

(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2004-508052

(P2004-508052A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/033	A O 1 K 67/033	5 O 1
A O 1 N 63/00	A O 1 N 63/00	A
A 6 1 K 38/00	A O 1 N 63/00	C
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 B O 2 4
		4 B O 6 3
		4 B O 6 5
		4 C O 8 4
		(全 201 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-525836 (P2002-525836)	(71) 出願人	591063187
(86) (22) 出願日	平成13年8月24日 (2001.8.24)		バイエル アクチェンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月7日 (2003.3.7)		ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン (
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/009771		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/020830		D-51368 Leverkusen,
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		Germany
(31) 優先権主張番号	100 44 098.3	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成12年9月7日 (2000.9.7)		弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100086405
(31) 優先権主張番号	100 53 785.5		弁理士 河宮 治
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000.10.30)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100103230
			弁理士 高山 裕貢
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物を同定し、かつ特徴付けるための試験システム及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、蠕虫及び節足動物由来の膜貫通受容体に基づく試験システム、蠕虫、節足動物に作用するかあるいは生物及び／又は細胞のカルシウム代謝に対する効果を有する物質を同定しかつ特徴付けるためのその使用に関する。さらに本発明は本試験システムにおける特異的なリガンドの使用、及び駆虫薬又は殺節足動物活性物質としてのその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

駆虫活性を有する物質を同定するたの、蠕虫由来のカルシウムチャネル膜貫通受容体の使用。

【請求項 2】

殺節足動物活性を有する物質を同定するための、節足動物由来のカルシウムチャネル膜貫通受容体の使用。

【請求項 3】

7 回膜貫通ドメインを有する G タンパク共役膜貫通受容体であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の膜貫通受容体の使用。

10

【請求項 4】

セクレチンサブファミリーの膜貫通受容体であることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

【請求項 5】

線虫由来の膜貫通受容体であることを特徴とする、請求項 1、3 又は 4 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

【請求項 6】

ダニ類由来の膜貫通受容体であることを特徴とする、請求項 2 ～ 4 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

【請求項 7】

ヘモンクス コントルトス由来の膜貫通受容体 H C 1 1 0 - R が関与することを特徴とする、請求項 1 及び 3 ～ 5 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

20

【請求項 8】

膜貫通受容体 H C 1 1 0 - R と相同的であることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

【請求項 9】

カルシウムチャネル遮断物質を同定するための、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

【請求項 10】

α - ラトロトキシシン結合膜貫通受容体であることを特徴とする、カルシウムチャネル遮断物質を同定するための、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の膜貫通受容体の使用。

30

【請求項 11】

請求項 1、3 ～ 5、及び 7 のいずれかに記載の膜貫通受容体のアゴニストとしての、α - ラトロトキシシンの使用。

【請求項 12】

殺線虫剤としての α - ラトロトキシシンの使用。

【請求項 13】

殺線虫活性及び／又は殺節足動物活性を有する化合物を同定するための方法における、α - ラトロトキシシンの使用。

【請求項 14】

H C 1 1 0 - R 受容体及びそれと相同的なタンパク質を得るための方法であって、原核生物又は真核生物発現系において該ポリペプチド又はその断片を発現させることを含む方法。

40

【請求項 15】

真核生物発現系が関与することを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

H E K 2 9 3 又は C O S 7 細胞を、その発現に用いることを特徴とする、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

受容体 H C 1 1 0 - R 及びそれと相同的な、可能性のあるタンパク質を一過的に発現する

50

宿主細胞。

【請求項 18】

受容体 H C 1 1 0 - R 及びそれと相同的な、可能性のあるタンパク質を安定に発現する宿主細胞。

【請求項 19】

エクオリンを発現することを特徴とする、請求項 18 に記載の宿主細胞。

【請求項 20】

寄託番号 D S M A C C 2 4 6 4 を付与された安定に形質転換された細胞系であることを特徴とする、請求項 18 に記載の宿主細胞。

【請求項 21】

寄託番号 D S M A C C 2 4 6 5 を付与された安定に形質転換された細胞系であることを特徴とする、請求項 18 又は 19 に記載の宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 18 ～ 21 のいずれかに記載の宿主細胞の安定な形質転換のための、及び請求項 17 に記載の宿主細胞の一過性形質転換のためのベクター。

【請求項 23】

ベクター p M y c 6 x H i s が関与することを特徴とする、請求項 18 又は 20 に記載の宿主細胞を安定に形質転換するためのベクター。

【請求項 24】

蠕虫及び／又は節足動物由来のカルシウムチャネル膜貫通受容体のアゴニスト及び／又は 20
アンタゴニストを同定するための方法であって、

a) 請求項 17 ～ 21 のいずれかに記載の宿主細胞又はそれらの膜と、化合物または化合物の混合物とを、蠕虫及び／又は節足動物由来のカルシウムチャネル膜貫通受容体のポリ 20
ペプチドと化合物との相互作用が可能な条件下で接触させる工程、及び、

b) 該ポリペプチドと特異的に結合する化合物を決定する工程、
を含む方法。

【請求項 25】

蠕虫又は節足動物由来のカルシウムチャネル膜貫通受容体の発現を変化させる化合物の同 30
定方法であって、

a) 請求項 17 ～ 21 のいずれかに記載の宿主細胞を、化合物又は化合物の混合物と接触 30
させる工程、

b) カルシウムチャネル膜貫通受容体濃度を測定する工程、及び

c) 蠕虫又は節足動物由来のカルシウムチャネル膜貫通受容体のポリペプチドの発現に特 30
異的に影響を及ぼす化合物を決定する工程、
を含む方法。

【請求項 26】

セクレチンサブファミリーの G タンパク共役膜貫通受容体又はその断片が関与することを 40
特徴とする、請求項 24 又は 25 に記載の方法。

【請求項 27】

膜貫通受容体 H C 1 1 0 - R 又はその断片、及びそれらと相同的なタンパク質が関与する 40
ことを特徴とする、請求項 24 又は 25 に記載の方法。

【請求項 28】

被験物質と膜貫通受容体とを、該受容体分子と該被験物質との相互作用が可能な条件下で 40
接触させ、次いで

a) 生じた被験物質の結合を検出し、そして

b) 被験物質存在下の受容体分子の活性と被験物質の非存在下の該活性とを比較すること 40
を特徴とする、請求項 24、26 及び 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

細胞ベースの試験システムを用いることを特徴とする、請求項 24 ～ 28 のいずれかに記 40
載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

請求項 17～21 のいずれかに記載の細胞を用いることを特徴とする、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

無細胞試験システムを用いることを特徴とする、請求項 24 及び 26～28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

被験物質と膜貫通受容体との相互作用を、それに結合した α -ラトロトキシンの置換によって検出することを特徴とする、請求項 24 及び 26～31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

被験物質と膜貫通受容体との相互作用を、それに結合したニフェジピンの置換によって検出することを特徴とする、請求項 24 及び 26～31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

請求項 24 及び 26～31 のいずれかに記載の方法におけるニフェジピンの使用。

【請求項 35】

請求項 24～34 のいずれかに記載の方法において同定される物質。

【請求項 36】

蠕虫及び／又は節足動物を抑制するための組成物を製造するための請求項 35 に記載の物質の使用。

【請求項 37】

駆虫剤及び／又は殺節足動物剤としての、HC110-R 受容体及びそれと相同的なタンパク質の調節物質の使用。

【請求項 38】

遺伝子組換え無脊椎動物を作製するための、HC110-R 受容体をコードする DNA 及びそれと相同的な DNA の使用。

【請求項 39】

HC110-R 受容体又はそれと相同的なタンパク質を含む遺伝子組換え無脊椎動物。

【請求項 40】

Drosophila melanogaster 及び *Caenorhabditis elegans* であることを特徴とする、請求項 39 に記載の遺伝子組換え無脊椎動物。

【請求項 41】

蠕虫由来の DNA を検出するための、HC110-R 受容体をコードする DNA と特異的にハイブリダイズする DNA オリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 42】

蠕虫由来の DNA を検出するための方法であって、

- a) HC110-R 受容体をコードする DNA またはその相補鎖、又はその 5' - 若しくは 3' - 隣接領域とハイブリダイズする DNA オリゴヌクレオチドを入手し、
 - b) 該 DNA オリゴヌクレオチドを DNA 含有試料と接触させ、
 - c) 該 DNA オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出し、
 - d) 検出した配列の配列を決定し、そして
 - e) 該配列を、HC110-R 受容体をコードする DNA 配列と比較すること
- を特徴とする方法。

【請求項 43】

HC110-R 受容体をコードする DNA 配列又はその断片あるいはそれらと相同的な DNA 配列を含む診断用試験キット。

【請求項 44】

DNA 配列が検出可能な指標と共に提供されていることを特徴とする、請求項 43 に記載の診断用試験キット。

【請求項 45】

ワクチン生産のための、HC110-R 受容体又はその断片及びそれらと相同的なタンパ

10

20

30

40

50

ク質の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、蠕虫 (helminth) 及び節足動物由来の膜貫通受容体に基づく試験システムに関し、並びに蠕虫、節足動物にて作用する又は生物宿主細胞のカルシウムバランスに作用する物質を同定および特徴付けるための本試験システムの使用に関する。さらに本発明は、本試験システムにおける特異的なリガンドの使用、及び駆虫又は殺節足動物活性物質としての該リガンドの使用に関する。

【0002】

寄生蠕虫及び節足動物は、ヒト及び動物の健康上重大な問題である。農業の分野だけでみても、このような寄生虫により引き起こされる損害を退治又は防止するためにかかる費用は、全世界合計で年間70億ドイツマルクを超える(1997年の統計)。多くの活性物質のクラスに属する数多くの活性物質が、主に蠕虫によって引き起こされる内因的寄生虫病(endoparasitoses)及び主として節足動物によって引き起こされる外因的寄生虫病(ectoparasitoses)を処置するために利用されている。ここ20年の間に、門(phylum)内の多数の寄生生物種(例えば、蠕虫)に対し、または様々な動物学的門(zoological phyla)(例えば、蠕虫及び昆虫)の範囲にまで拡張したとしても、非常に良好な作用を同時に示す活性物質の重要性が特に増大している。とりわけ前者には広範なスペクトルを有する駆虫薬、例えばベンズイミダゾール又はイミダゾチアゾールなどが挙げられ、後者としては大環状ラクトンが挙げられる。 10 20

【0003】

前回、新規の、広範な活性を有する活性物質の群が市場に出まわったのは、約20年前のことで、それは大環状ラクトンであった。しかしながら、多くの内因的寄生虫及び外因的寄生虫種は、活性物質の個々のクラス及び幾つかの場合には同時に様々なクラスに対する耐性を獲得している。従って、駆虫活性を有する新規物質を開発する必要性が継続し、緊急性が増大している。

【0004】

現在有効な活性物質の、数少ない有望な新しい群には、多数の特許の対象である環状デブシペプチド(WO 93/19053, EP 626 376, WO 94/19334, WO 95/07272, EP 626 375, EP 657 171, EP 657 172, EP 657 173)が含まれ、活性が調査されている(Conderら、1995; Martinら、1996; Sasakiら、1992; Terada M 1992; Samson-Himmelstjernaら、2000)。 30

【0005】

この群の活性物質の1つの代表、PF 1022A (シクロ(-D-Lac-L-MeLeu-D-PhLac-L-MeLeu-)₂)の作用機構を解明すべく、既に多くの研究が記載されている(参照として、DE-A-197 04 024中の該当箇所の情報)。これらには、環状デブシペプチドに対して特異的な結合タンパク質やヒツジ寄生虫Haemonchus contortus (DE-A-197 04 024)由来のタンパク質をコードしているDNA配列を同定し、かつ特徴づけることが記載された。本発明の範囲として、HC110-Rと称される上記タンパク質の機能的相互作用、特に環状デブシペプチドの更なる代表としてのリガンドBAY 44-4400 (cyclo(-D-Lac-L-MeLeu-D-p-モルホリニル-PhLac-L-MeLeu-))との機能的相互作用、を記載する。この目的のために、先の出願DE-A-197 04 024に記載の配列番号2に基づき、HC110-Rを発現する組換え真核細胞系を構築した。 40

【0006】

従って本発明は、特に蠕虫及び節足動物の、好ましくは線虫及びダニ類由来の、特に好ましくは毛様線虫(Trichostrongylidae)由来の、さらにより好ましく 50

は *Haemonchus spp.* 由来の膜貫通受容体に、とりわけ *H. contortus* 由来の受容体 HC110-R に基づき、被験化合物の高速大量処理（ハイスループットスクリーニング検定；HTS 検定）が可能な試験システムを提供することを目的とする。

【0007】

相同タンパク質は、文献 DE-A-197 04 024（本文献の教示は本出願に包含される）に記載の配列番号 2 に示す配列と、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 25 個、特に好ましくは 30 個の連続したアミノ酸、さらにとりわけ好ましくはその全長にわたって、少なくとも 70%、好ましくは 80%、特に好ましくは 90%、より好ましくは 95% 同一であるタンパク質とする。

10

【0008】

アミノ酸配列の同一性は、標準設定の GCG プログラムパッケージ、バージョン 9.1 の GAP プログラムを用いて決定することが好ましい（Devereux ら、1984）。

【0009】

本目的は、GPC 受容体の少なくとも 1 つの生物学的活性を発揮するポリペプチドを提供することによって、並びにこれらポリペプチドを得る方法を提供することによって、並びに殺線虫活性及び殺節足動物活性を有する化合物の同定方法を提供することによって、達成される。

【0010】

組換え微生物に基づく試験システムは、製薬的に活性な物質を同定するために多くの場で既に用いられており、また特に寄生虫遺伝子を組換え発現する微生物も使用されている（Klein and Gearsy 1997）。しかしながら、これまで、寄生虫膜貫通受容体を、標的として真核生物中にて組換え機能性タンパク質として用いたシステムは開示されていない。本発明中に記載する試験システムは、ハイスループットスクリーニング（HTS）又は超-HTS にて受容体の新規クラスを同定するのに用いることができる。

20

【0011】

線虫由来の受容体を組換え発現させることは通常困難である。従って、線虫由来の G タンパク共役受容体（GPCR）を、その機能特性（例えば、インヒビターに対する感受性）が天然受容体の特性に対応するような様式で発現させることは、今のところ一般に不可能である。

30

【0012】

真核生物系における、蠕虫、特に線虫由来の、及び節足動物由来の受容体の機能的発現は、例えば新規の駆虫薬又は殺節足動物薬を探索するのに、実用上、非常に重要である。

【0013】

従って、本発明はさらに、膜貫通受容体、特に線虫及び節足動物由来の GPC 受容体を発現させる可能な方法を提供することを目的とし、これを踏まえて、殺線虫活性及び殺節足動物活性を有する新規物質を同定することができる試験システムを開発することに基づく。

40

【0014】

従って、本発明は特に、蠕虫及び節足動物由来、好ましくは線虫及びダニ類由来、特に好ましくは毛様線虫由来、さらにより非常に好ましくは捻転胃虫由来、及び最も好ましくは寄生線虫 *H. contortus* 由来のオーファン G タンパク共役受容体を、殺線虫活性物質の効率的な探索のための標的タンパク質として発現させること、及び使用することに関する。

【0015】

この受容体を、胃腸線虫 *H. contortus* から得られた cDNA ライブラリーにて同定した。その cDNA は、110 kDa サイズの線虫の膜貫通タンパク質であって、HC110-R と称される膜貫通タンパク質をコードしている。このタンパク質は、G タ

50

ンパク共役受容体 (GPCR) のセクレチンファミリーに属しており、ラトロフィリン (latrophilin) と高い類似性を示す (図5)。

【0016】

標的としてのHC110-R受容体

GPCRラトロフィリンは、哺乳類の脳から独自に単離された。ラトロフィリンは分子量210kDaであり、第一の膜貫通セグメントの18残基上流で翻訳後開裂を受け、その結果、2つの非共有結合サブユニットから構成される。p120サブユニットはN末端の親水性細胞外タンパク質を含み、p85サブユニットは7回膜貫通ドメインとラトロフィリンの細胞内C末端領域とを含み、GPCRに対して異常に大きい。2つの近似した相同体、ラトロフィリン-2及びラトロフィリン-3が最近同定された (図6も参照のこと) 10。後者は、ラトロフィリン-1と同様に脳内で優先的に発現されるのに対し、ラトロフィリン-2は、優先的に哺乳類の胎盤、腎臓、脾臓、卵巣、心臓及び肺に偏在して発現される (Ichtchenkoら、1999; Sugitaら、1998)。

【0017】

HC110-Rはラトロフィリン210kDaの半分の大きさしかないが、配列の類似性は機能的な類似性にも及んでいる。両受容体に対する内因性リガンドは未だに知られていないが、ラトロフィリンとHC110-Rはいずれも、人工リガンド α -LTX (α -ラトロトキシン) により影響を受けることが知られている。

【0018】

例えば、HEK-293細胞をラトロフィリンで一過的にトランスフェクトする場合、放射性的 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いる実験計画により示すことができるように、 α -LTXの添加により外部 Ca^{2+} の流入を引き起こす。さらに α -LTXは、HC110-Rで一過的にトランスフェクションしたHEK-293細胞においても、 Ca^{2+} 流入を引き起こし、これは例えば Ca^{2+} イメージングにより観察できる) (図10及び11も参照のこと)。

【0019】

しかしながら、この Ca^{2+} 流入は非常に複雑である。HC110-Rが、C末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を結合した構築物の形である場合、流入は二相的である。即ち1つの変化は約3分後に、別のもう1つの変化は約22分後に見られる。しかしながら、HC110-Rの前にN末端のMyc-Hisタグのみある場合、主の流入は、 α -LTX 30を添加した約2~3分後にのみ観察される。この理由についてはまだ分かっていないが、 α -LTX添加に対する応答は、以下の説明によって示されるように特異的である：

1. Ca^{2+} 流入は、トランスフェクトしていない細胞及びマウス β_2 -アドレナリン作動性受容体で一過的にトランスフェクションした細胞では観察されない。
2. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は α -LTXの投与量に依存する (図10)。
3. 二相的な変化には、ニフェジピンに対するそれらの感受性から明らかなように、 Cd^{2+} によってブロックされ得る Ca^{2+} チャネル、特にLタイプのチャネルを介して起きる Ca^{2+} 流入であることが必要である。

【0020】

α -LTXとHC110-Rとの相互作用及びシグナル伝達の正確なメカニズムには、さらに説明が必要である。ラトロフィリン-1の例については、 α -LTXによって引き起こされるHEK-293細胞中への Ca^{2+} 流入に、単一の膜貫通ドメインのみが必要であることを証明することが可能である (Kraspernovら、1999)。

【0021】

本明細書に記載されたシステムにおいてニフェジピンが α -LTXの効果ブロックするという事実は、本システムは、新規の特異的なカルシウムチャネル遮断物質 (ブロッカー) を同定するのに適当であることを示している。ニフェジピンは、カルシウムチャネルアゴニスト及びアンタゴニストのクラスに属し、それらはカルシウムチャネルの特定の部位に対する結合、例えばLタイプのチャネルに対する結合に基づいて、分類される。カルシウムチャネル遮断物質の主要な3つのクラス (Lタイプ) には、ベンジルアセトニトリ 50

ル (benzylacetone nitrile) (例えば、ベラパミル (verapamil), WO 91/02497)、ベンゾチアゼピノン (例えば、ジルチアゼム)、及び 1, 4-ジヒドロピリジン誘導体 (例えば、ニフェジピン、ニバルジピン (nivaldipine)、ニモジピン、ニカルジピン、イスラジピン、アムロジピン、ニトレンジピン、フェロジピン又はニソルジピン) がある (Baconら、1989; WO 90/09792)。L-タイプカルシウムチャネル遮断物質の別のクラスには、1, 3-ジホスホナート、例えばベルフォソジルが含まれる。

【0022】

従って本発明はまた、新規カルシウムチャネル遮断物質を同定するための、 α -LTX 結合膜貫通受容体の使用に関する。7回ラセン膜貫通受容体はこの目的の使用に特に好ましく、Gタンパク結合受容体であることが特に好ましい。セクレチンファミリーの膜貫通受容体の使用は特に非常に好ましい。最も好ましいのは、配列番号2に示されるHC110-R受容体、及びそれと70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%、そして非常に好ましくは95%相同的である受容体タンパク質の使用である。

【0023】

入手可能なデータは、さらに、HC110-Rが新規駆虫薬デブシペプチドBAY44-4400の標的であることを示している。BAY44-4400は、HC110-RでトランスフェクションしたHEK-293細胞において α -LTXによるシグナル伝達を妨害する (図12)。この妨害は、他のデブシペプチド、例えばビューヴァリシン (beauvericin)、エニアチン (enniatin) などに典型的なように、BAY44-4400のイオン透過活性から生じ得る (Geßnerら、1996)。しかしながら、BAY44-4400は非トランスフェクト細胞では何の変化も引き起こさない。さらに、BAY44-4400は、マウス β_2 アドレナリン作動性受容体を用いてトランスフェクションしたHEK-293細胞を介するイソプロテレノール誘導性シグナル伝達を妨害しない。加えて、BAY44-4400は、 α -LTXのアンタゴニストとして作用するが、それ単独ではHC110-RでトランスフェクションしたHEK-293細胞中の Ca^{2+} 濃度に影響を及ぼさない。

【0024】

HC110-Rタンパク質

DE 197 04 024 A1に記載の膜タンパク質は、駆虫薬活性物質 PF1022Aの可能性のある標的タンパク質であると同定された。寄生線虫Haemonchus contortusの λ ZAPII cDNA発現ライブラリーを調製し、PF1022AとKLH (キーホール リンペットヘモシアニン) とのコンジュゲート PF1022A-KLHおよびこのコンジュゲートに対するポリクローナル抗体を用いてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、可能性のある標的タンパク質を同定した (実施例1を参照のこと)。非増殖組換えクローン約 1.5×10^6 の試験により、H. contortus由来の3.6 kb mRNAとハイブリダイズする3036 bp長のcDNAクローンが明らかとなった (実施例2も参照のこと)。RACE PCR法を用いて、3'末端及び5'末端を補完した (実施例4)。最終的に、3539 bp長のcDNAを得、これをHC110-Rと称した。このcDNAは、ATG¹⁰⁰で始まるオープンリーディングフレームを有する986アミノ酸 (110 kDa) をコードしている (図2)。この開始コドンは、翻訳を最適に開始させるためのコザック配列に囲まれている。このタンパク質の導かれた分子量を、インビトロにて転写されたHC110-R RNAのインビトロ翻訳により確認した。

【0025】

HC110-Rタンパク質のアミノ酸配列は特定の構造を幾つか示す。このタンパク質の細胞外N末端部分は、全部で535残基から成る。このN末端には、21アミノ酸長のシグナルペプチド及び18位の開裂部位が含まれる。その次に、レクチン様配列 (AA 22-215) 及び144位のセリンが唯一割り込んで存在しているいわゆる「Thr ストレッチ」 (AA 128-147) がある。この「Thr ストレッチ」の下流には、

構造 $CX_9WX_{12}CX_9WXCX_5WX_9CX_3W$ (AA 166-221) を有するシステイン豊富(リッチ)モチーフがある。さらに、HC110-Rタンパク質は、536残基と772残基の間に7回疎水性ラセン膜貫通ドメインを含んでいる。この膜貫通領域のすぐ上流に、構造 $CXWWX_6WX_4CX_{11}CXC$ (AA 478-524) の4-Cys領域がさらに存在する。膜貫通領域に、残基587-597, 654-673及び743-749を含む3つの細胞外ループと、3つの細胞内ループ(559-569位, 627-636位, 696-724位)がある。C末端は、214残基長(24 kDa)であり、プロリンリッチ部分(AA 845-861)やPEST領域(AA 915-933)を含む。最後に、誘導された細胞内ドメイン中に、さらに残基26、499及び862の3個の推定N-グリコシル化部位、並びに14個の推定リン酸エステル化部位がある(図6も参照のこと)。

10

【0026】

データベース分析により、HC110-Rタンパク質は、線虫 *Caenorhabditis elegans* のゲノムクローンB0457(ジーンバンクTMアクセッションナンバーZ54306)から得られる未知の膜貫通タンパク質(10014 AA)と48%同一で、78%類似していることが明らかとなった(図3も参照のこと)。

【0027】

本明細書にて用いる用語「同一性」は、いわゆるアライメントにて一致する配列部位の数を表す。これはアライメント長の百分率として示される。

【0028】

本明細書中で用いられる用語「類似性」は、類似性計量に基づく配列の類似性であり、言い換えると、例えばバリンをスレオニン又はロイシンと仮定して、どの程度類似しているかの尺度である。

20

【0029】

本明細書中で用いられる用語「相同的」は、進化上の関係を意味する、言い換えると、2つの相同タンパク質が共通の祖先配列から派生したものであるかどうかを意味する。この用語は、通常、相同配列の方がより類似している又はアライメントにおける一致部位が非同相配列よりも多いという事実は別にして、同一性又は類似性と何らかの関係がある必要はない。

【0030】

2つの配列の比較によって、例えばレクチン様配列、「Thrストレッチ」、Cysモチーフ及びPEST配列など、両方のタンパク質に共通する特徴が示される。膜貫通領域で最も高い同一性が見出される(62%)のに対し、N末端領域(44%)及びC末端領域(50%)における同一性はそれほど顕著ではない。

30

【0031】

さらに、HC110-Rタンパク質は、7回ラセンGタンパク共役膜貫通受容体(GPCR)、特にセクレチンサブファミリーに対して20~30%の同一性を有する。7回膜貫通ドメインの比較により、構造及び配列に関してセクレチンサブファミリーの種々のGPCRとHC110-Rとの間に高い同一性及び類似性が示される(図4)。

【0032】

セクレチンサブファミリーのメンバーであるラトロフィリン、哺乳類、例えばヒト由来(ジーンバンクTMアクセッションナンバー: E1360690)、ウシ由来(例えば、G416021、G416053及びG4185804)、及びラット由来(U78105又はU72487)は、他のセクレチン受容体よりも、HC110-Rに対して幾分高い同一性を示す。特に、膜貫通領域の同一性は45~48%を示す。HC110-R及び1466アミノ酸のラットラトロフィリン-1 GPCR(U78105)は、例えば、膜貫通領域の前にレクチンドメイン、システイン豊富ドメイン及び保存的な4-Cysモチーフがあるなど共通の特徴を示す。後者は、ラトロフィリン及び他の巨大セクレチンGPCRのタンパク質分解部位であることが最近示された。比較すると、HC110-RのN末端は、ラトロフィリンのオルファクトメジン領域及びPro/Thr領域を含まな

40

50

いが、ラトロフィリンはその代わり、HC110-Rの「Thr ストレッチ」を有しない。

【0033】

従って、本出願はさらに、駆虫活性を有する物質を同定するための、蠕虫由来の7回膜貫通ドメインを有するGタンパク共役膜貫通受容体の使用に関する。本発明に基づき、セクレチンサブファミリーが有し得る膜貫通受容体の使用が好ましい。

【0034】

細胞での局在

一過性トランスフェクション実験は、種々の哺乳類細胞系、例えばCOS-7細胞又はHEK-293細胞において、HC110-R-GFP融合タンパク質を用いて行なった（図7）。H. contortus細胞系がまだ確立されていないため、非相同的発現を選択した。 10

【0035】

パシフィック・クラゲAequorea victoria由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）は、生細胞においてタンパク質の場所を特定するために用いることができる（図8を参照のこと）。GFPは、一過性トランスフェクト又は安定なトランスフェクトの頻度を示すためのインビボレポーターとして細胞レベルで、及びタンパク質の局在を特定するために細胞下レベルで用いられる。野生型GFPは、UVライト（360～400nm；最大395nm）又は青色ライト（440～480nm；最大475nm）による励起後に最大509nmの緑色光を発する、238アミノ酸から構成される27kDaのモノマーであり、外来物質又は補因子を必要としない（Chalfieら、1994）。したがって、GFPは蛍光顕微鏡により直接インビボ検出でき、かつその蛍光特徴は融合タンパク質の一部であっても本質的に変わることはない。EGFP（増強GFP）は、野生型GFPの遺伝的変異体であり、哺乳動物細胞のトランスフェクトに用いられる（Yangら、1996）。EGFPの最大励起は、Ser⁶⁵をThrに置換することで唯一の490nmのピークに移動した。ベクターpEGFP-C1（ジーンバンクアクセッションナンバー：U55763）及びpEGFP-N3（ジーンバンクアクセッションナンバー：U55762）〔クローンテック、Palo Alto, CA, U.S.A.〕は、強力な構成性CMVプロモーターの退治下にEGFPを発現し、EGFPのN末端及びC末端のそれぞれに別のタンパク質を融合させるために用いることができる。 20 30

【0036】

安定な細胞系は、全ての細胞が所望のタンパク質を恒常的に発現し、局在化した後も所望のタンパク質を単離できる点で、一過性発現よりも有利である。蛍光顕微鏡又はウェスタンブロットの助けによってタンパク質を検出するために、所望のタンパク質に対する抗体が必要であるか、または、実際のタンパク質のC末端にMyc又はHisタグを正しいリーディングフレームで融合させる発現ベクターを選択することが適当であり、大抵の場合、モノクローナル抗体であっても、それに対する抗体を購入することができる。

【0037】

同様に、本発明は、HC110-R受容体及び可能であればそれと相同的なタンパク質を安定に発現する細胞に関する。 40

【0038】

HC110-Rタンパク質に対するα-ラトロトキシンの効果

HC110-Rとラトロフィリンとの間の類似性をさらに実証するため、及び組換え的に発現したHC110-Rの機能を試験するため、HEK-293細胞を、HC110-R-GFP融合タンパク質を用いて一過的にトランスフェクト及び安定にトランスフェクトし、α-ラトロトキシン（α-LTR）を用いて刺激した。

【0039】

α-ラトロトキシンは、クロゴケグモ（Latrodectus mactans）毒から単離し得るシナプス前神経毒である。脊椎動物の中樞神経系に対するその毒性は知られ 50

ており、 $[Ca^{2+}]_i$ を増大させ、神経伝達物質の非退治型のエキソサイトーシスを刺激することで神経の脱分極を引き起こす。このように、 α -ラトロトキシンの効果は、少なくとも部分的にラトロフィリンにより媒介されることも明らかとなった。さらに、 α -ラトロトキシンの毒性は、GTP結合タンパク質と共役する受容体(GPCR)と相互作用するその能力に拠るものであると推定される。これらの受容体は、通常、内因性ホルモン又は神経ペプチドの効果を媒介する(Holz及びHabener 1998)。

【0040】

トランスフェクションしたHEK-293細胞の α -LTXに対する応答を試験するため、本発明では、この細胞中に存在する Ca^{2+} 即ち $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定することによる、いわゆる Ca^{2+} イメージング技術を用いた(実施例24、及び図9、10及び11を参照)。

【0041】

α -LTXは、 $[Ca^{2+}]_i$ の二相的な増大を引き起こす。75 nMの濃度で、 α -LTXは、まず、 α -LTXの添加から2分後に僅か 5 ± 0.2 nMの非常に小さな増大を生じ、22分後に約 220 ± 14.9 nM Ca^{2+} の大きい遅延型の増大を生じる。 α -LTXの濃度が増加(7.5 nM~120 nM)するにつれ、最初の増大は大きくなり、第二の増大は小さくなる。120 nMの α -LTX濃度で、第一の増大値は約 135 ± 13.6 nM Ca^{2+} に達するが、一方で第二の増大値は約 50 ± 7.1 nM Ca^{2+} にまで落ち込む。90 nM及び120 nMの α -LTXを用いる同じプロファイルでは飽和を示す。

【0042】

N末端GFPタグHC110-R構築物を用いてHEK-293細胞をトランスフェクトし、それを α -LTX 75 nMで刺激すると、第二のピークが僅かに低下する。また、HC110-Rタンパク質をN末端GFPタグを用いて提供した場合、最終的に、 α -LTXに対する応答がほんの僅か減少した。従って、GFPタグのN-又はC-末端への結合は、HC110-Rによる α -LTX結合及び次のシグナル伝達に対する影響を無視できると考えられる。

【0043】

トランスフェクトしていない、又はGFPを用いて単に一過的にトランスフェクションした細胞は、 α -LTXに対して応答を示さない。C末端GFPタグを有する他のGタンパク共役受容体、例えばマウス β_2 アドレナリン作動性受容体、又はヒトムスカリン性H1アセチルコリン受容体を用いてHEK-293細胞を一過的にトランスフェクションした場合に、濃度75 nMの α -LTXにより引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の増大は、ほんの僅かである(20分後に約 40 ± 10.4)か、又はゼロである。

【0044】

α -LTXにより引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の増大は、細胞外 Ca^{2+} の流入と細胞内 Ca^{2+} の流出の両方につながり得る。 α -LTXを添加する前又は後に、細胞外 Ca^{2+} を2 mM EGTAを用いて除去した場合、HC110-R-GFP融合タンパク質を発現するHEK-293細胞の $[Ca^{2+}]_i$ にはほんの僅かな増大が表れる。このことから、 α -LTXは主に、細胞外 Ca^{2+} の流入を引き起こすことが明らかである。この Ca^{2+} 流入は、単純拡散に基づくものではなく、原形質膜の Ca^{2+} チャネルの力により生じる。

【0045】

15 μ Mのニフェジピンは、 $[Ca^{2+}]_i$ の α -LTX誘導性の増大を有意に低下させるに十分であることから、 Ca^{2+} 流入に関与する Ca^{2+} チャネルの大部分はLタイプである。さらに、第一の増大が完全に阻害され、第二の増大は 267 ± 12.7 nMから 30 ± 5.4 nMにまで落ち込む。

【0046】

また、C末端Myc/Hisタグを有するHC110-R受容体を発現する安定な又は一過性のHEK-293細胞系は、 α -LTXに用量依存的に応答する(図10を参照のこ

と)。7.5 nMの α -LTXでは、この場合でも同様に、 α -LTX-誘導性の Ca^{2+} 流入を生じさせるには少なすぎる。しかしながら、さらに25 nM α -LTXは、僅か2分後に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を 130 ± 38.0 nMにまで増大させるのに十分である。7.5 nM α -LTXを添加することで 296 ± 91.5 nMの Ca^{2+} 流入が生じる、これは α -LTX添加2分後に同様に非常に増大し、たった27分後にもとの Ca^{2+} 含有量に戻る。この Ca^{2+} シグナルは、シグナルの高さ及びそのプロファイルについて、同じ α -LTX濃度(7.5 nM)のHC110-R-GFPトランスフェクトHEK293細胞の第二の遅延型の Ca^{2+} ピークに似ているが、その応答は(また、高濃度(90 nM及び120 nM)のHC110-R-GFPトランスフェクト細胞について同様に) α -LTX添加後すぐに起こる。

10

【0047】

従って、本発明は同様に、線虫由来のセクレチン(secretin)ファミリーの膜貫通受容体のアゴニストとしての、 α -LTXの使用に関する。 α -LTXは、配列番号2に示すHC110-R受容体、及びそれと70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%、さらにとりわけ非常に好ましくは95%相同的である受容体タンパク質のアゴニストとして用いることが好ましい。

【0048】

同様に、本発明は殺線虫剤としての α -LTXの使用に関する。

【0049】

同様に、本発明は、殺線虫活性又は殺節足動物活性を有する化合物、膜貫通受容体のアゴニスト又はアンタゴニストとして活性である可能性のある化合物を同定する方法における、 α -LTXの使用に関する。

20

【0050】

同様に、本発明は、カルシウムチャネルをブロックする化合物を同定する方法における、 α -LTXの使用に関する。

【0051】

α -LTXの作用に対するBAY 44-4400の効果

PF1022Aは、具体的な種に依存して、100~800 ng/mLの濃度範囲で線虫に対してその効果を発揮する(Terada, 1992)。HC110-RとPF1022Aとの間の何らかの可能性のある相互作用、及びHC110-Rにより媒介されるシグナル伝達を、各場合において調べるため、PF1022Aの容易に可溶化する誘導体であるBAY44-4400を、FURA-2をローディングし、HC110-R-GFPでトランスフェクションしたHEK-293細胞における、以下の Ca^{2+} イメージング実験に用いた。

30

【0052】

400 ng/mLの濃度では、細胞を活性物質で90分間プレインキュベーションしても、非常に有効な殺線虫剤BAY44-4400及び事実上効果のない鏡像体PF1022-001のいずれも、HC110-R-GFPでトランスフェクションしたHEK293細胞において Ca^{2+} 応答を引き起こさない。これとは対照的に、両物質は、程度は異なるが、 α -LTXに依存してシグナル伝達に影響を及ぼす(図12及び14)。4 ng/mLのBAY44-4400の存在下では、 α -LTXは、14分後に最大 44 ± 6.0 nM Ca^{2+} の小さい Ca^{2+} 増大のみを誘導する(図12)。しかしながら、PF1022-001の存在下では、 α -LTXは、6分後に 103 ± 11.5 nM Ca^{2+} のより大きな増大を引き起こす(図10B)。別の方法では、細胞を4 ng/mL又は400 ng/mLのBAY44-4400及びPF1022Aと90分間プレインキュベーションし、次いで活性物質を除去したのち、細胞を α -LTXで刺激した。PF1022AとプレインキュベーションしたHEK-293細胞は、 α -LTXに対する応答において有意な変化はなかった。BAY44-4400のみが、 α -LTXに対する細胞の感受性に影響を及ぼした。濃度4 ng/mLのBAY44-4400において、 α -LTXは、安定な Ca^{2+} レベルに達する19分前に、 Ca^{2+} 増大(95 ± 20.5 nM C

40

50

Ca^{2+}) を誘導した。400 ng/mL の BAY 44-4400 では、 α -LTX は、約 $65 \pm 7.5 \text{ nM}$ Ca^{2+} だけ Ca^{2+} 濃度の増大をもたらした。さらに、この小さな増大は 12 分移動した。

【0053】

これらの結果の特異性を確認するため、さらに、内因性の天然 M1-R に対する 1 mM カルバコールの効果を、非トランスフェクト HEK-293 細胞において測定した。400 ng/mL の BAY 44-4400 の存在は、細胞の応答に変化を及ぼさなかった。HEK-293 細胞において、内因性の天然 β_2 -R の、又はニコチンコリン作動性受容体の、イソプロテレノール及びアレコリンにより誘導された刺激はいずれも、BAY 44-4400 によって何ら影響を受けなかった。

10

【0054】

最後に、本発明の範囲内である、C 末端に GFP を伴って提供される HC110-R タンパク質を一過的にまたは安定に発現する HEK-293 細胞における HC110-R タンパク質に対する、PF1022A 変異体のより可溶性の変異体である BAY 44-4400 の効果を、 Ca^{2+} イメージングにより調べた。HEK-293 細胞を 400 ng/mL の BAY 44-4400 のみとインキュベートすると、細胞は、細胞内の Ca^{2+} 濃度における変化とは類似しない様式で 50 分間応答した。しかしながら、BAY 44-4400 の効果は α -LTX の存在下で認められる。75 nM α -LTX を加える前に、細胞を BAY 44-4400 と 6 分間インキュベートすることで、 Ca^{2+} 濃度に対する α -LTX の効果が低下する。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ における最初の小さな増大は見られず、第二の増大は α -LTX を加えた 15 分後に 85% にまで低下する。 α -LTX に対する応答は、細胞を FURA で 30 分間処理する前に、BAY 44-4400 と 60 分間プレインキュベーションした場合、さらに強力なものとなる。 Ca^{2+} の最初の増大は全く見られず、70 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の非常に小さな第二の増大が、75 nM α -LTX を加えた 30 分後に見られるのみである。

20

【0055】

α -LTX の作用に対する BAY 44-4400 の特異的な効果を示すため、2 つの対照実験を行なった。最初に、HEK-293 細胞を、C 末端に GFP タグを伴って提供されるマウス β_2 -アドレナリン作動性受容体で一過的にトランスフェクト又は安定にトランスフェクトして、イソプロテレノールをリガンドとして用いた。

30

【0056】

実際に、イソプロテレノールも有意な Ca^{2+} 応答を引き起こす：イソプロテレノールを添加した後すぐに、 Ca^{2+} の増大のみが表れる。しかしながら、この増大は BAY 44-4400 の影響を受けない。

【0057】

さらに、BAY 44-4400 と HC110-R との間の相互作用の特異性は、リガンドとして BAY 44-4400 の部位を占める光学対掌体によって示される。駆虫活性が 100 倍弱い PF1022A 誘導体、PF1022-001：シクロ (−L−Lac−D−MeLeu−L−PhLac−D−Me−Leu−)₂ (光学対掌体とも称する) を 400 ng/mL 用いて、細胞を 90 分間前処理した後、75 nM α -LTX を添加した 6 分後に、僅か 110 nM Ca^{2+} の増大が表れた、これは 59% にまで低下したことを意味する。4 ng/mL の光学対掌体を、75 nM α -LTX を添加する 6 分前に加えた場合、 α -LTX を添加してすぐに 67 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増大がみられる。光学対掌体の濃度を増加した場合、増大は 20 nM Ca^{2+} にまで低下する。

40

【0058】

本明細書中にて用いられる用語「ポリペプチド」は、通常、ペプチド、オリゴペプチド又はオリゴマーと称される短いアミノ酸鎖と、通常タンパク質と称される長いアミノ酸鎖との両方を意味する。これには、天然のプロセス、例えば翻訳後プロセッシングによるか、あるいは最先端の化学的方法によるかのいずれかによって修飾され得るアミノ酸鎖が含まれる。このような修飾は、ポリペプチドの様々な部位で、かつ 1 つ以上が生じ得る、例え

50

ばペプチド骨格（バックボーン）で、アミノ酸側鎖で、アミノ末端宿主カルボキシ末端で生じ得る。これらには、例えばアセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビン、ヘム部分、ヌクレオチド若しくはヌクレオチド誘導体、脂質若しくは脂質誘導体またはホスファチジルイノシトールとの共有結合、環化、ジスルフィド架橋形成、ジメチル化、シスチン形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質加水分解プロセッシング、リン酸化、セレノイル化及びtRNA媒介のアミノ酸付加が包含される。

【0059】

ポリペプチドは、本発明に基づいて、「成熟」タンパク質の形態において、又は大きなタンパク質（例えば、融合タンパク質）の一部として用いることができる。これには、さらに分泌配列又は「リーダー」配列、プロ配列（*pro-sequences*）、簡単な精製を可能にする配列（例えば複数のヒスチジン残基）、又はさらなる安定化アミノ酸が包含され得る。

10

【0060】

相同タンパク質又は相同ポリペプチドは、文献DE-A-197 04 024（本文献の教示は本出願に包含される）に記載の配列番号2に示す配列と少なくとも70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%、とりわけ非常に好ましくは95%一致し、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、特に好ましくは少なくとも30個の連続アミノ酸、とりわけ非常に好ましくはその完全長を有するタンパク質又はポリペプチドとする。

【0061】

本発明のポリペプチドの使用によれば、ポリペプチドは完全な受容体を表す必要はなく、少なくとも完全な受容体の生物学的活性を有してさえいれば、その単なる断片であって良い。さらに、ポリペプチドはH. contortusの膜貫通受容体から得られるものである必要もない。蠕虫又はさらに節足動物の別の種の膜貫通受容体に対応するポリペプチドあるいはその受容体の生物学的活性を発揮することさえできればその断片でさえ、本発明に従うものとする。

20

【0062】

本発明のポリペプチドの使用に関して、ポリペプチドは、完全なGPC受容体の生物学的活性を少なくとも1つを発揮しさえすれば、天然のGPC受容体の対応する領域と比較して欠失又はアミノ酸置換を有していても良い。保存的な置換が好ましい。このような保存的置換には、1つのアミノ酸が以下の群由来の別のアミノ酸に置換された変異体を包含する：

30

1. 小さい脂肪族、無極性又は僅かに極性のある残基：Ala, Ser, Thr, Pro及びGly；
2. 極性、負に帯電している残基及びそのアミド：Asp, Asn, Glu及びGln；
3. 極性、正に帯電している残基：His, Arg及びLys；
4. 大きな脂肪族、無極性残基：Met, Leu, Ile, Val及びCys；並びに
5. 芳香族残基：Phe, Tyr及びTrp。

40

【0063】

以下のリストは、好ましい保存的置換を示す：

元の残基	置換
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

10

20

30

40

50

【0064】

上記の配列、及びDE-A-197 04 024の配列番号1及び配列番号3に記載の配列は、蠕虫又は節足動物中の機能的に類似の膜貫通受容体の構造に参与するポリペプチドをコードする遺伝子を見い出すのにも用いることができる。本発明に基づく機能的に類似の受容体とは、本明細書中に記載のポリペプチドとアミノ酸配列が異なっているけれども、本質的に同じ生物学的機能を有しているポリペプチドを包含する受容体を意味する。

【0065】

本明細書にて用いる用語「本質的に同じ生物学的機能」とは、機能することが可能なGタンパク共役7回ラセン膜貫通受容体、特にセクレチンサブファミリーの受容体、の構造における関与、又はH. contortus由来のHC110-R受容体に相当する機能を意味する。該機能には、該受容体の上記の特性、例えばアゴニストとしての α -LTX又は α -LTXのアンタゴニストとしてのニフェジピンに対する感受性も、また含まれる。

【0066】

本明細書にて用いる用語「ハイブリダイズ」は、1本鎖の核酸分子が相補鎖と塩基対を形

成するプロセスを表す。本明細書中に記載の情報の配列から出発することで、例えば、H. contortus 以外の他の線虫由来、及び節足動物由来の、GPC受容体の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするDNA断片を単離できる。

【0067】

適当なプローブに関して、アミノ末端及びカルボキシ末端のcDNA部分が好ましい。ハイブリダイゼーション条件は、他の生物に由来する類似性の低い配列を検出することもできるように選ばれる。ストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件は、以下のようのものでよい：例えば、ハイブリダイゼーション溶液として6×SSC／0%ホルムアミド中、40～55℃でハイブリダイゼーションを行なう。2回目の洗浄工程の条件は試験しなければならない、例えば、まず50℃にて2×SSCで行ない、次いでそのシグナルの強度を評価する。次いで、洗浄条件に変更を加える。

【0068】

適当なハイブリダイゼーション条件を、以下に例示として示す：

ハイブリダイゼーション溶液：6×SSC／0%ホルムアミド、好ましいハイブリダイゼーション溶液：6×SSC／0%ホルムアミド

ハイブリダイゼーション温度：34℃、好ましいハイブリダイゼーション温度：42℃

1回目の洗浄工程：40℃にて2×SSC

2回目の洗浄工程：45℃にて2×SSC；好ましい2回目の洗浄工程：55℃にて0.6×SSC；特に好ましい2回目の洗浄工程：65℃にて0.3×SSC。

【0069】

ハイブリダイゼーション条件は、以下の式により適宜計算する：

融解温度 $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log [c(\text{Na}^+)] + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 500/n$

(Lottspeich and Zorbas 1998)。

【0070】

式中、cは濃度であり、nは塩基対のハイブリダイズする配列部分の長さである。500/nの項は100bpを超える配列について除外される。最大のストリンジェンシーの洗浄は、 T_m より5～15℃低い温度で、15mM Na^+ のイオン強度(0.1×SSCに相当する)である。ハイブリダイゼーションにRNAプローブを用いる場合、溶解温度は10～15℃高くなる。

【0071】

殺線虫活性及び殺節足動活性を有する化合物を同定するための本発明の方法に用いるポリペプチドは、DE-A-197 04 024に記載の配列番号1及び配列番号3に記載の核酸によりコードされる。

【0072】

また、本発明の方法に含まれるものとしては、少なくとも20個、好ましくは少なくとも100個、特に好ましくは少なくとも500個の連続したヌクレオチド、及びとりわけより好ましくは完全長にわたって、配列番号1又は配列番号3に示される配列と少なくとも70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%、とりわけより好ましくは95%一致するものが挙げられる。

【0073】

同様に、本発明に記載の核酸は、遺伝子組換え無脊椎動物を作製するのに用いることができる。後者は、本発明の受容体又は野生型とは異なるその変異体の発現に基づく試験システムにおいて用いることができる。これには、他の遺伝子又は遺伝子退治配列(例えば、プロモーター)の修飾が、そのために本発明の受容体またはその変異体の発現における変化を引き起こす、全ての遺伝子組換え無脊椎動物も含まれる。

【0074】

遺伝子組換え無脊椎動物の作製は、例えば、Drosophila melanogasterにおいてはP因子介在の遺伝子導入によって、又はCaenorhabditis elegansにおいてはトランスポゾン介在の遺伝子導入によって行なわれる(例え

10

20

30

40

50

ばT c 1、P l a s t e r k 1 9 9 6)。

【0075】

従って、本発明は、本発明の少なくとも1つの核酸を含む遺伝子組換え無脊椎動物、好ましくは*Drosophila melanogaster* または*Caenorhabditis elegans*の種の遺伝子組換え無脊椎動物、及びその遺伝子組換え体の子孫にも関する。遺伝子組換え無脊椎動物は、本発明に基づく受容体を野生型とは異なる形態で含んでいることが好ましい。

【0076】

本発明の核酸は、慣用の方法で作製することができる。例えば、核酸分子の完全な化学合成が可能である。さらに、本発明の配列のごく短い1片だけを化学的に合成し、そのようなオリゴヌクレオチドを放射活性又は蛍光染色によって標識することもできる。標識したオリゴヌクレオチドは、線虫mRNA又は昆虫mRNAを出発物質として作製したcDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いることができる。この標識したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするクローンを、関連するDNAから単離するために選択する。単離したDNAを特徴付けした後、本発明の核酸を簡単な方法により得る。

10

【0077】

また、本発明に基づく核酸は、化学合成したオリゴヌクレオチドを用いるPCR法により作製することもできる。

【0078】

本明細書にて用いる用語「オリゴヌクレオチド」は、10～50ヌクレオチド、好ましくは15～30ヌクレオチドからなるDNA分子を意味する。それらは、例えば、化学合成でき、プローブとして用いることができる。

20

【0079】

本発明に基づく核酸は、コード領域近傍に天然に存在する調節領域の単離と特徴付けのために用いることができる。

【0080】

同様に、本発明の方法により、本発明にしたがって使用される核酸又は本発明にしたがって使用されるDNA構築物を含むベクターを使用する。使用し得るベクターは、分子生物学の実験室で用いられる、全てのファージ、プラスミド、ファージミド、ファスミド、コスミド、YAC、BAC、人工染色体又は粒子銃に適した粒子である。

30

【0081】

好ましいベクターには、植物細胞用のpBINおよびその誘導体、酵母細胞用のpFL61、細菌細胞用のpBLUESCRIPTベクター、ファージ用のλZAP (Stratagene製)がある。

【0082】

種々のベクターが用いられ、多くの構築物が本発明の範囲内で作製される。同様に、本発明は細胞系の一過性または安定な形質転換およびHC110-R受容体の安定な発現のために用いるベクターに関する。

【0083】

N末端EGFPタグを有する融合タンパク質(EGFP-HC110-R)又はC末端EGFPタグを有する融合タンパク質(HC110-R-EGFP)を発現するEGFP構築物を、真核生物細胞における一過性発現のために作製した。同様に、本発明は、これらのベクター及び慣用のGFPベクターによってコードされるポリペプチド、およびレッドシフト変異体及びブルーシフト変異体に関する。

40

【0084】

更なる構築物、ベクターpMyc6xHisは安定な発現に用いることができ、同様に本発明はそれらに関する。ベクターpMyc6xHisは、制限酵素NhiIとSfiIでの2重消化した後、末端を平滑化し、ベクターを再びライゲーションすることによって、ベクターpSecTagA [Invitrogen, Leek, NL]から得られる。

【0085】

50

さらに、本発明は本発明にしたがって用いられる核酸、又は本発明にしたがって用いられるベクターを含む宿主細胞に関する。

【0086】

本発明は特に、HC110-R-Myc/Hisを用いて安定に形質転換したHEK-293細胞系(38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, Microorganismen und Zellkulturen GmbHから国際寄託当局DSMZ-Deutsche Sammlungに、ナンバーDSMA CC2464として寄託した)に関する。

【0087】

本発明は同様に、本発明にしたがって用いられる核酸または本発明にしたがって用いられるベクター、及び細胞が Ca^{2+} の存在下で発光する発光タンパク質、エクオリンを発現することを可能にするベクターを含む宿主細胞に関する。対応する宿主細胞は、 Ca^{2+} 濃度の変化、即ち、例えばHC110-Rに対する物質の効果を、エクオリン指示薬の助けを借りて追跡することが可能である。本発明は特に、エクオリンを発現することが可能で、38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, Microorganismen und Zellkulturen GmbHから国際寄託当局DSMZ-Deutsche Sammlungに、ナンバーDSMA CC2465として寄託されたHC110-R-Myc/Hisによって安定に形質転換したHEK-293細胞系に関する。

【0088】

本明細書にて用いる用語「宿主細胞」は、本発明の核酸を天然では含まない細胞に関する。

【0089】

適切且つ好ましい宿主細胞は、酵母、哺乳動物、両生類、昆虫又は植物細胞などの真核生物細胞である。好ましい真核生物宿主細胞には、HEK-293、Schneider S2、Spodoptera Sf9、Kc、CHO、HepG-2、K1、COS-1、COS-7、HeLa、C127、3T3又はBHK細胞があり、特にアフリカツメガエル(xenopus oocytes)及びHEK-293又はCOS-7細胞がとりわけ好ましい。

【0090】

同様に、本発明は、蠕虫由来の、特に好ましくは線形動物門、とりわけ好ましくは毛様線虫科由来の、とりわけさらに好ましくは捻転胃虫属由来の、及び最も好ましくはHaemonchus contortus由来のDNAの検出のための、出願番号DE-A-197 04 024に記載の配列番号2に対応するDNAの使用に関する。

【0091】

さらに、本発明は上記のDNA配列の領域又はその相補鎖に対応するオリゴヌクレオチド、及びそれとハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドに関する。本発明は、それらのオリゴヌクレオチド又はその一部の、

a) ノーザンブロット分析又はサザンブロット分析におけるプローブ、
b) 上記の蠕虫を検出するための診断方法におけるPCRプライマー(ここに、該PCRプライマーとPCR技術を利用して、関連する蠕虫のDNAを特異的に増幅し、同定する)

としての使用に関する。

【0092】

さらに、本発明は、好ましくは線形動物門の、特に好ましくは毛様線虫科の、さらにより好ましくは捻転胃虫属の、及び最も好ましくはHaemonchus contortusの蠕虫を検出する方法であって、上記オリゴヌクレオチドは該生物由来のDNA配列と特異的にハイブリダイズし、次いでPCR技術により増幅される方法に関する。

【0093】

既述生物の検出は、例えば

10

20

30

40

50

- a) 本発明のH C 1 1 0 - RをコードするD N Aまたはその相補鎖、またはその5'若しくは3'隣接領域とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを提供し、
- b) 該オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを、適当に調製したD N A含有試料と接触させ、
- c) 該オリゴヌクレオチド又はプライマーのハイブリダイゼーションを（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて）検出し、
- d) 検出したH C 1 1 0 - R遺伝子の配列を決定し、そして、
- e) この配列と本発明に記載のD N A配列、好ましくは出願番号D E - A - 1 9 7 0 4 0 2 4に記載の配列番号2の配列とを比較する、
- ことによって行なうことができる。

10

【0094】

同様に、本発明は、好ましくは線形動物門の、特に好ましくは毛様線虫科の、さらにより好ましくは捻転胃虫属の、及び最も好ましくは*Haemonchus contortus*の蠕虫を検出する診断試験キットに関し、キットは、上記系統の群から種を検出する方法に用いることができる上記オリゴヌクレオチドを特に利用する。

【0095】

同様に、本発明は上記の診断試験キットに関し、この試験キットに利用できるオリゴヌクレオチドは検出可能なマーカーと共に提供される。そのような検出可能なマーカーには、特に酵素、酵素基質、補酵素、酵素阻害物質、蛍光マーカー、発色団、発光マーカー及び放射性同位体が挙げられる。

20

【0096】

さらに、本発明は、蠕虫、好ましくは線形動物門、特に好ましくは毛様線虫科、さらにより好ましくは捻転胃虫属及び最も好ましくは*Haemonchus contortus*由来の、上記H C 1 1 0 - Rポリペプチドまたはその断片、またはそれらと70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%及びよりさらに好ましくは95%相同な受容体タンパク質の、少なくとも1つのH C 1 1 0 - Rポリペプチド又はその断片、またはそれらと70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%及びよりさらに好ましくは95%相同な受容体タンパク質を含有するワクチンを生産するための使用に関する。この場合、このワクチンは、上記H C 1 1 0 - Rタンパク質に特異的な免疫応答を誘発できる。

30

【0097】

好ましい態様において、ワクチンは、抗原決定基、例えば出願番号D E - A - 1 9 7 0 4 0 2 4に記載の配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドの一個の決定基、又は上記D N A又はその断片によりコードされるポリペプチドの一個の決定基を含んでいる。

【0098】

さらに本発明は、本発明にしたがって用いられるポリペプチドを生産する方法に関する。周知の核酸によりコードされているポリペプチドは、その核酸を含む宿主細胞を好ましい条件下にて培養することによって製造することができる。次いで、所望のポリペプチドは、従来法により細胞又は培地から単離できる。また、そのポリペプチドをインビトロの系で製造することもできる。

40

【0099】

本発明の核酸を用いて宿主細胞によって合成させた本発明に記載のポリペプチドを単離する迅速な方法は、例えば実施例に記載のように、単純な方法で融合パートナーをアフィニティー精製することができる融合タンパク質の発現によって開始される。融合パートナーは、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼが挙げられる。次いで、その融合タンパク質をグルタチオンアフィニティーカラムにて精製できる。融合パートナーは、例えば融合パートナーと精製される本発明ポリペプチドとの間のリンカーでの、部分的なタンパク質加水分解開裂により除去できる。このリンカーは、トリプシンによる開裂のための部位を規定するアルギニンやリシン残基などの標的アミノ酸を含むよう設計することができる。

50

そのようなリンカーは、オリゴヌクレオチドを用いる標準的なクローニング法を用いることによって作製することができる。もう1つの可能な方法は、ヒスチジン融合タンパク質の使用と、 Ni^{2+} タロン (Talon) カラム上でのその精製に基づく。

【0100】

さらに可能な精製法としては、調製用電気泳動法、FPLC、HPLC（例えば、ゲルろ過カラム、逆相カラム又は微疎水性 (slightly hydrophobic) カラムを用いる）、ゲルろ過、区別的精製 (differential precipitation)、イオン交換クロマトグラフィー及びアフィニティークロマトグラフィーに基づく。

【0101】

受容体様タンパク質キナーゼは膜タンパク質であるため、この精製法においては、例えば、本ポリペプチドの2次構造及び3次構造に僅かにしか又は全く影響を及ぼさない界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤を用いて、界面活性剤抽出を行なうことが好ましい。

【0102】

本発明にしたがって使用されるポリペプチドの精製には、本発明の核酸を発現する宿主細胞から出発する膜の単離が含まれ得る。そのような細胞は、HC110-R遺伝子を元来発現する細胞由来の膜と比較して、少なくとも10倍、好ましくは少なくとも100倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍の量で膜区画に見られるポリペプチド量に十分なコピー数のポリペプチドを発現する細胞であることが好ましい。

【0103】

本明細書中で用いる用語「単離又は精製」は、ポリペプチドを他のタンパク質又は細胞若しくは組織の他の巨大分子から分離することを意味する。ポリペプチドを含む本発明の組成物は、宿主細胞由来の調製物と比較して、タンパク質量が少なくとも10倍、特に好ましくは少なくとも100倍豊富であることが好ましい。

【0104】

また、本発明のポリペプチドは、該ポリペプチドに結合する抗体を用いれば、融合パートナーを用いることなくアフィニティー精製できる。

【0105】

さらに、本発明は上記ポリペプチド又は受容体と特異的に結合する抗体に関する。そのような抗体は慣用の方法により精製される。例えば、そのような抗体は、実質的な免疫担当宿主に、H. contortus由来のHC110-R受容体のような本発明の膜貫通受容体、又はその断片の、抗体産生に十分な量を注射し、次いでその抗体を単離することにより製造しうる。さらに、それ自体が周知である方法にて、モノクローナル抗体を産生する不死化細胞系を得ることができる。抗体は、検出試薬を用いて適当に標識化できる。そのような標識試薬の好ましい例としては、酵素、放射標識エレメント、蛍光化学物質、又はビオチンがある。完全抗体に代えて、所望の特異的な結合特性を有する断片を用いることもまた可能である。

【0106】

本明細書にて用いる用語「アゴニスト」は、膜貫通受容体を活性化する分子を意味する。

【0107】

本明細書にて用いる用語「アンタゴニスト」はアゴニストの結合部位にてアゴニストに取って代わるかアゴニストの機能を阻害する分子を表す。

【0108】

本明細書にて用いる用語「モジュレーター」はアゴニスト及びアンタゴニストの総称である。モジュレーターは、本発明に記載のポリペプチドと結合する小さい有機化合物分子、ペプチド又は抗体であっても良い。さらにモジュレーターは、ある分子に結合する小さな有機化合物分子、ペプチドまたは抗体であって、その分子が今度は本発明のポリペプチドに結合することによりその生物学的活性に影響を与えるものであってよい。モジュレーターは、天然の基質及びリガンドの模擬物であっても良い。

【0109】

10

20

30

40

50

モジュレーターは、小さな有機化合物であることが好ましい。

【0110】

ポリペプチドに対するモジュレーターの結合は、それらで処置した蠕虫又は節足動物の細胞のプロセスを変え、死に至らしめ得る。

【0111】

従って、本発明はさらに、駆虫剤及び殺節足動物剤としてのポリペプチドのモジュレーターの使用にも及ぶ。

【0112】

同様に、本発明は、特に、駆虫剤としての α -LTXの使用に関する。

【0113】

また、本発明の方法における核酸又はポリペプチドの本発明に従う使用は、本発明の受容体と結合する化合物を見出すことを可能にする。同様に、後者は駆虫剤として、例えば植物については殺線虫剤として、又は動物については駆虫活性物質として用いることができる。例えば、核酸を含み、その対応する受容体又はポリペプチドを発現する宿主細胞、或いはその遺伝子産物を、宿主細胞、受容体又は個々のポリペプチドと少なくとも1つの化合物とが相互作用できる条件下で、化合物又は化合物の混合物と接触させる。

【0114】

本発明は、蠕虫又は節足動物由来の膜貫通受容体、好ましくはセクレチンサブファミリーのGPCR、特に好ましくはH. contortus由来の受容体HC110-Rと結合し、配列がそれらと70%、好ましくは80%、特に好ましくは90%、さらにより好ましくは95%一致する受容体と結合する、殺線虫活性物質を同定するために適当な方法に、特に関する。しかしながら、本方法は、本明細書に記載の種以外の種由来のHC110-R相同受容体を用いて実施することもできる。本発明のHC110-R以外の受容体を用いる方法は、本発明に完全に包含される。

【0115】

本発明に記載の方法には、ハイスループットスクリーニング（例えば、ハイスループットスクリーニング（HTS）及び超ハイスループットスクリーニング（UHTS））が含まれる。この目的のために、本発明の核酸及び／又は本発明に記載のポリペプチドを含む宿主細胞及び無細胞調製物の両方を使用することができる。

【0116】

無細胞試験システム

化合物及び天然抽出物を試験することを目的とする多くの試験システムは、与えられた期間に試験する物質の数を最大にするため、ハイスループット用に設計される。無細胞操作に基づく試験システムは、精製した又は半精製したタンパク質を必要とする。これらは、標的タンパク質に対するある物質の効果の可能性を主として検出することを目的とする「初期の」試験に適当である。

【0117】

細胞毒性などの効果は、これらインビトロの系では、通常無視する。この試験システムは、物質の阻害または抑制効果と刺激効果の両方をさらに試験する。物質の効果は、一連の濃度依存試験により確認することができる。被験物質を含まない対照混合物は、その効果を評価するために用いることができる。

【0118】

細胞ベース試験システム

HC110-R及び相同受容体の活性を調節する物質を同定するための、細胞ベースの試験システムの開発は、本発明によって利用可能なHC110-R受容体で安定にトランスフェクションした細胞系により開発が可能であるが、本発明に基づいて同定することができる他の種由来の対応する相同受容体によっても開発することができる。

【0119】

同様に、本発明はカルシウムチャネル遮断物質として有効なその他の化合物の同定を可能にする。

10

20

30

40

50

【0120】

モジュレーターは、合成反応混合物（例えば、インビトロ翻訳の産物）または細胞を構成する物質、例えば、膜又は本ポリペプチドを含む他の任意の調製物をアゴニスト及びアンタゴニストであり得る候補分子の存在下又は非存在下にて、本ポリペプチドの標識した基質又はリガンドと共にインキュベートすることによって見い出すことができる。本発明のポリペプチドの活性を増大又は低下させる候補分子の能力は、標識したリガンドの結合を増大又は低下させることあるいは標識した基質の変換を増大又は低下させることから明らかとなる。十分に結合し且つ本発明のポリペプチドの活性を増大させる分子がアゴニストである。十分に結合するが本発明に記載のポリペプチドの生物学的活性を引き起こさない分子が、おそらく良いアンタゴニストである。

10

【0121】

シンチレーション近接アッセイ (SPA)

H C 1 1 0 - R 及びそれと相同な受容体タンパク質の活性を調節する物質を同定するための1つの可能性として、シンチレーション近接アッセイ (SPA) と呼ばれるものがある (E P - A - 0 1 5 4 7 3)。この試験システムは、放射能標識したリガンド（例えば、小さな有機分子又は第二の放射能標識したタンパク質分子）と受容体（例えば、H C 1 1 0 - R）との相互作用を利用するものである。この場合、受容体を、シンチレーティング分子と共に提供される微粒子又はビーズと結合させる。放射能の減衰の間に、球形のシンチレーティング物質は放射性マーカーの素粒子により励起され、検出可能な光子を発する。シグナルを発するようリガンドにより放射された粒子のみが、受容体又はH C 1 1 0 - R と結合したリガンドにより発せられるものとなるよう、試験条件を最適化する。

20

【0122】

1つの可能な態様では、H C 1 1 0 - R を、被験物質との相互作用または結合を伴う又は伴わずにビーズと結合させる。さらに、この場合、H C 1 1 0 - R 受容体の断片を用いることも可能であろう。放射能標識したリガンドは、例えば、標識した α - L T X、ニフェジピン又は標識したデブシペプチドであって良い。結合性リガンドを、固定化したH C 1 1 0 - R 受容体と結合させる場合、このリガンドは、それ自体を接触部分の領域に結合させるために、固定化したH C 1 1 0 - R と標識化リガンドとの間に存在する相互作用を阻害又は破壊する必要があるであろう。次いで、標識したH C 1 1 0 - R 受容体とのうまく結合したものを、閃光で検出することができる。同様に、固定化した標識化リガンドと固定化していない標識化リガンドとの間の複合体は、被験物質の結合により破壊され、閃光で検出できる強度に減衰する。次いで、その試験システムは補助的な阻害システムに対応する

30

【0123】

2 ハイブリッドシステム

全細胞に基づく試験システムの別の例としては、2 ハイブリッドシステムと呼ばれるものがある。その具体的な例としては、相互作用トラップと呼ばれるものがある。これには、酵母における相互作用するタンパク質を遺伝的に選択することが関係する（例えば、G y u r i s ら、1 9 9 3 を参照のこと）。この試験システムは、検出可能なシグナルを生じる相互作用の成功を通じて、2つのタンパク質の相互作用を検出し、そして描写するよう設計される。

40

【0124】

そのような試験システムは、大量の被験物質を所定の期間内に試験するのにも応用できる。

【0125】

このシステムは、2つのベクター、即ち「おとり」ベクターと「餌食」ベクターの構築に基づく。本発明のH C 1 1 0 - R 又はその断片をコードする遺伝子をおとりベクター中にクローニングした後、D N A 結合タンパク質であるL e x A タンパク質との融合タンパク質として発現させる。H C 1 1 0 - R 相互作用パートナー、例えば α - L T X をコードする第2の遺伝子を、餌食ベクター中にクローニングし、B 4 2 餌食タンパク質との融合タ

50

ンパク質として発現させる。両ベクターは、*lacZ*又は*HIS2*レポーター遺伝子の5'側に*LexA*結合DNAのコピーを含む*Saccharomyces cerevisiae*宿主に存在する。この2つの融合タンパク質の間で相互作用が起こると、受容体遺伝子の転写が活性化される。被験物質の存在により、この相互作用が阻害又は破壊されると、この2つの融合タンパク質はもはや相互作用できず、レポーター遺伝子産物も産生されない。

【0126】

置換試験

本発明に記載のポリペプチドのモジュレーターを見つけることができる別の方法の例としては置換試験があり、これは、この目的に適した条件下にて、本発明のポリペプチドと可能性のあるモジュレーターとを、本発明のポリペプチドと結合することが知られている分子、例えば天然の基質若しくはリガンド、又は基質若しくはリガンド模擬体と、共に合わせる試験である。 α -LTXは、本発明の方法に従って、この試験に好ましく使用される。

10

【0127】

既知の分析システム、例えば、*Biacore AB, Uppsala, Sweden*のシステムは、完全なHC110-Rタンパク質、またはHC110-RのN-宿主C末端欠失変異体、インビトロ突然変異誘発又は他の既知の方法により改変されたHC110-R分子のその他の変異体を用いる、分子相互作用試験に用いることができる。これには、1つに

20

(i) HC110-R受容体又はその断片を、既知の化学的方法（アミン、チオール、アルデヒドを介したカップリング）により結合させること、又はバイオチップへのアフィニティー結合（例えば、ストレプトアビジン-ビオチン、IMAC）させること、あるいはもう1つに、

(ii) α -LTX又は別のモジュレーター、例えばBAY44-4400又は他の可能性のあるリガンドを、(i)に記載したようにそのチップに結合させることが必要である。

【0128】

固定化した分子と、溶液中に存在するリガンド（HC110-Rタンパク質又は任意のモジュレーター、例えばBAY44-4400など）との結合を、物理的に測定する。*Biacore Instrument*にて、金の薄層を有するセンサーチップ上にリガンドを固定化する。分析物の溶液は、チップ上のマイクロフローセルによって拡散する。固定化されたリガンドに分析物が結合することにより、その表面の局所的な濃度が増大し、その媒体付近の金層の屈折率が徐々に増大する。これは、金属中の自由電子（プラズモン）と器具から発せられる光子との間の相互作用に対する効果である。この物理的变化は、チップ上の分子の質量及び数に比例し、そのリガンド-分析物間の結合をリアルタイムで記録し、みかけの結合／解離定数を決定することが可能である（Fivashら、1998）。結合の特異性は、競合実験により立証する。

30

【0129】

さらに、対応する測定を、リガンドの結合に重要なHC110-Rタンパク質ドメインを決定するために、及び新規の、これまで開示されていないHC110-Rのリガンドを同定するために用いる。

40

【0130】

カルシウムイメージング

カルシウムイメージング又はシグナリングは、HC110-Rと相互作用する物質を検出するもう1つの方法と考えられる（例えば、図11及び10を参照のこと）。これには、細胞内カルシウムレベルの変化を検出可能にするよう補助するカルシウム指示薬の使用が必要である。カルシウム指示薬をローディングしたHC110-R発現細胞をこの方法に用いる。HC110-Rアゴニストにより引き起こされるカルシウム流入が存在する場合、または細胞内カルシウムの放出が存在する場合、指示薬のカルシウム取り込みの関数と

50

して、UV照射下で吸光度の変化が現れる。アンタゴニストは、このシステムでは、アゴニスト（例えば、 α -LTX）により誘導されるカルシウムシグナルを完全に又は部分的に抑制することによって同定することができる。この目的に好ましい可能なカルシウム指示薬には、Fura-2 (Sigma) 又は Indo-1 (molecular probes) がある。

【0131】

さらに、カルシウム指示薬は可視光により励起され、その蛍光特性が、カルシウム取り込みに依存して検出可能な形で変化する。指示薬 Fluo-3 及び Fluo-4 は、カルシウム親和性が高い。Fluo-4 は、強い蛍光シグナルを有し、HEK-293 細胞の場合のように、細胞を低濃度でのみ用いる試験システムにおける測定に特に好ましい。さらに、指示薬として、Rhod-2、x-Rhod-1、Fluo-5N、Fluo-5F、Magg-Fluo-4、Rhod-5F、Rhod-5N、Y-Rhod-5N、Magg-Rhod-2、Magg-X-Rhod-1、カルシウムグリーン-1 及び -2、カルシウムグリーン-5N、オレゴングリーン488 BAPTA-1、オレゴングリーン488 BAPTA-2 及び -5N、Furaレッド、カルセイン (calcein) などがある。

10

【0132】

カルシウム指示薬を細胞にローディングする別法として、標的細胞における発光タンパク質の組換え発現がある。そして、これらの発光タンパク質は、カルシウムイオンと複合体を形成すると、光を発するように応答する。すでに多くの研究や試験システムによく用いられている発光タンパク質として、エクオリンがある。標的タンパク質をエクオリンと同時に発現する細胞は、まず初めに、この試験方法において発光団セレンテラジンと共にローディングする。細胞により形成されるアポエクオリンは、セレンテラジンおよび二酸化炭素と複合体を形成する。続いてカルシウムも細胞に入り、この複合体と結合すると、二酸化炭素を放出し青色の光（最大発光約 466 nm）を発する。この場合の光の発光は、細胞内存在するカルシウムの濃度と相関する。

20

【0133】

このように、本発明は同様に、HC110-R、その断片、又は他の生物由来の類似タンパク質の使用に関し、該受容体の機能又は該受容体に対するモジュレーターの結合が、エクオリン又は同様の発光タンパク質により媒介される光シグナルにより検出される。

30

【0134】

また、この方法において、本発明の核酸を含む宿主細胞又は遺伝子導入無脊椎動物を使用することによって、受容体の発現に変化を及ぼす物質を見い出すことができる。そのような物質もまた、価値ある駆虫薬を示し得る。

【0135】

したがって、本発明の方法により見出される活性物質は、動物の害虫、特に農場、森林、倉庫において発生する昆虫、クモ及び線虫の退治、材料の保護、及び衛生部門に好ましい。本発明の方法により見出される活性物質は、線虫及びクモを退治するのに特に好ましい。上記の害虫には、以下のものが含まれる。

【0136】

Isopoda目に属するもの、例えば、*Oniscus asellus*, *Armadillidium vulgare*, *Porcellio scaber*。

Diplopoda目に属するもの、例えば、*Blaniulus guttulatus*。

Chilopoda目に属するもの、例えば、*Geophilus carpophagus*, *Scutigera spp.*。

Symphyla目に属するもの、例えば、*Scutigerebella immaculata*。

Thysanura目に属するもの、例えば、*Lepisma saccharina*。

Collembola目に属するもの、例えば、*Onychiurus armatus*

40

50

。

Orthoptera目に属するもの、例えば、*Acheta domesticus*, *Gryllotalpa* spp., *Locusta migratoria migratorioides*, *Melanoplus* spp., *Schistocerca gregaria*。

Blattaria目に属するもの、例えば、*Blatta orientalis*, *Periplaneta americana*, *Leucophaea maderae*, *Blattella germanica*。

Dermaptera目に属するもの、例えば、*Forficula auricularia*。

10

Isoptera目に属するもの、例えば、*Reticulitermes* spp.。

Phthiraptera目に属するもの、例えば、*Pediculus humanus corporis*, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Trichodectes* spp., *Damalinia* spp.。

Thysanoptera目に属するもの、例えば、*Hercinothrips femoralis*, *Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Franklinella accidentalis*。

Heteroptera目に属するもの、例えば、*Eurygaster* spp., *Dysdercus intermedius*, *Piesma quadrata*, *Cimex lectularius*, *Rhodnius prolixus*, *Triatom* 20
a spp.。

20

【0137】

Homoptera目に属するもの、例えば、*Aleurodes brassicae*, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aphis gossypii*, *Brevicoryne brassicae*, *Cryptomyzus ribis*, *Aphis fabae*, *Aphis pomi*, *Eriosoma lanigerum*, *Hyalopterus arundinis*, *Phylloxera vastatrix*, *Pemphigus* spp., *Macrosiphum avenae*, *Myzus* spp., *Phorodon humuli*, *Rhopalosiphum padi*, *Empoasca* spp., *E* 30
uscelis bilobatus, *Nephotettix cincticeps*, *Lecanium corni*, *Saissetia oleae*, *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens*, *Aonidiella aurantii*, *Aspidiotus hederae*, *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp.。

30

【0138】

Lepidoptera目に属するもの、例えば、*Pectinophora gossypiella*, *Bupalus piniarius*, *Cheimatobia brumata*, *Lithocolletis blancardella*, *Hyponomeuta padella*, *Plutella xylostella*, *Malaco* 40
soma neustria, *Euproctis chrysorrhoea*, *Lymantria* spp., *Bucculatrix thurberiella*, *Phyllocnistis citrella*, *Agrotis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp., *Earias insulana*, *Heliothis* spp., *Mamestra brassicae*, *Panolis flamm*
ea, *Spodoptera* spp., *Trichoplusia ni*, *Carpocapsa pomonella*, *Pieris* spp., *Chilo* spp., *Pyrausta nubilalis*, *Ephesia kuehniella*, *Galleria mellonella*, *Tineola bisselliella*, *Tinea pellionella*, *Hofmannophila pseudosp* 50

50

retella, Cacoecia podana, Capua reticulana, Choristoneura fumiferana, Clysia ambigua, Homona magnanima, Tortrix viridana, Cnaphalocerus spp., Oulema oryzae.

Coleoptera目に属するもの、例えば、Anobium punctatum, Rhizopertha dominica, Bruchidius obtectus, Acanthoscelides obtectus, Hylotrupes bajulus, Agelastica alni, Leptinotarsa decemlineata, Phaedon cochleariae, Diabrotica spp., Psylliodes chrysocephala, Epilachna varivestis, Atomaria spp., Oryzaephilus surinamensis, Anthonomus spp., Sitophilus spp., Otiorrhynchus sulcatus, Cosmopolites sordidus, Ceuthorrhynchus assimilis, Hypera postica, Dermestes spp., Trogoderma spp., Anthrenus spp., Attagenus spp., Lyctus spp., Meligethes aeneus, Ptinus spp., Niptus hololeucus, Gibbium psyllioides, Tribolium spp., Tenebrio molitor, Agriotes spp., Conoderus spp., Melolontha melolontha, Amphimallon solstitialis, Costelytra zealandica, Lissorhoptrus oryzophilus.

Hymenoptera目に属するもの、例えば、Diprion spp., Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Vespa spp.

Diptera目に属するもの、例えば、Aedes spp., Anopheles spp., Culex spp., Drosophila melanogaster, Musca spp., Fannia spp., Calliphora erythrocephala, Lucilia spp., Chrysomya spp., C. uterebra spp., Gastrophilus spp., Hyppoboscidae spp., Stomoxys spp., Oestrus spp., Hypoderma spp., Tabanus spp., Tannia spp., Bibio hortulanus, Oscinella frit, Phorbia spp., Pegomyia hyoscyami, Ceratitis capitata, Dacus oleae, Tipula paludosa, Hylemyia spp., Liriomyza spp.。

【0139】

Siphonaptera目に属するもの、例えば、Xenopsylla cheopis, Ceratophyllus spp.。

【0140】

Arachnida綱に属するもの、例えば、Scorpio maurus, Latrodectus mactans, Acarus siro, Argas spp., Ornithodoros spp., Dermanyssus gallinae, Eriophyes ribis, Phyllocoptiruta oleivora, Bophilus spp., Rhipicephalus spp., Amblyomma spp., Hyalomma spp., Ixodes spp., Psoroptes spp., Chorioptes spp., Sarcoptes spp., Tarsonemus spp., Bryobia praetiosa, Panonychus spp., Tetranychus spp., Hemitarsonemus spp., Brevipalpus spp.。

【0141】

植物寄生線虫としては、例えば、*Pratylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Ditylenchus dipsaci*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp., *Aphelenchoides* spp., *Longidorus* spp., *Xiphinema* spp., *Trichodorus* spp., *Bursaphelenchus* spp. が挙げられる。

【0142】

本発明に記載の方法を用いることで見い出された活性物質は、植物、衛生及び貯蔵品の害虫だけでなく、マダニ(hard ticks)、ヒメダニ(soft ticks)、疥癬ダニ(mange mites)、葉ダニ(leaf mites)、ハエ(嘔むおよび舐める)、寄生性のハエ幼虫、しらみ、毛じらみ、毛皮しらみ(fur lice)及びノミなどの動物寄生生物(外寄生生物)に対する動物薬部門についても作用する。この寄生生物には、以下のものが含まれる。

【0143】

*Anoplurida*目に属するもの、例えば、*Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Phthirus* spp., *Solenopotes* spp.。

*Mallophagida*目に属するもの、並びに、*Amblycerina*及び*Ischnocerina*亜目に属するもの、例えば、*Trimenopon* spp., *Menopon* spp., *Trinoton* spp., *Bovicola* spp., *Werneckiella* spp., *Lepikentron* spp., *Damalina* spp., *Trichodectes* spp., *Felicola* spp.。

【0144】

*Diptera*目に属するもの、並びに*Nematocerina*及び*Brachycerina*亜目に属するもの、例えば、*Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp., *Simulium* spp., *Eusimulium* spp., *Phlebotomus* spp., *Lutzomyia* spp., *Culicoides* spp., *Chrysops* spp., *Hybomitra* spp., *Atylotus* spp., *Tabanus* spp., *Haematopota* spp., *Philipomyia* spp., *Braula* spp., *Musca* spp., *Hydrotaea* spp., *Stomoxys* spp., *Haematobia* spp., *Morellia* spp., *Fannia* spp., *Glossina* spp., *Calliphora* spp., *Lucilia* spp., *Chrysomyia* spp., *Wohlfahrtia* spp., *Sarcophaga* spp., *Oestrus* spp., *Hypoderma* spp., *Gasterophilus* spp., *Hippobosca* spp., *Lipoptena* spp., *Melophagus* spp.。

【0145】

*Siphonapterida*目に属するもの、例えば、*Pulex* spp., *Ctenocephalides* spp., *Xenopsylla* spp., *Ceratophyllus* spp.。

【0146】

*Heteropterida*目に属するもの、例えば、*Cimex* spp., *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp., *Panstrongylus* spp.。

【0147】

*Blattarida*目に属するもの、例えば、*Blattella orientalis*, *Periplaneta americana*, *Blattella germanica*

10

20

30

40

50

, *Supella* spp.。

【0148】

Acaria (*Acarida*) 亜綱に属するもの、並びに *Meta*-及び *Mesos* *stigmata* 目に属するもの、例えば、*Argas* spp., *Ornithodor* *us* spp., *Otobius* spp., *Ixodes* spp., *Amblyom* *ma* spp., *Boophilus* spp., *Dermacentor* spp., *Haemophysalis* spp., *Hyalomma* spp., *Rhipice* *phalus* spp., *Dermanyssus* spp., *Raillietia* spp., *Pneumonyssus* spp., *Sternostoma* spp., *Varroa* spp.。

10

【0149】

Actiniedida (*Prostigmata*) 及び *Acaridida* (*Ast* *igmata*) 目に属するもの、例えば、*Acarapis* spp., *Cheylet* *iella* spp., *Ornithocheyletia* spp., *Myobia* spp., *Psorergates* spp., *Demodex* spp., *Trom* *bicula* spp., *Listrophorus* spp., *Acarus* spp., *Tyrophagus* spp., *Caloglyphus* spp., *Hypo* *dectes* spp., *Pterolichus* spp., *Psoroptes* spp., *Chorioptes* spp., *Otodectes* spp., *Sarc* *optes* spp., *Notoedres* spp., *Knemidocoptes* spp., *Cytodectes* spp., *Laminosioptes* spp.。

20

【0150】

本発明に記載の方法によって見い出された活性物質もまた、ダニ、特に家塵ダニ、例えば *Dermatophagoides pteronyssinus* 及び *D. farina* *e* を退治するのに好ましい。

【0151】

本発明に記載の方法を用いることで見い出された活性物質もまた、農業生産家畜、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ロバ、ラクダ、水牛、ウサギ、ニワトリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、ミツバチ、その他ペット（例えば、犬、猫、かごの鳥及び観賞魚）、およびいわゆる実験動物（例えば、ハムスター、ギニーピッグ、ラット及びマウス）などに寄生する節足動物を退治するのに好ましい。これらの節足動物の退治は、死亡率の低減や生産性（肉、ミルク、毛、皮、卵、蜂蜜などの）の減少を低減し、その結果、より経済的でより容易な動物の管理が本発明の活性物質の使用を通じて可能になる。

30

【0152】

同様に、記載された方法により見い出された化合物及びポリペプチドは、ヒトの、または生産性家畜、ペット、動物園の動物並びに研究および実験用動物の病原内因的寄生虫によって感染した動物やヒトを処置するのに有用である。

【0153】

正常株、感受性株及び耐性株の開発における全ての戦略に、本化合物を用いることができる。これらの化合物の1またはそれ以上を含む組成物を用いる処置によって、生産性家畜における経済的損失を防ぎ、かつヒト及び動物における疾患を処置することが可能である。以下の寄生生物は、見出された活性物質の標的として特に興味深いものである。

40

【0154】

Enoplida, 例えば、*Trichuris* spp., *Capillaria* spp., *Trichomosoides* spp., *Trichinella* spp. *Rhabditia*, 例えば、*Micronema* spp., *Strongyloides* spp.

Strongylida, 例えば、*Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp., *Oesophagodontus* spp., *Trichon*

50

ema spp.、Gyallocephalus spp.、Cylindropharynx spp.、Poteriosstomum spp.、Cyclococercus spp.、Cylicostephanus spp.、Oesophagostomum spp.、Chabertia spp.、Stephanurus spp.、Ancylostoma spp.、Uncinaria spp.、Bunostomum spp.、Globocephalus spp.、Syngamus spp.、Cyathostomum spp.、Cylicocyclus spp.、Neostrongylus spp.、Cystocaulus spp.、Pneumostrongylus spp.、Spicocaulus spp.、Elaphostrongylus spp.、Parelaphostrongylus spp.、Crenosoma spp.、Paracrenosoma spp.、Angiostrongylus spp.、Aelurostrongylus spp.、Filaroides spp.、Parafilaroides spp.、Trichostongylus spp.、Haemonchus spp.、Ostertagia spp.、Marshallagia spp.、Cooperia spp.、Nematodirus spp.、Hyostongylus spp.、Obeliscoides spp.、Amidostomum spp.、Ollulanus spp.、Dictyocaulus spp.、Muellerius spp.、Protostongylus spp.

10

【0155】

20

Oxyurida、例えば、Oxyuris spp.、Enterobius spp.、Passalurus spp.、Syphacia spp.、Aspiculuris spp.、ヘテラキス (Heterakis) spp.

【0156】

Ascaridia、例えば、回虫 spp.、Toxascaris spp.、Toxocara spp.、Parascaris spp.、Anisakis spp.、Ascaridia spp.

Spirurida、例えば、Gnathostoma spp.、Physaloptera spp.、Thelazia spp.、Gongylonema spp.、Habronema spp.、Parabronema spp.、Draschia spp.、Dracunculus spp.

30

Filarida、例えば、Stephanofilaria spp.、Parafilaria spp.、Setaria spp.、Loa spp.、Dirofilaria spp.、Litomosoides spp.、Brugia spp.、Wuchereria spp.、Onchocerca spp.

Gigantorhynchida、例えば、Filicollis spp.、Moniliformis spp.、Macracanthorhynchus spp.、Prosthenorchis spp.

Mastigophora (Flagellata)

Trypanosomatidae、例えば、Trypanosoma b. brucei、T. b. gambiense、T. b. rhodesiense、T. congolense、T. cruzi、T. evansi、T. equinum、T. lewisi、T. percae、T. simiae、T. vivax、Leishmania brasiliensis、L. donovani、L. tropica

40

Trichomonadidae、例えば、Giardia lamblia、G. canis.

Sarcomastigophora (Rhizopoda)、例えば、Entamoeba histolytica

Hartmannellidae、例えば、Acanthamoeba sp.、Hartmannella spp.

50

30

40

40

40

40

40

40

40

40

40

40

【0161】

2. RNAの単離

全RNAは、GTC/CsClクッション法 (Sambrookら、1989) により、成虫 *Haemonchus contortus* 線虫から抽出して単離するか、あるいは GTC/フェノール/クロロホルム抽出 (Chomczynski 及び Sacchi 1987) により一工程で得た。ポリ (A)⁺ RNA を、オリゴ (dT) セルロースのクロマトグラフィーにより単離した (Aviv and Leder, 1972)。

【0162】

3. ノーザンブロッティング

Haemonchus contortus 由来のグルオキシル化全RNA (1レーン当たり 20 µg) をアガロースゲルにて分画し (Sambrookら、1989; McMaster 及び Carmichael 1977)、標準キャピラリー輸送法 (the basic capillary transfer method) (Chomczynski, 1992) により Hybond N メンブレン (Amersham) に移動させた。放射能標識プローブは、メガプライム キット (Amersham, Braunschweig, Germany) と 50 µCi の [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmole, ICN, Meckenheim, Germany) を用いて、線状化したプラスミド DNA (HC110-R) のランダム標識により調製した。ハイブリダイゼーションは、6×SSC (1×SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム)、5×デンハルト試薬 (0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% BSA, 0.1% Ficoll 400)、0.1% SDS 及び 100 µg/mL ニシン精子DNA中、65℃にて一晩行なった。フィルターは、0.1×SSC 及び 0.1% SDS 中の高いストリンジェンシーで、65℃にて洗浄し、露光した (-80℃の Kodak BioMax MS フィルム) (図1(A) を参照)。

【0163】

4. 5' 及び 3' RACE PCR

5' / 3' RACE 法を用いて、同定した cDNA クローンに欠けている 5' 及び 3' 末端を単離した。

【0164】

5' RACE は、mRNA 由来の遺伝子の 5' 端を特異的に増幅することに基づく。配列特異的プライマー及び AMV 逆転写酵素を用いて、第1の cDNA 鎖を合成する。ポリ (A) 尾部をその生成物に結合させることにより、後の PCR において、オリゴ dT アンカープライマーおよびネステッド配列特異的プライマーを用いることが可能になる。別の PCR では、特異性を確保するため、別のネステッドプライマーを用いることが可能である。

【0165】

3' RACE では、第1の cDNA 鎖はオリゴ dT プライマーを用いて合成し、後の PCR 反応は配列特異的プライマーを用いて行なう。

【0166】

cDNA は、プライマー 5' -GGT CAC CGT CGT CCC AGA AA-3' 及び GIBCO BRL (Eggenstein, Germany) の 5' RACE キットを用いて 1 µg の *H. contortus* 全RNA から合成した。スーパークリプト逆転写酵素をこの目的のために用いた。この cDNA の C 末端の C テイリングは、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて行なった。第1の増幅は、400 nM のオリゴデオキシイノシルアンカープライマー (5' -CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') と、400 nM の第1のネステッドプライマー 5' -CCA TTC GAT TTC TCT TCT CG-3' (Birsner und Grob, Denzlingen, Germany) を用い、200 µM の各 dNTP、1.5 mM の MgCl₂、5 分の 1 のテイル cDNA 及び 2.5 U の天然 Taq ポリメラーゼを含む 50 µ

1 中にて行なった。最初の変性は、94℃で5分間行ない、次いで94℃1分間、53℃1分間そして72℃10分間のサイクルを35サイクル行ない、次ぎに最後の合成工程を72℃で10分間行なった。ネステッドPCRについての反応条件は、テンプレートとして1μlの最初の増幅産物用い、遺伝子特異的な第2のネステッドプライマー5'-GTCTGATGGTGCAGATTTCGC-3'、アンカープライマー(5'-CUACUACUACUAGGCACGCGTCGACTAGTAC-3')の先端欠失型、及びアニーリン温度を53℃にしてサイクルを25サイクルのみで行なったことを除いて、上記と同一である。

【0167】

3' RACE PCR (GIBCO BRL, Eggenstein, Germany) は、成虫H. contortus由来の全RNA 1μg及び500 nMのオリゴdTアダプタープライマー5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTT TTT TTT TTT TTT T-3'を用いて、70℃、10分間のプレインキュベーションから開始し、4℃にて2分間行なった。20μl中の、2.5mM MgCl₂、各dNTP 500μM、10μM DTT及び200Uのスーパー スクリプトII逆転写酵素を加えた後、cDNAを42℃で50分間インキュベーションし、最後の工程で、70℃で15分間、4℃で10分間インキュベーションした。E. coli RNase H 2Uを用いて、37℃で10分間インキュベーションしてRNAを除去した。第1の増幅は、各dNTP 200mM、1.5mM MgCl₂、10分の1のテイルcDNA及び2.5Uの天然Taq DNAポリメラーゼを含む50μl中、ユニバーサルアダプタープライマー400nM (5'-CUACUACUACUAGGCACGCGTCGACTAGTAC-3') および400nMのシークエンス-特異的プライマー5'-TTTGTCTT CCT TGG TAT CC-3'を用いて行なった。最初の変性工程は、94℃にて3分間行ない、次いで94℃にて1分間、51℃にて1分間及び72℃にて2分間のサイクルを35サイクル行い、最後の合成工程は72℃にて15分間行った。特に記載しない限り、最初の増幅物2μlをネステッドPCRに用い、その他の条件は同一であったが、この場合において、短いアダプタープライマー5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'と、ネステッドプライマー5'-ACA CTC TAA TCT CCA ACT G-3'を用いて30サイクル行なった。PCR産物を2%アガロースゲルにて分析し、溶出し、TAベクターpMosBlue (Amersham, Braunschweig, Germany)中にクローニングした。

【0168】

5. RNAのトランスファー

中性のHybond N ナイロンメンブレン [Amersham, Braunschweig] への、グリオキサリゲルからの分画したRNAの移動、及びTBEアガロースゲルからのゲノムDNAの移動は、Chomczynski法 (1992) により、アルカリントランスファー溶液中、下向きのアルカリ性の毛細管輸送によって2時間行なう。次いで、このメンブレンを0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 中で20分間中和し、80℃にて20~60分間乾燥させ、焼き付けた。放射能標識したプローブとハイブリダイズさせるために、メンブレンをプラスチック製バッグ中、5ml/cm²のプレハイブリダイゼーション溶液でシールし、65℃で3時間インキュベーションした。緩衝液を、ハイブリダイゼーション用のハイブリダイゼーション溶液に変える。Rapid Hyb. 溶液 [Amersham, Braunschweig] を使用すれば、プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液をさらに加えることなく、65℃にて30分間で起きる。ランダムプライミングにより放射能標識したしたプローブを加えた後、ハイブリダイゼーションを65℃にて一晩行なう。その後、そのメンブレンを、2×SSC/0.1% SDSを用いて65℃にて20分間を1回、0.1×SSC/0.1% SDSを用いてそれぞれ1時間を3回で洗浄した。このメンブレンは、適当な増強スクリーンを用いて、コダックX-OMAT又はコダックBIOMAX-MS

X線フィルムに -80°C にて露光する。

【0169】

6. インビボ転写及び翻訳

TNT T7/T3カップリングした網赤血球リゼートシステム (Promega) を、製造元のプロトコルに従って用い、 ^{35}S 標識メチオニン及びシステイン (ICN, Eschwege, Germany) の存在下、HC110-Rのコード配列の全長を転写及び翻訳した。 $40\text{ }\mu\text{Ci }^{35}\text{S}$ 標識化混合物 ($>1000\text{ Ci/mmole}$, ICN, Meckenheim, Germany)、 $1\text{ }\mu\text{g}$ の環状化HC110-R プラスミドDNA及び10UのT3 RNAポリメラーゼを用いるウサギ網赤血球リゼートシステム (Promega, Serva, Heidelberg) を用いて、RNAを 10
翻訳した。反応は 30°C にて90分間行った。ポジティブコントロールには、 $1\text{ }\mu\text{g}$ のルシフェラーゼコントロールDNAを含有させた。

【0170】

反応産物をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Laemmli 1970) により分画し、増幅フルオログラフィー溶液 (Amersham Pharmacia Biotech) 又は1Mのサリチル酸ナトリウム (pH 7) (Chamberlain 1979) を用いて蛍光光度分析し、そしてそのゲルを乾燥させ、露光した (増感剤とともに -80°C にてKodak BioMax MRフィルム) (図1(B)を参照)。

【0171】

あるいは、Ambion (Heidelberg) のMAXIscriptインビトロ 20
転写キットを、pBluescript SK中にクローニングしたHC110-R cDNAからのRNA転写物のインビトロ合成のために用いた。HC110-RプラスミドDNA $4\text{ }\mu\text{g}$ を、制限酵素Hind III又はストップコドンの後のSal Iを用いて直線化し、フェノール/クロロホルムで抽出し、3倍量のエタノールを用いて沈殿させ、DEPC/ H_2O 中に溶解した。反応混合物 $50\text{ }\mu\text{l}$ 中のHC110-R cDNA $2\text{ }\mu\text{g}$ を、 $200\text{ mM DTT } 2.5\text{ }\mu\text{l}$ 、 $10\text{ mM ATP, CTP, GTP}$ 及び UTP 各々 $2.5\text{ }\mu\text{l}$ 、 $10\times$ 転写緩衝液 $5\text{ }\mu\text{l}$ 、RNasinインヒビター ($40\text{ U}/\mu\text{l}$) (Promega, Heidelberg) $1.6\text{ }\mu\text{l}$ 、及びT3ファージポリメラーゼ ($10\text{ U}/\mu\text{l}$) $2\text{ }\mu\text{l}$ と混合し、 37°C で2時間インキュベーションした。 30
1時間後、T3ファージポリメラーゼ ($10\text{ U}/\mu\text{l}$) $2\text{ }\mu\text{l}$ をさらに加えた。この混合物を、RNase不含DNase I ($2\text{ U}/\mu\text{l}$) $1.5\text{ }\mu\text{l}$ 及びRNasinインヒビター ($40\text{ U}/\mu\text{l}$) $1\text{ }\mu\text{l}$ と混合し、 37°C で15分間インキュベーションし、フェノール/クロロホルムを用いて抽出し、3倍量のエタノール中にて沈殿させ、DEPC/ $\text{H}_2\text{O } 25\text{ }\mu\text{l}$ 中に再懸濁した。試料の $1/5$ の容量をグリオキサールゲルにて分析した。

【0172】

7. DNA分析

クローンは、自動レーザー蛍光配列分析 (LICOR 4000; MWG, Ebersberg, Germany) およびThermo Sequenase蛍光標識サイクル 40
配列分析キット (Amersham, Braunschweig, Germany) の支援によりジデオキシヌクレオチド鎖終止法で配列を決定した。両方の鎖の配列を決定し、その配列データをGCGソフトウェア (Genetics Computer Group Inc., Madison, WI, USA) 及びPC/GENEソフトウェア (Intelligenetics, Mountain View, CA, USA) でした。プログラムFASTA (Pearson 及びLipman 1988)、BLITZ (Smith及びWaterman 1981)、及びBLAST (Altschul及びLipmann 1990) を用いて、得られたタンパク質配列の配列類似性についてEMBLおよびスイスプロット プロテインデータベース (Swiss-Prot protein databases) をスクリーニングした。タンパク質配列は、SAPS (Brendelら、1992) およびPROSITEおよびProt 50

Param (Appelら、1994)を用いて分析した。

【0173】

8. *Haemonchus contortus*由来のタンパク質抽出物の調製

液体窒素中にて凍結させた*H. contortus* 50~100mgをTRIzol [Gibco, Karlsruhe] 1ml中に加えた。線虫を、ガラス容器中、TRIzolと共に3×15秒間ホモジナイズし、室温で5分間インキュベーションした。TRIzol 1ml当たりクロロホルム200μl加えた後、この試料を15秒間攪拌し、混合物を室温でさらに2~3分間インキュベーションし、4℃で10分間7000~12000rpmで遠心分離した。上部の水相にはRNA、中間相にはゲノムDNA、赤色の有機相にはタンパク質が含まれている (Coombsら、1990; Chomczynski 1993)。水相を除去し、別々に処理した。中間相と有機相を、TRIzol 1ml当たり300μlの100%エタノールとともに混合し、十分に混合し、室温で2~3分間インキュベーションした。4℃で5分間、2000rpmで遠心分離した後、タンパク質の上清を慎重にエッペンドルフ容器に移し、イソプロパノール1mlを用いて室温にて10分間沈殿させた。再度、遠心分離を、4℃で10分間、12000rpmで行ない、上清を廃棄し、タンパク質沈殿物を95%エタノール中の0.3M塩酸グアニジン溶液2mlと混合して、攪拌し、室温で20分間インキュベーションし、4℃にて5分間、7,500rpmで3回遠心分離した。次いで、ペレットを100%エタノール2ml中に溶解し、室温で20分間沈殿させ、そして4℃で5分間、7500rpmにてペレット化した。ペレットを簡単に真空乾燥し、尿素溶解緩衝液 (8M)中に再懸濁した。不溶性の物質を4℃で10分間、10000rpmの遠心分離で取り除き、上清を新しいエッペンドルフ容器に移した後、タンパク質濃度を決定し、さらなる処理を行うまで-20℃で保存した。

【0174】

9. 酵母細胞由来のタンパク質抽出物の調製

タンパク質抽出物は、YPAD培地5mlに単一の酵母コロニーを植え、飽和するまで (2日間) 30℃で振盪することで酵母培養細胞から調製した。この培養酵母の一部2mlを4℃で2分間、3000rpmで遠心分離 (Heraeus Biofuge 15 R) し、H₂Oで一度洗浄し、酵母溶解緩衝液250μl中に再懸濁し、小さい試験管に移し、ガラスビーズ (φ 0.5mm) を液面のすぐ下まで入れ、最大設定で5分間攪拌した。次いで、4×RotiLoad緩衝液 (Roth, Karlsruhe)を加え、混合物を95℃で5分間インキュベーションした。破壊した細胞をエッペンドルフ容器に移し、細胞破片を5分間、14000rpmで遠心分離 (エッペンドルフ遠心分離機 (Eppendorf Centrifuge) 5415 C) することによって除去した。この方法により調製した試料の一部20μlを、SDSポリアクリルアミドゲルに流した。

【0175】

10. *E. coli*細胞由来のタンパク質抽出物の調製

タンパク質抽出物は、一晚培養した培養液5mlから、Heraeusフロー遠心分離機にて4℃で5分間、5000rpmで遠心分離して、 1×10^7 の*E. coli*細胞をペレット化し、PBS 5mlを用いて洗浄し、再び遠心分離することにより調製した。次いで、このペレットをTRIzol (Gibco, Karlsruhe) 1ml中に再懸濁し、処理をさらに行なった。

【0176】

これに代わる方法として、PBS洗浄した細胞ペレットをPBSに再懸濁し、細胞を数回の短い超音波パルス (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U. S. A.)、液体窒素及びリゾチームにより破壊した。

【0177】

続くタンパク質分析では、4×RotiLoad緩衝液 (Roth, Karlsruhe) 50

e)を加え、SDSポリアクリルアミドゲルに流して画分を分析した。1レーンあたりに流したタンパク質の全量は10～20 μgであった。

【0178】

11. 培養細胞からのタンパク質抽出物の調製

35mmの接着細胞の集密細胞培養皿、又はFCS含有培地中の5～10⁶個の非接着動物細胞を、トリプシン/EDTA溶液でトリプシン化することにより予め取り出すかあるいは冷却した後に細胞スクレイパーを用いて機械的に剥がし、エッペンドルフ容器に移し、室温で10秒間、13000rpmにてペレット化し、PBSで2回洗浄し、再び遠心分離した。その細胞をTRIZOL 1ml中に溶解した後、これを激しく攪拌するか、又は使い捨てできる注射器の針の中に細胞を数回吸引することにより、細胞を溶解させ、室温で5分間インキュベーションした。この別法として、細胞ペレットをPBS 1ml中、又は尿素溶解緩衝液(8M)中に再懸濁し、非常に短かい時間、超音波処理(Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U. S. A.)した。次いで、タンパク質量を、Bradford (1976)又はLowryら、(1951))の方法により測定する。

10

【0179】

12. E. coliにおける誘導的タンパク質発現

HC110-Rタンパク質に対するポリクローナル抗体は、発現ベクターpRSET B (Invitrogen, Leek, NL) にクローニングされ、その結果6×Hisがリーディングフレームを満足しながらN末端に融合された3つのHC110-R断片、即ち、完全HC110-R cDNA、膜貫通ドメインを含まないN末端、及び7番目の膜貫通ドメインの後のC末端により製造した。

20

【0180】

HC110-Rの完全なコード領域を、P84__ATG BamHI 5'プライマー 5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC ATG AGG-3'および、P3121__TGA HindIII 3'プライマー 5'-GCA CT A AGC TTG ACT GAA GCG CAC AAC CTC G-3'を用いて増幅し、第1の膜貫通ドメインまでのN末端を、P84__ATG BamHI 5'プライマー (上記参照) およびP1434__TGA HindIII 3'プライマー 5'-GGC TCA AGC TTA TCA GAG AAC AAG CGA CAC GGC-3'を用いて増幅し、そして第7の膜貫通ドメインの後から始まるC末端は、P2486__ATG BamHI 5'プライマー 5'-CTA TCG GAT CCC AAC ATG GC T GGC TCC CGT GAT ACC TCT AGG-3'およびP3121__TGA HindIII 3'プライマー (上記参照) を用いて増幅した。3つの全てのプラスミドPCRのアニーリング温度は、最初の5サイクルは56℃、後の30サイクルは62℃で行なった。PCR産物はBamHI及びHindIII酵素を用いて消化し、同様にBamHI/HindIIIを用いて直線化したpRSET B発現ベクター中に直接ライゲートした。

30

【0181】

pRSET Bベクターにおいて、発現は、バクテリオファージ T7のウィルスプロモーターにより制御されている。従って、クローニングは、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を有していないXL1-Blue E. coli株にて行なった。次いで、この組換えプラスミドを、クロラムフェニコール耐性により安定化したプラスミドpACYC184をさらに含み、かつT7 RNAポリメラーゼの天然のインヒビターであるT7リゾチームの発現量が少ない、T7ポリメラーゼ発現性BL21 (De3) pLysS大腸菌細胞中へ形質転換した。これらの細胞はlacUV5プロモーターの制御下にあるため、IPTG誘導によりT7 RNAポリメラーゼが発現し、その結果融合タンパク質を発現する。

40

【0182】

目的のHC110-Rプラスミドを有する単一のコロニーを、50 μg/mLアンピシリン及び35 μg/mL クロラムフェニコールを添加した新鮮なLBプレートから、同じ

50

選択圧下のLB培地 50 mlに移し、静止期になるまで37℃にて280 rpmで一晩振盪した。この一晩培養した培養物をOD₆₀₀が0.3になるよう希釈し、この培養物100 mlをOD₆₀₀が0.6~0.5になるまで37℃にて280 rpmでさらに振盪した。

【0183】

1 OD₆₀₀のユニットを採取し、未誘導細胞を手短かに遠心分離し、pH8.0の8 M 尿素溶解緩衝液150 µl及び4×RotiLoad緩衝液 [Roth, Karlsruhe] 50 µl中に溶解した。この未誘導試料を2分間変性させ、ゲノムDNAをSonifier B-12の短い超音波パルス [Branson Sonic Power Company, Danbury, U. S. A.] を2、3秒間行なうことにより 10
剪断し、不溶性部分を14000 rpmで3分間遠心分離することによりペレット化した。

【0184】

融合タンパク質の発現は、1 mM IPTGを加えることにより誘導し、培養物100 mlをさらに3~4時間37℃にてインキュベーションした。インキュベート後、誘導した細胞を5000 rpm、4℃にて15分間遠心分離 (Heraeus 蛍光遠心分離機) し、ペレットをPBS中にて洗浄した後、8 M 尿素溶解緩衝液8 ml中に再懸濁した。細胞を液体窒素に液沈して破壊し、37℃で3回融解した。最初の窒素処理後に、0.75 mg/ml リゾチームを加えた。液体窒素における最後のインキュベートの後、16℃で20分間インキュベーションした後、氷水浴中で冷却しながら、溶液が水と同等の粘度 20
になるまで各10秒間の短い超音波パルスを与えた。13000 rpmで、4℃にて10分間遠心分離 (Beckman J2-21; JS 13.1-Rotor) した後、誘導した試料150 µlを取り出し、4×RotiLoad緩衝液 (Roth) 50 µlと混合し、SDS-PAGEにより、次いでクマシー染色又はマウス抗His抗体を用いたウェスタンブロット分析により、特定のHC110-Rタンパク質断片を未誘導試料と一緒にチェックした。

【0185】

残りの上清を新しい容器に移し、アフィニティークロマトグラフィーによりさらに精製するために-20℃で保存した。

【0186】

13. 金属アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製 30
濃縮は、変性条件下にて、クロンテック社 [Palo Alto, U. S. A.] のTALONスピン カラムにてIMAC システム (「Immobilized Metal Affinity Chromatography」) を用い、N末端6×Hisタグにより行なった。最初に、カラム内の樹脂をpH8の8 M 尿素溶解緩衝液の5倍量で別個に平衡化し、3000 rpmにて4℃で4分間沈降させて、ゆっくり攪拌しながらHC110-Rタンパク質上清と室温にて20分間インキュベーションした。再び遠心分離した後、樹脂を、ゆっくり室温で10分間攪拌しながら、10倍量のpH8の8 M 尿素溶解緩衝液で3回洗浄し、再度遠心分離した。最後の洗浄工程の後に、ペレットを8 M 尿素溶解緩衝液1 ml中にとり、カラムにローディングするのに用いた; 後者は、3倍量の8 40
M 尿素溶解緩衝液で2回洗浄し、イミダゾール含有8 M 尿素溶解緩衝液で溶出し、各々150 µlのいくつかの画分に分画した。画分中の融合タンパク質量を、ゲル分析及びBradfordタンパク質測定法により測定する。

【0187】

14. アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製
金属アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製は、本明細書中の実施例に記載する。

濃縮は、変性条件下にて、クロンテック社 [Palo Alto, U. S. A.] のTALONスピン カラムにてIMAC システム (「Immobilized Metal Affinity Chromatography」) を用い、N末端6×Hisタグに 50

より行なった。最初に、カラム内の樹脂をpH 8の8 M 尿素溶解緩衝液の5倍量で別個に平衡化し、3000 rpmにて4℃で4分間沈降させて、ゆっくり攪拌しながらHC 110-Rタンパク質上清と室温にて20分間インキュベーションした。再び遠心分離した後、樹脂を、ゆっくり室温で10分間攪拌しながら、10倍量のpH 8の8 M 尿素溶解緩衝液で3回洗浄し、再度遠心分離した。最後の洗浄工程の後に、ペレットを8 M 尿素溶解緩衝液1 ml中にとり、カラムにローディングするのに用いた；後者は、3倍量の8 M 尿素溶解緩衝液で2回洗浄し、イミダゾール含有8 M 尿素溶解緩衝液で溶出し、各々150 µlのいくつかの画分に分画した。画分中の融合タンパク質量を、ゲル分析及びBradfordタンパク質測定法により測定する。

【0188】

10

15. アミノ酸配列分析

cDNA全長クローンHC 110-Rから推定されるアミノ酸配列を確認するため、上流の開始コドン及びコザック (Kozak) 配列を含む688 bp ((2486~3182位)) を含有する3'末端を、pRSET B発現ベクター中にクローニングし、コンピテントBL21 (DE3) pLysSE. coli細胞における21 kDタンパク質 (189 AA) の発現を、1 mM IPTGを加えることにより誘導した。このN末端Hisタグを伴って発現した融合タンパク質を、Talonマトリックスにて濃縮し、Centriconチューブにより濃縮し、脱塩した。N末端Hisタグのため、1 nMの21 kD HC 110-Rタンパク質の部分的なC末端タンパク質の配列分析は、Top Lab (Martinsried) によるBoyd (Boydら、1992) の変法の段階的なSchlack-Kumpf分解 (Schlackら、1926) により行なった。除去したアミノ酸の配列分析はPROCISE 492アミノ酸配列分析装置 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) において行ない、ABI 140Cマイクロ勾配システム及びABI 785A UV/VIS検出器からなるPROCISE C逆相HPLCシステムを用いて分析し、PROCISE Cコントロールソフトウェア及びABI データ解析ソフトウェアを用いて同定した。

20

【0189】

最初に、21 kD HC 110-Rタンパク質25 pmolを、2%トリプシン (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) を用いて37℃にて一晩分解した。トリプシン自己分解産物の配列分析を除外するため、トリプシン無しでの分解物のクロマトグラムを、トリプシン消化後のHC 110-R標準クロマトグラムと比較することによって、合計4つのペプチド断片を選択した。これら4つのペプチド断片を、Top Lab (Martinsried) によってHunkapillerら、(1983) により改変された階段的Edman消化法によって、N末端部分のタンパク質配列分析を行った。分解したペプチド断片を分離し、HPLCにより分画した。イモビロンにてプロッティングされたペプチド画分を、PROCISE 492アミノ酸配列分析装置 (Applied Biosystems, Weiterstadt) の反応チャンバーに移し、アミノ酸を140 C-PTH-分析器及びUV検出器 785 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) にて分離した。アミノ酸を逆相HPLCにより定量し、配列分析前に作製した標準クロマトグラムと保持時間を比較することにより同定した。

30

40

【0190】

16. 細胞培養系

以下の細胞培養系は、Microorganismen und Zellkulturen GmbH [Braunschweig] [Drexlerら、1995] を介してDeutsche Sammlungから購入した：

COS-7細胞 (DSM: ACC 60) — サル、腎臓

HEK-293細胞 (ATCC: CRL 1573) — ヒト、胚、腎臓

【0191】

17. 種々の細胞培養系の培養

50

接着細胞系COS-7やHEK-293は、110mm組織培養皿 [Greiner, Solingen] にて、10mLの培地中、37℃、5%CO₂ 及び95%湿度で培養した。培養細胞は、DMEM培地中でCOS-7およびHEK-293細胞を培養することにより維持した。3.024 g/L NaHCO₃、10% FCS、50U/mL ペニシリン及び50 µg/mL ストレプトマイシンを含む培地を使用前に37℃に温めた。COS-7の前培養について、それらを4℃で2時間保存した後、細胞スクレイパーを用いて機械的に培養皿から分離した。ガラスピペットを用いて、HEK-293細胞を培養皿の底から直接分離できた。

【0192】

18. 真核生物細胞の一過性トランスフェクション及び安定なトランスフェクション
Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) の非リポソームトランスフェクション試薬FuGENE 6を、動物細胞内へ外来DNAを一過的に導入するために用いた (Kurachiら、1998)。この目的のため、1%ゼラチンでコーティングした滅菌ガラススライドを後の共焦点レーザースキャンニング顕微鏡のために設置した35mm 組織培養皿に、培地2mL中の約0.5~1.5×10⁵個の細胞を置いた。細胞を、37℃で5% CO₂ 及び95%湿度にて一晚培養した。培地をトランスフェクトの前に再度交換した。トランスフェクションのために、FuGENE 6 [Roche Molecular Biochemicals] 3 µlを血清不含培地97 µl中に希釈し、各反応混合物について5分間室温でインキュベーションした。各混合物につき、プラスミド-DNA 2 µg (0.5~1 µg/µl) に、希釈したFuGENE 6の一部100 µlをピペッティングして滴下し、慎重に混合した後、室温でさらに15分間インキュベーションした。その後、完全反応混合物を細胞に滴加して、トランスフェクト混合物を、皿をゆっくり回転させて均一に分配した。培地を交換せずに、細胞をさらに1~2日間培養した。以下の3つのネガティブコントロール (陰性対照) を、各トランスフェクションに必ず入れた：35mm 組織培養皿に0.5~1.5×10⁶細胞を入れトランスフェクトしない、第2の培養皿はDNAをトランスフェクション混合物に加えるが、FuGENE 6は添加しない、そして第3の培養皿には、FuGENE 6を添加するがDNAは添加しない。

【0193】

安定なトランスフェクションについては、所望のプラスミドHC110-Rを、若干の修飾を加えた発現ベクターpSecTag A [Invitrogen, Leek, NL] 又はpIRESneo [Clontech, Palo Alto, U. S. A.] 中へ正しいリーディングフレームでクローニングした。これらのベクターは、マーカーとして耐性遺伝子を有し、その結果、ゼオシン (Zeocin) 及びG418又はブレオマイシン 48を一過性トランスフェクションの72時間後およびその後の培地の各交換時にそれぞれ加えた時に、恒常的に耐性遺伝子産物を発現するトランスフェクに成功した細胞のみが生き残る。Zeocin又はG418含有選択培地の最適な濃度は、それぞれの細胞系の希釈系列を設定することで予め決定される。

【0194】

19. 動物細胞における組換えタンパク質の細胞内局在化
HC110-Rタンパク質をGFP (緑色蛍光タンパク質) にC末端連結させるため、HC110-R DNAの完全コード化領域を、pEGFP-N3のHindIII/SalIサイトにクローニングした。137kDa融合タンパク質は、一過的にトランスフェクションした組換え細胞系において発現させ、ウェスタンブロット分析により実証することができる。CLSM (共焦点レーザースキャンニング顕微鏡) により、HC110-R-GFP融合タンパク質がCOS-7及びHEK-293細胞の細胞質内に存在し、より小さい程度で、細胞質膜上にも局在化していることが示される (図8も参照)。

【0195】

Leica CLSM付属TCS NT (「共焦点レーザースキャンニング顕微鏡」、Leica Lasertechnik, Heidelberg)、バージョン1.5.4

51を備えたZeiss IM 35顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen) を、共焦点レーザースキャンニング顕微鏡に用いた。GFPタンパク質の蛍光及び蛍光色素イソチオシアン酸フルオロセインの蛍光はアルゴンレーザーを用いて488nmにて励起され、ローダミン、Texasレッド、フィコエリトリン、Alexa 568、LysotrackerTM Red DND-99、MitoTrackerTM Red CMXRos及びヨウ化プロピジウムはクリプトンレーザーを用いて568nmにて励起した。細胞を透過する光学分画のZシリーズは、1024×1024ピクセルの分解能で厚さ0.5μmをスキャンした (Gieseら、1995)。評価は、AVSソフトウェア (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, U. S. A.) を用いて行なわれ、後者はウィンドウズ用のAdobe Photoshop 10 5.0およびCorel Draw 8.0を用いて後に行なった。

【0196】

酸性オルガネラを標識するためのプローブLysotrackerTMを用いて示されるように、融合タンパク質は酸リソソームに特に局在する。HC110-Rタンパク質を含む粒子は、核酸付近で数の増加が見られた。GFP及びマウスβ₂-アドレナリン作動性GPCRの融合タンパク質をコントロールとして調製し (アクセッションナンバー X155643, Nakadaら、1989)、そのトランスフェクションは、HC110-R-GFP融合タンパク質の場合と同様に細胞内と同じ分配パターンを生じた (図8)。

【0197】

20. 一過発現のためのEGFP構築物

ベクターpEGFP C1及びpEGFP N3 (Clontech, Palo Alto, CA, U. S. A.) を、制限酵素Hind IIIとSal Iを用いて切断した。HC110-R全長cDNAの増幅は、P83EGFP-ATG Hind III 5'プライマー 5'-GGT AGA AGC TTT TCG GTT TAA TAC CAA CAT GAG G-3'と、P3057EGFP-o. TGA Sal I 3'プライマー 5'-CTG TGT CGA CAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3'を用いてアニーリング温度65℃にて行なった。次いで、そのPCR産物を同様に、酵素Hind III及びSal Iを用いて切断し、特定のベクターのHind IIIとSal Iとの開裂部位の間のオープンリーディングフレームを形成させるためにライゲートし、形質転換した。その結果得られたN末端GFPタグを有する融合タンパク質をGFP-HC110-Rと称し、C末端EGFPを有するものをHC110-R-GFPと称する。マウスβ₂-アドレナリン作動性受容体 (ジーンバンクアクセッションナンバー: P18762; Nakadaら、1989) は、P117マウスβ₂ AR Xho I 5'プライマー 5'-TAC CTC GAG CTG CTA ACC TGC CAG CCA TG-3'と、P1349マウスβ₂ AR EcoRI 3'プライマー 5'-TGT AGA ATT CTT CCT TCC TTG GGA GTC AAC GCT-3'を用いてアニーリング温度55/60℃にて全長cDNAを増幅させ、制限酵素Xho IとEcoRIとを用いて切断し、そしてXho I-EcoRI直線化pEGFP N3中にライゲートすることで、C末端にEGFPを融合させた。55/60℃にて、P 40 70HumM1Rez Xho I 5'プライマー 5'-ATA TCT CGA GAG CCC CAC CTA GCC ACC ATG AAC A-3'と、P1465HumM1Rez EcoRI 3'プライマー 5'-GAC GAA TTC CAT TGG CG GAG GGA GTG CGG T-3'を用いて、既に増幅されたヒトムスカリン性受容体1の全長cDNA (humM1Rez.; ジーンバンクアクセッション No.: Y00508; Allardら、1987) を、同様にしてXho I-EcoRI切断pEGFP N3ベクター中にライゲートした。この結果得られたオープンリーディングフレームを有する融合タンパク質を、マウスβ₂ AR-EGFP及びhumM1Rez-EGFPと称する。

【0198】

21. 安定なトランスフェクション又は一過性トランスフェクション用のHC110-R-MycHisタグ構築物

ベクターpMyc6xHisは、ベクターpSecTagA [Invitrogen, Leek, NL] を、制限酵素NhiI及びSfiIを用いて二重消化した後に、末端を平滑化してそのベクターを再度ライゲーションすることにより得られる。HC110-Rのコード領域は、PCRプライマー P83MycTag__ATG BamHI 5' プライマー 5'-ATA GGA TCC TTC GGT TTA ATA CCA ACA TGA GG-3' と、P3058MycTag__o. TGA XbaI 3' プライマー 5'-CCT GTC TAG AAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3' とをアニーリング温度56/60℃にて用いて増幅し、制限酵素BamHI及びXbaIを用いて切断し、そして同様にBamHI及びXbaIを用いて直線化したpMyc6xHisベクター中にライゲートし、E. coli DH5α細胞中にトランスフェクションした。続いて、COS-7細胞を、この構築物を用いて安定にトランスフェクトし、Zeocin選択圧下にて維持した。

【0199】

これと平行して、HC110-RMycHis cDNAを、プライマーP83__ATG NotI-5' 5'-ATA TTG CGG CCG CTT CGG TTT AAT ACC AAC ATG-3' と、pMycHis__TGABamHI-3' 5'-CGC GGA TCC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' とを用いて増幅し、次いで切断して、同様にBamHI及びNotIを用いて制限切断されたバイシストロン性発現ベクターpIRES1neo (GenBankアクセッション No. : U89673) (Clontech, Palo Alto, U. S. A.) 中にライゲートした。pIRES1neoベクターは、さらにネオマイシン耐性遺伝子 (Reesら、1996) の開始部位ATGのすぐ前にある脳筋炎ウイルス (ECMV) のリボソーム内結合部位 (IRES) を含んでいる。この方法において、HC110-Rの、及び抗生物質耐性マーカーの2つのオープンリーディングフレームは、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (Jacksonら、1990; Jiangら、1988) を有する1つのmRNAからのみ翻訳される。選択は、COS-7細胞及びHEK-293細胞中のG418 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U. S. A.) を用いて行なった。

【0200】

22. 共焦点レーザースキャンニング顕微鏡

Leica CLSM付属TCS NT (「共焦点レーザースキャンニング顕微鏡」、Leica Lasertechnik, Heidelberg)、バージョン1.5.451を備えたZeiss IM 35顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen) を、共焦点レーザースキャンニング顕微鏡に用いた。蛍光はアルゴンレーザーを用いて488nmにて励起され、そしてクリプトンレーザーを用いて568nmにて励起された。細胞を透過する光学分画のZシリーズは、1024×1024ピクセルの分解能で厚さ0.5μmをスキャンした (Gieseら、1995)。評価は、AVSソフトウェア (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, U. S. A.) を用いて行なわれ、後者はウィンドウズ用のAdobe Photoshop 5.0およびCorel Draw 8.0を用いて後に行なった。

【0201】

23. HC110-R断片に対するα-LTXの結合の研究

タンパク質をSDS-PAGE (Laemmliら、1970) により分画し、ニトロセルロース膜上で電気泳動した。α-LTX結合実験の場合、その染色は、TST中、濃度20nMのα-LTXを用いて室温で2時間インキュベーションした。TSTを用いて3回洗浄した後、抗-α-LTX抗体 (ウサギ由来Calbiochem-Novabiochem) を濃度0.1μg/mLにて用い、そしてペルオキシダーゼを連結した抗体及びウサギIgGに対する抗体 (ヤギ由来、1:25000希釈) を用いた。抗体は、全て

の実験でECL (Amersham-Pharmacia) を用いて検出した (図9を参照)。

【0202】

24. カルシウムイメージング

細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ は、HC110-R-GFP又は β_2 -AR-EGFP構築物を用いて一過的にトランスフェクションしたDOS-7細胞及びHEK-293細胞にて、カルシウムイメージング法を用いて測定した (図11も参照)。各々の場合について、 2×10^5 COS-7細胞及びHEK-293細胞を、DMEM培地 (10% FCS及びpen/strepを含む) 5mlを有する55mm組織培養皿にて1%ゼラチンを用いてコーティングした42mmカバーガラスに用いた。トランスフェクションは、非トランスフェクション試薬FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) を用いて行なった。これには、FCSを含まないDMEM培地200 μ lにて初めに室温で5分間インキュベーションしたFuGENE 6 6 μ lを含み、その後プラスミドDNA4 μ gを加え、さらに15分間室温にてインキュベーションし、完全トランスフェクション混合物をその細胞にピペットにて滴加した。正しいリーディングフレームに融合されたGFPタグを有するHC110-R全長クロンの構築物、及び同様にその3'端にGFPタグを有する β_2 -アドレナリン駆動性受容体の完全cDNAの構築物をトランスフェクションした。純粋なpEGFP-N3発現ベクター (Clontech, Heidelberg) のプラスミドDNA4 μ gと、トランスフェクション試薬FuGENEをDNAなしで加えた非トランスフェクト細胞をコントロールとして保存した。

【0203】

1 μ M Fura-2-アセトキシメチルエステル (Fura-2/AM) (Sigma, Deisenhofen) を用いた細胞のローディングは、37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 及び95%湿度で、30分間、 Na^+ -HBS溶液 (水中、150 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 1.8 mM $CaCl_2$; 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 20 mM フルコース; 20 mM ヘペス (Hepes), pH 7.3) 中にてトランスフェクションした48時間後に行なった。インキュベート後にFura-2/AMと共にローディングした細胞を、倒立顕微鏡 (Zeiss, Axiovert, Germany) の下で、及びそれと平行して、デジタルイメージング蛍光顕微鏡 (PTI) の下で試験し、440nmと490nmそれぞれの波長でトランスフェクト細胞と、非トランスフェクト細胞を区別した。平均して、5~7のトランスフェクト細胞及び非トランスフェクト細胞は、ROI (目的領域) を固定化することで、選択した。吸光は340nm (カルシウム結合Fura-2/AM) と、380nm (遊離Fura-2/AM) にて測定され、発光は510nmにて測定された。イメージマスター (Image Master) 1 $\times$ ソフトウェアを用いて、加えた試薬の機能としての340:510nm、380:510nm及び340/380:510nmの比率の商 (バックグラウンド補正した画像) を形成することで、評価した。

【0204】

試薬は、常に、 Na^+ -HBS緩衝液の適当量を取り測定を開始した6分後に加え、さらに30~50分間、試料容器中に直接ピペティングする。試料容器中の全量を、実験を通じて1.5mlと一定にした。それぞれの場合、実験を始める分前に、初めに30nM及び75nM α -ラトロトキシン (α -LTX, RBI, Natick, U.S.A.) を、用量依存を決定するため、HC110-R-GFP融合タンパク質を発現するCOS-7細胞に種々の濃度の α -LTX (7.5 nM; 25 nM; 50 nM, 75 nM, 90 nM 及び120 nM) を加える、及び最適な活性濃度を決定するため、種々の濃度の環状デブシペプチド BAY 44-4400 (100 ng/mL (89.3 nM)、333 ng/mL (297 nM); 400 ng/mL (357 nM)、1 μ g/mL (893 nM)、10 μ g/mL (8.9 μ M) を、HC110-R-GFPを発現するHEK-293細胞に加える。幾つかの実験において、HEK-293

細胞を、駆虫活性を有しない、 Na^+ HBS中の光学対掌体PF1022-0014又は400 ng/mL BAY 44-4400あるいは4又は400 ng/mLと共に、37℃で5% CO_2 及び97%湿度にて90分間、プレインキュベーションし、細胞は、1 μM Fura-2/AMをBAY 44-4400溶液又はPF1022-001に加えることによって60分後にローディングし、30分間維持した。細胞を器具に導入した後、75 nM α -LTXをさらにそれらに実験開始の6分後に添加した。最適な α -LTX濃度75 nMを、C-末端GFPタグを有する β_2 -アドレナリン作動性受容体(β_2 -R-GFP)を発現するHEK-293細胞にて試験した。CdCl₂ (それぞれの場合に1 μM 及び10 μM)を Na^+ HBS中に溶解し、ニフェジピン(15 μM)及びEGTA(2 mM)を0.1% DMSO中に溶解した。CdCl₂ 及びニフェジピンを実験開始時にすぐ加え、次いで α -LTXを加え、そしてEGTAを実験の開始時と α -LTXの添加の4分後の両方で加えた。溶解 α -LTXは、50 mM トリス-HCl中で濃度300 nMにて存在する; BAY 44-4400は最初、純粋なDMSO中に溶解した(ストック溶液は0.004~10 $\mu\text{g/mL}$)。ストック溶液は、 Na^+ HBS緩衝液中にて所望の濃度に調整した。最終濃度0.1% DMSOに溶解した活性物質BAY 44-4400の最大量は、 Na^+ HBSにおける希釈系列を行なって見出した。0.1% DMSO及びそのたの被験成分のいずれもが、Fura-2/AMと選択した濃度では相互作用しなかった。

10

【0205】

エクセル(Excel) 98 の表計算プログラムを用いて、このデータを分析した。結果は少なくとも2~4回の再現実験、それぞれの場合4~8のトランスフェクト細胞から導く。

20

【0206】

細胞内カルシウム濃度は、McCormackらの方法(1991)により前校正した後に、Grynkiewiczらの方法により(1985)計算した。

【0207】

25. HC110-Rに対するPF1022Aの結合

HC110-Rに対するPF1022A及びモルホリン誘導体BAY 44-4400の結合は、SDS-PAGE、リガンド調製及び以下の分析流動細胞計測器(フローサイトメトリー)により示される。さらに、PF1022A及びその誘導体が、 α -LTXのように、HC110-RトランスフェクトHEK-293細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に変化を引き起こすか否かあるいはHC110-R媒介 α -LTXシグナリングにも影響があるか否かを確認する。

30

【0208】

場合によって、免疫蛍光において明らかなシグナルを与える抗体又はタンパク質が、免疫ブロット法を使用しても反応しないことがある。SDS-PAGEを行なうには、タンパク質の変性が必要なため、コンフォメーションに依存するエピトープが破壊され得る。そのようなエピトープを特異的に認識する抗体又はタンパク質はもはや、結合できない。したがって、HC110-R特異的結合はウェスタンブロットにおいて、ビオチン化活性物質PF1022Aを用いるか、又はヒトPF1022Aよりもより可溶性のモルホリン誘導体BAY 44-4400を用いるかのいずれかによっては同定できない。BAY 44-4400は、PF1022AのD-フェニルアクリル(phenyl lactyl)ラジカルフェニル環と共有結合している2個のモルホリン残基についてPF1022Aと異なっている。しかしながら、疎水性相互作用を破壊することを通じて、SDSを部分的に除去して、タンパク質を、尿素を用いてSDS分離ゲルにて再生させる場合、ウェスタンブロットにおいてHC110-R特異的結合を検出することができる。この目的のために、非トランスフェクトHEK-293細胞及びHC110-R-Myc/Hisを一過的に発現するHEK-293細胞由来の全タンパク質、及びE. coliにて発現されるHC110-Rの54 kDaのN末端及び21 kDaのC末端を、SDS-PAGEにより分画し、再生して常法によりブロッティングした。免疫検出は、リガンドBAY 4

40

50

4-4400と共に、ウサギ抗PF1022A-KLJ免疫血清と共に、及びヤギ抗-ウサギIgGHRP抗体と共にインキュベーションした後に行なった。さらに、非トランスフェクトHEK-293細胞、HC110-R-Myc/Hisを用いて一過的にトランスフェクションしたHEK-293細胞、及びE. coli中にて発現されるHC110-RのN末端、及びH. contortus由来の全タンパク質を用いた部分的再生SDSポリアクリルアミドゲルをブロッティングし、PF1022A-ビオチンと共にインキュベーションし、ストレプトアビジンHRPを用いて検出した。2つのプロットの各々については、HC110-R-Myc/Hisを安定に発現するHEK-293細胞ではサイズ116kDaの明確なバンドを示したのに対し、非トランスフェクト細胞を用いたレーンではこのレベルではバンドを示さない。さらに、モルホリン誘導体BAY44-4400と、21kDaのC-末端を除くHC110-Rの54kDa N末端と結合しているビオチン化PF1022Aとの両方が、特異的PF1022A結合を示さない。成虫H. contortus 線虫由来の全タンパク質分画の2つのバンドの全量は、ビオチン化PF1022Aを用いて検出できる：サイズ110kDaのバンド及びサイズ約88kDaの別のバンド。特に、サイズ110kDaのバンドとは対照的に検出をストレプトアビジンHRPを用いて排他的に行なった場合でさえ検出されるため、おそらく後者は、すでに線虫ヘテラキスspumosaについて記載した83kDaのタンパク質のようなビオチン化タンパク質である。もう一方は、HC110-R-Myc/Hisを用いて安定にトランスフェクションしたHEK-293細胞はもはや、ストレプトアビジンHRPのみのサイズ116kDaのバンドを示さない。さらにヤギ抗ウサギIgGHRP二次抗体単独により生じる非特異的シグナルを排除できた。

【0209】

さらにこの結果を検証するために、以下のリガンド沈殿を行なった。磁性Dynal M-280ストレプトアビジン結合ビーズの一部2mg及び4mgを、ビオチン化PF1022A500μgと共に混合した。Dynalビーズ4mgを用いたコントロール混合物において、TST緩衝液をPF1022Aに代えて加えた。過剰量のPF1022Aビオチンを磁性分離により除去し、次いでE. coliにて発現され、事前にアフィニティークロマトフラフィーにより精製したPF110-R末端及びC末端を加えた。非結合HC110-R断片を除去するための再生磁性分離の後に、Dynalビーズ2mg、及び4mgから得られる部分標本をSDS-PAGEにより分画し、ブロッティングした。沈殿物の検出は、マウス抗-His IgG及びウサギ抗-マウス IgG HRP抗体を有するN末端融合Hisタグを介して行なった。PF1022Aに結合しないHC110-RのC-末端が事前に磁性分離により分離されていることに基づいて、HC110-RのN末端54kDa領域のみをPF1022Aにより沈殿させる。ストレプトアビジン結合ビーズに対するHC110-RのN-又はC-末端の非特異的結合は、反応混合物にビオチン化PF1022Aを加えないことで排除した。

【0210】

インビボにおけるHC110-Rに対するリガンドPF1022Aの結合を、さらにFACS分析により分析した(図13)。この目的のために、HEK-293細胞を、HC110-R-GFP又はGFP-HC110-Rを用いて一過トランスフェクションするか、その他にはHC110-R-Myc/His及びGFPを用いて同時トランスフェクションした。非トランスフェクトHEK-293細胞、及びβ₂-R-GFP又はM1-R-GFPを用いて一過的にトランスフェクションしたHEK-293をコントロールとして用いた。トランスフェクションの24時間後に、細胞をビオチン化PF1022Aと共にインキュベーションし、PF1022A結合細胞をストレプトアビジン-フィコエリトリンを用いて検出し、最終的に固定化した。ネガティブコントロールであるHC110-R-GFPを用いてトランスフェクションした細胞を、PF1022A-ビオチンを用いず、ストレプトアビジン-フィコエリトリンのみを用いてインキュベーションした。

【0211】

FACSscanは、細胞サイズ、粒状度及び蛍光染色についてそれぞれ10000 HE

K-293細胞を蛍光分析するために、励起波長488nmを用いて使用した。フィコエリトリンは、TRITCのように、EGFPとオーバーラップした吸光スペクトルを有する一方で、発光スペクトルは十分に離れているため、両方の蛍光色素を単一の波長のみで励起できる。細胞破碎物は、主な細胞集団に「ゲート」を設けることで蛍光強度測定から排除できる。定量的評価については、非トランスフェクト細胞及びGFPトランスフェクト細胞の基礎に基づく陰性（ネガティブ）、非染色及び陽性（ポジティブ）、GFP-蛍光細胞についての制限は固定した。非トランスフェクトHEK-293細胞の緑色蛍光4.6%（自己蛍光）は、他のGFP蛍光試料から引いた；そしてフィコエリトリン-結合ストレプトアビジン（5.4%）による細胞の非特異的染色の値を、全てのレッド蛍光細胞から引いた（表1）。

10

表1 FACSscanによる、HC110-Rを用いてトランスフェクションしたHEK-293細胞に結合するPF1022Aの検出

【表1】

プラスミド	GFP 蛍光	フィコエリトリン蛍光
非トランスフェクト	0 ± 0%	0 ± 0%
GFP	17.0 ± 0.5%	1.3 ± 0.4%
HC110-R-GFP	10.9 ± 0.2%	4.5 ± 0.4%
GFP-HC110-R	9.4 ± 2.5%	2.5 ± 0.3%
β_2 -R-GFP	7.6 ± 0.4%	0.8 ± 0.1%
M1-R-GFP	8.2 ± 0.7%	1.6 ± 0.1%
HC110-R-Myc/His + GFP	23.1 ± 2.3%	10.3 ± 0.7%

20

【0212】

自己蛍光及びストレプトアビジン-フィコエリトリンによる非特異的な赤染色を引いた後の、赤（レッド）蛍光でもある緑色蛍光細胞の百分率を計算することで、HC110-R-GFPを発現する細胞が41.2%、GFP-HC110-Rを発現する細胞が26.8%、そしてHC110-R-Myc/HisとGFP結合PF1022Aとを用いて同時トランスフェクションした細胞が44.5%であることが示されたが、GFPを発現している細胞は僅かに7.5%であり、 β_2 -R-GFPを発現している細胞は9.9%、そしてM1-R-GFP bind PF1022Aを発現している細胞は19.2%であった（図13）。

30

【0213】

26. HC110-R媒介性 α -LTXシグナル伝達を用いたPF1022A誘導体の相互作用

40

PF1022Aは、線虫種に応じて $10^{-9} \sim 10^{-3}$ mg/mlの間のインビトロにおける神経薬理学的活性を示す。HC110-R及びHC110-Rにより媒介される α -LTXシグナリングを用いてPF1022Aとその誘導体の任意の干渉を検出するため、BAY44-4400、より可溶性のPF1022Aモルホリン変異体の効果は、 Ca^{2+} イメージング法を用いて、HC110-Rを一過又は安定に発現するHEK-293細胞において調査した。PF1022Aの光学対掌体であって、インビトロ及びインビボにおいて100倍以上の活性を有するPF1022-001を、コントロールとして用いた。BAY44-4400及びPF1022A-001の疎水性のため、初めにBAY44-4400及びPF1022-001を、純粋なDMSO中に溶解した。0.1% DMSOがいつも実験混合物中に存在するように、ストック濃度を選択した。対照実験において

50

は、非トランスフェクトHC110-R細胞及びHC110-R-GFPを用いてトランスフェクションしたHC110-R細胞の実験結果に支障をきたさない最大のDMSO濃度、0.1%にまで排除できる(図14)。Fura-2ローディングした非トランスフェクト細胞及びHC110-R-GFPを用いてトランスフェクションした細胞を、一方では100、300又は400 ng/mL及び1又は10 µg/mLのBAY44-4400か、又は他方では同じ濃度のPF1022-001を用いて刺激した。濃縮なしで、 Ca^{2+} 媒介応答は50分の前期間に渡って検出可能であった。図14B及びCは、400 ng/mL BAY44-4400及びPF1022-001を用いた、HC110-R-GFP及びM1-R-GFPでトランスフェクションした細胞の刺激を、実施例のように示す。さらにPF1022A変異体は細胞に取り込まれ、シグナル伝達経路を2次的に阻害して、寄生虫に応じて寄生虫内で長期間、PF1022A誘導体は維持され得るため、幾つかの実験において細胞を該誘導体と共に90秒間プレインキュベーションした。4 ng/mL又は400 ng/mL BAY44-4400又はPF1022-001を用いてプレインキュベーションした細胞は、 $[Ca^{2+}]_i$ に変化がない(図14D)。濃度300 ng/mL又はそれ以上のBAY44-4400を直接加える場合は、光学対掌体とは対照的に、40倍の倍率をもって細胞を表すモニター上で、数分のうちに逆転する僅かな膨張が、HC110-R-GFPを用いてトランスフェクションしたHEK-293細胞における駆虫薬の効果を直接的に観察できた。

【0214】

最近の実験では、ピペラジンが、インビトロ及びインビボにおいてヘテラキス spumosaを用いた実験においてPF1022A/BAY44-4400の効果を相乗的に増大することが示された。400 ng/mL BAY44-4400を1又は10 µM ピペラジンと同時に与えた場合(図14F)、非トランスフェクトHEK-293細胞又はHC110-R-GFPを用いて一過的にトランスフェクションしたHEK-293細胞のいずれにおいても、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化は検出できなかった。10 µM ピペラジンを用いたコントロール混合物は、同様に、非トランスフェクト及びHC110-R-GFPトランスフェクト細胞の Ca^{2+} バランスに変化を引き起こさなかった(図14E)。

【0215】

これとは対照的に、範囲は変えてあるが、BAY44-4400及び光学対掌体PF1022-001の両方は、75 nM α-LTXの存在下にて、HC110-R-GFP発現HEK-293細胞のα-LTX誘導型シグナル伝達に影響を及ぼした(図14B~E)。HC110-R-GFP又はM1-R-GFPを用いてトランスフェクションした細胞を、刺激の6分前に75 nM α-LTX、0.1% DMSOを用いて処置する対照実験においては、後者の濃度のBAY44-4400及びPF1022-001に用いられる溶媒により発揮される $[Ca^{2+}]_i$ におけるα-LTX誘導型変化の効果を排除できる。M1-R-GFP発現細胞とは対照的に、HC110-R-GFP発現細胞は、α-LTXを加えた後の $[Ca^{2+}]_i$ の値と匹敵する上記の二相性のプロファイルを示した(図15A)。4 ng/mLのBAY44-4400で6分間、HC110-R-GFP発現細胞を誘導した後、α-LTXを加え、 Ca^{2+} 濃度に対するα-LTXの記載された効果を減少させた。：α-LTXによって誘導される $[Ca^{2+}]_i$ の最初の小さな増加は、消失し、2番目の送れたピークは、α-LTXの添加から14分後に 44 ± 6.0 nM Ca^{2+} に減少した(図15B)。4 ng/mLのPF1022-001の存在下で、α-LTXでの刺激の6分前に添加を行った、 103 ± 11.5 nM Ca^{2+} の急速な増加がみられた(図15B)。400 ng/mL BAY44-4400をα-LTXの添加の6分前にHC110-R-GFP発現細胞に添加した場合、4 ng/mL BAY44-4400(図15B)の場合と同様に、23分間で 49 ± 4.2 nMの、 $[Ca^{2+}]_i$ の遅延された増加がみられ、8分後に水平に減少し、最初の値と比較して、 11 ± 1.4 nMにわずかに増加した(図15C)。α-LTXとインキュベーションする6分前に、400 ng/mL PF1022-001 75 nM添加すると、以前4 ng/mL PF1022-001の添加で観察された(図15B)のと

同様に、 $112 \pm 14.3 \text{ nM Ca}^{2+}$ という Ca^{2+} の急速な増加がみられた (図 15 C)。別の実験計画では、各ケースにおいて、 $\text{HC110-R-GFP-発現 HEK-293}$ 細胞を 4 ng/mL (図 15 D) または 400 ng/mL BAY44-4400 または PF1022-001 と 90 分間プレインキュベーションした (図 15 E)。インキュベーション後、結合しなかったまたは取り出した活性物質を注意深く洗浄し、細胞に Fura-2/AM を加えた後、細胞を $75 \text{ nM } \alpha\text{-LTX}$ で刺激した。光学対掌体 PF1022-001 とプレインキュベーションした $\text{HC110-R-トランスフェクト細胞}$ は、 4 ng/mL PF1022-001 で、 $102 \pm 6.4 \text{ nM}$ の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を示し (図 15 D)、 400 ng/mL で $109 \pm 8.4 \text{ nM Ca}^{2+}$ の同様の増加を示した (図 15 E)。 $\alpha\text{-LTX}$ の添加後たった 2、3 分で観察された Ca^{2+} のこの増加は、 $\alpha\text{-LTX}$ による刺激の直前に PF1022-001 を添加した場合、図 15 B および 15 C において前に観察された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の急速な変化と類似していた。対照的に、 BAY44-4400 は、 HC110-R-GFP-発現細胞 を 4 ng/mL BAY44-4400 と 90 分プレインキュベーションした場合、 $\alpha\text{-LTX}$ -減少した Ca^{2+} 流入と関係して、異なった反応を示した： $\alpha\text{-LTX}$ 誘発は、 $23 \pm 2.6 \text{ nM Ca}^{2+}$ に上昇した広範囲の水平になる前に、10 分で $95 \pm 20.5 \text{ nM}$ という最大の増加を導いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (図 15 D)。 400 ng/mL BAY44-4400 でのプレインキュベーションでは、 $\alpha\text{-LTX}$ 刺激の後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が最大 $65 \pm 7.5 \text{ nM}$ に増加し (図 15 D)、これは 4 ng/mL BAY44-4400 でのプレインキュベーションと比較して 12 分の遅延であった (図 15 C)。

【0216】

400 ng/mL BAY44-4400 の、 $\alpha\text{-LTX}$ の添加の 6 分前の、 HC110-R-Myc/His を安定に発現している HEK-293 細胞への添加により、 $267 \pm 45.8 \text{ nM}$ の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の観察された急速な増加の完全な阻害がみられた (図 15 F)。これとは対照的に、 400 ng/mL PF1022-001 の添加は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の有意な変化は誘導せず、 Ca^{2+} の増加は $209 \pm 33.4 \text{ nM Ca}^{2+}$ であった (図 15 F)。

【0217】

HC110-R-発現細胞 における $\alpha\text{-LTX}$ -媒介 Ca^{2+} シグナル伝達に対する BAY44-4400 の特異的な効果を証明するために、以下の対照実験を行った：最初の非トランスフェクト HEK-293 細胞を、 400 ng/mL BAY44-4400 の存在下および非存在下で、ムスカリン性アセチルコリン受容体に対するリガンドである、 1 mM 塩化カルバミルコリン (カルバコール) で刺激した (図 15 G)。両ケースにおいて、 BAY44-4400 の存在下で HEK-293 細胞について $58 \pm 8.1 \text{ nM Ca}^{2+}$ および駆虫薬の非存在下で $53 \pm 6.8 \text{ nM Ca}^{2+}$ の、内因性の、天然のムスカリン性アセチルコリン受容体による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の類似した急速な増加が見られた。 GFP (M1-R-GFP) に C 末端融合したヒトムスカリン性 M1-アセチルコリン受容体 による、 HEK-293 細胞の更なる一過性トランスフェクションは、 400 ng/mL BAY44-4400 の存在下で $89 \pm 5.5 \text{ nM}$ 、非存在下で $85 \pm 6.1 \text{ nM Ca}^{2+}$ の、非トランスフェクト細胞 (図 15 G) と比較して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のわずかな増加につながった (図 15 H)。 M1-R-GPCR に対する BAY44-4400 の有意な効果は観察できなかった。非トランスフェクト HEK-293 細胞における、 1 mM イソプロテレノールでの、内因的に存在する天然の β_2 -アドレナリン作動性受容体の刺激、または 1 mM アレコリンでの、ニコチン受容体の刺激は、カルバコールについて記載したように、 400 ng/mL BAY44-4400 の存在下および非存在下では、またしても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の有意な違いはなかった (図 15 I)。イソプロテレノールは、 BAY44-4400 の存在下で $45 \pm 4.7 \text{ nM}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、および BAY44-4400 非存在下で $48 \pm 5.7 \text{ nM Ca}^{2+}$ の増加を誘導したアレコリン刺激後、 BAY44-4400 の存在下で Ca^{2+} の $28 \pm 4.1 \text{ nM}$ 、

およびこの活性物質の非存在下で $27 \pm 3.5 \text{ nM}$ in Ca^{2+} の増加がみられた (図15I)。

【0218】

27. 抗体の入手

抗体は、雌性NMR Iマウスおよびウサギ (チンチラクロス) を用いることによって入手した。NMR Iマウスの免疫は、 $3 \times 15 \mu\text{g}$ の精製21 kD C末端HC110-Rタンパク質断片をそれぞれ100 μl のFCAとともに100 μl のPBS⁻中に溶解し、1、8および15日目に2匹のナイーブ NMR Iマウスに皮下注射した。血液サンプルの採取と血清の入手は23日目に行った。

【0219】

血清を入手するために、心臓穿刺により得た血液を、最初に37℃で1時間インキュベーションした後、4℃で少なくとも2時間インキュベーションした。次いで、細胞の構成成分を、Beckman GPKR 遠心機にて、2回、3000 rpm、4℃で10分間ペレット化し、上清を56℃で45分間不活化した。Heraeus biofuge 15 R にて、13000 rpm、4℃で10分間さらに遠心した後、血清を取り出し、さらに使用するまで-20℃で保存することができる。

【0220】

最初の血液採取および免疫前血清の入手の後、2匹のウサギに最初に、等部分のPBS⁻およびFCAからなる懸濁液中の、50 μg のC末端21 kD HC110-Rタンパク質、および50 μg の54 kD N末端HC110-Rタンパク質を皮下注射で投与した。最初の免疫後、31日目および79日目に、さらに2回、100 μg の抗原を用いて免疫した。最初の血液採取は43日目に行った。2回目の血液採取と血清の入手は、最初の免疫から98日目に行った。

【0221】

参考文献

1. Allard W. J. , Sigal I. S. 及びDixon R. A. F. (1987) ヒトM1ムスカリン性アセチルコリン受容体をコードしている遺伝子の配列. *Nucleic Acids Res.* 24, 10604.
2. Altschul S. F. 及びLipman D. J. (1990) 多重アライメントについてのタンパク質データベースサーチ (探索). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5509-5513.
3. Appel R. D. , Bairoch A. 及びHochstrasser D. F. (1994) 生物学者用の情報検索ツールの新たな形成: ExPASy WWW serverの例. *Trends Biochem. Sci.* 19, 258-260.
4. Aviv H. 及びLederer P. (1972) オリゴチミジル酸セルロース上のクロマトフラフィーによる生物学的活性グロビンメッセンジャーRNAの精製. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1408-1412.
5. Bacon K. B. , Westwick J. 及びCamp R. D. (1989) カルシウムチャネルアゴニストによるIL-8-、IL-1 α -及びIL-1 β -誘導性インビトロ ヒトリンパ球遊走の潜在的かつ特異的な阻害. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165, 349-354.
6. Boyd V. L. , Bozzini M. , Zon G. , Noble R. L. 及びMattaliano R. J. (1992) カルボキシ末端からのペプチド及びタンパク質のシーケンシング. *Anal. Biochem.* 206, 344-352.
7. Bradford M. (1976) タンパク質染色結合の原理に利用できるタンパク質 (μg 量) の定量化についての迅速且つ敏感な方法. *Anal. Biochem.* 72, 248-252.

10

20

30

40

50

8. Brendel V., Bucher P., Nourbakhsh I. R., Blaisdell B. E. 及び Karlin S. (1992) タンパク質配列の統計学的分析用の方法及びアルゴリズム. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2002 - 2006.
9. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W. 及び Prasher D. C. (1994) 遺伝子発現用のマーカーとしての緑色蛍光タンパク質. *Science* 263, 725 - 788.
10. Chan M-S. (1997) 50年間の一腸管の線虫感染症の世界的な苦悩. *Parasitol. Today* 13, 438 - 443.
11. Chen W., Terada M. 及び Cheng J. T. (1996) γ -アミノブチル酸受容体における PF1022A、新規駆虫薬の結合検定及び結合による、*Ascaris* 筋肉調製における γ -アミノブチル酸受容体のサブタイプの特徴づけ. *Parasitol. Res.* 82, 97 - 101.
12. Chomczynski P. (1992) DNA及びRNAのプロットティングについての1時間下方アルカリンキャピラリートランスファー. *Anal. Biochem.* 201, 134 - 139.
13. Chomczynski P. (1993) 細胞及び組織試料由来のRNA、DNA及びタンパク質の単一工程同時単離用の試薬. *BioTechniques* 15, 532 - 534; 536 - 537.
14. Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) 酸グアニジウム チオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出によるRNA単離についての単一工程方法. *Anal. Biochem.* 162, 156 - 159.
15. Coombs L. M., Pigott D., Proctor A., Eydmann M., Denner J. 及び Knowles M. A. (1990) グアニジンイソチオシアネートを用いる、小腫瘍試料由来のDNA、RNA及びキナーゼ活性を示す抗原性タンパク質の同時単離. *Anal. Biochem.* 188, 338 - 343.
16. Conder G. A., Johnson S. S., Nowakowski D. S., Blake T. E., Dutton F. E., Nelson S. J., Thomas E. M., Davis J. P. 及び Thompson D. P. (1995) インビトロ及びインビボモデルにおけるシクロデブシペプチドPF1022Aの駆虫薬プロファイル. *J. Antibiotics* 48, 820 - 823.
17. Davletov B. A., Meunier F. A., Ashton A. C., Matsushita H., Hirst W. D., Lelianova V. G., Wilkin G. P., Dolly J. O. 及び Ushkaryov Y. A. (1998) α -ラトロトキシンによる刺激される小胞エキソサイトーシスは、ラトロフィリンにより媒介され、外部 Ca^{2+} と貯蔵 Ca^{2+} の両方を必要とする. *EMBO J.* 17, 3909 - 3920.
18. Davletov B. A., Shamotienko O. G., Leliana V. G., Grishin E. V. 及び Ushkaryov Y. A. Ca^{2+} 依存性 α -ラトロトキシン結合タンパク質の単離及び特徴づけ. *J. Biol. Chem.* 271, 23239 - 23245.
19. Drexler H. G., Dirks W., MacLeod R. A. F., Quentmeier H. 及び Steube K. (eds.) (1995) ヒト及び動物細胞系のDSMカタログ; Fifth Edition, Braunschweig.
20. Jackson R. J., Howell M. T. 及び Kaminski A. (1990) ピコルナウイルスRNA翻訳の開始の新規メカニズム. *Trends Biochem. Sci.* 15, 477 - 483.
21. Devereux J., Haeblerli P. 及び Smithies O. (50

- 1984) VAXの配列分析プログラムの包括的セット. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395。
22. Fivash M., Towler E. M., Fisher R. J. (1998) 巨大分子相互作用についてのピアコア. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 97-101。
23. Fukashe T., Koike T., Chinone S., Akiham a S., Iagake H., Takagi M., Shimizu T., Yaguchi T., Sasaki T. 及びOkada T. (1990) 犬及び猫における腸寄生性線虫のPF1022A、新規環状デプシペプチドの駆虫薬効果. *Proc 110th Meet Jap Soc vet Sci*, 122 (Abstr.)。 10
24. Giese G., Wiegers W., Kubbies M., Scherbarth A. 及びTraub P. (1995) MPC-11マウスプラズマ細胞腫細胞におけるオカダ酸共誘導性ピメンチン発現及び細胞周期停止. *J. Cell. Physiol.* 163, 145-154。
25. Geßner G., Methe S., Rink T. 及びBoheim G. (1996) イオン透過孔及びPF1022Aの駆虫活性、シクロオクタデプシペプチドは関連していない. *Pestic. Sci.* 48, 399-407。
26. Grynkiewicz G., Poenie M. M. 及びTsien R. Y. (1985) 大きく改良した蛍光特性を有するCa²⁺指示薬の新たな発現. *J. Biol. Chem.* 260, 3440 - 3450。 20
27. Gyuris J., Golemis E., Chertkov H. 及びBrent R. (1993) Cdk 2と結合するCdi 1、ヒトG1及びS相タンパク質ホスファターゼ. *Cell* 75, 791-803。
28. Harder A., Londershausen M. 及びMehlhorn H. (1997) ヘテラキスspumosaの4の幼虫期及び成虫は、駆虫薬 シクロデプシペプチドPF 1022Aにより障害を負う. *Zbl. Bakterirol.* 286, 212。
29. Henkel A. W. 及びSankaranarayanan S. (1999) α-ラトロトキシン作用メカニズム. *Cell Tissue Res.* 296, 229-233。 30
30. Holz G. G. 及びHabener J. F. (1998) クロゴケグモ (Black widow spider) α-ラトロトキシン：構造の相同性を分泌促進性ホルモンのグルカゴン様ペプチド-1ファミリーと共有しているシナプス前神経毒、*Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121, 177-184。
31. Hunkapiller M. W., Hewick R. M., Dreyer W. J. 及びHood L. E. (1983) ガス相配列決定装置を用いた高感度シーケンシング. *Meth. Enzymol.* 91, 399-413。
32. Ichtchenko, K., Bittner, M. A., Krasnoperov, V., Little, A. R., Chepurny, O., Holz, R. W. 及びPetrenko, A. G. (1999) 新規広域発現性α-ラトロトキシン受容体は、Gタンパク共役受容体のCIRLファミリーのメンバーである. *J. Biological Chem.* 274, 5491-5498。 40
33. Jackson R. J., Howell M. T. 及びKaminski A. (1990) ピコルナウイルスRNA翻訳阻害の新しいメカニズム. *Trends Biochem. Sci.* 15, 477-483。
34. Jang S. K., Krausslich H. G., Nicklin M. J., Duke G. M., Palmenberg A. C. 及びWimmer E. (1988) 脳心筋炎ウイルスRNAの5'非翻訳領域セグメントは、インビトロ翻訳中のリボソームの内部侵入を引き起こす. *J. Virol.* 62, 2636-2643 50

35. Kachi S., Ishih A. 及び Terada M. (1994) ラット及びマウスの中樞神経系に定住する広東住血線虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) の PF1022A の効果. *Jpn. J. Parasitol.* 43, 483-488.
36. Kachi S., Ishih A. 及び Terada M. (1995) ラットの中樞神経系中へ移住する肺動脈及び肝臓中の成人広東住血線虫の PF1022A の効果. *Parasitol. Res.* 81, 631-637.
37. Kachi S., Terada M. 及び Hashimoto H. (1997) インビトロにおける広東住血線虫の移動性についての PF1022A の影響. *Parasitol. Res.* 83, 578-582. 10
38. Kachi S., Terada M. 及び Hashimoto H. (1998) マウスにおける広東住血線虫 (*Angiostrongylus costaricensis*) についての PF1022A、新規抗線虫薬のアーモーフォウ (*armorphou*) 及び多型の効果. *Jpn. J. Pharmacol.* 77, 235-245.
39. Klein R. D. 及び Geary T. G. (1997) 非抗菌化合物についての高スループットスクリーニングのための道具としての組換え微生物, *J. Biomol. Screening* 2, 41-49.
40. Krasnoperov V., Bittner M. A., Holz R. W. 及び Chepurny O. (1999) α -ラトロトキシン結合及び α -ラトロトキシン刺激性分泌についての構造的な要求. *J. Biological Chem.* 274, 3590-3596. 20
41. Kozak M. (1989) 翻訳についてのスキャンニングモデル: An update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.
42. Kurachi S., Sze L. 及び Kurachi K. (1998) FUGENETM 6 トランスフェクション試薬を用いる Hep G2 細胞の改良トランスフェクション. *Biochemica* 3, 43-44.
43. Laemmli U. K. (1970) バクテリオファージ T4 の頭部の会合中の構造タンパク質の開裂. *Nature* 227, 680-685. 30
44. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. 及び Randall R. J. (1951) フォリン (Folin) フェノール試薬を用いたタンパク質測定. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
45. Martin R. J. (1997) 駆虫薬の作用モデル. *Veterinary J.* 154, 11-34.
46. Martin R. J., Robertson A. P. 及び Bjorn H. (1997) 駆虫薬の標的部. *Parasitol.* 114, 111-124.
47. Martin R. J., Harthe A., Londershausen M. 及び Jeschke P. (1996) シクロデブシペプチド PF1022A の駆虫作用、及び回虫 *suum* の筋細胞における電気生理学的効果. *Pestic. Sci.* 48, 343-349. 40
48. McCormack J. G. 及び Cobbold P. H. (1991) 細胞カルシウム: 実用的アプローチ. *The practical approaches series*, IRL press, Oxford, 30-42.
49. McMaster G. K. 及び Carmichael G. G. (1977) グリオキサール及びアクリジンオレンジを用いる、ポリアクリルアミドゲル及びアガロースゲル上の 1 本鎖及び 2 本鎖核酸の分析. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4835-4838.
50. Nakada M. T., Haskell K. M., Ecker D. J., Stadel J. M. 及び Crooke S. T. (1989) 3T3-L1 繊維芽 50

- 細胞における β_2 - アドレナリン作動性受容体の遺伝的退治. *Biochem. J.* 260, 53-59.
51. Pearson W. R. 及び Lipman D. J. (1988) 生物学的配列比較のための改良型ツール. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 85, 2444-2448.
52. Petrenko A. G. (1993) α -ラトロトキシン受容体. 神経終末機能における意味. *FEBS Lett.* 325, 81-85.
53. Plasterk R. H. (1996) Tc1/マリンナートランスポゾンファミリー. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 204, 125-43.
54. Rahman M. A., Ashton A. C., Meunier F. A., Davletov B. A., Dolly J. O. 及び Ushkaryov Y. A. (1999) α -ラトロトキシンにより刺激されるノエルピネフリンエキソサイトーシスは、外部 Ca^{2+} 及び貯蔵 Ca^{2+} の両方を必要とし、ラトロフィリン、Gタンパク質及びホスホリパーゼCにより媒介される. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 379-386.
55. Rees S., Coote J., Stables J., Goodson S., Harris S. 及び Lee M. G. (1996) 組換えタンパク質を発現する全ての抗生物質耐性細胞を病気に罹らせる安定な哺乳動物細胞系を創り出すためのビシストロン性ベクター. *BioTechniques* 20, 102-112.
56. Sambrook J., Fritsch E. F. 及び Maniatis T. (1989) 分子クローニング. *A laboratory handbook.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 7.43-7.45.
57. Samson-Himmelstjerna G. von, Harder A., Schnieder T., Kalbe J. 及び Mencke N. (2000) 新規駆虫薬デブシペプチド PF1022A のインビボ活性. *Parasitol. Res.* 86, 194-199.
58. Sasaki T., Takagi M., Yaguchi T., Miyadoh S., Okada T. 及び Koyama M. (1992) 新規駆虫薬シクロデブシペプチド、PF1022A. *J. Antibiotics* 45, 692-697.
59. Schlack P. 及び Kumpf W. (1926) Ueber eine neue Methode zur Ermittlung der Konstitution von Peptiden. *Z. Physiol. Chemie Hoppe-Seyler* 154, 125-170.
60. Schmitt-Wrede H.-P., Waldruff A., Kruecken J., Harder A. 及び Wunderlich F. (1999) 寄生線虫ヘモンクス コントルトスのヘキソキナーゼコード化 cDNA の特徴づけ. *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 439-444.
61. Seagar M., Liao C., Charvin N., Marquie B., Martin-Moutot N., Boudier J. A., Boudier J.-L., Shoji-Kasai Y., Sato K. 及び Takahashi M. (1999) エキソサイトーシスに関連付けられるタンパク質と、電位作動型カルシウムチャネルとの間の相互作用. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 289-297.
62. Smith T. F. 及び Waterman M. S. (1981) 共通分子配列の同定. *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.
63. Sugita S., Ichtchenko K., Khvotchev M. 及び Suedhof T. C. (1998) α -ラトロトキシン受容体 CIRL/ラトロフ

- ィリン1 (CL1) は、遍在性Gタンパク連結受容体の異常ファミリーを規定する。
J. Biological Chem. 273, 32715-32724。
64. Tagaki M., Sasaki T., Yaguchi T., Kodama Y., Okada T., Miyadoh S. 及びKoyama M. (1991) 駆虫効果を有する新規シクロデブシペプチド、PF1022Aについて。 *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 65, 326 (Abstr.)。
65. Terada M. (1992) 広東住血線虫及び単離されたカエル直筋における、シクロデブシペプチドの新規構造を有する抗線虫駆虫薬、PF1022Aの神経薬理学的作用機構。 *Jpn. J. Parasitol.* 41, 1-18。
66. Terada M., Ishih A., Tungtrongchitr A., Sano M. 及びShomura T. (1993) 経路、用量及び剤系に対する特別の基準を用いた、マウスにおいて広東住血線虫の幼虫を発育させる際のPF1022Aの効果。 *Jpn. J. Parasitol.* 42, 199-210。
67. Thomas A. P. 及びDelaville F. (1991) 細胞集団及び単一細胞において細胞基質不含カルシウム濃度を測定するための蛍光指標の使用。 *IRL Press*, 1-54。
68. Waller P. J. (1997) 駆虫薬 resistance. *Veterinary Parasitology* 72, 391-412。
69. Waller P. J. (1998) 家畜の線虫寄生虫を統合退治する概念に対する国際的アプローチ。 *Veterinary Parasitology* 73, 155-164。
70. Yang F., Moss L. G. 及びPhillips G. N. Jr. (1996a.) 緑色蛍光タンパク質の分子構造。 *Nature Biotechnology* 14, 1246-1251。
71. Yang T. T., Cheng L. Z. 及びKain S. R. (1996b) 最適コドン使用頻度及び発色団突然変異により、感受性が増進された緑色蛍光タンパク質が提供される。 *Nucleic Acid Res.* 24, 4592-4593。

【図面の簡単な説明】

【図1】HC110-R mRNA及びタンパク質

- (A) ヘモンクス コントラス由来の全量RNA及びHC110-Rの3.6kbp cDNAを使用したノーザンブロット分析。
- (B) インビトロ翻訳^{3 5} S-標識化HC110-Rタンパク質の10% SDS-PAGEフルオログラム。インビトロ転写HC110-R mRNA (HC110-R) 1µgのインビトロ翻訳、HC110-R mRNA (コントロール) を含まないネガティブコントロール、ポジティブコントロールとしてのルシフェラーゼmRNA (ルシフェラーゼ) 1µg。

【図2】HC110-Rの全長cDNA配列及び誘導アミノ酸配列

HC110-RのKozakモチーフ (Kozak, 1989) 及びポリアデニル化シグナル (ジーンバンクアクセッション No. : AJ272270) は下線で示す; 100位の開始コドンは太字で示す。シグナルペプチド (残基1~21、太字)、レクチン様配列 (残基22~125、点)、Thrストレッチ (残基128から147、グレーの網掛け); 構造CX₉WX₁₂CX₉WCX₅WX₉CX₃Wのシステイン リッチ (豊富) 領域 (残基166-221、波線、Cys及びTrp残基はさらに太字); 構造CXWWX₆WX₄CX₁₁CXCの4-Cys領域 (残基78-524、破線、Cys及びTrp残基はさらに太字); 7回膜貫通領域 (残基563~772の間、グレーの網掛け) PEST領域 (残基915~933、グレーの網掛け); N-グリコシル化部位 (残基26、499及び862、太字); セクレチンGPCR間 (部位595及び666、太字及び二重下線) のCys-Cysペアーの高保存推定ジスルフィド結合。

【図3】H. contortus HC110-R及び線虫エレガンス コスミドクロー

ン B 0 4 5 7 (C E - B 0 4 5 7 ; G e n B a n k ア ク セ ャ シ ョ ン N o . : Z 5 4 3 0 6) の 誘 導 ア ミ ノ 酸 配 列 の ア ラ イ メ ン ト

シグナルペプチド (S P、残基 1 ~ 2 1、太字)、レクチン様配列 (レクチン、残基 2 2 ~ 1 2 5、点) ; T h r ストレッチ (T - リッチ、残基 1 2 8 ~ 1 4 7、グレーの網掛け) ; 構造 C X₉ W X_{1 2} C X₉ W X C X₅ W X₉ C X₃ W の C y s - リッチ領域 (C シグネチャー、残基 1 6 6 ~ 2 2 1、波線、C y s 及び T r p 残基はさらに太字) ; 構造 C X W W X₆ W X₄ C X_{1 1} C X C の 4 - C y s モチーフ (4 C 領域、残基 4 7 8 - 5 2 4、破線、C y s 及び T r p 残基はさらに太字) ; 7 回膜貫通領域 (残基 5 3 6 ~ 7 7 2 の間、太字及び下線) P r o - リッチストレッチ (P - リッチ、残基 8 4 5 ~ 8 6 1、グレーの網掛け) ; P E S T 領域 (P E S T、残基 9 1 5 ~ 9 3 3、グレーの網掛け) ; N - グリコシル化部位 (残基 2 6、4 9 9 及び 8 6 2、太字) ; セクレチン G P C R 間の C y s - C y s ペアの高保存推定ジスルフィド結合 (5 9 5 及び 6 6 6 部位、太字及び二重下線)。同一アミノ酸は星印をもって、非常に関連するアミノ酸はコロンをもって、関連のあるアミノ酸は単一の点をもって示す。

10

【図 4】7 回膜貫通受容体 H C 1 1 0 - R 及びセクレチン サブファミリーの種々の他の受容体のアライメント

H C 1 1 0 - R : ヘモンクス コントルトス 7 回ラセンオーファン膜貫通受容体 (アクセション n o . : A J 2 7 2 2 7 0) ; B T L A T 3 : B o s t a u r u s ラトロフィリン - 3 (種々のスプライシング変異体アクセション n o . : G 4 1 6 4 0 5 3 - G 4 1 6 4 0 7 5) ; R N L A T 1 : ラッタス (R a t t u s) n o r v e g i c u s ラトロフィリン - 1 (アクセション n o . : U 7 8 1 0 5, U 7 2 4 8 7) ; M M E M R 1 : M u s 筋肉 E M R 1 ホルモン受容体前駆体 (アクセション n o . : Q 6 1 5 4 9) ; H S C D 9 7 : ホモサピエンス白血球活性化抗原 C D 9 7 (アクセション n o . : P 4 8 9 6 0) ; M M C A D H : M . m u s c u l u s 幼虫 7 回膜貫通受容体前駆体 (アクセション n o . : G 3 8 0 0 7 3 8) ; X L X R F 1 : X e n o p u s l a e v i s コルチコトロピン関連受容体前駆体 (アクセション n o . : O 4 2 6 0 2) ; R N V I P 1 : R . n o r v e g i c u s 血管作動性腸管ポリペプチド受容体前駆体 2 (アクセション n o . : Q 0 2 6 4 3)。この 7 回膜貫通ドメインはグレーの網掛け (I - V I I) で示し、高度に保存された推定ジスルフィド結合を太字で示す。

20

30

【図 5】H . c o n t o r t u s H C 1 1 0 - R 及び R . n o r v e g i c u s ラトロフィリン - 1 (G e n B a n k A c c . N o . U 7 8 1 0 5, U 7 2 4 8 7) の誘導アミノ酸配列のアライメント

シグナルペプチド (S P、残基 1 ~ 2 1、太字)、レクチン様配列 (l e c t i n、残基 2 2 ~ 1 2 5、点) ; T h r ストレッチ (T - リッチ、残基 1 2 8 ~ 1 4 7、グレーの網掛け) ; 構造 C X₉ W X_{1 2} C X₉ W X C X₅ W X₉ C X₃ W の C y s - リッチ領域 (C シグネチャー、残基 1 6 6 ~ 2 2 1、破線、C y s 及び T r p 残基はさらに太字) ; 構造 C X W W X₆ W X₄ C X_{1 1} C X C の 4 - C y s モチーフ (4 C 領域、残基 4 7 8 ~ 5 2 4、破線、C y s 及び T r p 残基はさらに太字) ; 7 回膜貫通領域 (残基 5 3 6 と 7 7 2 との間、太字及び下線) ; P r o - リッチストレッチ (P - リッチ、残基 8 4 5 ~ 8 6 1、グレーの網掛け) ; P E S T 領域 (P E S T、残基 9 1 5 ~ 9 3 3、グレーの網掛け) ; N - グリコシル化部位 (残基 2 6、4 9 9 及び 8 6 2、太字) ; セクレチン G P C R s 間 (部位 5 9 5 及び 6 6 6、太字及び二重下線) の C y s - C y s ペアの高度に保存された推定ジスルフィド結合。同一アミノ酸は星印により、非常に関連するアミノ酸はコロンにより、関連アミノ酸は 1 個の点で示す。

40

【図 6】H C 1 1 0 - R タンパク質の構造及びラトロフィリン - 1 の構造

(A) 7 回膜貫通ドメインを有する H C 1 1 0 - R の疎水性プロットイング。

(B) 以下の特徴的なモチーフを有する H C 1 1 0 - R のタンパク質構造 : シグナル配列 (S P)、レクチンドメイン (レクチン)、T h r ストレッチ (T - ストレッチ)、C y s モチーフ (シグネチャー)、4 - C y s 領域 (4 C 領域)、7 回膜貫通ドメ

50

イン（１－７、黒色）、P r o－リッチモチーフ（P－リッチ）及びP E S T配列（P E S T）。推定グリコシル化領域部位は下部のダイアグラム（N）にて示す、推定ジスルフィド結合（大文字なしの細線）の４C領域のC y s残基及び２つの保存C y s残基である。

（C） ラトロフィリン－１のタンパク質構造。ラトロフィリン－１は、T h rストレッチを有していないが、付加的なオルファクトメディンモチーフ（オルファクトメディン）、P r o－T h r領域（P－T領域）、リンカードメイン（リンカー）及び幾つかの繰り返しを含む長い領域を含む。

【図７】H E K－２９３及びC O S－７細胞におけるH C １１０－R－G F Pの発現

（A） G F P（G F P）又はH C １１０－R－G F P（H C １１０－R）を用いて一過的にトランスフェクションしたH E K－２９３及びC O S－７細胞、及び非トランスフェクト（n. t.）H E K－２９３及びC O S－７細胞由来の全タンパク質は、トランスフェクションの２４時間後にT r i z o l法により単離した。

（B） β_2 －R－G F P（ β_2 －R）又はM １－R－G F P（M １－R）を用いて一過的にトランスフェクションしたH E K－２９３細胞、及び非トランスフェクト（n. t.）H E K－２９３細胞由来の全タンパク質は、トランスフェクションの２４時間後にT r i z o l法により単離した。S D Sマーカーバンドは、１１６、９０、７０及び５５k D a（マーカー）である。

レーン当たり全タンパク質２０ μ gを１０％ポリアクリルアミドゲルにて分画化し、ニトロセルロース膜にブロットした。R o t i B l o c k溶液中にて一晩中ブロッキングして、モノクローナルマウス抗－G F P I g G一次抗体（０．４ μ g／m L）とモノクローナルウサギ抗マウスI g G－H R P二次抗体（１：２５０００）を用いて、E C Lシステムによる免疫検出を行なった。

【図８】C L S MによるトランスフェクトC O S－７におけるH C １１０－R及び β_2 －Rの細胞局所化

いずれもC末端G F Pタグを有しているH C １１０－R－G F P及び β_2 －R－G F Pを用いて、C O S－７細胞をトランスフェクションした。トランスフェクトの２４時間後にC L S Mを行なった。棒線は１０ μ mに相当する。

（A） H C １１０－R－G F Pは、原形質膜上及び細胞区画中に発現する。細胞小胞のコンパクションが核近傍に見られる。

（B） 酸リソソームと緑色H C １１０－R－G F Pタンパク質とのC L S M共存は、L y s o T r a c k e r R e d D N D－９９を用いて、３７℃で１時間染色した。

（C） β_2 －R－G F Pトランスフェクト細胞は、H C １１０－R－G F Pと類似のG F P蛍光パターン、又は以下の（A）に記載のようなG F P蛍光パターンを示す。この受容体は、原形質膜及び小胞中に局在化し、幾つかの場合には酸リソソームと共に局在化し得る（染色はL y s o T r a c k e r R e d D N D－９９を用いて３７℃にて１時間で行なった）。

（D） 発現した β_2 －R－G F Pは、幾つかの場合、小胞体と共に局在化する（染色はモノクローナル抗K D E L抗体を用いて行なった）。

【図９】H C １１０－Rに対する α －ラトロトキシンの結合

（A） 単離したL a t r o d e c t u s r e v i v e n s i s 毒液腺（v e n o m g l a n d s）（１）由来の全タンパク質５ μ g、及び純粋な１３０k D a α －L T X（２）、p I R E S １n e oベクターのH C １１０－R－M y c／H i s構築物を用いて安定にトランスフェクションしたH E K－２９３細胞由来の各ケースの全タンパク質４０ μ g（３）、非トランスフェクト細胞（４）及び５E. c o l iに導入したH C １１０－Rの４k D a N末端（６）及び２１k D a C末端（７）を、１０％S D Sポリアクリルアミドゲルにて分画し、一晩中ブロッティング及びブロッキングした。変性タンパク質は、２０nM α －L T Xと共に２時間インキュベーションし、ウサギ抗 α －L T X I g G－H R P（１：５０００）及びヤギ抗ウサギI g G抗体（１：２５０００）及びE C Lシステムを用いて検出される α －L T Xの結合が可能となる。

(B) E. coli に導入した HC110-R の C 末端 (1) 及び N 末端 (2) 由来の各ケースの全タンパク質 40 μ g、及び非トランスフェクト HEK-293 細胞由来の全タンパク質 (3)、及び HC110-R-Myc/His を用いて安定にトランスフェクションした HEK-293 細胞 (4)、及び生体 H. contortus 線虫 (5) を、10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて分画し、4M 尿素含有再生緩衝液を用いて部分的に再生させた。プロットを一晩中ブロッキングし、20 nM 純粋 α -LTX を用いてインキュベーションし、そして α -LTX 結合タンパク質をウサギ抗 α -LTX IgG 抗体 (1:5000)、ビオチンタンパク質 A (1:100)、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ (1:3000) 及び ECL システムを用いて検出した。

【図 10】 HC110-R 媒介 Ca^{2+} シグナリングにおける α -LTX の用量依存性
HC110-R-GFP を用いて一過的にトランスフェクションした 48 時間後に、HEK-293 細胞を 1 μ M Fura-2/AM を用いて 30 分間ローディングした。この細胞を、種々の α -LTX 濃度の測定を開始した 6 分後にさらに 44 分間刺激した。340/380 nm の商 (比率) は、時間の機能として計測した。選択した細胞の数を n として表す。 10

(A) HC110-R-GFP-発現細胞は、7.5 nM (黒線) 又は 25 nM α -LTX (グレーの線) を用いて刺激した。

(B) 50 nM (グレーの線) 又は 75 nM α -LTX (黒線) を、HC110-R-GFP-発現細胞に加えた。

(C) HC110-R-GFP-発現細胞は、90 nM (グレーの線) 又は 120 nM α -LTX (黒線) を用いて刺激した。 20

(D) $[Ca^{2+}]_i$ は、横軸に nM でプロットし、HC110-R-GFP 発現 HEK-293 細胞を刺激して得られた第一の迅速型ピーク (第一のピーク、グレーの線) 及び第二の遅延型ピーク (第二のピーク、黒線) について α -LTX 濃度 (0, 7.5, 25, 50, 75, 90 及び 120 nM) を縦軸にプロットした。

【図 11】 HC110-R トランスフェクト HEK-293 細胞の Ca^{2+} イメージング
(A) C-末端 GFP タグを有する HC110-R (HC110-R-GFP) : 黒線。N 末端 GFP タグを有する HC110-R (GFP-HC110-R) : 灰色線。

(B) 非トランスフェクト HEK-293 細胞 (n. t.、黒線) 及び GFP トランスフェクト細胞を用いた 75 nM α -LTX (GFP、灰色線)。 30

(C) C-末端標的ヒト M1 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M1-R-GFP、灰色線) 及び C-末端標的化マウス β_2 アドレナリン作動性アセチルコリン受容体 (β_2 -R-GFP、黒線) を用いてトランスフェクションした細胞を用いた 75 nM α -LTX。

(D) HC110-R-GFP トランスフェクト細胞を、2 mM EGTA を用いて 6 分間処理した後、 α -LTX (75 nM) (+EGTA、灰色線) を加えた。EGTA はコントロールから省いた (-EGTA、黒線)。

(E) 2 mM EGTA は、 α -LTX (75 nM) を加えた 10 分後に加えた (+EGTA、灰色線)。コントロール混合物には EGTA は加えなかった (-EGTA、灰色線)。 40

(F) コントロールとして、非トランスフェクト細胞 (n. t.、灰色線) 及び HC110-R-GFP-発現細胞 (黒線) を、2 nM EGTA と共に 30 分間混合した。

【図 12】 α -LTX により生じるシグナル伝達を用いた、BAY 44-4400 による干渉

HEK-293 を、GFP タグ化 HC110-R タンパク質を用いて一過的にトランスフェクトし、そのトランスフェクションの 48 時間後に刺激した (矢印)。 Ca^{2+} イメージングを 50 分間行なった (図 A~D)、非トランスフェクト HEK-293 細胞の種々の内因性天然受容体を用いた対照実験は 20 分間行なった。n は細胞の数を示す。

(A) 400 ng/mL の BAY 44-4400 (黒線) 又は PF1022-001 50

(灰色線)を細胞に添加する。コントロールとして、BAY44-4400又はPF1022-001を加えた後に、その細胞を、種々の物質の溶剤としても供するNa⁺HBS/HEPES緩衝液(HBS)を用いて処理した。

(B) 4 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 及びPF1022-001 (灰色線)の存在下にて、 α -LTX(75 nM)により生じるシグナル伝達。

(C) 4 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線)と共に90分間、プレインキュベーションした細胞における α -LTXにより生じるシグナル伝達。この物質は α -LTXを加える前に除いた。

(D) 400 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線)と共に90分間、プレインキュベーションしたHEK-293-GFPトランスフェクト細胞により生じるシグナル伝達。この物質は α -LTXを加える前に除いた。

(E) 非トランスフェクトHEK-293細胞は、1 mM 塩化カルバミルコリン(カルバコール)を用いて、400 ng/mL BAY44-4400の存在下(400 ng/mL BAY44-4400、黒線)又は非存在下(灰色線、-BAY44-4400)にて100秒間刺激した。

(F) 非トランスフェクトHEK-293細胞は、1 mM イソプロテレノール及び1 mMアレコリンを用いて、400 ng/mL BAY44-4400の存在下(400 ng/mL BAY44-4400、黒線)又は非存在下(灰色線、-BAY44-4400)にて、各場合において100秒間刺激した。

【図13】FACSscanによるHC110-RトランスフェクトHEK-293細胞に対するPF1022A結合の検出

トランスフェクトしていない、GFP、HC110-R-GFP、GFP-HC110-R、 β_2 -R-GFP及びM1-R-GFPを用いて一過的にトランスフェクションした、及びHC110-R-Myc/Hisを用いて一過的に同時トランスフェクションした 5×10^5 HEK-293細胞の各場合において、トランスフェクション後、0.5 μ g/mL PF1022A-ビオチン及びストレプトアビジン-フィコエリトリン(phycoerythrin)(1:300)と共に24時間インキュベーションし、そして固定した。ネガティブコントロールとして、HC110-R-GFPトランスフェクト細胞を、PF1022A-ビオチンを除いてストレプトアビジン-フィコエリトリンのみとインキュベーションした。自己蛍光の減算、即ち、全ての緑色蛍光細胞の緑色チャンネルにおける非トランスフェクト細胞(n.t.) 4.6%、及び赤色チャンネルにおけるストレプトアビジン-フィコエリトリンにより生じる非特異的染色4.4%の減算の後、PF1022Aと結合しているGFP蛍光細胞(GFP、HC110-R-GFP、GFP-HC110-R、 β_2 -R-GFP、M1-R-GFP及びHC110-R-Myc/His+GFP)の比率を見出した(%におけるPF1022A結合)。3組みの混合物の平均を決定して、標準偏差を求めた。

【図14】HC110-R媒介Ca²⁺シグナル伝達に対するBAY44-4400及び光学対掌体PF1022-001の効果

1 μ M Fura-2/AMを用いた細胞のローディングを、非トランスフェクトHEK-293細胞、およびHEK-293-GFP又はM1-R-GFPを用いて一過的にトランスフェクションした48時間後に行なった。340/380 nmの商(比率)を、時間の関数として測定した。選択した細胞の数をnにより示す。

(A) 非トランスフェクト(n.t、灰色線) 及びHC110-R-GFPトランスフェクト(HC110-R-GFP、黒線) 細胞を、Na⁺HBS緩衝液中の0.1%溶媒DMSOを用いてコントロールとして6分後に混合した。

(B) HC110-R-GFP- (黒線) 及びM1-R-GFP- (灰色線) トランスフェクト細胞を、400 ng/mL BAY44-4400を用いて6分後に刺激した。

(C) (B)と同様に、HC110-R-GFP- (黒線) 及びM1-R-GFP- (灰色線) トランスフェクト細胞を、400 ng/mL PF1022-001を用い

て6分後に刺激した。

(D) HC110-R-GFP-発現細胞を、400 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線) を用いて90分間プレインキュベーションし、非結合物質を測定前に洗い流した。

(E) 10 μ M ピペラジン、非トランスフェクト細胞 (n. t.、灰色線) 及びHC110-R-GFP-発現細胞 (HC110-R-GFP、黒線) に6分後に加えた。

(F) 10 μ M ピペラジン及び400 ng/mL BAY44-4400の混合物を、非トランスフェクト細胞 (n. t.、灰色線) 及びHC110-R-GFP-発現細胞 (HC110-R-GFP、黒線) に6分後に加えることを除いて、(E)と同様に行った。 10

【図15】PF1022A誘導体を介するHC110-R媒介 α -LTXシグナル伝達の相互作用

1 μ M Fura-2/AMを用いた細胞のローディングは、非トランスフェクトHEK-293、およびHC110-R-GFP又はM1-R-GFPを用いて一過的にトランスフェクションした48時間後に行なった。用いた α -LTXの量は、常に75 nMであった。コントロール物質を用いた実験については、細胞は、流速1.6 ml Na⁺ HBS/分で流した。340/380 nmの商 (比率) は、時間の関数として測定した。選択した細胞の数はnにて示す。

(A) [Ca²⁺]_iにおける α -LTXで誘導される変化に対する効果を有するDMSOを排除するため、 α -LTX刺激の6分前に、HC110-R-GFP- (黒線) 及びM1-R-GFP- (灰色線) 発現細胞を、0.1% DMSOと混合した。 20

(B) HC110-R-GFP-トランスフェクト細胞は、 α -LTXを添加する6分前に4 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線) と混合した。

(C) α -LTXを用いた刺激の6分前に、400 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線) をHC110-R-GFP-発現細胞に添加したことを除き、(B)と同様に行った。

(D) HC110-R-GFP-トランスフェクト細胞は、4 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線) と90分間プレインキュベーションし、非結合物質を測定前に除去した。細胞の刺激は α -LTXを用いて6分後に行なった。 30

(E) HC110-R-GFP-トランスフェクト細胞を400 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線) と90分間プレインキュベーションして、非結合物質を測定前に除去し、細胞を α -LTXで6分後に刺激したことを除いて、(D)と同様に行った。

(F) HC110-R-Myc/Hisを安定に発現する細胞を、 α -LTXの添加の6分前に、400 ng/mL BAY44-4400 (黒線) 又はPF1022-001 (灰色線) と混合した。

(G) コントロールとして、1 mM 塩化カルバミルコリン (カルバコール) を6分後に100秒間加え、再びNa⁺ HBSを用いて洗浄し、400 ng/mL BAY44-4400の存在下 (400 ng/mL BAY44-4400、黒線) 及び非存在下 (-BAY44-4400、灰色線) にて非トランスフェクト細胞に対し、再度Na⁺ HBSを用いて洗浄した。 40

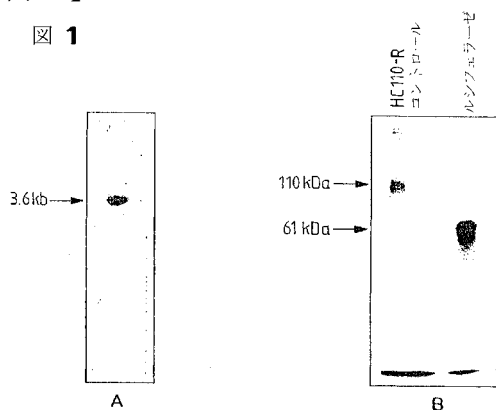
(H) M1-R-GFP-トランスフェクト細胞を、400 ng/mL BAY44-4400の存在下 (400 ng/mL BAY44-4400、黒線) 又は非存在下 (-BAY44-4400、灰色線) で6分後に1 mM カルバコールで100秒間刺激し、再度Na⁺ HBSを用いて洗浄することを除いては、(G)と同様に行った。

(I) コントロールとして、400 ng/mL BAY44-4400の存在下 (400 ng/mL BAY44-4400、黒線) 又は非存在下 (-BAY44-4400 50

、灰色線)で、3分後に1 mM イソプロテレノールで100秒間刺激し、12分後に1 mM アレコリンで100秒間刺激した。100秒後に、物質を Na^+ HBSを用いて再度洗浄した。

【图 1】

图 1



【例 3-1】

图 3

- 4124 -

[illegible]

【図 3 - 2】

- 5 / 24 -

HC110-R	ILFVAPAAVILLTWMELMNCIVYRHSK--YIFORHAADNGDIRTWGAGLWLLGYHTGCLL	742
CE-B0457	IWTFAGPACIFCANSLVWLTCTVYQHTSGGLPCRHDVDSGRSIRNMWGSALASLGYHTGCLF	763
HC110-R	WIDGHSIWAATFIANSGLQGLFIFVHYLCSERMYDIARWCKGKGLSCTSSGRSDTSLQKRGMS	812
CE-B0457	WVDSHSIWAATFIANSGLQGLFIFVHYLCSERMYDIARWCKGKGLSCTSSGRSDTSLQKRGMS	833
HC110-R	P--SEKSGSEFIYPTSEKMT---SPR---GLSS--LSSAYFQPTTHYVARDPQNGYDYATI	870
CE-B0457	PQWMSSTCSDFLWINDKYLINSOTYMLVYHGMHRIENSVYQAP--HH-QIYE-QQP-QTYDYATI	898
HC110-R	AYGMVPGMIPMASSPSPHGA--IHYPSFOLDSSYQP-QIENHRFPDPSPPSPDPSPPSPDPSPP	931
CE-B0457	AYGMVPGH---RWAA--P-PAYQRLAVAEGRYGLQYQGHRIPEPSPSPSPSPSPSPSPSPSPSP	962
HC110-R	SKVIRPSSKMSDGSAYSDGSSSVLTETVPSGATVLRWLGKNGPPHWRW	986
CE-B0457	GSGRPPSSKMSDGSAYSDG--SSMLTETVPSGATVLRIDL--NKPSMYQDL 1014	

【図 5 - 2】

- 9 / 24 -

HC110-R	SSQKLVN-----QLTVNVHNAIR--AKENWQWSPVAKQTYATRLNGVERAMTS	331
ラトロフィリン-1	NYWQKHRENTCTDYKAVVTVONLRPALESKQWATEQVHTATMLDVLREGAPL	656
HC110-R	SSTVYSSENVYQPLWMTENSESIRTPSQWYFLFSPMALGACNVDVQVPSALEAM	391
ラトロフィリン-1	LADWREPARFLAKQNVVLSVSTGQVQGVLPVQYASESSIQLSANTIK---QN	712
HC110-R	TGLDARVYVYASANIGSEMPEPVEISAGEQKPTGLRRRRIVSRVAVSLQGVIR	451
ラトロフィリン-1	SRMGKVKVFLVNLGLFLSTENATVLAGAGTGGPGASLVNVSQVLAASINKESSR	772
HC110-R	LPILKPIITTFHYPEALARMSSPESQWMTED--KQWSTSGCSLQSHNTHTYCAC	507
ラトロフィリン-1	VFMIDVITTVARLEAKKHENAN---CSFWYTSERMLGYWSTQSCRIVENKHTHTYCAC	829
HC110-R	SHMTFHAVIMUYGHSISSEDQQLFLTYTGCTLSIVCLTLTFPCVVFVKGGBVFI	567
ラトロフィリン-1	SHLTNFAVIMAHNTYQCRINELLSSVITWGVISLVCLAICTSTFCRLGLQTRNTI	889
HC110-R	HKNLCASLGIAEIVLAGIWRTEKFBQMIAGCLLFFLSALTWMLRGYQYQMLVEV	627
ラトロフィリン-1	RKNLCINFLAELFLVGTDKTYEVACPIFAGLLHYFLAASFMLLEGVHYLLDVEV	949
HC110-R	FPASRRIFTFLVG-YGLRALITGAAAYYDPTGCTRYNCKLRYDNLFILFVAPAAVIL	686
ラトロフィリン-1	FESEYSRTKYTYLGGYCTPALVGTAAADYASVGTAKACWLVNDVFIWSEFGPVSVFI	1009
HC110-R	LTMWELMNCIVYRHSKYIPORHAADNGDIRTWGAGLWLLGYHTGCLLWID	746
ラトロフィリン-1	VYKLVFLAVYTHRMISSSVLPQSSRLDN--IKWALGALALFLGLTFAEGLLWIK	1067
HC110-R	GHSIWAATFIANSGLQGLFIFVHYLCSERMYDIARWCKGKGLSCTSSG-----	797
ラトロフィリン-1	-ESWAVWVLTFTTNAQGVTFVFCALQKQVHSYS-KCLRHYSYCCIRASPPGAGCSLK	1125
HC110-R	-SRDTSRLQKRGMSPSERSGSEFIYPTSEKMTS-----	832
ラトロフィリン-1	TSARHSVITYTGTQSRIRAMNDTVKQTESSEMGADINSTPIRGTWMLLWVVL	1185

【図 5 - 1】

- 8 / 24 -

図. 5

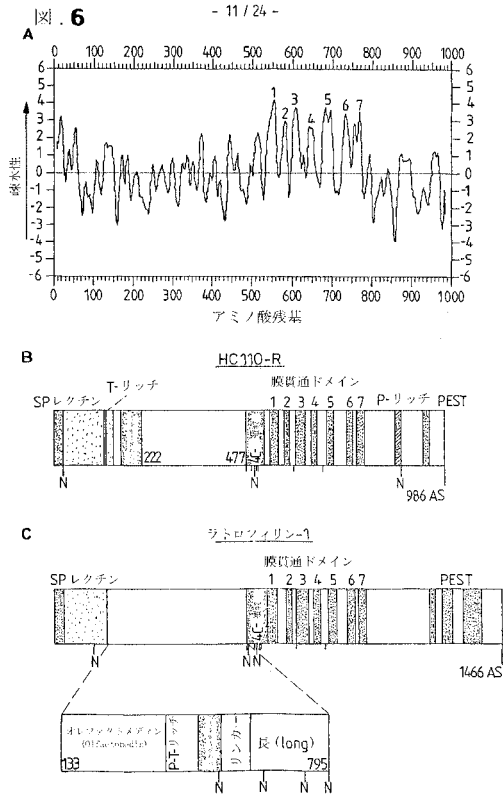
HC110-R	SP -----KENVYILLLSVWGTETVABLPQMSNLSVUCBGPABELCPHGWISTAL	51
ラトロフィリン-1	MAALAAALWSLCVTVTVLTSATQGLSRAGLPFLMRRELACGYPIELACPGSDVMVEN	60
HC110-R	ANYGRYSARVCYENELDDVVMYTOCHNPKMTTBRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDCPC	111
ラトロフィリン-1	ANYGRDODKICDAP---PQWENYQCYLPDAFKHSGRKNWYQCVVAGDAEP--DPCP	116
HC110-R	GKKYLVETVYLCVADVITTT	131
ラトロフィリン-1	GTYYKLVQYDQVPYIFVCPGTQLQVLEPTSTHESHSQCAWCKDPLQAGDGLVYHWP	176
HC110-R	YRTDILTETASWSDTYAARHTTYRLNWRVDTGTFVYDCAVFNKCRKNIVKYLDRTR	236
ラトロフィリン-1	IKSGETVIMYVYHOTSPTVWGGKTDLAVDENGWVIVATEGNGRLLVSQLPYTLR	296
HC110-R	FFGTWETGYOKRSASNAFWGVLYVLSVYVDDSSAAGNRVDYAFNTWNRREPVSIA	356
HC110-R	FEVDDVWEDMSAKSAPS	141
ラトロフィリン-1	FMPPYQEVSSVYNPRNQLYVMNVFVRYSLFPGPPPSAGPATSPLSTTTTARPTP	416
HC110-R	TTSTTTEVEDDVKEDMSAKSAPS	167
ラトロフィリン-1	LTSTASPAATTPILARAPLTHFPVGAINGQLGDPLEAPATSTRPPAPNLVSPLELCE	476
HC110-R	ATSRGIGEWATILSGTTPVRRPCPDGTGCTSSMICS-AGCWSEPGKPTTECSNDTIOQ	226
ラトロフィリン-1	PREVRVQVWPAQGMVWERPCPKGTGCTGASPCQLPCLGNRGPDLNCTSPWVQVVA	536
HC110-R	DALRETIQD-DASGIPELLRANTSDTRRMVAGDQKLNLDIIVDQVVG---REVWAK	282
ラトロフィリン-1	QIKISGGMNANTASELARHTGCTVAGDVSSVVKMEQLDILDALQALRPIERESAGK	596

【図 5 - 3】

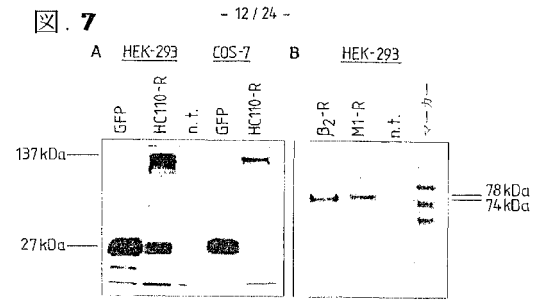
- 10 / 24 -

HC110-R	PRGLESSLSSAVPQCTTHHVRPQPPQNC	864
ラトロフィリン-1	QPRGCTSPYNTLIAESVGNPSSPPVNSPGSYREPKPELOGRGACGMOTLPLANGNNS	1245
HC110-R	YDYNTIAYGEMVPGHLMRMASSPSPHGOALHYSPDLOSSYQPTFHHRFPDPSPPSP	924
ラトロフィリン-1	YSLRSGDFPPGGGPPKPGKGNLADAAAFEMTISRLVHMLAGASGGAGPPPEPVPVP	1305
HC110-R	FPASRRIFTFLVG-YGLRALITGAAAYYDPTGCTRYNCKLRYDNLFILFVAPAAVIL	686
ラトロフィリン-1	FESEYSRTKYTYLGGYCTPALVGTAAADYASVGTAKACWLVNDVFIWSEFGPVSVFI	1009
HC110-R	GCSSSVLTETVPSGATVLRWLGKNGPPHWRW	986
ラトロフィリン-1	PLSSPPGRDSLVSAGANLADSPSPSSPDEGWEALRPPPPAPGPEIYTSRPPALWA	1425
HC110-R	RNPLQGYQVRRPSHDGYLAAPSLGPGDGGQGMVLVSL 1466	

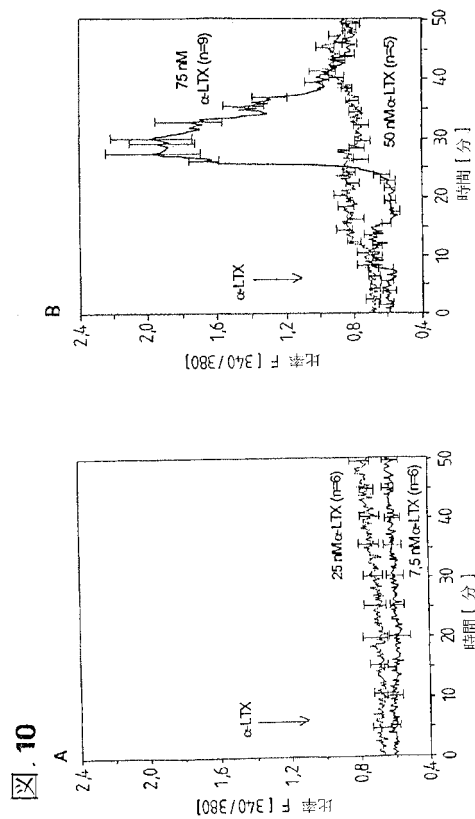
【図 6】



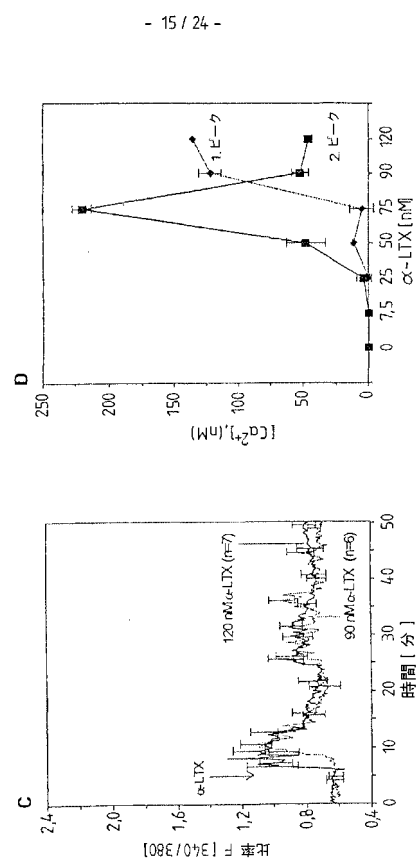
【図 7】



【図 10-1】

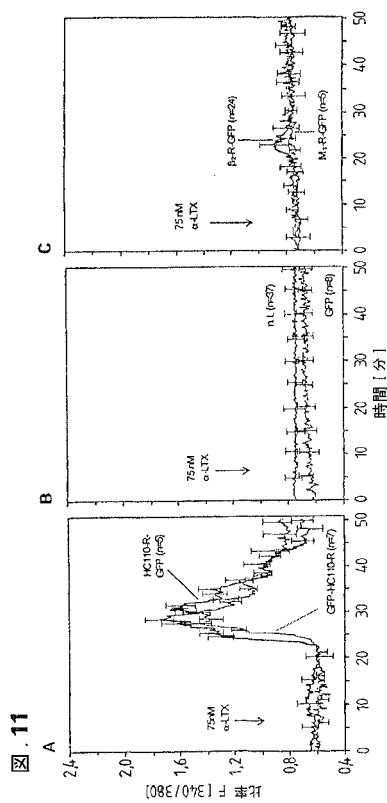


【図 10-2】



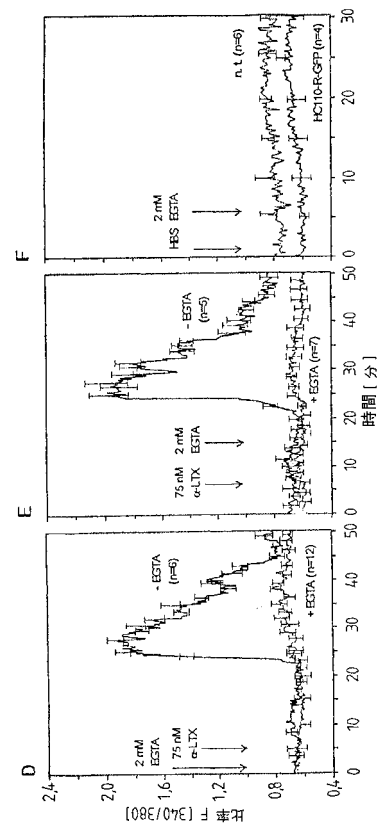
【図 1 1 - 1】

- 16 / 24 -



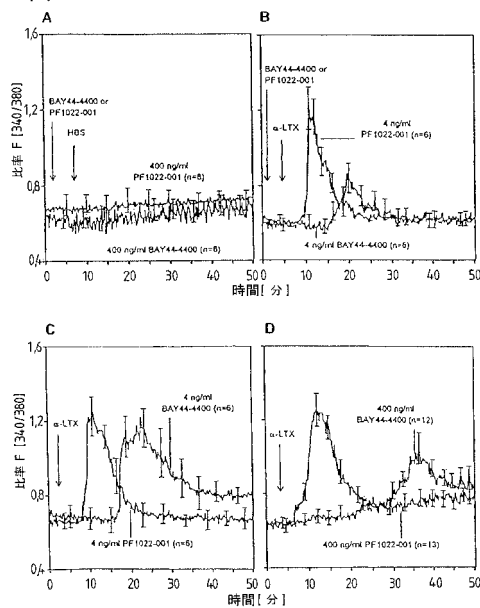
【図 1 1 - 2】

- 17 / 24 -



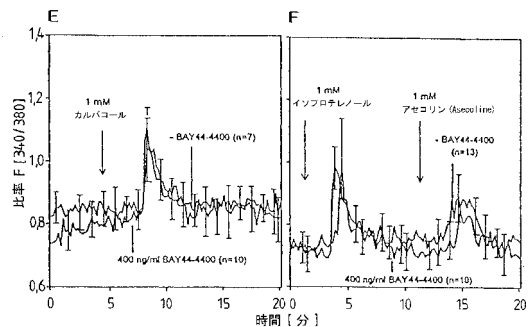
【図 1 2 - 1】

図 12



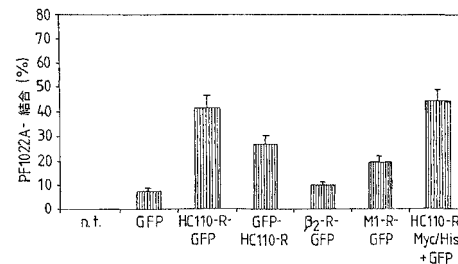
【図 1 2 - 2】

- 19 / 24 -



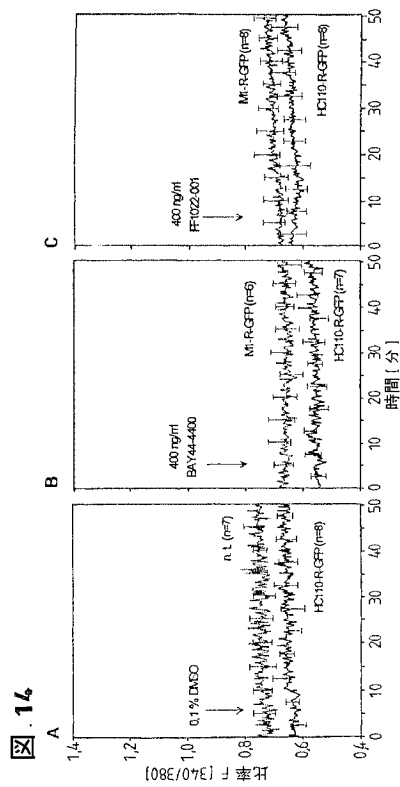
【図 1 3】

図 13



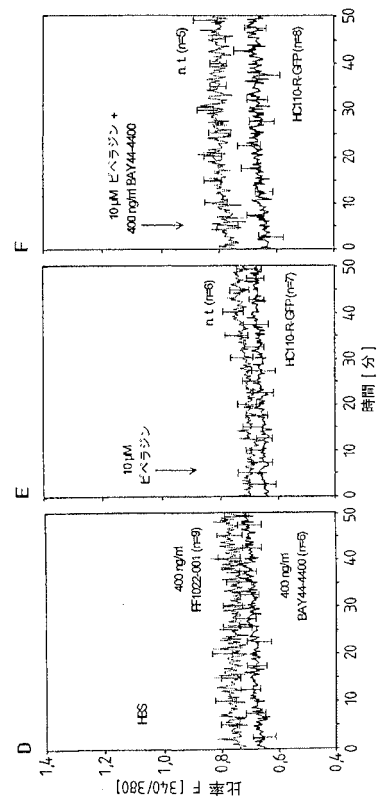
【図 14 - 1】

- 20 / 24 -



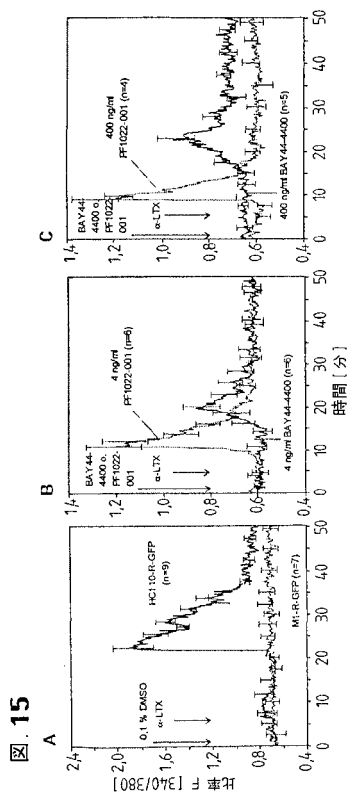
【図 14 - 2】

- 21 / 24 -



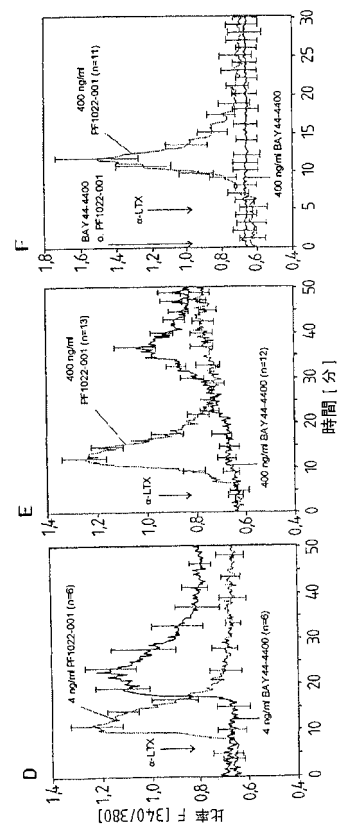
【図 15 - 1】

- 22 / 24 -



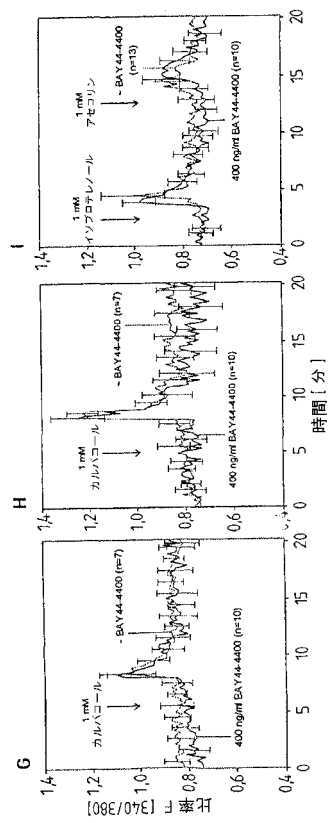
【図 15 - 2】

- 23 / 24 -



【図 15 - 3】

- 24 / 24 -



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/20830 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/25, I02, I68, C12N 15/00, C07K 14/435 (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09771 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 24. August 2001 (24.08.2001) (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 44 098.3 7. September 2000 (07.09.2000) DE 100 53 785.5 30. Oktober 2000 (30.10.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg [DE/DE]; Nemenkammer Str. 21, 42657 Solingen (DE). HARDER, Achim [DE/DE]; Europa Ring 54, 51109 Köln (DE). WUNDERLICH, Frank [DE/DE]; Burgstr. 31, 41469 Neuss (DE). SCHMITT-WREDE, Hans-Peter [DE/DE]; An der Wolfskaul 18, 41812 Erkelenz (DE). SAEGER, Beate [DE/DE]; Werstener Feld 48, 40591 Düsseldorf (DE).
- Veröffentlicht: — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TEST SYSTEMS AND THE USE THEREOF FOR IDENTIFYING AND CHARACTERIZING COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: TESTSYSTEME UND DEREN VERWENDUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON VERBINDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to test systems that are based on transmembrane receptors from helminths and arthropods and to their use for identifying and characterizing substances that are effective against helminths, arthropods or that have an effect on the calcium metabolism of organisms and/or cells. The invention further relates to the use of a specific ligand in said test system and to the use thereof as an anthelmintic or arthropodan active substance.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft auf Transmembranrezeptoren aus Helminthen und Arthropoden basierende Testsysteme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Stoffen mit Wirkungen gegen Helminthen, Arthropoden oder mit Wirkung auf den Calciumhaushalt von Organismen und/oder Zellen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines spezifischen Liganden in diesem Testsystem und dessen Verwendung als anthelmintischer oder arthropodizider Wirkstoff.

WO 02/20830 A2

Testsysteme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft auf Transmembranrezeptoren aus Helminthen und Arthropoden basierende Testsysteme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Stoffen mit Wirkungen gegen Helminthen, Arthropoden oder mit Wirkung auf den Calciumhaushalt von Organismen und/oder Zellen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines spezifischen Liganden in diesem
- 10 Testsystem und dessen Verwendung als anthelmintischer oder arthropodizider Wirkstoff.

- Parasitische Helminthen und Arthropoden stellen für Menschen und Tiere ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Allein im Bereich der Landwirtschaft betragen die
- 15 jährlich zur Bekämpfung oder Vermeidung von derartigen Parasiten hervorgerufenen Schädigungen weltweit mehr als 7 Mrd. DM (Stand 1997). Zur Behandlung von durch die vorwiegend von Helminthen verursachten Endoparasitosen, sowie die in erster Linie durch Arthropoden hervorgerufenen Ektoparasitosen stehen eine große Zahl von Wirksubstanzen aus einer Reihe von Wirkstoffklassen zur Verfügung.
- 20 Während der letzten zwei Jahrzehnte haben insbesondere derartige Wirkstoffe, die gleichzeitig eine sehr gute Wirkung gegen mehrere Parasitenspezies innerhalb eines Stammes (z.B. Helminthen), oder sogar über verschiedene zoologische Stämme hinweg (z.B. Helminthen und Insekten) aufweisen, an Bedeutung gewonnen. Zu ersteren zählen unter anderem die Breitspektrumanthelmintika wie z.B. die Benzimidazole
- 25 oder die Imidazothiazole, während die makrozyklischen Laktone zu den letzteren zählen.

- Mit den makrozyklischen Laktonen wurde zuletzt vor ca. zwei Jahrzehnten eine neue, breit wirksame Wirkstoffgruppe in den Markt eingeführt. Inzwischen haben jedoch eine Vielzahl von Endo-, als auch Ektoparasitenspezies Resistenzen gegen Vertreter einzelner, teilweise auch mehrerer Wirkstoffklassen gleichzeitig entwickelt.
- 30

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 2 -

Daher besteht ein ständiger und zunehmend dringender Bedarf, neue antiparasitisch wirksame Substanzen zu entwickeln.

5 Zu den wenigen neuen aussichtsreichen Wirkstoffgruppen, an denen gegenwärtig gearbeitet wird, gehören die cyclischen Depsipeptide, welche Gegenstand umfangreicher Patent- (WO 93/19053, EP-OS 626 376, WO 94/19334, WO 95/07272, EP-OS 626 375, EP-OS 657 171, EP-OS 657 172, EP-OS 657 173) und Forschungsaktivitäten sind (Conder et al. 1995; Martin et al. 1996; Sasaki et al. 1992; Terada M 1992; Samson-Himmelstjerna et al. 2000).

10

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus eines Vertreters dieser Wirkstoffgruppe, dem PF 1022A (cyclo(-D-Lac-L-MeLeu-D-PhLac-L-MeLeu-)₂) sind bereits mehrere Studien beschrieben worden (vgl. dazu Angaben in DE-A-197 04 024). Dazu gehörte auch die Identifizierung und Charakterisierung eines spezifischen Bindungsproteins für zyklische Depsipeptide und der für das Protein kodierenden DNA-Sequenz aus 15 dem Schafparasiten *Haemonchus contortus* (DE-A-197 04 024). Im Rahmen der hier vorliegenden Erfindung wird die funktionale Interaktion des o.a. Proteins, genannt HC110-R, unter anderem mit dem Liganden BAY 44-4400 (cyclo(-D-Lac-L-MeLeu-D-p-Morpholinyl-PhLac-L-MeLeu-), als einem weiteren Vertreter der zyklischen Depsipeptide beschrieben. Dazu wurden rekombinante eukaryotische Zelllinien konstruiert, in denen das HC110-R, basierend auf der in der früheren Anmeldung DE-A- 20 197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2, exprimiert wird.

Der vorliegenden Erfindung liegt demnach insbesondere die Aufgabe zugrunde, auf 25 Basis von Transmembranrezeptoren von Helminthen und Arthropoden, bevorzugt aus Nematoden und Akarina, besonders bevorzugt aus Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt aus *Haemonchus* spp. und insbesondere auf Basis des Rezeptors HC110-R aus *H. contortus*, Testsysteme mit einem hohen Durchsatz an Testverbindungen (High Throughput Screening Assays; HTS-Assays) bereitzustellen.

30

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 3 -

Als homologe Proteine werden solche Proteine betrachtet, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 des Dokuments DE-A-197 04 024, dessen Inhalt ausdrücklich Teil der
5 vorliegenden Anmeldung sein soll, über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlängen aufweisen.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit
10 Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standard-einstellungen (Devereux *et al.* 1984).

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von Polypeptiden, welche zumindest eine biologische Aktivität eines GPCR-Rezeptors ausüben sowie durch die Bereit-
15 stellung eines Verfahrens zur Gewinnung dieser Polypeptide und durch die Bereitstellung von Verfahren zum Identifizieren von nematizid und arthropodizid wirksamen Verbindungen.

Auf rekombinanten Mikroorganismen basierende Testsysteme wurden bereits vielfältig zur Identifizierung von pharmazeutisch wirksamen Substanzen verwendet, unter
20 anderem auch unter Verwendung von Mikroorganismen, die rekombinant parasitische Gene exprimieren (Klein und Geary 1997). Bisher sind jedoch keine Systeme bekannt, in denen parasitische Transmembranrezeptoren als rekombinante, funktionale Proteine in eukaryotischen Zellen als Targets verwendet werden. Durch die in
25 dieser Erfindung beschriebenen Prüfsysteme lassen sich im High-Throughput-Screening (HTS), bzw. im Ultra-HTS neue Agonisten und Antagonisten dieser neuen Rezeptorklasse identifizieren.

Die rekombinante Expression von Rezeptoren aus Nematoden hat sich regelmäßig als
30 schwierig erwiesen. So ist es bisher im allgemeinen nicht gelungen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aus Nematoden so zu exprimieren, dass ihre funktionalen

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 4 -

Eigenschaften (z.B. Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren) denen natürlicher Rezeptoren entspricht.

5 Es ist von großer praktischer Bedeutung, beispielsweise für die Suche nach neuen Anthelmintika oder Arthropodiziden, Rezeptoren aus Helminthen, insbesondere Nematoden sowie aus Arthropoden in eukaryotischen Systemen funktionell auszu- prägen.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt somit auch die Aufgabe zu Grunde, eine Möglichkeit zur Expression von Transmembranrezeptoren, vor allem von GPC-Rezeptoren aus Nematoden und Arthropoden bereit zu stellen und darauf basierend ein Testsystem zu entwickeln, das die Identifizierung von neuen nematizid und arthropodizid wirksamen Substanzen ermöglicht.

15 Die vorliegende Erfindung betrifft somit insbesondere die Expression und Verwendung eines orphanen G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus Helminthen und Arthropoden, bevorzugt aus Nematoden und Akarina, besonders bevorzugt aus Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt aus Haemonchus und am meisten bevorzugt aus dem parasitären Nematoden *H. contortus* als Zielprotein für die
20 effektive Suche nach nematiziden Wirkstoffen.

Dieser Rezeptor wurde in einer cDNA-Bibliothek identifiziert, die aus dem gastro- intestinalen Nematoden *H. contortus* gewonnen wurde. Die cDNA kodiert für ein
25 heptahelikales Transmembranprotein einer Größe von 110 kDa, das als HC110-R bezeichnet wurde. Das Protein gehört zur Sekretin-Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu Latrophilin (Abb.5).

Der HC110-R Rezeptor als Target

30 Der GPCR Latrophilin wurde ursprünglich aus dem Gehirn von Säugern isoliert. Latrophilin hat eine molekulare Masse von 210 kDa und wird posttranslational an

Rest 18 stromaufwärts des ersten Transmembransegments gespalten, besteht also aus zwei nichtkovalent verknüpften Untereinheiten. Die Untereinheit p120 enthält den N-terminalen, hydrophilen extrazellulären Anteil, die p85-Untereinheit enthält die sieben Transmembran-Domänen und die intrazelluläre C-terminale Region des Latrophilins, die für GPCRs ungewöhnlich groß ist. Vor kurzem wurden zwei enge Homologe identifiziert, Latrophilin-2 und Latrophilin-3 (siehe auch Abb. 6). Letzteres wird bevorzugt, wie auch das Latrophilin-1, im Gehirn exprimiert, während Latrophilin-2 ubiquitär mit einer Präferenz für Plazenta, Niere, Milz, Ovarien, Herz und Lunge von Säugern exprimiert wird (Ichtchenko *et al.* 1999; Sugita *et al.* 1998).

Obwohl HC110-R nur etwa halb so groß ist wie das 210 kDa große Latrophilin, erstreckt sich die Ähnlichkeit der Sequenz auch auf eine funktionelle Ähnlichkeit. Für beide Rezeptoren ist der endogene Ligand noch unbekannt, aber sowohl Latrophilin als auch HC110-R werden durch den künstlichen Liganden α -LTX (alpha-Latrotoxin) beeinflusst.

Werden z. B. HEK-293-Zellen transient mit Latrophilin transfiziert, verursacht die Zugabe von α -LTX den Einstrom von externem Ca^{2+} , wie anhand eines Versuchsansatzes mit radioaktivem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ gezeigt werden kann. α -LTX verursacht einen solchen Ca^{2+} -Einstrom auch bei HEK-293-Zellen, die transient mit HC110-R transfiziert wurden, was zum Beispiel durch Ca^{2+} -Imaging beobachtet werden kann (siehe auch Abb. 10 und 11).

Dieser Ca^{2+} -Einstrom ist allerdings sehr komplex. Liegt das HC110-R als Konstrukt mit C-terminalem Green-Fluorescent-Protein (GFP) Anhang vor, ist er biphasisch, d.h. es zeigt sich eine Änderung nach ca. 3 und eine weitere nach ca. 22 Minuten. Wird dem HC110-R jedoch nur ein Myc-His-Tag N-terminal vorangestellt, so wird Haupteinstrom bereits ca. 2-3 Minuten nach Zugabe von α -LTX beobachtet. Der Grund hierfür ist bislang unbekannt, die Reaktion auf die α -LTX Zugabe ist jedoch, wie die späteren Ausführungen zeigen, spezifisch:

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 6 -

1. Der Ca^{2+} -Einstrom kann nicht beobachtet werden in nicht transfizierten Zellen sowie in Zellen, die transient mit einem β_2 -adrenergen Rezeptor aus der Maus transfiziert wurden.
- 5 2. Die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind α -LTX dosisabhängig (Abb. 10).
3. Die biphasische Änderung benötigt den Einstrom von Ca^{2+} , der durch Ca^{2+} -Kanäle erfolgt, die von Cd^{2+} blockiert werden können, vor allem solche des L-Typs, wie anhand deren Empfindlichkeit gegenüber Nifedipin zu erkennen
10 ist.

Der genaue Mechanismus der Interaktion von α -LTX mit HC110-R und die Weiterleitung von Signalen muss noch geklärt werden. Am Beispiel des Latrophilin-1 konnte gezeigt werden, dass nur eine einzige Transmembran-Domäne für den durch
15 α -LTX bedingten Ca^{2+} -Einstrom in HEK-293-Zellen nötig ist (Kraspernov *et al.* 1999).

Die Tatsache, daß Nifedipin die Wirkung des α -LTX in dem hier beschriebenen System blockiert, zeigt, dass sich das Systems auch für die Identifizierung neuer
20 spezifischer Calcium-Kanal-Blocker eignet. Nifedipin gehört zu einer Klasse von Calcium-Kanal Agonisten und Antagonisten, die entsprechend ihrer Bindung an einen spezifischen Ort eines Calcium-Kanals eingeteilt werden, z. B. anhand ihrer Bindung an Kanäle des L-Typs. Bei den wichtigsten drei Klassen von Calcium-Kanal-Blockern (L-Typ) handelt es sich um Benzoacetonitrile (z. B. Verapamil, WO
25 91/02497), Benzothiazepinone (z. B. Diltiazem) und 1,4-Dihydropyridin-Derivate wie Nifedipin, Nivaldipin, Nimodipin, Nicardipin, Isradipin, Amlodipin, Nitrendipine, Felodipin oder Nisoldipin (Bacon *et al.* 1989; WO 90/09792). Eine weitere Klasse von Blockern von Calcium-Kanälen des L-Typs sind 1,3-Diphosphonate, z.
B. Belfosodil.

30

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 7 -

- Gegenstand dieser Erfindung ist daher auch die Verwendung von α -LTX bindenden Transmembranrezeptoren zur Identifizierung von neuen Calcium-Kanal-Blockern. Besonders bevorzugt werden dabei heptahelikale Transmembranrezeptoren verwendet, besonders bevorzugt handelt es sich um G-Protein bindende Rezeptoren.
- 5 Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung von Transmembranrezeptoren der Sekretin-Familie. Am meisten bevorzugt ist die Verwendung des HC110-R Rezeptors gemäß SEQ ID. NO: 2 sowie dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und besonders bevorzugt zu 95 % homologer Rezeptorproteine.
- 10 Die vorliegenden Daten zeigen auch, dass HC110-R ein Target für das neue anthelmintische Depsipeptid BAY44-4400 ist. BAY44-4400 stört die Signalübertragung durch α -LTX in HEK-293-Zellen, die mit HC110-R transfiziert wurden (Abb. 12). Diese Störung kann auf der ionophoren Aktivität des BAY 44-4400 beruhen, wie es für andere Depsipeptide typisch ist, z. B. dem Beauvericin, Enniatin
- 15 etc. (Geßner et al. 1996). BAY44-4400 verursacht jedoch keine Änderungen in nicht transfizierten Zellen. Ausserdem stört BAY44-4400 nicht die durch Isoproterenol induzierte Signalübertragung durch mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor der Maus transfizierten HEK-293-Zellen. Darüber hinaus wirkt BAY44-4400 als Antagonist von α -LTX, während BAY44-4400 alleine die Ca^{2+} -Konzentration in HC110-R
- 20 transfizierten HEK-293-Zellen nicht beeinflusst.

Das HC110-R-Protein

- Das in DE 197 04 024 A1 beschriebene Membranprotein wurde als ein mögliches
- 25 Zielprotein für den anthelmintischen Wirkstoff PF1022A identifiziert. Zur Identifizierung möglicher Zielproteine wurde eine λ ZAPII cDNA-Expressions-Bibliothek des parasitären Nematoden *Haemonchus contortus* hergestellt und die cDNA-Bibliothek mit Hilfe eines Konjugats aus PF1022A und KLH (keyhole limpet hemocyanin), PF1022A-KLH, und polyklonalen Antikörpern gegen dieses Konjugat
- 30 durchsucht (siehe Bsp. 1). Die Überprüfung von etwa $1,5 \times 10^6$ nicht amplifizierten, rekombinanten Klonen ergab einen 3036 bp langen cDNA-Klon, der an eine 3,6 kb

große mRNA aus *H. contortus* hybridisierte (siehe auch Bsp. 2). Um die 3'- und 5'-Enden zu vervollständigen, wurde die RACE-PCR-Technik verwendet (Bsp. 4). Schließlich wurde eine 3539 bp lange cDNA erhalten, die als HC110-R bezeichnet wurde. Diese cDNA kodiert für 986 Aminosäuren (110 kDa), wobei der offene Leserahmen mit dem ATG¹⁰⁰ beginnt (Abb. 2). Das Startkodon ist zur optimalen Initiation der Translation von einer Kozak-Sequenz umgeben. Das abgeleitete Molekulargewicht des Proteins wurde durch die *in vitro* Translation der *in vitro* transkribierten HC110-R RNA bestätigt.

Die Aminosäuresequenz des HC110-R Proteins weist einige besondere Merkmale auf. Der extrazelluläre N-terminale Teil des Proteins besteht aus insgesamt 535 Resten. Der N-Terminus enthält ein Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren und einer Spaltstelle an Position 18. Darauf folgt eine Lektin-ähnliche Sequenz (AS 22-125) und ein sogenannter "Thr-Stretch" (AS 128-147), der nur durch ein Serin in Position 144 unterbrochen wird. Stromabwärts des "Thr-Stretch" folgt ein cysteinereiches Motiv der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (AS 166-221). Darüberhinaus enthält das Protein HC110-R sieben hydrophobe, α -helikale Transmembran-Domänen zwischen den Resten 536 und 772. Direkt stromaufwärts der Transmembran-Region existiert eine weitere 4-Cys-Region der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (AS 478-524). In der Transmembranregion gibt es drei extrazelluläre Loops enthaltend die Reste 587-597, 654-673 und 743-749 und drei intrazelluläre Loops (Position 559-569, 627-636, 696-724). Der C-Terminus ist 214 Reste lang (24 kDa) und enthält einen prolinreichen Teil (AS 845-861) und eine PEST-Region (AS 915-933). Schließlich existieren noch drei putative N-Glykosylierungsstellen an den Resten 26, 499 und 862 sowie 14 putative Phosphorylierungsstellen in der abgeleiteten intrazellulären Domänen (siehe auch Abb. 6).

Die Analyse von Datenbanken ergab eine 48%ige Identität und 76%ige Ähnlichkeit des HC110-R-Proteins mit einem unbekannten Transmembranprotein (1014 AS), welches aus dem genomischen Klon B0457 (GenBankTM Accession Number

Z54306) des Nematoden *Caenorhabditis elegans* abgeleitet wurde (siehe auch Abb. 3).

5 Der Begriff "Identität" wie er hier verwendet wird, beschreibt die Zahl von Sequenzpositionen, die in einem so genannten "Alignment" identisch sind. Sie wird in Prozent der "Alignment"-Länge angegeben.

10 Der Begriff "Ähnlichkeit", wie er hierin verwendet wird, beschreibt die Ähnlichkeit von Sequenzen auf Basis einer Ähnlichkeitsmetrik, also eines Maßes dafür, als wie ähnlich man beispielsweise ein Valin zu einem Threonin oder zu einem Leucin annehmen will.

15 Der Begriff "Homologie", wie er hierin verwendet wird, bedeutet evolutionäre Verwandtschaft, wenn sich also zwei homologe Proteine sich aus einer gemeinsamen Verläufersequenz entwickelt haben. Der Begriff hat nicht unbedingt etwas mit Identität oder Ähnlichkeit zu tun, abgesehen davon, dass homologe Sequenzen meist ähnlicher sind, oder in einem "Alignment" mehr identische Positionen besitzen als nicht-homologe Sequenzen.

20 Der Vergleich beider Sequenzen zeigt gemeinsame Merkmale beider Proteine, so zum Beispiel die Lektin-ähnliche Sequenz, den "Thr-Stretch", die Cys-Motive und die PEST-Sequenz. Die höchste Identität ist im Bereich der Transmembranregion zu finden (62%), wogegen eine geringer ausgeprägte Identität in der N-terminalen (44%) und C-terminalen (50%) Region zu finden ist.

25 Darüberhinaus weist das Protein HC110-R eine 20-30%ige Identität mit heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren (GPCR) auf, besonders mit der Sekretin-Subfamilie. Vergleiche von sieben Transmembran-Domänen zeigen hohe Identität und Ähnlichkeit hinsichtlich Struktur und Sequenz
30 zwischen verschiedenen GPCR der Sekretin-Subfamilie und HC110-R (Abb. 4).

Latrophilin, ein Mitglied der Sekretin-Subfamilie, aus Säugern wie dem Menschen (Gen Bank TM Accession Nr.: E1360690), dem Rind (z. B. G416021, G416053 und G4185804), und der Ratte (U78105 oder U72487) zeigt eine etwas höhere Identität (31 %) zu HC110-R als andere Sekretin-Rezeptoren. Vor allem die Transmembranregionen zeigen eine Identität von 45-48 %. HC110-R und der 1466 Aminosäuren große Latrophilin-1 GPCR (U78105) aus der Ratte weisen gemeinsame Merkmale auf, z. B. die Lektin-Domäne, die cysteinreiche Region und ein konserviertes 4-Cys-Motiv vor der Transmembranregion. Letzteres wurde vor kurzem als Proteolysestelle von Latrophilin und anderen großen Sekretin GPCR vorgeschlagen. Dagegen enthält der N-Terminus des HC110-R nicht die Olfactomedin-Region und die Pro/Thr-Region des Latrophilins, während Latrophilin wiederum nicht den "Thr-Stretch" des HC110-R aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist deshalb auch die Verwendung G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen aus Helminthen zum Identifizieren von anthelmintisch wirksamen Substanzen. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Transmembranrezeptoren verwendet, die der Sekretin-Subfamilie zugeordnet werden können.

Zelluläre Lokalisation

Transiente Transfektionsexperimente mit einem HC110-R-GFP-Fusionsprotein wurden in verschiedenen Säugerzelllinien durchgeführt, so zum Beispiel COS-7-Zellen oder HEK-293-Zellen (Abb. 7). Die heterologe Expression wurde gewählt, da bislang noch keine Zelllinien aus *H. contortus* etabliert wurden.

Zur Proteinlokalisierung in lebenden Zellen (siehe Abb. 8) läßt sich das grün-fluoreszierende Protein (Green Fluorescent Protein, GFP) aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* verwenden. Auf zellulärer Ebene dient GFP als ein *in vivo* Reporter, um die Frequenz einer transienten oder stabilen Transfektion aufzuzeigen und auf subzellulärer Ebene zur Lokalisation von Proteinen. Wildtyp-GFP ist ein 27

- kD-Monomer aus 238 Aminosäuren, das nach Anregung mit UV-Licht (360 – 400 nm; Max. bei 395 nm) oder blauem Licht (440 – 480 nm; Max. bei 475 nm) grünes Licht mit einem Maximum von 509 nm emittiert, ohne dazu exogene Substrate oder Kofaktoren zu benötigen (Chalfie *et al.* 1994). GFP läßt sich somit direkt durch
- 5 Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* nachweisen und sein Fluoreszenzverhalten bleibt auch als Teil eines Fusionsproteins im wesentlichen unverändert. EGFP („enhanced“ GFP) stellt eine genetische Variante des Wildtyp-GFP dar und wird zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt (Yang *et al.* 1996). Das Anregungsmaximum von EGFP wurde durch Substitution von Ser⁶⁵ durch Thr auf nur einen Peak bei 490 nm ver-
- 10 schoben. Die Vektoren pEGFP-C1 (GenBank Accession Nr.: U55763) und pEGFP-N3 (GenBank Accession Nr.: U55762) [Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.] exprimieren EGFP unter der Kontrolle des starken konstitutiven CMV-Promotors und können zur Fusion von anderen Proteinen an den N- bzw. C-Terminus von EGFP verwendet werden.
- 15 Stabile Zelllinien bieten gegenüber einer transienten Expression den Vorteil, daß jede Zelle das gewünschte Protein dauerhaft exprimiert und eine Isolation des Proteins nach der Lokalisation möglich wird. Um das Protein Fluoreszenz-mikroskopisch oder mit Hilfe eines Western Blots nachzuweisen, wird ein Antikörper gegen das
- 20 gewünschte Protein benötigt, oder es bietet sich an, einen Expressionsvektor zu wählen, der beispielsweise ein Myc- oder His-Tag C-terminal mit dem eigentlichen Protein im richtigen Leseraster fusioniert, gegen die es dann käufliche, meist sogar monoklonale Antikörper gibt.
- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Zellen, die die stabile Expression des Rezeptors HC 110-R sowie dazu homologer Proteine ermöglichen.

Wirkung von alpha-Latrotoxin auf das HC110-R Protein

5 Zur weiteren Substantiierung der Ähnlichkeit zwischen HC110-R und Latrophilin sowie zur Überprüfung der Funktionalität des rekombinant exprimierten HC110-R wurden HEK-293-Zellen transient und stabil mit HC110-R-GFP-Fusionsprotein transfiziert und mit alpha-Latrotoxin (α -LTX) stimuliert.

10 Alpha-Latrotoxin ist ein präsynaptisches Neurotoxin, das aus dem Gift der Schwarzen Witwe (*Latrodectus mactans*) gewonnen werden kann. Es ist bekannt für seine Toxizität für das zentrale Nervensystem von Vertebraten, wo es durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und die Stimulation der unkontrollierten Exozytose von Neurotransmittern die Depolarisation von Neuronen auslöst. So ist auch bekannt geworden, dass die Wirkung des α -Latrottoxins zumindest teilweise durch Latrophilin vermittelt wird. Dabei wird angenommen, dass die Toxizität des α -Latrottoxins auf dessen 15 Fähigkeit beruht, mit Rezeptoren, die mit GTP-bindenden Protein gekoppelt sind (GPCR), zu interagieren. Diese Rezeptoren vermitteln normalerweise die Wirkung endogener Hormone oder Neuropeptide (Holz und Habener 1998).

20 In der vorliegenden Erfindung wurde die sogenannte " Ca^{2+} -Imaging"-Technik verwendet, um die Reaktion transfizierter HEK-293-Zellen auf α -LTX zu testen, indem die Änderung des intrazellulär vorliegenden Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt wird (siehe Bsp. 24 und Abb. 9, 10 und 11).

25 α -LTX verursacht einen biphasischen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$. Bei einer Konzentration von 75 nM induziert α -LTX zunächst einen sehr kleinen Anstieg von nur $5 \pm 0,2$ nM 2 Minuten nach α -LTX-Zugabe und einen stärkeren, verzögerten Anstieg von etwa $220 \pm 14,9$ nM Ca^{2+} nach 22 Minuten. Mit zunehmender Konzentration von α -LTX (7,5 nM- 120 nM) wird der erste Anstieg größer, während sich der zweite Anstieg verringert. Bei einer Konzentration von 120 nM α -LTX erreicht der erste Anstieg 30 Werte von etwa $135 \pm 13,6$ nM Ca^{2+} , während der zweite Anstieg sich auf einen Wert

von $50 \pm 7,1$ nM Ca^{2+} absenkt. Der gleiche Verlauf bei Einsatz von 90 nM und 120 nM α -LTX deutet auf eine Sättigung hin.

5 Transfiziert man HEK-293-Zellen mit einem N-terminalen GFP-getaggtem HC110-R-Konstrukt und stimuliert sie mit 75 nM α -LTX kommt es zu einem geringfügig reduzierten 2. Peak. Schließlich wurde auch dann eine nur geringfügig verminderte Reaktion auf α -LTX hin festgestellt, wenn das HC110-R Protein mit einem N-terminalen GFP-Tag versehen wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, daß das Anhängen eines GFP-Tags N- oder C-terminal keinen wesentlichen Einfluß auf die

10 α -LTX-Bindung und die nachstehende Signaltransduktion durch HC110-R hat.

Zellen, die nicht oder nur mit GFP transient transfiziert worden waren, zeigen keine Reaktion auf α -LTX. Werden HEK-293-Zellen transient mit anderen C-terminal GFP-getaggten G-Protein gekoppelten Rezeptoren transfiziert, z. B. dem β_2 -adrenergen Rezeptor der Maus, oder dem humanen muscarinergen H1 Acetylcholin-Rezeptor, verursacht α -LTX in einer Konzentration von 75 nM nur einen geringen

15 (von etwa $40 \pm 10,4$ nM nach etwa 20 Minuten) bis keinen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Der durch α -LTX bedingte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann sowohl den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} als auch den Ausstrom von intrazellulärem Ca^{2+} nach sich ziehen. Wird extrazelluläres Ca^{2+} vor oder nach der Zugabe von α -LTX mit 2 mM EGTA entfernt, zeigt sich nur ein kleiner Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von HEK-293-Zellen, die das HC110-R-GFP-Fusionsprotein exprimieren. Daraus wird ersichtlich, dass α -LTX in erster Linie den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} verursacht. Dieser Ca^{2+} -

20 Einstrom basiert nicht auf einfacher Diffusion, sondern geht mit Hilfe von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran vonstatten.

Bei einem Großteil der Ca^{2+} -Kanäle, die am Ca^{2+} -Einstrom beteiligt sind, handelt es sich um solche des L-Typs, da 15 μM Nifedipin bereits ausreichen, den durch α -LTX induzierten Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant zu unterdrücken. Dabei wird der erste An-

30

stieg vollständig inhibiert, der zweite Anstieg sinkt von $267 \pm 12,7$ nM auf $30 \pm 5,4$ nM ab.

5 Auch die den C-terminal Myc/His-getaggten HC110-R Rezeptor exprimierende stabile bzw. transiente HEK-293-Zelllinie reagiert dosisabhängig auf α -LTX (Abb. 10). 7,5 nM α -LTX sind auch hier noch zu gering, um einen α -LTX-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu erzeugen. Aber bereits 25 nM α -LTX sind ausreichend, um eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $130 \pm 38,0$ nM bereits nach 2 min zu erzeugen. Bei Zugabe von 75 nM α -LTX kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom von $296 \pm 91,5$ nM, der
10 ebenfalls 2 min nach α -LTX-Gabe stark zunimmt und erst nach 27 min wieder seinen ursprünglichen Ca^{2+} -Gehalt erreicht. Dieses Ca^{2+} -Signal gleicht dem zweiten verzögerten Ca^{2+} -Peak HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen bei gleicher α -LTX Konzentration (75 nM) in der Höhe des Signals und in seinem Verlauf, die Antwort erfolgt nur - wie auch bei höheren Konzentrationen (90 nM und 120 nM)
15 HC110-R-GFP transfizierter Zellen - unmittelbar nach α -LTX-Zugabe.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ebenfalls die Verwendung von α -LTX als Agonist von Transmembranrezeptoren der Sekretin-Familie aus Nematoden. Bevorzugt wird α -LTX als Agonist des HC110-R Rezeptors gemäß SEQ ID NO: 2 verwendet sowie von dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und ganz besonders bevorzugt zu 95 % homologer Rezeptorproteine.
20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von α -LTX als Nematizid.
25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von α -LTX in einem Verfahren zum Identifizieren von nematizid oder arthropodizid wirksamen Verbindungen, wobei die Verbindungen als Agonisten oder Antagonisten der Transmembranrezeptoren wirksam sein können.
30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von α -LTX in einem Verfahren zum Identifizieren von Verbindungen, die Calcium-Kanäle blockieren.

5 **Einfluss von BAY 44-4400 auf die Wirkung von α -LTX**

PF1022A übt seine Wirkung auf Nematoden in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies bei Konzentrationen im Bereich von 100-800 ng/ml aus (Terada, 1992). Um jeweils eine mögliche Wechselwirkung zwischen PF1022A mit HC110-R und der
10 durch HC110-R vermittelten Signalübertragung zu untersuchen, wurde in den folgenden Ca^{2+} -Imaging Experimenten in mit FURA-2 beladenen und mit HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen das BAY44-4400 verwendet, das ein leichter lösliches Derivat von PF1022A ist.

15 Bei einer Konzentration von 400 ng/ml rufen weder das sehr effektive Nematizid BAY44-4400 noch die nahezu ineffektive Antipode PF1022-001 eine Ca^{2+} -Antwort in HC110-R-GFP transfizierten HEK 293-Zellen hervor, selbst wenn die Zellen für 90 Minuten mit dem Wirkstoff vorinkubiert worden waren. Im Gegensatz dazu beeinflussen beide Substanzen die durch α -LTX bedingte Signalübertragung, wenn
20 auch in verschiedenem Ausmaß (Abb. 12 und 14). Bei Anwesenheit von 4 ng/ml BAY44-4400 ruft α -LTX einen nur geringen Ca^{2+} -Anstieg mit einem Maximum von $44 \pm 6,0$ nM Ca^{2+} nach 14 Minuten hervor (Abb. 12). Bei Anwesenheit von PF1022-001 verursacht α -LTX jedoch einen größeren Anstieg von $103 \pm 11,5$ nM Ca^{2+} nach 6 Minuten (Abb. 10B). In einem anderen Ansatz wurden die Zellen entweder mit 4
25 ng/ml oder 400 ng/ml BAY44-4400 und PF1022A für 90 Minuten vorinkubiert, die Wirkstoffe dann entfernt bevor die Zellen mit α -LTX stimuliert wurden. HEK-293-Zellen, die mit PF1022A vorinkubiert worden waren, zeigten keine signifikante Änderung in ihrer Reaktion auf α -LTX. Nur BAY44-4400 beeinflusste die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber α -LTX. Bei einer Konzentration von BAY44-
30 4400 von 4 ng/ml induzierte α -LTX einen Ca^{2+} -Anstieg ($95 \pm 20,5$ nM Ca^{2+}), 19 Minuten bevor ein stabiles Ca^{2+} -Niveau erreicht wurde. Bei 400 ng/ml BAY44-4400

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 16 -

verursachte α -LTX nur einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf etwa $65 \pm 7,5$ nM Ca^{2+} . Zusätzlich war dieser kleinere Anstieg um 12 Minuten verschoben.

5 Um die Spezifität dieser Ergebnisse zu untermauern, wurde weiterhin der Effekt von 1mM Carbachol auf das endogene, natürliche M1-R in nicht transfizierten HEK-293-Zellen gemessen. Die Anwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 veränderte die Antwort der Zellen nicht. Auch die durch Isoproterenol und Arecolin induzierte Stimulation des endogenen, natürlichen β_2 -R oder des nikotinischen cholinergen Rezeptors in HEK-293-Zellen wurde durch BAY44-4400 in keiner Weise beeinflusst.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde schließlich durch Ca^{2+} -Imaging der Einfluss von BAY 44-4400, einer besser löslichen Variante von PF1022A, auf das HC110-R-Protein in HEK-293-Zellen untersucht, die transient oder stabil ein C-terminal mit GFP versehenes HC110-R-Protein exprimieren. Bei einer Inkubation von HEK-293-Zellen mit nur 400 ng/ml BAY 44-4400 reagieren die Zellen für 50 Minuten in keiner vergleichbaren Weise mit einer Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Allerdings kann ein Einfluss des BAY 44-4400 bei Anwesenheit des α -LTX festgestellt werden. Inkubiert man Zellen 6 Minuten vor der Zugabe von 75 nM α -LTX mit BAY 44-4400, verringert sich der Einfluss des α -LTX auf die Ca^{2+} -Konzentration. Der erste kleine Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verschwindet und der zweite wird 20 15 Minuten nach der Zugabe von α -LTX um 85 % reduziert. Die Reaktion auf α -LTX verstärkt sich noch mehr, wenn die Zellen für 60 Minuten mit BAY 44-4400 vorinkubiert werden, bevor die Zellen für 30 Minuten mit FURA versetzt werden. Es ergibt sich ein völliges Verschwinden des ersten Ca^{2+} -Anstiegs sowie ein nur sehr geringer zweiter Anstieg von 70 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 30 Minuten nach Zugabe von 75 nM α -LTX.

30 Um den spezifischen Einfluss von BAY 44-4400 auf die Wirkung von α -LTX zu zeigen, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zunächst wurden HEK-293-Zellen transient oder stabil mit einem C-terminal mit einem GFP-Tag versehenen β_2 -

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 17 -

adrenergen Rezeptor aus der Maus transfiziert und Isoproterenol als Ligand verwendet.

5 Tatsächlich verursacht Isoproterenol auch eine signifikante Ca^{2+} -Antwort: direkt nach der Zugabe von Isoproterenol ergibt sich nur ein Ca^{2+} -Anstieg. Dieser Anstieg wird jedoch nicht durch BAY 44-4400 beeinflusst.

10 Weiterhin wird die Spezifität der Wechselwirkung zwischen BAY 44-4400 mit HC110-R mit Hilfe des optischen Antipoden gezeigt, die die Stelle des BAY 44-4400 als Ligand einnehmen. Nach Vorinkubation der Zellen mit 400 ng/ml eines anthelmintisch 100-fach schwächer wirksamen Derivates von PF1022A des PF1022-001: cyclo(-L-Lac-D-MeLeu-L-PhLac-D-Me-Leu-)₂ (auch als optischer Antipode bezeichnet) für 90 Minuten ergibt sich nur ein Ca^{2+} -Anstieg von 110 nM 6 Minuten nach Zugabe von 75 nM α -LTX, also eine Verringerung um 59 %. Wenn 4 ng/ml des
15 optischen Antipode 6 Minuten vor der Zugabe von 75 nM α -LTX zugegeben werden, ergibt sich ein Anstieg von 67 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt nach der Zugabe des α -LTX. Mit zunehmender Konzentration des optischen Antipode verringert sich der Anstieg auf 20 nM Ca^{2+} .

20 Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die
25 Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-
30 Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen,

Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

5

Die Polypeptide können erfindungsgemäß in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine verwendet werden. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätz-

10

liche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

Als homologe Proteine oder Polypeptide werden solche Proteine oder Polypeptide betrachtet, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 des Dokuments DE-A-197 04 024, dessen Inhalt ausdrücklich Teil der vorliegenden Anmeldung sein soll, über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fort-

15

laufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlängen aufweisen.

20

Die Polypeptide müssen für ihre erfindungsgemäße Verwendung nicht vollständige Rezeptoren darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch die biologische Aktivität der vollständigen Rezeptoren aufweisen. Dabei müssen die Polypeptide nicht von Transmembranrezeptoren aus *H. contortus* ableitbar sein. Als erfindungsgemäß werden auch Polypeptide betrachtet, die Trans-

25

membranrezeptoren von anderen Helminthen- oder auch Arthropodenspezies entsprechen oder Fragmenten davon, die noch die biologische Aktivität dieser Rezeptoren ausüben können.

30

Die Polypeptide können für ihre erfindungsgemäße Verwendung im Vergleich zu der entsprechenden Region natürlich vorkommender GPCR-Rezeptoren Deletionen oder

Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Rezeptoren ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

- 5
1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
 2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
 3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
 - 10 4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
 5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Die vorstehend und in DE-A-197 04 024 unter SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO: 3 beschriebenen Sequenzen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Transmembranrezeptoren in Helminthen oder Arthropoden beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselbe biologische Funktion haben.

Der Ausdruck "im wesentlichen dieselbe biologische Funktion", wie er hierin verwendet wird, bedeutet eine Beteiligung am Aufbau von funktionsfähigen G-Protein gekoppelten heptahelikalen Transmembranrezeptoren, besonders solcher
5 Rezeptoren der Sekretin-Subfamilie, bzw. eine dem HC110-R Rezeptor aus *H. contortus* entsprechende Funktion. Eine solche Funktion beinhaltet auch die vorstehend beschriebenen Eigenschaften des Rezeptors, wie der Sensitivität gegenüber α -LTX als Agonisten oder Nifedipin als Antagonisten des α -LTX.

10 Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Nematoden als *H. contortus* sowie aus Arthropoden isoliert werden, welche für
15 Polypeptide mit der biologischen Aktivität von GPCR-Rezeptoren codieren.

In Hinblick auf eine geeignete Sonde werden die aminoterminalen und carboxyterminalen cDNA-Abschnitte bevorzugt. Die Hybridisierungsbedingungen werden so gewählt, dass auch weniger ähnliche Sequenzen aus anderen Organismen detektierbar sind. Die Hybridisierungsbedingungen unter erniedrigter Stringenz können beispielsweise wie folgt aussehen: in 6xSSC/0% Formamid als Hybridisierungslösung
20 wird zwischen 40-55°C hybridisiert. Die Bedingungen des spezifischen 2. Waschschritts müssen ausgetestet werden, z.B. initial 2xSSC bei 50°C, dann Abschätzung der Signalintensitäten. Daraufhin folgt die Modifikation der Waschbedingungen.

25 Beispielhaft werden nachfolgend geeignete Hybridisierungsbedingungen angegeben:

Hybridisierungslösung: 6xSSC / 0 % Formamid, bevorzugte Hybridisierungslösung:
6xSSC / 25 % Formamid

30 Hybridisierungstemperatur: 34°C, bevorzugte Hybridisierungstemperatur: 42°C

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 22 -

1. Waschschrift: 2xSSC bei 40°C
2. Waschschrift: 2xSSC bei 45°C; bevorzugter 2. Waschschrift: 0,6xSSC bei
5 55°C; besonders bevorzugter 2. Waschschrift: 0,3xSSC bei 65°C.

Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

- 10 Die Schmelztemperatur $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log[c(\text{Na}^+)] + 0.41(\%G + C) - 500/n$
(Lottspeich und Zorbas 1998).

- 15 Dabei ist c die Konzentration und n die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz >100 bp entfällt der Ausdruck $500/n$. Mit höchster Stringenz wird bei einer Temperatur 5-15°C unterhalb T_m und einer Ionenstärke von 15 mM Na^+ (entspricht 0.1 x SSC) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um 10-15°C höher.

- 20 Die im erfindungsgemäßen Verfahren zum Identifizieren von nematizid und arthropodizid wirksamen Verbindungen verwendeten Polypeptide werden von den in DE-A-197 04 024 unter SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 beschriebenen Nukleinsäuren kodiert.

- 25 Weiterhin werden zur erfindungsgemäßen Verwendung solche Nukleinsäuren erfasst, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 95 %ige Identität mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 100, besonders bevorzugt wenigstens 500 fortlaufenden Nukleotiden und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlänge aufweisen.

30

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann ebenfalls zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsystemen eingesetzt werden, die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder Varianten hiervon basieren. Ferner fallen hierunter sämtliche transgenen Invertebraten, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Genkontrollsequenzen (z.B. Promotoren) eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder deren Varianten eintritt.

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise in *Drosophila melanogaster* durch P-Element-vermittelten Gentransfer oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon-vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1, Plasterk 1996).

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Rezeptoren in einer vom Wildtyp abweichenden Form.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise kann das Nukleinsäuremolekül vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Sequenz chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Nematoden-mRNA oder Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäße Nukleinsäure.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden z.B. chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

5

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann zur Isolierung und Charakterisierung der regulatorischen Regionen, die natürlicherweise benachbart zu der kodierenden Region vorkommen, verwendet werden. Solche regulatorischen Regionen sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10

In den erfindungsgemäßen Verfahren kommen ebenfalls Vektoren zum Einsatz, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

15

Bevorzugte Vektoren sind pBIN und seine Derivate für pflanzliche Zellen, pFL61 für Hefezellen, pBLUESCRIPT-Vektoren für bakterielle Zellen, lamdaZAP (Fa. Stratagene) für Phagen.

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden verschiedene Vektoren verwendet und mehrere Konstrukte erstellt. Die Vektoren, die zur transienten bzw. stabilen Transformation von Zelllinien und zur stabilen Expression des HC110-R Rezeptors verwendet wurden, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

Zur transienten Expression in eukaryotischen Zellen wurden EGFP-Konstrukte hergestellt, die zur Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen EGFP-Tag (EGFP-HC110-R) oder einem C-terminalen EGFP-Tag (HC110-R-EGFP) führen. Die von diesen Vektoren und den herkömmlichen GFP-Vektoren sowie Rotshift- und

30

Blaushift-Varianten kodierten Polypeptide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

5 Für die stabile Expression wurde ein weiteres Konstrukt, der Vektor pMyc6xHis, verwendet, der ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Der Vektor pMyc6xHis leitet sich von dem Vektor pSecTagA [Invitrogen, Leek, NL] durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und SfiI, gefolgt von „blunting“ der Enden und Religation des Vektors ab.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäß zu verwendenden Vektor enthalten. Insbesondere ist die stabil transformierte Zelllinie HEK-293 mit HC110-R-Myc/His Gegenstand dieser Erfindung, die unter der Nummer DSM ACC2464 bei der internationalen Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung
15 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b in 38 124 Braunschweig hinterlegt wurde.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Wirtszellen, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäß zu verwendenden Vektor enthalten, sowie einen Vektor, der die Zellen zur Expression von Aequorin befähigt, einem Lumineszenz-Protein, das in Gegenwart von Ca^{2+} Licht emittiert. Durch entsprechende Wirtszellen wird es möglich gemacht, die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration und damit die Wirkung von Substanzen z. B. auf HC110-R mit Hilfe des Indikators Aequorin zu verfolgen. Insbesondere ist die zur
20 Expression von Aequorin befähigte, stabil transformierte Zelllinie HEK-293 mit HC110-R-Myc/His Gegenstand der Erfindung, die unter der Nummer DSM ACC2465 bei der internationalen Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b in 38 124 Braunschweig hinterlegt wurde.

30

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

5 Als Wirtszellen eignen sich vorzugsweise eukaryotische Zellen, wie Hefen, Säuger-, Amphibien-, Insekten- oder Pflanzenzellen. Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen sind HEK-293-, Schneider S2-, Spodoptera Sf9-, Kc-, CHO-, HepG-2-, K1- COS-1-, COS-7-, HeLa-, C127-, 3T3- oder BHK-Zellen und insbesondere Xenopus-Oocyten, ganz besonders eignen sich HEK-293- oder COS-7-Zellen.

10 Gegenstand dieser Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von DNA entsprechend der in Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2 zur Detektion von DNA aus Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung Haemonchus und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus*.

15 Die Erfindung bezieht sich dabei auf Oligonukleotide die einer Region der oben beschriebenen DNA-Sequenz oder deren komplementärem Strang entsprechen und an diese hybridisieren können. Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung dieser Oligonukleotide oder Teilen davon als

- 20 a) Proben in Northern- oder Southern-Blot-Assays,
- b) PCR-Primer in einem diagnostischen Verfahren zur Detektion der oben genannten Nematoden, wobei die DNA der betreffenden Helminthen spezifisch
- 25 mit Hilfe der Primer und der PCR-Technik amplifiziert und dann identifiziert wird.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Detektion von Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung Haemonchus und am

30 meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus*, wobei Oligonukleotide wie oben

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 27 -

beschrieben zu DNA-Sequenzen spezifisch hybridisieren, die aus den genannten Organismen stammen, und die dann mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert werden.

Die Detektion von Organismen wie obengenannt kann z.B. erfolgen, indem man

5

a) eine Oligonukleotidprobe bzw. Primer zur Verfügung stellt, die an die erfindungsgemäße, für HC110-R kodierende, DNA oder dazu komplementäre Stränge hybridisieren oder an die 5'- oder 3'-flankierenden Regionen derselben,

10

b) die Oligonukleotidprobe bzw. die Primer mit einer entsprechend aufbereiteten, DNA enthaltenden Probe in Kontakt bringt,

15

c) die Hybridisierung des Oligonukleotids bzw. Primers detektiert (z.B. mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion),

d) die detektierte Sequenz des HC110-R-Gens sequenziert, und

20

e) die Sequenz mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen vergleicht, bevorzugt mit der in Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2.

25

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ebenfalls ein diagnostischer Testkit zur Detektion von von Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung *Haemonchus* und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus*, der unter anderem Oligonukleotide wie oben beschrieben zur Verfügung stellt, die in Verfahren zur Detektion von Spezies aus den genannten systematischen Gruppen verwendet werden können.

30

5 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein diagnostischer Testkit wie vorstehend beschrieben, wobei die in diesem Kit zur Verfügung gestellten Oligonukleotide mit einem detektierbaren Marker versehen sind. Solche detektierbaren Marker können u.a. Enzyme beinhalten, Enzym-Substrate, Coenzyme, Enzyminhibitoren, Fluoreszenzmarker, Chromophore, lumineszente Marker und Radioisotope.

10 Gegenstand dieser Erfindung ist auch die Verwendung der vorstehend genannten HC110-R-Polypeptide oder Fragmente davon sowie von dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und besonders bevorzugt zu 95 % homologer Rezeptorproteine aus Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung Haemonchus und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus* zur Herstellung von Vakzinen, die mindestens ein HC110-R-Polypeptid oder Fragment oder ein dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und besonders
15 bevorzugt zu 95 % homologes Rezeptorprotein davon enthalten. Das Vakzin ist dabei in der Lage eine Immunantwort hervorzurufen, die spezifisch ist für ein vorstehend beschriebene HC110-R Protein.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Vakzin eine antigene Determinante, z.B. eine einzelne Determinante eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz gemäß der in Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2 oder eines Polypeptids, das von der vorstehend genannten DNA oder Fragmenten davon kodiert wird.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide. Zur Herstellung der Polypeptide, die von den bekannten Nukleinsäuren kodiert werden, können Wirtszellen, die diese Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem
30 Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in *in vitro*-Systemen hergestellt werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt zum Beispiel, wie in den Beispielen beschrieben, mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden. Ein weiteres mögliches Verfahren basiert auf der Verwendung von Histidin-Fusionsproteinen und deren Aufreinigung über Ni^{2+} -Talsäulen.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Da rezeptorähnliche Proteinkinasen Membranproteine darstellen, werden in den Reinigungsverfahren vorzugsweise Detergenzextraktionen durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von Detergenzien, die die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Polypeptide nicht oder nur wenig beeinflussen, wie nicht-ionische Detergenzien.

Die Reinigung der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide kann die Isolierung von Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die Polypeptide in einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in vergleichbaren

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 30 -

Membranen von Zellen gefunden wird, die das HC110-R-Gen natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist die Menge mindestens 100-fach, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

- 5 Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine erfindungsgemäße, die Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders be-
10 vorzugt mindestens 100-fach angereichert.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

- 15 Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen Transmembranrezeptors wie des HC110-R Rezeptors aus *H. contortus* oder eines Fragments
20 davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind
25 Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

- Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül,
30 das Transmembranrezeptoren aktiviert.

Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das einen Agonisten von seiner Bindungsstelle verdrängt oder die Funktion des Agonisten inhibiert.

5 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die
10 erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können Mimetika von natürlichen Substraten und Liganden darstellen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische
15 Verbindungen.

Die Bindung der Modulatoren an die Polypeptide kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben der damit behandelten Helminthen oder Arthropoden führt.

20 Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der Polypeptide als Anthelmintika und Arthropodizide.

Insbesondere ist die Verwendung des α -LTX als Anthelmintikum ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Nukleinsäuren bzw. Polypeptide in einem erfindungsgemäßen Verfahren ermöglicht auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden. Diese können ebenfalls als Anthelmintika, z.B. als Nematizide bei Pflanzen oder als anthelmintische Wirkstoffe bei Tieren angewandt werden. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die Nukleinsäuren enthalten und
30

die entsprechenden Rezeptoren bzw. Polypeptide exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben.

5

Insbesondere ist ein Verfahren Gegenstand der vorliegenden Erfindung, dass zur Identifizierung von nematiziden Wirkstoffen geeignet ist, die an Transmembranrezeptoren aus Helminthen oder Arthropoden binden, bevorzugt an GPCR der Sekretin-Subfamilie, besonders bevorzugt an den Rezeptor HC110-R aus *H. contortus* sowie an dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und ganz besonders bevorzugt an dazu zu 95 % sequenzidentische Rezeptoren binden. Die Verfahren können jedoch auch mit einem HC110-R homologen Rezeptor aus einer anderen als der hier genannten Spezies durchgeführt werden. Verfahren, die andere als den erfindungsgemäßen HC110-R Rezeptor verwenden, sind von der vorliegenden Erfindung voll umfasst.

10

15

Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (z.B. high throughput screening (HTS) und ultra high throughput screening (UHTS)) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten.

20

Zellfreie Testsysteme

Viele Testsysteme, die die Prüfung von Verbindungen und natürlichen Extrakten zum Ziel haben, sind auf hohe Durchsatzzahlen ausgerichtet, um die Zahl der untersuchten Substanzen in einem gegebenen Zeitraum zu maximieren. Testsysteme, die auf zellfreiem Arbeiten beruhen, brauchen gereinigtes oder semi-gereinigtes Protein. Sie sind geeignet für eine "erste" Prüfung, die in erster Linie darauf abzielt, einen möglichen Einfluß einer Substanz auf das Zielprotein zu detektieren.

25

30

Effekte wie Zelltoxizität werden in diesen *in vitro* Systemen in der Regel ignoriert. Die Testsysteme überprüfen dabei sowohl inhibierende bzw. suppressive Effekte der Substanzen, als auch stimulatorische Effekte. Die Effektivität einer Substanz kann durch konzentrationsabhängige Testreihen überprüft werden. Kontrollansätze ohne
5 Testsubstanzen können zur Bewertung der Effekte herangezogen werden.

Auf Zellen basierende Testsysteme

Durch die anhand der vorliegenden Erfindung verfügbaren, stabil mit HC110-R transformierten Zelllinien, aber auch durch die anhand der vorliegenden Erfindung
10 identifizierbaren entsprechenden, homologen Rezeptoren aus anderen Spezies, wird die Entwicklung von Testsystemen, die auf Zellen basieren, zur Identifizierung von Substanzen ermöglicht, die die Aktivität von HC110-R und homologer Rezeptoren modulieren.

15 Ebenso wird durch die vorliegende Erfindung die Identifizierung von weiteren Verbindungen ermöglicht, die als Calcium-Kanal-Blocker wirksam sind.

Um Modulatoren aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte
20 der *in vitro*-Translation) oder ein zellulärer Bestandteil, wie eine Membran oder irgendeine andere Präparation, die das Polypeptid enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls, die Aktivität der erfindungsgemäßen
25 Polypeptide zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des markierten Substrates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, aber nicht die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen
30 Polypeptide auslösen, sind wahrscheinlich gute Antagonisten.

Scintillation Proximity Assay (SPA)

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität von HC110-R bzw. dazu homologer Rezeptorproteine modulieren, ist der sogenannte "Scintillation Proximity Assay" (SPA), siehe EP-A- 015 473. Dieses Testsystem nutzt die Interaktion eines Rezeptors (z.B. HC110-R) mit einem radiomarkierten Liganden (z.B. ein kleines organisches Molekül oder ein zweites, radioaktiv markiertes Proteinmolekül). Der Rezeptor ist dabei an kleine Kügelchen ("Microspheres") oder Perlen ("Beads") gebunden, die mit szintillierenden Molekülen versehen sind. Im Verlauf des Abfalls der Radioaktivität wird die szintillierende Substanz im Kügelchen durch die subatomaren Partikel des radioaktiven Markers angeregt und ein detektierbares Photon emittiert. Die Testbedingungen werden so optimiert, daß nur jene vom Liganden ausgehenden Partikel zu einem Signal führen, die von einem an den Rezeptor bzw. HC110-R gebundenen Liganden ausgehen.

In einer möglichen Ausführungsform ist HC110-R an die Beads gebunden, entweder zusammen oder ohne interagierende bzw. bindende Testsubstanzen. Verwendet werden könnten dabei auch Fragmente des HC110-R Rezeptors. Ein radioaktiv markierter Ligand könnte z. B. markiertes α -LTX, Nifedipin oder ein markiertes Dipeptid sein. Bei einer Bindung eines bindenden Liganden an den immobilisierte HC110-R Rezeptor, müßte dieser Ligand eine bestehende Interaktion zwischen dem immobilisierten HC110-R und dem markierten Liganden inhibieren oder aufheben, um selbst im Bereich der Kontaktfläche zu binden. Eine erfolgte Bindung an den immobilisierte HC110-R Rezeptor kann dann anhand eines Lichtblitzes detektiert werden. Entsprechend wird ein bestehender Komplex zwischen einem immobilisierten und einem freien, markierten Liganden durch die Bindung einer Testsubstanz zerstört, was zu einem Abfall der detektierten Lichtblitzintensität führt. Das Testsystem entspricht dann einem komplementären Inhibitions-System.

30

Two Hybrid System

Ein weiteres Beispiel für ein auf ganzen Zellen basierendes Testsystem ist das sogenannte "Two Hybrid System". Ein spezifisches Beispiel dafür ist die sogenannte
5 "Interaction Trap", die Interaktions-Falle. Es handelt sich dabei um eine genetische Selektion von interagierenden Proteinen in Hefe (siehe z.B. Gyuris *et al.* 1993). Das Testsystem ist darauf ausgelegt, die Interaktion zweier Proteine zu detektieren und zu beschreiben, indem eine erfolgte Interaktion zu einem detektierbaren Signal führt.

10 Ein solches Testsystem kann auch an die Prüfung großer Zahlen von Testsubstanzen in einem gegebenen Zeitraum angepaßt werden.

Das System beruht auf der Konstruktion zweier Vektoren, dem "Bait"- und dem "Prey"-Vektor. Ein für ein erfindungsgemäßes HC110-R oder Fragmente davon
15 kodierendes Gen wird in den Bait-Vektor kloniert und dann als Fusionsprotein mit dem LexA-Protein, einem DNA-bindenden Protein, exprimiert. Ein zweites Gen, kodierend für ein Interaktionspartner von HC110-R, beispielsweise für ein α -LTX, wird in den Prey-Vektor kloniert, wo es als Fusionsprotein mit dem B42-Prey-Protein exprimiert wird. Beide Vektoren liegen in einem *Saccharomyces cerevisiae*-Wirt vor,
20 der Kopien von LexA-bindender DNA auf der 5'-Seite eines lacZ- oder HIS3-Reportergens enthält. Findet eine Interaktion zwischen den beiden Fusions-Proteinen statt, kommt es zur Aktivierung der Transkription des Reportergens. Führt die Anwesenheit einer Testsubstanz zur Inhibition oder zur Störung der Interaktion, können die beiden Fusions-Proteine nicht mehr interagieren und das
25 Produkt des Reportergens wird nicht mehr hergestellt.

Verdrängungstest

Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem
30 man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und

einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Bevorzugt wird dazu in erfindungsgemäßer Weise das α -LTX verwendet.

5

Im Rahmen von molekularen Interaktionsstudien unter Verwendung des vollständigen HC110-R Proteins bzw der N- und/oder C-terminalen Deletionsmutanten von HC110-R, oder auch mit durch *in vitro* Mutagenese bzw. sonstige bekannte Methoden veränderten HC110-R Molekülvarianten, kann ein bekanntes Analyse-

10

system eingesetzt werden, z.B. von Biacore AB, Uppsala, Schweden. Dabei kann einerseits

15

(i) das HC110-R Protein oder Fragmente davon über bekannte chemische Methoden (Kopplung über Amine, Thiole, Aldehyde) oder Affinitätsbindung (z.B. Streptavidin-Biotin, IMAC) an einen Biochip gekoppelt oder andererseits

20

(ii) α -LTX oder ein anderer Modulator z.B. BAY 44-4400 oder andere mögliche Liganden wie unter (i) beschrieben an den Chip gekoppelt werden.

25

Die Bindung eines in Lösung befindlichen Liganden (HC110-R Protein, bzw. ein beliebiger Modulator z.B. BAY 44-4400 etc.) an die immobilisierten Moleküle ist physikalisch messbar. Bei dem Biacore Instrument wird der Ligand auf einem Sensorchip immobilisiert, der eine dünne Goldschicht aufweist. Die Analytlösung wird durch eine Mikroflussszelle auf dem Chip perfundiert. Bindung des Analyten an den immobilisierten Liganden erhöht die lokale Konzentration auf der Oberfläche, wobei der Brechungsindex des Mediums nahe der Goldschicht graduell erhöht wird. Dies hat einen Einfluß auf die Interaktion zwischen freien Elektronen (Plasmonen) in dem Metall und Photonen, die vom Instrument emittiert werden. Diese physikalischen Änderungen sind proportional zur Masse und Molekülzahl auf dem Chip, die Ligand-Analyt Bindung wird in Echtzeit registriert, wodurch Bestimmung der

30

apparenten Assoziations-/Dissoziationsrate möglich ist (Fivash et al. 1998). Durch Kompetitionsversuche wird die Spezifität der Bindung validiert.

Entsprechende Messungen dienen auch zur Bestimmung der für die Bindung von
5 Liganden wichtigen HC110-R Proteindomänen sowie die Identifikation neuer noch nicht bekannter Liganden des HC110-R.

Calcium Imaging

10 Als weiteres Verfahren zur Detektion von mit dem HC110-R interagierenden Substanzen ist das Calcium Imaging oder Signaling anzusehen (siehe z.B. Abb. 10 und 11). Dabei kommen Calcium-Indikatoren zum Einsatz mit deren Hilfe Änderungen im intrazellulären Calciumspiegel detektierbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Verfahren kommen HC110-R exprimierende Zellen zum Einsatz, die mit Calcium-
15 Indikatoren beladen werden. Unter UV-Anregung kommt es dann bei einem durch einen HC110-R Agonisten hervorgerufenen Calcium-Einstrom, bzw. bei Freisetzung intrazellulären Calciums zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit der Calciumbeladung des Indikators. Ein Antagonist läßt sich in einem derartigen System durch die vollständige oder teilweise Unterdrückung des von dem Agonisten (z.B. α -LTX) induzierten Calciumsignals erkennen. Als mögliche Calcium-Indikatoren kommen dazu das Fura-2 (Sigma) oder Indo-1 (Molecular Probes) in Betracht.

Weitere Calcium Indikatoren lassen sich durch sichtbares Licht anregen und ändern in Abhängigkeit von ihrer Calciumbeladung detektierbar ihr Fluoreszenzverhalten. Die
25 Indikatoren Fluo-3 und Fluo-4 weisen eine hohe Calciumaffinität auf. Fluo-4 eignet sich mit seinem stärkeren Fluoreszenzsignal dabei insbesondere für Messungen bei Testsystemen, bei denen die Zellen nur in geringer Dichte eingesetzt werden, wie im Falle der HEK293-Zellen. Weitere Indikatoren sind Rhod-2, x-Rhod-1, Fluo-5N, Fluo-5F, Mag-Fluo-4, Rhod-5F, Rhod-5N, Y-Rhod-5N, Mag-Rhod-2, Mag-X-Rhod-1,
30 Calcium Green-1 und -2, Calcium Green-5N, Oregon Green 488 BAPTA-1, Orgeon Green 488 BAPTA-2 und -5N, Fura Red, Calcein und ähnliche.

- Eine Alternative zur Beladung von Zellen mit Calcium Indikatoren stellt die re-kombinante Expression von Photoproteinen in den Zielzellen dar. Diese Photoproteine reagieren dann in Form einer Lichtemission nachdem sie mit Calciumionen einen
- 5 Komplex eingegangen sind. Ein in zahlreichen Untersuchungen und Testsystemen bereits vielfach verwendetes Photoprotein ist das Aequorin. Die das Zielprotein und gleichzeitig das Aequorin exprimierenden Zellen werden in diesem Testverfahren zunächst mit dem Luminophor Coelenterazin beladen. Das von den Zellen gebildete Apoequorin bildet mit dem Coelenterazin und Kohlendioxid einen Komplex. Tritt an-
- 10 schließend Calcium in die Zelle hinzu und bindet an den Komplex, kommt es zur Freisetzung von Kohlendioxid und blauem Licht (Emissions-Maximum ~466 nm). Die Lichtemission korreliert dabei mit der intrazellulär herrschenden Calciumkonzentration.
- 15 Gegenstand dieser Erfindung ist damit ebenfalls die Verwendung von HC110-R, Fragmenten davon oder ähnlicher Proteine aus anderen Organismen in einem Testverfahren, in dem die Funktion des Rezeptors oder die Bindung von Modulatoren an den Rezeptor mittels eines durch Aequorin oder ähnlichen Photoproteinen vermittelten Lichtsignals detektiert wird.
- 20 Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, ist es auf diese Weise auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern. Auch solche Substanzen können wertvolle Anthelminthika darstellen.
- 25 Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens gefundenen Wirkstoffe eignen sich entsprechend zur Bekämpfung von tierischen Schädlingen, insbesondere Insekten, Spinnentieren und Nematoden, die in der Landwirtschaft, in Forsten, im Vorrats- und Materialschutz sowie auf dem Hygienesektor vorkommen. Besonders eignen sich die
- 30 mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe zur Bekämpfung von Nematoden und Spinnentieren. Zu den oben erwähnten Schädlingen gehören:

- Aus der Ordnung der Isopoda z.B. *Oniscus asellus*, *Armadillidium vulgare*, *Porcellio scaber*.
- Aus der Ordnung der Diplopoda z.B. *Blaniulus guttulatus*.
- 5 Aus der Ordnung der Chilopoda z.B. *Geophilus carpophagus*, *Scutigera* spp..
- Aus der Ordnung der Symphyla z.B. *Scutigera* spp..
- Aus der Ordnung der Thysanura z.B. *Lepisma saccharina*.
- Aus der Ordnung der Collembola z.B. *Onychiurus asperatus*.
- Aus der Ordnung der Orthoptera z.B. *Acheta domestica*, *Gryllotalpa* spp., *Locusta* -
- 10 *migratoria migratorioides*, *Melanoplus* spp., *Schistocerca gregaria*.
- Aus der Ordnung der Blattaria z.B. *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana*, *Leucophaea maderae*, *Blattella germanica*.
- Aus der Ordnung der Dermaptera z.B. *Forficula auricularia*.
- Aus der Ordnung der Isoptera z.B. *Reticulitermes* spp..
- 15 Aus der Ordnung der Phthiraptera z.B. *Pediculus humanus corporis*, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Trichodectes* spp., *Damalinea* spp..
- Aus der Ordnung der Thysanoptera z.B. *Hercinothrips femoralis*, *Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Frankliniella occidentalis*.
- Aus der Ordnung der Heteroptera z.B. *Eurygaster* spp., *Dysdercus intermedius*,
- 20 *Piesma quadrata*, *Cimex lectularius*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma* spp.
- Aus der Ordnung der Homoptera z.B. *Aleurodes brassicae*, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aphis gossypii*, *Brevicoryne brassicae*, *Cryptomyzus ribis*, *Aphis fabae*, *Aphis pomi*, *Eriosoma lanigerum*, *Hyalopterus arundinis*,
- 25 *Phylloxera vastatrix*, *Pemphigus* spp., *Macrosiphum avenae*, *Myzus* spp., *Phorodon humuli*, *Rhopalosiphum padi*, *Empoasca* spp., *Euscelis bilobatus*, *Nephotettix cincticeps*, *Lecanium corni*, *Saissetia oleae*, *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens*, *Aonidiella aurantii*, *Aspidiotus hederae*, *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp.
- 30 Aus der Ordnung der Lepidoptera z.B. *Pectinophora gossypiella*, *Bupalus piniarius*, *Cheimatobia brumata*, *Lithocolletis blancardella*, *Hyponomeuta padella*, *Plutella*

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 40 -

- xylostella*, *Malacosoma neustria*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Lymantria* spp.,
Bucculatrix thurberiella, *Phyllocnistis citrella*, *Agrotis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp.,
Earias insulana, *Heliothis* spp., *Mamestra brassicae*, *Panolis flammea*, *Spodoptera*
 spp., *Trichoplusia ni*, *Carpocapsa pomonella*, *Pieris* spp., *Chilo* spp., *Pyrausta*
 5 *nubilalis*, *Ephesttia kuehniella*, *Galleria mellonella*, *Tineola bisselliella*, *Tinea*
pellionella, *Hofmannophila pseudospretella*, *Cacoecia podana*, *Capua reticulana*,
Choristoneura fumiferana, *Clysia ambiguella*, *Homona magnanima*, *Tortrix*
viridana, *Cnaphalocerus* spp., *Oulema oryzae*.
 Aus der Ordnung der Coleoptera z.B. *Anobium punctatum*, *Rhizopertha dominica*,
 10 *Bruchidius obtectus*, *Acanthoscelides obtectus*, *Hylotrupes bajulus*, *Agelastica alni*,
Leptinotarsa decemlineata, *Phaedon cochleariae*, *Diabrotica* spp., *Psylliodes*
chrysocephala, *Epilachna varivestis*, *Atomaria* spp., *Oryzaephilus surinamensis*,
Anthonomus spp., *Sitophilus* spp., *Otiorrhynchus sulcatus*, *Cosmopolites sordidus*,
Ceuthorrhynchus assimilis, *Hypera postica*, *Dermestes* spp., *Trogoderma* spp.,
 15 *Anthrenus* spp., *Attagenus* spp., *Lyctus* spp., *Meligethes aeneus*, *Ptinus* spp., *Niptus*
hololeucus, *Gibbium psyllodes*, *Tribolium* spp., *Tenebrio molitor*, *Agriotes* spp.,
Conoderus spp., *Melolontha melolontha*, *Amphimallon solstitialis*, *Costelytra*
zealandica, *Lissorhoptrus oryzophilus*.
 Aus der Ordnung der Hymenoptera z.B. *Diprion* spp., *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp.,
 20 *Monomorium pharaonis*, *Vespa* spp.
 Aus der Ordnung der Diptera z.B. *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp.,
Drosophila melanogaster, *Musca* spp., *Fannia* spp., *Calliphora erythrocephala*,
Lucilia spp., *Chrysomyia* spp., *Cuterebra* spp., *Gastrophilus* spp., *Hyppobosca* spp.,
Stomoxys spp., *Oestrus* spp., *Hypoderma* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp., *Bibio*
 25 *hortulanus*, *Oscinella frit*, *Phorbia* spp., *Pegomyia hyoscyami*, *Ceratitis capitata*,
Dacus oleae, *Tipula paludosa*, *Hylemyia* spp., *Liriomyza* spp..
 Aus der Ordnung der Siphonaptera z.B. *Xenopsylla cheopis*, *Ceratophyllus* spp..
 30 Aus der Klasse der Arachnida z.B. *Scorpio maurus*, *Latrodectus mactans*, *Acarus*
siro, *Argas* spp., *Ornithodoros* spp., *Dermanyssus gallinae*, *Eriophyes ribis*,

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 41 -

Phyllocoptura oleivora, *Boophilus* spp., *Rhipicephalus* spp., *Amblyomma* spp.,
Hyalomma spp., *Ixodes* spp., *Psoroptes* spp., *Chorioptes* spp., *Sarcoptes* spp.,
Tarsonemus spp., *Bryobia praetiosa*, *Panonychus* spp., *Tetranychus* spp.,
Hemitarsonemus spp., *Brevipalpus* spp..

5

Zu den pflanzenparasitären Nematoden gehören z.B. *Pratylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Ditylenchus dipsaci*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp., *Aphelenchoides* spp., *Longidorus* spp., *Xiphinema* spp., *Trichodorus* spp., *Bursaphelenchus* spp.

10

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe wirken nicht nur gegen Pflanzen-, Hygiene- und Vorratsschädlinge, sondern auch auf dem veterinärmedizinischen Sektor gegen tierische Parasiten (Ektoparasiten) wie Schildzecken, Lederzecken, Räudemilben, Laufmilben, Fliegen (stechend und

15

leckend), parasitierende Fliegenlarven, Läuse, Haarlinge, Federlinge und Flöhe. Zu diesen Parasiten gehören:

Aus der Ordnung der Anoplurida z.B. *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Phthirus* spp., *Solenopotes* spp..

20

Aus der Ordnung der Mallophagida und den Unterordnungen Amblycerina sowie Ischnocerina z.B. *Trimenopon* spp., *Menopon* spp., *Trinoton* spp., *Bovicola* spp., *Werneckiella* spp., *Lepikentron* spp., *Damalina* spp., *Trichodectes* spp., *Felicola* spp..

25

Aus der Ordnung Diptera und den Unterordnungen Nematocera sowie Brachycera z.B. *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp., *Simulium* spp., *Eusimulium* spp., *Phlebotomus* spp., *Lutzomyia* spp., *Culicoides* spp., *Chrysops* spp., *Hybomitra* spp., *Atylotus* spp., *Tabanus* spp., *Haematopota* spp., *Philipomyia* spp., *Braulta* spp., *Musca* spp., *Hydrotaea* spp., *Stomoxys* spp., *Haematobia* spp., *Morellia* spp., *Fannia* spp., *Glossina* spp., *Calliphora* spp., *Lucilia* spp., *Chrysomyia* spp.,

30

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 42 -

Wohlfahrtia spp., *Sarcophaga* spp., *Oestrus* spp., *Hypoderma* spp., *Gasterophilus* spp., *Hippobosca* spp., *Lipoptena* spp., *Melophagus* spp..

5 Aus der Ordnung der Siphonaptera z.B. *Pulex* spp., *Ctenocephalides* spp., *Xenopsylla* spp., *Ceratophyllus* spp..

Aus der Ordnung der Heteroptera z.B. *Cimex* spp., *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp., *Panstrongylus* spp..

10 Aus der Ordnung der Blattellidae z.B. *Blattella orientalis*, *Periplaneta americana*, *Blattella germanica*, *Supella* spp..

15 Aus der Unterklasse der Acaria (Acarida) und den Ordnungen der Meta- sowie Mesostigmata z.B. *Argas* spp., *Ornithodoros* spp., *Otobius* spp., *Exodes* spp., *Amblyomma* spp., *Boophilus* spp., *Dermacentor* spp., *Haemophysalis* spp., *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus* spp., *Dermanyssus* spp., *Raillietia* spp., *Pneumonyssus* spp., *Sternostoma* spp., *Varroa* spp..

20 Aus der Ordnung der Actiniedida (Prostigmata) und Acaridida (Astigmata) z.B. *Acarapis* spp., *Cheyletiella* spp., *Ornithocheyletia* spp., *Myobia* spp., *Psorergates* spp., *Demodex* spp., *Trombicula* spp., *Listrophorus* spp., *Acarus* spp., *Tyrophagus* spp., *Caloglyphus* spp., *Hypodectes* spp., *Pterolichus* spp., *Psoroptes* spp., *Chorioptes* spp., *Otodectes* spp., *Sarcoptes* spp., *Notoedres* spp., *Knemidocoptes* spp., *Cytodectes* spp., *Laminosioptes* spp..

25 Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens gefundenen Wirkstoffe eignen sich auch zur Bekämpfung von Milben, insbesondere Hausstaubmilben z.B. *Dermatophagoides pteronyssinus* und *D. farinae*.

30 Die mit den erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe eignen sich auch zur Bekämpfung von Arthropoden, die landwirtschaftliche Nutztiere, wie z.B.

- Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Schweine, Esel, Kamele, Büffel, Kaninchen, Hühner, Puten, Enten, Gänse, Bienen, sonstige Haustiere wie z.B. Hunde, Katzen, Stubenvögel, Aquarienfische sowie sogenannte Versuchstiere, wie z.B. Hamster, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse befallen. Durch die Bekämpfung dieser
- 5 Arthropoden sollen Todesfälle und Leistungsminderungen (bei Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern, Honig usw.) vermindert werden, so daß durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist.
- 10 Verbindungen, die mit Hilfe der beschriebenen Verfahren und Polypeptide gefunden werden, sind ebenfalls wertvoll zur Behandlung von Tieren und Menschen, die mit pathogenen Endoparasiten des Menschen oder von Nutztieren, Hobbytieren, Zootieren sowie Labor und Versuchstieren infiziert sind.
- 15 Die Verbindungen können in allen Entwicklungsstadien normaler, sensibler Stämme und auch resistenter Stämme verwendet werden. Durch die Behandlung mit Mitteln, die eine oder mehrere dieser Verbindungen enthalten, können sowohl wirtschaftliche Verluste bei Nutztieren und Krankheiten bei Menschen und Tieren vermieden oder behandelt werden. Die folgenden Parasiten sind dabei von besonderem Interesse als
- 20 Ziele der gefundenen Wirkstoffe:

Enoplida, z.B. *Trichuris* spp., *Capillaria* spp., *Trichomosoides* spp., *Trichinella* spp.
Rhabditia, z.B. *Micronema* spp., *Strongyloides* spp.

- Strongylida, z.B. *Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp., *Oesophagodontus* spp.,
- 25 *Trichonema* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylindropharynx* spp., *Poterostomum* spp., *Cyclocercus* spp., *Cylicostephanus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Chabertia* spp., *Stephanurus* spp., *Ancylostoma* spp., *Uncinaria* spp., *Bunostomum* spp., *Globocephalus* spp., *Syngamus* spp., *Cyathostomum* spp., *Cylicocyclus* spp., *Neostongylus* spp., *Cystocaulus* spp., *Pneumostongylus* spp., *Spicocaulus* spp.,
- 30 *Elaphostongylus* spp., *Parelaphostongylus* spp., *Crenosoma* spp., *Paracrenosoma* spp., *Angiostrongylus* spp., *Aelurostrongylus* spp., *Filaroides* spp., *Parafilaroides*

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 44 -

spp., *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Marshallagia* spp.,
Cooperia spp., *Nematodirus* spp., *Hyostrongylus* spp., *Obeliscoides* spp.,
Amidostomum spp., *Ollulanus* spp., *Dictyocaulus* spp., *Muellerius* spp.,
Protostrongylus spp.

5

Oxyurida, z.B. *Oxyuris* spp., *Enterobius* spp., *Passalurus* spp., *Syphacia* spp., *Aspiculuris* spp., *Heterakis* spp.

10 Ascaridia, z.B. *Ascaris* spp., *Toxascaris* spp., *Toxocara* spp., *Parascaris* spp., *Anisakis* spp., *Ascaridia* spp.

Spirurida, z.B. *Gnathostoma* spp., *Physaloptera* spp., *Thelazia* spp., *Gongylonema* spp., *Habronema* spp., *Parabronema* spp., *Draschia* spp., *Dracunculus* spp.

15 Filarida, z.B. *Stephanofilaria* spp., *Parafilaria* spp., *Setaria* spp., *Loa* spp., *Dirofilaria* spp., *Litomosoides* spp., *Brugia* spp., *Wuchereria* spp., *Onchocerca* spp.

Gigantorhynchida, z.B. *Filicollis* spp., *Moniliformis* spp., *Macracanthorhynchus* spp., *Prosthenorchis* spp.

Mastigophora (Flagellata)

20 Trypanosomatidae, z.B. *Trypanosoma b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. evansi*, *T. equinum*, *T. lewisi*, *T. percae*, *T. simiae*, *T. vivax*, *Leishmania brasiliensis*, *L. donovani*, *L. tropica*

Trichomonadidae, z.B. *Giardia lamblia*, *G. canis*.

Sarcomastigophora (Rhizopoda), z.B. *Entamoeba histolytica*

Hartmannellidae, z.B. *Acanthamoeba* sp., *Hartmannella* spp.

25 Apicomplexa (Sporozoa), z.B. *Eimeria acervulina*, *E. adenoides*, *E. alabamensis*, *E. anatis*, *E. anseris*, *E. arloingi*, *E. ashata*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brunetti*, *E. canis*, *E. chinchillae*, *E. clupearum*, *E. columbae*, *E. contorta*, *E. crandallii*, *E. deblickei*, *E. dispersa*, *E. ellipsoides*, *E. falciformis*, *E. faurei*, *E. labbeana*, *E. leucarti*, *E. magna*, *E. maxima*, *E. media*, *E. meleagridis*, *E. meleagritidis*, *E. mitis*,
 30 *E. necatrix*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. ovis*, *E. parva*, *E. pavonis*, *E. perforans*, *E. phasani*, *E. piriformis*, *E. praecox*, *E. residua*, *E. scabra*, *E. spec.*, *E. stiedai*, *E. suis*,

E. tenella, *E. truncata*, *E. truttae*, *E. zuernii*, *Globidium spec.*, *Isospora belli*, *I. canis*, *I. felis*, *I. ohioensis*, *I. rivolta*, *I. spec.*, *I. suis*, *Neospora caninum*, *Cystispora spec.*, *Cryptosporidium spec.*

Toxoplasmodidae, z.B. *Toxoplasma gondii*

- 5 Sarcocystidae, z.B. *Sarcocystis bovicanis*, *S. bovis*, *S. neurona*, *S. ovicanis*, *S. ovifelis*, *S. spec.*, *S. suihominis*

Leucozoide, z.B. *Leucozytozoon simondi*

Plasmodiidae, z.B. *Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. spec.*

- 10 Piroplasma, z.B. *Babesia argentina*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. spec.*, *Theileria parva*, *T. spec.*

Adeleina, z.B. *Hepatozoon canis*, *H. spec.*

Weiterhin von Bedeutung sind

- 15

Myxospora und Microspora, z.B. *Glugea spec.* und *Nosema spec.*, sowie *Pneumocystis carinii*, Ciliophora (Ciliata), z.B. *Balantidium coli*, *Ichthyophthirius spec.*, *Trichondina spec.* oder *Epistylis spec.*

- 20

Die gefundenen Verbindungen und Mittel sind ebenfalls effektiv gegenüber Protozoen von Insekten, wie solche des Stammes Microsporidia, besonders solche der Ordnung Nosema, ganz besonder solche der Art *Nosema apis*, die Parasiten der Honigbiene sind.

- 25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von Verbindungen, die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren und/oder unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Polypeptide gefunden wurden, zur Herstellung eines Mittels der Bekämpfung von Helminthen und/oder Arthropoden.

Beispiele

1. Konstruktion und Durchsuchen der cDNA-Bibliothek

Die Konstruktion der cDNA-Bibliothek, die Herstellung von KLH-PF1022A-Konjugat und Antiserum gegen PF1022A sowie das Immunscreening der cDNA-Bibliothek und die DNA-Analyse erfolgte wie in WO 98/15625 beschrieben.

2. Isolierung von RNA

Die totale RNA wurde entsprechend der GTC/CsClKissen-Methode aus adulten *Haemonchus contortus* Nematoden extrahiert und isoliert (Sambrook et al. 1989) oder durch einen einzigen Schritt durch GTC/Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen (Chomczynski und Sacchi 1987). Poly (A)⁺ RNA wurde durch Chromatographie an oligo(dT)Cellulose isoliert (Aviv und Leder, 1972).

3. Northern Blotting

Glyoxylierte totale RNA aus *Haemonchus contortus* (20 µg pro Bahn) wurden im Agarosegel aufgetrennt (Sambrook et al. 1989; McMaster und Carmichael 1977) und auf eine Hybond N Membran (Amersham) mittels basischer Kapillar-Transfer-methode übertragen (Chomczynski, 1992). Radiomarkierte Proben wurden durch randomisierte Markierung linearisierter Plasmid-DNA (HCT10-R) hergestellt, wobei ein Megaprime-Kit (Amersham, Braunschweig, Deutschland) und 50 µCi [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim, Deutschland) verwendet wurden. Die Hybridisierung wurde über Nacht durchgeführt bei 65°C in 6 x SSC (1x SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat), 5x Denhardt's Reagenz (0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 0,1 % BSA, 0,1 % Ficoll 400), 0,1 % SDS und 100 µg/ml Heringssperma-DNA. Die Filter wurden unter hoher Stringenz in 0,1xSSC und 0,1 % SDS bei 65°C gewaschen und exponiert (Kodak BioMax MS Filme bei -80°C), siehe Abb. 1 (A).

4. 5'- und 3'-RACE-PCR

Zur Isolierung der im identifizierten cDNA Klon fehlenden 5'- und 3'-Enden wurde das Verfahren des 5'/3'-RACE angewendet.

5

Das 5'-RACE beruht auf der spezifischen Amplifizierung des 5'-Endes eines Gens aus mRNA. Mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers und der AMV Reversen Transkriptase wird der cDNA-Erststrang synthetisiert. An das Produkt wird ein ein poly (A)-Schwanz angehängt, so dass in der nachfolgenden PCR ein oligo dT-Anker-
10 primer und ein "nested" sequenzspezifischer Primer eingesetzt werden kann. In einer zweiten PCR kann ein weiterer "nested" Primer verwendet werden, um die Spezifität zu gewährleisten.

15 Im 3'-RACE erfolgt die cDNA-Erststrangsynthese mit einem oligo dT-Primer und die nach-folgenden PCR Reaktionen mit sequenzspezifischen Primern.

cDNA wurde aus 1 µg totaler *H. contortus* RNA mit dem Primer 5'-GGT CAC CGT CGT CCC AGA AA-3' synthetisiert unter Verwendung des 5'-RACE Kits von GIBCO BRL (Eggenstein, Deutschland). Dazu wurde die Superscript Reverse
20 Transkriptase verwendet. Das C-Tailing des C-Terminus der cDNA wurde mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotidyltransferase durchgeführt. Die erste Amplifikation erfolgte mit 400 nM eines oligo-desoxy-inosyl-Anker-Primers (5'-CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') und 400 nM des ersten "nested" Primers 5'-CCA TTC GAT TCC TCT TCT CG-3' (Birsner
25 und Grob, Denzlingen, Deutschland) in 50 µl enthaltend 200 µM jedes dNTP, 1,5 mM MgCl₂, ein Fünftel der "tailed" cDNA und 2,5 U der nativen Taq-Polymerase. Die erste Denaturierung erfolgte bei 94°C für 5 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen zu je 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 53°C und 2 Minuten bei 72°C, wiederum gefolgt von einem letzten Syntheseschritt von 10 Minuten bei 72°C. Die
30 Reaktionsbedingungen für die "nested" PCR waren dieselben wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass 1 µl des ersten Amplifikationsproduktes als Template

verwendet wurde, sowie der genspezifische zweite "nested" Primer 5'-GTC GAT GGT GCA GAT TTC GC-3', eine verkürzte Form des Anker-Primers (5'-CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3') und nur 25 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 53°C durchgeführt wurden.

- 5 Die 3'-RACE-PCR (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) wurde mit 1 µg der totalen RNA adulter *H. contortus* und 500 nM des oligo dT Adapter-Primers 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT T-3' durchgeführt, beginnend mit einer Präinkubation für 10 Minuten bei 70°C und 2 Minuten bei 4°C.
- 10 Nach Zugabe von 2,5 mM MgCl₂, 500 µM jedes dNTP, 10 µM DTT und 200 U Super-Script II Reverse Transkriptase in 20 µl wurde die cDNA für 50 Minuten bei 42°C und in einem abschließenden Schritt für 15 Minuten bei 70°C und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Die RNA wurde durch 2 U *E. coli* RNase H und einer Inkubation bei 37°C für 10 Minuten entfernt. Die erste Amplifikation erfolgte mit 400 nM eines universellen Adapter-Primers (5'-CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT
- 15 AGT AC-3') und 400 nM des sequenzspezifischen Primers 5'-TTTGITCTT CCT TGG TAT CC-3' in 50 µl enthaltend 200 mM jedes dNTP, 1,5 mM MgCl₂, ein Zehntel der "tailed" cDNA und 2,5 U native Taq-DNA-Polymerase. Der erste Denaturierungsschritt erfolgte bei 94°C für 3 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen zu je 1
- 20 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 51°C und 2 Minuten bei 72°C sowie einem abschließenden Syntheseschritt von 15 Minuten bei 72°C. Für die "nested" PCR wurden 2 µl der ersten Amplifikation bei ansonsten gleichen Bedingungen verwendet, wobei nun der kürzere Adapter-Primer 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' und der "nested" Primer 5'-ACA CTC TAA TCT CCA ACT G-3' bei nunmehr 30
- 25 Zyklen verwendet wurden. Die PCR-Produkte wurden auf 2%igen Agarose-Gelen analysiert, eluiert und in den TA-Vektor pMosBlue (Amersham, Braunschweig, Deutschland) kloniert.

5. Transfer der RNA

Der Transfer der aufgetrennten RNA aus dem Glyoxalgel bzw. genom. DNA aus einem TBE-Agarosegel auf eine neutrale Hybond-N Nylonmembran [Amersham, Braunschweig] erfolgt nach dem 'Downward Alkaline Capillary Transfer' in alkalischer Transferlösung nach der Methode von Chomczynski (1992) für 2 h. Danach wird die Membran für 20 min in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8) neutralisiert, getrocknet und für 20 - 60 min bei 80°C gebacken. Für die Hybridisierung gegen radioaktiv markierte Sonden wird die Membran mit 5 ml/cm² Prähybridisierungslösung in Kunststoffüten eingeschweißt und für 3 h bei 65°C inkubiert. Zur Hybridisierung wird der Puffer durch Hybridisierungslösung ersetzt. Bei Verwendung von Rapid Hyb.-Lösung [Amersham, Braunschweig] erfolgt die Prähybridisierung in 30 min bei 65°C ohne zusätzliche Prähybridisierungslösung. Nach Zugabe der durch 'Random Priming' radioaktiv markierten Sonde erfolgt die Hybridisierung bei 65°C über Nacht. Danach wird die Membran einmal mit 65°C warmem 2x SSC / 0,1 % SDS für 20 min und dreimal mit 0,1x SSC / 0,1 % SDS für je 1 h gewaschen. Die Exposition der Membran erfolgt auf Kodak X-OMAT oder Kodak BIOMAX-MS Röntgenfilmen mit entsprechender Verstärkerfolie bei -80°C.

6. *In vitro* Transkription und Translation

Das TNT T7/T3 gekoppelte Retikulocytenlysats-System (Promega) wurde verwendet, um die volle Länge der kodierenden Sequenz von HC110-R in der Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin und Cystein (ICN, Eschwege, Deutschland) entsprechend den Vorschriften des Herstellers zu transkribieren und translatieren. Die RNA wurde mit einem Kaninchen Retikulocytenlysats-System (Promega, Serva, Heidelberg) translatiert, wobei eine 40 µCi ³⁵S-markierte Mischung (>1000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim, Deutschland), 1 µg zirkularisierte HC110-R Plasmid-DNA und 10 U T3-RNA-Polymerase verwendet wurden. Die Reaktion wurde bei 30°C für 90 Minuten durchgeführt. Eine positive Kontrolle enthielt 1 µg Luciferase-Kontroll-DNA.

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 50 -

Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Lämmli 1970) aufgetrennt und mit Hilfe der "Amplify Fluorography Solution" (Amersham Pharmacia Biotech) oder 1 M Natriumsalicylat (pH 7) fluorographiert (Chamberlain 5 1979), die Gele dann getrocknet und exponiert (Kodak BioMax MR Film mit Verstärker bei -80°C), siehe Abb. 1 (B).

Alternativ wurde zur *in vitro* Synthese eines RNA-Transkriptes aus in pBluescript SK klonierter HC110-R cDNA das 'MAXIscript *In Vitro* Transcription Kit' von 10 Ambion (Heidelberg) herangezogen. 4 µg HC110-R Plasmid-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym Hind III bzw. Sal I hinter dem Stop-Codon linearisiert, mit Phenol-Chloroform extrahiert, in 3 Vol. Ethanol gefällt und in DEPC-H₂O gelöst. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 2 µg HC110-R cDNA mit 2,5 µl 200 mM DTT, je 2,5 µl 10 mM ATP, CTP, GTP und UTP, 5 µl 10x Transkriptionspuffer, 1,6 µl 15 RNasin-Inhibitor (40 U / µl) (Promega, Heidelberg) und 2 µl T3-Phagen-Polymerase (10 U / µl) versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurden noch einmal 2 µl T3-Phagen-Polymerase (10 U / µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit 1,5 µl RNasefreier DNase I (2 U / µl) und 1 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl) versetzt, für 20 15 min bei 37°C inkubiert, mit Phenol-Chloroform extrahiert, in 3 Vol. Ethanol gefällt und in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert. 1/5 Vol. der Probe wurde in einem Glyoxalgel analysiert.

7. DNA-Analyse

25 Die Klone wurden durch die Didesoxynukleotid-Kettenterminationsmethode unter Zuhilfenahme der automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung (LICOR 4000; MWG, Ebersberg, Deutschland) sequenziert sowie des "Thermo Sequenase fluorescent-labeled cycle sequencing kit" (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Sequenzen beider Stränge wurden bestimmt und die Sequenzdaten mit der GCG- 30 Software (Genetics Computer Group Inc., Madison, WI, USA) sowie der PC/GENE-Software (Intelligenetics, Mountain View, CA, USA). Die Programme FASTA

(Pearson und Lipman 1988), BLITZ (Smith und Waterman 1981) und BLAST (Altschul und Lipmann 1990) wurden verwendet, um die EMBL- und Swiss-Prot Protein-Datenbanken nach Sequenzähnlichkeiten der abgeleiteten Proteinsequenz zu durchsuchen. Die Proteinsequenzen wurden mit SAPS analysiert (Brendel et al. 5 1992), sowie mit PROSITE und Prot-Param (Appel et al. 1994).

8. Herstellung von Proteinextrakten aus *Haemonchus contortus*

50 – 100 mg in flüssigem Stickstoff eingefrorene *H. contortus*-Würmer wurden in
10 1 ml TRIZOL [Gibco, Karlsruhe] aufgenommen. Die Nematoden wurden zusammen mit dem TRIZOL 3x für 15 sec in einem Glas-Potter homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIZOL und Schütteln der Probe für 15 sec wurde der Ansatz für weitere 2 - 3 min bei RT inkubiert, bevor er für 10 min bei 7.000 - 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Die obere wäßrige
15 Phase enthält die RNA, die Interphase die genomische DNA, die rote organische Phase die Proteine (Coombs et al. 1990; Chomczynski 1993). Die wäßrige Phase wurde entfernt und separat aufbereitet. Die Interphase und organische Phase wurden mit 300 µl 100 % Ethanol pro ml TRIZOL versetzt, gut durchmischt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2.000 rpm für 5 min und 4°C wurde
20 der Protein-Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Es wurde erneut für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet 3x mit je 2 ml 0,3 M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung in 95 % Ethanol versetzt, „gevornt“, für
25 20 min bei RT inkubiert und für 5 min bei 7.500 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 2 ml 100 % Ethanol gelöst, für 20 min bei RT gefällt und für 5 min bei 7.500 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde kurz vakuumgetrocknet und in Harnstoff-Lysispuffer (8 M) resuspendiert. Unlösliches Material wurde durch eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C entfernt, der Überstand in ein
30 neues Eppendorfgefäß überführt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

9. Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus einer Hefekultur wurden 5 ml YPAD-Medium mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und bis zur Sättigung bei 30°C geschüttelt (2 Tage). Jeweils 2 ml einer solchen Hefekultur wurden für 2 min bei 3.000 rpm und 4°C (Heraeus Biofuge 15 R) abzentrifugiert, einmal mit H₂O gewaschen, in 250 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert, in ein kleines Reagenzglas überführt, mit Glasperlen (Ø 0,5 mm) bis knapp unter den Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt und für 5 min auf höchster Stufe „gevortext“. Anschließend wurde 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zelltrümmer für 5 min bei 14.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) abzentrifugiert. Jeweils 20 µl der so aufbereiteten Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

10. Herstellung von Proteinextrakten aus *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden 1×10^7 *E. coli*-Zellen aus einer 5 ml Über-Nacht-Kultur für 5 min bei 5.000 rpm und 4°C in einer Heraeus-Untertischzentrifuge pelletiert, mit 5 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 1 ml TRIZOL (Gibco, Karlsruhe) resuspendiert und weiter aufgearbeitet.

Alternativ hierzu wurde das mit PBS gewaschene Zellpellet wieder in PBS resuspendiert und die Zellen mit Hilfe von mehreren kurzen Ultraschallimpulsen (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.), flüssigem Stickstoff und durch Zugabe von Lysozym zerstört.

In Anschluß an die Proteinbestimmung wurde 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) zugegeben und die Fraktion durch Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Dabei wurde pro Spur eine Proteinmenge von insgesamt 10 – 20 µg aufgetragen.

11. Herstellung von Proteinextrakten aus der Zellkultur

5 Eine konfluente 35 mm Zellkulturschale adhärenter Zellen bzw. $5 \cdot 10^6$ nicht-adhärenter Säuger-Zellen in FCS-haltigem Medium wurden zuvor mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abtrypsiniert oder mechanisch nach Kälteeinwirkung mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt, für 10 sec bei 13.000 rpm und RT pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml TRIzol wurden diese durch kräftiges „Vortexen“ oder durch 10 mehrfaches Ziehen der Zellen durch die Kanüle einer Einwegspritze lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Alternativ hierzu kann das Zellpellet auch in 1 ml PBS oder Harnstoff-Lysispuffer (8 M) resuspendiert und einer kurzen Ultraschallbehandlung (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) unterzogen werden. Danach wird der Proteingehalt nach Bradford (1976) oder Lowry *et al.* 15 (1951) bestimmt.

12. Induzierbare Protein-Expression in *E. coli*

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das HC110-R Protein wurden 20 drei HC110-R Fragmente - die komplette HC110-R cDNA, das N-terminale Ende ohne TM-Domänen und das C-terminale Ende nach der 7. TM-Domäne - in den Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Leek, NL) kloniert und so N-terminal mit einem 6xHis-Tag unter Beachtung des Leserasters fusioniert.

25 Der komplette kodierende Bereich von HC110-R wurde mit dem P84_ATG BamHI 5'-Primer 5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC ATG AGG-3' und dem P3121_TGA HindIII 3'-Primer 5'-GCA CTA AGC TTG ACT GAA GCG CAC AAC CTC G-3', der N-Terminus bis zur 1. Transmembrandomäne wurde mit den Primern P84_ATG BamHI 5'-Primer (s. o.) und dem P1434_TGA HindIII 3'-Primer 30 5'-GGC TCA AGC TTA TCA GAG AAC AAG CGA CAC GGC-3', und der C-Terminus beginnend nach der 7. Transmembrandomäne wurde mit dem P2486_ATG

BamHI 5'-Primer 5'-CTA TCG GAT CCC AAC ATG GCT GGC TCC CGT GAT
ACC TCT AGG-3' und dem P3121_TGA HindIII 3'-Primer (s. o.) amplifiziert. Die
Annealingtemperatur betrug bei allen drei Plasmid-PCR zunächst über 5 Zyklen
56°C und dann über 30 Zyklen 62°C. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen
5 BamHI und HindIII verdaut und gerichtet in den ebenfalls BamHI / HindIII
linearisierten pRSET B-Expressionsvektor ligiert.

In dem pRSET B-Vektor wird die Expression über einen viralen Promoter des
Bakteriophagen T7 kontrolliert. Die Klonierung erfolgte deshalb in dem XL1-Blue *E.*
10 *coli* Stamm, der kein Gen der T7 RNA Polymerase enthält. Das rekombinante Plas-
mid wurde danach in T7 Polymerase exprimierenden BL21(De3)pLysS *E. coli*-Zel-
len transformiert, die zusätzlich das Plasmid pACYC184 enthalten, das über eine
Chloramphenicolresistenz stabilisiert wird, und in geringen Mengen das T7-
Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, exprimieren. Da
15 diese Zellen unter der Kontrolle des lacUV5 Promoters stehen, erfolgt bei IPTG-
Induktion die Expression der T7 RNA Polymerase und damit auch die des Fusions-
proteins.

Eine Einzelkolonie mit dem gewünschten HC110-R Plasmid wurde von einer
20 frischen LB-Platte mit 50 µg / ml Ampicillin und 35 µg / ml Chloramphenicol in
50 ml LB-Medium unter gleichem Selektionsdruck überimpft und ÜN bei 37°C und
280 rpm bis zur stationären Phase geschüttelt. Diese ÜN-Kultur wurde anschließend
auf OD₆₀₀ = 0,3 verdünnt und 100 ml der Kultur bei 37°C und 280 rpm bis zu einer
OD₆₀₀ = 0,6 - 0,5 weitergeschüttelt.

25 1 OD₆₀₀ -Einheit wurde abgenommen, die nicht-induzierten Zellen kurz abzentri-
fugiert und in 150 µl 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, und 50 µl 4xRotiLoad-
Puffer [Roth, Karlsruhe] aufgenommen. Die nicht-induzierte Probe wurde für 2 min
denaturiert, die genomische DNA durch kurze Ultraschallimpulse von wenigen
30 Sekunden im Sonifier B-12 [Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.]

geschert und unlösliche Partikel durch eine 3minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm pelletiert.

Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die 100 ml Kultur für weitere 3 - 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die induzierten Zellen für 15 min bei 5.000 rpm und 4°C (Heraeus-Unterschentrifuge) abzentrifugiert, das Pellet in PBS gewaschen und anschließend in 8 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 3maliges Eintauchen der Zellen in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C. Nach der ersten Stickstoffbehandlung wurden 0,75 mg/ml Lysozym zugesetzt. Nach der letzten Inkubation in flüssigem Stickstoff erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 16°C, gefolgt von kurzen Ultraschallimpulsen zu je 10 sec und einer Abkühlung im Eiswasserbad, bis die Lösung eine wasserähnliche Viskosität aufwies. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C (Beckman J2-21; JS 13.1-Rotor) wurde eine induzierte 150 µl Probe entnommen, mit 50 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth) versetzt und die Induktion des jeweiligen HC110-R Proteinfragmentes zusammen mit der nicht-induzierten Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse mit einem Maus-anti-His-Antikörper überprüft.

Der restliche Überstand wurde für die weitere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie in ein frisches Gefäß überführt und bei - 20°C gelagert.

13. Proteinaufreinigung durch Metall-Affinitätschromatographie

Die Anreicherung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über das N-terminale 6xHis-Tag mit Hilfe des IMAC-Systems ('Immobilized Metal Affinity Chromatography') über TALONspin-Säulen von Clontech [Palo Alto, U.S.A.]. Das Harz der Säule wurde zunächst separat mit 5 Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, äquilibriert, für 4 min bei 3.000 rpm und 4°C sedimentiert und zusammen mit dem HC110-R Protein-Überstand für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Harz 3mal mit dem 10fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer aufgenommen und damit die Säule beladen; diese wurde im folgenden noch 2mal mit dem 3fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer gewaschen, bevor die Elution mit Imidazolhaltigem 8 M-Harnstoff-Lysispuffer in mehreren Fraktionen zu je 150 µl erfolgte. Der Gehalt von Fusionsprotein in den Fraktionen wird durch Gelanalyse und Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt.

10

14. Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie

An dieser Stelle soll beispielhaft die Proteinaufreinigung durch Metall-Affinitätschromatographie beschrieben werden. Die Anreicherung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über das N-terminale 6xHis-Tag mit Hilfe des IMAC-Systems ('Immobilized Metal Affinity Chromatography') über TALONspin-Säulen von Clontech [Palo Alto, U.S.A.]. Das Harz der Säule wurde zunächst separat mit 5 Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, äquilibriert, für 4 min bei 3.000 rpm und 4°C sedimentiert und zusammen mit dem HC-1 Protein-Überstand für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Harz 3mal mit dem 10fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer aufgenommen und damit die Säule beladen; diese wurde im folgenden noch 2mal mit dem 3fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer gewaschen, bevor die Elution mit Imidazolhaltigem 8 M-Harnstoff-Lysispuffer in mehreren Fraktionen zu je 150 µl erfolgte. Der Gehalt von Fusionsprotein in den Fraktionen wird durch Gelanalyse und Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt.

25

15. Aminosäuresequenzanalyse

Zur Überprüfung der deduzierten Aminosäure-Sequenz ausgehend von dem cDNA-full length Klon HC110-R wurde das 3'-Ende bestehend aus 688 bp (Pos. 2486-3182) mit einem vorangestellten Start-Codon und Kozak-Sequenz in den pRSET B-Expressionsvektor kloniert und in kompetenten BL21(DE3)pLysS *E. coli*-Zellen die Expression des 21 kD Proteins (189 AS) durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Das mit einem N-terminalen HisTag versehene Fusionsprotein wurde über eine Talon-Matrix angereichert und mittels Centriconröhrchen aufkonzentriert und entsalzt. Wegen des N-terminalen HisTags wurde eine C-terminale Protein-Ansequenzierung von 1 nM des 21 kD HC110-R Proteins nach dem schrittweisen Schlack-Kumpf-Abbau (Schlack *et al.* 1926) in einer Modifikation von Boyd (Boyd *et al.* 1992) von der Firma TopLab (Martinsried) durchgeführt. Die Sequenzierung der abgespaltenen Aminosäuren erfolgte in einem Aminosäuresequenzierer PROCISE 492 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und wurde mit dem PROCISE C Reversed phase HPLC System, bestehend aus einem ABI 140C Mikrogradienten System und einem ABI 785A UV / VIS Detektor, analysiert und mit der PROCISE C Kontrollsoftware sowie der ABI Data Analysis Software identifiziert.

25 pmol des 21 kD HC110-R Proteins wurden durch 2 % Trypsin (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) bei 37°C über Nacht intern gespalten. Insgesamt wurden vier Peptidfragmente durch einen Vergleich des HC110-R Standardchromatogrammes nach dem Trypsin-Verdau mit dem Chromatogramm des Trypsin-Blankverdaus ausgewählt, um die Sequenzierung von tryptischen Autolyseprodukten auszuschließen. Diese vier Peptidfragmente wurden einer N-terminalen Protein-Ansequenzierung nach dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaues in einer Modifikation nach Hunkapiller *et al.* (1983) durch die Firma TopLab (Martinsried) unterzogen. Die gespaltenen Peptidfragmente wurden mittels HPLC aufgetrennt und fraktioniert. Die auf Immobilon geblottete Peptidfraktion wurde in die Reaktionskammer des Aminosäuresequenzierers PROCISE 492 (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingebracht und die Aminosäuren in einem 140 C-PTH-

Analyser und UV-Detektor 785 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) abgetrennt. Die Aminosäuren wurden quantitativ durch 'Reversed Phase' HPLC erfaßt und über Retentionszeitvergleich mit einem vor der Sequenzanalyse erstellten Standardchromatogramm identifiziert.

5

16. Zellkulturlinien

Die folgenden Zellkulturlinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Braunschweig] bezogen [Drexler *et al.* 1995]:

- | | | |
|----|--|---------------------------|
| 10 | COS-7-Zellen (DSM: ACC 60) | - Affe, Niere |
| | HEK-293-Zellen (ATCC: CRL 1573) | - Human, embryonal, Niere |

17. Kultivierung der verschiedenen Zellkulturlinien

15

Die Kultivierung der adhärennten Zelllinien COS-7 und HEK-293 erfolgte in 110 mm Gewebekulturschalen [Greiner, Solingen] in einem Volumen von 10 ml Medium bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur wurden COS-7- und HEK-293-Zellen in DMEM-Medium kultiviert. Die Medien enthielten 3,024 g/l NaHCO₃, 10 % FCS, 50 U / ml Penicillin, sowie 50 µg/ml Streptomycin und wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Zur Subkultivierung der COS-7-Zellen wurden diese für 2 h bei 4°C gelagert und anschließend mechanisch mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. Die HEK-293-Zellen ließen sich direkt mit einer Glaspipette vom Boden der Kulturschale ablösen.

20

25

18. Transiente und stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Um Fremd-DNA transient in Säuger-Zellen einzubringen, wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz FuGENE 6 von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) eingesetzt (Kurachi *et al.* 1998). Dazu wurden ca. 0,5 - 1,5 x 10⁵ Zellen in 2 ml Medium auf 35 mm große Gewebekulturschalen ausgebracht, in die für die

30

spätere konfokale Laserscanning-Mikroskopie ein steriles, mit 1 % Gelatine beschichtetes Objektträgergläschen gelegt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht kultiviert. Vor der Transfektion wurde noch einmal das Medium gewechselt. Für die Transfektion wurden pro Reaktionsansatz 3 µl FuGENE 6 [Roche Molecular Biochemicals] in 97 µl serumfreiem Medium verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Tropfenweise wurden je 100 µl des verdünnten FuGENE 6 pro Ansatz zu 1-2 µg Plasmid-DNA (0,5-1 µg/µl) pipettiert, vorsichtig gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde der komplette Reaktionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Schale die Transfektionsmischung gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel für 1 - 2 Tage weiterkultiviert. Bei jeder Transfektion wurden folgende 3 Negativkontrollen stets mit durchgeführt: eine 35 mm-Gewebe-
kulturschale mit 0,5 - 1,5 x 10⁵ Zellen wurde nicht transfiziert, einer zweiten Schale wurde zwar DNA, aber kein FuGENE 6 im Transfektionsansatz zugesetzt und einer dritten Schale wurde FuGENE 6, aber keine DNA zugefügt.

Für eine stabile Transfektion wurde das gewünschte Plasmid HC110-R im richtigen Leseraster in den leicht modifizierten Expressionsvektor pSecTag A [Invitrogen, Leek, NL] bzw. pIRESneo [Clontech, Palo Alto, U.S.A.] kloniert. Diese Vektoren tragen ein Resistenzgen als Marker, so daß bei Zugabe von Zeozin bzw. G418 oder Bleomycin 48-72 h nach der transienten Transfektion und bei jedem folgenden Mediumwechsel nur erfolgreich transfizierte Zellen, die das Resistenzgenprodukt dauerhaft exprimieren, überleben. Die optimale Konzentration des Zeozin- bzw. G418-haltigen Selektionsmediums wurde zuvor durch Anlegen einer Verdünnungsreihe für die jeweilige Zelllinie ermittelt.

19. Zelluläre Lokalisation rekombinanter Proteine in Säuger-Zellen

Die vollständige kodierende Region der HC110-R-DNA wurde in die HindIII/SalI-Stelle von *pEGFP-N3* kloniert, um das HC110-R-Protein C-terminal mit GFP (Green Fluorescent Protein) zu verknüpfen. Das 137 kDa große Fusionsprotein wird in

transient transformierten Empfängerzelllinien exprimiert, was durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden kann. Die CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) zeigt, dass das HC110-R-GFP-Fusionsprotein in COS-7 und HEK-293-Zellen im Cytoplasma lokalisiert ist sowie in geringerem Ausmaß auch an der Plasmamembran (siehe auch Abb. 8).

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT ('Confocal Laser Scanning Microscope Unit', Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz des GFP-Proteins sowie des Farbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) wurde bei 488 nm mit einem Argon-Laser, die für Rhodamin, Texas-Rot, Phycoerythrin, Alexa 568, LysoTrackerTMRed DND-99, MitoTrackerTMRed CMX Ros bzw. Propidiumiodid bei 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einer Schichttiefe von 0,5 µm gescannt (Giese *et al.* 1995). Die Auswertung erfolgte mit der AVS Software (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, M.A., U.S.A.) sowie später mit Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0 für Windows.

Das Fusionsprotein findet sich dabei vor allem in sauren Lysosomen, wie die Kolokalisierung mit Hilfe von LysoTrackerTM, eine Probe zur Markierung saurer Organellen, zeigt. Die das HC110-R-Protein enthaltenden Vesikel wurden vermehrt in der Nähe des Nukleus beobachtet. Zur Kontrolle wurden ein Fusionsprotein aus GFP und dem β_2 -adrenergen GPCR aus der Maus hergestellt (Accession Number X155643, Nakada *et al.* 1989), dessen Transfektion im gleichen Verteilungsmuster innerhalb der Zelle resultierte wie im Falle des HC110-R-GFP-Fusionsproteins (Abb. 8).

20. EGFP-Konstrukte für die transiente Expression

Die Vektoren pEGFP C1 und pEGFP N3 (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) wurden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Sal I geschnitten. Die Amplifizierung der

5 HC110-R „full length“ cDNA erfolgte mit dem P83EGFP_ATG HindIII 5'-Primer 5'-GGT AGA AGC TTT TCG GTT TAA TAC CAA CAT GAG G-3' und dem P3057EGFP_o.TGA SalI 3'-Primer 5'-CTG TGT CGA CAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3' bei einer Annealing-Temperatur von 65°C. Das PCR-Produkt wurde

10 anschließend ebenfalls mit den Enzymen Hind III und SalI geschnitten und unter Erzeugung eines offenen Leserasters zwischen die Hind III und SalI-Schnittstellen des jeweiligen Vektors ligiert und transformiert. Das entstehende Fusionsprotein mit dem N-terminalen GFP-Tag wurde GFP-HC110-R, das mit dem C-terminalen EGFP-Tag HC110-R-GFP genannt. Ein β_2 -Adrenerger Rezeptor aus der Maus (Gen Bank Accession Nr.: P18762; Nakada *et al.* 1989) wurde mit einem C-terminalen EGFP-

15 Tag fusioniert, indem die „full length“ cDNA mit dem P117Maus β_2 AR XhoI 5'-Primer 5'-TAC CTC GAG CTG CTA ACC TGC CAG CCA TG-3' und dem P1349Maus β_2 AR EcoRI 3'-Primer 5'-TGT AGA ATT CTT CCT TCC TTG GGA GTC AAC GCT-3' mit einer Annealingtemperatur von 55/60°C amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und in den XhoI – EcoRI

20 linearisierten pEGFP N3 ligiert wurde. Ebenfalls in den XhoI – EcoRI geschnittenen pEGFP N3-Vektor wurde die „full length“ cDNA eines humanen muscarinischen Rezeptors 1 (huM1Rez.; Gen Bank Accession Nr.: Y00508; Allard *et al.* 1987) ligiert, die zuvor mit dem P70HumM1Rez XhoI 5'-Primer 5'-ATA TCT CGA GAG CCC CAC CTA GCC ACC ATG AAC A-3' und dem P1465HumM1Rez EcoRI 3'-

25 Primer 5'-GAC GAA TTC CAT TGG CGG GAG GGA GTG CGG T-3' bei 55/60°C amplifiziert wurde. Die resultierenden Fusionsproteine mit offenem Leseraster wurden Maus β_2 AR-EGFP und huM1Rez-EGFP genannt.

21. HC110-R-MycHis-Tag Konstrukte für die stabile oder transiente Transfektion

- Der Vektor pMyc6xHis leitet sich von dem Vektor pSecTagA [Invitrogen, Leek, NL] durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und SfiI, gefolgt von 'blunting' der Enden und Religation des Vektors. Die codierende Region von HC110-R wurde mit Hilfe der PCR-Primer P83MycTag_ATG BamHI 5'-Primer 5'-ATA GGA TCC TTC GGT TTA ATA CCA ACA TGA GG-3' und P3058MycTag_o.TGA XbaI 3'-Primer 5'-CCT GTC TAG AAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3' bei einer Annealingtemperatur von 56/60°C amplifiziert, mit den Enzymen BamHI und XbaI geschnitten und in den gleichfalls BamHI XbaI linearisierten pMyc6xHis-Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Im folgenden wurden COS-7-Zellen stabil mit dem Konstrukt transfiziert und unter Zeocin-Selektionsdruck gehalten.
- Parallel hierzu wurde die HC110-RMycHis-cDNA mit den Primern P83_ATGNotI-5' 5'-ATA TTG CGG CCG CTT CGG TTT AAT ACC AAC ATG-3' und pMycHis_TGABamHI-3' 5'-CGC GGA TCC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' amplifiziert, nachgeschnitten und in den gleichfalls BamHI und NotI restringierten bicistronischen Expressionsvektor pIRES1neo (GenBank Accession Nr.: U89673) (Clontech, Palo Alto, U.S.A.) ligiert. Der pIRES1neo Vektor enthält zusätzlich eine interne Ribosomen-Bindestelle (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus (ECMV) kurz vor dem Start-ATG des Neomycin-Resistenzgens (Rees *et al.* 1996). Auf diese Weise werden zwei offene Leseraster, das des HC110-R und das des Antibiotika-Resistenzmarkers, von nur einer mRNA mit einem humanen Cytomegalovirus- (CMV-) Promoter translatiert (Jackson *et al.* 1990; Jang *et al.* 1988). Die Selektion erfolgte durch G418 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.) in COS-7- und HEK-293-Zellen.

22. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT ('Confocal Laser Scanning Microscope Unit', Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm mit einem Argon-Laser, bei 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einer Schichttiefe von 0,5 µm gescannt (Giese *et al.* 1995). Die Auswertung erfolgte mit der AVS Software (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, M.A., U.S.A.) sowie später mit Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0 für Windows.

23. Bindungsstudien von α -LTX an HC110-R Fragmente

Proteine (20 µg/Bahn) wurden durch SDS-PAGE (Lammli *et al.*, 1970) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen elektrogeblotted. Im Falle von α -LTX-Bindungs-experimenten wurden die Blots bei Raumtemperatur mit α -LTX bei einer Konzentration von 20 nM in TST für 2h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TST wurde ein anti- α -LTX-Antikörper (aus Kaninchen, Calbiochem-Novabiochem) bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml und ein mit Peroxidase konjugierter und gegen IgG aus Kaninchen gerichteter Antikörper (aus Ziege, Verdünnung: 1:25 000) verwendet. Die Detektion der Antikörper erfolgte in allen Experimenten mit ECL (Amersham-Pharmacia). Siehe auch Abbildung 9.

24. Calcium-Imaging

Die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in transient mit dem HC110-R-EGFP- bzw. β_2 -AR-EGFP-Konstrukt transfizierten COS-7- und HEK293-Zellen mit Hilfe der Calcium-Imaging-Methode gemessen (siehe auch Abb. 11). Je 2 x 10^5 COS-7- und HEK293-Zellen wurden auf ein mit 1 %iger Gelatine beschichtetes 42 mm großes Deckgläschen in 55 mm großen Gewebekulturschalen

mit 5 ml DMEM-Medium (mit 10 % FCS und Pen / Strep) ausgebracht. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Dabei wurden 6 µl FuGENE 6 in 200 µl DMEM-Medium ohne FCS zunächst für 5 min bei RT und
5 nach Zugabe von 4 µg Plasmid-DNA für weitere 15 min bei RT inkubiert, bevor der gesamte Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen pipettiert wurde. Transfiziert wurden Konstrukte des HC110-R ‚full length‘ Klonen mit einem im richtigen Leseraster fusionierten GFP-Tag und die komplette cDNA des β_2 -Adrenergen Rezeptors, die ebenfalls mit einem GFP-Tag am 3‘-Ende versehen
10 worden war. Als Kontrolle dienten 4 µg Plasmid-DNA des reinen pEGFP-N3-Expressionsvektors (Clontech, Heidelberg), sowie nicht-transfizierte Zellen, denen das Transfektionsreagenz FuGENE 6 ohne DNA zugesetzt wurde.

Die Beladung der Zellen mit 1 µM Fura-2 / Acetoxymethylester (Fura-2 / AM) (Sigma, Deisenhofen) erfolgte 48 h nach der Transfektion in einer Na^+ -HBS-Lösung
15 (150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl_2 ; 0,8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 20 mM Glucose; 20 mM Hepes in H_2O , pH 7,3) für 30 min bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach der Inkubation wurden die mit Fura-2 / AM beladenen Zellen in einem Inversmikroskop (Zeiss, Aciort, Germany) und parallel hierzu in einem
20 digitalen ‚Imaging‘-Fluoreszenzmikroskop (PTI) betrachtet und bei einer Wellenlänge von 440 bzw. 490 nm in transfizierte, sowie nicht transfizierte Zellen unterschieden. Durchschnittlich wurden je 5-7 transfizierte und nicht transfizierte Zellen durch das Setzen eines ROI („region of interest“) ausgewählt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 340 nm (Calcium-gebundenes Fura-2 / AM) und 380 nm
25 (freies Fura-2 / AM), die der Emission bei 510 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Image Master 1.x-Software durch Bildung des Quotienten von 340:510 nm, 380:510 nm und des Ratio von 340/380:510 nm („background corrected images“) als eine Funktion des zugefügten Agens.

30 Die Zugabe von Agentien erfolgte stets 6 min nach Beginn der Messung durch Abnahme eines entsprechenden Volumens Na^+ -HBS-Puffer und direktes Zupipettieren

der Agentien in das Probengefäß für weitere 30 bis 50 min. Das Gesamtvolumen im Probengefäß betrug während des gesamten Versuches konstant 1,5 ml. Zu den das Fusionsprotein HC110-R-GFP exprimierenden COS-7-Zellen wurden zunächst 30 nM und 75 nM α -Latrotoxin (α -LTX, RBI, Natick, U.S.A.), zu den HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen wurden zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit verschiedene Konzentrationen an α -LTX (7,5 nM; 25 nM; 50 nM, 75 nM, 90 nM und 120 nM), bzw. zur Ermittlung der optimalen Wirkkonzentration verschiedene Konzentrationen des zyklischen Depsipeptids BAY 44-4400 (100 ng/ml (89,3 nM), 333 ng / ml (297 nM); 400 ng / ml (357 nM), 1 μ g/ml (893 nM), 10 μ g/ml (8,9 μ M) in 0,1 % DMSO) jeweils 6 min nach Versuchsbeginn zugesetzt. In einigen Experimenten wurden die HEK-293-Zellen für 90 min mit 4 bzw. 400 ng/ml BAY 44-4400, bzw. mit 4 bzw. 400 ng / ml des anthelmintisch inaktiven optischen Antipoden PF1022-001 in Na^+ -HBS bei 37°C, 5 % CO_2 und 97 % Luftfeuchte vorinkubiert und die Zellen nach 60 min durch Zusetzen von 1 μ M Fura-2/AM zur BAY 44-4400-Lösung, bzw. zum PF1022-001, während der restlichen 30 min beladen. Nach dem Einbringen der Zellen in die Apparatur wurden auch hier 6 min nach Versuchsbeginn 75 nM α -LTX zugesetzt. An HEK-293-Zellen, die den β_2 -Adrenergen Rezeptor mit C-terminalem GFP-Tag (β_2 -R-GFP) exprimieren, wurde die optimale α -LTX-Konzentration von 75 nM ausgetestet. CdCl_2 (je 1 μ M und 10 μ M) wurden in Na^+ -HBS, Nifedipin (15 μ M) und EGTA (2 mM) in 0,1 % DMSO gelöst. Die Zugabe von CdCl_2 und Nifedipin erfolgte direkt zu Versuchsbeginn und vor α -LTX-Zugabe, EGTA wurde sowohl zu Versuchsbeginn, als auch 4 min nach α -LTX-Zugabe. Gelöstes α -LTX lag in einer Konzentration von 300 nM in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, vor; BAY 44-4400 wurde zunächst in reinem DMSO (Stammlösungen zwischen 0,004-10 μ g/ml) gelöst. Die Stammlösungen wurden in dem Na^+ -HBS-Puffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die maximal lösliche Menge des Wirkstoffes BAY 44-4400 bei einer Endkonzentration von 0,1 % DMSO wurde durch Anlegen einer Verdünnungsreihe in Na^+ -HBS ermittelt. Weder 0,1 % DMSO noch eine andere Testkomponente interagiert bei den gewählten Konzentrationen mit Fura-2 / AM.

Die Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 98 ausgewertet. Die Ergebnisse resultieren aus wenigstens 2 - 4 reproduzierten Versuchen zu je 4-8 transfizierten und nicht-transfizierten Zellen.

- 5 Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde nach Grynkiewicz et al. (1985) nach vorausgehende Kalibrierung gemäß McCormack *et al.* (1991) berechnet.

25. Bindung von PF1022A an HC110-R

- 10 Im Folgenden soll die Bindung von PF1022A und dem Morpholin-Derivat BAY44-4400 an HC110-R durch SDS-PAGE, Liganden-Präzipitation und analytische Durchflußcytometrie gezeigt werden. Außerdem soll überprüft werden, ob PF1022A und seine Derivate - ähnlich wie α -LTX - zu Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen führen oder aber das HC110-R vermittelte α -LTX-
15 'Signalling' beeinflussen.

- Gelegentlich zeigen Antikörper oder Proteine, die in der Immunfluoreszenz deutliche Signale geben, keine Reaktion bei der Anwendung des Immunoblot-Verfahrens. Da zur Durchführung der SDS-PAGE eine Denaturierung der Proteine notwendig ist,
20 kommt es gegebenenfalls zu einer Zerstörung konformationsabhängiger Epitope. Antikörper oder Proteine, die spezifisch solche Epitope erkennen, können deshalb nicht mehr binden. So kann auch weder mit dem biotinylierten Wirkstoff PF1022A, noch mit dem im Vergleich zum PF1022A besser löslichen Morpholin-Derivat BAY44-4400 eine HC110-R spezifische Bindung im Western Blot ausgemacht
25 werden. BAY44-4400 unterscheidet sich von PF1022A durch 2 Morpholin-Reste, die kovalent an die Phenylringe der beiden D-Phenylactyl-Reste von PF1022A gebunden sind. Renaturiert man die Proteine im SDS-Trenngel jedoch mit Hilfe von Harnstoff, der durch Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen eine partielle Entfernung des SDS bewirkt, so kann im Western Blot eine HC110-R spezifische
30 Bindung nachgewiesen werden. Hierzu wurde Gesamtprotein aus nicht transfizierten, aus HC110-R-Myc/His transient exprimierenden HEK-293-Zellen sowie aus dem in

E. coli exprimierten 54 kDa großen N- und dem 21 kDa großen C-Terminus von HC110-R durch SDS-PAGE aufgetrennt, renaturiert und wie gewohnt geblottet. Die Immundetektion erfolgte nach der Inkubation mit dem Liganden BAY44-4400, mit einem Kaninchen-anti-PF1022A-KLH-Immunsereum und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper. Ferner wurde ein partiell renaturiertes SDS-Polyacrylamidgel mit den Proteinfractionen nicht transfizierter, HC110-R-Myc/His transient transfizierter HEK-293-Zellen sowie dem in *E. coli* exprimierten N-Terminus von HC110-R und Gesamtprotein aus *H. contortus* geblottet, mit PF1022A-Biotin inkubiert und über Streptavidin-HRP detektiert. Beide Blots wiesen je eine distinkte 116 kDa große Bande in den HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen auf, wohingegen die Spuren mit nicht transfizierten Zellen keine Bande in dieser Höhe aufwiesen. Ferner banden sowohl das Morpholinderivat BAY44-4400, als auch das biotinylierte PF1022A an den 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R, der 21 kDa große C-Terminus zeigte keine spezifische PF1022A-Bindung. Durch das biotinylierte PF1022A konnten in der Gesamt-Proteinfraction adulter *H. contortus* Nematoden insgesamt 2 Banden detektiert werden: Eine 110 kDa große Bande und eine weitere ca. 88 kDa große Bande. Bei letzterer handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein biotinyliertes Protein, wie es bereits für den Nematoden *Heterakis spumosa* mit 83 kDa beschrieben wurde, zumal es im Gegensatz zu der 110 kDa großen Bande selbst dann detektiert wird, wenn der Nachweis ausschließlich über Streptavidin-HRP erfolgt. HC110-R-Myc/His stabil transfizierte HEK-293-Zellen weisen dagegen allein unter Streptavidin-HRP keine 116 kDa große Bande mehr auf. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass der verwendete Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Sekundärantikörper allein unspezifische Signale verursacht.

Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde folgende Liganden-Präzipitation durchgeführt. Je 2 mg und 4 mg magnetische Dynal M-280-Streptavidin-gekoppelte Beads wurden mit 500 µg biotinyliertem PF1022A versetzt. Einem Kontrollansatz mit 4 mg Dynal-Beads wurde TST-Puffer anstelle von PF1022A zugesetzt. Überschüssiges PF1022A-Biotin wurde durch magnetische Separation entfernt, bevor ein

- Gemisch aus den in *E. coli* exprimierten und zuvor über Affinitätschromatographie aufgereinigten HC110-R N- und C-Terminus zugegeben wurde. Nach erneuter magnetischer Separation zur Abtrennung nicht gebundener HC110-R-Fragmente wurde je ein Aliquot ausgehend von 2 mg und 4 mg Dynal-Beads über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion des Präzipitates erfolgte über das N-terminal fusionierte His-Tag mit einem Maus-anti-His IgG- und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Antikörper. Nur die N-terminale 54 kDa große Region von HC110-R wird durch PF1022A präzipitiert, folglich wird der nicht an PF1022A gebundene C-Terminus von HC110-R zuvor durch magnetische Separation entfernt. Unspezifische Bindungen des N- oder C-Terminus von HC110-R an die Streptavidin-gekoppelten Beads wurden ausgeschlossen, indem einem Reaktionsansatz kein biotinyliertes PF1022A zugesetzt wurde.
- Die Bindung des Liganden PF1022A *in vivo* an HC110-R wurde außerdem mit Hilfe der FACS-Analyse überprüft (Abb. 13). Hierzu wurden in Dreifach-Ansätzen HEK-293-Zellen transient mit HC110-R-GFP oder GFP-HC110-R transfiziert oder aber transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte sowie transient mit dem β_2 -R-GFP oder dem M1-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen eingesetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit biotinyliertem PF1022A inkubiert und PF1022A-gebundene Zellen über Streptavidin-Phycoerythrin detektiert und abschließend fixiert. Eine Negativkontrolle HC110-R-GFP transfizierter Zellen wurde ohne PF1022A-Biotin nur mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert.
- Die Fluoreszenzanalyse von je 10000 HEK-293-Zellen erfolgte mit dem FACScan bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzfärbung. Phycoerythrin besitzt - wie auch TRITC - ein mit EGFP überlappendes Absorptionsspektrum bei ausreichend getrennten Emissionsspektren, so daß beide Fluorochrome bei nur einer Wellenlänge angeregt werden können. Zelltrümmer wurden durch das Setzen eines 'Gate' auf die Haupt-Zellpopulation von der Messung der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Zur quantitativen

Auswertung wurden die Grenzen für negative, ungefärbte und positive, GFP-fluoreszierende Zellen anhand der nicht transfizierten und mit GFP transfizierten Zellen festgelegt. Die 4,6 % grünfluoreszierenden, nicht transfizierten HEK-293-Zellen (Autofluoreszenz) wurden von den anderen GFP-fluoreszierenden Proben abgezogen; und der Wert für die unspezifische Färbung der Zellen durch das mit Phycoerythrin gekoppelte Streptavidin (5,4 %) wurde von allen rotfluoreszierenden Zellen abgezogen (Tab. 1).

Tabelle 1: Nachweis der PF1022A-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen durch FACScan

Plasmid	GFP-Fluoreszenz	Phycoerythrin-Fluoreszenz
nicht transfiziert	0 ± 0 %	0 ± 0 %
GFP	17,0 ± 0,5 %	1,3 ± 0,4 %
HC110-R-GFP	10,9 ± 0,2 %	4,5 ± 0,4 %
GFP-HC110-R	9,4 ± 2,5 %	2,5 ± 0,3 %
β ₂ -R-GFP	7,6 ± 0,4 %	0,8 ± 0,1 %
M1-R-GFP	8,2 ± 0,7 %	1,6 ± 0,1 %
HC110-R-Myc/His + GFP	23,1 ± 2,3 %	10,3 ± 0,7 %

5 Berechnet man den prozentualen Anteil der grünfluoreszierenden Zellen, die nach Abzug der Autofluoreszenz bzw. der unspezifischen Rotfärbung durch Streptavidin-Phycoerythrin auch rotfluoreszierend waren, so binden 41,2 % der HC110-R-GFP exprimierenden Zellen, 26,8 % der GFP-HC110-R exprimierenden Zellen sowie 44,5 % der mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierten Zellen PF1022A, da-
 10 gegen binden nur 7,5 % der GFP exprimierenden Zellen, 9,9 % der β₂-R-GFP exprimierenden Zellen und 19,2 % der M1-R-GFP exprimierenden Zellen PF 1022A (Abb. 13).

15 **26. Wechselwirkungen von PF1022A-Derivaten mit HC110-R vermittelter α-LTX Signaltransduktion**

PF1022A zeigt neuropharmakologische *in vitro* Aktivität zwischen 10⁻⁹-10⁻³ mg/ml je nach Nematodenart. Um eine mögliche Interferenz von PF1022A und seiner Derivate mit HC110-R und dem durch HC110-R vermittelten α-LTX-‘Signalling’
 20 festzustellen, wurde mit Hilfe der Ca²⁺-Imaging-Methode der Einfluß von BAY44-4400, einer besser löslichen Morpholin-Variante von PF1022A, auf HC110-R transient oder stabil exprimierende HEK-293-Zellen untersucht. Zur Kontrolle wurde der *in vitro* wie *in vivo* mehr als 100fach weniger wirksame optische

Antipode zu PF1022A, PF1022-001, eingesetzt. BAY44-4400 und PF1022-001 wurden aufgrund ihrer Hydrophobizität zunächst in reinem DMSO gelöst. Die Stammkonzentration wurde dabei so gewählt, daß im Versuchsansatz stets nur 0,1 % DMSO gegenwärtig waren. Für DMSO-Konzentrationen bis einschließlich 0,1 % konnte in Kontrollversuchen ausgeschlossen werden, daß sie in nicht transfizierten wie HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen zu einer Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse führten (Abb. 14A). Fura-2 beladene nicht transfizierte sowie mit HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden zum einen mit 100, 300 oder 400 ng/ml sowie 1 oder 10 µg/ml BAY44-4400 und zum anderen mit den gleichen Konzentrationen PF1022-001 stimuliert. Bei keiner Konzentration konnte über den gesamten Zeitraum von 50 min eine Ca^{2+} -vermittelte Antwort festgestellt werden. Abb. 14B und C zeigen exemplarisch die Stimulation HC110-R-GFP und M1-R-GFP transfizierter Zellen mit 400 ng/ml BAY44-4400 und PF1022-001. Da die PF1022A-Derivate möglicherweise auch von den Zellen aufgenommen werden und damit sekundär in Signaltransduktionswege eingreifen können und weil die PF1022A-Derivate je nach Parasit längere Zeit im Wurm verweilen, wurden die Zellen in einigen Versuchen für 90 min mit den Derivaten vorinkubiert. Zellen, die für 90 min mit 4 ng/ml oder 400 ng/ml BAY44-4400 oder PF1022-001 vorinkubiert wurden, zeigten keine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 14D). Bei direkter Zugabe von Konzentrationen ab 300 ng/ml BAY44-4400 konnte - im Gegensatz zu dem optischen Antipoden - eine leichte, aber innerhalb weniger Minuten reversible Zellschwellung als unmittelbare Wirkung auf das Anthelmintikum in HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen auf einem Monitor, der die Zellen 40fach vergrößert darstellte, beobachtet werden.

Von Piperazin weiß man neuesten Versuchen zufolge, daß es die Wirkung von PF1022A/BAY44-4400 in *in vitro*- wie *in vivo*-Versuchen mit *Heterakis spumosa* synergistisch verstärkt. Bei gleichzeitiger Gabe von 400 ng/ml BAY44-4400 mit 1 oder 10 µM Piperazin (Abb. 14F) konnte weder in nicht transfizierten, noch in HC110-R-GFP transient transfizierten HEK-293-Zellen eine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festgestellt werden. Der Kontrollansatz mit 10 µM Piperazin führte ebenfalls in nicht

transfizierten und HC110-R-GFP transfizierten Zellen zu keiner Veränderung des Ca^{2+} -Haushaltes (Abb. 14E).

Im Gegensatz dazu beeinflussten sowohl BAY44-4400, als auch der optische Antipode PF1022-001, in Anwesenheit von 75 nM α -LTX die α -LTX-induzierte Signaltransduktion von HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 14B-E). In einem Kontrollexperiment, in dem man HC110-R-GFP oder M1-R-GFP transfizierten Zellen 6 min vor der Stimulation mit 75 nM α -LTX 0,1 % DMSO zusetzte, konnte ausgeschlossen werden, daß das für BAY44-4400 und auch PF1022-001 verwendete Lösungsmittel in dieser Konzentration einen Einfluß auf die durch α -LTX induzierte Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausübte. HC110-R-GFP exprimierende Zellen zeigten im Gegensatz zu den M1-R-GFP exprimierenden Zellen nach α -LTX-Zugabe den bereits geschilderten biphasischen Verlauf mit vergleichbaren Werten für $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 15A). Inkubierte man HC110-R-GFP exprimierende Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe mit 4 ng/ml BAY44-4400, so verringerte sich der beschriebene Einfluß des α -LTX auf die Ca^{2+} -Konzentration: Der durch α -LTX induzierte erste kleine Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verschwand und der zweite verzögerte Peak wurde 14 min nach der α -LTX-Zugabe auf $44 \pm 6,0$ nM Ca^{2+} reduziert (Abb. 15B). In Anwesenheit von 4 ng/ml PF1022-001 - die Zugabe erfolgte 6 min vor der Stimulation mit α -LTX - kam es zu einem schnellen sofortigen Anstieg von $103 \pm 11,5$ nM Ca^{2+} (Abb. 15B). Wurde HC110-R-GFP exprimierenden Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe 400 ng/ml BAY44-4400 zugesetzt, kam es - ähnlich wie bei 4 ng/ml BAY44-4400 (Abb. 15B) - zu einer verzögerten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $49 \pm 4,2$ nM nach 23 min, die 8 min später auf ein verglichen mit den Ausgangswerten um $11 \pm 1,4$ nM leicht erhöhtes Plateau absank (Abb. 15C). Setzte man 400 ng/ml PF1022-001 6 min vor der Inkubation mit 75 nM α -LTX zu, so kam es zu einer schnellen Ca^{2+} -Erhöhung um $112 \pm 14,3$ nM Ca^{2+} (Abb. 15C), wie sie bereits bei Zugabe von 4 ng/ml PF1022-001 beobachtet werden konnte (Abb. 15B). In einem anderen Versuchsansatz wurden HC110-R-GFP exprimierende HEK-293-Zellen jeweils mit 4 ng/ml (Abb. 15D) oder 400 ng/ml BAY44-4400 bzw. PF1022-001 (Abb. 15E) für 90 min vorinkubiert.

Nicht gebundener oder aufgenommener Wirkstoff wurde nach der Inkubation und Beladung der Zellen mit Fura-2/AM sorgfältig gewaschen, bevor die Zellen mit 75 nM α -LTX stimuliert wurden. Mit dem optischen Antipoden PF1022-001 vorinkubierte HC110-R transfizierte Zellen zeigten bei 4 ng/ml PF1022-001 eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $102 \pm 6,4$ nM (Abb. 15D) und bei 400 ng/ml eine vergleichbare Erhöhung um $109 \pm 8,4$ nM Ca^{2+} (Abb. 15E). Dieser bereits wenige Minuten nach α -LTX-Zugabe beobachtete Ca^{2+} -Anstieg glich den bereits in Abb. 15B und C beobachteten schnellen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$, als PF1022-001 unmittelbar vor der Stimulation mit α -LTX zugegeben wurde. BAY44-4400 dagegen zeigte unterschiedliche Antworten bezüglich des α -LTX induzierten Ca^{2+} -Einstroms: Wurden HC110-R-GFP exprimierende Zellen mit 4 ng/ml BAY44-4400 für 90 min vorinkubiert, kam es durch α -LTX-Induktion zu einer maximalen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $95 \pm 20,5$ nM bei 10 min, bevor sie auf ein um $23 \pm 2,6$ nM Ca^{2+} erhöhtes ausge-dehtes Plateau absank (Abb. 15D). Bei Vorinkubation mit 400 ng/ml BAY44-4400 kam es nach α -LTX-Stimulation zu einer Ca^{2+} -Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um maximal $65 \pm 7,5$ nM (Abb. 15D), die zudem noch 12 min verzögert gegenüber der Vorinkubation mit 4 ng/ml BAY44-4400 auftrat (Abb. 15C).

Setzte man stabil HC110-R-Myc/His exprimierenden HEK-293-Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe 400 ng/ml BAY44-4400 zu, so wird die beobachtete direkte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $267 \pm 45,8$ nM komplett inhibiert (Abb. 15F). Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von 400 ng/ml PF1022-001 mit einer Ca^{2+} -Erhöhung um $209 \pm 33,4$ nM Ca^{2+} zu keiner signifikanten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 15F).

Um den spezifischen Einfluß von BAY44-4400 auf das α -LTX vermittelte Ca^{2+} -‘Signalling’ in HC110-R exprimierenden Zellen zu zeigen, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt: Zunächst wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen mit 1 mM Carbamylcholin-Chlorid (Carbachol), einem Liganden für muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren, unter An- und Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 stimuliert (Abb. 15G). In beiden Fällen kam es zu einer vergleichbaren sofortigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch endogene, natürliche muscarinische Acetyl-

cholin-Rezeptoren um $58 \pm 8,1$ nM Ca^{2+} für HEK-293-Zellen bei Anwesenheit von BAY44-4400 und um $53 \pm 6,8$ nM Ca^{2+} bei Abwesenheit des Anthelmintikums. Die zusätzliche transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem C-terminal GFP-fusionierten, humanen muscarinischen M1-Acetylcholin-Rezeptor (M1-R-GFP) führte zu einer gegenüber nicht transfizierten Zellen (Abb. 15G) leichten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $89 \pm 5,5$ nM bei An- und um $85 \pm 6,1$ nM Ca^{2+} bei Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (Abb. 15H). Auch konnte kein signifikanter Einfluß von BAY44-4400 auf den M1-R-GPCR beobachtet werden. Stimulierte man in nicht transfizierten HEK-293-Zellen die endogen vorhandenen natürlichen β_2 -adrenergen Rezeptoren mit 1 mM Isoproterenol oder die nicotinischen Rezeptoren mit 1 mM Arecolin - wie bereits für Carbachol beschrieben - unter An- und Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400, so kam es auch hier zu keinem signifikanten Unterschied der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 15I). Isoproterenol induzierte einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $45 \pm 4,7$ nM in An- und eine Zunahme von $48 \pm 5,7$ nM Ca^{2+} in Abwesenheit von BAY44-4400. Infolge der Arecolin-Stimulation kommt es in Anwesenheit von BAY44-4400 zu einer Erhöhung um $28 \pm 4,1$ nM Ca^{2+} , in Abwesenheit des Wirkstoffes um $27 \pm 3,5$ nM Ca^{2+} (Abb. 15I).

27. Gewinnung von Antikörpern

Zur Gewinnung von Antikörpern wurden weibliche NMRI-Mäusen sowie Kaninchen (Chinchilla-Bastarde) eingesetzt. Für die Immunisierung der NMRI-Mäuse wurden 3×15 µg des aufgereinigten 21 kD großen C-terminalen HC110-R Proteinfragmentes in je 100 µl PBS⁻ zusammen mit 100 µl FCA gelöst und an den Tagen 1, 8 und 15 zwei naiven NMRI-Mäusen subkutan gespritzt. Die Blutabnahme und Serumgewinnung erfolgte am Tag 23.

Zur Serumgewinnung wurde das durch Herzpunktion gewonnene Blut zunächst für 1 h bei 37°C und dann für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile zweimal für 10 min bei 3000 rpm und 4°C in der Beckman GPKR-Zentrifuge pelletiert und der Überstand daraufhin für 45 min bei

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 75 -

56°C inaktiviert. Nach einer weiteren 10minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C in der Heraeus Biofuge 15R konnte das Serum abgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

- 5 Zwei Kaninchen wurde nach der ersten Blutentnahme und Gewinnung des Prä-immunserums zunächst 50 µg des C-terminalen 21 kD großen HC110-R Proteins, sowie des 54 kD großen N-terminalen HC110-R Proteins in einer zu gleichen Teilen aus PBS⁻ und FCA bestehenden Suspension subkutan injiziert. Zwei weitere Immunisierungen mit je 100 µg Antigen erfolgten am Tag 31 und Tag 79 nach der ersten
- 10 Immunisierung. Eine erste Blutentnahme wurde am Tag 43 durchgeführt. Eine zweite Blutentnahme und Serumgewinnung erfolgte am Tag 98 nach der ersten Immunisierung.

Beschreibung der Abbildungen**Abbildung 1: HC110-R mRNA und Protein**

- 5 (A) Northern Blot Analyse unter Verwendung von Gesamt-RNA aus *Haemonchus contortus* und der 3,6 kbp cDNA von HC110-R.
- (B) 10% SDS-PAGE-Fluorogramm von *in vitro* translatiertem ³⁵S-markierten HC110-R-Protein. *In vitro*-Translation von 1 µg *in vitro* transkribierter HC110-R mRNA (HC110-R), Negativ-Kontrolle ohne HC110-R mRNA (control), 1 µg Luciferase mRNA als Positiv-Kontrolle (luciferase).

10

Abbildung 2: Full length cDNA-Sequenz von HC110-R und abgeleitete Aminosäuresequenz

- 15 Das Kozak-Motiv (Kozak, 1989) und das Polyadenylierungssignal von HC110-R (GenBank Accession Nr.: AJ272270) sind unterstrichen; das Startkodon in Position 100 ist fett gedruckt. Signalpeptid (Reste 1-21, fett), Lektin-ähnliche Sequenz (Reste 22-125, gepunktet), Thr-Stretch (Reste 128-147, grau unterlegt); Cystein-reicher Bereich der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (Reste 166-221, geschwungene Linie, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); 4-Cys-Region der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (Reste 478-524, gestrichelt, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett);
- 20 die 7 Transmembranregionen (zwischen Resten 563-772, fett und unterstrichen); der Prolin-reiche Stretch (Reste 845-861, grau unterlegt), die PEST-Region (Reste 915-933, grau unterlegt); die N-Glykosylierungsstelle (Reste 26, 499 und 862, fett); die hochkonservierte putative Disulfidbindung des Cys-Cys-Paares
- 25 zwischen Sekretin GPCRs (Position 595 und 666, fett und doppelt unterstrichen).

Abbildung 3: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *H. contortus* HC110-R und *Caenorhabditis elegans* Cosmid-Klons B0457 (CE-B0457; GenBank Accession Nr.: Z54306)

- 5 Signalpeptid (SP, Reste 1-21, fett), Lektin-ähnliche Sequenz (Lektin, Reste 22-125, gepunktet); Thr-Stretch (T-reich, Reste 128-147, grau unterlegt); Cys-reiche Region der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (C-Signatur, Reste 166-221, geschwungene Linie, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); 4-Cys-Motiv der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (4 C-Region, Reste 478-524, gestrichelt, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); die 7 Transmembranregionen (zwischen Resten 536-772, fett und unterstrichen); der Pro-reiche Stretch (P-reich, Reste 845-861, grau unterlegt); die PEST-Region (PEST, Reste 915-933, grau unterlegt); die N-Glykosylierungsstellen (Reste 26, 499 und 862, fett); die hochkonservierte putative Disulfidbindung des Cys-Cys-Paares zwischen Sekretin GPCRs (Position 595 und 666, fett und doppelt unterstrichen). Identische Aminosäuren sind mit Sternchen markiert, sehr nahe miteinander verwandte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt, verwandte Aminosäuren mit einem einzelnen Punkt.
- 10
- 15

Abbildung 4: Alignment des 7-Transmembranrezeptors HC110-R und mehrerer anderer Rezeptoren der Sekretin-Subfamilie

- 20 HC110-R: *Haemonchus contortus* heptahelikaler Orphan-Transmembranrezeptor (Accession Nr.: AJ272270); BTLAT3: *Bos taurus* Latrophilin-3 (mehrere Splicing-Varianten, Accession Nr.: G4164053-G4164075); RNLAT1: *Rattus norvegicus* Latrophilin-1 (Accession Nr.: U78105, U72487); MMEMR1: *Mus musculus* EMR1 Hormonrezeptor Vorläufer (Accession Nr.: Q61549); HSCD97: *Homo sapiens* Leukozyten Aktivierungsantigen CD97 (Accession Nr.: P48960); MMCADH: *M. musculus* Cadherin 7-Transmembranrezeptor-Vorläufer (Accession Nr.: G3800738); XLXRF1: *Xenopus laevis* Corticotropin Releasing Rezeptor-Vorläufer (Accession Nr.: O42602); RNVIP1: *R. norvegicus* vasoaktiver intestinaler Polypeptidrezeptor-Vorläufer 2 (Accession Nr.: Q02643). Die sieben Transmembrandomänen sind grau
- 25
- 30

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 78 -

unterlegt (I-VII) und die hochkonservierte putative Disulfidbindung ist fett dargestellt.

5 Abbildung 5: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des H. contortus HC 110-R und R. norvegicus Latrophilin-1 (GenBank Acc. Nr. U78105, U72487)

Signalpeptid (SP, Reste 1-21, fett), Lektin-ähnliche Sequenz (Lektin, Reste 22-125, gepunktet); Thr-Stretch (T-reich, Reste 128-147, grau unterlegt); Cys-reiche Region
 10 der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (C-Signatur, Reste 166-221, geschwungene Linie, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); 4-Cys-Motiv der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (4 C-Region, Reste 478-524, gestrichelt, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); die 7 Transmembranregionen (zwischen Resten 536-772, fett und unterstrichen); der Pro-reiche Stretch (P-reich, Reste 845-861, grau unterlegt);
 15 die PEST-Region (PEST, Reste 915-933, grau unterlegt); die N-Glykosylierungsstellen (Reste 26, 499 und 862, fett); die hochkonservierte putative Disulfidbindung des Cys-Cys-Paares zwischen Sekretin GPCRs (Position 595 und 666, fett und doppelt unterstrichen). Identische Aminosäuren sind mit Sternchen markiert, sehr
 20 nahe miteinander verwandte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt, verwandte Aminosäuren mit einem einzelnen Punkt.

Abbildung 6: Struktur des HC110-R-Proteins und des Latrophilin-1 der Ratte

- (A) Hydrophobizitätsplot von HC110-R mit der 7-Transmembrandomäne.
 25
 (B) Proteinstruktur von HC110-R mit den folgenden charakteristischen Motiven: Signalsequenz (SP), Lektin-Domäne (lectin), Thr-Stretch (T-stretch), Cys-Motiv (signature), 4-Cys-Region (4C-region), 7-Transmembrandomäne (1-7, schwarz), das Pro-reiche Motiv (P-rich) und die PEST-Sequenz (PEST). Die
 30 putativen Glykosylierungsstellen sind unter dem Diagramm dargestellt (N),

die Cys-Reste der 4C-Region und die beiden konservierten Cys-Reste der putativen Disulfidbindung ebenfalls (dünne Linie ohne Großbuchstaben).

- 5 (C) Proteinstruktur von Latrophilin-1. Latrophilin-1 hat keinen Thr-Stretch, enthält aber ein zusätzliches Olfaktomedin-Bindungsmotiv (olfactomedin), eine Pro-Thr-Region (P-T-Region), eine Linker-Domäne (linker) und eine lange, mehrere Repeats enthaltende Region (long).

Abbildung 7: Expression von HC110-R-GFP in HEK-293 und COS-7-Zellen

10

- (A) Gesamtprotein aus transient mit GFP (GFP) oder HC110-R-GFP (HC110-R) transfizierten sowie nicht transfizierten (n. t.) HEK-293- und COS-7-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion über die Trizol-Methode isoliert.

15

- (B) Gesamtprotein aus transient mit β_2 -R-GFP (β_2 -R) oder M1-R-GFP (M1-R) transfizierten sowie nicht transfizierten (n. t.) HEK-293-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion über die Trizol-Methode isoliert. SDS-Marker-Banden bei 116, 90, 70 und 55 kDa (Marker).

20

Je 20 μ g Gesamtprotein pro Spur wurden über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach dem Blocken in RotiBlock-Lösung über Nacht erfolgte die Immundetektion mit dem monoklonalen Maus-anti-GFP IgG-Primär- (0,4 μ g/ml) und dem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundärantikörper (1:25000) durch das ECL-System.

25

Abbildung 8: Zelluläre Lokalisation von HC110-R und β_2 -R in transfizierten COS-7-Zellen durch CLSM

5 COS-7-Zellen wurden mit HC110-R-GFP und β_2 -R-GFP transfiziert, die beide einen C-terminalen GFP-Tag tragen. Die CLSM wurde 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Der Balken entspricht 10 μ m.

- 10 (A) HC110-R-GFP wird an der Plasmamembran und in cytoplasmischen Kompartimenten exprimiert. In der Nähe des Nukleus kann eine Verdichtung von cytoplasmischen Vesikeln beobachtet werden.
- (B) CLSM-Kolokalisation des grünen HC110-R-GFP-Proteins mit sauren Lysosomen, gefärbt mit LysoTracker Red DND-99 bei 37°C für 1h.
- 15 (C) β_2 -R-GFP transfizierte Zellen zeigen ein ähnliches GFP-Fluoreszenzmuster wie HC110-R-GFP, bzw. wie unter Punkt (A) beschrieben. Der Rezeptor kann an der Plasmamembran und in Vesikeln lokalisiert werden und kann teilweise mit sauren Lysosomen, gefärbt mit LysoTracker Red DND-99 bei 37°C für 1h, kolokalisiert werden.
- 20 (D) Exprimierter β_2 -R-GFP kolokalisiert teilweise mit dem endoplasmatischen Retikulum, gefärbt mit monoklonalen anti-KDEL-Antikörpern.

Abbildung 9: Bindung von α -Latrotoxin an HC110-R

- 25 (A) 5 μ g Gesamtprotein isolierter *Latrodectus revivensis* Giftdrüsen (1) sowie reines 130 kDa großes α -LTX (2), ferner je 40 μ g Gesamtprotein stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRESneo-Vektor transfizierter HEK-293-Zellen (3), nicht transfizierter Zellen (4) und des in *E. coli* induzierten 54 kDa großen N-Terminus (6) und 21 kDa großen C-Terminus (7)
- 30 von HC110-R wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt,

geblottet und über Nacht geblockt. Die denaturierten Proteine wurden für 2 h mit 20 nM α -LTX inkubiert und mögliche Bindungen von α -LTX mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG- (1:5000), einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper (1:25000) und dem ECL-System detektiert.

5

- (B) Je 40 μ g Gesamtprotein des in *E. coli* induzierten C- (1) und N-Terminus (2) von HC110-R sowie nicht transfizierter (3) und stabil mit HC110-R-Myc/His transfizierter HEK-293-Zellen (4) und adulter *H. contortus* Nematoden (5) wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einem 4 M Harnstoff-haltigem Renaturierungspuffer partiell renaturiert. Der Blot wurde über Nacht geblockt, mit 20 nM reinem α -LTX inkubiert und α -LTX bindende Proteine mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Antikörper (1:5000), Biotin-Protein A (1:100), Streptavidin-Peroxidase (1:3000) und dem ECL-System nachgewiesen.

10

Abbildung 10: Dosisabhängigkeit von α -LTX auf das HC110-R-vermittelte Ca^{2+} -Signalling

HEK-293-Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP für 30 min mit 1 μ M Fura-2/AM beladen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 6 min nach Beginn der Messung mit unterschiedlichen α -LTX-Konzentrationen für weitere 44 min. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

15

- 25 (A) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 7,5 nM (schwarze Linie) oder 25 nM α -LTX (graue Linie) stimuliert.
- (B) HC110-R-GFP exprimierenden Zellen wurde 50 nM (graue Linie) oder 75 nM α -LTX (schwarze Linie) zugesetzt.

30

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 82 -

- (C) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 90 nM (graue Linie) oder 120 nM α -LTX (schwarze Linie) stimuliert.
- 5 (D) Auf der Abszisse ist die $[Ca^{2+}]_i$ in nM, auf der Ordinate sind die zur Stimulation von HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen eingesetzten α -LTX-Konzentrationen (0, 7,5, 25, 50, 75, 90 und 120 nM) für den ersten schnellen Peak (1. Peak, graue Linie) und den zweiten verzögerten Peak (2. Peak, schwarze Linie) aufgetragen.
- 10 **Abbildung 11: Ca^{2+} -Imaging von HC110-R transfizierten HEK 293-Zellen**
- (A) C-terminal mit GFP getaggt HC110-R (HC110-R-GFP): schwarze Linie.
N-terminal mit GFP getaggt HC110-R (GFP-HC110-R): graue Linie.
- 15 (B) 75 nM α -LTX mit nicht-transfizierten HEK-293-Zellen (n. t., schwarze Linie) und GFP-transfizierten Zellen (GFP, graue Linie).
- (C) 75 nM α -LTX mit Zellen, die mit C-terminal getaggt humanen M1 muskarinischen Acetylcholinrezeptor (M1-R-GFP, graue Linie) und mit C-terminal getaggt β_2 -adrenergem Acetylcholinrezeptor aus der Maus (β_2 -R-GFP, schwarze Linie) transfiziert wurden.
- 20 (D) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden 6 Minuten vor α -LTX-Zugabe (75 nM) mit 2 mM EGTA behandelt (+EGTA, graue Linie). In der Kontrolle wurde EGTA weggelassen (-EGTA, schwarze Linie).
- 25 (E) 2mM EGTA wurden 10 min nach α -LTX-Zugabe (75 nM) zugesetzt (+EGTA, graue Linie). Dem Kontrollansatz wurde kein EGTA zugesetzt (-EGTA, schwarze Linie).
- 30

- (F) Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierende Zellen (schwarze Linie) über 30 Minuten mit 2 nM EGTA versetzt.

5 **Abbildung 12: Störung der durch α -LTX bedingten Signalübertragung durch BAY44-4400**

HEK-293-Zellen wurden transient mit GFP-getagtem HC110-R-Protein transfiziert und 48 h nach der Transfektion stimuliert (Pfeile). Ca^{2+} -Imaging wurde für 50 Mi-
 10 nuten (Abb. A-D) durchgeführt, Kontrollexperimente mit verschiedenen endogenen natürlichen Rezeptoren nicht-transfizierter HEK-293-Zellen für 20 Minuten. n = Anzahl der Zellen.

- 15 (A) Zugabe von 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder von PF1022-001 (graue Linie) zu den Zellen. Zur Kontrolle wurden die Zellen nach der Zugabe von BAY44-4400 oder PF1022-001 mit Na^+ -HBS-HEPES-Puffer (HBS) behandelt, der auch als Lösungsmittel für die jeweiligen Substanzen diente.
- 20 (B) Durch α -LTX (75 nM) bedingte Signalübertragung in Gegenwart von 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) und PF1022-001 (graue Linie).
- (C) Durch α -LTX bedingte Signalübertragung in Zellen, die für 90 Minuten mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vor-
 25 inkubiert wurden. Die Substanzen wurden vor der Zugabe von α -LTX wieder entfernt.
- (D) Durch α -LTX bedingte Signalübertragung in HC110-R-GFP transfizierten Zellen, die für 90 Minuten mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder
 30 PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert wurden. Die Substanzen wurden vor der Zugabe von α -LTX wieder entfernt.

- (E) Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 mM Carbamylcholinechlorid (Carbachol) für 100 s in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (graue Linie, -BAY44-4400) stimuliert.
- (F) Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 mM Isoproterenol und mit 1 mM Arecolin für jeweils 100 s in An- (400 mg/ml BAY 44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (-BAY44-4400, graue Linie) stimuliert.

Abb. 13: Nachweis der PF1022A-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen durch FACSscan

- Je 5×10^5 nicht transfizierte, transient mit GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP und M1-R-GFP transfizierte sowie transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierte HEK-293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit 0,5 μ g/ml PF1022A-Biotin und Streptavidin-Phycoerythrin (1:300) inkubiert und anschließend fixiert. Als Negativkontrolle wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen ohne PF1022A-Biotin nur mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Nach Abzug der Autofluoreszenz, d. h. der 4,6 % nicht transfizierten Zellen (n. t.) im Grünkanal von allen grün-fluoreszierenden Zellen und der durch Streptavidin-Phycoerythrin bedingten 4,4 % unspezifischen Färbung im Rotkanal wurde der prozentuale Anteil der GFP-fluoreszierenden Zellen (GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP, M1-R-GFP und HC110-R-Myc/His + GFP) ermittelt, die PF1022A gebunden haben (PF1022A-Bindung in %). Die Standardabweichung ergibt sich durch die Bestimmung der Mittelwerte von Dreifach-Ansätzen.

Abb. 14: Einfluß von BAY44-4400 und dem optischen Antipoden PF1022-001 auf das HC110-R vermittelte Ca^{2+} -Signalling

- Die Beladung der Zellen mit 1 μM Fura-2/AM erfolgte in nicht transfizierten HEK-293-Zellen sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP oder M1-R-GFP. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.
- 5
- (A) Nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP transfizierte (HC110-R-GFP, schwarze Linie) Zellen wurden zur Kontrolle nach 6 min mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO in Na^+ -HBS-Puffer versetzt.
- 10
- (B) HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) transfizierte Zellen wurden nach 6 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 stimuliert.
- 15
- (C) Wie (B), HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) transfizierte Zellen wurden nach 6 min mit 400 ng/ml PF1022-001 stimuliert.
- (D) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden für 90 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert und nicht gebundene Substanzen vor der Messung gewaschen.
- 20
- (E) Nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) wurde nach 6 min 10 μM Piperazin zugesetzt.
- 25
- (F) Wie (E), nur wurde nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) nach 6 min ein Gemisch aus 10 μM Piperazin und 400 ng/ml BAY44-4400 verabreicht.
- 30

Abb. 15: Wechselwirkungen des HC110-R vermittelten α -LTX Signalling durch PF1022A-Derivate

- Die Beladung der Zellen mit 1 μ M Fura-2/AM erfolgte in nicht transfizierten HEK-293-Zellen sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP oder M1-R-GFP. Die eingesetzte α -LTX-Menge betrug stets 75 nM. Für die Versuche mit den Kontrollsubstanzen wurden die Zellen mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,6 ml Na⁺-HBS/min umspült. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.
- (A) HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) exprimierende Zellen wurden 6 min vor der α -LTX-Stimulation mit 0,1 % DMSO versetzt, um auszuschließen, daß DMSO Einfluß auf α -LTX induzierte Veränderungen der [Ca²⁺]_i nimmt.
- (B) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden 6 min vor der α -LTX Zugabe mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) versetzt.
- (C) Wie (B), nur wurde HC110-R-GFP exprimierenden Zellen 6 min vor der Stimulation mit α -LTX 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) zugegeben.
- (D) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden für 90 min mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert und nicht gebundene Substanzen vor der Messung entfernt. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach 6 min mit α -LTX.
- (E) Wie (D), nur wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen für 90 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert, nicht gebundene Substanzen vor der Messung entfernt und die

Zellen nach 6 min mit α -LTX stimuliert.

- 5 (F) HC110-R-Myc/His stabil exprimierende Zellen wurden 6 min vor der Zugabe von α -LTX mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) versetzt.
- 10 (G) Zur Kontrolle wurde nicht transfizierten Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 6 min 1 mM Carbamylcholin-Chlorid (Carbachol) für 100 s zugesetzt und wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.
- 15 (H) Wie (G), nur wurden M1-R-GFP transfizierte Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 6 min mit 1 mM Carbachol für 100 s stimuliert und wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.
- 20 (I) Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 3 min für 100 s mit 1 mM Isoproterenol und nach 12 min für 100 s mit 1 mM Arecolin stimuliert. Die Substanzen wurden nach den 100 s wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.

Literatur

1. Allard W.J., Sigal I.S. und Dixon R.A.F. (1987) Sequence of the gene encoding the human M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Res.* 24, 10604.
2. Altschul S.F. und Lipman D.J. (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5509-5513.
3. Appel R.D., Bairoch A. und Hochstrasser D.F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19, 258 – 260.
4. Aviv H. und Lederer P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1408-1412.
5. Bacon K.B., Westwick J. und Camp R.D. (1989) Potent and spezif inhibition of IL-8-, IL-1 alpha- and IL-1 beta- induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165, 349-354.
6. Boyd V.L., Bozzini M., Zon G., Noble R.L. und Mattaliano R.J. (1992) Sequencing of peptides and proteins from the carboxy terminus. *Anal. Biochem.* 206, 344 – 352.
7. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 – 252.
8. Brendel V., Bucher P., Nourbakhsh I.R., Blaisdell B.E. und Karlin S. (1992) Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2002 – 2006.
9. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. und Prasher D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 725 – 728.
10. Chan M.-S. (1997) The global burden of intestinal nematode infections – fifty years on. *Parasitol. Today* 13, 438-443.

11. Chen W., Terada M. und Cheng J.T. (1996) Characterization of subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors in an *Ascaris* muscle preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors. *Parasitol. Res.* 82, 97-101.
- 5 12. Chomczynski P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134-139.
13. Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532 - 534; 536 - 537.
- 10 14. Chomczynski P. und Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA-isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
15. Coombs L.M., Pigott D., Proctor A., Eydmann M., Denner J. und Knowles M.A. (1990) Simultaneous isolation of DNA, RNA, and antigenic protein exhibiting kinase activity from small tumor samples using guanidine isothiocyanate. *Anal. Biochem.* 188, 338 - 343.
- 15 16. Conder G.A., Johnson S.S., Nowakowski D.S., Blake T.E., Dutton F.E., Nelson S.J., Thomas E.M., Davis J.P. und Thompson D.P. (1995) Anthelmintic profile of the cyclodepsipeptide PF1022A in *in vitro* and *in vivo* models. *J. Antibiotics* 48, 820-823.
- 20 17. Davletov B.A., Meunier F.A., Ashton A.C., Matsushita H., Hirst W.D., Lelianova V.G., Wilkin G.P., Dolly J.O. und Ushkaryov Y.A. (1998) Vescicle exocytosis stimulated by α -latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca^{2+} . *EMBO J.* 17, 3909-3920.
- 25 18. Davletov B.A., Shamotienko O.G., Lelianova V.G., Grishin E.V. und Ushkaryov Y.A. Isolation and biochemical characterization of a Ca^{2+} -independent α -latrotoxin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 23239-23245.
19. Drexler H.G., Dirks W., MacLeod R.A.F., Quentmeier H. und Steube K. (eds.) (1995) *DSM Catalogue of Human and Animal Cell Lines*; Fifth Edition, Braunschweig
- 30

20. Jackson R. J., Howell M. T. und Kaminski A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 477 - 483.
21. Devereux J., Haeberli P. und Smithies O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs of VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
22. Fivash M., Towler E.M., Fisher R.J. (1998) Biacore for macromolecular interaction. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 97-101.
23. Fukashe T., Koike T., Chinone S., Akihama S., Iagake H., Takagi M., Shimizu T., Yaguchi T., Sasaki T. und Okada T. (1990) Anthelmintic effects of PF1022A, a new cyclic depsipeptide, on the intestinal parasitic nematodes in dogs and cats. *Proc 110th Meet Jap Soc vet Sci*, 122 (Abstr.).
24. Giese G., Wiegers W., Kubbies M., Scherbarth A. und Traub P. (1995) Okadaic acid co-induces vimentin expression and cell cycle arrest in MPC-11 mouse plasmacytoma cells. *J. Cell. Physiol.* 163, 145 - 154.
25. Gefner G., Meder S., Rink T. und Boheim G. (1996) Ionophore and anthelmintic activity of PF1022A, a cyclooctadepsipeptide, are not related. *Pestic. Sci.* 48, 399-407.
26. Grynkiewicz G., Poenie M.M. und Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440 - 3450.
27. Gyuris J., Golemis E., Chertkov H. und Brent R. (1993) Cdi 1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk 2. *Cell* 75, 791-803.
28. Harder A., Londershausen M. und Mehlhorn H. (1997) The four larval stages and the adults of *Heterakis spumosa* are impaired by the anthelmintic cyclodepsipeptide PF 1022A. *Zbl. Bakteriol.* 286, 212.
29. Henkel A.W. und Sankaranarayanan S. (1999) Mechanisms of α -latrotoxin action. *Cell Tissue Res.* 296, 229-233.
30. Holz G.G. und Habener J.F. (1998) Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121, 177-184.

31. Hunkapiller M.W., Hewick R.M., Dreyer W.J. und Hood L.E. (1983) High sensitivity sequencing with a gas phase sequenator. *Meth. Enzymol.* 91, 399 – 413.
32. Ichchenko, K., Bittner, M.A., Krasnoperov, V., Little, A.R., Chepurny, O., Holz, R.W. und Petrenko, A.G. (1999) A novel ubiquitously expressed α -latrotoxin receptor is a member of the CIRL family of G-protein-coupled receptors. *J. Biological Chem.* 274, 5491-5498.
33. Jackson R.J., Howell M.T. und Kaminski A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 477 – 483.
34. Jang S.K., Krausslich H.G., Nicklin M.J., Duke G.M., Palmenberg A.C. und Wimmer E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J. Virol.* 62, 2636 – 2643.
35. Kachi S., Ishih A. und Terada M. (1994) Effects of PF1022A on *Angiostrongylus cantonensis* staying in the central nervous system of rats and mice. *Jpn. J. Parasitol.* 43, 483-488.
36. Kachi S., Ishih A. und Terada M. (1995) Effects of PF1022A on adult *Angiostrongylus cantonensis* in the pulmonary arteries and larvae migrating into the central nervous system of rats. *Parasitol. Res.* 81, 631-637.
37. Kachi S., Terada M. und Hashimoto H. (1997) Influence of PF1022A on the motility of *Angiostrongylus cantonensis* *in vitro*. *Parasitol. Res.* 83, 578-582.
38. Kachi S., Terada M. und Hashimoto H. (1998) Effects of amorphous and polymorphs of PF1022A, a new antinematode drug, on *Angiostrongylus costaricensis* in mice. *Jpn.J. Pharmacol.* 77, 235-245.
39. Klein R.D. und Geary T.G. (1997) Recombinant microorganisms as tools for high throughput screening for nonantibiotic compounds, *J. Biomol. Screening* 2, 41-49.
40. Krasnoperov V., Bittner M.A., Holz R.W., Chepurny O. und Petrenko A.G. (1999) Structural requirements for α -latrotoxin binding and α -latrotoxin-stimulated secretion. *J. Biological Chem.* 274, 3590-3596.

41. Kozak M. (1989) The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* 108, 229 – 241.
42. Kurachi S., Sze L. und Kurachi K. (1998) Improved Transfection of Hep G2 Cells using FuGENE™ 6 Transfection Reagent. *Biochemica* 3, 43 – 44.
- 5 43. Lämmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
44. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 – 275.
45. Martin R.J. (1997) Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary J.* 154, 11-34.
- 10 46. Martin R.J., Robertson A.P. und Bjorn H. (1997) Target sites of anthelmintics. *Parasitol.* 114, 111-124.
47. Martin R.J., Harder A., Londershausen M. und Jeschke P. (1996) Anthelmintic actions of the cyclic depsipeptide PF1022A and its electrophysiological effects on muscle cells of *Ascaris suum*. *Pestic. Sci.* 48, 343-349.
- 15 48. McCormack J.G. und Cobbold P.H. (1991) Cellular calcium: a practical approach. *The practical approach series, IRL press, Oxford*, 30 – 42.
49. McMaster G.K. und Carmichael G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4835-4838.
- 20 50. Nakada M.T., Haskell K.M., Ecker D.J., Stadel J.M. und Crooke S.T. (1989) Genetic regulation of beta 2-adrenergic receptors in 3T3-L1 fibroblasts. *Biochem. J.* 260, 53 – 59.
- 25 51. Pearson W.R. und Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 85, 2444 – 2448.
52. Pearson und Lipman (1988) Petrenko A.G. (1993) α -Latrotoxin receptor. Implications in nerve terminal function. *FEBS Lett.* 325, 81-85.
53. Plasterk R. H. (1996) The Tc1/mariner transposon family. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 204, 125-143.
- 30

54. Rahman M.A., Ashton A.C., Meunier F.A., Davletov B.A., Dolly J.O. und Ushkaryov Y.A. (1999) Norepinephrine exocytosis stimulated by α -latrotoxin requires both external and stored Ca^{2+} and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 379-386.
- 5 55. Rees S., Coote J., Stables J., Goodson S., Harris S. und Lee M.G. (1996) Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques* 20, 102 – 112.
56. Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory handbook. *Verlag Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*, 7.43-7.45.
- 10 57. Samson-Himmelstjerna G. von, Harder A., Schnieder T., Kalbe J. und Mencke N. (2000) *In vivo* activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A. *Parasitol. Res.* 86, 194-199.
- 15 58. Sasaki T., Takagi M., Yaguchi T., Miyadoh S., Okada T. und Koyama M. (1992) A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J. Antibiotics* 45, 692-697.
59. Schlack P. und Kumpf W. (1926) Über eine neue Methode zur Ermittlung der Konstitution von Peptiden. *Z. Physiol. Chemie Hoppe-Seyler* 154, 125 – 170.
- 20 60. Schmitt-Wrede H.-P., Waldraff A., Krücken J., Harder A. und Wunderlich F. (1999) Characterization of a hexokinase encoding cDNA of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 439-444.
61. Seagar M., Lévêque C., Charvin N., Marquêze B., Martin-Moutot N., Boudier J.A., Boudier J.-L., Shoji-Kasai Y., Sato K. und Takahashi M. (1999) Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 289-297.
- 25 62. Smith T.F. und Waterman M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.
63. Sugita S., Ichchenko K., Khvotchev M. und Südhof T.C. (1998) α -Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. *J. Biological Chem.* 273, 32715-32724.
- 30

64. Tagaki M., Sasaki T., Yaguchi T., Kodama Y., Okada T., Miyadoh S. und Koyama M. (1991) On a new cyclic depsipeptide, PF1022A with anthelmintic effects. *Nippon Nogekagaku Kaishi* 65, 326 (Abstr.).
- 5 65. Terada M. (1992) Neuropharmacological mechanism of action of PF1022A, an antinematode anthelmintic with a new structure of cyclic depsipeptide, on *Angiostrongylus cantonensis* and isolated frog rectus. *Jpn. J. Parasitol.* 41, 1-18.
- 10 66. Terada M., Ishih A., Tungtrongchitr A., Sano M. und Shomura T. (1993) Effects of PF1022A on developing larvae of *Angiostrongylus costaricensis* in mice, with special reference to route, dose and formulation. *Jpn. J. Parasitol.* 42, 199-210.
67. Thomas A.P. und Delaville F. (1991) The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. *IRL Press*, 1-54.
- 15 68. Waller P.J. (1997) Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 72, 391-412.
69. Waller P.J. (1998) International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *Veterinary Parasitology* 73, 155 – 164.
- 20 70. Yang F., Moss L.G. und Phillips G.N. Jr. (1996a.) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14, 1246 – 1251.
71. Yang T.T., Cheng L.Z. und Kain S. R. (1996b) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acid Res.* 24, 4592 – 4593.

WO 02/20830

95

PCT/EP01/09771

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 20.08.2001 11:03:45 AM

0-1	Formular - PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.92 (aktualisiert 01.03.2001)
0-2	Internationales Aktenzeichen.	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34240-WO
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	25
1-2	Zeile	27
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	25 Mai 2000 (25.05.2000)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ ACC2465
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE
2	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
2-1	Seite	25
2-2	Zeile	14
2-3	Angaben betr. Hinterlegung	
2-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Datum der Hinterlegung	25 Mai 2000 (25.05.2000)
2-3-4	Eingangsnummer	DSMZ ACC2464
2-4	Weitere Angaben	KEINE
2-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

WO 02/20830

96

PCT/EP01/09771

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 20.08.2001 11:03:45 AM

2-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE
-----	---	-------

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der Internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	JA
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	N. MAILLIARD

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim Internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

Patentansprüche

1. Verwendung von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Helminthen
zum Identifizieren von anthelminthisch wirksamen Substanzen.
2. Verwendung von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Arthropoden
zum Identifizieren von arthropodizid wirksamen Substanzen.
3. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß Anspruch 1 oder 2, da-
durch gekennzeichnet, dass es sich um G-Protein gekoppelte Transmembran-
rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen handelt.
4. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis
3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Transmembranrezeptoren der
Sekretin-Subfamilie handelt.
5. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1, 3
oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Transmembranrezeptoren
aus Nematoden handelt.
6. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 2 bis
4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Transmembranrezeptoren aus
Akarina handelt.
7. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1
und 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Transmembran-
rezeptor HC110-R aus *Haemonchus contortus* handelt.
8. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis
6, dadurch gekennzeichnet, dass sie zum Transmembranrezeptor HC110-R
homolog sind.

9. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Identifizieren von Calcium-Kanal-Blockern.
- 5 10. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Identifizieren von Calcium-Kanal-Blockern, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um alpha-Latrotoxin bindende Transmembranrezeptoren handelt.
- 10 11. Verwendung von alpha-Latrotoxin als Agonist von Transmembranrezeptoren, gemäß einem der Ansprüche 1, 3 bis 5 und 7.
12. Verwendung von alpha-Latrotoxin als Nematizid.
13. Verwendung von alpha-Latrotoxin in Verfahren zum Identifizieren von nematizid und/oder arthropodizid wirksamen Verbindungen.
- 15 14. Verfahren zur Gewinnung des HC110-R Rezeptors sowie dazu homologer Proteine umfassend die Expression des Polypeptids oder Fragmenten davon in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssystem.
- 20 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein eukaryontisches Expressionssystem handelt.
16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass zur Expression HEK 293- oder COS7-Zellen verwendet werden.
- 25 17. Wirtszellen, die eine transiente Expression des Rezeptors HC110-R sowie dazu homologer Proteine ermöglichen.
- 30 18. Wirtszellen, die eine stabile Expression des Rezeptors HC110-R sowie dazu homologer Proteine ermöglichen.

19. Wirtszellen gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie Aequorin exprimieren.
- 5 20. Wirtszellen gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die stabil transformierte Zelllinie der Hinterlegungsnummer DSM ACC2464 handelt.
- 10 21. Wirtszellen gemäß Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die stabil transformierte Zelllinie der Hinterlegungsnummer DSM ACC2465 handelt.
- 15 22. Vektoren zur stabilen Transformation von Wirtszellen gemäß einem der Ansprüche 18 bis 21 und zur transienten Transformation von Wirtszellen gemäß Anspruch 17.
- 20 23. Vektoren zur stabilen Transformation von Wirtszellen gemäß Anspruch 18 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Vektor pMyc6xHis handelt.
24. Verfahren zum Identifizieren von Agonisten und/oder Antagonisten von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Helminthen und/oder Arthropoden, umfassend die folgenden Schritte:
- 25 a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21 oder von Membranen derselben mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und
- 30

WO 02/20830

100

PCT/EP01/09771

- b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.
25. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, welche die Expression von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Helminthen oder Arthropoden verändern, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,
- b) Bestimmen der Calcium-Kanal-Transmembranrezeptor-Konzentration, und
- c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.
26. Verfahren gemäß Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren der Sekretin-Subfamilie oder Fragmente davon handelt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Transmembranrezeptor HC110-R oder Fragmente davon sowie dazu homologer Proteine handelt.
28. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24, 26 und 27, dadurch gekennzeichnet, dass man die Testsubstanz unter solchen Bedingungen mit dem Transmembranrezeptor in Kontakt bringt, die eine Interaktion der Rezeptormoleküle mit der Testsubstanz gestatten, und dann

WO 02/20830

101

PCT/EP01/09771

- a) die erfolgte Bindung der Testsubstanz detektiert, und
b) die Aktivität des Rezeptormoleküls bei Anwesenheit der Testsubstanz mit dessen Aktivität bei Abwesenheit einer Testsubstanz vergleicht.
- 5 29. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass man ein auf Zellen basierendes Testsystem verwendet.
30. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass man Zellen gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21 verwendet.
- 10 31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass man ein zellfreies Testsystem verwendet.
32. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion einer Testsubstanz mit dem Transmembranrezeptor durch die Verdrängung von daran gebundenem alpha-Latrotoxin detektiert wird.
- 15 33. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion einer Testsubstanz mit dem Transmembranrezeptor durch die Verdrängung von daran gebundenem Nifedipin detektiert wird.
- 20 34. Verwendung von Nifedipin in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 31.
- 25 35. Substanzen, die in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 34 identifiziert werden.
- 30 36. Verwendung von Substanzen gemäß Anspruch 35 zur Herstellung eines Mittels zur Bekämpfung von Helminthen und/oder Arthropoden.

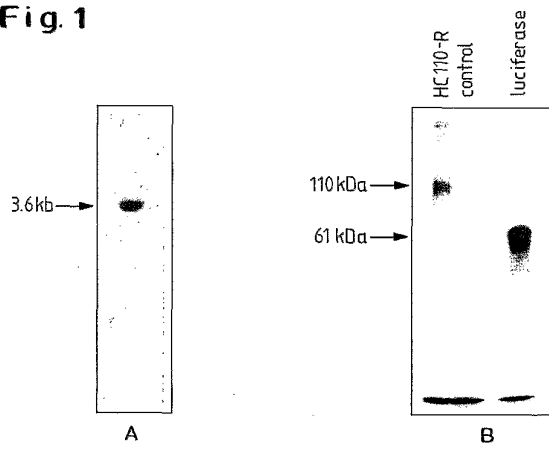
37. Verwendung von Modulatoren des Rezeptors HC110-R sowie dazu homologer Proteine als Anthelminthika und/oder Arthropodizide.
- 5 38. Verwendung der für den Rezeptor HC110-R kodierenden DNA sowie dazu homologer DNA zur Herstellung transgener Invertebraten.
39. Transgene Invertebraten, die den Rezeptor HC110-R oder dazu homologe Proteine enthalten.
- 10 40. Transgene Invertebraten gemäß Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* handelt.
41. Verwendung von DNA-Oligonukleotiden, die spezifisch an die für den Rezeptor HC110-R kodierende DNA hybridisieren, zur Detektion von DNA, die aus Helminthen stammt.
- 15 42. Verfahren zur Detektion von DNA aus Helminthen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 20 a) DNA-Oligonukleotide zur Verfügung stellt, die an die für den Rezeptor HC110-R kodierende DNA oder dazu komplementäre Stränge hybridisieren oder an die 5'- oder 3'- flankierenden Regionen derselben,
- 25 b) die DNA-Oligonukleotide mit einer DNA enthaltenden Probe in Kontakt bringt,
- c) die Hybridisierung des DNA-Oligonukleotids detektiert,
- d) die detektierte Sequenz sequenziert, und
- 30 e) die Sequenz mit der für den Rezeptor HC110-R kodierenden DNA-Sequenz vergleicht.

43. Diagnostischer Testkit umfassend eine für den Rezeptor HC110-R kodierende DNA-Sequenz oder Fragment davon oder dazu homologe DNA-Sequenzen.
44. Diagnostischer Testkit gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass die
5 DNA-Sequenzen mit einem detektierbaren Marker versehen sind.
45. Verwendung des Rezeptors HC110-R oder Fragmenten davon sowie dazu homologer Proteine zur Herstellung von Vakzinen.

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 1 / 24 -

Fig. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

PCT/EP01/09771

Fig. 2

[illegible]

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 3 / 24 -

F P A S R R R R F T F F L V G Y G L P A I I T G A A A Y Y D P 657
ACTGGTTTGGACACGCAATGATTGCTGGTTACGACGCAACCTTTTCATTTTATCTTGTGCGACGAGCTGTGATTACTG 2160
T G F G T R N H Q W L R T D N L F I L F F V A P A A Y I L L 687
ACGAATACGATGTTCTGTTCATGACTATGTGCATTGTATACAGACATTCGAGTATATCCCTGTAGGCATGCTGGCGATATGGAGGT 2250
T H T M F L F M T H C I V Y R H S K Y I P C R R A A D N G G 717
GACATAAGGACTTGGTCAAGGAGCGATGGGTCTGGTCTGTCTACTTGGTGTACATGGACTTGTGGCTTCTCTGGATCGATGATGC 2340
D I R T W V K G A M G L V C L L G V T W T C G L L W I D D G 747
CATTCGATAGTGGATACGGGTTTACCATTTGGGATTTCCCTTCAGGGCTTTTCATCTTGTCTTCCATGTCTGTCTCAGAGAG 2430
H S I V M A Y A F T I A N S L Q G L F I F V F H V L C S E K 777
ATGGCTTACGATATTGCCGATGGTGTGGCAAGCATGGCTTTTCATGTATCAGCTCTGGCTCCCGTATACCTCTAGGGATCTACAAAA 2520
M R Y D I A R W C G K N G L S C I S S G S R D T S R D L Q K 807
CGTGGAACTATGTACCGTCCGAGAGGAGTGGCAGCGAATTCTATCCACATCGGAGAGATGCACACATCTCCCTCGGATTGGAA 2610
R G T M S P S E R S G S E F I Y P T S E K M H T S P R G L E 837
TCTCTCTCAGCTCGGCTTCTCTCAACACCACTCATCCACCACTATCAGCGTCTGCCACCGCAACGCTTAATGGAACTTACTAC 2700
S S L S S A Y [REDACTED] N G T Y D Y 867
GCAACAATTGGCTATGGCGAGATGGTACCGGCCATATGTACACCGCCGCTCTCTGTTCTCTATCCAGGTGTTCGCATCCATTAT 2790
A T I A Y G E M V P G H M L P R M A S S F P H P G V A I H Y 897
CCCTCATTTGATCTGGATTCTCTTACCAACCCAGATCTTCCATCATCGGCTTCCACGAGACTTTTCTCCACCGCCGCTCTCTGCC 2880
P S F D L D S S Y Q P Q I F H H R [REDACTED] 927
CAGGGTACACACCTTCAAAAGTAACTCGTCCCATCATCAAGATGAGTGACGACTCGGCTTATTCGATGGTGGATCTCGTCCGTA 2970
[REDACTED] K V I R P P S S K M S D D S A Y S D G G S S S V 957
CTCACCACGGAAGTACACCGCTCTGGAGGAGTGTGCTTGAATGATTGGGCGAATAACCGCTAATTTGGCGAAATGTTGA 3060
L T T E V T P S G A T V L R M D L G R N Q P P N Y W R N V - 986
GCATGTGTCTCTGTAATGTTTCTCTCGAGAGAGATTTTGGCGAGGTGTGCGCTTTCAGTACGCTTTTATGACGATCCGGGTGCTTTTGC 3150
AATCATTTTGTATGTTGATTTGCTTCTCTCTTGGTATCCAAGGCTTTTCATGCTCTTCCGAGCATCTGTGCACTTTTCTACACTCTAAT 3240
GCTCCAACTGCTTAAATATCAGCATATCATGTCACAATTATGCGCATTTTCTCAGATTACCGGTTTCTTGTACATTTGTGGAT 3330
TGTAGTGTGATGCTAATCTATTCAGAGGTATTTTGTATGATGATTAATAGCCAAATATTGTTTACTATTAAGTACTAA 3420
TTGTTTTTTAAGTCCGATTCCTGCTTATGGAAAAATTTGTTTTGCTTCCATCCGATATCTTTAGGTTGAGATCAATAAA 3510
AACGTAAATTTG (A)_n 3524

Fig. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[illegible]

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 6 / 24 -

Fig. 4

	I	II	
HC110R	TFLTYGCTSTVGLTETFPCEVVIKGGGDRVFIHKNICASLGIAELVFLA----	GIWRTTEK-	592
BTLAT3	DVITWVGHLSVGLLGGCTETCEFGQSDRNTIHKNICISLVAELEFLI----	GINRTDQPI	938
RNLAT1	SVITWVGHLSVGLAATGASITCEFGQSDRNTIHKNICISLVAELEFLI----	GIDKTQYEV	915
MMEMR1	MTISVGHVLSVGLAATAFLICRAVQNHNTIHDHESVCLTAKLEFLI----	GIDKTDNQT	708
HSCD97	DLITRVGLAHLFCGLACIAFLIMRPIQGSRTTHHMLCIGFVASTICLA----	GLENEGQV	515
MMCADH	KTLITVALGVSLAAMMTTEFLTLRALRSNQHGIIRNNTAALGLAQLVELI----	GINQAD-LP	525
XLCRF1	IVINELGHSTSLCALEVAFLISLRHSIRCLRNTHNLTAFLIRNVTAFVQLTSLHEA----	HDSN	184
RNVIP2	KETVLYGYVSLMSITGSLTCEERLHCTRNTHNDFSEMLRAISLVKDSVLYSSSGTLRCHDQF		195
HSGHRH	KIITVGHSTSLVALEVAITLVALRLHCPNNVHTDTEFLKAGAVFLKDAALFHSDDTDHC---	S	196
	--i--vG--iSlvCL-l---f---r-l---rn-iH-nLc--l-la---fl-----gi--t----		
	III	IV	
HC110R	---FECGTAAGCHYFFLSALTMMLEGYQDYMI----	VEVFPASRRRTFF-IVGYGHEALITGAA	653
BTLAT3	A---CAVEPALHFEFLAAPTMALEGVQGYMI----	VEVFESEHSRRKYFIVGYGHEALITVAVSA	999
RNLAT1	A---CPITAGLHYTELAAPSWLCEGVHGMML----	VEVFESEYSRTKYFIVGYGHEALITVAVSA	976
MMEMR1	A---CAITAGLHYTELAAPSWLCEGVHGMML----	VEVFESEYSRTKYFIVGYGHEALITVAVSA	774
HSCD97	G--LACRIAGLHYTELAAPSWLCEGVHGMML----	VRVFGQGLSTRMIDTGYGHEALITVAVSA	578
MMCADH	---FACITVAILLHETATCAPSAGLEALHLYRALTEVROVNA-----	SPMRFYVLCGVPAKITGLAV	587
XLCRF1	VWV---CRIVTAHNTVAVNFMMEGEGYHTAI-----	VLYSTDKLRKMEITGCHGHEALITVAVSA	247
RNVIP2	GSWVGCKLSEVATQYIMENFVILVEGIAHTILL-----	VAILPPSR-CFLAVILHGVGHEALITVAVSA	259
HSGHRH	FSTVLCKVSVAAASHZATMTNESWLAQAVYINCLL-----	ASTSPSSRRFVWVLIAGLGLVLETITVAV	261
	----C---a--lhy-fl--f-WmllEg--Ly--l-----v-vf-----r-----l-Gyg-Pa-i-g--a		
	V		
HC110R	YYDPTGEGTRNHWCWLRDNLTEFL-APPAVILLNTMELMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDI		719
BTLAT3	YYDYSYGTDKVWCWLRDNLTEFL-APPAVILLNTMELMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDI		1063
RNLAT1	YYDYSYGTGKACWLRVDNYELNSEL-APPAVILLNTMELMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDI		1040
MMEMR1	SYQPRGYGMHNRWLNTEGTNSEL-APPAVILLNTMELMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDI		838
HSCD97	LYSYRGYGRPRYCWLDFOGLNSEL-APPAVILLNTMELMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDI		642
MMCADH	SLDPBGYNPOFCWLSNNTLLNSTA-APPAVILLNTMELMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDI		648
XLCRF1	EGKL-YYDNEK-CWPGKAGVYTDITGQVIVLNTNLELNTIRILMTKLR---ASTTS--ETIQY		309
RNVIP2	ATRL-SLEDTG-CWDTNDHSIFW-ATMPHLSSTVNEFELISVIRILLQKLT---SPDVGGNDQSQY		322
HSGHRH	CKL-AFEDIA-CWLDLDTSPYK-ATKGPVIVSYGVNEFELISVIRILVRKLE---PAQGLHTQSQY		324
	-----yg---CwL-----fiw-f---gP---ii--N---l-----		

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 7 / 24 -

	VI	VII	
HC110R	RTWVKGAMGIVGHEVWTCGDLWDDGHSTVMAA--FTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		779
BTLAT3	KSWVTCGALGCHGGLTWARGLMYNES-TVIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		1117
RNLAT1	KSWVTCGALGCHGGLTWARGLMYNES-TVIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		1094
MMENR1	RHHTKATAGCTTCCGQSWVLGIFQIGPL-ASIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		897
HSCD97	RAHTTATAGCTTCCGQSWVLGIFQIGPL-ASIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		701
MMCADH	SG-LRSSTVIRLISATALLALISMSD---TLLSHYHAGCHVCGEMTNSIVXSKVR		706
XLCRF1	RKAVKATVHPLGCTTCCGQSWVLGIFQIGPL-ASIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		371
RNVIP2	KRLAKSTVHPLGCTTCCGQSWVLGIFQIGPL-ASIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		382
HSGHRH	WRLKSTVHPLGCTTCCGQSWVLGIFQIGPL-ASIMAY--LFTIANSTOGHFFVTHVLCSEKMR		384
	----k----ll-LIG-tw--gl-----ay---fti-ns-QG-fif--hc-l---vr		

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 8 / 24 -

Fig. 5

	SP	Lectin	
HC110-R	-----MRNVYILLLSVVGTFPTVAEELPAQSSSIIVVCEGGTALECPHGMVISIAL		51
Latrophilin-1	MARLAAALWSLCVTTVLVTSATQGLSRAGLPFGLMRRELACEGYPIELRCPGSDVIMVEN		60
	* :*: : ** :.***. **.***. ** :		
HC110-R	ANYGRYSARVCYENEELDDVVENTQCHNPKTMTPLRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDCP		111
Latrophilin-1	ANYGRDDDKICDADP---FQMENVCYLPAFKIMSQRNNRTQCWVAGSDAFD-DPCP		116
	***** :*: : **:*.*** : : *.**.*.***.*** *****		
HC110-R	GVKKYLEVTYLCVADVPTPL-----		131
Latrophilin-1	GTWKYLEVQYDCVPYIFVCPGTLQKVLEPTSTHESEHQSGAWCKDPLQAGDRIYVMPWIP		176
	*, ***** ** : . . .		
HC110-R	-----		
Latrophilin-1	YRTDTLLEYASWEDYVAARHTTYYRLPNRVDTGTFVVDGAVFYNKERTRNIVKYDLRTR		236
HC110-R	-----		
Latrophilin-1	IKSGETVINTANYHDTSPYRWGGKTDIDLAVDENGLWVIYATEGNNRGLVVSQNLNPTTLR		296
HC110-R	-----		
Latrophilin-1	FEGTWETGYDKRSASNAFMVCGVLYVLRSVYVDDDDSAAGNRVDYAFNTNANREEPVSLA		356
		T-reich	
HC110-R	-----	-----	141
Latrophilin-1	FNPYQFVSSVDYNPRDNLVWNNYFVVRYSLEFGPPDPSAGPATSPPLSTTTTARPTP		416
		***** :*	
HC110-R	-----	-----TCA	167
Latrophilin-1	LTSTASPAATTPLRRAPLTTHPVGAINQLGPDLPAPATAPSTRPPAPNLHVSPELFCE		476
	***: *		
	C-Signatur		
HC110-R	ATSRRGIEWPATISGTTVNRPCPEGTRGTSSWKCS-AEGLWSEPGNPTECRSDWTIORQ		226
Latrophilin-1	PREVRVQWPATQCGMLVERPCPKGTRGIASFQCLPALGLWNPAGPDLNCTSPWVNQVA		536
	. . * :*.***. * *.***.*** :*: * ***. **: :* * *. *		
HC110-R	DALEETIKDQ-DASGIPELLRAMTSDTRRPMVAGDLPKLLNILDIVQDVVG---REVWAK		282
Latrophilin-1	QKIKSGENAANIASELARHTRGSIYAGDVSSVKLMEQLLDIILDAQLQALRPIERESAGK		596
	: :. : ** :. *. . . :*.*** :. : ** *		

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 9 / 24 -

HC110-R	SSQKLVN-----QLIVNVVHNALR--AKENWQNWPSVKRQTFATRLNGVERAMTS	331
Latrophilin-1	NYNKMHKRETKDYIKAVVETVONLLRPEALESWKDMNATEQVHTATMLLDVLEGAFL	656
	. : * : : : : * : * * * * : : : : * * * : * .	
HC110-R	SSTTVYSSENYVQFLVMTSEISRTSSQPSNYFLFSPMALWAGENNVSDVDPREALM	391
Latrophilin-1	LADNVREPARFLAAQNVLVETVLTSTEGVQELVFPQYASESSQLSANTIK----QN	712
	: * . . : : . : : : : : : * . . : : : : :	
HC110-R	TGLDRARVYYASPANIGEEMPPVEISAGSEQKPTGLERRRIRVSRVAVSLVDGKVIR	451
Latrophilin-1	SRNGVVKVVEILYNNLGLFLSTENATVKLAGEAGTGGPGGASLVVNSQVIAASINKESSR	772
	: . . : * : : * : . : : * : : * : : : : *	
	4 C-Region	
HC110-R	LPILPKPIITFHHPYALRMSSPECSWQTED---MKWSTSCCSLQSHNSTHTVCAC	507
Latrophilin-1	VFLMDPVITFVAHLEAKNHENAN--CSFWYSESRMLGYWSTQGCRLVESNKTHTTCAC	829
	: : : * : * . : . : * : * : : * * * * * . * * * * *	
HC110-R	SHMTFAVIMDYVGHEISSDNQLLTFLTYTGCTLSIVCLTLTFFCFVVEIKGGDRVFI	567
Latrophilin-1	SHLTNFAVLMAREIYQGRINELLVSITWVGIVISLVCLAICTSTFCFLRGLQTRMTI	889
	** : * * * * : . : : * : * : * : * * * : : * : * * *	
HC110-R	HKNLCSAGIARLVLAGIWRTEEFQGMAGCLLYFFLSALTWMLLEGYQLYQMLVEV	627
Latrophilin-1	HKNLCLNLFLELLFLVGIDKQYEVACPIFAGLLHYFLAFAFWCLGCVHLYLLLEVEV	949
	***** : * * * * * * : * : : * * * * * * * : * : * * * * *	
HC110-R	FPASRRRFTFFLVG-YGLPAITGAAAYDPTGFGTRNHCHLRTDNLFLEFVAPAAVIL	686
Latrophilin-1	FESEYSRTKYIYLGGYCFPALVVGIAAIDYRSYGTAKACWLRVDNYFINSEIGPVSEVI	1009
	* : . * : : * * * * : * * * * : * * : * * * * * * : * : * : :	
HC110-R	LNTNMFLEMTMCIVYRHSKYIPCRHAADNGGDIRTWKGMGLVCLLGVYTWTCGLLWIDD	746
Latrophilin-1	VVNLVFLMVTLHKMIRSSSVLKPDSSRLDN--IKSWALGAIALLFLGLTWAFGLLEINK	1067
	: * * * * : : * * : : : : * : * * : * * : * * : * * : *	
HC110-R	GHSIVMAYAFIANSIQGLFIFVPHVLCSEKMYDIARWCGKHGLSCISSG-----	797
Latrophilin-1	-ESVVMAYLFTTFNAFQGVFIEVFHCAQKKVHKEYS-KCLRHSYCCIRSPGGAHGLSK	1125
	: * * * * * * * : * * : * * : : : * : * . * * *	
HC110-R	-SRDTSRLQKRGTMSPSERSGSEFIYPTSEKMHTS-----	832
Latrophilin-1	TSAMRSNTRYITGTQSRIRRMNDTVRKQTESSFMAGDINSTPTLNRCGTGNHLLTNPVL	1185
	* * . * * * * : : : * : . :	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 10 / 24 -

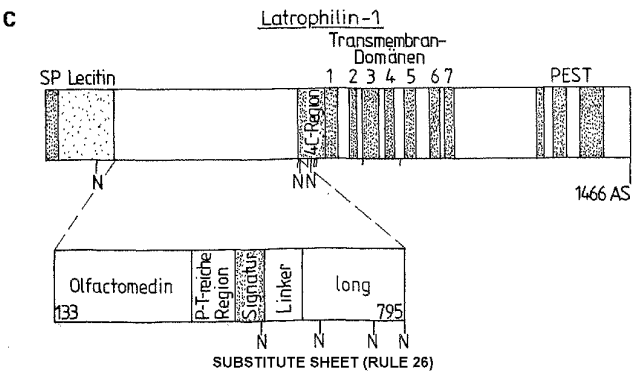
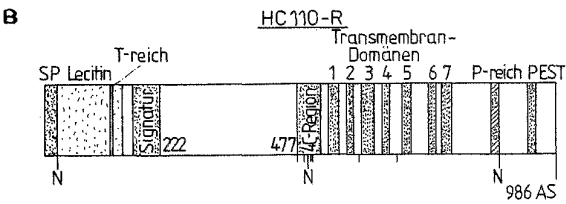
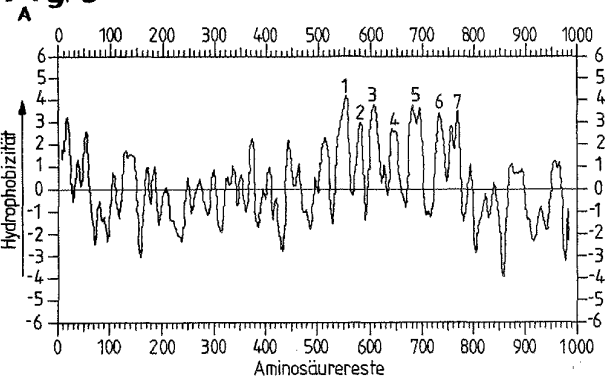
HC110-R P-reich
-PRGLESSLSSAYFQQR-----LTHHYCRPPQPFNG-----T 864
Latrophilin-1 QPRGTSFYNTLIAESVGFNPSSPPVFNSPGSYREPKHPLGGREACQMDTLPLNGFNNS 1245
*** * . : . : . : * * : * * :
PEST
HC110-R YDYATIAVGEMVPGHMLPRMASSFPHPGVAlHYPSFDLDSSYQPIFHHREPPDSEEPD 924
Latrophilin-1 YSLRSGDFPFGDGGPEPPRGNLADAAFEKMIISELVHNNLAGASGAGPPPEPPVPP 1305
* . : : * ** . . . * : . . : : ** . * **
HC110-R PP-----AQTLESKVIKIRPPSSKMSDDSAISD 951
Latrophilin-1 VPGVSEDEAGPGCADRAEIELLYKALEEPLLPRAQSVLYQSDLESESECTAEDGATSR 1365
* ** . . . : . * : : * *
HC110-R GGSSSVLTTEVTESGATVLRMDLGRNQPPNYWRNV----- 986
Latrophilin-1 PLSSPPGRDLSLYASGANLRDSPSYPDSSPEGPNEALPPPPPPAPGPPEIYYTSRPPALWA 1425
** . : : ** . : : * : :
HC110-R -----
Latrophilin-1 RNPLQGYQVRRPSHEGYLAAPSLEGPGDGDGMQLWLSL 1466

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

Fig. 6

- 11 / 24 -



WO 02/20830

PCT/EP01/09771

Fig. 7 - 12 / 24 -

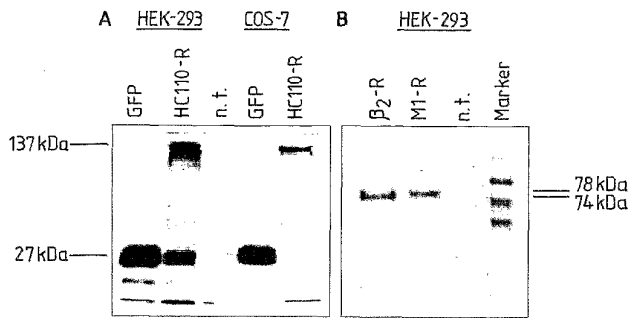
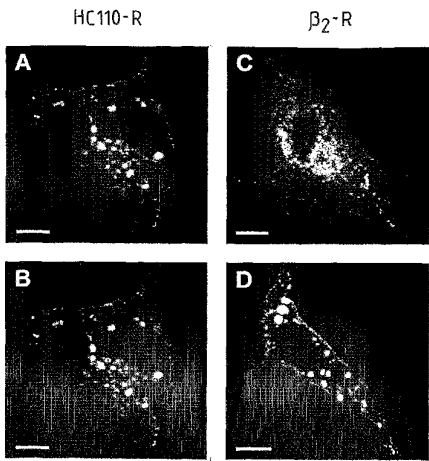


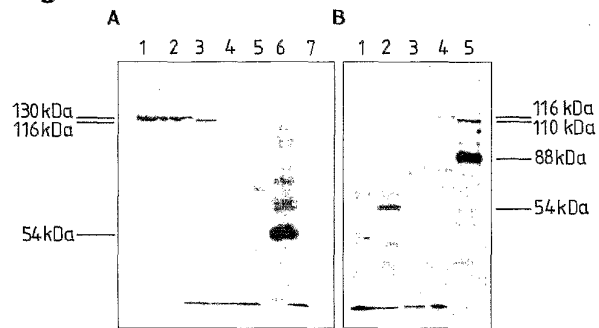
Fig. 8



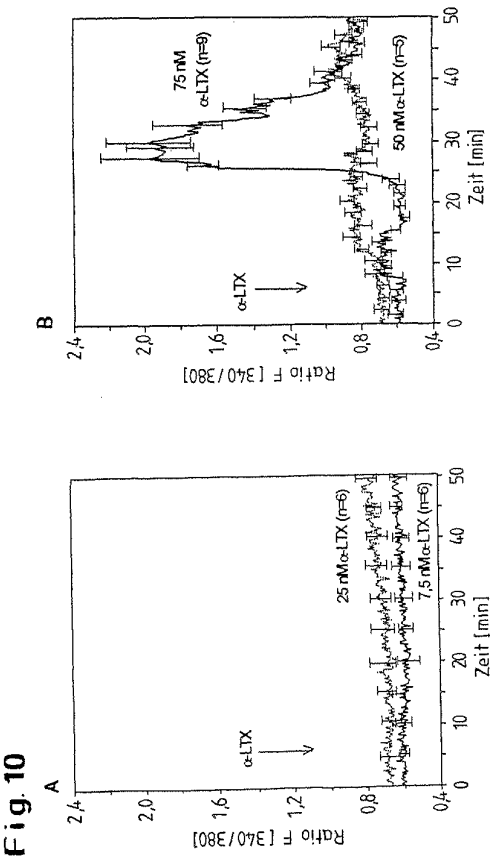
WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 13 / 24 -

Fig. 9

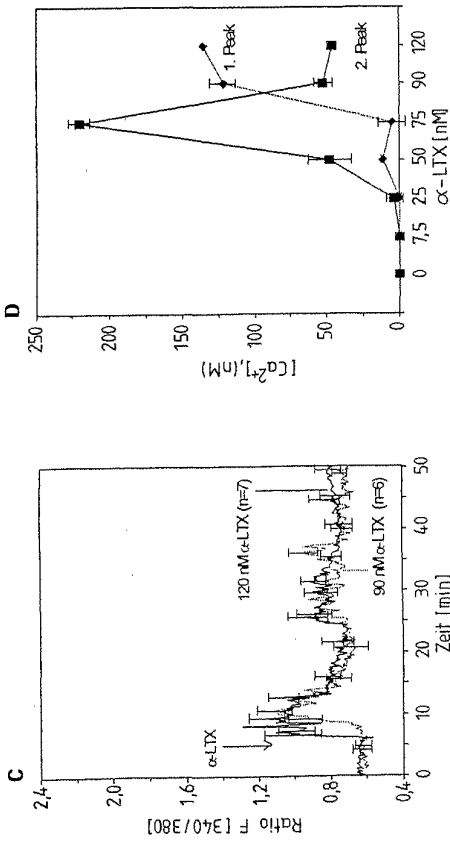
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



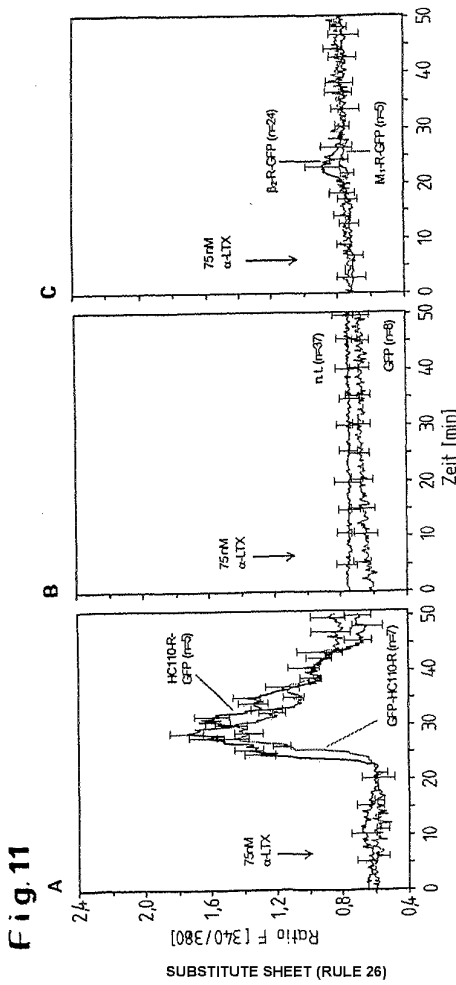
WO 02/20830

PCT/EP01/09771

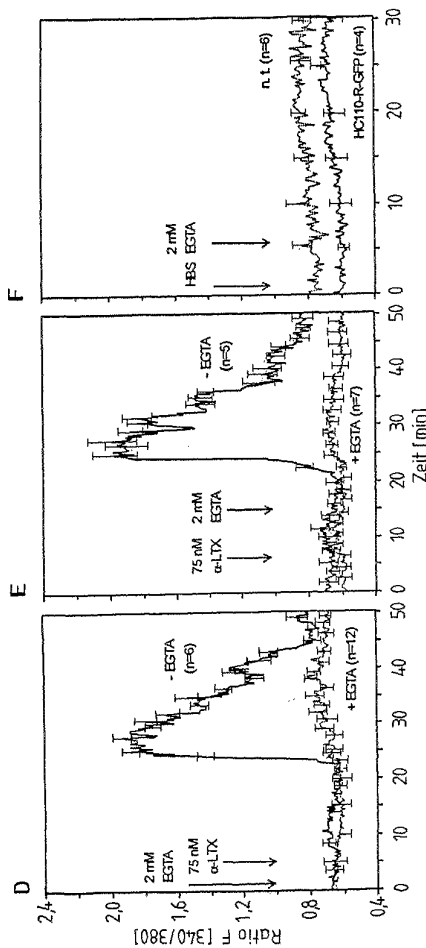
- 15 / 24 -



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



- 17 / 24 -

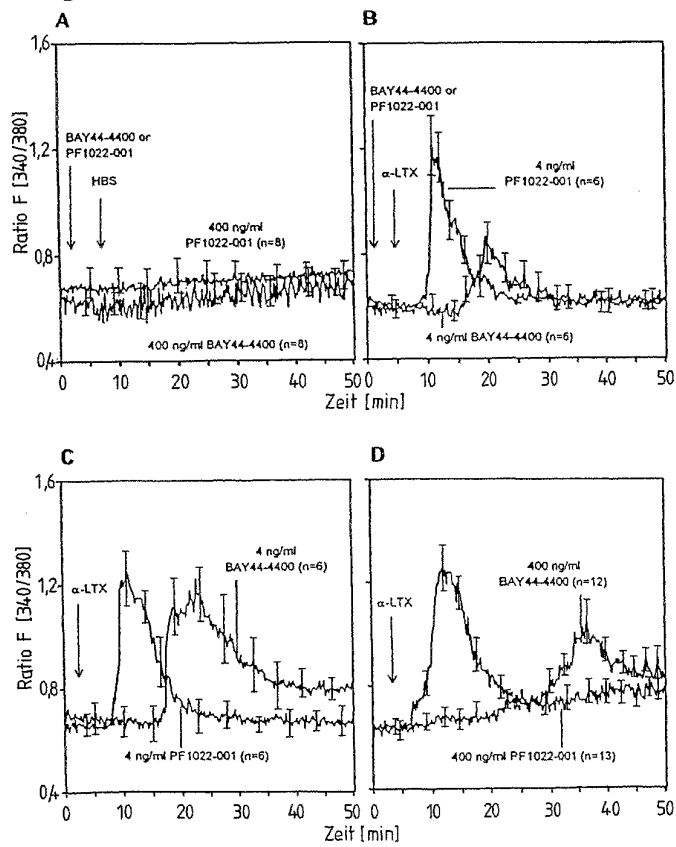


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 18 / 24 -

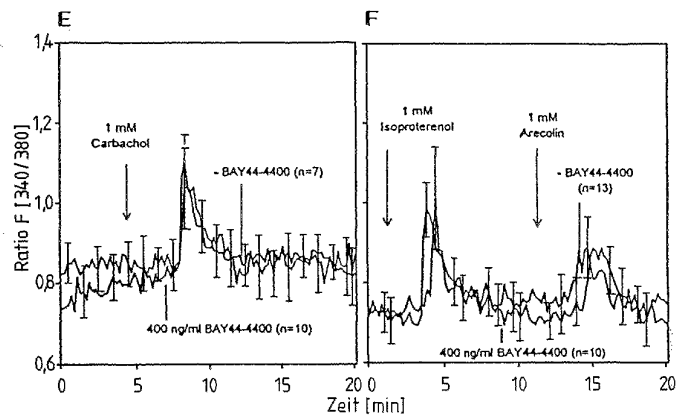
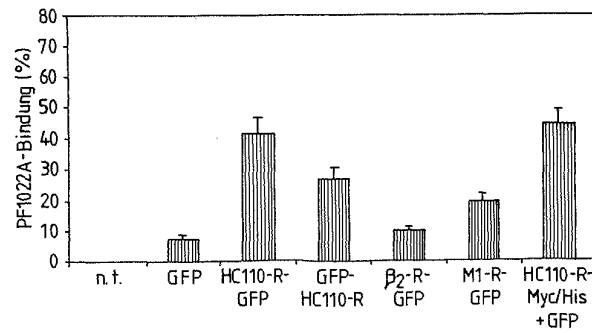
Fig. 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/20830

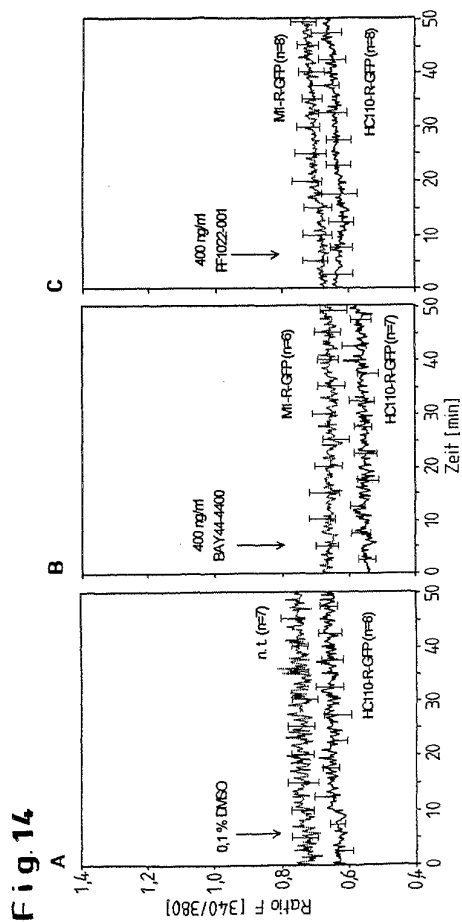
PCT/EP01/09771

- 19 / 24 -

**Fig. 13**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 20 / 24 -



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

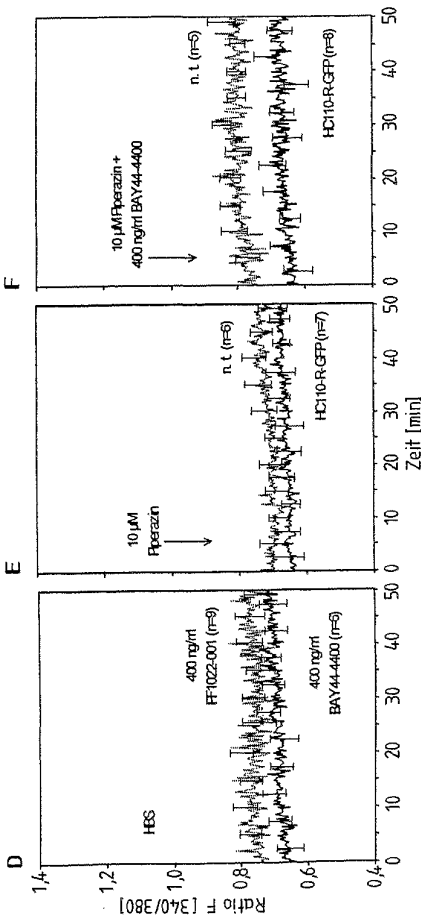
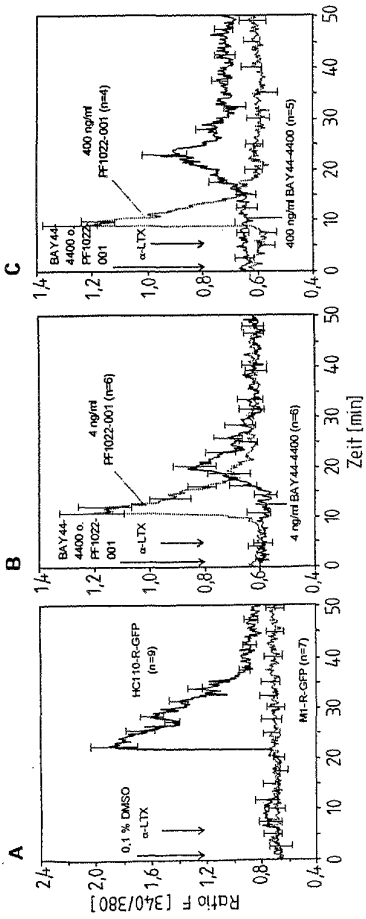
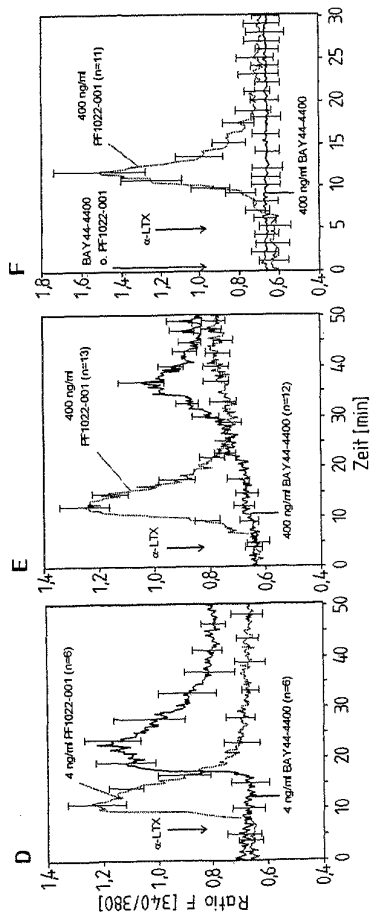


Fig. 15

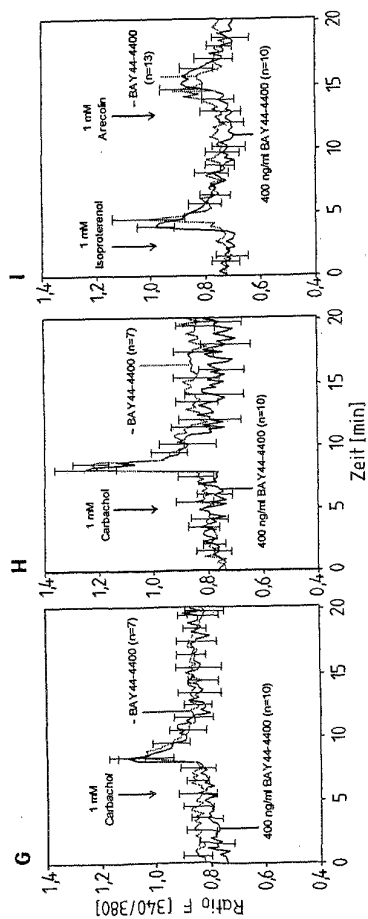




WO 02/20830

PCT/EP01/09771

- 24 / 24 -



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/020830 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/25, (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-
S1A02, 1/68, C12N 15/00, C07K 14/435 SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09771

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. August 2001 (24.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 44 098.3 7. September 2000 (07.09.2000) DE
100 53 785.5 30. Oktober 2000 (30.10.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON SAMSON-HIM-
MELSTJERNA, Georg [DE/DE]; Neuenkamper Str.
21, 42657 Solingen (DE); HARDER, Achim [DE/DE];
Europa Ring 54, 51109 Köln (DE); WUNDERLICH,
Frank [DE/DE]; Burgstr. 31, 41469 Neuss (DE);
SCHMITT-WREDE, Hans-Peter [DE/DE]; An der
Wolfskaul 18, 41812 Erkelenz (DE); SAEGER, Beate
[DE/DE]; Werssoner Feld 48, 40591 Düsseldorf (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 25. Juli 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TEST SYSTEMS BASED ON TRANSMEMBRANE RECEPTORS FROM HELMINTHS AND THE USE THEREOF
FOR IDENTIFYING AND CHARACTERIZING COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: AUF TRANSMEMBRANREZEPTOREN AUS HELMINTHIEN BASIERENDE TESTSYSTEME UND DE-
REN VERWENDUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON VERBINDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to test systems that are based on transmembrane receptors from helminths and arthropods and to their use for identifying and characterizing substances that are effective against helminths, arthropods or that have an effect on the calcium metabolism of organisms and/or cells. The invention further relates to the use of a specific ligand in said test system and to the use thereof as an anthelmintic or arthropod active substance.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft auf Transmembranrezeptoren aus Helminthen und Arthropoden basierende Testsys-
teme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Stoffen mit Wirkungen gegen Helminthen, Arthropoden
oder mit Wirkung auf den Calciumhaushalt von Organismen und/oder Zellen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines
spezifischen Liganden in diesem Testsystem und dessen Verwendung als anthelmintischer oder arthropodizider Wirkstoff.

WO 02/020830 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09771
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/25 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N15/00 C07K14/435		
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 C12Q		
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, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 04 024 A (BAYER AG) 16 April 1998 (1998-04-16) cited in the application page 2, line 31-35 page 8, line 58 -page 9, line 66 figure 2	1,3-10, 14,15, 17,18, 22, 24-31, 41-45
A	US 4 925 664 A (JACKSON J R HUNTER ET AL) 15 May 1990 (1990-05-15) column 1-2 --- -/-	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 April 2002		24/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentsaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Bilang, J

from PCT/ISA(210 second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/09771

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARTIN R J ET AL: "ANTHELMINTICS AND ION-CHANNELS: AFTER A PUNCTURE, USE A PATCH" INTERNATIONAL JOURNAL OF PARASITOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 28, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 849-862, XP000951698 ISSN: 0020-7519 the whole document	
P,X	SAEGER BEATE ET AL: "Latrophilin-1-like receptor from the parasitic nematode Haemonchus contortus as target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A." FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 7, May 2001 (2001-05), pages 1332-1334, XP001069101 ISSN: 0892-6638 the whole document	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP01/09771

FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Claims Nos.: 35-37

Present patent claims 35-37 relate to a product/a compound that is defined by a desired peculiarity or property, namely binding to the HC110R receptor.

The patent claims therefore comprise all products etc. that have this peculiarity or property, while only a limited portion of such products etc. that have this peculiarity or property are supported in the description according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. Regardless of the above, the patent claims also lack clarity under Art. 6 PCT, since they try to define the product/the compound by referring to the desired result. This lack of clarity is so grave that it makes a meaningful search covering the entire scope of protection impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). 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 (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/EP 01/09771

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
DE 19704024	A	16-04-1998	DE	19704024 A1	16-04-1998
			AU	4624997 A	05-05-1998
			WO	9815625 A1	16-04-1998
US 4925664	A	15-05-1990	WO	9309138 A1	13-05-1993
			US	5064657 A	12-11-1991
			US	5281693 A	25-01-1994
			US	5196204 A	23-03-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/09771

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/25 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N15/00 C07K14/435		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 197 04 024 A (BAYER AG) 16. April 1998 (1998-04-16) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 31-35 Seite 8, Zeile 58 -Seite 9, Zeile 66 Abbildung 2	1,3-10, 14,15, 17,18, 22, 24-31, 41-45
A	US 4 925 664 A (JACKSON J R HUNTER ET AL) 15. Mai 1990 (1990-05-15) Spalte 1-2 --- -/-	
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Keine Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* Aktuelles Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die gesprochene, einen Prioritätsanspruch zwelftehaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *C* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der für zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *K* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *V* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nützlich ist *R* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 12. April 2002		Abschlußdatum des internationalen Rechercheberichts 24/04/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Bilang, J

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1999)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Abzeichen
PCT/EP 01/09771

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Klammern kommenden Teile	Beitrag Anspruch Nr.
A	MARTIN R J ET AL: "ANTHELMINTICS AND ION-CHANNELS: AFTER A PUNCTURE, USE A PATCH" INTERNATIONAL JOURNAL OF PARASITOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, Bd. 28, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 849-862, XP000951698 ISSN: 0020-7519 das ganze Dokument	
P,X	SAEGER BEATE ET AL: "Latrophilin-like receptor from the parasitic nematode Haemonchus contortus as target for the anthelmintic depsiptide PF1022A." FASEB JOURNAL, Bd. 15, Nr. 7, Mai 2001 (2001-05), Seiten 1332-1334, XP001069101 ISSN: 0892-6638 das ganze Dokument	1-45

Internationales Aktenzeichen PCTEP 01 09771

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 35-37

Die geltenden Patentansprüche 35-37 beziehen sich auf ein Produkt/eine Verbindung, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Bindung an den HC110R Rezeptor. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehörenInternationales Abkürzungen
PCT/EP 01/09771

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19704024 A	16-04-1998	DE 19704024 A1	16-04-1998
		AU 4624997 A	05-05-1998
		WO 9815625 A1	16-04-1998
US 4925664 A	15-05-1990	WO 9309138 A1	13-05-1993
		US 5064657 A	12-11-1991
		US 5281693 A	25-01-1994
		US 5196204 A	23-03-1993

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 33/10	A 6 1 P 33/10	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 H 0 1 1
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	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	C
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 0 7 K 16/28	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	
	C 0 7 K 16/28	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ウィンドウズ

- (72)発明者 ゲオルク・フォン・ザムゾーヒンメルシュトイエルナ
ドイツ連邦共和国デー 3 0 9 0 0 メッレンドルフ、オルヒデーエンヴェーク 3 2 番
- (72)発明者 アヒム・ハルダー
ドイツ連邦共和国デー 5 1 1 0 9 ケルン、オイローパ・リング 5 4 番
- (72)発明者 フランク・ヴンダーリヒ
ドイツ連邦共和国デー 4 1 4 6 9 ノイス、ブルクシュトラーク 3 1 番
- (72)発明者 ハンス・ペーター・シュミット・グレンデ
ドイツ連邦共和国デー 4 1 8 1 2 エアケレンツ、アン・デア・ヴォルフスカウル 1 8 番
- (72)発明者 ベアテ・ゼーガー
ドイツ連邦共和国デー 4 0 5 9 1 デュッセルドルフ、ヴェルシュテナー・フェルト 4 8 番

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
DB07 FA26 FB02 FB12 GC15
4B024 AA01 BA63 CA04 DA02 EA04 GA11 HA01
4B063 QA18 QQ43 QQ79 QR32 QR55 QS31 QS34
4B065 AA93X AA99Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA45 CA46
4C084 AA02 BA44 DA35 ZB392
4C085 AA03 BB11 DD62
4H011 AC01 BA01 BB21 DA15 DC05
4H045 AA11 CA50 DA75 EA31 FA74