

(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2004-524834

(P2004-524834A)

(43) 公表日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(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	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/417	A 6 1 K 31/417	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/437	A 6 1 K 31/437	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 254 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-559554 (P2002-559554)	(71) 出願人	501281939
(86) (22) 出願日	平成14年1月23日 (2002. 1. 23)		デューク ユニヴァーシティー
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月23日 (2003. 7. 23)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/001701		7708 ダーラム アーウィン ロード
(87) 国際公開番号	W02002/059267		(番地なし)
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002. 8. 1)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	60/263, 406		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成13年1月23日 (2001. 1. 23)	(74) 代理人	100096769
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	10/054, 616	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成14年1月22日 (2002. 1. 22)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	バラック, ラリー・エス
			アメリカ合衆国ノースカロライナ州277
			12, ダーラム, インヴァネス・ドライブ
			5248
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 構成的脱感作Gタンパク質共役受容体

(57) 【要約】

本発明は、修飾Gタンパク質共役受容体(GPCR)類に関する。本発明の修飾GPCR類には、修飾GPCR類が構成的に脱感作されるように変化したDRYモチーフ類を有するように修飾されたGPCR類が含まれる。したがって、本発明の修飾GPCR類は、好ましくは、アゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化する。本発明はまた、修飾GPCR類を使用したGPCR活性に関する化合物およびサンプル溶液をスクリーニングする方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D R Yモチーフを含む単離された修飾 G P C R またはその生物学的に活性なフラグメントであって、該 D R Yモチーフは第 2 位にアルギニン以外のアミノ酸を含むように修飾され、該修飾 G P C R またはその生物学的に活性なフラグメントはアゴニストの非存在下で構成的に脱感作される、単離された修飾 G P C R またはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 2】

前記単離された修飾 G P C R が、アゴニストの非存在下で、アレスチンに結合し、クラスリンコートピットに局在化し、またはエンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中に局在化している請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

10

【請求項 3】

前記単離された修飾 G P C R が図 1 の天然 G P C R に由来する請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

【請求項 4】

前記単離された修飾 G P C R が *H o m o s a p i e n* の G P C R である請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

【請求項 5】

前記単離された修飾 G P C R がクラス A の G P C R である請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

20

【請求項 6】

前記単離された修飾 G P C R がクラス B の G P C R である請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

【請求項 7】

前記単離された修飾 G P C R がオーファン G P C R である請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

【請求項 8】

前記単離された修飾 G P C R が嗅覚 G P C R または味覚 G P C R に由来する請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

【請求項 9】

前記単離された修飾 G P C R が、図 2 B の群から選択される修飾 D R Yモチーフを含む請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R。

30

【請求項 10】

配列番号 1 ~ 6 からなる群から選択されるポリペプチドであって、細胞中で発現した場合、該ポリペプチドはアゴニストの非存在下でアレスチンに結合するポリペプチド。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが修飾 D R Yモチーフを含み、該 D R Yモチーフのアルギニンがアルギニン以外の任意の天然アミノ酸または合成アミノ酸である、図 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 1 ~ 6 からなる群から選択されるポリペプチドであって、細胞中で発現した場合、該ポリペプチドはアゴニストの非存在下でエンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中に局在化される、ポリペプチド。

40

【請求項 13】

請求項 1 に記載の単離された修飾 G P C R またはその生物学的に活性なフラグメントをコードする核酸。

【請求項 14】

配列番号 7 ~ 12 からなる群から選択される核酸。

【請求項 15】

配列番号 1 ~ 6 からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 16】

50

請求項 14 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

a) アゴニストを使用せずにエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化する単離された修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、
 b) 該単離された修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントを基質に結合させるステップと、
 c) 該単離された修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントを候補化合物に曝露するステップと、
 d) 該単離された修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントをアレスチンまたはアレスチンの生物学的に活性なフラグメントに曝露するステップと、
 e) アレスチンタンパク質と GPCR との相互作用が試験化合物への曝露後に減少するかどうかを検出するステップであって、該相互作用の減少が、該化合物が GPCR へのアレスチン結合の阻害活性を有することの指標であるステップと
 を含む、アレスチンへの GPCR の結合を阻害する化合物の識別方法。

10

【請求項 19】

a) アゴニストを使用せずにエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化する単離された修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、
 b) アレスチンと検出可能な分子との抱合体をも発現する細胞中で該修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントを発現させるステップと、
 c) 該細胞を候補化合物に曝露するステップと、
 d) アレスチンタンパク質と GPCR との相互作用が、試験化合物への曝露後に減少するかどうかを検出するステップであって、該相互作用の減少が該化合物が活性を有することの指標であるステップと
 を含む、GPCR のアンタゴニストまたは逆アゴニスト活性について化合物を識別する方法。

20

【請求項 20】

前記修飾 GPCR がクラス A 受容体である請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記修飾 GPCR がクラス B 受容体である請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記修飾 GPCR が嗅覚受容体または味覚受容体である請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記修飾 GPCR がオーファン受容体である請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記修飾 GPCR が検出可能な分子に結合している請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

前記検出可能な分子が放射性同位体、エピトープタグ、アフィニティ標識、酵素、蛍光基、または化学発光基である請求項 19 に記載の方法。

40

【請求項 26】

請求項 18 または請求項 19 に記載の方法によって識別された化合物。

【請求項 27】

治療有効量の請求項 26 に記載の化合物と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む、哺乳動物における GPCR によって媒介される病態の治療のための医薬組成物。

【請求項 28】

図 3 に記載の修飾 GPCR を発現する、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 29】

前記動物がマウスである請求項 28 に記載の動物。

50

【請求項 30】

前記非ヒトトランスジェニック動物が、霊長類、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヤギ、またはヒツジである請求項 28 に記載の動物。

【請求項 31】

修飾 GPCR を認識して結合する抗体を使用して生体サンプルをアッセイするステップと、該抗体が該修飾 GPCR に結合するかどうかを決定するステップとを含む、生体サンプル中での修飾 GPCR の検出方法。

【請求項 32】

(a) 生体サンプルを修飾 GPCR プローブに曝露するステップと、
(b) 該修飾 GPCR プローブが該生体サンプルの核酸に結合するかどうかを決定するステップと
を含む、生体サンプル中の請求項 14 に記載の核酸を検出する方法。 10

【請求項 33】

基質と、式 I のモチーフをコードする 1 つまたは複数の請求項 14 に記載の核酸またはそのフラグメントとを含み、該式 I が修飾 DRY モチーフである、組成物。

【請求項 34】

修飾 GPCR を認識して結合する抗体と、該修飾 GPCR に結合する抗体を検出する試薬とを含む、生体サンプル中の修飾 GPCR を検出するキット。

【請求項 35】

修飾 GPCR を認識して結合する、単離された免疫グロブリン。 20

【請求項 36】

前記免疫グロブリンが、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、または抗体フラグメントである請求項 35 に記載の免疫グロブリン。

【請求項 37】

前記抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(v)、および scFv である請求項 35 に記載の免疫グロブリン。

【請求項 38】

有効量の 2 - エチル - 5 , 7 - ジメチル - 3 - [[2 ' - (1 H - テトラゾル - 5 - イル) [1 , 1 ' - ビフェニル] - 4 - イル] メチル] - 3 H - イミダゾ [4 , 5 - b] ピリジンまたはフェントラミンを、それを必要としている患者に投与することによる、GPCR の構成的脱感作を阻害する方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国特許法第 120 条の下、2001 年 1 月 23 日提出の米国特許出願番号 60 / 263 , 406 号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に関する優先権を主張する。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所の助成金 HL 61365 および NS 19576 の援助を受けているので、政府は本発明に一定の権利を有し得る。 40

【背景技術】

【0003】

本発明は、修飾 G タンパク質共役受容体 (GPCR) に関する。本発明の修飾 GPCR には、タンパク質がアゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化するように変化した DRY モチーフを有するように修飾された GPCR が含まれる。本発明はまた、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームにアゴニストと独立して GPCR が局在化する変異タンパク質を含む。本発明はまた、G タンパク質共役受容体 (GPCR) 活性の検出方法および GPCR 活性のアッセイ方法に関する。本発明は、GPCR 調節経路の成分と相互作用する化合物の識別方法および GPCR のアンタゴニストの識 50

別方法を提供する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、ホルモンまたはリガンド結合を細胞内シグナルに翻訳する細胞表面タンパク質である。GPCRは、これまで研究された全ての動物、昆虫、および植物で見出されている。GPCRシグナル伝達は、光形質導入、嗅覚、神経伝達、血管緊張、心拍出量、消化、疼痛、および流体と電解質とのバランスを含む種々の生理学的機能の調節で極めて重要な役割を果たす。種々の生理学的機能に関連するにもかかわらず、GPCRは多数の共通の構造上の特徴を共有する。GPCRは、細胞内および細胞外ループの変化によって架橋した7回膜貫通ドメインおよび種々の長さの細胞内カルボキシ末端テールを含む。

10

【0005】

GPCRによって制御される生理学的応答の大きさは、GPCRシグナル伝達とシグナル終結との間のバランスに関連する。GPCRのシグナル伝達は、アレスチンと呼ばれる細胞内タンパク質ファミリーによって制御される。アレスチンは、活性化GPCR(アゴニスト活性化されたGPCR、特にGタンパク質共役受容体キナーゼ(GRK)によってリン酸化されたGPCRを含む)に結合する。

【0006】

GPCRを含む受容体は、高い親和性でリガンド、ホルモン、および薬物に結合するので、創薬および治療薬の標的であった。今日使用されている治療薬の約50%がGPCRの標的であるかこれと相互作用する。例えば、Jurgen Drews、2000、「創薬：歴史的観点」、Science、287、1960~1964を参照のこと。

20

【0007】

数百個のヒトGPCRしか知られていないが、千種以上のGPCRがヒトゲノム中に存在する。これら公知のGPCRの多数が、機能またはリガンドとの関連が明らかでないオーファン受容体である。

【0008】

正確で解釈が容易なGタンパク質共役受容体活性の検出方法およびGPCR活性のアッセイ方法が必要である。Barakらの米国特許第5,891,646号および同第6,110,693号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示されている1つの方法は、GPCRを発現する細胞およびアレスチンと検出可能な分子との抱合体を使用する。

30

【0009】

既存のGPCRアンタゴニストの識別方法の大部分は、アゴニストの存在に依存する。GPCRの活性化を防止する化合物の識別アッセイは、典型的には、妨害化合物を識別するためにGPCRを最初に活性化する必要がある。既知のアゴニストを使用する受容体のために、現在、これらのアゴニストを使用してこれらの受容体を活性化する。しかし、多数のGPCRは既知のリガンドおよびアゴニストを使用しないオーファン受容体である。

【0010】

PauschらのWO00/12704に開示されている1つの方法は、活性化リガンドの非存在下で受容体の機能的活性が検出される構成的に活性化した変異を有するGPCRを使用する。Pauschらでは、構成的に活性化受容体を得られるようにGPCRを修飾する。Pauschらの構成的に活性化GPCR変異体は、野生型受容体と比較して固有の活性が高くなっていて、アゴニスト非依存様式で細胞内ヘテロ三量体Gタンパク質と相互作用して活性化する。Pauschらの方法は、アゴニスト非依存性であるが、構成的に活性化GPCR変異体を使用する。

40

【0011】

オーファン受容体のアンタゴニストの発見は、典型的には以前のアゴニストおよびリガンドの発見に依存するので、GPCRアッセイのアゴニスト非依存性は引き続き問題である

50

。したがって、アゴニストに依存していないGPCR活性化のさらなる方法を提供する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、構成的に脱感作された修飾GPCRに関する。

【0013】

本発明の第1の態様は、DRYモチーフを含む修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントである。本発明の修飾GPCRでは、DRYモチーフは、第2位のアルギニン以外のアミノ酸を含むように修飾される。修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントは、アゴニストの非存在下で構成的に脱感作される。本発明の修飾GPCRは、アレスチンに結合するか、クラスリンに局在化するか、アゴニストの非存在下でエンドサイトーシス小胞もしくはエンドソーム中に局在化することができる。修飾GPCRは、天然GPCRに由来し得る。修飾GPCRは、Homo sapiens GPCR、クラスAのGPCR、クラスBのGPCR、オーファンGPCR、または嗅覚GPCRもしくは味覚GPCRであり得る。

10

【0014】

さらなる態様では、本発明は、単離された修飾アレスチンポリペプチドに関する。本発明の単離された修飾アレスチンポリペプチドは、細胞中で発現した場合、構成的に脱感作されたGPCRを産生する。

【0015】

さらなる態様では、本発明は、単離された修飾GRKポリペプチドに関する。単離された修飾GRKポリペプチドは、細胞中で発現した場合、構成的に脱感作されたGPCRを産生する。

20

【0016】

本発明はまた、本明細書中に記載の活性を有し、前述の、およびここに記載する配列番号1～配列番号6から選択されるアミノ酸配列を示す、修飾GPCRタンパク質を含む。細胞中で発現した場合、ポリペプチドはアゴニストの非存在下でアレスチンに結合し、アゴニストの非存在下でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに標的化することができる。ポリペプチドは修飾DRYモチーフを含み、ここで、DRYモチーフのアルギニンは、アルギニン以外の任意の天然アミノ酸または合成アミノ酸である。

30

【0017】

本発明はまた、出願時の請求項1に記載の単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントをコードする核酸に関する。本発明の核酸配列を、配列番号7～配列番号12から選択することができる。

【0018】

本発明は、さらに、本明細書中に記載の核酸配列を含むベクターに関する。核酸を、発現調節配列に作動可能に連結させて、適切な宿主に導入することができる。したがって、本発明は、本発明の修飾GPCRをコードするDNA配列を含むクローン化遺伝子または組換えDNA分子で形質転換した単細胞宿主にまで及ぶ。

【0019】

さらなる態様では、本発明は、組成物、化合物、およびサンプル溶液のスクリーニング方法に関する。これらの方法には、アレスチンのGPCRへの結合を阻害する化合物の識別方法が含まれる。この方法は、a)アゴニストを使用せずにエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化する単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントを調製するステップと、b)前記単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントを基質に結合させるステップと、c)前記単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントを候補化合物に曝露するステップと、d)前記単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性化フラグメントをアレスチンまたはアレスチンの生物学的に活性化フラグメントに曝露するステップと、およびe)前記アレスチンまたはアレスチンの生物学的に活性化フラグメントとの結合が遮断されるかどうかを決定

40

50

するステップとを含む。

【0020】

本発明の方法はまた、アレスチンのアゴニスト非依存様式の局在化を妨害する化合物の識別方法を含む。この方法は、a) 修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、b) 前記修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントをアレスチンもまた発現する細胞中で発現させるステップと、c) 細胞を候補化合物に曝露するステップと、およびd) 前記候補化合物がアレスチンのエンドソーム標的化を阻害するかどうかを決定するステップとを含む。

【0021】

本発明の方法はまた、GPCRアンタゴニスト活性または逆アゴニスト活性を有する化合物の識別方法を含む。この方法は、a) アゴニストを使用せずにエンドソームまたはエンドサイトーシス小胞を標的化する単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、b) アレスチンと検出可能な分子との抱合体をもまた発現する細胞中で前記単離された修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを発現させるステップと、c) 前記細胞を候補化合物に曝露するステップと、およびd) アレスチンタンパク質とGPCRとの相互作用が前記試験化合物との曝露後に減少するかどうかを検出するステップであって、前記相互作用の減少が前記化合物が活性を有することの指標であることを特徴とするステップとを含む。

【0022】

本発明の方法では、修飾GPCRは、クラスA受容体、クラスB受容体、嗅覚受容体もしくは味覚受容体、またはオーファン受容体であり得る。本発明の方法では、アレスチンを検出可能な分子に結合させることができる。本発明の方法では、修飾GPCRを検出可能な分子に結合させることができる。検出可能な分子は、放射性同位体、エピトープタグ、アフィニティ標識、酵素、蛍光基、または化学発光基であってもよい。

【0023】

本発明はまた、本発明の方法によって識別される化合物に関する。本発明は、さらに、本発明の方法によって識別された治療有効量の化合物および薬学的に許容可能なキャリアを含む、哺乳動物におけるGPCRによって媒介される病態の治療のための医薬組成物に関する。

【0024】

さらなる態様では、本発明は、修飾GPCRを発現する非ヒトトランスジェニック動物に関する。動物は、マウス、霊長類、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヤギ、またはヒツジであり得る。

【0025】

さらなる態様では、本発明は、生体サンプル中での修飾GPCRの検出方法に関する。この方法は、修飾GPCRを認識して結合する抗体を使用して生体サンプルをアッセイするステップと、前記抗体が前記修飾GPCRに結合するかどうかを決定するステップとを含む。

【0026】

さらなる態様では、本発明は、生体サンプル中の本発明の核酸の検出方法に関する。この方法は、(a) 生体サンプルを修飾GPCRプローブに曝露するステップと、(b) 前記修飾GPCRプローブが前記生体サンプルの核酸に結合するかどうかを決定するステップとを含む。

【0027】

本発明はまた、基質および式Iのモチーフをコードする1つまたは複数の本発明の核酸またはそのフラグメントを含み、前記式Iが修飾DRYモチーフである組成物に関する。

【0028】

本発明はまた、生体サンプル中の修飾GPCR検出用のキットに関する。このキットは、修飾GPCRを認識して結合する抗体および前記修飾GPCRに結合する抗体を検出する試薬を含む。

10

20

30

40

50

【0029】

本発明は、さらに、修飾GPCRを認識して結合する単離された免疫グロブリンに関する。免疫グロブリンは、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、または抗体フラグメントであってもよい。免疫グロブリンは抗体フラグメントであってもよく、抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(v)、およびscFvであってもよい。

【0030】

さらに別の態様では、本発明は、有効量の2-エチル-5,7-ジメチル-3-[[2'-(1H-テトラゾル-5-イル)[1,1'-ビフェニル]-4-イル]メチル]-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはフェントラミンを必要な患者に投与することによる、アレスチンのGPCRへの結合またはエンドサイトーシス小胞もしくはエンドソームへのGPCR局在化を阻害する方法に関する。

10

【0031】

他の目的および利点は、例示的な図面を参照した説明に照らして当業者に明らかとなる。

【0032】

本発明の目的および利点は、図面と共に以下の詳細な説明によって理解される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

本発明によれば、当業者の範囲内の従来の分子生物学、微生物学、免疫学、および組換えDNA技術を使用することができる。このような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、Sambrookら、「分子クローニング：実験マニュアル」、1989；「現代の分子生物学」、第I巻～第III巻、Ausubel, R.M編、1994；「細胞生物学：実験ハンドブック」、第I巻～第III巻、J.E.Celisら、1994；「現代の免疫学プロトコール」、第I巻～第III巻、Coligan, J.E.編、1994；「オリゴヌクレオチド合成」、M.J.Gait編、1984；「核酸ハイブリダイゼーション」、B.D.Hames & S.J.Higgins編、1985；「転写と翻訳」、B.D.Hames & S.J.Higgins編、1984；「動物細胞培養」、R.I.Freshney編、2000；「固定化細胞と酵素」、IRL Press、1986；B.Perbal、「分子クローニング説明書」、1984；「抗体の使用法：実験マニュアル：ポータブルプロトコールNo.1」、Harlow, E. and Lane, David, Cold Spring Harbor Press、1998；「抗体の使用法：実験マニュアル」、Harlow, E. and Lane, David, Cold Spring Harbor Press、1999；を参照のこと。

20

30

【0034】

別記しない限り、明細書および特許請求の範囲で使用した以下の用語は、以下の意味を有する。

【0035】

「免疫グロブリン」は、抗体および抗体活性を有する抗体フラグメントを含む。免疫グロブリンが修飾GPCRに結合する場合の免疫活性が好ましい。さらに好ましい免疫グロブリンは、修飾GPCRと野生型GPCRとを区別することができるものである。最も好ましい免疫グロブリンは、修飾DRYモチーフまたはGPCRのDRYモチーフに結合するものである。用語「抗体」は、抗体全体および特定のエピトープを認識するか、または特定のエピトープに結合するそのフラグメントを含む免疫グロブリンをいう。用語「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびキメラ抗体が含まれ、最後に記載のものは米国特許第4,816,397号および米国特許第4,816,567号にさらに詳述されている。用語「エピトープ」は、抗体または他の免疫系成分によって認識されるか認識可能な抗原または免疫原の1つまたは複数の部分を識別するために使用する。

40

【0036】

免疫グロブリンの例は、インタクトな免疫グロブリン分子、実質的にインタクトな免疫グ

50

ロブリン分子、およびパラトープを含む免疫グロブリン分子の一部である。抗体フラグメントには、本明細書中に記載の治療方法での使用に好ましいFab、Fab'、F(ab')₂、F(v)、およびscFvが含まれる。

【0037】

抗体フラグメントのFabおよびF(ab')₂部分を、周知の方法による実質的にインタクトな抗体に対するパパイソおよびペプシンのタンパク質分解反応によってそれぞれ調製する。例えば、Theofilopoulosらに付与された米国特許第4,342,566号を参照のこと。Fab'抗体部分もまた周知であり、F(ab')₂部分から産生され、その後メルカプトエタノールなどを使用して2つの重鎖部分に結合したジスルフィド結合を還元し、ヨードアセトアミドなどの試薬を用いてアルキル化する。本明細書中

10

【0038】

「抗体結合部位(antibody combining site)」は、抗原に特異的に結合する重鎖および軽鎖の可変領域ならびに超可変領域からなる抗体の構造部分である。

【0039】

その種々の文法上の形態における語句「モノクローナル抗体」とは、抗原上の特定のエピトープと免疫反応することができる抗体結合部位のたった1つの種を有する抗体をいう。したがって、モノクローナル抗体は、それぞれが異なる抗原に免疫特異的な複数の抗体結合部位を含むことができる(例えば、二重特異的(キメラ)モノクローナル抗体)。

【0040】

「動物」は、脊椎動物(例えば、カエル、サンショウウオ、ニワトリ、またはウシ)および無脊椎動物(例えば、蠕虫など)を含む任意の動物界の構成要素を意味する。「動物」はまた、「哺乳動物」を含むことを意味する。好ましい哺乳動物には、家畜(例えば、ウシ、バッファロー、ウマ、ヒツジ、ブタ、およびヤギなどの有蹄動物)、げっ歯類(例えば、マウス、ハムスター、ラット、およびモルモット)、イヌ、ネコ、霊長類、オオカミ、ラクダ、シカ、げっ歯類、鳥類、魚類が含まれる。

20

【0041】

「アンタゴニスト」には、アゴニストに結合する野生型および/または修飾GPCR、野生型および/または修飾GPCR脱感作、野生型および/または修飾GPCR結合アレクチン、野生型および/または修飾GPCRエンドソーム局在化などを妨害する全ての薬剤が含まれ、これには、野生型および/または修飾GPCRに影響を与える薬剤ならびに野生型および/または修飾GPCRシグナル伝達、脱感作、エンドソーム局在化、再感作などに関連する他のタンパク質に影響を与える薬剤が含まれる。

30

【0042】

DNA配列は、発現調節配列がDNA配列の転写および翻訳を調節および制御する場合に、発現調節配列に「作動可能に連結される」。用語「作動可能に連結される」は、発現すべきDNA配列の前に適切な開始シグナル(例えば、ATG)を有することと、発現調節配列の調節下でDNA配列を発現させ、DNA配列によってコードされた所望の産物を産生させる正確なリーディングフレームを維持することを含む。組換えDNA分子への挿入が所望される遺伝子が適切な開始シグナルを含まない場合、このような開始シグナルを遺伝子の前に挿入することができる。

40

【0043】

「異常なGPCR脱感作」および「異常な脱感作」は、活性受容体と脱感作受容体との間のバランスが野生型条件に関して変化するようにGPCR脱感作経路が破壊されることを意味する。通常よりも活性化受容体が存在するか、野生型条件よりも脱感作された受容体が存在するか。異常なGPCR脱感作は、正常よりも受容体のシグナル伝達が増加するか正常よりもシグナル伝達が増加する、構成的に活性である構成的に脱感作されたGPCRの結果であり得る。

【0044】

「アレクチン」は、天然アレクチンおよびアレクチンの設計された変異型を意味し、視覚

50

アレスチン（しばしばアレスチン1と呼ばれる）、アレスチン1（しばしばアレスチン2と呼ばれる）、アレスチン2（しばしばアレスチン3と呼ばれる）が含まれるが、これらには限定されない。

【0045】

修飾GPCRの「生物学的に活性なフラグメント」は、アゴニスト非依存様式でアレスチンに結合し、アゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞もしくはエンドソームまたはそれらの両方を標識する能力を有する修飾GPCRのポリペプチドフラグメントを意味する。

【0046】

アレスチンの「生物学的に活性なフラグメント」は、野生型および/または修飾GPCRに結合する能力を有するアレスチンのフラグメントを意味する。 10

【0047】

「生体サンプル」は、被験体から単離した組織、細胞、および体液ならびに被験体の体内に存在する細胞および流体を含むことを意図し、前記サンプルは、血液、血清、尿サンプル、糞便サンプル、腫瘍サンプル、細胞洗浄物、口内サンプル、唾液、体液、組織抽出物、新たに採取した細胞、組織培養でインキュベートした細胞であり得る。

【0048】

本明細書中で使用される、「カルボキシル末端テール」は、GPCRのカルボキシル末端テールを意味する。多数のGPCRのカルボキシル末端テールは、7回貫通ドメインの末端をマークする保存NPXXYモチーフのすぐ後から始まる（すなわち、NPXXYモチーフに続くものがGPCRのカルボキシル末端テールである）。カルボキシル末端テールは、比較的長くてもよく（約数十～数百個のアミノ酸）、比較的短くてもよく（約10～100個のアミノ酸）、または事実上存在しなくてもよい（約10アミノ酸未満）。本明細書中で使用される、「カルボキシル末端テール」は、これら3つの変異型（比較的長い 20
か、比較的短いか、事実上存在しない）を意味する。

【0049】

「クラスA受容体」は、好ましくは、HEK-293細胞中でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化する。

【0050】

「修飾クラスA受容体」は、DRY変異を含むクラスA受容体を意味する。 30

【0051】

「クラスB受容体」は、好ましくは、HEK-293細胞中でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化しない。

【0052】

「修飾クラスB受容体」は、DRY変異を含むクラスB受容体を意味する。

【0053】

DNA「コード配列」は、適切な調節配列の制御下におかれた場合にインピボでポリペプチドに転写および翻訳される二本鎖DNA配列である。コード配列の境界を、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシル）末端の翻訳終止コドンによって決定する。コード配列には、原核配列、真核mRNA由来のcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA由来のゲノムDNA配列、さらに合成DNA配列を含み得るが、これらに限定されない。ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は、通常、コード配列の3'末端に存在する。 40

【0054】

転写および翻訳調節配列は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなどの宿主細胞中のコード配列を発現させるDNA調節配列である。

【0055】

「並行投与」、「組み合わせ投与」、「同時投与」、または「同時に投与する」は、2つまたはそれ以上の化合物が同一の時間に投与されたかのように得られた結果が実質的に同一であるような時間内で同時にまたは十分に近い時間で化合物を投与することを意味する 50

。

【0056】

「異常性の保存」は、GPCR経路中の異常性を意味し、異常なGPCRシグナル伝達の原因となり得るGPCR、GRK、アレスチン、AP-2タンパク質、クラスリン、プロテインホスファターゼなどの異常が含まれるが、これらに限定されない。この異常なGPCRシグナル伝達は、GPCR関連疾患に寄与することができる。

【0057】

「構成的に脱感作された」GPCRに関して、従来のGタンパク質シグナル伝達を適切に活性化することができるGPCRと、活性化することができないGPCRとの間の平衡は、従来のGタンパク質シグナル伝達を適切に活性化できないほうへ移行する。さらに、本発明の構成的に脱感作されたGPCRは、構成的にリン酸化され、構成的にアレスチンに結合し、構成的にクラスリンコートピット(clathrin-coated pit)中に局在化し、そして/または構成的にエンドサイトーシス小胞もしくはエンドソームに局在化する。構成的に脱感作された受容体は、アゴニストに適切に応答する能力を欠き、アゴニストの非存在下でさえも脱感作することができる。感作GPCRのアゴニスト刺激と独立して構成的に脱感作されたGPCRが形成される。構成的に脱感作された受容体は、多くの程度の不適切なシグナル伝達に及び、構成的に脱感作された受容体は、その寿命におけるいくつかの時点で、シグナルを送ることもあり、送らないこともある。

10

【0058】

「検出可能な分子」は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、放射性手段、および光学的手段によって検出することができる任意の分子(蛍光、リン光、および生体発光、および放射性崩壊が含まれるが、これらに限定されない)を意味する。検出可能な分子には、GFP、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、ローダミン結合抗体などが含まれるが、これらに限定されない。検出可能な分子には、放射性同位体、エピトプタグ、アフィニティ標識、酵素、蛍光基、化学発光基などが含まれる。検出可能な分子には、他の分子とのその相互作用の関数として直接または間接的に検出される分子が含まれる。

20

【0059】

「脱感作GPCR」は、アゴニストに応答して従来のGタンパク質シグナル伝達を活性化する能力を現時点で持たないGPCRを意味する。本発明の脱感作GPCRは、アゴニストに適切に応答せず、リン酸化されており、アレスチンに結合し、クラスリンコートピット中に構成的に局在化し、そして/またはエンドサイトーシス小胞もしくはエンドソームに構成的に局在化する。

30

【0060】

「脱感作経路」は、脱感作過程の任意の細胞成分ならびに脱感作過程およびその後の過程に關与する任意の細胞構造を意味し、アレスチン、GRK、GPCR、AP-2タンパク質、クラスリン、プロテインホスファターゼなどが含まれるが、これらに限定されない。本発明のアッセイ方法では、ポリペプチドを、例えば、細胞質中、細胞膜上、クラスリンコートピット中、エンドサイトーシス小胞中、エンドソーム中、その間の任意の段階等で検出することができる。

40

【0061】

「DAC」類は、任意の脱感作活性化化合物を意味する。脱感作活性化化合物は、このプロセスを刺激すること、または阻害することのいずれかによってGPCR脱感作機構に影響を与える任意の化合物である。DACは、このプロセスの任意の細胞成分およびこのプロセスに關連する任意の細胞構造(アレスチン、GRK、GPCR、AP-2タンパク質、カルスリン、プロテインホスファターゼなどが含まれるが、これらに限定されない)に対する作用によってGPCR脱感作経路に影響を与える。DACには、アレスチンのGPCRへの移動を阻害する化合物、アレスチンのGPCRへの結合を阻害する化合物、アレスチンのGPCRへの移動を刺激する化合物、アレスチンのGPCRへの結合を刺激する化合物、GRKのGPCRへのリン酸化を阻害する化合物、GRKのGPCRへのリン酸化を

50

刺激する化合物、プロテインホスファターゼのGPCRへの脱リン酸化を阻害する化合物、プロテインホスファターゼのGPCRへの脱リン酸化を刺激する化合物、GPCRからのアレスチン放出を調節する化合物、GPCRのアンタゴニスト、逆アゴニストなどを含み得るが、これらに限定されない。DACは、好ましくは、GPCRの伝統的なアゴニストおよびアンタゴニストと同一のGPCRのリガンド結合部位に結合することなくGPCR脱感作過程を阻害または刺激する。

【0062】

「DNA分子」は、一本鎖または二本鎖ヘリックスのいずれかのデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）のポリマー形態をいう。この用語は、分子の一次構造および二次構造についてのみをいい、特定の三次形態（tertiary form）に制限されない。したがって、この用語には、特に、線状DNA分子（例えば、制限フラグメント）、ウイルス、プラスミド、および染色体中に見出される二本鎖DNAが含まれる。特定の二本鎖DNA分子の構造を議論する場合、本明細書中では、DNAの非転写鎖（すなわち、mRNAと相同な配列を有する鎖）に沿って5' → 3'方向でのみ配列を示す通常の習慣にしたがって配列を記載することができる。

10

【0063】

「DRYモチーフ」は、第3の膜貫通領域と第2の細胞内ループの細胞質との境界付近に存在する高度に保存されたGPCRモチーフを意味する。DRYモチーフは、最も好ましくは、以下の3つのアミノ酸モチーフ：アスパラギン酸 - アルギニン - チロシン（アスパラギン酸は第1のアミノ酸であり、アルギニンは第2のアミノ酸であり、チロシンは第3のアミノ酸である（または単一のアミノ酸置換を使用する場合、DRY））であり、DRYは式Iともいう。アレスチンへのアゴニスト非依存性結合またはGPCRへのアゴニスト非依存性エンドソーム局在化を付与しないこのアミノ酸配列の変形形態もまた含まれる。例えば、第1のアミノ酸は、グルタミン酸（すなわち、ERY）、ロイシン、プロリン、グルタミン、スレオニン、イソロイシン、システイン、グリシン、アスパラギン、バリン、ヒスチジン、またはアラニンであり得る。例えば、第3のアミノ酸は、ヒスチジン（すなわち、DRH）、トリプトファン、フェニルアラニン、セリン、イソロイシン、グルタミン、ヒスチジン、グリシン、システイン、ロイシン、アスパラギン酸、またはアラニンであり得る。DRYモチーフ中に1つを超える置換または置換基の任意の組み合わせが存在し得る。野生型DRYモチーフおよび好ましい修飾を、図2aに例示する。

20

30

【0064】

「発現調節配列」は、別のDNA配列の転写および翻訳を調節および制御するDNA配列である。コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写し、その後コード配列によってコードされたタンパク質に翻訳される場合、転写および翻訳調節配列の「調節下」におかれている。

【0065】

「GFP」は、天然供給源から単離するか遺伝子操作することができるGFPの天然に存在する種々の形態および人為的に修飾したGFPをいう緑色蛍光タンパク質を意味する。GFPは当該分野で周知である。例えば、米国特許第5,625,048号、米国特許第5,777,079号、および米国特許第6,066,476号を参照のこと。GFPは、天然供給源から単離されるか遺伝子操作された他の蛍光タンパク質（黄色蛍光タンパク質（YFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、青色蛍光タンパク質、ルシフェリン、UV励起蛍光タンパク質、またはこれらの間の任意の波長のもが含まれるが、これらに限定されない）と容易に交換可能であることが当該分野で十分に理解されている。本明細書中で使用される、「GFP」は、当該分野で既知の全ての蛍光タンパク質を意味する。

40

【0066】

「GPCRシグナル伝達」は、Gタンパク質のGPCR誘導活性化を意味する。これにより、例えば、cAMPを産生することができる。

【0067】

50

「Gタンパク質共役受容体キナーゼ」(GRK)には、GPCRをリン酸化する能力を有する任意のキナーゼが含まれる。

【0068】

「Homo sapien GPCR」は、Homo sapienに天然に存在するGPCRを意味する。

【0069】

「ハイブリダイゼーション」は、相補ヌクレオチド間またはヌクレオチド塩基間のワトソン・クリック水素結合またはHoogsteenもしくは逆Hoogsteen水素結合であってよい水素結合を意味する。例えば、アデニン(A)およびチミン(T)は、水素結合の形成を介して対合する相補的な核酸塩基である。

10

【0070】

「逆アゴニスト(inverse agonist)」は、GPCRへの結合の際にGPCRの基底(basal)の内因性活性を阻害する化合物を意味する。逆アゴニストは、アンタゴニストの1つの型である。

【0071】

「単離された」または「精製された」GPCR核酸分子またはタンパク質、その生物学的に活性な部分、または抗体は、組換え技術によって産生された場合は本質的に他の細胞材料または培養培地を含まず、化学合成された場合には実質的に化合物の前駆体または他の化合物を含まない。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物のゲノムDNA中の核酸に天然に隣接する(すなわち、核酸の5'および3'末端に存在する配列)配列(好ましくは、タンパク質コード配列)を含まない。本発明の目的のために、核酸分子について言及するために使用する場合、「単離された」は、単離された染色体を含まない。例えば、種々の実施形態では、単離されたGPCR核酸分子は、核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸に天然に隣接する約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含むことができる。実質的に細胞材料を含まないGPCRタンパク質は、約30%、20%、10%、または5%(乾燥重量)未満の非GPCRタンパク質を含むGPCRタンパク質調製物を含む。GPCRタンパク質またはその生物学的に活性な部分を組換えによって産生する場合、好ましくは、培養培地は、約30%、20%、10%、または5%未満のタンパク質調製物を含む。GPCRタンパク質を化学合成によって産生する場合、好ましくは、タンパク質調製物は、約30%、20%、10%、または5%未満(乾燥重量)の化合物前駆体または非GPCR化合物を有する。

20

30

【0072】

「修飾GPCR」は、構成的に脱感作されたGPCRが得られる1つまたは複数の修飾を有するGPCRをいう。したがって、修飾GPCRは、好ましくはそのDRYモチーフ中に1つまたは複数のアミノ酸配列の付加、置換、欠失を有し得る。

【0073】

「修飾GPCRプローブ」は、これらのポリペプチドをコードする核酸の修飾DRY領域を介して特異的に結合するプローブを意味する。

【0074】

「修飾DRYモチーフ」は、DRYモチーフ以外のアミノ酸配列が得られる1つまたは複数の修飾を有するGPCRのDRYモチーフをいう。この修飾DRYモチーフにより、構成的に脱感作されたGPCRが得られる。より好ましくは、修飾DRYモチーフは、第2のアミノ酸としてアルギニン以外のアミノ酸からなる。DRYモチーフの第2のアミノ酸は、好ましくは、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、またはアスパラギンであるが、図2bに示すアルギニンまたはリジン以外の任意のアミノ酸であってもよい。

40

【0075】

「修飾GRK」は、脱感作を変化させるように改変されたGRKを意味する。

【0076】

50

「天然GPCR」は、天然に存在するGPCRを意味する。

【0077】

「嗅覚リガンド (Odorant ligand)」は、受容体への結合の際、アゴニストおよびアンタゴニスト分子を含む合成化合物および/または組換えによって産生した化合物を含む臭気を認知するリガンド化合物を意味する。

【0078】

「嗅覚受容体」は、(通常、嗅覚リガンドの結合によって)活性化された場合に通常臭気が認知される嗅神経表面上に見出される受容体タンパク質を意味する。

【0079】

「修飾嗅覚受容体」は、DRY変異を含む嗅覚受容体である。

10

【0080】

本発明のプローブについて言及するために本明細書中で使用される、用語「オリゴヌクレオチド」を、2つまたはそれ以上、好ましくは3つ以上のリボヌクレオチドから構成される分子と定義する。その正確なサイズは、多数の因子に依存する。言い換えると、最終的な機能およびオリゴヌクレオチドの使用に依存する。

【0081】

「複製起点」とは、DNA合成に関連するDNA配列をいう。

【0082】

用語「薬学的に許容可能な」は、ヒトに投与した場合に生理学的に許容され、且つ典型的には胃の不調およびめまいなどのアレルギー性のまたは類似の副作用を起こさない分子および組成物をいう。

20

【0083】

本明細書中で使用される、用語「薬学的に許容可能なキャリア」とは、化合物の運搬または輸送に関連する、液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料などの薬学的に許容可能な材料、組成物、または賦形剤を意味する。

【0084】

「霊長類化抗体」は、霊長類の可変配列または抗原結合部分およびヒト定常ドメイン配列を含む組換え抗体を意味する。

【0085】

本明細書中で使用される、用語「プライマー」は、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下に置かれた場合(すなわち、ヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼなどの誘導剤の存在下ならびに適切な温度およびpH)、合成開始点として作用することができる精製された制限消化物中で天然に生じる、または合成によって産生されるオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは一本鎖であっても二本鎖であってもよく、誘導剤の存在下で所望の伸長産物合成の開始に十分な長さでなければならない。正確なプライマーの長さは、温度、プライマー供給源、および使用した方法を含む多数の因子に依存する。例えば、診断のために、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、15~25またはそれ以上のヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドを含むことができる。

30

【0086】

本明細書中のプライマーを、特定の標的DNA配列の異なる鎖に「実質的に」相補的になるように選択する。これは、プライマーが、各々の鎖とハイブリダイゼーションするのに十分であるように相補的でなければならないことを意味する。したがって、プライマー配列は、テンプレートの正確な配列を反映する必要はない。例えば、相補的でないヌクレオチドフラグメントを、プライマーの5'末端に結合させることができ、残りのプライマー配列はこの鎖に相補的である。あるいは、プライマー配列がハイブリダイゼーションする鎖の配列と十分に相補的であり、それにより伸長産物の合成用のテンプレートが形成される場合、相補的でない塩基またはより長い配列はプライマー中に散在させることができる。

40

【0087】

50

本明細書中で使用される、用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」は、それぞれ特定のヌクレオチド配列またはその付近の二本鎖DNAを切断する細菌酵素をいう。

【0088】

「現時点 (presently)」とは、時間の前後関係において、感作、脱感作、または再感作を位置付けることを、時間的な前後関係として意味する。

【0089】

「プロモーター配列」は、細胞中でRNAポリメラーゼに結合して下流(3'方向)コード配列の転写を開始させることができるDNA調節領域である。本発明を定義する目的で、プロモーター配列を、転写開始部位によってその3'末端で結合させ、バックグラウンドを超える検出可能なレベルでの転写開始に必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように上流(5'方向)を伸長させる。プロモーター配列内で、転写開始部位(ヌクレアーゼS1を使用したマッピングによって都合よく見出される)およびRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)が見出される。真核生物プロモーターは、しばしば「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含むが常に含むわけではない。原核生物プロモーターは、-10および-35コンセンサス配列に加えてシャイン・ダルカルノ配列を含む。

10

【0090】

「レプリコン」は、インビボでDNA複製の自律的単位として機能する(すなわち、それ自体の調節下で複製することができ)任意の遺伝子成分(例えば、プラスミド、染色体、ウイルス)である。

20

【0091】

「再感作されたGPCR」は、先に脱感作され、現時点で感作されているGPCRを意味する。

【0092】

「再感作活性化化合物」は、GPCRを再感作する化合物である。

【0093】

「感作GPCR」は、現時点でアゴニストに応答して、従来のGタンパク質シグナル伝達を活性化するGPCRである。

【0094】

「シグナル配列」を、コード配列の前に含めることができる。この配列は、ポリペプチドを細胞表面に方向付けるように宿主細胞に伝達する、またはポリペプチドを培地へ分泌するシグナルペプチド(ポリペプチドのN末端)をコードし、このシグナルペプチドは、タンパク質が細胞から離れる前に宿主細胞によって切り離される。原核生物および真核生物由来の種々のタンパク質に会合されたシグナル配列を見出すことができる。

30

【0095】

「治療有効量」は、例えば、血圧上昇および呼吸などの病理学のいくつかの特徴の予防、好ましくは軽減に十分な量を意味する。

【0096】

外因性または異種のDNAがある細胞内に導入されている場合、その細胞は、そのようなDNAによって「形質転換されている」。形質転換するDNAは、細胞のゲノムから作製した染色体DNAに組み込まれて(共有結合)いてもよく、組み込まれていなくてもよい。例えば、原核生物(酵母)および哺乳動物では、形質転換するDNAを、プラスミドなどのエピソードエレメント上に保持することができる。真核細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、染色体の複製によって娘細胞に遺伝するように形質転換するDNAが染色体に組み込まれている細胞である。この安定性を、形質転換するDNAを含む娘細胞集団から構成される細胞株またはクローンを確立する真核細胞の能力によって示す。「クローン」は、1つの細胞または有糸分裂による共通の先祖由来の細胞集団である。「細胞株」は、インビトロで多数の世代を安定に成長することができる初代細胞のクローンである。

40

【0097】

50

2つのDNA配列は、定義したDNA配列長と少なくとも75%（好ましくは、少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも90%または95%）のヌクレオチドがマッチする場合に「実質的に相同」である。実質的に相同な配列を、配列データベースで利用可能な標準的なソフトウェアを使用した配列比較、例えば、または特定の系について定義したストリンジェントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験によって識別することができる。適切なハイブリダイゼーション条件の定義は、当業者の範囲内である。例えば、Maniatisら、前出；「DNAクローニング」、第I巻および第II巻、前出；「核酸ハイブリダイゼーション」、前出を参照のこと。

【0098】

「未知受容体またはオーファン受容体」は、その機能および/またはリガンドが未知のGPCRを意味する。 10

【0099】

「修飾オーファン受容体」は、DRY変異を含むオーファン受容体を意味する。

【0100】

「ベクター」は、別のDNAセグメントが結合したセグメントの複製を引き起こすように結合することができるプラスミド、ファージ、またはコスミドなどのレプリコンである。

【0101】

本発明は、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチド、好ましくは修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチドの実質的に純粋な調製物、または修飾DRYモチーフを含む組換え修飾GPCRポリペプチドを特徴とする。好ましい実施形態では、ポリペプチドは生物学的活性を有し、ポリペプチドは配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を有し、好ましくは、配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と約65%同一であり、最も好ましくは、配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と約92%~約99%同一であり、ポリペプチドは配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と実質的に同一であり、ポリペプチドは、少なくとも約5、10、20、50、100、または150アミノ酸残基長であり、ポリペプチドは、少なくとも約5個、好ましくは少なくとも約10個、より好ましくは少なくとも約20個、さらにより好ましくは少なくとも50個、100個、または150個の配列表に含まれる本発明の連続するアミノ酸残基を含む。さらに別の好ましい実施形態では、配列同一性が配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と約7%~約8%異なるアミノ酸配列もまた、本発明に含まれる。 20 30

【0102】

好ましい実施形態では、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチドは、配列表に含まれる本発明の核酸または配列表に含まれる本発明の核酸と少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%相同な核酸によってコードされる。

【0103】

好ましい実施形態では、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチドは、配列表に含まれる本発明の配列と約1、2、3、5、10、またはそれ以上の残基が異なる。しかし、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチドが、依然として構成的に脱感作された生物学的活性を示すように異なる。 40

【0104】

好ましい実施形態では、ポリペプチドは、リーディングフレームに、さらなるアミノ酸残基、好ましくは配列表に含まれる本発明の配列をコードするゲノムDNAに対して5'または3'でゲノムDNAによってコードされる残基に融合された、配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列の全てまたはフラグメントを含む。

【0105】

本発明のポリペプチドには、別の転写事象、別のRNAスプライシング事象、および別の翻訳および翻訳後事象の結果として得られるものが含まれる。

【0106】

好ましい実施形態では、修飾 D R Y モチーフを含むコードされた修飾 G P C R ポリペプチドは、(例えば、少なくとも1つのアミノ酸残基のアミノ酸置換、付加、または欠失によって)アミノ酸配列中の約1、2、3、5、10、またはそれ以上の残基が配列表に含まれる本発明の配列と異なる。しかし、修飾 D R Y モチーフを含むコードされた修飾 G P C R ポリペプチドが、依然として構成的に脱感作された生物学的活性を示すように異なる。

【0107】

好ましい実施形態では、コードされたポリペプチドは、リーディングフレームに、さらなるアミノ酸残基、好ましくは配列表に含まれる本発明の配列をコードするゲノム D N A に対して5'または3'でゲノム D N A によってコードされる残基に融合された、配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列の全てまたはフラグメントを含む。

10

【0108】

本発明は、以下を含む。対立遺伝子変異型；天然の変異体；誘導変異体；配列表に含まれる本発明のポリペプチドをコードする核酸に対して低または高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイゼーションする D N A によってコードされるタンパク質(高および低ストリンジエンシーの定義については、「現代の分子生物学プロトコール」、John Wiley & Sons、New York、1989、6.3.1~6.3.6(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)を参照のこと)；および抗血清によって修飾 D R Y モチーフを含む G P C R ポリペプチドに特異的に結合したポリペプチド、特に、抗血清によって修飾 D R Y モチーフポリペプチドを含む修飾 G P C R ポリペプチドの活性部位または結合ドメインに特異的に結合したポリペプチド。本発明はまた、フラグメント、好ましくは生物学的に活性なフラグメントを含む。これらおよび他のポリペプチドを、本明細書中では修飾 G P C R ポリペプチド類似体または変異型ともいう。

20

【0109】

本発明は、さらに、本発明のポリペプチドをコードする核酸(例えば、R N A または D N A)を提供する。これには、二本鎖核酸ならびにコードする一本鎖およびアンチセンス一本鎖が含まれる。

【0110】

好ましい実施形態では、修飾 D R Y モチーフを含む修飾 G P C R をコードする核酸は、修飾 D R Y モチーフを含む修飾 G P C R の遺伝子配列(例えば、組換え宿主細胞における発現に適切な修飾 D R Y モチーフを含む修飾 G P C R をコードする遺伝子配列)に作動可能に連結された転写調節配列(例えば、少なくとも1つの転写プロモーター配列または転写エンハンサー配列)を含む。

30

【0111】

さらに好ましい実施形態では、本発明の修飾 D R Y モチーフを含む修飾 G P C R ポリペプチドをコードする核酸は、ストリンジエントな条件下で修飾 D R Y モチーフを含む配列表に含まれる本発明の少なくとも約8個の連続するヌクレオチド、より好ましくは配列表に含まれる本発明の少なくとも約12個の連続するヌクレオチド、さらにより好ましくは配列表に含まれる本発明の少なくとも約20個の連続するヌクレオチド、最も好ましくは配列表に含まれる本発明の少なくとも約40個の連続するヌクレオチドに対応する核酸プロンプとハイブリダイゼーションする。

40

【0112】

別の態様では、本発明は、修飾 D R Y モチーフを含む修飾 G P C R ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する実質的に純粋な核酸を提供する。好ましい実施形態では、コードされたポリペプチドは、生物学的活性を有し、コードされたポリペプチドは、配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%相同なアミノ酸配列を有し、コードされたポリペプチドは配列表に含まれる本発明のアミノ酸配列と実質的に同一であり、コードされたポリペプチドは、少なくとも約5、10、20、50、100、または150アミノ酸残基長であり、コードされたポリペプチドは、少なくとも約5、好ましくは少なくとも約10個、より好ましくは少なくとも約20個、さらにより好ましくは少なくとも50個、100個、また

50

は150個の配列表に含まれる本発明の連続するアミノ酸を含む。

【0113】

別の態様では、本発明は、以下を含む。修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチドまたは本明細書中に記載の修飾DRYモチーフ変異型を含む修飾GPCRポリペプチドをコードする核酸を含むベクター、ベクターでトランスフェクトした宿主細胞、および、例えば細胞培養培地中で細胞を培養するステップと、例えば細胞または細胞培養培地から修飾DRYモチーフまたは変異型を含む修飾GPCRポリペプチドを単離するステップとを含む、修飾DRYモチーフまたは変異型を含む組換え修飾GPCRポリペプチドを産生する方法。

【0114】

本発明の1つの実施形態は、実質的に単離された核酸に関する。本発明の核酸には、配列番号7～配列番号12の任意の1つまたはその相補物に対応する少なくとも約8ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約12ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも15～20ヌクレオチド長の配列が含まれる。あるいは、核酸は、配列番号7～配列番号12のいずれかが一部を形成する完全なタンパク質コード配列を含む任意のORF（リーディングフレーム）内に含まれる配列を含む。本発明は、これらの配列の配列保存変異型および機能保存変異体を含む。核酸は、DNA、RNA、DNA/RNA二重鎖、タンパク質核酸（PNA）、またはその誘導体であり得る。

【0115】

別の態様では、本発明は、配列表に含まれる本発明の配列と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%相同な精製された組換え核酸を特徴とする。

【0116】

本発明はまた、これらの修飾DRYモチーフ由来の配列を含む組換えDNA（DNAクローニングベクターおよび発現ベクター）、このようなDNAを含む宿主細胞（真菌、細菌、酵母、植物、昆虫、および哺乳動物の宿主細胞を含む）、および修飾DRYモチーフ配列を含む修飾GPCRによってコードされるRNAおよびポリペプチドを含む発現産物の産生方法を含む。配列が発現する条件下で修飾DRYモチーフ由来の核酸配列を含む修飾GPCRを含む宿主細胞のインキュベーションによってこれらの方法を行う。宿主細胞は、天然または組換えであってよい。ポリペプチドを、（a）細胞画分および培地画分を得るためにインキュベートした細胞を採取するステップと、（b）細胞画分、培地画分、またはこれらの両方由来の修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRポリペプチドを回収するステップとによって得ることができる。ポリペプチドを、インビトロ翻訳によっても作製することができる。

【0117】

別の態様では、本発明は、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRのmRNAに結合することができる核酸を特徴とする。このような核酸は、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRのmRNAの翻訳を調節するようにアンチセンス核酸として作用することができる。さらなる態様は、修飾DRYモチーフ核酸を含む修飾GPCRポリペプチドに特異的に結合することができる核酸を特徴とする。これらの核酸を、本明細書中で相補物ともいい、プローブおよび捕捉試薬として使用する。

【0118】

別の態様では、本発明は、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRの核酸に対応するリーディングフレームを含む発現系を特徴とする。核酸は、さらに、意図する宿主に適合する調節配列を含む。発現系は、修飾DRYモチーフ核酸を含む修飾GPCRポリペプチドに対応するポリペプチドの作製に有用である。

【0119】

別の態様では、本発明は、以下を含む。修飾DRYモチーフまたは本明細書中に記載の変異型を含む修飾GPCRポリペプチドをコードする核酸を含むベクター、ベクターでトランスフェクトした宿主細胞、および例えば、細胞培養培地中で細胞を培養するステップと

10

20

30

40

50

、例えば、細胞または細胞培養培地から修飾 D R Yモチーフまたは変異型を含む修飾 G P C R ポリペプチドを単離するステップとを含む、修飾 D R Yモチーフまたは変異型を含む組換え修飾 G P C R ポリペプチドを産生する方法。

【 0 1 2 0 】

本発明は、さらに、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体、好ましくはモノクローナル抗体を提供する。宿主動物中での抗体の産生方法も提供する。本発明の方法は、動物を修飾 D R Yモチーフ由来の免疫原性成分を含む少なくとも1つの修飾 G P C R で免疫化するステップを含み、前記免疫原性成分は、配列番号7～配列番号12のいずれか1つによってコードされる1つまたは複数のポリペプチドまたはその配列保存変異型もしくは機能保存変異型；または完全なタンパク質コード配列（配列番号7～配列番号12のいずれかが一部を形成する）を含む任意の O R F 内に含まれるポリペプチド、または配列番号1～配列番号6のいずれかに含まれるポリペプチド配列、または配列番号1～配列番号6のいずれかが一部を形成するポリペプチドを含む。宿主動物には、任意の温血動物（哺乳動物および鳥類が含まれるが、これらに限定されない）が含まれる。このような抗体を、修飾 D R Yモチーフ特異的抗原を含む修飾 G P C R の存在量および分布を評価するための免疫アッセイ用の試薬として使用する。

10

【 0 1 2 1 】

本発明は、修飾 G P C R、修飾 G P C R のポリペプチド、修飾 G P C R をコードする核酸分子、修飾 G P C R をコードする核酸分子を含むベクター、修飾 G P C R の核酸構築が可能なベクター、および修飾 G P C R を含む細胞に関する。本発明は、さらに、修飾 G P C R を使用するアッセイ系、修飾 G P C R を含む細胞を使用するアッセイ系、アッセイ系を使用して識別された化合物、識別された化合物を使用した処理方法、アッセイ系を使用した疾患の診断方法、および本発明のアッセイ試薬および本発明の細胞を含むキットに関する。本発明はまた、アンチセンスおよび修飾 G P C R 核酸を使用した処理技術に関する。

20

【 0 1 2 2 】

特定のコドン異なるアミノ酸をコードするコドンに変化させるように G P C R または修飾 G P C R を変異させることができる。一般に、可能な限り少ないヌクレオチドの変化によってこのような変異を行う。非保存様式（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸群に属するアミノ酸から別の群に属するアミノ酸へのコドンの変化による）または保存様式（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸群に属するアミノ酸から同一の群に属するアミノ酸へのコドンの変化による）で得られたタンパク質中のアミノ酸を変化させるために、この種の置換変異を行うことができる。このような保存的变化により、一般に、得られたタンパク質の構造および機能はあまり変化しない。非保存的变化により、得られたタンパク質の構造、活性、または機能が変化する可能性が高い。本発明は、得られたタンパク質の活性または結合の特徴が有意に変化しない保存的变化を含む配列を含むとみなすべきである。本発明はまた、得られたタンパク質の活性または結合の特徴が有意に変化しない非保存的变化を含む配列を含むとみなすべきである。

30

【 0 1 2 3 】

特定の実施形態では、本発明の修飾 G P C R には、アゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化するように修飾された G P C R が含まれる。特定の実施形態では、本発明の修飾 G P C R には、アゴニスト非依存様式で アレスチンに結合するように修飾した G P C R が含まれる。さらに好ましい実施形態では、本発明の修飾 G P C R は、アレスチンに結合し、且つエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化する。

40

【 0 1 2 4 】

本発明の修飾 G P C R は、修飾 D R Yモチーフを含む。D R Yモチーフは、第3の膜貫通領域と第2の細胞内ループとの細胞質境界付近に存在する高度に保存された G P C R モチーフである。D R Yモチーフは、最も好ましくは、以下の3つのアミノ酸モチーフである。アスパラギン酸 - アルギニン - チロシン（D R Y）。修飾 D R Yモチーフは、D R Yモチーフ以外のアミノ酸配列が得られる1つまたは複数の修飾を有する G P C R の D R Y モ

50

チーフをいう。最も好ましくは、修飾 D R Yモチーフは、第 2 のアミノ酸としてアルギニン以外のアミノ酸からなる。D R Yモチーフの第 2 のアミノ酸は、好ましくは、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、またはアスパラギンであるが、アルギニンまたはリジン以外の任意のアミノ酸であってよい。

【 0 1 2 5 】

修飾 D R Yモチーフにより、本発明前には知られていなかった構成的に脱感作された G P C R が得られる。本明細書中に記載されているように、任意の G P C R の D R Yモチーフを修飾して、構成的に脱感作された G P C R を得ることができる。

【 0 1 2 6 】

修飾 G P C R には、V 2 R を含んでもよいが、V 2 R を排除することもできる。V 2 R R 1 3 7 H の修飾 D R Yモチーフを使用して、他の G P C R の D R Yモチーフに置換することができる。好ましくは、この 3 つのアミノ酸配列を、第 3 の膜貫通領域と第 2 の細胞内ループとの細胞質境界付近に設置する。D R Yモチーフの R の変異を含む修飾 G P C R は、アレスチンに対する親和性が増加し、アゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中でアレスチンと共存する。本発明は、好ましくは D R Yモチーフの R の変異のためにアゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中でアレスチンと共存する修飾 G P C R を含む（に関する）。

10

【 0 1 2 7 】

本発明の修飾 G P C R はまた、2 0 0 1 年 1 1 月 5 日提出の米国特許出願番号 0 9 / 9 9 3 , 8 4 4 号、「修飾 G タンパク質共役受容体」（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に記載のようにカルボキシル末端テール中に適切に位置付けられた 1 つまたは複数のリン酸化部位、好ましくはリン酸化部位のクラスターを含むような修飾を含んでもよい。アミノ酸のクラスターは、2 つの連続するアミノ酸位置のうちの 2 つ、3 つのうちの 2 つ、3 つのうちの 3 つ、4 つの位置のうちの 3 つ、4 つのうちの 4 つ、5 つの位置のうちの 4 つ、5 つのうちの 5 つなどを占めてもよい。リン酸化部位のこれらのクラスターは、好ましくは、G P C R のカルボキシル末端テール中に存在するセリン残基およびスレオニン残基である。これらの変異は、アミノ酸残基の個別の点変異、G P C R の核酸配列中の変異、またはカルボキシル末端テールの全体または一部を、リン酸化部位を適切に位置付けたクラスターを有する G P C R のそれと交換することによって得ることができる。交換部位は、保存されている N P X X Yモチーフの後に存在するか、このモチーフに含まれる。あるいは、G P C R の推定パルミトイル化部位を、保存されている N P X X Yモチーフの約 1 0 ~ 2 5 （好ましくは 1 5 ~ 2 0 ）アミノ酸残基下流で識別することができ、交換部位は、パルミトイル化システインの後に存在するか、これを含み得る。テールを交換し、修飾 G P C R を核酸配列または対応するアミノ酸配列の操作によって構築することができる。

20

30

【 0 1 2 8 】

本発明の修飾 G P C R は、G タンパク質共役受容体（G P C R）活性を変化させることができる化合物のスクリーニングアッセイで有用である。これらのアッセイは、アレスチン、G P C R、または脱感作に関連する他のタンパク質に結合した検出可能な分子を使用することができる。検出可能な分子は、本明細書中に記載されており、蛍光基（例えば、G F P）、酵素（例えば、ガラクトシダーゼ）、放射性同位体、エピトープタグ、アフィニティ標識、および化学発光基が含まれる。本発明で使用することができるアッセイの例には、米国特許第 5 , 8 9 1 , 6 4 6 号および米国特許第 6 , 1 1 0 , 6 9 3 号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に記載のものを含んでもよいが、これらに限定されない。本発明で使用することができるさらなるアッセイの例には、化学発光を使用したアッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）、および A n g e r s , S , S a l a h p o u r , A . , J o l y , E . H i l a i r e t , S . C h e l s k y、「生体発光共鳴エネルギー移動（B R E T）を使用した、生きた細胞における 2 アドレナリン作動性受容体の二量体化」、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、7、3 6 8 4 ~ 3 6 8 9 に記載の生体蛍光共鳴エネルギー移動（B R E T）技術を使用したアッ

40

50

セイを含んでもよいが、これらに限定されない。

【0129】

本発明を使用することができる既知のGPCRの非限定的なリストの例は、図1に含まれる。図1では、受容体を、構造の類似性およびリガンドに基づいた古典的な分類にしたがって分類している。

【0130】

例として、既知の受容体についての主要なGPCRクラスは、HEK-293細胞中でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化することが好ましいクラスA受容体およびHEK-293細胞中でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化しないことが好ましいクラスB受容体である。

10

【0131】

アゴニストがGPCRに結合した後、Gタンパク質共役受容体キナーゼ(GRK)はGPCRの細胞内ドメインをリン酸化することが発見された。リン酸化後、アレスチンタンパク質は、GRKリン酸化受容体に会合し、その同族Gタンパク質由来の受容体と結合しない。アレスチンのリン酸化GPCRとの相互作用によりGPCRシグナル伝達が終結し、非シグナル伝達脱感作受容体が産生される。

【0132】

脱感作GPCRに結合したアレスチンは、アダプタータンパク質としての機能によって、エンドサイトーシスのためにGPCRをクラスリンコートピットに標的化させ、GPCRがアダプタータンパク質2(AP-2)およびクラスリンなどのエンドサイトーシス機構成分に結合する。インターナライズされたGPCRは脱リン酸化され、脱感作された細胞表面に戻される。本発明者らは、アレスチンとGPCRとの相互作用の安定性が、GPCRの脱リン酸化率、再利用率、および再感作率に影響することを決定した。脱感作プロセスにおけるGPCRリン酸化および脱リン酸化の関連が、2001年11月5日出願の米国特許出願番号09/993,844号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)で例示されている。

20

【0133】

本発明者らは、アレスチンのGPCRとの会合のアゴニストに対する依存がGPCRのDRYモチーフによって媒介され得ることを発見した。DRYモチーフにより、アゴニストに依存してアレスチン-GPCR会合が可能であり得る。

30

【0134】

通常アゴニスト依存様式でアレスチンに結合するGPCRを、修飾DRYモチーフを含むように修飾することができる。この修飾により、好ましくは、アゴニストの非存在下で修飾GPCRをアレスチンに結合させることが可能である。これらの修飾GPCRは、GPCR活性のアンタゴニストのスクリーニングに有用であり得る。

【0135】

GPCRは、多数の疾患(狭心症などの心臓適応症、本態性高血圧症、心筋梗塞、上室および心室の不整脈、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、腎不全、糖尿病、喘息などの呼吸器適応症、慢性気管支炎、気管支痙攣、気腫、気道閉塞症、鼻炎などの上気道適応症、季節性アレルギー、炎症性疾患、損傷に対する炎症、慢性関節リウマチ、慢性炎症性腸疾患、緑内障、酸ノペプシン障害などの胃腸適応症、びらん性食道炎、胃腸過分泌、肥満細胞症、胃腸逆流、消化性潰瘍、ゾリンジャー・エリソン症候群、疼痛、肥満症、神経性大食症、うつ病、強迫性障害、器官奇形(例えば、心臓奇形)、パーキンソン病およびアルツハイマー病などの神経変性疾患、多発性硬化症、エプスタイン・バー感染、および癌が含まれるが、これらに限定されない)に関与している。したがって、GPCR活性およびアレスチン親和性の調整は、これらの病態の改善メカニズムである。

40

【0136】

本発明者らは、GPCRシグナル伝達経路の任意の部分の異常により、GPCR関連疾患は発症させる異常なGPCRシグナル伝達を引き起こし得ると判断した。例えば、GPCRシグナル伝達経路の成分(GPCR、GRK、アレスチン、プロテインホスファターゼ

50

、A P - 2 タンパク質、クラスリンなどが含まれるが、これらに限定されない)は変異を発現し得る。変異により、例えば、G P C R シグナル伝達を変化させることができる異常なリガンド結合、G タンパク質結合、G P C R 輸送などを得ることができる。これらの変異により、構成的に脱感作されたG P C Rを得ることができる。

【0137】

(1)現時点でアゴニストに応答して従来のG タンパク質シグナル伝達を活性化することができることを意味する感作と、(2)現時点でアゴニストに応答することができず従来のG タンパク質シグナル伝達を活性化することができないことを意味する脱感作と、(3)現時点でアゴニストに再度応答して従来のG タンパク質シグナル伝達を活性化することができることを意味する再感作との間で野生型G P C Rは循環する。このバランスを崩壊させて、例えば、構成的に脱感作したG P C Rを得ることができる。構成的に脱感作したG P C Rは、上記のように循環しない。野生型条件下では、G P C Rは、感作G P C Rのアゴニスト活性化後に脱感作され、感作G P C Rのアゴニスト刺激から独立して構成的に脱感作されたG P C Rが形成される。本発明の構成的に脱感作されたG P C Rは、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中に局在化することが最も好ましい。

10

【0138】

本明細書中に記載のように、構成的に脱感作されたG P C Rは、病態と関連がある可能性がある。これらの構成的に脱感作されたG P C Rは、適切にアゴニストに応答せず、従来のG タンパク質シグナル伝達を活性化しない。従来のG タンパク質シグナル伝達のこの欠損は、病気の状態の原因であるかもしれない。これらの構成的に脱感作されたG P C Rを、構成的にリン酸化して、構成的にアレスチンに結合することができる。アレスチン結合により、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中にG P C Rを局在化することができる。

20

【0139】

ある条件は、これらの受容体の構成的脱感作を変化させることができる。これらの条件の中には、脱感作受容体を生ずるものもある。条件の中には、関連する病態を逆転させうるものもある。

【0140】

例えば、構成的に脱感作された変異受容体は、構成的脱感作、特にエンドソーム局在化を防止する第2の変異を保有することができる。例として、修飾G P C Rは、更なる変異を有することができ、リン酸化部位(例えば、S S S T S S)は、カルボキシル末端テール中の非リン酸化部位(例えば、A A A A A A)に変換され、それによりアレスチンの結合が減少し、構成的脱感作、特にG P C Rのエンドソーム局在化が防止される(図8)。脱感作経路中の変異タンパク質は、変異G P C Rの構成的脱感作およびエンドサイトーシス小胞中での局在化またはエンドソーム局在化を阻害することができる(図14)。G P C Rのアンタゴニストは、構成的脱感作、特にエンドソーム局在化を防止することができる(図14および15)。脱感作経路に関連する他のタンパク質に結合する化合物はまた、構成的脱感作、特にエンドソーム局在化を防止することができる。

30

【0141】

例として、G P C Rは、G P C Rの任意の部分(カルボキシル末端テール、細胞内ループ、および/または膜貫通領域の細胞質末端が含まれるが、これらに限定されない)に変異を有することができる。この修飾により、例えば、アレスチンに対するG P C Rの親和性を増強することができる。変異によってアレスチンに対するG P C Rの親和性が十分に増強された場合、G P C Rを構成的に脱感作することができる。構成的に脱感作された受容体は、G P C R関連疾患の病因に寄与し得る。

40

【0142】

アレスチンはまた、その任意の部分にG P C Rに対するアレスチンの親和性を増強するか減少させる変異を有してもよい。さらに、A P - 2 タンパク質およびクラスリンは、その任意の部分に受容体に結合したアレスチンの結合を維持する能力を増強または減少させる変異を有してもよい。G P C Rに対するアレスチンの親和性の変化により、構成的に脱感

50

作したGPCRを得ることができ、それによりGPCR関連疾患の病因となりうる。さらに、野生型に関してアレチンの発現を増加させて、構成的に脱感作したGPCRを得ることができる。

【0143】

さらに、Gタンパク質共役受容体キナーゼ(GRK)は、その任意の部分にGPCRのリン酸化を増強してアレチンに対するGPCRの親和性を増強させる変異を有し得る。修飾GRKにより、構成的に脱感作され、それによりGPCR関連疾患の病因となりうる。さらに、野生型に関してGRKの発現を増加させて、構成的に脱感作したGPCRを得ることができる。

【0144】

さらに、プロテインホスファターゼは、任意の部分にGPCRの脱リン酸化を増強または減少させてアレチンに対するGPCRの親和性を増強または減少させることができる修飾(例えば、遺伝子の変異または他の機能の変化)を有し得る。プロテインホスファターゼの修飾により、構成的に脱感作され、それによりGPCR関連疾患の病因に寄与し得る。GPCRシグナル伝達経路に関連し得るプロテインホスファターゼには、例えば、カルシウム調節セリンスレオニンホスファターゼが含まれるが、これに限定されない。Ca調節セリンスレオニンホスファターゼの例には、ホスファターゼのPPEF1/PPEF2ファミリーが含まれる。

【0145】

特定の実施形態では、本発明の修飾GPCRには、アゴニスト刺激の非存在下で基本レベルよりも高い比率でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化するように修飾されたGPCRが含まれる。

【0146】

[修飾GPCR]

本発明は、修飾GPCRに関する。最も好ましくは、本発明の修飾GPCRを、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中に構成的に局在化するように修飾する。通常、アゴニストはGPCRに結合し、活性化GPCRはリン酸化され、アレチンに結合し、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームに標的化する。リン酸化ドメインは、カルボキシル末端ドメイン中に存在し得る。本発明者らは、カルボキシル末端ドメイン以外のGPCR領域の修飾によりアレチンへのGPCRの結合を調節することができるかと判断した。本発明者らは、修飾によりアゴニストの非存在下でのアレチンへのGPCR結合が可能であると判断した。修飾により、構成的に脱感作させた受容体を形成することができる。

【0147】

本発明者らは、特定のアミノ酸モチーフがGPCR/アレチン複合体のアゴニスト依存性の形成に関連し得るので、最終的にエンドサイトーシス小胞またはエンドソームへのアレチンの補充を促進し得ることを発見した。これらのアミノ酸モチーフの修飾により、GPCR/アレチン複合体形成のアゴニスト依存性を緩和することができる。より好ましくは、GPCR/アレチン複合体のアゴニスト依存性の形成に関連するアミノ酸モチーフは、DRYモチーフであり得る。

【0148】

最も好ましくは、本発明の修飾GPCRは、DRYモチーフ中に1つまたは複数の修飾を含む。DRYモチーフの1つ、2つ、または3つのアミノ酸を修飾することができるが、少なくともアルギニンが修飾されなければならない。DRYモチーフの全体または一部を修飾することができる。DRYモチーフは、第3の膜貫通領域と第2の細胞内ループの細胞質境界付近に存在する高度に保存されたGPCRモチーフである。DRYモチーフは、最も好ましくは、以下の3つのアミノ酸モチーフ: アスパラギン酸 - アルギニン - チロシン(DRY)である。このモチーフの修飾により、構成的に脱感作された受容体を形成することができる。

【0149】

例として、図3に示すように、V2Rは、アミノ酸136~138にDRYモチーフを有

10

20

30

40

50

する。DRYモチーフの修飾により、GPCR/アレスチン複合体のアゴニスト非依存性形成およびエンドサイトーシス小胞またはエンドソームへの構成的な局在化を促進することができる。_{1B}-AR受容体は、GPCR/アレスチン複合体の形成を促進し、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化するDRYモチーフを、アミノ酸142~144に含む。AT_{1A}R受容体は、GPCR/アレスチン複合体の形成を促進し、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化するDRYモチーフを、アミノ酸125~127に含む。

【0150】

本発明は、これらの修飾GPCRのポリペプチド配列を含む。本発明の修飾GPCRには、アゴニスト非依存様式でエンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化するDRYモチーフで修飾したGPCRが含まれる。本発明の修飾GPCRのポリペプチド配列には、1つまたは複数の付加、欠失、置換、または変異を有する配列が含まれる。これらの変異は、好ましくは、保存様式(すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸群に属するアミノ酸から同一の群に属するアミノ酸へのコドンの変化による)で得られる置換変異である。このような保存的变化により、一般に、得られたタンパク質の構造および機能はあまり変化しない。本発明は、得られたタンパク質の活性または結合の特徴が有意に変化しない保存的变化を含む配列を含むとみなすべきである。本発明はまた、得られたタンパク質の活性または結合の特徴が有意に変化しない非保存的变化を含む配列を含むとみなすべきである。

10

【0151】

本発明は、さらに、修飾GPCRをコードする単離された核酸分子を含む。修飾GPCRと同一のアミノ酸配列を有するが縮重している修飾GPCRをコードする修飾GPCRコードDNA配列は本発明の範囲内であると認識すべきである。「縮重」は、異なる三文字コドンを使用して特定のアミノ酸を特定することを意味する。

20

【0152】

本発明の修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRを作製するために、DRYモチーフを含むGPCRは、修飾GPCRが構成的に脱感作された受容体であるようにそのDRYモチーフ中に1つまたは複数のアミノ酸残基の付加、置換、欠失、または変異を有し得る。例として、修飾GPCRを得るためにアミノ酸残基の個別の点変異を得ることができる。例として、3つの連続するアミノ酸を、修飾GPCRが得られるように変異することができる。例として、修飾GPCRが得られるようにアルギニンをリジン以外の任意のアミノ酸、最も好ましくはアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、またはヒスチジンに変異することができる。

30

【0153】

さらに、修飾DRYモチーフを含む修飾GPCRを作製するために、特定のコドンを異なるアミノ酸をコードするコドンに変化させるようにGPCRの核酸配列を変異させることができる。一般に、可能な限り少ないヌクレオチドの変化によってこのような変異を行う。構成的に脱感作した受容体を形成する修飾DRYモチーフを作製するために、得られたタンパク質のアミノ酸を変化させるこの種の置換変異を行うことができる。例として、核酸配列を個別に点変異することができる。

40

【0154】

さらに、本発明の修飾GPCRを得るために、アゴニスト依存様式でアレスチンに結合するGPCRはまた、構成的に脱感作された受容体を形成する修飾DRYモチーフを有するGPCRのDRYモチーフと交換したそのDRYモチーフの全部または一部を有することができる。好ましくは、アゴニスト依存性様式でアレスチンに結合するGPCRのDRYモチーフを、DRYモチーフに極めて近接したアミノ酸残基と交換する。

【0155】

遺伝子操作分野で標準的な分子生物学的技術(ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、制限酵素、発現ベクター、およびプラスミドなどが含まれるが、これらに限定されない)によって修飾GPCRを作製することができる。例として、アレスチンに対するGPCRのアゴ

50

ニストに依存しない親和性を増強するようにベクターをデザインすることができる。修飾すべきGPCRのPCR増幅DNAフラグメントを、適切な制限酵素によって消化し、pcDNA3.1/zeoまたはpEGFP-N3などのベクターにサブクローン化することができる。上記の標準的な分子生物学的技術によってDNAの修飾を導入することができる。

【0156】

標準的な受容体結合アッセイによって示すことができるように、アレスチンに対するアゴニスト非依存性の親和性、すなわち構成的なエンドソームの局在化を除いて、修飾GPCRは野生型の対応物と実質的に区別することができない。例えば、修飾GPCRは、アンタゴニストまたは逆アゴニストなどに対して類似の親和性を有する。

10

【0157】

例として、図5に示すように、V2Rは、修飾されたエンドサイトーシス標的化を生ずる修飾R137H(図3)を有し得る。この修飾V2Rは、腎性尿崩症(NDI)に関連し得る。

【0158】**[GPCR活性のアッセイ方法]**

本発明の修飾GPCRは、GPCR活性のアッセイ方法において有用である。本発明の修飾GPCRを、アレスチンとの所望の相互作用または会合よりも強いGPCRおよびアレスチンとの相互作用または会合が未知であるGPCRを研究するためのアッセイにおいて使用することができる。修飾GPCRを使用する本発明の方法により感度の高いアッセイが得られ、例えば、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームにおいてアレスチン/GPCRの検出を増強することができる。本発明の修飾GPCRを使用するアッセイは、アンタゴニスト、逆アゴニスト、脱感作活性化化合物、および再感作活性化化合物などのための組成物、化合物、およびサンプル溶液などのスクリーニングに有用であり得る。一旦識別されると、これらの化合物は、GPCR活性を調整することができる薬物として有用であり、且つGPCRが関連する1つまたは複数の病態の治療において有用であり得る。

20

【0159】

本発明の好ましいアッセイでは、本発明の修飾GPCRを発現する細胞が得られ、これらの細胞はアレスチンと検出可能な分子との抱合体をさらに含み得る。

【0160】

GPCR経路で機能するので、検出可能な分子に結合したアレスチンを検出およびモニターすることができる。細胞質中に均一に分散しているか、細胞膜に濃縮されているか、クラスリンコートピットに濃縮しているか、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームに局在化しているアレスチンの位置を検出することができる。アレスチンのGPCRとの近接および任意の他の細胞構造との近接をモニターすることができる。アゴニストの存在下でのこの近接の変化を、分析することができる。例えば、アンタゴニストにตอบสนองして、細胞膜でGPCRに近接しているか、クラスリンコートピットでGPCRと共に濃縮されているか、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上でGPCRと共存しているアレスチンを検出することができる。

30

【0161】

好ましくは、本発明の修飾GPCRは、アゴニストの非存在下でアレスチンに対する親和性が増加し、修飾GPCRとアレスチンとの安定な複合体が得られ、それによりアゴニストの非存在下でエンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中に修飾GPCRとアレスチンとの共存が促進される。本発明のアッセイ方法では、例えば、細胞質中、細胞膜で修飾GPCRに近接して濃縮されているか、クラスリンコートピット中で修飾GPCRに近接して濃縮されているか、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上に修飾GPCRと共存しているアレスチンなどを検出することができる。好ましくは、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上でGPCRと共存したアレスチンを検出することができる。好ましくは、化合物は、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上でのアレスチンのGPCRとのこの共存を変化させることができる。

40

50

【0162】

エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上での修飾GPCRとのアレスチンの会合を、アゴニストの非存在下で検出することができる。エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上での修飾GPCRとのアレスチンの共存を、アンタゴニストの存在下で破壊することができる。エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム上でのGPCRとのアレスチンの会合により、強力で容易に認識可能なシグナルを得ることができる。40倍の対物レンズ下で、シグナルは、外観上はドーナツ型であり得る。エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中に共存するアレスチンとGPCRとの区画化 (compartmentalization) に起因するシグナルは、典型的には検出が容易である。同様に、この会合の遮断も検出が容易である。検出方法の例を、本明細書中に記載する。このような方法には、例えば、偏光顕微鏡法、BRET、FRET、エバネッセント波励起顕微鏡法、および標準的な顕微鏡法または共焦点顕微鏡法が含まれる。

10

【0163】

本発明のGPCR経路活性の評価方法は、(a)アゴニストを使用せずにエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化する修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを基質に結合させるステップと、(c)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントをアレスチンに曝露するステップと、および(e)修飾GPCRのアレスチンとの相互作用を決定するステップとを含み得る。

【0164】

GPCR経路活性の評価方法は、(a)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを、アレスチンを含む細胞中で発現させるステップと、(c)修飾GPCRのアレスチンとの相互作用を決定するステップとを含み得る。

20

【0165】

GPCR経路活性の評価方法は、(a)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)細胞内でのGPCRの細胞局在化を検出するステップとを含み得る。

【0166】

アレスチンは、修飾GPCRに近接して存在し得る。例えば、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中、クラスリンコートピット、および細胞膜に近接して濃縮したアレスチン、修飾GPCR、および/またはアレスチン/修飾GPCR複合体を検出することができる。好ましくは、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中のアレスチン、修飾GPCR、および/またはアレスチン/修飾GPCR複合体を検出することができる。したがって、アゴニストの非存在下で、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中のアレスチン、修飾GPCR、および/またはアレスチン/修飾GPCR複合体を検出することができる。エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中でのアレスチンのGPCRとの会合により、長期間持続する強力で容易に認識可能なシグナルを得ることができる。

30

【0167】

本発明の修飾GPCRを使用して、エンドソームの局在化を防止する第2の部位の変異をスクリーニングすることができ、これは疾患調整に関連し得る。構成的に脱感作された変異GPCRは、構成的エンドソームの局在化を防止する第2の部位に変異を有することができる。例として、変異受容体はまた、そのカルボキシル末端テールにアレスチン結合を減少させて構成的なエンドソーム局在化を防止する変異(AAAAAAに変異したSSSTSなど)を有し得る(図8)。GPCR中の第2の部位サブレッサー変異の識別方法は、(a)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)アレスチンを発現する細胞中で修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを発現させるステップと、(c)細胞を変異誘発物質に曝露するステップと、(d)細胞内のGPCRの位置を検出し、前記変異誘発物質がGPCRのエンドソーム局在化を阻害するかどうかを決定するステップと、および(e)第2の部位変異を識別するス

40

50

トップとを含む。GPCR中の第2の部位サブレッサー変異の識別方法は、PCRなどの標準的な分子生物学的技術によって得た、さらなる変異を含む修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)アレスチンを含む細胞中で修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを発現させるステップと、(c)細胞内の修飾GPCRの位置を検出し、前記変異がGPCRのエンドソーム局在化を阻害するかどうかを決定するステップと、および(e)第2の部位変異を識別するステップとを含む。このアプローチを、GPCR脱感作経路に関連するタンパク質中の第2の部位サブレッサー(例えば、GRKおよびアレスチンなど)の識別に使用することもできる。

【0168】

脱感作経路における変異タンパク質を、上記のスクリーニングで識別することができる。例えば、エンドサイトーシス経路での変異タンパク質により、構成的なエンドソーム局在化を防止することができる。例として、ダイナミン(K44A)変異体は、野生型ダイナミンの存在下でエンドソーム中に構成的に局在化される脱感作受容体の構成的なエンドソーム局在化を防止する(図14)。

10

【0169】

好ましくは、本明細書中に記載のように、アレスチンおよび/またはGPCRを検出可能な分子に結合させる。

【0170】

[スクリーニング方法]

本発明の修飾GPCRを使用して、アンタゴニスト、逆アゴニスト、修飾GPCRの構成的エンドソーム局在化を妨害する薬剤について組成物、化合物、サンプル溶液、化学的ライブラリー、組み合わせライブラリー、模倣ライブラリー、および免疫グロブリンなどをスクリーニングすることができる。したがって、修飾GPCRは、アゴニストの非存在下で上記の薬剤をスクリーニングすることができる。例として、図14および15は、GPCRの構成的なエンドソーム局在化を妨害するアンタゴニストを例示する。したがって、同様に、他のアンタゴニストなどを識別することができる。

20

【0171】

本発明のGPCR経路活性の評価方法は、(a)アゴニストを使用せずにエンドサイトーシス小胞またはエンドソームを標的化する修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを基質に結合させるステップと、(c)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを候補化合物に曝露するステップと、(d)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントをアレスチン(またはその生物学的に活性なフラグメント)に曝露するステップと、および(e)アレスチンの結合が前記候補化合物によって遮断されたかを決定するステップとを含む。

30

【0172】

修飾GPCRに結合するアゴニスト非依存性アレスチンを妨害する化合物の識別方法は、(a)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを、アレスチンを含む細胞中で発現させるステップと、(c)細胞を候補化合物に曝露するステップと、(d)細胞内のアレスチンの細胞局在化を検出し、前記候補化合物がアレスチンのエンドソーム局在化を妨害するかを決定するステップとを含む。

40

【0173】

修飾GPCRのアゴニスト非依存性エンドソーム局在化を妨害する化合物の識別方法は、(a)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを調製するステップと、(b)修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを、アレスチンを含む細胞中で発現させるステップと、(c)細胞を候補化合物に曝露するステップと、(d)細胞内の修飾GPCRの位置を検出し、前記候補化合物が修飾GPCRのエンドソーム局在化を妨害するかを決定するステップとを含む。

【0174】

50

好ましくは、本明細書中に記載されているように、アレスチンおよび/または修飾GPCRを検出可能な分子に結合させる。

【0175】

例として、化合物およびサンプル溶液を、本発明の修飾GPCRを使用してGPCRアンタゴニストまたは逆アゴニストについてスクリーニングすることができる。少なくとも1つの本発明の修飾GPCRを発現し、アレスチンおよび検出可能な分子をさらに含む細胞が得られる。細胞を、試験すべき組成物に曝露する。化合物への曝露によりアレスチンまたは修飾GPCRのエンドソーム局在化が妨害されるか(この妨害は、組成物がGPCRアンタゴニスト活性または逆アゴニスト活性を有することを示す)を検出する。修飾GPCRを、好ましくはカルボキシル末端で検出可能な分子と結合することもできる。上記で説明するように、本発明のようなGPCRに対する修飾により、アンタゴニストまたは逆アゴニストに対するGPCRの天然の親和性に影響を与えるべきではない。

10

【0176】

さらなる例として、化合物、組成物、およびサンプル溶液を、本発明の修飾GPCRを使用してGPCR再感作活性についてスクリーニングすることができる。少なくとも1つの本発明の第1の修飾GPCRを発現する第1の細胞であって、アレスチンおよび検出可能な分子をさらに含む第1の細胞を提供する。かかる第1の細胞を、試験すべき化合物またはサンプル溶液に曝露する。アレスチンの第1の修飾GPCRとの相互作用が組成物への曝露後に減少するかを検出する。アレスチンの第1の修飾GPCRとの相互作用を減少させる組成物について、該細胞および溶液を、受容体の既知のアゴニストまたはリガンドに曝露する。次いで、アレスチンの第1の修飾GPCRとの相互作用がアゴニストまたはリガンドへの曝露後に増加するか(組成物が再感作活性を有することを示す)を決定する。当該分野で既知のように、アレスチンの修飾GPCRとの相互作用を、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム、クラスリンコートピット、および細胞膜付近などで検出することができる。次いで、少なくとも1つの本発明の第2の修飾GPCRを発現する第2の細胞であって、アレスチンと検出可能な分子との抱合体をさらに含む第2の細胞を提供する。第2の修飾GPCRは、第1の修飾GPCRと無関係である。かかる第2の細胞を試験すべき組成物に曝露する。組成物への曝露後にアレスチンの第2の修飾GPCRとの相互作用が減少するかどうかを検出する。アレスチンの第2の修飾GPCRとの相互作用を減少させる組成物について、該細胞および溶液を、受容体の既知のアゴニストまたはリガンドに曝露する。ここで、相互作用の増加は、組成物が発現したGPCRに独立したGPCR再感作活性を有することを示す。アレスチンの修飾GPCRとの相互作用を、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム、クラスリンコートピット、および細胞膜付近などで検出することができる。好ましくは、第1の検出ステップでエンドサイトーシス小胞またはエンドソームでのアレスチンの修飾GPCRとの相互作用を検出し、第2の検出ステップでクラスリンコートピットまたは細胞膜付近でのアレスチンの修飾GPCRとの相互作用を検出し、第3の検出ステップでエンドサイトーシス小胞またはエンドソームでのアレスチンの修飾GPCRとの相互作用を検出する。

20

30

【0177】

GPCRを直接標的化する化合物に加えて(図14および15)、脱感作経路に関連する他のタンパク質を標識する化合物はまた、構成的な脱感作、特にエンドサイトーシス小胞またはエンドソームへの局在化を防止することができる。例として、ダイナミンを阻害する化合物は、脱感作受容体の構成的エンドソーム局在化を防止し、ダイナミンインヒビターの非存在下でエンドソーム中に構成的に局在化する。上記のダイナミンインヒビターは、このようなインヒビターの機能を示すダイナミン(K44A)変異体の効果を模倣することができる。

40

【0178】

[無細胞アッセイ(Cell Free Assays)]

無細胞アッセイで修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを分析することができる。

50

【0179】

本発明の無細胞アッセイでは、本発明の修飾GPCRが蓄積している基質が得られる。アレステンと検出可能な分子との接合物を含む流体を得ることもできる。

【0180】

修飾GPCRおよびアレステンを全細胞から得て、精製後に無細胞アッセイで使用することができる。修飾GPCRはアレステン結合部位を有し、多層または二重層脂質小胞中に維持することができる。修飾GPCRが維持されうる小胞は基質上に蓄積し、修飾GPCRは脂質小胞中に維持され、アレステン結合部位がアレステンに曝露されるように基質上に蓄積されうる。基質は、修飾GPCRがその上に蓄積することができる任意の人工基質であってよく、ガラス、プラスチック、ダイヤモンド、セラミック、半導体、シリカ、光ファイバー、生体適合性モノマー、生体適合性ポリマー、およびポリマービーズ（有機および無機ポリマー）などが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0181】

[抱合体]

本発明のアッセイ方法で使用する細胞は、アレステンタンパク質と検出可能な分子との抱合体を含むことができる。本発明の細胞および方法では、細胞はまた、本発明の修飾GPCRと検出可能な分子との抱合体を含むことができる。

【0182】

視覚アレステン、アレステン1、およびアレステン2を含んでもよいが、これらには限定されない全てのタイプのアレステン（天然のアレステンおよび操作された変異型アレステン）を本発明で使用することができる。本発明の修飾GPCRは、検出可能なレベルで全てのアレステンのタイプと相互作用することができる。

20

【0183】

アレステンとの結合に使用することができる検出可能な分子には、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、放射性手段、および光学的手段によって検出することができる分子（生体発光、リン光、および蛍光が含まれるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。検出可能な分子には、GFP、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、ローダミンコンジュゲート抗体などが含まれるが、これらに限定されない。検出可能な分子には、放射性同位体、エピトープタグ、アフィニティ標識、酵素、蛍光基、化学発光基などが含まれる。検出可能な分子には、他の分子とのその相互作用の関数として直接にまたは間接的に検出される分子が含まれる。これらの検出可能な分子は、生物学的に適合する分子であるべきであり、アレステンのGPCR系に相互作用する能力を妥協すべきではなく、アレステンのGPCR系との相互作用は検出すべき検出可能な分子の能力を妥協してはならない。好ましい検出可能な分子は、化学的、機械的、電氣的、または放射性的の蛍光、リン光、または生体発光を発するように励起することができるような光学的に検出可能な分子（光学的に検出可能なタンパク質が含まれる）である。より好ましい検出可能な分子は、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）が含まれる）などの本来の蛍光分子である。Barakeら（米国特許第5,891,646号および米国特許第6,110,693号）に記載の方法によって、検出可能な分子をアレステンタンパク質に結合させることができる。検出可能な分子を、アレステンの前部、後部、または中央部に結合させることができる。

30

40

【0184】

修飾GPCRまたはその生物学的に活性なフラグメントを、検出可能な分子と結合させることができる。好ましくは、修飾GPCRのカルボキシル末端を検出可能な分子に結合させる。検出可能な分子に結合させるか付着させたカルボキシル末端テールをカルボキシル末端テール交換で使用する、本発明の修飾GPCRを得ることができる。

【0185】

修飾GPCRが検出可能な分子に結合した場合、修飾GPCRのアレステンとの近接を容易に検出することができる。さらに、修飾GPCRが検出可能な分子にコンジュゲートした場合、修飾GPCRとアレステンとの区画化を容易に確認することができる。修飾GPC

50

C Rとの結合に使用される検出可能な分子には、上記の分子（例えば、化学的、機械的、電氣的、または放射性に蛍光、リン光、または生体発光を発するように励起することができるような光学的に検出可能な分子が含まれるが、これらに限定されない）を含み得る。好ましい光学的に検出可能な分子を、免疫蛍光、発光、蛍光、およびリン光によって検出することができる。

【0186】

例えば、修飾GPCRは、免疫蛍光分子に結合した抗体で標識した抗体であり、修飾GPCRを発光ドナーとコンジュゲートさせることができる。特に、修飾GPCRを、例えばルシフェラーゼ（例えば、Renillaルシフェラーゼ）またはローダミンコンジュゲート抗体（例えば、ローダミン結合抗HAMマウスモノクローナル抗体）と結合させることができる。好ましくは、修飾GPCRのカルボキシル末端テールを、発光ドナー（例えば、ルシフェラーゼ）とコンジュゲートさせることができる。L. S. Barakら、「機能的にインタクトな₂アドレナリン作動性受容体-緑色蛍光タンパク質抱合体の内部輸送および表面移動」、Mol. Pharm., 1997、51、177~184に記載のように、修飾GPCR、好ましくはカルボキシル末端テールを、GFPにコンジュゲートさせることもできる。

10

【0187】

[細胞型および基質]

本発明の細胞は、少なくとも1つの本発明の修飾GPCRを発現することができる。細胞は、さらに、アレスチンタンパク質と検出可能な分子との抱合体を含むことができる。有用な細胞には、真核細胞および原核細胞（細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、線虫細胞、植物細胞、および動物細胞）が含まれるが、これらに限定されない。適切な動物細胞には、HEK-293細胞、HeLa細胞、COS細胞、および種々の霊長類哺乳動物細胞が含まれるがこれらに限定されない。組織全体または特定の器官内または組織タイプ内のアレスチンと検出可能な分子との抱合体を発現する動物モデルを使用することもできる。

20

【0188】

本発明の細胞は、エンドサイトーシス小胞またはエンドソームにGPCRのアゴニスト非依存性で局在化する1つの修飾タンパク質を発現することができる。

【0189】

基質上に複数の本発明の細胞を蓄積することができる。基質は、任意の適切な生物学的基質（ガラス、プラスチック、セラミック、半導体、シリカ、光ファイバー、ダイヤモンド、生体適合性モノマーまたは生体適合性ポリマー材料）であってよい。

30

【0190】

[修飾GPCRの発現]

本発明の別の特徴は、本明細書中に開示のDNA配列の発現である。当該分野で周知のように、適切な発現ベクター中での発現調節配列へのDNA配列の作動可能な連結および適切な単細胞宿主の形質転換のためのこの発現ベクターの使用によって、DNA配列を発現させることができる。

【0191】

本発明のDNA配列の発現調節配列へのこのような作動可能な連結には、勿論、すでにDNA配列の一部でないにしても、DNA配列の上流の適当なリーディングフレーム中への開始配列(ATG)の提供が含まれる。

40

【0192】

広範な種々の宿主/発現ベクター組み合わせを、本発明のDNA配列の発現で使用することができる。有用な発現ベクターは、例えば、染色体セグメント、非染色体および合成のDNA配列からなるものであってよい。このようなベクターは、プラスミドおよび線状DNAなどであってよく、形質転換、トランスフェクション、および遺伝子銃などの標準的な方法を介して宿主に導入することができる。適切なベクターには、SV40の誘導體、公知の細菌プラスミド（例えば、大腸菌プラスミドcolEI、pCR1、pBR322

50

、 p M B 9、およびその誘導体)、 R P 4 などのプラスミド; フェージ D N A (例えば、
 フェージの多数の誘導体 (例えば、 N M 9 8 9)) および他のフェージ D N A (例えば
 、 M 1 3 および糸状菌一本鎖フェージ D N A) ; 2 μ プラスミドまたはその誘導体などの
 酵母プラスミド; 昆虫または哺乳動物で有用なベクターなどの真核細胞で有用なベクター
 ; フェージ D N A または他の発現調節配列を使用するように修飾したプラスミドなどのプ
 ラスミドとフェージ D N A との組み合わせに由来するベクターが含まれる。

【 0 1 9 3 】

任意の広範な種々の発現調節配列 (すなわち、作動可能に連結される D N A 配列の発現を
 調節する配列) をこれらのベクターで使用して、本発明の D N A 配列を発現することがで
 きる。このような有用な発現調節配列には、例えば、 S V 4 0、 C M V、ワクシニアウイル
 ス、ポリオマウイルス、またはアデノウイルスの初期プロモーターまたは後期プロモ
 ーター、 l a c 系、 t r p 系、 T A C 系、 T R C 系、 L T R 系、 フェージの主要なオペ
 レーターおよびプロモーター領域、 f d 外殻タンパク質の調節領域、 3 - ホスホグリセレ
 ートキナーゼまたは他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター (
 例えば、 P h o 5)、酵母 交配因子のプロモーター、原核細胞もしくは真核細胞または
 そのウイルスの遺伝子発現を調節することが知られている他の配列、ならびにそれらの種
 々の組み合わせが含まれる。

10

【 0 1 9 4 】

広範な種々の単細胞宿主細胞はまた、本発明の D N A 配列の発現で有用である。これらの
 宿主には、真核生物宿主および原核生物宿主類 (大腸菌、シュドモナス、バチルス、ス
 トレプトミセス、酵母 (例えば、サッカロミセス) などの真菌、植物細胞、線虫細胞、お
 よび H E K - 2 9 3 細胞、 C H O 細胞、 R I . I 細胞、 B - W 細胞、 L - M 細胞、アフリ
 カミドリザル腎細胞 (例えば、 C O S - 1、 C O S - 7、 B S C 1、 B S C 4 0、および
 B M T 1 0 細胞)、昆虫細胞 (例えば、 S f 9 細胞)、およびヒト細胞などの動物細胞な
 らびに組織培養における植物細胞など) を含んでもよい。

20

【 0 1 9 5 】

全てのベクターではないが、発現調節配列および宿主は本発明の D N A 配列を発現するよ
 うに十分に等しく機能することが理解される。全ての宿主が同一の発現系で等しく十分に
 機能するわけではない。しかし、当業者は、本発明の範囲を逸脱することなく、所望の発
 現を達成するための過度の実験を行うことなく、適切なベクター、発現調節配列、および
 宿主を選択することができる。例えば、ベクターの選択では、宿主中でベクターが作動可
 能でなければならないので、宿主を考慮しなければならない。ベクターのコピー数、コピ
 ー数を調節する能力、およびベクターによってコードされる任意の他のタンパク質発現 (
 抗生物質マーカーなど) も考慮する。

30

【 0 1 9 6 】

発現調節配列の選択では、通常、種々の因子を考慮する。これらには、例えば、特に潜在
 的な二次構造に関する系の相対強度、調節性、および発現すべき特定の D N A 配列または
 遺伝子との適合性が含まれる。適切な単細胞宿主を、例えば、選択したベクターとの適合
 性、分泌特性、タンパク質を正確に折りたたむ能力、および発酵要件、発現すべき D N A
 配列によってコードされる産物の宿主に対する毒性、および発現産物の精製の容易さを考
 慮することによって選択する。

40

【 0 1 9 7 】

これらおよび他の因子を考慮して、当業者は、発酵または大規模な動物培養において D N
 A 配列を発現する種々のベクター / 発現調節配列 / 宿主組み合わせを構築することができ
 る。

【 0 1 9 8 】

修飾 G P C R 類似体を、本発明の範囲内のタンパク質複合体 / サブユニットのヌクレオチ
 ド配列から調製することができる。修飾 G P C R のフラグメント
 などの類似体を、例えば、修飾 G P C R 材料のペプシン消化によって産生することができ
 る。ムテインなどの他の類似体を、修飾 G P C R コード配列の標準的な部位特異的変異誘

50

発によって産生することができる。プロモーターまたはインヒビターのいずれかとして機能する小分子などの修飾 GPCR のように機能する類似体を、既知のインビボおよび/またはインビトロアッセイによって識別することができる。

【0199】

上記のように、修飾 GPCR をコードする DNA 配列を、クローン化よりもむしろ合成によって調製することができる。DNA 配列を、修飾 GPCR アミノ酸配列の適切なコドンを使用してデザインすることができる。一般に、発現のために配列を使用する場合、意図する宿主の好ましいコドンを選択する。完全な配列を、標準的な方法によって調製した重複オリゴヌクレオチドから構築し、完全なコード配列に組み立てる。例えば、Edge ら、Nature、292、756~762、1981; Nambiar ら、Science、223、1299~1301、1984; Jay ら、J. Biol. Chem., 259、6311~6317、1984 を参照のこと。

10

【0200】

合成 DNA 配列により、GPCR 類似体または「ムテイン」を発現する遺伝子を都合よく構築可能である。あるいは、ムテインをコードする DNA を、天然または修飾 GPCR 遺伝子または cDNA の部位特異的変異誘発によって作製することができ、従来のポリペプチド合成を使用してムテインを直接作製することができる。

【0201】

非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的組み込みの一般的な方法は、Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science、244、182~188、1989年4月に記載されている。この方法を使用して、非天然アミノ酸を含む類似体を作製することができる。一般に、非天然アミノ酸は、Aldrich and Bachem などの業者から市販されている。非天然アミノ酸の例には、ホモセリン、ホモシステイン、N-メチルアルギニン、ノルロイシン、N-メチルイソロイシン、フェニルグリシン、ヒドロキシプロリン、ピログルタミン、オルニチン、2-アミノイソ酪酸、2-アミノ酪酸、シクロヘキシルアラニン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、シトルリン、ピペコリン酸、ピペラジン酸、4-クロロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、およびサルコシンが含まれる。

20

30

【0202】

[検出方法]

アレスチンと検出可能な分子との抱合体の細胞内の位置、検出可能な分子に融合した GPCR の細胞内の位置、または検出可能な分子に結合したアレスチンの GPCR との相互作用、または任意の他の細胞構造（例えば、細胞膜でのアレスチン濃度、エンドサイトーシス小胞またはエンドソーム中でのアレスチンの GPCR との共存、クラスリンコートピット中でのアレスチン濃度などを含む）の検出方法は、使用した検出可能な分子に依存して変化する。当業者は、使用した検出可能な分子に適切な検出方法を考え出すことができる。光学的に検出可能な分子のために、放出された光の再分布 (redistribution) または再配向によって蛍光、生体発光、またはリン光の変化を測定することができる任意の光学的

40

【0203】

好ましい実施形態では、アレスチンを GFP にコンジュゲートさせ、アレスチン-GFP 抱合体を共焦点顕微鏡法によって検出することができる。別の好ましい実施形態では、アレスチンを GFP にコンジュゲートさせ、修飾 GPCR を免疫蛍光分子にコンジュゲートさせ、抱合体を共焦点顕微鏡法で検出することができる。さらに好ましい実施形態では、アレスチンを GFP にコンジュゲートさせ、修飾 GPCR のカルボキシ末端をルシフェラーゼにコンジュゲートさせることができる。これらの抱合体を、生体発光共鳴放射技術 (

50

bioluminescence resonance emission technology) によって検出することができる。さらに好ましい実施形態では、アレスチンをルシフェラーゼにコンジュゲートさせ、修飾 GPCR を GFP にコンジュゲートさせることができる。ルシフェラーゼ / GFP 抱合体を、生体発光共鳴放射技術によって検出することができる。本発明の方法は、GPCR 活性の検出に関する。本発明の方法により、リアルタイムで GPCR 経路のモニタリングを増強することができる。

【0204】

[診断および治療上の処置]

GPCR の存在によって得られる診断および治療上の処置の可能性は、因子が直接関連してリガンド間のタンパク質 - タンパク質相互作用の原因となり、その後細胞内シグナルを開始するという事実由来する。以前に考察され、本明細書中でさらに詳述するように、本発明は、天然または修飾 GPCR が関連する、GPCR によって開始される活性を調整する反応のカスケードにおける薬学的な介入を意図する。

10

【0205】

したがって、特定の刺激または因子に起因する活性の減少または阻害を所望する例では、GPCR のリガンドとの相互作用を遮断するために適切な GPCR のインヒビターを導入することができる。これに対して、G タンパク質または第 2 のメッセンジャーの不十分な活性化が起こる例を、さらなる量の GPCR またはそのキメラもしくは薬学的に同種の物質、類似体、およびフラグメントなどの導入によって修復することができる。

【0206】

本発明は、さらに、本発明の治療方法の実施において有用な治療用組成物を意図する。本発明の治療用組成物には、薬学的に許容可能な賦形剤 (キャリア) および本明細書中に記載の有効成分として 1 つまたは複数の GPCR のアゴニスト、GPCR のアンタゴニスト、または GPCR の DAC の混合物が含まれる。好ましい実施形態では、組成物は、標的細胞での GPCR のリガンドとの特異的結合を調整することができる薬物を含む。

20

【0207】

[抗体]

また、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む抗体、修飾 GPCR および / またはその生物学的に活性なフラグメントもしくはサブユニットの産生または活性を調整する薬物は、一定の診断用途を有し、例えば、ウイルス感染などの病態を検出および / または測定する目的に使用することができる。例えば、修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントもしくはサブユニットを使用して、種々の細胞培地中で、例えば、融合マウス脾臓リンパ球および骨髓腫細胞を使用したハイブリドーマ技術などの公知の技術によって修飾 GPCR またはその生物学的に活性なフラグメントもしくはサブユニットに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方を産生することができる。同様に、本発明の修飾 GPCR 活性を模倣する小分子または遮断する (antagonize) 小分子を発見するか合成することができ、これを診断および / または治療プロトコールで使用することができる。

30

【0208】

同様に、本発明は、天然に生じて、組換えで調製された抗体を含む、修飾 GPCR に対する抗体の開発に関する。例えば、抗体を使用して発現ライブラリーをスクリーニングし、修飾 GPCR をコードする遺伝子を得ることができる。このような抗体には、既知の遺伝子技術によって調製したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、二重特異的 (キメラ) 抗体、ならびに修飾 GPCR 活性を調整する能力を使用してさらなる診断に適切な他の機能性を含む抗体を含み得る。好ましくは、本発明の診断方法で使用される抗修飾 GPCR 抗体は、アフィニティ精製したポリクローナル抗体である。より好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体 (mAb) である。さらに、本明細書中で使用される抗修飾 GPCR 抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(v)、または scFv の形態であることが好ましい。

40

【0209】

50

ハイブリドーマによる一般的なモノクローナル抗体の作製方法は周知である。モノクローナル抗GPCR抗体の産生方法も当該分野で周知である。Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80、4949～4953、1983を参照のこと。典型的には、先に記載の抗GPCRモノクローナル抗体の産生手順において、GPCRまたはペプチド類似体を免疫原として単独でまたは免疫原性キャリアと共に使用する。ハイブリドーマが培地中に抗体を分泌するのに十分な条件下および期間で培養物を維持する。ハイブリドーマを、GPCRまたはペプチド類似体と免疫反応する抗体の産生能力についてスクリーニングする。次いで、抗体含有培地を回収する。次いで、抗体を、周知の技術によってさらに単離することができる。不死化抗体産生細胞株を、癌性DNAでのBリンパ球の直接形質転換またはエプスタイン・バーウイルスでのトランスフェクションなどの融合以外の技術によって作製することもできる。例えば、「抗体の使用：実験マニュアル」、Harlow編、Lane, David、Cold Spring Harbor Press、1999を参照のこと。

【0210】

これらの組成物の調製に有用な培地は、当該分野で周知で、市販されており、このような培地には人工培地および近交系マウスなどが含まれる。人工培地の例としては、4.5 g/mlのグルコース、20 mMのグルタミン、および20%のウシ胎児血清を補足したダルベッコ最小基本培地(DMEM; Dulbeccoら、Virol., 8、396、1956)である。好ましい近交系マウス系列は、Balb/cである。

【0211】

ポリクローナル抗ポリペプチド抗体の産生方法は、当該分野で周知である。Nestorらに付与された米国特許第4,493,795号を参照のこと。モノクローナル抗体およびその免疫学的に活性なフラグメントを、「抗体の使用法：実験マニュアル」、Harlow, Ed and Lane, David、Cold Spring Harbor Press、1999(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に記載のハイブリドーマ技術を使用して調製することができる。簡単に述べれば、モノクローナル抗体組成物を産生するハイブリドーマを形成するために、骨髄腫細胞または他の自己永続的細胞株を、GPCRで超免疫化した哺乳動物の脾臓から得たリンパ球と融合する。脾細胞を、典型的には、ポリエチレングリコール(PEG)6000 MWを使用して骨髄腫細胞に融合する。融合ハイブリッドを、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)補足培地に対する感受性によって選択する。本発明実施で有用なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、本発明のGPCRと免疫応答する能力および標的細胞中で特定のGPCR活性を阻害する能力によって識別する。

【0212】

特に、特異的にリン酸化された因子に対する抗体を選択することができ、これは以下の活性化タンパク質の特定の能力について本発明の範囲内に含まれる。したがって、修飾GPCRまたは関連すると考えられる特異的ポリペプチドの能力を、適切な標識量の修飾GPCRまたはその抗体もしくは類似体を使用した本明細書中で考察されたアッセイ技術によって直接追跡することができる。

【0213】

修飾GPCRペプチドに対して産生されたモノクローナル抗体のパネルを、種々の性質(すなわち、イソ型、エピトープ、および親和性など)についてスクリーニングすることができる。修飾GPCRまたはそのサブユニットの活性を中和するモノクローナル抗体を特に目的とする。このようなモノクローナル抗体を、GPCRアッセイで容易に識別することができる。高アフィニティ抗体はまた、天然GPCRまたは組換え修飾GPCRの免疫アフィニティ精製が可能である場合に有用である。

【0214】

したがって、修飾GPCR類、それらの類似体および/または、類似体および修飾GPCRに対して惹起され得る任意のアンタゴニストまたは抗体は、種々の診断技術(例えば、放射性添加物または放射性ヨウ素化のいずれかによって標識されたGPCRに対する抗体

を使用したラジオイムノアッセイなどの免疫アッセイを含む)と共に使用することができる。

【0215】

免疫アッセイでは、対照量のアンタゴニストまたはそれに対する抗体などを調製し、酵素、特異的結合パートナーおよび/または放射性エレメントで標識し、細胞サンプルに導入することができる。標識材料またはその結合パートナーがサンプル内の部位と反応する機会を有していた場合、得られた集合物を既知の技術(結合した標識の性質によって変化し得る)によって試験することができる。例えば、特異的にリン酸化された因子に対する抗体を選択し、上記のように以下の活性化タンパク質の目的のためにアッセイプロトコールの例において適切に使用することができる。

【0216】

放射性標識(^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、および ^{186}Re などであるが、これらに限定されない)を使用する場合、現在既知の利用可能な計数手段を使用することができる。標識が酵素である場合、本明細書中で考察され、当該分野で公知の現在使用されている任意の比色分析技術、分光学的分析技術、蛍光分光学的技術、電流滴定法、またはガス分析技術によって検出することができる。

【0217】

前記で示唆されるように、本発明の診断方法は、抗修飾GPCR抗体、好ましくはアフィニティ精製したポリクローナル抗体、より好ましくはmAbなどの修飾GPCR/タンパク質に対する有効量のアンタゴニストを含むアッセイによって細胞サンプルまたは培地を試験するステップを含む。さらに、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(v)、またはscFvの形態である本明細書中で使用される抗修飾GPCR抗体フラグメントが好ましい。先で考察されるように、この方法の利益を得ることができる患者には、癌患者、前癌性病変患者、ウイルス感染患者、または他の類似の病態または疾患の患者が含まれる。抗修飾GPCR抗体を含む修飾GPCRを単離し、抗修飾GPCR抗体の標的細胞の試験を補助する能力を決定および最適化する方法は、当該分野で周知である。

【0218】

本発明は、修飾GPCRの存在範囲を定量し、その活性を模倣するか遮断することができる薬物または他の薬剤を識別するための試験キットの形態で準備することができるアッセイシステムを含む。そのようなシステムまたは試験キットは、本明細書中で述べた放射性の技術および/または酵素技術の1つによって調製される標識成分であって、標識を修飾GPCR、そのアゴニストおよび/またはアンタゴニストに結合する標識成分と、1つまたは複数のさらなる免疫化学的試薬であって、そのうちの少なくとも1つが、標識成分、その結合パートナー、識別される成分の1つ、またはその結合パートナーのいずれかと結合することができる遊離リガンドまたは固定リガンドである免疫化学的試薬とを含んでもよい。

【0219】

[アンチセンス組成物およびその使用]

別の実施形態では、上記方法によって識別される遺伝子の発現を調整するためのアンチセンス組成物および方法が得られる。好ましいアンチセンス組成物は、本明細書中に開示されているか当該分野で公知の系統的なイン・シリコ発見法を使用して標的核酸を識別するものである。好ましいアンチセンス組成物は、例えば、配列番号7~配列番号12(図17)を標的化することができる。

【0220】

アンチセンスの特異的核酸を標的化することが好ましい。アンチセンス組成物の特定の核酸への「標的化」は、タンパク質をコードする本明細書中に開示の系統的なイン・シリコ法によって識別された核酸であることが好ましい。遺伝子は、病原性の生物に由来し得る。標的化は、アンチセンス領域の標的遺伝子内の部位(例えば、遺伝子または遺伝子転写物の機能を調整するためのセンス鎖およびアンチセンス鎖の連結物質)の決定を含む。好

10

20

30

40

50

ましいアンチセンス組成物は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始コドンまたは終止コドンを含む部位を認識して結合する組成物である。当該分野で知られているように、典型的には、翻訳開始コドンは5'-AUGであるので（転写mRNA分子中；対応するDNA分子中の5'-ATG）、翻訳開始コドンを、「AUGコドン」、「開始コドン」、または「AUG開始コドン」ともいう。少数の遺伝子は、インビボで機能することが認められているRNA配列5'-GUG、5'-UUG、または5'-CUGおよび5'-AUA、5'-ACG、および5'-CUGを有する翻訳開始コドンを有する。したがって、用語「翻訳開始コドン」および「開始コドン」は、それぞれの場合の開始アミノ酸は典型的にはメチオニン（真核生物）またはホルミルメチオニン（原核生物）であるにもかかわらず、多数のコドン配列を含み得る。

10

【0221】

真核生物遺伝子と原核生物遺伝子とが2つまたはそれ以上の代替の開始コドンを有し、好ましくは、その任意の1つを特定の細胞型もしくは組織または特定の条件下で使用することができることも当該分野で知られている。本発明の文脈では、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、インビボで本明細書中に開示の系統的なイン・シリコ法または本明細書中に開示の配列によって識別されたタンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNA分子の翻訳を開始するために使用されるコドンをいう。

【0222】

遺伝子転写物の翻訳終止コドン（または「終止コドン」）は、3つの配列（すなわち、5'-UAA、5'-UAG、および5'-UGA（対応するDNA配列は、それぞれ5'-TAA、5'-TAG、および5'-TGAである））のうちの1つを有し得る。用語「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」は、翻訳開始コドン由来のいずれかの方向（すなわち、5'または3'方向）の約25～約50個の連続するヌクレオチドを含むこのようなmRNAまたは遺伝子の一部をいう。同様に、用語「終止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」は、翻訳終止コドン由来のいずれかの方向（すなわち、5'または3'方向）の約25～約50個の連続するヌクレオチドを含むこのようなmRNAまたは遺伝子の一部をいう。好ましいアンチセンス組成物は、コードする任意の標的遺伝子またはmRNA転写物の終止コドンおよび/または開始コドンを含む領域を認識して結合する。

20

【0223】

当該分野において、翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域をいうことが知られているオープンリーディングフレーム（ORF）または「コード領域」は、また、アンチセンス組成物の好ましい標的を有し得る領域である。他の標的領域には、5'非翻訳領域（5'-UTR）および3'非翻訳領域（3'-UTR）が含まれる。5'-UTRは、翻訳開始コドン由来の5'方向のmRNAの一部をいうので、mRNAまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドの5'キャップ部位と翻訳開始コドンとの間のヌクレオチドを含む。3'非翻訳領域（3'-UTR）は、翻訳終止コドン由来の3'方向のmRNAの一部をいうので、mRNAまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドの翻訳終止コドンと3'末端との間のヌクレオチドを含む。mRNAの5'キャップは、5' 5'三リン酸結合を介してmRNAのほとんどの5'残基と結合したN7メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域を、5'キャップ構造自体およびキャップに隣接する最初の50ヌクレオチドを含むとみなす。5'キャップ領域はまた、アンチセンス組成物の好ましい標的領域であり得る。

30

40

【0224】

真核生物では、遺伝子はイントロンおよびエクソンから構成され、エクソンは遺伝子のタンパク質産物をコードする材料を含む。イントロン材料は、mRNAを産生する遺伝子から転写されるが、タンパク質への翻訳前にmRNA転写物から切り出される。エクソンと共にスプライシングして連続したmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位（すなわち、イントロンとエクソンの連結点）はまた、アンチセンス組成物の好ましい標的領域であり、異常なスプライシングが疾患に関連するか、特定のmRNAスプライス産物の

50

過剰産生が疾患に関連する状況において特に有用である。再整列または欠失による異常な融合連結点もまた好ましい標的である。イントロンもまた有効であり、それにより例えば DNA または プレ mRNA に標的されたアンチセンス組成物の好ましい標的領域であり得ることも見出された。

【0225】

一旦系統的な発見法を使用して識別した遺伝子中に1つまたは複数の標的部位が識別されると、所望の生物学的結果（例えば、GPCR 関連疾患または病態の阻害および/または予防、調整した GPCR 活性の調整、アレスチン活性の調整）が得られるように標的に十分に相補的な（すなわち、十分にハイブリダイゼーションし、十分な特異性を有する）オリゴヌクレオチドを選択する。

10

【0226】

本発明の文脈では、「ハイブリダイゼーション」は、相補的なヌクレオシド塩基間、またはヌクレオチド塩基間との間のワトソン・クリック、Hoogsteen、または逆Hoogsteen水素結合であり得る水素結合を意味する。例えば、アデニン（A）およびチミン（T）は、水素結合の形成を介して対合する相補的核酸塩基である。本明細書中で使用される、「相補的」は、典型的には2つのヌクレオチド間の正確な対合能力をいう。例えば、オリゴヌクレオチドの一定の位置のヌクレオチドがDNAまたはRNA分子の同一の位置のヌクレオチドと水素結合することができる場合、オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは、その位置で互いに相補的であると考えられる。オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは、各分子中の対応する位置で互いに水素結合することができるヌクレオチドが十分な数である場合、互いに相補的である。アンチセンス組成物の配列は特異的にハイブリダイゼーションされる標的核酸の配列と100%相補的である必要がないことが当該分野で理解される。あるいは、この遺伝子を使用して三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給することができる。アンチセンス組成物は、典型的には、組成物の標的DNAまたはRNA分子への結合が有用性を喪失させる標的DNAまたはRNAの正常な機能を妨害する場合、特異的にハイブリダイゼーション可能である。特異的結合が望ましい条件下でアンチセンス組成物の非標的配列への非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性である場合、有用性が喪失する。好ましい特異的結合の条件は、インビボアッセイまたは治療上の処置の場合は生理学的条件であり、インビトロアッセイの場合はアッセイが行われる条件である。

20

30

【0227】

意図する好ましいアンチセンス組成物は、研究試薬および診断薬用である。例えば、特定の遺伝子の機能を解明するために遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドがしばしば使用される。例えば、生物学的経路の種々のメンバーの機能を区別するためにもアンチセンス組成物を使用する。したがって、アンチセンス調整は、研究で役立っている。

【0228】

オリゴヌクレオチドは、動物およびヒトの病態の治療における治療部分として使用されている。したがって、オリゴヌクレオチドは、細胞、組織、および動物（特に、ヒト）の治療計画で有用であるように形成することができる有用な治療方法であり得ることが確立されている。本発明の文脈では、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA）またはその模倣物のオリゴマーまたはポリマーをいう。この用語には、天然に存在する核酸塩基、糖、およびヌクレオシド間（骨格）の共有結合、ならびに同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。例えば、細胞取り込みの向上、核酸標的に対する親和性の向上、およびヌクレアーゼの存在下での安定性の増加などの望ましい性質のために、このような修飾されたまたは置換されたオリゴヌクレオチドはしばしば天然の形態よりも好ましい。

40

【0229】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはアンチセンス組成物の好ましい形態である一方で、本発明は、他のオリゴマーアンチセンス組成物（下記のものなどのオリゴヌクレオチド模倣

50

物が含まれるが、これらに限定されない)を含む。本発明のアンチセンス組成物は、好ましくは、約8個～約30個の核酸塩基(すなわち、約8個～約30個の連結したヌクレオシドおよびその間の全ての長さのもの)を含む。アンチセンス組成物は、30個よりも長くてもよい(例えば、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個またはそれ以上およびこの間の範囲)。しかし、より好ましいアンチセンス組成物は、約12個～約25個の核酸塩基およびその間の全ての長さのものを含む。

【0230】

当該分野で公知のように、核酸塩基は、塩基と糖との組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常、複素環式塩基である。このような複素環式塩基の2つの最も一般的なクラスは、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドについて、リン酸基は糖の2'、3'、または5'水酸基部分のいずれかに連結することができる。オリゴヌクレオチドの形成では、リン酸基は互いに隣接するヌクレオシドと共有結合して、線状ポリマー組成物を形成する。次いで、この線状ポリマー構造の各末端をさらに結合させて環状構造を形成することができる。しかし、一般に、アンチセンス組成物としての使用には開環線状構造が好ましい。オリゴヌクレオチド構造内で、一般に、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間骨格の形成に関する。RNAおよびDNAの正常な結合または骨格は、3' 5'リン酸ジエステル結合である。

【0231】

本発明で有用な好ましいアンチセンス組成物の特定の例には、修飾された骨格または非天然のヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書で定義されるように、修飾骨格を有するオリゴヌクレオチドには、骨格中にリン原子を保有するものおよび骨格中にリン原子を含まないものが含まれる。本明細書に記載の目的のために、そして当該分野でしばしば参照されるように、ヌクレオチド骨格中にリン原子を含まない修飾オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドと考えることもできる。

【0232】

アンチセンス組成物で使用される好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えば、ホスホロチオエート類、キラルホスホロチオエート類、ホスホロジチオエート類、ホスホトリエステルの類、アミノアルキルホスホトリエステルの類、メチルホスホナート類および他のアルキルホスホナート類(3'-アルキレンホスホナート類およびキラルホスホナート類が含まれる)、ホスフィンート類、ホスホラミデート類(3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデート類が含まれる)、チオノホスホラミデート類、チオノアルキルホスホナート類、チオノアルキルホスホトリエステルの類、および正常な3' 5'結合を有するボラノホスフェート類、これらの2' 5'結合類似体、隣接するヌクレオチド単位の対が3' 5'から5' 3'または2' 5'から5' 2'で結合した逆の極性(inverted polarity)を有するものが含まれる。種々の塩、混合塩、および遊離酸形態もまた含まれる。このようなリンを含む結合のさらなる調製方法については、例えば、米国特許第3,687,808号、米国特許第4,469,863号、米国特許第4,476,301号、米国特許第5,023,243号、米国特許第5,177,196号、米国特許第5,188,897号、米国特許第5,264,423号、米国特許第5,276,019号、米国特許第5,278,302号、米国特許第5,286,717号、米国特許第5,321,131号、米国特許第5,399,676号、米国特許第5,405,939号、米国特許第5,453,496号、米国特許第5,455,233号、米国特許第5,466,677号、米国特許第5,476,925号、米国特許第5,519,126号、米国特許第5,536,821号、米国特許第5,541,306号、米国特許第5,550,111号、米国特許第5,563,253号、米国特許第5,571,799号、米国特許第5,587,361号、および米国特許第5,625,050号を参照のこと。

【0233】

リン原子を含まない好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子、およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子または複素環ヌクレオシド結合によって形成された骨格を有し得る。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から一部形成されている）；シロキサノ骨格；スルフィド、スルホキシド、およびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファマート骨格；メチレンイミノ骨格およびメチレンヒドラジノ骨格；スルホナート骨格およびスルホンアミド骨格；アミド骨格；およびN、O、S、および CH_2 成分部分が混合した他の骨格を有するものが含まれる。リン原子を欠く修飾オリゴヌクレオチド骨格の調製方法については、例えば、米国特許第5,034,506号、米国特許第5,166,315号、米国特許第5,185,444号、米国特許第5,214,134号、米国特許第5,216,141号、米国特許第5,235,033号、米国特許第5,264,562号、米国特許第5,264,564号、米国特許第5,405,938号、米国特許第5,434,257号、米国特許第5,466,677号、米国特許第5,470,967号、米国特許第5,489,677号、米国特許第5,541,307号、米国特許第5,561,225号、米国特許第5,596,086号、米国特許第5,602,240号、米国特許第5,610,289号、米国特許第5,602,240号、米国特許第5,608,046号、米国特許第5,610,289号、米国特許第5,618,704号、米国特許第5,623,070号、米国特許第5,663,312号、米国特許第5,633,360号、米国特許第5,677,437号、および米国特許第5,677,439号を参照のこと。

【0234】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣物には、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合（すなわち、骨格）が新規の基に置換されたような置換が含まれる。適切な核酸標的組成物とのハイブリダイゼーションのために塩基単位を保持する。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されている1つのこのようなオリゴマー組成物（オリゴヌクレオチド模倣物）を、ペプチド核酸（PNA）という。PNA組成物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格を、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格と置換する。核酸塩基を保持し、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接にまたは間接的に結合させる。このような方法の考察については、例えば、米国特許第5,539,082号、米国特許第5,714,331号、米国特許第5,719,262号、およびNielsenら、*Science*、1991、254、1497~1500を参照のこと。

【0235】

本発明の最も好ましい実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子骨格、特に $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ （メチレン（メチルイミノ）またはMMI骨格として公知）、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、および $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ （天然のホスホジエステル骨格を $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ と示す）、およびアミド骨格（米国特許第5,602,240号に記載のものなど）を有するオリゴヌクレオチドである。モルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチド（米国特許第5,034,506号に記載のものなど）も好ましい。

【0236】

本明細書中で意図されるアンチセンス組成物として使用される修飾オリゴヌクレオチドはまた、1つまたは複数の置換糖部分を含むことができる。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'の位置に $-\text{OH}$ ； $\text{F}-$ ； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ 、または $\text{N}-$ アルキル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ 、または $\text{N}-$ アルケニル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ 、または $\text{N}-$ アルキニル；または $\text{O}-$ アルキル- $\text{O}-$ アルキルの1つを含み、前記アルキル、アルケニル、およびアルキニルを $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキルまたは $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルケニルおよびアルキニルに置換してもしなくても良い。 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 、および $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ （ n および m は1~約10

である)が特に好ましい。他の好ましいオリゴヌクレオチド類は、2'の位置に、 $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルもしくはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターイカレータ、オリゴヌクレオチドの薬理学的特性を向上させる基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改良する基、および類似の性質を有する他の置換基の1つを含み得る。好ましい修飾には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂-CH₂-OCH₃)、2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても公知、Martinら、Helv. Chim. Acta、1995、78、486 ~ 504)、すなわち、アルコキシアルコキシ基が含まれる。別の好ましい修飾には、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ(すなわち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、2'-DMAOEとしても公知)および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該分野で2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても公知)が含まれる。

【0237】

意図されるアンチセンス組成物に対する他の好ましい修飾には、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位、2'-5'結合オリゴヌクレオチド中、および5'末端ヌクレオチドの5'位で類似の修飾を行うこともできる。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりのシクロブチル部分などの糖模倣物を含み得る。このような修飾された糖構造の調製方法については、例えば、米国特許第4,981,957号、米国特許第5,118,800号、米国特許第5,319,080号、米国特許第5,359,044号、米国特許第5,393,878号、米国特許第5,446,137号、米国特許第5,466,786号、米国特許第5,514,785号、米国特許第5,519,134号、米国特許第5,567,811号、米国特許第5,576,427号、米国特許第5,591,722号、米国特許第5,597,909号、米国特許第5,610,300号、米国特許第5,627,053号、米国特許第5,639,873号、米国特許第5,646,265号、米国特許第5,658,873号、米国特許第5,670,633号、および米国特許第5,700,920号を参照のこと。

【0238】

オリゴヌクレオチドはまた、核酸塩基(しばしば当該分野で単純に「塩基」という)の修飾または置換を含み得る。本明細書中で使用される、「非修飾」または「天然」核酸塩基には、プリン塩基であるアデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U)が含まれる。本発明はまた、アンチセンス組成物中での修飾ヌクレオチドの使用を含む。このような修飾ヌクレオチドには、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、および2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシン、およびチミン、5-ウラシル(偽ウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の8置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ(例えば、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル)および他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、および3-デアザグアニン、および3-デアザアデニンなどの他の合成および天然の核酸塩基が含まれる。さらなる核酸塩基は当業者に既知である。例えば、米国特許第3,687,808号、「コンサイスポリマー科学技術百科事典」、858~859、Kros

chwitz, J. I. 編、John Wiley & Sons、1990; English 版、ANGEWANDTE CHEMIE、第30巻、613、International Edition、1991; およびSanghvi, Y. S., 第15章、「アンチセンス研究と応用」、289~302、Crookeら、CRC Press、1993を参照のこと。一定のこれらの核酸塩基は、本発明のオリゴマー組成物の結合親和性の増加において特に有用である。これらには、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、およびO-6置換プリン(2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンが含まれる)が含まれる。5-メチルシトシン置換により、核酸二重鎖の安定性が0.6~1.2増加することが認められ(Sanghvi, Y. S.ら、1993)、これは現在好ましい塩基置換であり、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合さらにより好ましい。

10

【0239】

アンチセンス組成物での使用が意図される別のオリゴヌクレオチドの修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強する1つまたは複数の部分または抱合体へのオリゴヌクレオチドの化学結合を含む。このような部分には、コレステロール部分などの脂質部分(Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1989、86、6553~6)、コール酸(Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994、4、1053~60)、チオエーテル(例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharanら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992、660、306~9およびManoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993、3、2765~70))、チオコレステロール(Oberhauserら、Nucl. Acids Res., 1992、20、533~8)、脂肪族鎖(例えば、ドデカンジオールまたはエンデシル残基(Saision-Behmoarasら、EMBO J., 1991、10、1111~8; Kabanovら、FEBS Lett., 1990、259、327~30; およびSivinararchukら、Biochimie、1993、75、49~54))、リン脂質(例えば、ジヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-リン酸(Manoharanら、Tetrahedron Lett., 1995、36、3651~4; およびSheaら、Nucl. Acids Res., 1990、18、3777~83))、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharanら、Nucleosides & Nucleotides、1995、14、969~73)、またはアダマンタン酢酸(Manoharanら、Tetrahedron Lett., 1995、36、3651~4)、パルミトイル部分(Mishraら、Biochim. Biophys. Acta、1995、1264、229~237)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crookeら、J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996、277、923~937)が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0240】

このようなオリゴヌクレオチド抱合体の調製方法は当該分野で既知であり、米国特許第4,828,979号、米国特許第4,948,882号、米国特許第5,218,105号、米国特許第5,525,465号、米国特許第5,541,313号、米国特許第5,545,730号、米国特許第5,552,538号、米国特許第5,578,717号、米国特許第5,580,731号、米国特許第5,580,731号、米国特許第5,591,584号、米国特許第5,109,124号、米国特許第5,118,802号、米国特許第5,138,045号、米国特許第5,414,077号、米国特許第5,486,603号、米国特許第5,512,439号、米国特許第5,578,718号、米国特許第5,608,046号、米国特許第4,587,044号、米国特許第4,605,735号、米国特許第4,667,025号、米国特許第4,762,779号、米国特許第4,789,737号、米国特許第4,824,941号、米国特許第4

40

50

、 8 3 5 , 2 6 3 号、米国特許第 4 , 8 7 6 , 3 3 5 号、米国特許第 4 , 9 0 4 , 5 8 2 号、米国特許第 4 , 9 5 8 , 0 1 3 号、米国特許第 5 , 0 8 2 , 8 3 0 号、米国特許第 5 , 1 1 2 , 9 6 3 号、米国特許第 5 , 2 1 4 , 1 3 6 号、米国特許第 5 , 0 8 2 , 8 3 0 号、米国特許第 5 , 1 1 2 , 9 6 3 号、米国特許第 5 , 2 1 4 , 1 3 6 号、米国特許第 5 , 2 4 5 , 0 2 2 号、米国特許第 5 , 2 5 4 , 4 6 9 号、米国特許第 5 , 2 5 8 , 5 0 6 号、米国特許第 5 , 2 6 2 , 5 3 6 号、米国特許第 5 , 2 7 2 , 2 5 0 号、米国特許第 5 , 2 9 2 , 8 7 3 号、米国特許第 5 , 3 1 7 , 0 9 8 号、米国特許第 5 , 3 7 1 , 2 4 1 号、米国特許第 5 , 3 9 1 , 7 2 3 号、米国特許第 5 , 4 1 6 , 2 0 3 号、米国特許第 5 , 4 5 1 , 4 6 3 号、米国特許第 5 , 5 1 0 , 4 7 5 号、米国特許第 5 , 5 1 2 , 6 6 7 号、米国特許第 5 , 5 1 4 , 7 8 5 号、米国特許第 5 , 5 6 5 , 5 5 2 号、米国特許第 5 , 5 6 7 , 8 1 0 号、米国特許第 5 , 5 7 4 , 1 4 2 号、米国特許第 5 , 5 8 5 , 4 8 1 号、米国特許第 5 , 5 8 7 , 3 7 1 号、米国特許第 5 , 5 9 5 , 7 2 6 号、米国特許第 5 , 5 9 7 , 6 9 6 号、米国特許第 5 , 5 9 9 , 9 2 3 号、米国特許第 5 , 5 9 9 , 9 2 8 号、および米国特許第 5 , 6 8 8 , 9 4 1 号が含まれるが、これらに限定されない。

10

【 0 2 4 1 】

所定の化合物中の 1 つまたは複数の位置を修飾することができる。所定の化合物中の全ての位置を均一に修飾する必要はなく、実際、1 つの化合物中に 1 以上の上記の修飾またはオリゴヌクレオチド内の 1 つのヌクレオシドに上記の修飾を組み込むことができる。

【 0 2 4 2 】

本発明はまた、キメラ組成物であるアンチセンス組成物を含む。アンチセンス組成物の文脈では、「キメラ」アンチセンス組成物または「キメラ」は、それぞれ少なくとも 1 つのモノマー単位（オリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチド）から作製された 2 つまたはそれ以上の化学的に異なる領域を含む化合物である。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、オリゴヌクレオチドが付与されるようにオリゴヌクレオチドを修飾してヌクレアーゼ分解に対する耐性が増加し、細胞の取り込みが増加し、および/または標的核酸に対する結合親和性が増加した少なくとも 1 つの領域を含む。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、RNA : DNA または RNA : RNA ハイブリッドを切断することができる酵素の基質として使用することができる。例として、RNAアーゼ H は、RNA と DNA との二重鎖の RNA 鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。したがって、RNAアーゼ H の活性化により、RNA 標的が切断されて遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害効率が非常に増強される。したがって、キメラオリゴヌクレオチドを使用した場合、同一の標的領域とハイブリダイゼーションするホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドと比較して、より短いオリゴヌクレオチドを使用して類似の結果を得ることができる場合がある。RNA 標的の切断を、ゲル電気泳動、必要であれば、当該分野で公知の関連核酸ハイブリダイゼーション技術によって日常的に検出することができる。

20

30

【 0 2 4 3 】

本発明のキメラアンチセンス化合物を、2 つまたはそれ以上の上記のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドおよび/またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成することができる。このような化合物は、ハイブリッドまたはギャップマーとしても公知である。このようなハイブリッドの調製方法には、米国特許第 5 , 0 1 3 , 8 3 0 号、米国特許第 5 , 1 4 9 , 7 9 7 号、米国特許第 5 , 2 2 0 , 0 0 7 号、米国特許第 5 , 2 5 6 , 7 7 5 号、米国特許第 5 , 3 6 6 , 8 7 8 号、米国特許第 5 , 4 0 3 , 7 1 1 号、米国特許第 5 , 4 9 1 , 1 3 3 号、米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 5 0 号、米国特許第 5 , 6 2 3 , 0 6 5 号、米国特許第 5 , 6 5 2 , 3 5 5 号、米国特許第 5 , 6 5 2 , 3 5 6 号、および米国特許第 5 , 7 0 0 , 9 2 2 号の教示が含まれるが、これらに限定されない。

40

【 0 2 4 4 】

本明細書中で意図されるアンチセンス化合物を、周知の固相合成法によって都合よく且つ日常的に作製することができる。オリゴヌクレオチドを、例えば、Applied Biosystems の装置および技術を使用して調製することができる。さらにまたはその

50

代わりとして、当該分野で公知のこのような任意の他の合成手段を使用することができる。

【0245】

本発明のアンチセンス化合物をインビトロで合成し、この化合物は生物学的起源のアンチセンス組成物またはアンチセンス分子のインビボ合成を指示するようにデザインされた遺伝子ベクター構築物を含まない。本発明の化合物は、混合物であるか、カプセル化されているか、結合しているか、他の分子、分子構築物、または化合物の混合物（例えば、取り込み、分散、および/または吸収を補助するためのリポソーム、受容体標的化分子、経口、直腸、局所、または他の製剤）と会合していてもよい。このような取り込み、分散、および/または吸収を補助する製剤の方法および調製には、米国特許第5,108,921号、米国特許第5,354,844号、米国特許第5,416,016号、米国特許第5,459,127号、米国特許第5,521,291号、米国特許第5,543,158号、米国特許第5,547,932号、米国特許第5,583,020号、米国特許第5,591,721号、米国特許第4,426,330号、米国特許第4,534,899号、米国特許第5,013,556号、米国特許第5,018,921号、米国特許第5,213,804号、米国特許第5,227,170号、米国特許第5,264,221号、米国特許第5,356,633号、米国特許第5,395,619号、米国特許第5,416,016号、米国特許第5,417,978号、米国特許第5,462,854号、米国特許第5,469,854号、米国特許第5,512,295号、米国特許第5,527,528号、米国特許第5,534,259号、米国特許第5,543,152号、米国特許第5,556,948号、米国特許第5,580,575号、および米国特許第5,595,756号が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0246】

本明細書中に開示の意図するアンチセンス化合物および組成物には、任意の薬学的に許容可能な塩、エステル、またはこのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物に投与した際に生物学的に活性な代謝産物またはその残りを（直接に、または間接的に）得ることができる任意の他の化合物も含まれる。したがって、例えば、本発明のアンチセンス化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容可能な塩、このようなプロドラッグの薬学的に許容可能な塩、および他の生物学的な等価物についても開示する。

【0247】

[医薬組成物]

有効成分としてポリペプチド、その類似体、または活性フラグメントを含む治療用組成物の調製は、当該分野で十分に理解されている。典型的には、このような組成物を、注射用の溶液または懸濁液として調製するが、注射前に液体にする溶液または懸濁液に適切な固体形態としても調製することができる。調製物を、乳化することもできる。有効治療成分を、しばしば薬学的に許容可能であり、且つ有効成分と適合する賦形剤と混合する。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストラン、グリセロール、およびエタノールなどおよびそれらの組み合わせである。さらに、所望であれば、組成物は、有効成分の有効性を増強する潤滑剤、乳化剤、pH緩衝剤などの少量の佐剤（auxiliary）を含めることができる。

30

40

【0248】

本明細書中に開示の方法によって得たGPCRアゴニスト、アンタゴニスト、またはDACを、中和された薬学的に許容可能な塩の形態として治療用組成物に処方することができる。薬学的に許容可能な塩には、酸付加塩（ポリペプチドまたは抗体の遊離基を使用して形成する）が含まれ、これは、例えば、塩酸またはリン酸などの無機塩または酢酸、シュウ酸、酒石酸、およびマンデル酸などの有機塩を使用して形成される。遊離のカルボキシル基から形成した塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、およびプロカインなどの有機塩基にも由来し得る。

【0249】

50

治療用組成物を、例えば、従来の単位用量の注射によって静脈内投与する。本発明の治療用組成物に関して使用する場合、用語「単位用量」は、ヒト用の単回用量として適切な物理的に個別の単位をいい、各単位は必要な希釈剤（すなわち、キャリア、または賦形剤）と共に所望の治療効果が得られるように計算された所定量の活性物質を含む。

【0250】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒト用の範囲の投薬量の処方を使用することができる。このような組成物の投薬量は、好ましくは、毒性がほとんどないか全く無いED₅₀を含む循環濃度範囲内である。投薬量を、使用した投薬形態および使用した投与経路に依存してこの範囲内で変化させることができる。本発明の方法で使用した任意の組成物のために、最初に細胞培養アッセイから治療有効量を評価することができる。細胞培養で決定したIC₅₀（すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための動物モデルの用量を処方することができる。このような情報を使用して、ヒトに有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルを、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

10

【0251】

投薬製剤に適合する様式および治療有効量で組成物を投与する。投与量は、治療を受ける被験体、被験体の免疫系の有効成分を利用する能力、および所望のGPCR活性の調整の程度に依存する。投与に必要な正確な有効成分の量は、実務者の判断に依存し、各個体に固有である。しかし、適切な投薬量は、約0.001~30、好ましくは約0.01~約25、より好ましくは約0.1~20mgの有効成分/個体のkg体重/日の範囲であってよく、これは投与経路に依存する。最初の投与およびブースター注射のための適切な投薬計画も変更可能であるが、最初の投与後に1時間~数時間間隔でその後注射または他の投与方法を行うのが典型である。あるいは、ナノモル濃度からμモル濃度までの血中濃度の維持に十分な継続的な静脈内注入が意図される。

20

【0252】

当業者は、ある因子が被験体の有効な治療に必要な投薬量に影響を与え得ると認識しており、この因子には、疾患または病態、障害、または疾患の重症度、治療歴、被験体の身体全体の健康および/または年齢、および他の疾患の存在が含まれるが、これらに限定されない。さらに、治療有効量の組成物での被験体の治療には1回の治療を含み得るが、好ましくは一連の治療を含み得る。好ましい例では、被験体を、約0.1mg/kg体重と20mg/kg体重との間の範囲の組成物で、約1週間と10週間との間、好ましくは2週間と8週間との間、より好ましくは約3週間と7週間との間、さらにより好ましくは4、5、および6週間で週1回治療する。治療に使用される組成物の有効量は特定の治療経路によって増減し得ると認識される。投薬量の変化により、本明細書中に記載の診断アッセイの結果が得られ、明らかとなり得る。

30

【0253】

治療用組成物は、有効量のGPCRアゴニスト、アンタゴニスト、またはDACおよび1つまたは複数の以下の有効成分をさらに含み得る。抗生物質およびステロイドなど。

【0254】

用語「プロドラッグ」は、内因性酵素または他の化合物および/または条件の作用によって体内または細胞内で活性形態（すなわち、薬物）に変換される、不活性な形態で調製された治療薬を示す。特に、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグバージョンを、例えば、WO93/24510号およびWO94/26764号に開示の方法に従ってSATE（（S-アセチル-2-チオエチル）リン酸）誘導体として調製することができる。

40

【0255】

用語「薬学的に許容可能な塩」は、本発明の化合物の生理学的および薬学的に許容可能な塩（すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を維持し、望ましくない毒性を与えない塩）をいう。任意の開示の遺伝子、遺伝子転写物、またはそれによってコードされたタンパク質を調整するための化合物には、アンチセンス化合物および他の調整化合物が含まれる。

50

【0256】

アンチセンスおよび他の調整化合物と使用するための薬学的に許容可能な塩基付加塩を、アルカリ金属およびアルカリ土類金属または有機アミンなどの金属またはアミンを使用して形成させる。カチオンとして使用される金属の例は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、およびカルシウムなどである。適切なアミンの例は、N, N' - ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N - メチルグルカミド、およびプロカインである（例えば、Bergerら、「薬学的塩」、J. Pharma. Sci., 1977、66、1~19を参照のこと）。酸性化合物の塩基付加塩を、従来の様式で塩を得るための遊離酸形態の有効量の所望の塩基との接触によって調製する。遊離酸形態を、従来の様式での塩形態の酸との接触および遊離酸の単離によって再生することができる。遊離酸形態は、その各塩形態と極性溶媒への溶解性などの一定の物理的性質がいくらか異なるが、本発明の目的において塩はその各遊離酸と等価である。本明細書中で使用される、「製薬学的な付加塩」には、本発明の組成物の一成分の酸形態の薬学的に許容可能な塩が含まれる。これらには、アミンの有機または無機酸の塩が含まれる。好ましい酸の塩は、塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩、およびリン酸塩である。他の適切な薬学的に許容可能な塩は当該分野で公知であり、種々の無機酸および有機酸の塩基性塩（例えば、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、またはリン酸）；有機カルボン酸、スルホン酸、硫酸、リン酸、またはN置換スルファミン酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸、シュウ酸、グルコン酸、グルカル酸、グルクロン酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、サリチル酸、4 - アミノサリチル酸、2 - フェノキシ安息香酸、2 - アセトキシ安息香酸、エンボン酸、ニコチン酸、またはイソニコチン酸）、アミノ酸（自然界でのタンパク質合成に関連する20種のアミノ酸など、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸）、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸、エタン - 1, 2 - ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4 - メチルベンゼンスルホン酸、ナフタレン - 2 - スルホン酸、ナフタレン - 1, 5 - ジスルホン酸、2 - ホスホグリセリン酸または3 - ホスホグリセリン酸、グルコース - 6 - リン酸、N - シクロヘキシルスルファミン酸（シクラメートの形成）、またはアスコルビン酸などの他の酸性有機化合物など）が含まれる。

10

20

30

【0257】

化合物の薬学的に許容可能な塩を、薬学的に許容可能なカチオンを使用して調製することもできる。適切な薬学的に許容可能なカチオンは当該分野で周知であり、アルカリ、アルカリ金属、アンモニウム、および第四級アンモニウムカチオンが含まれる。炭酸塩または炭酸水素塩もまた可能である。

【0258】

オリゴヌクレオチドのために、薬学的に許容可能な塩の好ましい例には、(a) ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ポリアミン（スペルミンおよびスペルミジンなど）などのカチオンにより形成された塩、(b) 無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、および硝酸など）により形成された酸付加塩、(c) 有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、およびポリガラクトロン酸など）により形成された塩、および(d) 塩素、臭素、およびヨウ素などの元素アニオンにより形成された塩が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0259】

本明細書中に記載のアンチセンス化合物および他の調整化合物を、有効量のアンチセンス化合物または他の調整化合物の適切な薬学的に許容可能な希釈剤またはキャリアへの添加によって医薬組成物中で使用することができる。化合物の使用および本発明の方法もまた

50

、予防に有用であり得る。

【0260】

本発明のアンチセンス化合物は、系統的な発見技術を使用して識別した遺伝子をコードする核酸またはそのmRNA転写物にタイプライズするため、これらの化合物は研究および診断において有用である。このようなハイブリダイゼーションにより、この事実を利用するために容易に構築されるサンドイッチアッセイおよび他のアッセイを使用可能である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの系統的な発見方法によって識別された遺伝子または遺伝子転写物とのハイブリダイゼーションを、当該分野で公知の手段によって検出することができる。このような手段には、例えば、酵素のオリゴヌクレオチドとの結合、オリゴヌクレオチドの放射性標識、または任意の他の適切な検出手段を含み得る。サンプル中の遺伝子の転写物レベルを検出するためのこのような検出手段を使用するキットを調製することもできる。

10

【0261】

本発明はまた、本発明のアンチセンス化合物ならびに他の調整化合物および組成物を含む薬学的なアンチセンス組成物および製剤を含む。本発明の医薬組成物を、局所治療または全身治療のいずれが望ましいかおよび治療領域に依存した多数の方法で投与することができる。

【0262】

一定の実施形態では、本発明の医薬組成物を治療が必要な領域に局所投与することが望ましい。例えば、手術中の局所注入、局所塗布（例えば、手術後の損傷包帯剤を使用する）、注射、カテーテル、座薬、または移植片（移植片は、多孔質、非多孔質、またはゼラチン質の材料（シラスティック（sialastic）膜などの膜を含む）またはファイバーである）によってこれを行うことができるが、これらには限定されない。1つの実施形態では、悪性腫瘍または新生物または新生物発生前の組織部位（またはその前の部位）への直接注射によって投与することができる。

20

【0263】

局所塗布のために、所望の活性に基づいて有効量が送達されるように、組成物をキャリアと組み合わせることができる。

【0264】

局所投与用の医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、座薬、スプレー、液体、および粉末を含み得る。従来の薬学的キャリア、水溶液、粉末、油性基剤、および増粘剤などが必要であるか望ましい。

30

【0265】

経口投与のために、医薬組成物は、例えば、結合剤（例えば、事前にゲル化したトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶性セルロース、またはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容可能な賦形剤を使用した従来の手段によって調製した錠剤またはカプセルの形態をとることができる。当該分野で周知の方法によって錠剤をコートすることができる。経口投与用の液体調製物は、例えば、溶液、シロップ、または懸濁液の形態をとることができるか、使用前に水または他の適切な賦形剤を使用して構成するための乾燥生成物として存在することができる。このような液体調製物を、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または硬化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）；非水性賦形剤（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、または分留植物油）；および防腐剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）などの薬学的に許容可能な添加物を使用した従来の手段によって調製することができる。調製物は、必要に応じて、緩衝液、塩、香料、着色料、および甘味料も含み得る。

40

【0266】

50

経口投与用の調製物を、活性組成物が徐放されるように適切に処方することができる。

【0267】

組成物を、注射（例えば、ポラス注射または連続的注入）による非経口投与のために処方することができる。注射用の製剤は、単位投薬量形態（例えば、防腐剤を添加したアンブルまたは複数回投与コンテナ）で存在することができる。組成物は、油性または水性賦形剤を含む懸濁液、溶液、または乳濁液などの形態をとることができ、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤を含み得る。あるいは、有効成分は、使用前に適切な賦形剤（例えば、滅菌された発熱物質のない水）で形成されるために粉末形態であり得る。

【0268】

吸入による投与のために、本発明で使用される組成物を、エアロゾルスプレーの形態で都合よく送達され、適切な高圧ガス（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガス）を使用して加圧パックまたは噴霧器から投与する。加圧エアロゾルの場合、測定量（metered amount）を送達するためのバルブによって、投薬単位を決定することができる。例えば、組成物およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤の粉末混合物を含む吸入器または注入器用のゼラチンなどのカプセルおよびカートリッジを処方することができる。

10

【0269】

組成物を、持続性製剤として処方することもできる。このような長期作用製剤を、移植（例えば、皮下移植または筋肉内移植）または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、適切な重合材料または疎水性材料（例えば、許容可能な油中の乳濁液として）またはイオン交換樹脂、またはやや溶けにくい誘導体（例えば、やや溶けにくい塩）として組成物を処方することができる。

20

【0270】

所望であれば、組成物を、有効成分を含む1つまたは複数の単位投薬形態を含み得るパックまたはディスペンサー中に存在させることができる。パックは、例えば、プリスター包装などの金属またはプラスチック製のフォイルを含み得る。パックまたはディスペンサーデバイスには投与説明書を添付することができる。

【0271】

本発明の医薬組成物（例えば、本明細書中に記載の遺伝子、遺伝子転写物、またはタンパク質産物調整剤）には、溶液、乳濁液、およびリポソーム含有製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物を、種々の成分（予備形成脂質、自己乳化固体、および自己乳化半固体）から製造することができるが、これらに限定されない。

30

【0272】

単位投薬形態で都合よく存在することができる本発明の薬学的製剤を、医薬産業で周知の従来技術によって調製することができる。このような技術は、有効成分を薬学的キャリアまたは賦形剤と会合させるステップを含む。一般に、有効成分を液体キャリアまたは細かく砕いた固体キャリアまたはその両方と会合させ、必要であれば生成物を成形することによって製剤を調製する。

【0273】

本発明の1つの実施形態では、医薬組成物を、フォーム（forms）として製剤化して使用することができる。薬学的フォームには、乳濁液、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリー、およびリポソームが含まれるが、これらには限定されない。自然状態では基本的に類似しているが、これらの製剤は、最終生成物の成分および濃度が変化する。このような組成物および製剤の調製は、一般に、薬学および処方分野の当業者に公知であり、本発明の組成物の処方に適用することができる。

40

【0274】

本発明の組成物を、乳濁液として調製および処方することができる。乳濁液は、典型的には、ある液体が通常直径が0.1μmを超える別の液滴形態中に分散した不均一な系である。例えば、Idson、「医薬品投薬形態」、第1巻、199、Lieberman, Rieger and Banker編、1988、Marcel Dekker, Inc

50

、New York; Rosoff、「医薬品投薬形態」、第1巻、245; Block、「医薬品投薬形態」、第2巻、335; Higuchiら、「レミントンの薬学301」、Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1985を参照のこと。乳濁液は、しばしば完全に混合して互いに分散した2つの不混和性液相を含む二相系である。一般に、乳濁液は、油中水型(w/o)または水中油型(o/w)のいずれかであり得る。水相が細かく分割されて、小さな液滴として大量の油相に分散した場合、得られた組成物を油中水型(w/o)乳濁液と呼ぶ。あるいは、油相が細かく分割されて、小さな液滴として大量の水相に分散した場合、得られた組成物を水中油型(o/w)乳濁液と呼ぶ。乳濁液は、分散相に加えてさらなる成分および水相、油相、またはそれ自体が個別の相として存在することができる活性薬を含み得る。乳化剤、安定剤、色素、および抗酸化剤などの薬学的賦形剤は、必要に応じて乳濁液中に存在することもできる。薬学的な乳濁液はまた、2つを超える相から構成される多相乳濁液(例えば油-水-油型(o/w/o)乳濁液および水-油-水型(w/o/w)乳濁液)であり得る。このような複雑な製剤により、しばしば単純な二相乳濁液では得られない一定の利点を得られる。o/w乳濁液の各油滴が小さな水滴を取り囲んだ多相乳濁液は、w/o/w乳濁液を旺盛する。同様に、油中に安定化された水滴に取り囲まれた油滴の系により、o/w/o乳濁液が得られる。

10

【0275】

乳濁液は、熱力学的安定性がほとんどないか全く無いことによって特徴付ける。しばしば、乳濁液の分散相または不連続な相は、外部相または連続相に十分に分散され、乳化剤または製剤の粘度によってこの形態を維持している。乳濁液型の軟膏基剤およびクリームの場合と同様に、乳濁液のいずれかの相は、半固体または固体であり得る。乳濁液の他の安定化手段は、乳濁液のいずれかの相に組み込むことができる乳化剤を使用する必要がある。乳化剤を、以下の4つのカテゴリーに大きく分類することができる。合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤(absorption bases)、および細かく分散した固体(Ibson、「医薬品投薬形態」、第1巻、199; Lieberman, Rieger and Banker編、1988; Marcel Dekker, Inc., New York)。

20

【0276】

界面活性剤としても公知の合成界面活性剤は、乳濁液の処方において広範な適応性が見出され、文献(Rieger、「医薬品投薬形態」、第1巻、285; Idson、「医薬品投薬形態」、第1巻、199)で概説されている。界面活性剤は、典型的には、両親媒性であり、親水性および疎水性部分を含む。界面活性剤の親水性と疎水性との比を親水/親油バランス(HLB)といい、製剤の調製における界面活性剤の分類および選択における有用なツールである。界面活性剤を、親水基の性質に基づいて以下の異なるクラスに分類することができる。非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性(Rieger、「医薬品投薬形態」)。

30

【0277】

乳濁液製剤で使用される天然に存在する乳濁液には、ラノリン、蜜蝋、リン脂質、レシチン、およびアカシアが含まれる。吸収基剤は、水に浸漬して依然として半固体の一貫性を保持するw/o乳濁液(無水ラノリンおよび親水性ワセリン)を形成することができるような親水性を有する。細かく分割した固体を、特に界面活性剤と組み合わせる粘性調製物における良好な乳化剤として使用した。これらの固体には、極性無機固体(重金属水酸化物など)、非膨潤粘土(例えば、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウム、およびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウム)、色素、および非極性固体(例えば、炭素またはニトログリセリン)が含まれる。

40

【0278】

種々の非乳化物もまた乳濁液製剤に含まれ、乳濁液の性質に寄与する。これらには、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、保湿剤、親水性コロイド、

50

防腐剤、および抗酸化剤が含まれる (Block, 「医薬品投薬形態」、第1巻、385、Lieberman, Rieger and Banker 編、1988、Marcel Dekker, Inc., New York)。

【0279】

親水性コロイド (hydrophilic colloid) または親水コロイド (hydrocolloid) には、多糖類 (例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラギーナン、グアールガム、カラヤゴム、およびトラガカント) などの天然に存在するゴムおよび合成ポリマー、セルロース誘導体 (例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース)、および合成ポリマー (例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー) が含まれる。これらは水中に分散および膨潤して分散相の液滴周囲に強固な界面フィルムを形成することによって、および、外部相の粘度の増加によって乳濁液を安定化するコロイド状溶液を形成する。

10

【0280】

乳濁液はしばしば微生物の成長を容易に補助することができる炭水化物、タンパク質、ステロール、およびリン脂質などの多数の生物を含むので、これらの製剤にしばしば防腐剤を組み込む。乳濁液製剤に含まれる一般的に使用されている防腐剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が含まれる。一般に、製剤の変質を防止するために乳濁液製剤に抗酸化剤も添加する。使用される抗酸化剤は、フリーラジカルスカベンジャー (例えば、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン)、または還元剤 (例えば、アスコルビン酸およびメタ亜硫酸ナトリウム)、および抗酸化共力剤 (例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチン) であり得る。

20

【0281】

皮膚科学的、経口、および非経口経路を介した乳濁液製剤の適用およびその製造方法は、文献 (Idson, 「医薬品投薬形態」、第1巻、199) で概説されている。処方容易さ、吸収および生物学的利用能の見地からの有用性のために、経口送達用の乳濁液製剤は非常に広範に使用されている (Rosoff, 「医薬品投薬形態」、第1巻、245、Lieberman, Rieger and Banker 編、1988、Marcel Dekker, Inc., New York; Idson, 「医薬品投薬形態」)。鉱物油ベースの下剤、脂溶性ビタミン、および高脂肪栄養調製物は、一般に o/w 乳濁液として経口投与される材料である。

30

【0282】

本発明の1つの実施形態では、オリゴヌクレオチドと核酸との組成物を、マイクロエマルジョンとして処方する。マイクロエマルジョンを、単一の光学的等方性を有し、熱力学的に安定な溶液である水系、油系、および両親媒系と定義することができる (Rosoff, 「医薬品投薬形態」、第1巻、245)。典型的には、マイクロエマルジョンは、最初に水性界面活性剤溶液中の油に分散させ、その後十分な量の第4の成分 (一般に、透明な系を形成させるための中鎖アルコール) を添加することによって調製した系である。したがって、マイクロエマルジョンは、界面活性分子の界面フィルムによって安定化した2つの不混和性液体の熱力学的に安定な等方向性の透明な分散物とも説明されている (Leung and Shah, 「薬物の徐放: ポリマー系および凝集体系」、185~215、Rosoff, M. 編、1989、VCH Publishers, New York)。マイクロエマルジョンは、一般に、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤、および電解質を含む3~5つの成分の組み合わせを介して調製される。マイクロエマルジョンが油中水型 (w/o) または水中油型 (o/w) であるかどうかは、使用した油および界面活性剤の性質および界面活性分子の極性ヘッドおよび炭化水素テールの幾何的パッキングに依存する (Schott, 「レミントンの薬学271」、Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1985)。

40

【0283】

50

マイクロエマルジョンの調製で使用した界面活性剤には、単独の、または補助界面活性剤 (co-surfactant) と組み合わせたイオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (ML310)、テトラグリセロールモノオレエート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート (PO500)、デカグリセロールモノカプレート (MCA750)、デカグリセロールモノオレエート (MO750)、デカグリセロールセクイオレエート (SO750)、デカグリセロールデカオレエート (DAO750) が含まれるが、これらに限定されない。エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノールなどの通常は短鎖アルコールである補助界面活性剤は、表面フィルムへの浸透および表面分子間に空隙が作製されることによる無秩序なフィルムによって界面流動性を増加させるように作用する。

10

【0284】

しかし、補助界面活性剤を使用せずにマイクロエマルジョンを調製することができ、アルコールを含まない自己乳化マイクロエマルジョン系は、当該分野で公知である。水相は、典型的には、水、薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体であり得るが、これらに限定されない。油相には、Captex300、Captex355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8~C12) モノ、ジ、およびトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリセロール化グリセリド、飽和ポリグリセロール化C8~C10グリセリド、植物油、およびシリコン油などの物質を含み得るが、これらに限定されない。

20

【0285】

薬物可溶化および薬物吸収の増強の観点から、マイクロエマルジョンは特に興味深い。脂質ベースのマイクロエマルジョン (o/wおよびw/oの両方) は、ペプチドを含む薬物の経口生物学的利用能を向上させることが提案されている (Constantinidesら、Pharm. Res., 1994, 11, 1385~90; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205)。マイクロエマルジョンにより、薬物の可溶化の改良、酵素加水分解からの薬物の保護、膜の流動率および浸透性における界面活性剤に誘導される変化による薬物吸収の増強が可能であること、調製の容易さ、固体投薬形態での経口投与の容易さ、臨床的効力の改良、および毒性の減少という利点が得られる (Constantinidesら、1994; Hora, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138~143)。マイクロエマルジョン成分が周囲温度で共存する場合、しばしばマイクロエマルジョンを自発的に形成することができる。熱不安定性薬物、ペプチド、またはオリゴヌクレオチドを処方する場合、これは特に有利であり得る。マイクロエマルジョンはまた、化粧品および医薬品における有効成分の経皮送達で有効である。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤により、胃腸管からのオリゴヌクレオチド、核酸、および他の活性因子の全身性吸収の増加が促進され、胃腸管、腔、口腔、および他の投与領域内でのオリゴヌクレオチド、核酸、および他の活性因子の局所細胞取り込みが改善されると予想される。

30

【0286】

本発明のマイクロエマルジョンはまた、製剤の性質を改良し、本発明のオリゴヌクレオチドおよび核酸の吸収を増強するために、ソルビタンモノステアレート (Gri113)、ラブラゾール、および浸透増強剤などのさらなる成分および添加物を含み得る。本発明のマイクロエマルジョンで使用される浸透増強剤を、以下の5つの広範なカテゴリーのうちの1つに属するように分類することができる。界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、および非キレート化非界面活性剤 (Leeら、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 1991, 92)。これらの各クラスについては、上で考察している。

40

【0287】

マイクロエマルジョンに加えて、薬物の製剤化について研究し、製剤化のために使用され

50

ている多数の組織化された界面活性剤構造が存在する。これらには、単分子膜、ミセル、二分子膜、および小胞が含まれる。作用の特異性および持続時間により、リポソームなどの小胞が有用である。本発明で使用される、用語「リポソーム」は、球状の二分子膜に整列した両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。

【0288】

リポソームは、親油性物質および水性の内部から形成された膜を有する単層板または多層板の小胞である。水性部分は、送達されるべき組成物を含む。カチオン性リポソームは、細胞壁に結合することができるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、細胞壁に有効に融合することができないにもかかわらず、インビボでマクロファージによって取り込まれる。当該分野で公知である封入される薬剤に依存した適切なリポソームの選択は明らかである。

10

【0289】

インタクトな哺乳動物の皮膚を通過させるために、脂質小胞は、適切な経皮勾配 (transdermal gradient) の影響下で、一連の微細孔 (それぞれ直径 50 nm 未満) を通過しなければならない。したがって、高度に変形可能で、且つこのような細かい孔を通過することができるリポソームを使用することが望ましい。

【0290】

リポソームのさらなる利点には、(a)天然のリン脂質から得られたリポソームは、生体適合性且つ生物分解性であること、(b)リポソームは広範な種々の水および脂質可溶性薬物を組み込むことができること、(c)リポソームは内部区画中にカプセル化薬物を代謝および分解から保護することができることが含まれる (Rosoff, 「医薬品投薬形態」)。リポソーム製剤調製における重要な検討材料は、脂質表面の電荷、小胞サイズ、およびリポソームの水分量である。

20

【0291】

リポソームは、有効成分の作用部位への移動および送達に有用である。リポソームの膜が生体膜と構造的に類似しているため、リポソームを組織に適用した場合、リポソームは、細胞膜と同化し始める。リポソームの同化および細胞の進歩により、活性因子が作用し得る細胞中のリポソーム内容物は枯渇する。

【0292】

別の実施形態はまた、局所投与用のリポソームの使用を意図する。このような利点には、投与した薬物の全身性吸収の高さによる副作用の減少、所望の標的への投与薬物の蓄積の増加、広範な種々の親水性および疎水性の薬物を皮膚に投与する能力が含まれる。いくつかの報告で、リポソームの高分子量のDNAを含む薬物を皮膚に送達させる能力が詳述されている。鎮痛薬、抗体、ホルモン、および高分子量のDNAを含む化合物を、皮膚に投与した。大部分の適用により、表皮が標的化されるという結果が生じた。

30

【0293】

リポソームは、2つの広範なクラスに分類される。カチオン性リポソームは、負電荷のDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成する正電荷のリポソームである。正電荷のDNA/リポソーム複合体は、負電荷の細胞表面に結合し、エンドソーム中にインターナライズされる。エンドソーム内部が酸性pHであるために、リポソームが捕捉され、その内容物が細胞質に放出される (Wangら、Biochem. Biophys. Res. Comm., 1987, 147, 980~985)。

40

【0294】

pH感受性であるか負電荷のリポソームは、複合体を形成するよりもむしろDNAを補足する。DNAおよび脂質はともに同様に荷電しているため、複合体形成よりもむしろ反発力がはたらく。それにもかかわらず、これらのリポソーム水性内部にいくつかのDNAが捕捉される。pH感受性リポソームを使用して、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養物の細胞単層に送達した。標的細胞での外因性遺伝子の発現を検出した (Zhouら、J. Controlled Release, 1992, 19, 269~74)。

50

【0295】

別の企図されているリポソーム組成物は、天然に由来するホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性のリポソーム組成物を、例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)またはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、一般に、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成され、アニオン性融合誘導リポソームは主にジオレオイルホスファチジリエタノールアミン(DOPE)から形成される。別のリポソーム組成物型は、例えば、ダイズPCおよび卵PCなどのホスファチジルコリン(PC)から形成される。別の型は、リン脂質および/またはホスファチジルコリンおよび/またはコレステロールの混合物から形成される。

10

【0296】

「立体的に安定化された」リポソームとは、1つまたは複数の特定の脂質を含むリポソームをいい、リポソームに組み込まれた場合、このような特定の脂質を欠くりポソームと比較して循環寿命が向上するものをいい、このような「立体的に安定化された」リポソームもまた意図される。立体的に安定化されたリポソームは、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、(A)モノシアロガングリオシドGM1などの1つまたは複数の糖脂質を含むか、(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分などの1つまたは複数の親水性ポリマーで誘導体化されている。いかなる特定の理論に拘束されることも望まないが、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG誘導脂質を含む立体安定化リポソームのために、これらの立体的安定化リポソームの循環半減期の向上は、細胞への網内系(RES)の細胞への取り込みの減少に由来することが当該分野で考えられる(Allenら、FEBS Lett., 1987, 223, 42, Wuら、Can. Res., 1993, 53, 3765)。

20

【0297】

1つまたは複数の親水性ポリマーで誘導体化した脂質を含む多数のリポソームおよびその調製方法は、当該分野で公知である。例えば、PEG部分を含む非イオン性界面活性剤C12-15Gを含むリポソームを記載したSunamotoら、Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778、重合グリコールでのポリスチレン粒子の親水性コーティングにより血液の半減期が有意に向上することに留意したIllumら、FEBS Lett., 1984, 167, 79を参照のこと。ポリアルキレングリコール(例えば、PEG)のカルボキシル基の結合によって修飾した合成リン脂質は、Sears、米国特許第4,426,330号および米国特許第4,534,899号によって記載されている。Klibanovら、FEBS Lett., 1990, 268, 235は、PEGまたはPEGステアレートで誘導体化したホスファチジリエタノールアミン(PE)を含むリポソームにより血液循環半減期が有意に増加することを示す実験を記載した。Blumeら、Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91は、このような観察を、ジステロイルホスファチジリエタノールアミン(DSPE)およびPEGの組み合わせから形成された他のPEG誘導体化リン脂質(例えば、DSPE-PEG)に適用した。外表面上に共有結合したPEG部分を有するリポソームは、欧州特許第EP0445131号およびWO90/04384号、Fisherに記載されている。PEGで誘導化された1~20モル%のPEを含むリポソーム組成物およびその使用方法は、例えば、Woodleら、米国特許第5,013,556号および米国特許第5,356,633号およびMartinら、米国特許第5,213,804号および欧州特許第EP0496813B1号に記載されている。多数の他の脂質-ポリマー抱合体を含むリポソームは、WO91/05545および米国特許第5,225,212号(共にMartinら)およびWO94/20073(Zalipskyら)で開示されている。PEG修飾セラミド脂質を含むリポソームは、WO96/10391号(Choiら)に記載されている。米国特許第5,540,935号(Miyazakiら)および米国特許第5,556,948号(Tagawaら)は、リポソーム上に機能的部分でさらに誘導化することができるPEG含有リポソームを記載している

30

40

50

。

【0298】

リポソーム中に核酸をカプセル化する方法は、当該分野で公知である。WO96/40062号は、リポソーム中への高分子量核酸のカプセル化方法を開示している。Tagawaらに付与された米国特許第5,264,221号は、タンパク質結合リポソームを開示し、このようなリポソームの内容物はアンチセンスRNAを含むことができると主張している。Rahmanらに付与された米国特許第5,665,710号は、リポソーム中へのオリゴデオキシヌクレオチドのカプセル化方法を記載している。

【0299】

界面活性剤は、乳濁液（マイクロエマルジョンを含む）およびリポソームなどの製剤において広範に適用される。多数の異なる型の界面活性剤（天然および合成の両方）の性質を分類およびランキングするための最も一般的な方法は、親水/親油バランス（HLB）の使用である。親水基（「ヘッド」としても公知）の性質により、処方で使用した異なる界面活性剤の最も有用な分類手段が得られる（Rieger、「医薬品投薬形態」、285、Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988、285）。

10

【0300】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、非イオン性界面活性剤として分類する。非イオン性界面活性剤は、医薬品および化粧品で広範に適用され、広範なpH値で有用である。一般に、そのHLB値は、その構造に依存して2～約18の範囲である。非イオン性界面活性剤には、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルが含まれる。脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、およびエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーなどの非イオン性アルキルアミドおよびエーテルも、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤クラスの最も一般的なメンバーである。

20

【0301】

水に溶解または分散させた場合に界面活性剤分子が負電荷を有する場合、界面活性剤はアニオン性に分類される。アニオン性界面活性剤には、セッケンなどのカルボン酸塩、アシル乳酸塩、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩などの硫酸エステル、アルキルベンゼンスルホン酸塩などのスルホン酸塩、アシルイセチオン酸塩、アシルタウリン塩、およびスルホコハク酸塩、およびリン酸塩が含まれる。アニオン性界面活性剤クラスの最も重要な膜は、アルキル硫酸塩およびセッケンである。

30

【0302】

水に溶解または分散させた場合に界面活性剤分子が正電荷を有する場合、界面活性剤はカチオン性に分類される。カチオン性界面活性剤には、第4級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが含まれる。第4級アンモニウム塩は、このクラスで最も使用されているメンバーである。

【0303】

界面活性剤分子が正電荷または負電荷のいずれかを有する場合、界面活性剤は両性に分類される。両性界面活性剤には、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルペタイン、およびリン脂質が含まれる。

40

【0304】

薬剤製品、製剤、および乳濁液中の界面活性剤の使用が概説されている（Rieger、「医薬品投薬形態」、285、Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988）。

【0305】

1つの実施形態では、本発明は、核酸および他の薬剤（特にオリゴヌクレオチド）の動物の皮膚への有効な送達に影響を与える種々の浸透増強剤を使用する。ほとんどの薬物は、イオン化形態および非イオン化形態で溶液中に存在する。しかし、通常、脂溶性または親

50

油性薬物は細胞膜を容易に通過する。通過する膜を浸透増強剤で処理した場合、非親油性薬物でさえも細胞膜を通過することができることが発見された。細胞膜を通過する非親油性薬物の拡散の補助に加えて、浸透増強剤はまた親油性薬物の透過性を増強する。

【0306】

浸透増強剤を、5つの広範なカテゴリー（すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、非キレート化非界面活性剤）のうちの1つに属するように分類することができる（Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems、1991、92）。上記各クラスの浸透増強剤を、以下にさらに詳述している。

【0307】

本発明の別の実施形態は、界面活性剤を含む医薬組成物を意図する。界面活性剤（または「表面活性剤」）は、水溶液に溶解した場合に水溶液と別の溶液との間の溶液の表面張力または界面張力を減少させて、粘膜を介したオリゴヌクレオチドの吸収を増強する化学的構成要素である。胆汁酸塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透増強剤には、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル（Leeら、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems、1991、92）；およびFC-43などのペルフルオロ化合物乳濁液（Takahashiら、J. Pharm. Pharmacol.、1988、40、252）が含まれる。

【0308】

別の実施形態は、浸透増強剤として作用させるための種々の脂肪酸およびその誘導体の使用を意図し、これらの増強剤には、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸（n-デカン酸）、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン（1-モノオレオイル-rac-グリセロール）、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、そのC₁~₁₀アルキルエステル（例えば、メチル、イソプロピル、およびt-ブチル）、およびそのモノグリセリドおよびジグリセリド（すなわち、オレイン酸エステル、ラウリン酸エステル、カプリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル、およびリノール酸エステルなど）（Leeら、1991；Muraniishi、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems、1990、7、1~33；El Haririら、J. Pharm. Pharmacol.、1992、44、651~4）が含まれる。

【0309】

本発明の活性因子を含む組成物は、胆汁酸塩をさらに含むことができる。胆汁の生理学的役割には、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が含まれる（Brunton、第38章、Goodman & Gilman's、「薬理学的治療の基礎」、第9版、Hardmanら編、McGraw-Hill、N.Y.、1996、934~935）。種々の天然の胆汁酸塩およびその合成誘導体は、浸透増強剤として作用する。したがって、用語「胆汁酸」には、任意の天然に存在する胆汁成分および任意のその誘導体が含まれる。本発明の胆汁酸塩には、例えば、コール酸（またはその薬学的に許容可能なナトリウム塩、コール酸ナトリウム）、デヒドロコール酸（デヒドロコール酸ナトリウム）、デオキシコール酸（デオキシコール酸ナトリウム）、グルコール酸（グルコール酸ナトリウム）、グリコール酸（グリコール酸ナトリウム）、グリコデオキシコール酸（グリコデオキシコール酸ナトリウム）、タウロコール酸（タウロコール酸ナトリウム）、タウロデオキシコール酸（タウロデオキシコール酸ナトリウム）、ケノデオキシコール酸（ケノデオキシコール酸ナトリウム）、ウルソデオキシコール酸（UDCA）、タウロ-24、25-ジヒドロ-フシジン酸ナトリウム（STDHF）、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、およびポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（POE）（Leeら、1991；Swinyard、第39章、「レミントンの薬学」、第18版、Gennaro

10

20

30

40

50

編、Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1990、782 ~ 783; Muranishi、1990; Yamamotoら、J. Pharm. Exp. Ther., 1992、263、25; Yamashitaら、J. Pharm. Sci., 1990、79、579 ~ 83) が含まれる。

【0310】

本発明は、さらに、キレート剤を含む組成物を意図する。キレート剤は、複合体形成によって溶液から金属イオンを除去し、その結果、粘膜を介したオリゴヌクレオチドの吸収を増強させる化合物と定義することができる。活性因子がアンチセンス因子である場合のための浸透増強剤としての使用に関して、最も特徴付けられたDNAヌクレアーゼが触媒のために二価の金属イオンを必要とすることによりキレート剤によって阻害されるので、キレート剤はDNAインヒビターとしても作用するというさらなる利点を有する(Jarrett, J., Chromatogr., 1993、618、315 ~ 39)。本発明のキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、クエン酸、サリチル酸塩(例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸塩、およびホモバニリン酸塩)、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9、およびジケトンのN-アミノアシル誘導体(エナミン類)が含まれるが、これらに限定されない(Leeら、1991; Muranishi、1990; Buurら、J. Control Rel., 1990、14、43 ~ 51)。

10

【0311】

本発明はまた、活性因子および非キレート化非界面活性剤を含む医薬組成物を意図する。非キレート化非界面活性浸透増強調製物を、キレート剤または界面活性剤としての活性は不十分であるにもかかわらず、消化器粘膜を介したオリゴヌクレオチドの吸収を増強する化合物と定義することができる(Muranishi、1990)。この浸透増強剤クラスには、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキルアザシクロ-アルカノン誘導体および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体(Leeら、1991); およびジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、およびフェニルブタゾンなどの非ステロイド性抗炎症薬(Yamashitaら、J. Pharm. Pharmacol., 1987、39、621 ~ 6)が含まれる。

20

【0312】

オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物のために、細胞レベルでオリゴヌクレオチド取り込みを増強する薬剤を、本発明の医薬組成物および他の組成物に添加することもできる。例えば、リポフェクチン(Junichiら、米国特許第5,705,188号)などのカチオン性脂質、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリリジン(Loliloら、PCT出願WO97/30731)などのポリカチオン性分子もまた、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増強することが知られている。

30

【0313】

他の薬剤を使用して、投与した核酸の浸透を増強することができ、この薬剤には、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのグリコール、2-ピロールなどのピロール、アゾン類、およびテルペン類(例えば、リモネンおよびメトン)が含まれる。

【0314】

本発明の一定の組成物により、製剤中にキャリア化合物が組み込まれる。本明細書中で使用される、「キャリア化合物」または「キャリア」は、不活性(すなわち、それ自体が生物学的活性を含まない)であるが、例えば、生物学的に活性な核酸を分解することによって、または循環からのこの核酸の除去を促進することによって生物学的な活性を有する核酸のバイオアベイラビリティを減少させるインビボプロセスにより核酸と認識される核酸またはその類似体をいうことができる。核酸およびキャリア化合物(典型的には過剰量の後者の物質と共に)の同時投与により、おそらくキャリア化合物と核酸との間の共通の受容体についての競合により、肝臓、腎臓、または他の循環外貯蔵所で回収される核酸の量を実質的に減少させることができる。例えば、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジル酸、または4-アセトアミド-4'-イソチオシアノ-スチルベン-2,2'

40

50

二硫酸 (Miyaoら、Antisense Res. Dev., 1995、5、115 ~ 121; Takakuraら、Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996、6、177 ~ 183) と同時投与した場合、肝臓組織中のホスホリチオエート型オリゴヌクレオチドの部分的回収率を減少させることができる。

【0315】

本明細書中に開示の医薬組成物は、賦形剤を含むこともできる。上記のキャリア化合物と対照的に、これらの賦形剤には、1つまたは複数の核酸または他の活性因子を動物に送達するための薬学的に許容可能な溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬学的に不活性な媒介物が含まれる。賦形剤は液体であっても固体であってもよく、核酸または他の活性因子および所与の医薬組成物の他の成分と組み合わせた場合、所望の容量が得られるように所定の投与様式で選択される。典型的な薬学的キャリアには、結合剤 (例えば、予備ゼラチン化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど)、充填剤 (例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、またはリン酸水素カルシウム); 潤滑剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど); 崩壊剤 (例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど); および湿潤剤 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0316】

核酸と有害に反応しない、非経口投与に適切な薬学的に許容可能な有機賦形剤または無機賦形剤を使用して、本発明の組成物を製剤化することもできる。適切な薬学的に許容可能なキャリアには、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0317】

核酸および他の意図する活性因子の局所投与用製剤には、滅菌水溶液および非滅菌水溶液、非水溶液 (一般に、アルコールなどの溶媒)、または液体もしくは固体の油ベースの核酸溶液を含み得る。溶液はまた、緩衝液、希釈剤、および他の適切な添加物を含み得る。核酸または他の意図する活性因子と有害に反応しない非経口投与に適切な薬学的に許容可能な有機または無機賦形剤を使用することができる。

30

【0318】

本発明の組成物は、さらに、当該分野で確立された使用レベルで医薬組成物中に慣習的に見出される他の付加成分を含むことができる。したがって、例えば、組成物は、例えば、止痒剤、収斂薬、局所麻酔薬、または抗炎症薬などのさらなる適合性の薬学的に活性な物質を含むことができ、または色素、香料、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤などの本発明の組成物の種々の投薬形態を物理的に製剤化するために有用なさらなる物質を含むことができる。しかし、このような物質は、添加した場合に本発明の組成物成分の生物学的活性を過度に妨害すべきではない。製剤を滅菌することができ、所望であれば、製剤の核酸と有害に相互作用しない賦形剤 (例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、緩衝液、着色料、香料、および/または芳香物質など) と混合することができる。

40

【0319】

水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む懸濁液の粘度を増加させる一定の物質を含み得る。懸濁液はまた、一定の安定剤を含み得る。

【0320】

別の関連する実施形態では、本発明の組成物は、1つまたは複数のアンチセンス化合物または他の活性因子を含み得る。2つまたはそれ以上の組み合わせ化合物を、同時または連

50

続して使用することができる。

【0321】

[試験キット]

本発明のさらなる実施形態では、医学専門家に適切な市販の試験キットを作製して、推測される標的細胞中の所定の修飾GPCR活性または所定のGPPPCR活性の能力の有無を決定することができる。上記の試験技術にしたがって、このようなキットの1つのクラスは、少なくとも標識化GPCRまたはその結合パートナー（例えば、特異的な抗体）、および勿論、選択したアッセイ方法（例えば、「競合アッセイ」、「サンドイッチアッセイ」、「DASPアッセイ」など）に沿った説明書を含む。キットはまた、緩衝液、安定剤、キット中の分子検出成分などのあまり重要ではない試薬を含んでもよい。

10

【0322】

したがって、(a) 修飾GPCRまたはその特異的結合パートナーの検出可能な標識への直接または間接的結合によって得た所定量の少なくとも1つの標識化免疫化学的に活性な成分と、(b) 他の試薬とを含む、所定のGPCR活性について細胞の存在または能力を証明するための試験キットを準備することができる。

【0323】

より詳細には、診断試験キットは、(a) コントロールとして、既知量の修飾GPCR（または修飾GPCR結合パートナー）、あるいは適切なタグに結合しているもの、またはそれぞれの複数のこの最終生成物など（またはその結合パートナー）と、(b) 必要に応じて、他の試薬とを含み得る。

20

【0324】

さらなる変形形態では、所定のプロトコール（例えば、「競合」、「サンドイッチ」、「二重抗体」など）にしたがって操作する試験キットであって、(a) GPCRを検出可能な標識への結合させることによって得た標識化成分と、(b) 少なくとも1つの試薬がリガンドまたは固定化リガンドであって、該リガンドが、(i) 標識成分と結合することができるリガンド、(ii) 標識成分の結合パートナーと結合することができるリガンド、(iii) 決定される少なくとも1つの成分に結合することができるリガンド、(iv) 決定される少なくとも1つの成分の少なくとも1つの結合パートナーに結合することができるリガンドからなる群から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫化学的試薬を含む試験キットを準備し、上記の目的のために使用することができる。

30

【0325】

上記に従って、GPCR活性の調整に有効な可能性のある薬物をスクリーニングするためのアッセイ系を準備することができる。修飾GPCRを、試験系に導入することができ、可能性のある薬物を得られた細胞培養物に導入することもでき、その後培養物を試験してGPCR活性の任意の変化（例えば、シグナル伝達、再利用、およびアレスチンに対する親和性など）を観察した。

【0326】

[ノックアウトマウスおよび動物]

疾患モデルとして使用し、本明細書中で識別された化合物を試験するために、修飾GPCRトランスジェニックおよびノックアウトマウスおよび動物を産生および使用することができる。疾患モデルとして使用し、本明細書中で識別された化合物を試験するために、本明細書中に記載の脱感作経路の修飾成分を含むトランスジェニックおよびノックアウトマウスおよび動物を産生し、および使用することができる。

40

【0327】

本発明のさらなる態様は、少なくとも1つの不活性な内因性アレスチン遺伝子（例えば、視覚アレスチン遺伝子、アレスチン1遺伝子、およびアレスチン2遺伝子が含まれる）を含むノックアウトマウスおよびマウス細胞である。マウスは、不活性内因性アレスチン遺伝子について完全なノックアウトであってもホモ接合性であってもよく、または、マウスは不活性内因性アレスチン遺伝子について部分的にノックアウトであってもヘテロ接合性であってもよい。

50

【0328】

ノックアウトマウスは、化合物が実際にアレスチンインヒビターであるかどうかの評価で有用であり得る。例えば、本発明のノックアウトマウスを、アレスチンインヒビターで処理した野生型マウスとの比較のためのモデルとして使用することができる。この比較を使用して、野生型マウスに投与した化合物がアレスチンインヒビターであるかを評価することができる。

【0329】

ノックアウトマウスはまた、化合物が実際にアレスチンアクチベーターであるかどうかの評価において有用であり得る。例えば、アレスチンアクチベーターで処理した部分的ノックアウトマウスを野生型マウスおよび完全なノックアウトマウスとの比較のためのモデルとして使用することができる。この比較を使用して、投与した化合物がアレスチンアクチベーターであるかを評価することができる。

【0330】

本明細書中に提供した開示および1999年12月22日提出の米国特許出願番号09/469,554号、Rosessらに付与された米国特許第5,767,337号、Kessous-Elbazらに付与された米国特許第5,569,827号、Donehowerらに付与された米国特許第5,569,824号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)、およびA. Haradaら、Nature、369、488、1994などに記載の当業者に既知の技術に照らして、アレスチンノックアウトマウスを産生することができる。

【0331】

本発明のノックアウトマウスの細胞は、少なくとも1つの不活性内因性アレスチン遺伝子(例えば、視覚アレスチン遺伝子、アレスチン1遺伝子、およびアレスチン2遺伝子が含まれる)を含む。マウスは、不活性内因性アレスチン遺伝子について完全なノックアウトであってもホモ接合性であってもよいか、マウスは不活性内因性アレスチン遺伝子について部分的にノックアウトであってもヘテロ接合性であってもよい。

【0332】

本発明の実施に好ましいマウスには、少なくとも1つの不活性内因性視覚アレスチン遺伝子、アレスチン1遺伝子、およびアレスチン2遺伝子を含むマウスが含まれる。少なくとも1つの不活性内因性視覚アレスチン遺伝子を含むノックアウトマウスを使用して、眼の活性をモニターすることができる。少なくとも1つの不活性内因性アレスチン1遺伝子および/またはアレスチン2遺伝子を含むノックアウトマウスを使用して、広範な種々の他の器官の活性をモニターすることができる。

【0333】

本発明の実施のためのマウスの例を以下に開示する。

【0334】

上記の例を参照して本発明を詳述しているが、本発明の精神を逸脱することなく種々の修正形態を実施することができ、これは当業者に容易に公知であると理解される。さらに、本発明は、以下の実施例によって制限されると解釈されない。

【0335】

本発明を、限定することを意図しない以下の例示的实施例によってさらに説明する。

【0336】

[材料] アルギニン・バソプレシンをSigma Chemicals社(St. Louis, MO)から入手し、[³H]-AVPをAmer sham社(Piscataway, NJ)から入手した。ノルエピネフリン(NE)をResearch Biochemical International社(Natick, MA)から入手し、[³H]プラゾシンをNEN社(Boston, MA)から入手し、フェントラミンおよびアングイオテンシンII(AngII)をSigma社から入手した。L158,809(2-エチル-5,7-ジメチル-3-[[2'-(1H-テトラゾル-5-イル)]1,1'-ピフェニル]-4-イル]メチル]-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン; CA

10

20

30

40

50

S登録番号133240-46-7)は、E. Escher博士(Universite de Sherbrooke, PQ, Canada)から贈与していただいた。ゴールデンハムスター野生型_{1B}-ARおよびR143Aは、S. Cotecchia博士(Universite de Lausanne Switzerland)から贈与していただいた。HEK-293細胞およびCOS細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(Manassas, VA)から入手し、細胞培養試薬をLife Technologies(Rockville, MD)およびCellco(Kensington, MD)から入手した。

【0337】

[細胞培養およびトランスフェクション-V2R実験] HEK-293細胞を、10%のウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンの100倍希釈物(Sigma Chemicals社製、St. Louis, MO)を補足したEarle塩を含むイーグル最小基本培地(MEM)中で成長させた。Barakら、1997、Mol. Pharmacol., 51, 177~84に記載の改変カルシウムリン酸共沈法を使用して、細胞をプラスミドcDNAで一過性にトランスフェクトした。_{1B}-ARおよびAT_{1A}R実験:リン酸イノシトールについての上記の改変リン酸カルシウムトランスフェクション共沈法および結合アッセイを使用して、10cm²の皿(Falcon社製)中で細胞を1μgの受容体またはpcDNA3.1(-)中のGRKプラスミドcDNAで一過性にトランスフェクトした。共焦点顕微鏡のために、標準的な方法(Ciccione, V.ら、1999、Focus, 21, 2, 54~55)を使用して、コラーゲン(Sigma社製)コートした35mm²ガラス底共焦点皿(Mattek社製、Ashland, MA)中で細胞をLipofectamine(登録商標)2000およびOpti-MEM培地(Life Technologies社製)で一過性にトランスフェクトした。共焦点顕微鏡法用の細胞を、30ngのpEGFP中のアレスチンまたは受容体プラスミドcDNAおよびpcDNA3.1/zeo中の250ngのダイナミン(K44A)、GRK、または受容体でトランスフェクトした。

【0338】

[受容体結合およびアデニルシクラーゼの産生-V2R実験] 受容体cDNAを一過性に発現するHEK-293細胞を、12ウェルのFalcon皿にプレートした。細胞を、冷MEMで2回洗浄し、種々の濃度の[³H]AVPを含む250μlの2%のBSAの4のMEM溶液を、各ウェルに30分間添加した。100倍過剰の冷AVPの存在下で非特異的結合を決定した。ついで、細胞を冷MEM/BSAで3回洗浄し、結合した[³H]AVPを、250μlの0.5M NaOHのPBS溶液で抽出し、HClで中和し、液体シンチレーションカウンターを使用して測定した。V2R変異型を含むインタクトなHEK-293細胞におけるcAMP産生を、Barakら、Mol. Pharmacol., 51, 177~84、1997に記載のように測定した。_{1B}-ARおよびAT_{1A}R実験:10cm²皿中の一過性にトランスフェクトしたHEK-293細胞を、冷結合緩衝液(MEM+2%ウシ血清アルブミン(BSA))で2回洗浄し、種々の濃度の[³H]ピラゾシン(0.25M~8nM)を含む結合緩衝液中、室温で1時間インキュベートし、冷結合緩衝液で3回洗浄して非結合リガンドを除去した。[³H]ピラゾシンに結合した細胞を、シンチレーションカウンターを使用して測定した。非特異的結合を、1000倍過剰のフェントラミン(10μM)の存在下で決定した。ダイナミン(K44A)の同時発現または図14のフェントラミン添加の効果を測定するために行う結合アッセイのために、固定濃度(8nM)の[³H]ピラゾシンを使用した。

【0339】

[リン酸イノシトールの決定] 10cm²の皿中の一過性にトランスフェクトしたHEK-293細胞を、25mg/mlのポリ-D-リジン(Sigma社製)をコートした12ウェルプレート(Falcon社製)にプレートし、MEM+10%FBS(ウシ胎児血清)中、37で一晚インキュベートした。リン酸イノシトール産生をアッセイするために、細胞を標識培地(1μCi/0.5ml/ウェルの[³H]イノシトールのME

M + 5%ウシ胎児血清溶液)中、37 で一晩インキュベートした。細胞を、MEM、2 mM HEPES (pH 7.4)、20 mM LiClにて37 で5分間洗浄し、その後アゴニストで処理した。以前にCotecchia, S.ら、1992、J. Biol. Chem., 267、1633~1639に記載のように全てのリン酸イノシトールを抽出および分離した。

【0340】

[共焦点顕微鏡法] トランスフェクションの翌日に、コラーゲン(Sigma社製 Chemical, St. Louis, MO)で処理した35mm²のガラス底培養皿にHEK-293細胞をプレートした。Zeissレーザースキニング顕微鏡(LSM-510)を使用した共焦点顕微鏡法を行った。488nmのアルゴン励起および505nmのロングパスフィルターを使用して、GFP画像を回収した。_{1B}-ARおよびAT_{1A}R実験: HEK-293細胞を、35mm²共焦点皿中で一過性にトランスフェクトした。細胞を10μMのNEまたは1μMのAngIIで刺激し、観察前に37 で30分間インキュベートした。あるいは、細胞を、10μMのフェントラミンまたは1μMのL158, 809中、37 で一晩培養した。x100のZeissレーザースキニング顕微鏡(LSM-510)を使用した共焦点顕微鏡法を行った。488nmの励起および505nmのロングパスフィルターを使用して、GFPおよびFITC画像を回収した。

【0341】

[抗体標識] ガラス底ウェルを具備した35mm²の皿に生きてトランスフェクトした細胞をプレートした。細胞を、100倍希釈のローダミンタグ化抗HAMウスモノクローナル抗体(Boehringer社製、Indianapolis, IN)の10mMのHEPESを含む2%のBSA/MEM溶液と共に室温で40分間インキュベートし、MEM/HEPESで3回洗浄し、Zeiss LSM-510を使用した蛍光および共焦点顕微鏡法によって試験した。

【0342】

[全細胞リン酸化(Whole Cell Phosphorylation)] Barakら、J. Biol. Chem., 274、7565~7569、1999に本質的に記載されているように、受容体のリン酸化を行った。全細胞に結合した[³H]AVPによって識別された等量の受容体および一定量の各サンプル中の可溶化タンパク質を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、オートラジオグラフィーのために処理した。

【0343】

[受容体免疫沈降およびウェスタンブロットティング] Barakら、J. Biol. Chem., 274、7565~7569、1999に記載のように、AVPを使用するかまたは使用しないで、HEK-293細胞を10分間刺激し、氷冷PBSで洗浄し、沈殿緩衝液にすくい入れ、4 で1時間可溶化した。遠心分離後、上清を回収し、抗HA 12CA5マウスモノクローナル抗体(Boehringer Mannheim社製、Indianapolis, IN)を使用してHAタグ化受容体を4 で免疫沈降させた。回収したタンパク質を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、抗HAウサギポリクローナル抗体(BABC社製、Richmond, CA)で免疫プロットした。

【実施例1】

【0344】

[プラスミドDNAの構築]

N末端HAタグ化ヒトバソプレシンII型受容体V2R(Ala6)およびV2R(T362)を、pcDNA3.1/zeo(Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A. Barak, L.S. & Caron, M.G., 1999、J. Biol. Chem., 274、32248~32257)で発現させた。これらのR137H類似体を、ポリメラーゼ連鎖反応によって作製し、SacI/SalI制限部位(図17、配列番号7)を使用してインタクトな終止コドンを含む発現ベクターpEGFPN3(Clontech社製、Palo Alto, CA)に挿入した。野生型ヒトV2およびV2R(R137H)受容体の緑色蛍光タンパク質抱合体を、ヒトV2Rおよ

びヒトV2R (R137H) cDNAからポリメラーゼ連鎖反応によって作製し、pEGFP-N3のXhoI/SalIおよびSacI/SalI制限部位にインフレームで挿入した。Shira、Biochemistry、37、4869~4874、1998に記載のように、アレスチン2-GFP (S65T)を構築した。

【0345】

N末端HAエピトプタグ化構築物を、HA配列 (TACCCATACGACGTC CCA G-ACTACGCT) およびその後遺伝子配列を含む5'プライマーを使用したPCRによって作製し、それぞれpcDNA3.1/zeo (Invitrogen社製) およびpEGFP-N3 (CLONTECH)のNheI/HindIIIおよびNheI/SalI部位にクローン化した。以前に記載のように (Zhangら、1997、J. Biol. Chem., 272、27005~27014およびBarakら、1997、J. Biol. Chem., 272、27497~27500)、ダイナミン (K44A) およびアレスチン-GFPを構築した。

10

【0346】

^{1B}-AR R143H、R143E、およびR143NをPCRで作製し、それぞれpcDNA3.1/zeoおよびpEGFP-N3のNheI/SacIおよびXhoI/PstI部位 (図17、配列番号8、配列番号10、配列番号11)に挿入した。

【0347】

ラットAT_{1A}R R126HをPCRで作製し、それぞれpcDNA3.1/zeoおよびpEGFP-N3のNheI/HindIIIおよびNheI/SalI部位 (図17、配列番号12)にクローン化した。

20

【実施例2】

【0348】

[HEK-293細胞におけるV2RおよびV2R (R137H)の発現およびシグナル伝達]

V2R (R137H)変異は、受容体とリガンドとの相互作用よりもむしろGタンパク質共役に関連する保存GPCR領域で起こる。R137H変異の効果を評価に着手するために、V2RおよびV2R (R137H)受容体を発現する細胞を、リガンド結合、原形質膜発現レベル、および下流シグナル伝達に関して比較した。リガンドAVPに対するV2R (R137H)変異体の親和性を、リガンドAVPに対する野生型V2Rの親和性と比較した。原形質膜上のV2RおよびV2R (R137H)の発現レベルを比較し、V2RおよびV2R (R137H)受容体を発現する細胞中のcAMP蓄積を測定して、シグナル伝達を比較した。

30

【0349】

図4Aに示すHEK-293全細胞結合データは、野生型V2RおよびV2R (R137H)は同一のAVPに対する親和性を有することを示す。対照的に、スキッチャードプロット (挿入図A)により、原形質膜V2R (R137H)での発現は非常に低いことが示唆される。この所見を、ローダミン結合抗HA抗体で標識した生きた非浸透化HEK-293細胞表面でのHAタグ化V2R (図4B、左パネル) およびV2R (R137H) (図4B、右パネル)を起源とする蛍光量の比較によって確認する。図4Cは、野生型V2RまたはV2R (R137H)でトランスフェクトしたHEK-293細胞中のAVP刺激 (0~250nM)した全細胞のcAMP産生量を示す。V2R (R137H)トランスフェクト細胞では、基底を越えるアデニルシクラーゼ活性は本質的に認められない。これらのデータは、受容体がGタンパク質を活性化する能力がないことによりV2R (R137H)NDIが得られることができることを示す。

40

【実施例3】

【0350】

[AVPに応答したV2RおよびV2R (R137H)の分布および輸送]
多数のGPCRは、原形質膜での受容体発現に影響を与えることなくGタンパク質由来の受容体に結合しない変異体を発現する。Schonebergら、Hum. Mutat.

50

, 12、196~205、1998に記載のように、V2R(R137H)の原形質膜発現は比較的小さいにもかかわらず、アゴニストの非存在下での細胞内補体は比較的大きい。したがって、Schonebergら、Embo. J., 15、1283~1291、1996に記載のように、R137H変異はまた、受容体局在化を決定する輸送機構に影響を与え得る。

【0351】

HEK-293細胞におけるV2RおよびV2R(R137H)輸送を研究するために、V2RまたはV2R(R137H)緑色蛍光タンパク質キメラを使用したストラテジーを使用した。図5は、アゴニストの非存在下で、V2R-GFP蛍光が原形質膜から支配的に発生することを示す(左上のパネル)。100nMのAVPの添加により、膜蛍光が消失し、野生型V2Rに類似の様式でエンドサイトーシス小胞にV2Rが再分布する(右上のパネル)。アゴニスト添加後の時間または細胞を通じた共焦点スライス的位置に依存してサイトゾルまたは核周囲領域のいずれかで小胞が認められる。対照的に、体部分のV2R(R137H)-GFPは、アゴニストの非存在下でサイトゾル状および小胞状であり(図5、左下のパネル)、100nMのAVPへの30分間の曝露により、V2R(R137H)-GFP分布は明らかに変化しなかった。

10

【実施例4】

【0352】

[AVPに応答してV2RまたはV2R(R137H)を発現するHEK-293細胞におけるアレスチンの分布および輸送]

20

Barakら、J. Biol. Chem., 274、7565~7569、1999に記載のように、HEK-293におけるV2RのAVP媒介エンドサイトーシスにはアレスチンが必要であることが証明されている。AVPの非存在下または存在下で認められたV2R(R137H)-GFPの小胞局在化はアレスチン媒介エンドサイトーシスに特徴的であり、これにより、V2R(R137H)はアゴニストを使用する異なるこれ自体のインターナライズの促進に十分にアレスチンと結合することができることが示唆される。Lohseら、Science、248、1547~1550、1990およびBarakら、J. Biol. Chem., 274、7565~7569、1999に記載のように、生きたHEK-293細胞におけるアレスチンのV2R(R137H)との相互作用を試験するために、V2RまたはV2R(R137H)のいずれかおよびアレスチン2-GFP融合タンパク質をトランスフェクトした。アゴニストの非存在下でV2Rを用いてアレスチン2-GFPが発現した場合、蛍光はサイトゾル状であり且つ均一である(図6、左上のパネル)。AVPの添加により、アレスチンが原形質膜V2Rに移動し、その後クラスリンコート小胞中でアレスチン受容体複合体がAP2に指示されてクラスターを形成し、アレスチン-受容体複合体がエンドソームにインターナライズする。AVP処理後のエンドソーム中のアレスチン2-GFPの出現は、図6に示すGFP蛍光の小胞分布によって示される(右上のパネルおよび挿入図)。

30

【0353】

V2Rでの所見と対照的に、アゴニストと独立してV2R(R137H)を発現する細胞中のエンドソームでアレスチン2-GFPが分布する(図6の左下および右のパネル)。エンドサイトーシス小胞中のアレスチン-GFPの局在化により(挿入図)、アレスチン指示プロセスによって原形質膜受容体から細胞内V2R(R137H)集団が発生し得ることが示唆される。これにより、V2R(R137H)がGタンパク質を活性化できないことはGタンパク質を活性化できないことよりもむしろリガンド独立脱感作に一部起因し得ることが示唆される。

40

【実施例5】

【0354】

[優性のネガティブダイナミンの存在下でのV2RまたはV2R(R137H)アレスチン複合体のインターナライズの阻害]

サイトゾルタンパク質ダイナミンは、原形質膜からのクラスリンコート小胞の分離に必要

50

であり、Zhangら、*J. Biol. Chem.*, 274、10999~11006、1999に記載のように、クラスリンコート小胞の解離を競合的に阻害するダイナミン(K44A)変異型の過剰発現を使用してクラスリン媒介GPCRインターナライズを評価した。アゴニストの非存在下でのアレスチンの受容体との自発的会合が受容体インターナライズの誘導に十分である場合、ダイナミン(K44A)のV2R(R137H)を発現する細胞中でサイトゾルアレスチン2-GFPの補体が原形質膜に再分布する能力を評価した。

【0355】

HEK-293細胞では、アゴニストの非存在下で、V2Rを使用したダイナミン(K44A)の発現により、アレスチン-GFPの均一なサイトゾル分布を有意に変化させた。それに対して、AVP処理から30分後、図7A(左のパネル)および図6を比較して、アレスチン-GFPは原形質膜に点状に分布したままであり、エンドサイトーシス小胞に移動しなかった。したがって、ダイナミン(K44A)発現により、クラスリンコートピットを解してV2R-アレスチン複合体のインターナライズが阻害された。アゴニストの非存在下では、ダイナミン(K44A)とV2R(R137H)との同時発現により、アゴニストの存在下でのV2Rで認められたアレスチン2-GFP分布に類似のアレスチン2-GFPの原形質膜分布が認められた(図7A、左パネル)。AVP添加により、アレスチン2-GFPの原形質膜分布は変化しなかったが(図7A、右のパネル)、アレスチン2-GFPコート小胞によりいくつかの細胞で明らかとなった。V2R(R137H)を発現する細胞中でのサイトゾルアレスチン2-GFPの補体が原形質膜に再分布するダイナミン(K44A)の能力により、アゴニストの非存在下でのアレスチンの受容体との自発的会合は受容体インターナライズの誘導に十分であることが示唆される。

【実施例6】

【0356】

[V2R(R137H)の構成的リン酸化]

多数のGPCRとアレスチンとの間の親和性を、GRKリン酸化によって調節する。したがって、AVPの非存在下および存在下でのHEK-293細胞中に発現するV2RおよびV2R(R137H)のリン酸化状態を研究した。免疫沈降V2Rのウェスタンブロット分析により、約70、50、および40kDaに移動するこの受容体の3つの主要な種が明らかとなった(図7B、矢印、左のパネル)。各V2R種で認められた基本的なリン酸化の量は最小であり、50kDaのみがアゴニストと反応してリン酸化された(図7B、右のパネル)。免疫沈降V2R(R137H)のウェスタンブロット分析により、最も高い可能性で受容体の未熟なグリコシル化形態を示すエンドグリコシダーゼHおよびPNGアーゼA(データ示さず)による消化に感受性を示す約70kDaと40kDaに移動するこの受容体の形態(図7B、左パネル)が明らかとなった(Sadeghi, H. & Birnbaumer, M., 1999, *Glycobiology*, 9, 731~737; Sadeghi, H. M., Innamorati, G & Birnbaumer, M., 1997, *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 17, 433~445)。V2R(R137H)のこれらの各形態は、構成的にリン酸化された(図7B、右のパネル)。50kDaのV2R(R137H)種がウェスタンブロットで検出されなかったにもかかわらず、より感度の高いリン酸化アッセイにより、この形態の受容体に対する少量のアゴニスト媒介リン酸化が明らかとなった(図7B、中央の矢印、右のパネル)。さらに、50kDaのV2R(R137H)形態もまた、アゴニストの非存在下でリン酸化された。したがって、V2R(R137H)の異常な表現型の挙動が主にアレスチンのリン酸化受容体との構成的会合に影響を与え得るようである。

【実施例7】

【0357】

[V2R(R137H)構成的脱感作の逆転およびアレスチン親和性]

アゴニストの非存在下でのアレスチンに対する受容体の親和性の増加は、V2R (R137H) が G タンパク質に正常に結合し、cAMP を刺激する能力をマスクすることができる。アレスチンが GPCR を脱感作してそのインターナライズを促進するので、V2R (R137H) に対するアレスチンの親和性を減少させる介入により、より正常な受容体応答を再確立することができる。

【0358】

Barakら、J. Biol. Chem., 274、7565~7569、1999に記載するように、野生型V2Rのアラニン置換およびCテール短縮変異体(それぞれV2R (Ala6) およびV2R (T362))は、V2R GPCRのテール中の3つのセリンの1つのクラスターは受容体のアレスチンに結合する能力を実質的に減少させることができることを示す。V2R (R137H)、V2R (R137H、Ala6)、およびV2R (R137H、T362)の類似の変異体を構築した。変異体は、原形質膜での受容体の局在化を正常化するアレスチン親和性を減少させ、アデニルイルシクラーゼを刺激する能力を修正する。図8A(上のパネル)は、ローダミン抗HA抗体で標識した生きて透過できないようにしたHEK-293細胞におけるHAタグ化V2R、V2R (R137H、Ala6)、およびV2R (R137H、T362)の代表的な画像を示す。各受容体サブタイプは、アゴニストの非存在下でローダミン蛍光によって原形質膜で容易に認められる。結果は、透過できないようにした(unpermeabilized)HEK-293細胞表面上の比較的小さな抗体標識V2R (R137H)を示す所見と対照的である(図4)。V2R、V2R (R137H、Ala6)、およびV2R (R137H、T362)を含む細胞へのAVPの添加により、原形質膜の蛍光が喪失し、受容体エンドサイトーシスの結果としてサイトゾル蛍光が認められる(図8A、下のパネル)。V2R (R137H)テール変異体の原形質膜集団の野生型レベルへの回復を、AVPの結合によって確認した(図8B)。

10

20

【0359】

このV2R (R137H、Ala6) およびV2R (R137H、T362)受容体変異体は、図9Aでアレスチン2-GFP融合タンパク質を使用してアレスチンに対する親和性が低いことが示される。この所見と対照的に、V2R (R137H)、V2R (R137H、Ala6)、およびV2R (R137H、T362)は、ホルモンの非存在下での細胞の細胞質中のアレスチン2-GFPの均一な分布によって示されるように、アレスチンに構成的に会合しない。AVPの添加により、原形質膜での点状のアレスチン2-GFP再分布が促進されるが、エンドサイトーシス小胞への受容体の再分布は起こらない。アレスチン2-GFPが、セリンクラスターが除去されたV2Rに会合したままで輸送することができないことは、受容体のアレスチンに対する親和性を減少させる。

30

【0360】

V2R (R137H、Ala6) およびV2R (R137H、T362)のアレスチンに結合する能力の減少により、cAMPを刺激する能力が改良される。図9Bは、全ての受容体変異型の基本的cAMPが類似していることを示す。COS-7細胞での所見と一致して、V2R (R137H)の基底のcAMPを超えるcAMP濃度の小アゴニスト媒介増加が認められた。V2R (R137H)C末端中のセリンクラスターの変異により、V2R (R137H、Ala6) およびV2R (R137H、T362)変異体の両方のcAMP産生が6倍増強された(図9B)。これらのデータにより、V2R (R137H)がGタンパク質と相互作用するにもかかわらず、野生型V2Rよりも低く、アレスチンに対するその強力な親和性によりこの相互作用が著しく阻害されることが示唆される。

40

【実施例8】

【0361】

[HEK-293細胞における野生型_{1B}-ARおよび_{1B}-AR R143Eの発現]
{1B}-ARおよび{1B}-AR R143Eの原形質膜発現を、図10に示すように[³H]プラゾシンの全細胞結合によって決定した。スキヤッチャードプロット分析は、_{1B}-AR R143EのB_{max}は野生型_{1B}-ARよりも非常に低いことを示す。この所見を

50

、H A - エピトープでタグ化した野生型 $1_B - A R$ または $1_B - A R \ R 1 4 3 E$ を発現する生きている透過できないようにした細胞を使用した免疫蛍光によって確認した。細胞を、抗H A 抗体とインキュベートし、その後F I T C 標識化二次抗体とインキュベートした。 $1_B - A R \ R 1 4 3 E$ を発現する細胞の原形質膜を起源とする蛍光量 (図 1 0 B、右のパネル) は、野生型 $1_B - A R$ (左のパネル) よりも非常に低く、これは、 $1_B - A R \ R 1 4 3 E$ の表面発現の減少を示す。

【実施例 9】

【0362】

($1_B - A R$ および $1_B - A R \ R 1 4 3$ のシグナル伝達)

$1_B - A R \ R 1 4 3$ 変異体が構成的に脱感作されるかどうかを決定するために、 $1_B - A R \ R 1 4 3$ 変異体 (本明細書中で、 $R 1 4 3$ 変異体はアラニン、グルタミン酸、ヒスチジン、またはアスパラギンとの置換をいう)、野生型 $1_B - A R$ または $1_B - A R \ R 1 4 3$ 変異体を発現するH E K - 2 9 3 細胞中の $[^3 H]$ I P の蓄積を測定した (図 1 1)。野生型 $1_B - A R$ を発現する細胞のアゴニストの非存在下での $[^3 H]$ - I P 蓄積は低く、 $10 \mu M$ N E を添加すると6倍に増加した。それに対して、 $1_B - A R \ R 1 4 3$ 変異体は、アゴニスト誘導性I P 応答を媒介する能力が有意に減少した。それに対して、 $A T_{1A} R \ R 1 2 6 H$ 変異体は、 $1 \mu M$ のA n g I I で刺激した場合、刺激された野生型 $A T_{1A} R$ と比較してシグナル伝達はずか減少する。

【実施例 10】

【0363】

[ノルエピネフリン (N E) に応答した $1_B - A R$ および $1_B - A R \ R 1 4 3 - G F P$ 変異体の局在化]

結合データによって示される $1_B - A R \ R 1 4 3 A$ の膜発現の不足により受容体プロセシングの欠陥が示唆されるので、C 末端で緑色蛍光タンパク質 (G F P) でタグ化した受容体のキメラを使用して、野生型 $1_B - A R$ および $1_B - A R \ R 1 4 3$ 変異体の細胞局在化を決定した。図 1 2 A は、H E K - 2 9 3 細胞が野生型 $1_B - A R - G F P$ でトランスフェクトされた場合、共焦点顕微鏡法によって明らかとなった蛍光シグナルは、アゴニストの非存在下で原形質膜から主に発生することを示す。野生型 $1_B - A R - G F P$ を発現する細胞への $10 \mu M$ N E の添加により、原形質膜発現が喪失し、受容体がエンドサイトーシス小胞に再分布する。それに対して、図 1 2 B は、アゴニストの非存在下でさえ、 $1_B - A R \ R 1 4 3 - G F P$ 変異体がエンドサイトーシス小胞中に支配的に局在化し、これは構成的に脱感作された $V 2 R \ R 1 3 7 H$ で見出されたものに類似することを示す。 $1_B - A R \ R 1 4 3 - G F P$ 変異体を発現する細胞のアゴニストへの曝露により、残存する原形質膜受容体のエンドソーム分布が増強された (データ示さず)。

【実施例 11】

【0364】

[$1_B - A R$ を発現するH E K - 2 9 3 細胞中の アレスチン - G F P の分布]
アゴニスト刺激された $1_B - A R$ は、サイトゾル アレスチンの原形質膜への移動 (活性化受容体の脱感作およびエンドサイトーシスに関連する事象) を促進することが以前に示されている (M h a o u t y - K o d j a , S . ら、1999、M o l . P h a r m a c o l . , 5 5、339 ~ 347)。どのようにして アレスチンが $1_B - A R \ R 1 4 3$ 変異体に影響を受けるのかを観察するために、H E K - 2 9 3 細胞中で アレスチン - G F P をこれらの受容体と同時発現させた。図 1 3 A は、アゴニストの非存在下で、アレスチン - G F P は野生型 $1_B - A R$ を発現する細胞のサイトゾルに均一に分布し、細胞への $10 \mu M$ N E の添加により アレスチン - G F P が原形質に迅速に移動することを示す。この移動パターンは、 2 アドレナリン作動性受容体 ($2 - A R$) などのいわゆるクラスA 受容体を暗示する (O a k l e y , R . H . ら、2000、J . B i o l . C h e m . , 275、17201 ~ 17210)。V 2 R などのクラスB 受容体と同様に、クラスA 受容体の活性化により、エンドサイトーシス小胞へのその後の同時輸送を行うことなく アレスチンが原形質膜に移動する (O a k l e y , R . H . ら)。アレスチン - G

10

20

30

40

50

F Pおよび 1_B -AR R143 変異体を同時発現する細胞では、アレスチン-GFP の局在化はまた、野生型 1_B -AR との分布と対照的に、アゴニストを添加することなく原形質膜に部分的に出現している(図13B)。アゴニストの非存在下での変異体のアレスチン-GFPを移動させる能力により、アゴニストを使用しないで野生型受容体よりもアレスチンに対する親和性が高いことが示唆される(Oakley, R.H.ら)。

アレスチン-GFPおよび 1_B -AR R143 変異体を同時発現する細胞への $10 \mu\text{M}$ NEの添加により、この移動が増強される(データ示さず)。

【実施例12】

【0365】

[ダイナミン(K44A)のアンタゴニストでの 1_B -AR R143 構成的脱感作の逆転]

受容体-GFP構築物によって明らかとなった変異受容体の膜発現および細胞内局在化が低いことは、原形質膜に到達できないことを反映し得る。例えば、受容体を、不適切に折りたたみ、そして/または小胞体中でプロセシングすることができる。しかし、図14Bに示すように、発現の喪失がアレスチンとの構成的会合による場合、エンドサイトーシス小胞にインターナライズする前に変異受容体は原形質膜に輸送されることが示唆される。2つのアプローチを使用して、 1_B -AR R143E 変異体が原形質膜にトラップされてエンドサイトーシス小胞中で構成的インターナライズを逆転することができるかどうかを決定した。第1の方法では、 1_B -ARの選択的アンタゴニストであるフェントラミンを使用した。図14Aは、野生型 1_B -AR-GFPでトランスフェクトしたHEK-293細胞が原形質膜で受容体を支配的に発現することを示す(左上のパネル)。野生型 1_B -AR-GFPでトランスフェクトし、 $10 \mu\text{M}$ フェントラミンの存在下で一晩培養したHEK-293細胞は、原形質膜での受容体の発現が変化しなかった(中央上のパネル)。しかし、HEK-293細胞中の 1_B -AR R143E-GFPはエンドサイトーシス小胞内に支配的に局在化し(左下のパネル)、フェントラミンの存在下で、完全な逆転が認められ、原形質膜で変異体が局在化した(中央下のパネル)。構成的脱感作を逆転するために使用した第2の方法は、受容体のダイナミン(K44A)(原形質膜由来のクラスリンコート小胞の分裂を競合的に阻害するエンドサイトーシスタンパク質変異型)との同時発現であった(Zhang, J.ら, 1997, J. Biol. Chem., 272, 27005~27014)。ダイナミン(K44A)と同時発現する場合、 1_B -AR R143E-GFPはエンドサイトーシスを受けることができず、その発現が原形質膜に残存した(右下のパネル)。全細胞結合(図14B)により、未処理 1_B -AR R143E細胞は野生型 1_B -ARと比較して原形質膜上により低い受容体発現を示し、アンタゴニストの存在またはダイナミン(K44A)の同時発現により野生型 1_B -ARレベルへの原形質膜上での 1_B -AR R143Eの発現を増加することができることが確認された。

【実施例13】

【0366】

[AT_{1A}Rを発現するHEK-293細胞中のアレスチンの分布]

DRYモチーフアルギニンの変異に起因する構成的脱感作を別のGPCRに拡大することができるかを決定するために、AT_{1A}Rを使用して受容体-GFP局在化およびアレスチン-GFP翻訳を繰り返した。図15Aは、HEK-293細胞にトランスフェクトした場合、原形質膜に野生型AT_{1A}R-GFPが支配的に発現し、 $1 \mu\text{M}$ のアンジオテンシンII(AngII)の添加によりエンドサイトーシス小胞に受容体がインターナライズすることを示す。それに対して、HEK-293細胞にトランスフェクトしたAT_{1A}R R126H-GFPは、アゴニストを添加することなくエンドサイトーシス小胞中に局在化する。さらに、AT_{1A}R R126H-GFPを発現する細胞をAT_{1A}R選択的アンタゴニストL158, 809中で培養した場合、原形質膜に戻される受容体局在化の逆転が起こる。図15Bは、アレスチン-GFPが野生型AT_{1A}Rを発現するHEK-293細胞のサイトゾル中に均一に分布し、 $1 \mu\text{M}$ のAngIIの添加によりアレスチン-G

F Pのエンドサイトーシス小胞に再分布されることを示す。それに対して、アレスチン - G F Pは、A T_{1A}R R 1 2 6 Hと同時発現する場合、アゴニストの非存在下でエンドサイトーシス小胞中に支配的に分布する。1 μ MのA n g I IのA T_{1A}R R 1 2 6 Hを発現する細胞への添加により、エンドサイトーシス小胞へのアレスチン - G F Pの分布が増強された。

【実施例 1 4】

【0 3 6 7】

[G R Kの有無におけるA R_{1A}R R 1 2 6 Hのシグナル伝達]
 D R Yモチーフアルギニン変異を有するG P C RがGタンパク質に結合する能力を喪失し、アゴニストの非存在下でA T_{1A}R R 1 2 6 Hがアレスチン - G F Pを移動させることができるという事実が与えられた場合 (図 1 5 B に示す)、A T_{1A}R R 1 2 6 Hを、シグナル伝達表現型の喪失を示すと予想された。しかし、A R_{1A}R R 1 2 6 Hでトランスフェクトし、A n g I Iで刺激したH E K細胞は、野生型A T_{1A}Rでトランスフェクトし、A n g I Iで刺激したH E K細胞と同一のレベルで[³H] - I Pを蓄積することができた (図 1 6 C)。A T_{1A}R R 1 2 6 Hのシグナル伝達をG R Kの過剰発現によって廃止することができ、これがアレスチン - G F Pの局在化にどのような影響を与えるのかを決定するために、等量のG R Kプラスミドc D N Aを含むか含まない野生型A T_{1A}RまたはA T_{1A}R R 1 2 6 HでH E Kをトランスフェクトした。共焦点顕微鏡での観察のために、細胞をアレスチン - G F Pと同時にトランスフェクトするか、[³H] - I P蓄積を測定するために「³H」イノシトールとインキュベートした。図 1 6 A (左上および下のパネル) は、アレスチン - G F Pおよび野生型A T_{1A}RでトランスフェクトしたH E K細胞では、アレスチン - G F Pの局在化がG R Kの同時トランスフェクションを行うか行わないサイトゾル全体に分布されることを示す。これらの細胞への1 μ MのA n g I Iの添加の際、5分後にアレスチン - G F Pがエンドサイトーシス小胞に移動する (図 1 6 a、右のパネル、上および下のパネル)。図 1 6 B は、アレスチン - G F PおよびA T_{1A}R R 1 2 6 HでトランスフェクトしたH E K細胞によりアレスチン - G F Pがエンドサイトーシス小胞に一部移動し (左上のパネル)、大量のアレスチン - G F Pがサイトゾル中に残存することを示す。図 1 6 B に示すように (右上のパネル)、この残存サイトゾルアレスチン - G F Pは、1 μ gのA n g I Iの添加によってエンドサイトーシス小胞に移動する。しかし、図 1 6 B (左下のパネル) に示すように、アレスチン - G F P、A T_{1A}R R 1 2 6 H、およびG R KでトランスフェクトしたH E K細胞により、アゴニストを添加することなくアレスチン - G F Pがエンドサイトーシス小胞に完全に移動する。これらの細胞を1 μ gのA n g I Iに曝露した場合、アレスチン - G F Pは、エンドサイトーシス小胞中に局在化したままである (図 1 6 B、右下のパネル)。野生型A T_{1A}RまたはR 1 2 6 HでG R K過剰発現した細胞のシグナル伝達能力を測定するために、H E K細胞を、等量のG R K c D N Aを含むか含まない1 μ gの受容体c D N Aで一過性にトランスフェクトした。ついで、これらの細胞を「³H」 - イノシトール中でインキュベートし、[³H] - I P蓄積を、基底状態または1 μ gのA n g I Iの添加の際に測定した。図 1 6 C は、野生型A T_{1A}RおよびA T_{1A}R R 1 2 6 Hは、1 μ gのA n g I Iでの刺激の際に等量の[³H] - I Pを蓄積することを示す。しかし、G R Kの過剰発現により、アゴニストで刺激したA T_{1A}R R 1 2 6 H細胞中の「³H」 - I Pの蓄積を完全に止めることができ、野生型A T_{1A}Rのみがアゴニストで刺激された場合に[³H] - I P蓄積を減少させる。

【実施例 1 5】

【0 3 6 8】

[アレスチン発現の増加によりG P C Rが構成的に脱感作される]
 上記のように、バックグラウンドを超えるレベルで発現したG R Kにより、G P C Rが構成的にエンドソームに局在化させることができる。G R Kレベルの増加 (野生型に関して) により、G P C Rのリン酸化が増加する。過リン酸化G P C Rはアレスチンに対する親和性が増加し (野生型に関して)、それによりG P C Rの構成的エンドソーム局在化が増

加する（野生型に関して）。

【0369】

同様に、バックグラウンドレベルを超えるアレスチンを発現し、GPCR結合が増加し、それによりGPCRが構成的に脱感作されるか、最も好ましくはGPCRが構成的にエンドソームに局在化する。

【実施例16】

【0370】

[GPCR中のリン酸化部位の存在により、構成的に脱感作されたGPCRが得られる] 図9に記載のように、V2RC末端テール中のSSSTSのAAAAAへの変異（米国特許出願09/993,844（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）、Oakleyら、2001、J. Biol. Chem. 276、19452～19460）により、GPCRの構成的エンドソーム局在化が阻害される。高度にリン酸化されたアミノ酸（セリンおよびスレオニン）のGPCRのC末端テールのリン酸化部位のより少ないリン酸化アミノ酸（アラニンなど）への変異により、GRKによるGPCRリン酸化が減少し、GPCRへのアレスチン結合が減少し、GPCRのエンドソーム局在化が減少した。

10

【0371】

同様に、一定のGPCRのC末端テールのリン酸化部位でリン酸化の低いアミノ酸の高度にリン酸化可能なアミノ酸（米国特許出願番号09/993,844およびOakleyら、2001、J. Biol. Chem. , 276、19452～19460に記載）への変異により、GPCRのリン酸化が増加する。これらのリン酸化部位を、本発明の修飾GPCRのC末端テールに付加することができる。得られた修飾GPCRは、修飾DRYモチーフに加えて、そのC末端テール中に高度にリン酸化可能なアミノ酸を有し、高度にリン酸化され、増加した親和性（野生型に関して）でアレスチンに結合する。これにより、構成的脱感作、最も好ましくはGPCRがエンドソームに構成的に局在化する。

20

【実施例17】

【0372】

[アレスチンロックアウトマウスの使用]

例として、本発明のアレスチンロックアウトマウスを、アレスチンインヒビターのマウスモデルとして使用する。アレスチンインヒビターとして識別されたアンタゴニストを、野生型マウスで分析する。本発明のアレスチンロックアウトマウスを使用して、アレスチンアンタゴニストがアレスチンロックアウトとして機能するかを決定する。

30

【実施例18】

【0373】

[アレスチンロックアウトマウスの産生]

例として、アレスチン2ロックアウト（arr2-KO）マウスを、相同組換えによる遺伝子の不活化によって作製した。マウス129vJゲノムDNAのバクテリオファージライブラリー（Stratagene、La Jolla、CA）を、ラットarr2cDNAを使用してスクリーニングした（H. Attaramadalら、J. Biol. Chem. , 267、17882、1992）。ポジティブファージを識別し、制限消化によって分析した。12kbのarr2フラグメントをBamHIで消化し、pBluescript KS(-)にサブクローニングし、配列決定した。標的ベクターを、pHSV-TKカセット（pIC19R/MCI-TK、M. R. Capecchi、University of Utah）、2.8kbのNcoI-BamHI arr2フラグメント、arr2の0.8kbのBamHI-HindIIIフラグメントを置換したpGK-neoカセット（プラスミドpD383由来、R. Hen, Columbia University）、および4.5kb HindIII arr2フラグメントのpBluescript(-)に平滑末端ライゲーションによって構築した。この標的ベクターを、NotIで線状化し、マウス胚幹細胞にエレクトロポレーションした。G418およびガンシクロビルに耐性を示すトランスフェクタント由来のゲノム

40

50

DNAを、単離し、0.2 kbの5'外側 arr2プロンプおよび0.3 kbの3'外側 arr2プロンプを使用したサザン(DNA)プロット分析によってスクリーニングした。これらのES細胞のC57BL/6未分化胚芽細胞への微量注入によってキメラ動物を作製した。5匹の雄キメラの子供を獲得し、C57BL/6雌と交配した。サザンプロットングによって生殖系列への伝達を確認した。ヘテロ接合性の子孫を異種交配してホモ接合性マウスを得た。本研究で使用した野生型および変異体マウスは、年齢が一致しており(3~5月齢)、雄は兄弟であった。タンパク質免疫プロット分析のために、溶解緩衝液(10 mMのTris(pH7.4)、5 mMのEDTA、プロテアーゼインヒビター錠剤1錠/10 mL(Roche Molecular Biochemicals社製、Indianapolis, Indiana, USA)、1%のnonidet-40)中でのポリトロン均一化によって全細胞溶解物を調製した。ポリアクリルアミドゲルに25 µgのタンパク質/レーンでロードし、等しいタンパク質ローディングを、ゲルのPonceau Sによる染色で確認した。ポリビニルジフルオリド(PVDF)メンブレンに移行後、タンパク質を、アレスチン2またはアレスチン1に対するポリクローナル抗体でプロットした(H. Attaramadala, J. Biol. Chem., 267, 17882~17890, 1992)。西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させた二次抗体で視覚化し、化学発光検出システム(Amersham社製、Piscataway, NJ)で増強した。

10

【0374】

アレスチン2を欠くマウスを、サザンDNAプロット分析で識別し、アレスチン2の不在を脳幹、中脳水道周囲灰白質(PAG)組織、脾臓、肺および皮膚からの抽出物のタンパク質免疫プロットングによって確認した。arr2-KOマウスは生存しており、総表現型異常は含まれていなかった。

20

【0375】

アレスチン1ノックアウトマウスおよび視覚アレスチンノックアウトマウスを作製し、同様の様式(その代わりとして、アレスチン1遺伝子および視覚アレスチン遺伝子の不活化)で識別した。

【0376】

本発明を種々の特定の材料、手順、および実施例を参照して記載および例示しているが、本発明はこの目的のために選択した材料および手順の特定の組み合わせに制限されないと理解される。当業者によって認識されるこのような詳述の種々の改変された形態が意図される。

30

【0377】

以下は、上記開示、特に実験手順および考察に関連する文献のリストである。以下の書類および上記本文において参照された任意の書類は、引用することにより本明細書の一部をなすものとするものとみなすべきである。

【0378】**【表1A】**

Attramadal, H. , Arriza, J. L. , Aoki, C. , Dawson, T. M. , Codina, J. , Kwatra, M. M. , Snyder, S. H. , Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17882-17890

Barak, L. S., Oakley, R. H., Laporte, S. A. and Caron, M. G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 93-98

Barak, L. S. , Warabi, K. , Feng, X. , Caron, M. G. & Kwatra, M. M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 7565-7569

10

Barak, L. S. , Ferguson, S. S. , Zhang, J. & Caron, M. G. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27497-27500

Barak, L. S. , Ferguson, S. S. , Zhang, J. , Martenson, C. , Meyer, T. & Caron, M. G. (1997) *Mol. Pharmacol.* 51, 177-184

20

Barak, L. S. , Menard, L. , Ferguson, S. S. , Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) *Biochemistry* 34, 15407-15414

Ferguson, S. S. , Barak, L. S. , Zhang, J. & Caron, M. G. (1996) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 1095-1110

Ferguson, S. S. , Menard, L. , Barak, L. S. , Koch, W. J. , Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24782-24789

30

Kim, K.-M., Valenzano, K. J., Robinson, S. R., Yao, W. D., Barak, L. S., Caron, M. G. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 37409-37414

Laporte, S. A. , Oakley, R. H. , Holt, J. A. , Barak, L. S. & Caron, M. G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 23120-23126

Laporte, S. A. , Oakley, R. H. , Zhang, J. , Holt, J. A. , Ferguson, S. S. , Caron, M. G. & Barak, L. S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3712-3717

40

【 0 3 7 9 】

【 表 1 B 】

Menard, L. , Ferguson, S. S. , Zhang, J. , Lin, F. T. , Lefkowitz, R. J. , Caron, M. G. & Barak, L. S. (1997) *Mol. Pharmacol.* 51, 800-808

Mhaouty-Kodja, S. , Barak, L. S. , Scheer, A. , Abuin, L. , Diviani, D. , Caron, M. G. & Cotecchia, S. (1999) *Mol. Pharmacol.* 55, 339-347

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., Caron, M. G. (2001). *J. Biol. Chem.* 276: 19452-19460

10

Oakley, R. H. , Laporte, S. A. , Holt, J. A. , Caron, M. G. & Barak, L. S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 17201-17210

Oakley, R. H. , Laporte, S. A. , Holt, J. A. , Barak, L. S. & Caron, M. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32248-32257

Wilbanks, A. M., Laporte, S. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (2002) Manuscript submitted.

20

Zhang, J. , Barak, L. S. , Anborgh, P. H. , Laporte, S. A. , Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 10999-11006

Zhang, J. , Barak, L. S. , Winkler, K. E. , Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27005-27014

30

【図面の簡単な説明】

【0380】

【図1】本発明を使用することができる例示的且つ非限定的な公知のGPCRのリストが図1に含まれる。構造の類似性およびリガンドに基づいた古典的分類にしたがって受容体を分類する。

【図2】(a)野生型DRYモチーフおよび(b)修飾DRYモチーフを示す。

【図3】本明細書中に記載の修飾GPCRのアミノ酸配列を示す。野生型配列と異なるアミノ酸を太字および下線で示す。

【図4】HEK-293細胞におけるV2RおよびV2R(R137H)の発現およびアデニルイルシクラーゼ刺激を示す。V2R(黒四角)またはV2R(R137H)()についてcDNAで一過性にトランスフェクトした細胞を、種々の濃度の[³H]AVPに曝露した。(A)スキッチャード分析(挿入図)は、受容体が類似のAVP親和性を有することを示す(V2R、16±6nM; V2R(R137H)、15±3nM)。V2Rの発現は、1mgの細胞タンパク質あたり、2.5pmolと5pmolとの間で変化し、V2R(137H)の原形質膜発現はこれの約1/12である(スキッチャードのX切片)。データは、3つの実験(各測定点を2回測定)の代表である。(B)V2R(左)またはV2R(137H)(右)を発現する、ローダミンタグ化マウスモノクローナル抗HA抗体で標識した生きて透過できないようにした細胞の蛍光画像。(C)0と250nMとの間のAVP濃度で15分間刺激した全細胞において測定したcAMP。cAMP蓄積を、総[³H]cAMP数/細胞のウェルあたりの[³H]アデニンの総取り込みで

40

50

示す。結果は、3つの実験の平均 \pm SDである。

【図5】HEK-293細胞におけるV2R-GFPおよびV2R(R137H)-GFPの蛍光画像を示す。V2R-GFP(上)またはV2R(R137H)-GFP(下)を発現する細胞を、賦形剤またはAVPで30分間37°Cで処理した。原形質膜由来の野生型受容体(上)のアゴニストに媒介される再分布とエンドソーム中のV2R(R137H)-GFPのアゴニスト非依存性局在化(下)とを対比させている。バー=25 μ m。

【図6】HEK-293細胞におけるアレスチン2-GFPとV2RまたはV2R(R137H)との間の会合の蛍光画像を示す。左は、V2R(上)またはV2R(R137H)(下)を発現する生きた細胞におけるアレスチン2-GFPのアゴニスト非依存性分布を示す。アゴニスト処理を使用せずに、アレスチン2-GFPは、野生型V2Rを含む細胞(左上)でサイトゾルであるが、V2R(R137H)を含む細胞(左下)ではエンドサイトーシス小胞中でもサイトゾルである。100nMのAVPへの30分間の曝露後(右)、アレスチン-GFPは、両受容体サブタイプでエンドサイトーシス小胞に局在化する。

【図7】HEK-293細胞におけるV2RおよびV2R(R137H)とのアレスチン2の会合およびリン酸化を示す。(A)アレスチン2-GFPおよびV2RまたはV2R(R137H)のいずれかと共にダイナミン(K44A)を発現させた。V2RのAVP(100nM)(左)への曝露により、明らかにアレスチン2-GFPが移動し、細胞内の小胞分布よりもむしろ細胞膜での点状の分布として30分間継続して視覚可能である。アゴニストの非存在下では、ダイナミン(K44A)およびV2R(R137H)を含む細胞はまた、原形質膜の点状領域中にアレスチン2-GFP蛍光分布を示す。アゴニストの存在下でも類似のパターンが明らかであった(右)。(B)左のパネルは、マウス抗HA抗体で免疫沈降させ、ウサギ抗HA抗体でプロットした受容体を示す。6つ全てのレーンで認められるわずかな50kDaのバンドは、交差反応マウスIg重鎖である。右のパネルは、実験手順に記載のリン酸化についてアッセイした受容体を示す。等量の受容体(40fmol)を、各レーンにロードした。矢印は、抗HA抗体によって明らかとなった約70、50、および40kDaに移動した受容体種の位置を示す。結果は、3つの実験の代表である。

【図8】HEK-293細胞におけるV2R、V2R(R137H、Ala6)、およびV2R(R137H、T362)の発現を示す。(A)原形質膜受容体を、ローダミンタグ化マウスモノクローナル抗HA抗体で標識した。上のパネルは、アゴニストの非存在下での受容体分布を示す。下のパネルは、抗体で標識後、37°Cで30分間、100nMのAVPで処理した細胞を示す。(B)[³H]AVPによって測定した原形質膜受容体発現を、野生型V2R原形質膜発現に対して正規化した(約5pmol/mg)。データを、3つの独立した実験由来の平均 \pm SDとして示す。

【図9】HEK-293細胞におけるアレスチン2-GFPの移動およびV2R、V2R(R137H、Ala6)およびV2R(R137H、T362)のアデニルシクラーゼ反応を示す。(A)アゴニストの存在下(左)で、GFP蛍光はサイトゾル型である。細胞の100nM AVPへの37°Cで30分間の曝露後、GFP蛍光は原形質膜の点状領域に再分布する(右)。(B)細胞を賦形剤または2.5 μ MのAVPで15分間処理し、全細胞のcAMPを以下の実施例に記載のように決定した。絶対基底(absolute basal)および刺激したcAMP反応を、([³H]cAMP数/分/ウェル)/([³H]アデニン取り込み数/分/ウェル)の単位で示し、それぞれ、模擬物(0.019 \pm 0.009、0.017 \pm 0.006、n=3); V2R(R137H)(0.018 \pm 0.0045、0.040 \pm 0.008、n=4); V2R(R137H、Ala6)0.020 \pm 0.0017、0.23 \pm 0.040、n=4); V2R(Ala6)(0.017 \pm 0.0006、1.3 \pm 0.31、n=3); V2R(R137H、T362)(0.022 \pm 0.0056、0.22 \pm 0.070、n=4); V2R(T362)(0.015 \pm 0.0021、1.3 \pm 0.34、n=3); およびV2R(0.021 \pm 0.0024、1.4 \pm 0.19、n=4)であった。データを、4つの異なる実験に対する平

10

20

30

40

50

均 ± S Dとして示す。

【図10】HEK-293細胞における野生型 1_B -ARおよび 1_B -AR R143Aの発現を示す。野生型 1_B -AR (黒四角) または 1_B -AR R143A変異体 () についてcDNAで一過性にトランスフェクトした細胞を、種々の濃度の [3 H] プラゾシンに曝露した。(A) スキャッチャード分析は、 1_B -AR R143A変異体は野生型 1_B -ARよりも低い B_{max} を示すことを示す。野生型 1_B -ARの原形質膜発現は、1.5と4 pmol/mgの全細胞タンパク質との間で変化し、 1_B -AR R143Aは、0.2と0.5 pmol/mgとの間で変化した。ノルエピネフリン (NE) についての 1_B -AR R143A変異体の K_D は、NEについての野生型 1_B -ARの K_D と類似していた (1.5と3.5 nMとの間)。データは、各測定点を2回測定した3つの異なる実験の代表である。(B) 野生型 1_B -AR (左) または 1_B -AR R143A (右) を発現する生きた非浸透性HEK-293細胞の蛍光画像は、野生型 1_B -ARと比較して 1_B -AR R143Aは低い表面発現を示す。細胞をマウスモノクローナル抗HA抗体およびマウス抗IgG FITC結合二次抗体で標識した。

【図11】イノシトールリン酸 (IP) 蓄積のノルエピネフリン (NE) 刺激を示す。HEK-293細胞を野生型 1_B -ARまたは 1_B -AR R143変異体のcDNAで一過性にトランスフェクトし、10 μ MのNEで30分間刺激した。イノシトールリン酸の蓄積を記載のように測定し、 [3 H] IPの総数/細胞のウェルとして示す。データは、各測定点を3回測定した3つの異なる実験の代表である。

【図12】HEK293細胞における野生型 1_B -AR-GFPおよび 1_B -AR R143-GFP変異体の蛍光画像を示す。(A) 非刺激のままの場合、野生型 1_B -AR-GFPを発現する細胞は、原形質膜に局在化する (左)。細胞への10 μ MのNEの添加により、受容体がエンドソームに最分布する (右)。(B) 1_B -AR R143-GFP変異体を発現する細胞は、アゴニストの非存在下でエンドソーム中に局在化する。

【図13】アレスチン-GFPと野生型 1_B -ARまたは 1_B -AR R143-GFP変異体との間の会合のHEK-293細胞における蛍光画像を示す。(A) アレスチン-GFPは、野生型 1_B -ARと同時に発現した場合にサイトゾル中に支配的に分布する (左)。10 μ MのNEの添加により、アレスチン-GFPが野生型 1_B -ARを発現する細胞中の原形質膜に移動する (右)。(B) 1_B -AR R143変異体と発現した場合、アゴニストの非存在下でアレスチン-GFPは原形質膜に部分的に移動する。

【図14】フェントラミンと培養するか、ダイナミン (K44A) と同時発現する場合の野生型 1_B -AR-GFPおよび 1_B -AR R143-GFP変異体のHEK-293細胞における蛍光画像を示す。(A) 野生型 1_B -AR-GFP (上) および 1_B -AR R143E-GFP (下) を発現する細胞を未処理のままにし (左)、10 μ Mフェントラミン中、37 で一晩培養するか (中央)、またはダイナミン (K44A) と同時発現した (右)。フェントラミン処理およびダイナミン (K44A) の同時発現の両方により、エンドソームから原形質膜に 1_B -AR R143E-GFPが再分布する一方で、同一の条件では野生型 1_B -AR-GFPの分布に対して効果がない。(B) [3 H] プラゾシンに結合する全細胞を、野生型 1_B -AR-GFPまたは 1_B -AR R143E-GFP変異体を発現するHEK-293細胞において評価した。細胞を、未処理のままか、10 μ Mフェントラミン中、37 で一晩培養するか、ダイナミン (K44A) と同時発現させた。野生型 1_B -AR-GFPよりも低密度で原形質膜上に 1_B -AR R143E-GFPが発現する。細胞をフェントラミン中で培養するかダイナミン (K44A) と同時発現される場合、 1_B -AR R143E-GFP変異体の発現は野生型受容体のレベルまで増加する。

【図15】HEK-293細胞における、野生型 $AT_{1A}R$ -GFP、 $AT_{1A}R$ -R126H-GFP変異体、およびアレスチン-GFPの分布を例示する蛍光画像を示す。(A) 細胞は原形質膜上に $AT_{1A}R$ -GFPを支配的に発現し、1 μ MのアンジオテンシンI (Ang I) の添加により原形質膜からエンドソームに受容体が再分布する (上)。アゴニストの非存在下で細胞は $AT_{1A}R$ R126H-GFPを発現し、1 μ M L15

8, 809中での培養により、受容体が原形質膜に再分布する(下)。(B)野生型AT_{1A}Rと同時発現したアレスチン-GFPはサイトゾル中に支配的に分布し、1μM Ang IIの添加により、アレスチンがエンドソームに移動する(上)。それに対して、AT_{1A}R R126H-GFPと同時発現したアレスチン-GFPは、アゴニストの非存在下でエンドソーム中に分布し、この分布は、1μM Ang IIの添加により増強される(下)。

【図16】AT_{1A}Rのインターナライズに対するGRKの過剰発現の効果を示す。(A)上のパネルは、Ang IIの存在下および非存在下において野生型AT_{1A}RでトランスフェクトしたHEK-293中のアレスチン-GFPの局在化を示す。下のパネルは、GRKと同時トランスフェクトした野生型AT_{1A}RでトランスフェクトしたHEK-293中のアレスチン-GFPの局在化を示す。(B)上のパネルは、Ang IIの存在下および非存在下におけるAT_{1A}RのR126H変異体でトランスフェクトしたHEK-293中のアレスチン-GFPの局在化を示す。下のパネルは、GRKと同時トランスフェクトしたAT_{1A}RのR126H変異体でトランスフェクトしたHEK-293中のアレスチン-GFPの局在化を示す。(C)上記細胞についての[³H]-IP蓄積を決定した。

【図17】本発明の修飾GPCRをコードする核酸配列を示す。野生型配列と異なる核酸を太字および下線で示す。配列は、5' 3'方向で示す。

10

【図1A】

クラス1 ロドアンチン類	リガンド	組織	生理学	治療
アセチルコリン ミン (ムスカリン様およびニコチン様)	5	脳、神経、心臓	神経伝達物質	視力、アルツハイマー病
アドレナリン受容体	6	脳、腎臓、肝臓、心臓、肺	神経伝達物質	糖尿病、心臓病
βアドレナリン受容体	3	腎臓、心臓	神経伝達物質	心臓病、呼吸
ドーパミン	5	脳、腎臓、GI	神経伝達物質	心臓病、パーキンソン病
ヒスタミン	2	血管、心臓、腸	血管活性物質	炎症、潰瘍
セロトニン (5-HT)	16	ほとんどの組織	神経伝達物質	うつ病、不眠症、麻痺
アンギオテンシン	2	血管、肝臓、腎臓	血管活性物質	心臓病、内分泌
アラジキニン	1	肝臓、血管	血管活性物質	炎症症 (腸炎)
C5aアナーロイジン	1	血液	免疫系	炎症症
Fractalkin	3	血液	化学誘引物質	炎症症
インターロイキン8	1	血液	化学誘引物質	炎症症
ケモカイン	6	血液	化学誘引物質	炎症症
オレキニン	2	脳	脂肪代謝	肥満症
ノルアドレナリン	1	脳	気管支拡張薬、痛み	気管支炎、肺病
CCK (ガストリン)	2	胃腸、膵臓、腸	運動性、脂肪吸収	胃腸、肥満症、パーキンソン病
エンドセリン	2	心臓、膵臓、腸	筋収縮	心臓病、呼吸
メラノコルチン	5	腎臓、脳	代謝調節	炎症症、糖尿病

【図1B】

神経ペプチドY	5	神経、脳、血液	神経伝達物質	行動、記憶、心血管
ニューロテンシン	1	脳	CNS	心臓病、糖尿病
オビオイド	3	脳	CNS	うつ病、糖尿病
ソマトスタチン	5	脳、胃腸	神経伝達物質	嘔吐、アルツハイマー病
タキキニン (物質P, NK1)	3	脳神経、心臓、腸	神経伝達物質	うつ病、糖尿病
トロロニン	3	血小坂、血管	凝固因子	炎症症
バソプレッシン類	1	脳、腎臓	水分バランス	高血圧、糖尿病合併症
ガラニン	4	脳、腎臓	神経伝達物質	糖尿病、アルツハイマー病
ホルモンタンパク質	1	卵巣、精巣	内分泌	不妊症
卵細胞成熟ホルモン	1	卵巣、精巣	内分泌	不妊症
ルトロヒン-細胞成長因子ロドアンチン	1	中状腺	内分泌	甲状腺機能亢進症、代謝
オプシン	5	眼	光受容	眼病
プロスタノイド	4 (~1000)	鼻	香り	嗅覚疾患
プロスタグランジン	5	動脈、胃腸	血管拡張、痛み	心臓病、糖尿病
リノホスファタド酸	2	血管、心臓、腸	炎症	病、炎症症
スフィンゴリン-1	1	ほとんどの組織	細胞増殖	癌
ロイコトリエン	1	白血球、気管支	炎症	喘息、慢性気管支炎
プロスタサイクリン	1	動脈、胃腸	血小坂調節	心臓病
トロロヒン	1	動脈、気管支	血管収縮	心臓病、呼吸
スクレオチン	4	血管、気管支	複製の効果	心臓病、呼吸
アデノシン	4	血管、血小坂	筋弛緩	心臓病、呼吸
アリン受容体	2	脳	感覚認知	糖尿病、記憶
大腸	1	ほとんどの末梢組織	炎症	炎症症、癌
血小坂活性化因子	1	再生器管、下垂体	再生	前立腺癌、子宮内腺症
ゴナドトロピン放出ホルモン	1	再生器管、下垂体	再生	

図1

【 図 1 C 】

甲状腺ホルモン放出ホルモン 成長ホルモン阻害因子 メラトニン	甲状腺、脳 胃腸 脳、眼、下垂体	甲状腺ホルモン放出ホルモン 成長ホルモン阻害因子 メラトニン	甲状腺、脳 胃腸 脳、眼、下垂体
セクレチン類 カルシトニン アロコルチン 胃腸抑制ホルモンの放出因子 グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 成長ホルモン放出ホルモン ACTH 血管作動性腸管ポリペプチド (VIP)	胃腸、心臓 骨、脳 副腎、血管、脳 副腎、脂肪細胞、心臓 膵臓、脂肪細胞、心臓 膵臓、胃、肺 膵臓、副腎 膵臓、副腎 膵臓	セクレチン類 カルシトニン アロコルチン 胃腸抑制ホルモンの放出因子 グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 成長ホルモン放出ホルモン ACTH 血管作動性腸管ポリペプチド (VIP)	胃腸、心臓 骨、脳 副腎、血管、脳 副腎、脂肪細胞、心臓 膵臓、脂肪細胞、心臓 膵臓、胃、肺 膵臓、副腎 膵臓
甲状腺ホルモン放出ホルモン 成長ホルモン阻害因子 メラトニン	甲状腺、脳 胃腸 脳、眼、下垂体	甲状腺ホルモン放出ホルモン 成長ホルモン阻害因子 メラトニン	甲状腺、脳 胃腸 脳、眼、下垂体

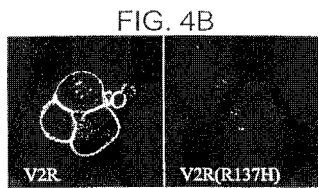
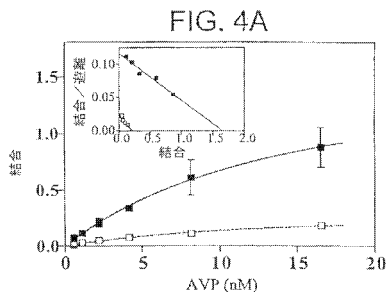
【 図 2 】

FIG. 2

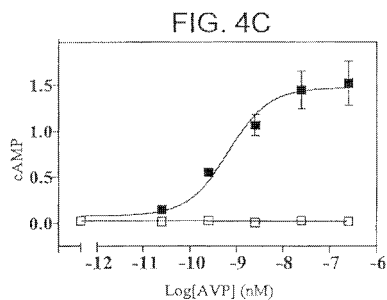
(a)
野生型DRYモチーフ
Dは、好ましくは、E、L、P、Q、T、I、C、G、N、V、H、またはAであり得る。
Yは、好ましくは、W、F、S、I、Q、H、G、C、L、D、またはAであり得る。
Rは、好ましくは、HもしくはCまたは別のアミノ酸であつてよく、GPCRは構造的に脱感作されていない。

(b)
修飾DRYモチーフ
第2のアミノ酸=RまたはK以外の任意のアミノ酸、好ましくは、A、D、E、N、およびHである。

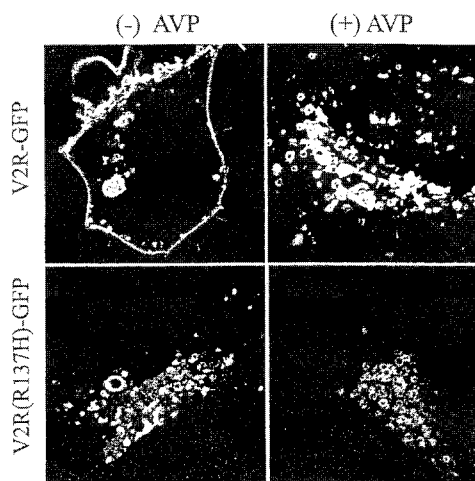
【 図 4 】



ローザン抗HA標識



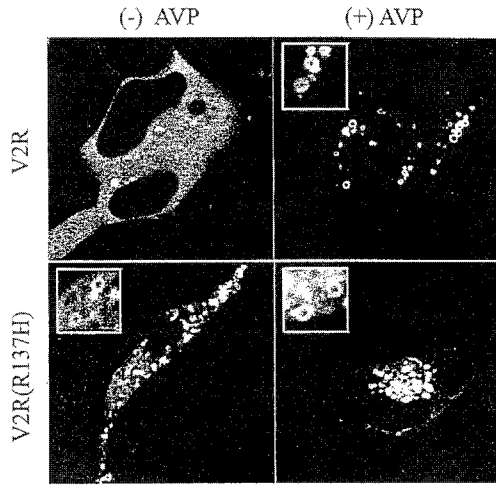
【 図 5 】



受容体-GFPの分布

FIG. 5

【 図 6 】



β アレスチン-GFPの分布

FIG. 6

【 図 7 】

ダイナミン(k44A)の存在下でのβアレスチン-GFP

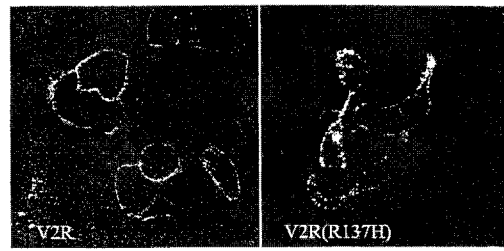


FIG. 7A

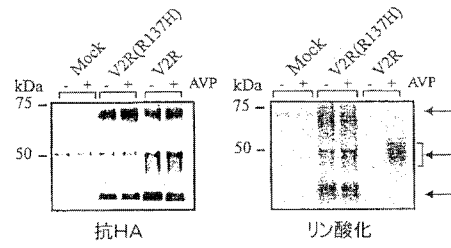
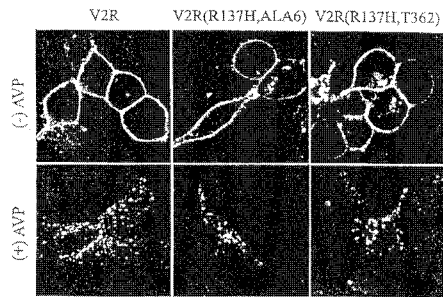


FIG. 7B

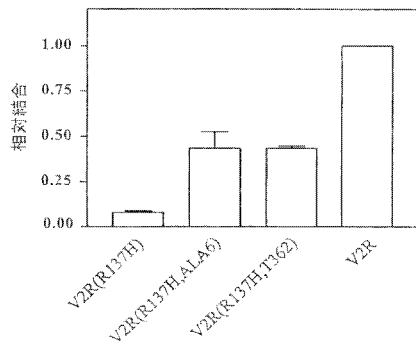
【 図 8 】

FIG. 8A



ローダミン抗HA標識

FIG. 8B



【 図 9 】

FIG. 9A

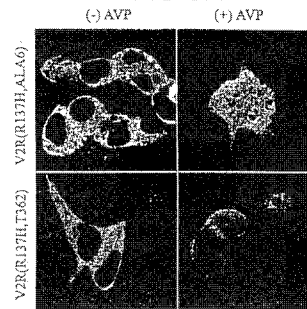
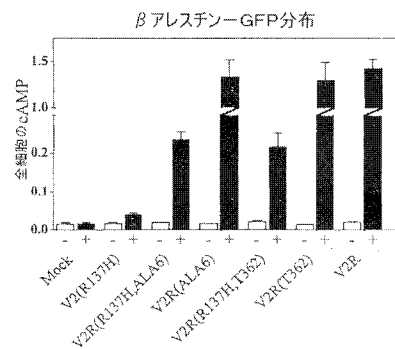


FIG. 9B



【 図 1 0 】

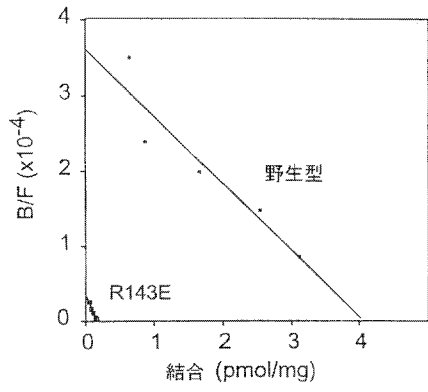


FIG. 10A

【 図 1 1 】

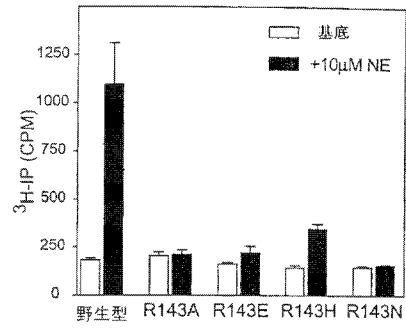


FIG. 11

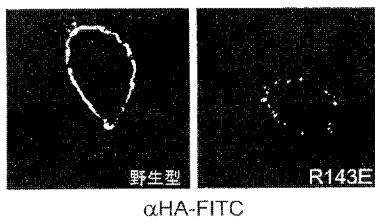


FIG. 10B

【 図 1 2 】

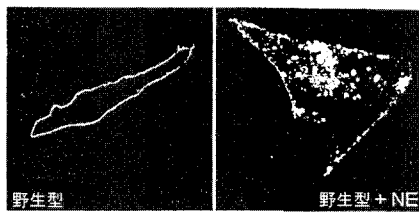


FIG. 12A

【 図 1 3 】

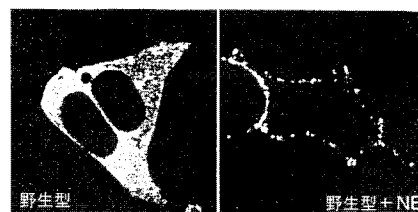
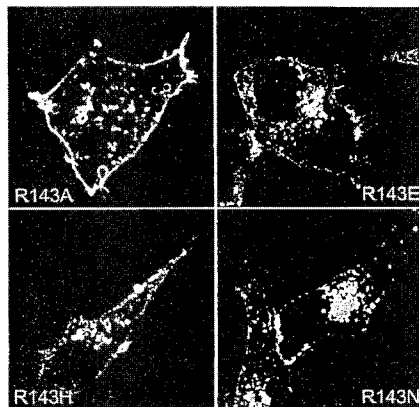
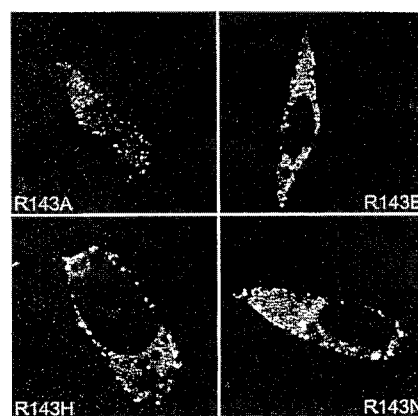


FIG. 13A

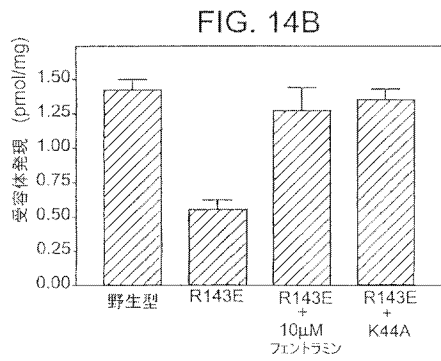
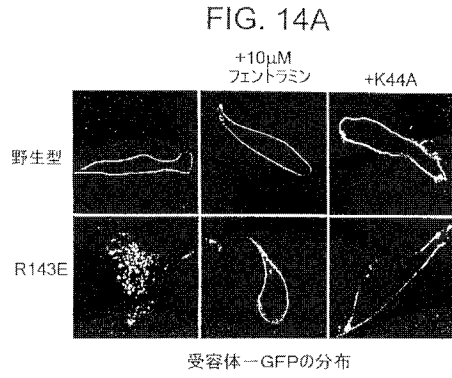


受容体-GFPの分布
FIG. 12B

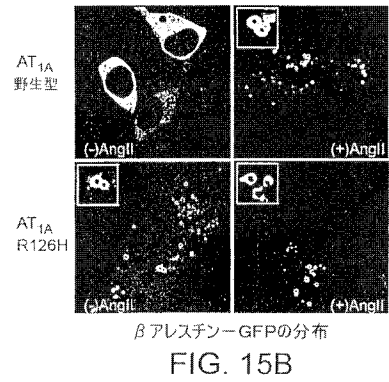
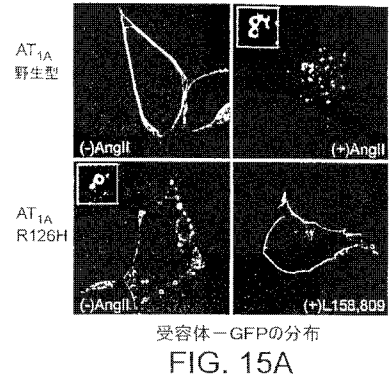


β アレスチン-GFPの分布
FIG. 13B

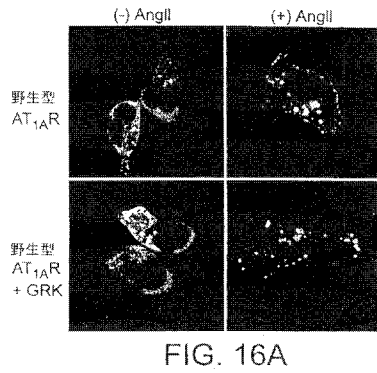
【 図 1 4 】



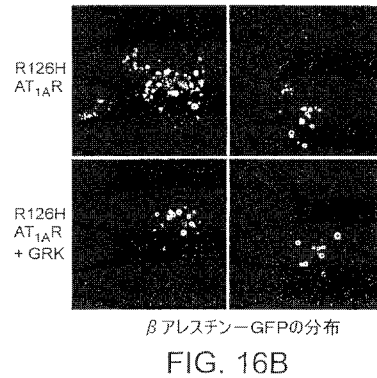
【 図 1 5 】



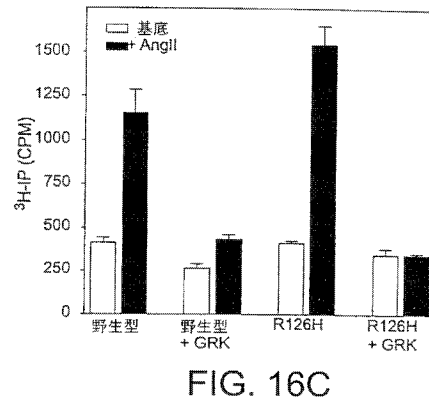
【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059267 A2

(51) International Patent Classification: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/01701

(22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)

(25) Filing Language: English

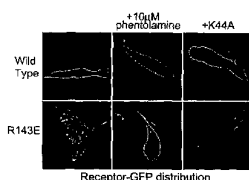
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/263,406 23 January 2001 (23.01.2001) US
Not furnished 22 January 2002 (22.01.2002) US(71) Applicant: DUKE UNIVERSITY [US/US]; Irwin Road,
Durham, NC 27708 (US).(72) Inventors: BARAK, Larry, S.; 5248 Inverness Drive,
Durham, NC 27712 (US); OAKLEY, Robert, H.; 705
Braiden Drive, Durham, NC 27713 (US); CARON, Marc,
G.; 803 Pleasant Green Road, Hillsborough, NC 27278
(US); LAPORTE, Stephane, A.; 820 Ave del'Espce, Out-
remont, Québec J2V3V3 (CA); WILBANKS, Alyson,
8101 Reynard Road, Chapel Hill, NC 27516 (US).(74) Agents: BAUM, Allen, R. et al.; Burns, Doane, Swecker
and Mathis, L.L.P., P.O. Box 1404, Alexandria, UT 22313-
1404 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, 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,
NL, SN, TD, TG).

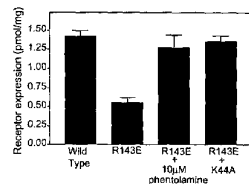
Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CONSTITUTIVELY DESENSITIZED G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS



Receptor-GFP distribution



(57) Abstract: The present invention relates to modified G-protein coupled receptors (GPCRs). The modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified to have altered DRY motifs such that the modified GPCRs are constitutively desensitized. As such, the modified GPCRs of the present invention preferably localize to endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner. The invention also relates to methods of screening compounds and sample solutions for GPCR activity using the modified GPCRs.

WO 02/059267 A2

WO 02/059267

PCT/US02/01701

**CONSTITUTIVELY DESENSITIZED G PROTEIN-COUPLED
RECEPTORS**

5 [0001] This application claims priority under 35 U.S.C. § 120 to U.S.S.N. 60/263,406, filed January 23, 2001, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

10 [0002] This work was supported by National Institutes of Health Grants HL 61365 and NS 19576, and therefore the government may have certain rights to the invention.

FIELD OF THE INVENTION

15 [0003] The present invention relates to modified G-protein coupled receptors (GPCRs). The modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified to have altered DRY motifs such that the proteins localize to endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner. This invention also includes mutant proteins that result in agonist-independent GPCR localization to endocytic vesicles or endosomes. This invention also relates to methods of detecting G protein-coupled receptor (GPCR) activity and methods of assaying GPCR activity. 20 The present invention provides methods for identifying compounds that interact with components of the GPCR regulatory pathway and methods for identifying antagonists of GPCRs.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] G protein-coupled receptors (GPCRs) are cell surface proteins that translate hormone or ligand binding into intracellular signals. GPCRs

WO 02/059267

PCT/US02/01701

have been found in all animals, insects, and plants studied to date. GPCR signaling plays a pivotal role in regulating various physiological functions including phototransduction, olfaction, neurotransmission, vascular tone, cardiac output, digestion, pain, and fluid and electrolyte balance. Although they are involved in various physiological functions, GPCRs share a number of common structural features. They contain seven membrane domains bridged by alternating intracellular and extracellular loops and an intracellular carboxyl-terminal tail of variable length.

[0005] The magnitude of the physiological responses controlled by GPCRs is linked to the balance between GPCR signaling and signal termination. The signaling of GPCRs is controlled by a family of intracellular proteins called arrestins. Arrestins bind activated GPCRs, including those that have been agonist-activated and especially those that have been phosphorylated by G protein-coupled receptor kinases (GRKs).

[0006] Receptors, including GPCRs, have historically been targets for drug discovery and therapeutic agents because they bind ligands, hormones, and drugs with high specificity. Approximately fifty percent of the therapeutic drugs in use today target or interact directly with GPCRs. See e.g., Jurgen Drews, (2000) "Drug Discovery: A Historical Perspective," *Science* 287:1960-1964.

[0007] Although only several hundred human GPCRs are known, it is estimated that upwards of a thousand GPCRs exist in the human genome. Of these known GPCRs, many are orphan receptors that have yet to be associated with a function or a ligand.

[0008] There is a need for accurate, easy to interpret methods of detecting G protein-coupled receptor activity and methods of assaying GPCR activity. One method, as disclosed in Barak et al., U.S. Patent Nos. 5,891,646 and 6,110,693, uses a cell expressing a GPCR and a conjugate

WO 02/059267

PCT/US02/01701

of an arrestin and a detectable molecule, the contents of which are incorporated by reference in their entirety.

5 [0009] The majority of the existing methods for identifying GPCR antagonists are dependent on the presence of agonist. Assays for identifying compounds that prevent the activation of GPCRs typically require that the GPCR is first activated in order to identify interfering compounds. For receptors with known agonists, these agonists are currently used to activate these receptors. However, many GPCRs are orphan receptors with no known ligand or agonist.

10 [0010] One method, as disclosed in Pausch et al., WO 00/12704, uses GPCRs with constitutively activating mutations that permit detection of the receptors' functional activity in the absence of activating ligands. In Pausch et al. modifications are made to the GPCR that result in a constitutively active receptor. The constitutively active GPCR mutants of Pausch et al. 15 have elevated intrinsic activity compared to wild type receptors and interact with and activate intracellular heterotrimeric G proteins in an agonist-independent manner. The method of Pausch et al., although agonist-independent, utilizes constitutively active GPCR mutants.

20 [0011] The agonist-dependence of GPCR assays continues to be a problem because antagonist discovery for orphan receptors is typically dependent on the prior discovery of agonist or ligand. Therefore, there is a need to provide additional methods of GPCR activation that are not dependent on agonist.

SUMMARY

25 [0012] The present invention relates to modified GPCRs that are constitutively desensitized.

[0013] A first aspect of the present invention is a modified GPCR or biologically active fragment thereof comprising a DRY motif. In the modified

WO 02/059267

PCT/US02/01701

GPCR of the present invention the DRY motif is modified to contain an amino acid other than arginine at position 2. The modified GPCR or biologically active fragment thereof is constitutively desensitized in absence of agonist. The modified GPCR of the present invention may bind arrestin, localize to clathrin-coated pits, or localize in endocytic vesicles or endosomes in absence of agonist. The modified GPCR may be derived from a naturally occurring GPCR. The modified GPCR may be a Human GPCR, a Class A GPCR, a Class B GPCR, an orphan GPCR, or an odorant or taste GPCR.

5

[0014] In an additional aspect, the present invention relates to an isolated modified arrestin polypeptide. The isolated modified arrestin polypeptide of the present invention produces a constitutively desensitized GPCR when expressed in a cell.

10

[0015] In a further aspect, the present invention relates to an isolated modified GRK polypeptide. The isolated modified GRK polypeptide produces a constitutively desensitized GPCR when expressed in a cell.

15

[0016] The present invention also includes modified GPCR proteins having the activities noted herein, and that display the amino acid sequences set forth and described above and selected from SEQ. ID. NO: 1 - SEQ. ID. NO.: 6. When expressed in a cell, the polypeptide binds arrestin in absence of agonist and may target to an endocytic vesicle or endosome in the absence of agonist. The polypeptide comprises a modified DRY motif wherein the arginine of the DRY motif is any naturally occurring amino acid or synthetic amino acid except arginine.

20

[0017] The present invention also relates to a nucleic acid encoding an isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof of claim 1. The nucleic acid sequence of the present invention may be selected from SEQ. ID. No.: 7 - SEQ. ID. No.: 12.

25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

[0018] The present invention further relates to vectors comprising a nucleic acid sequence as described herein. The nucleic acid may be operatively linked to an expression control sequence and introduced into an appropriate host. The invention accordingly extends to unicellular hosts
5 transformed with the cloned gene or recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence encoding the present modified GPCR(s).

[0019] In a further aspect, the present invention relates to methods of screening compositions, compounds, and sample solutions. These methods include methods of identifying a compound which inhibits arrestin binding to a GPCR. The method comprises a) preparing an isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof which targets to an endocytic vesicle or endosome without agonist; b) attaching the isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof to a substrate; c) exposing the isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof to a candidate
10 compound; d) exposing the isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof to an arrestin or biologically active fragment of arrestin; and e) determining if binding of arrestin or the biologically active fragment of arrestin is blocked.

[0020] The methods of the present invention also include methods of identifying compounds that interfere with agonist-independent localization of arrestin. This method comprises (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof; (b) expressing the modified GPCR or biologically active fragment thereof in a cell that also expresses arrestin; (c) exposing the cell to a candidate compound; and (d) determining whether the candidate compound inhibits endosomal targeting of arrestin.
15

[0021] The methods of the present invention also include methods of identifying a compound that has GPCR antagonist or inverse agonist activity. This method comprises a) preparing an isolated modified GPCR or
20

WO 02/059267

PCT/US02/01701

biologically active fragment thereof which targets to an endosome or endocytic vesicle without agonist; b) expressing the modified GPCR or biologically active fragment thereof in a cell that also expresses a conjugate of arrestin and a detectable molecule; c) exposing the cell a candidate
5 compound; and d) detecting whether interaction of the arrestin protein with the GPCR is decreased after exposure to the test compound, the decrease in interaction being an indication that the compound has activity.

[0022] In the methods of the present invention, the modified GPCR may be a class A receptor, a class B receptor, an odorant or taste receptor, or an orphan receptor. In the methods of the present invention, the arrestin may be conjugated to a detectable molecule. In the methods of the present
10 invention, the modified GPCR may be conjugated to a detectable molecule. The detectable molecule may be a radioisotope, an epitope tag, an affinity label, an enzyme, a fluorescent group, or a chemiluminescent group.

[0023] The present invention also relates to compounds identified by the methods of the present invention. The invention further relates to pharmaceutical compositions for the treatment of a condition mediated by a GPCR in mammals comprising a therapeutically effective amount of a
15 compound identified by the methods of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0024] In an additional aspect, the invention relates to a non-human transgenic animal which expresses a modified GPCR. The animal may be a mouse, a primate, a feline, a canine, a porcine, a bovine, a caprine, or an
20 ovine.

[0025] In a further aspect, the invention relates to a method of detecting a modified GPCR in a biological sample. The method comprises assaying the biological sample with an antibody which recognizes and binds to the modified GPCR and determining whether the antibody bound the modified
25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

GPCR.

[0026] In yet a further aspect, the invention relates to a method of detecting a nucleic acid of the present invention in a biological sample. The method comprises (a) exposing the biological sample to a modified GPCR probe; and (b) determining whether the modified GPCR probe bound the nucleic acid of the biological sample.

[0027] The invention also relates to a composition comprising a substrate and one or more nucleic acids of the present invention or fragments thereof which encode a motif of formula I, wherein formula I is a modified DRY motif.

[0028] The invention further relates to a kit for detecting a modified GPCR in a biological sample. The kit comprises an antibody which recognizes and binds to the modified GPCR and reagents which detect the antibody that binds to the modified GPCR.

[0029] The invention additionally relates to an isolated immunoglobulin which recognizes and binds to a modified GPCR. The immunoglobulin may be a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a human antibody, a bispecific antibody, a humanized antibody, a primatized antibody, or an antibody fragment. The immunoglobulin may be an antibody fragment and the antibody fragment may be Fab, Fab', F(ab')₂, F(v), and scFv.

[0030] In yet another aspect, the invention relates to a method of inhibiting arrestin binding to a GPCR or GPCR localization to endocytic vesicles or endosomes in the absence of agonist by administering an effective amount of 2-ethyl-5,7-dimethyl-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-3H-imidazo[4,5-b]pyridine or phentolamine to a patient in need thereof.

[0031] Other objects and advantages will become apparent to those skilled in the art from a review of the ensuing description which proceeds

with reference to the following illustrative drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

5 [0032] The objects and advantages of the invention will be understood by reading the following detailed description in conjunction with the drawings in which:

10 [0033] An illustrative, non-limiting list of known GPCRs with which the present invention may be used is contained in Figure 1. The receptors are grouped according to classical divisions based on structural similarities and ligands.

[0034] Fig. 2 illustrates (a) the wild-type DRY motif, as well as (b) the modified DRY motif.

15 [0035] Fig. 3 illustrates the amino acid sequences of the modified GPCRs described herein. Amino acids that differ from the wild-type sequence are in bold and underlined.

20 [0036] Fig. 4 illustrates the expression and adenylyl cyclase stimulation of V2R and V2R(R137H) in HEK-293 cells. Cells transiently transfected with cDNA for V2R (■) or V2R(R137H) (□) were exposed to varying concentrations of [³H]AVP. (A) Scatchard analysis (Inset) indicates the receptors have similar affinity for AVP [V2R, 16 ± 6 nM; V2R(R137H), 15 ± 3 nM]. V2R expression varied between 2.5 and 5 pmol/mg of cell protein, with the plasma membrane expression of the V2R(R137H) being approximately 1/12 of this (x intercept of Scatchard). The data are representative of three
25 experiments, with each point measured in duplicate. (B) Fluorescence images of live unpermeabilized cells, labeled with rhodamine-tagged mouse-monoclonal anti-HA antibodies, expressing the V2R (Left) or the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

V2R(R137H) (Right). (C) cAMP measured in whole cells stimulated for 15 min. with concentrations of AVP between 0 and 250 nM. cAMP accumulation is expressed as total counts of [³H]cAMP/total uptake of [³H]adenine per well of cells. Results are the mean ± SD of three experiments.

5
10
15
20
25

[0037] Fig. 5 illustrates the fluorescence images of V2R-GFP and V2R(R137H)-GFP in HEK-293 cells. Cells expressing V2R-GFP (Upper) or V2R(R137H)-GFP (Lower) were treated with vehicle or AVP for 30 min. at 37°C. The agonist-mediated redistribution of wild-type receptor (Upper) from the plasma membrane to endocytic vesicles contrasts with the agonist-independent localization of the V2R(R137H)-GFP in endosomes (Lower). Bar = 25 μm.

[0038] Fig. 6 illustrates the fluorescence images of the association between βarrestin2-GFP and V2R or V2R(R137H) in HEK-293 cells. Left shows the agonist-independent distribution of βarrestin2-GFP in living cells expressing the V2R (Upper) or V2R(R137H) (Lower). Without agonist treatment, βarrestin2-GFP is cytosolic in cells containing wild-type V2R (Left Upper), but in cells containing the V2R(R137H) (Left Lower), it is also in endocytic vesicles. Following 30 min. of exposure to 100 nM AVP (Right), βarrestin-GFP is localized on endocytic vesicles with both receptor subtypes.

[0039] Fig. 7 illustrates the βarrestin2 association with and phosphorylation of V2R and V2R(R137H) in HEK-293 cells. (A) Dynamin(K44A) was expressed with βarrestin2-GFP and either V2R or V2R(R137H). Exposure of V2R to AVP (100 nM) (Left) resulted in appreciable βarrestin2-GFP translocation that remains visible at 30 min. as a punctate distribution at the cell membrane rather than as a vesicular distribution inside the cell. In the absence of agonist, the cells containing dynamin(K44A) and V2R(R137H) also show βarrestin2-GFP fluorescence

WO 02/059267

PCT/US02/01701

distributed in punctate areas at the plasma membrane. A similar pattern was apparent even in the presence of agonist (Right). (B) Left panel shows receptors that were immunoprecipitated with a mouse anti-HA antibody and blotted with a rabbit anti-HA antibody. The faint 50-kDa band present in all
5 six lanes is cross-reactive mouse Ig heavy chain. Right panel depicts receptors that were assayed for phosphorylation as described in Experimental Procedures. Equal amounts of receptor (40 fmol) were loaded into each lane. The arrows mark the positions of the receptor species migrating at approximately 70, 50, and 40 kDa as revealed by anti-HA
10 antibody. Results are representative of three experiments.

[0040] Fig. 8 illustrates the expression of V2R, V2R(R137H, Ala6), and V2R(R137H, T362) in HEK-293 cells. (A) Plasma membrane receptors were labeled with rhodamine-tagged mouse-monoclonal anti-HA antibody. The upper panels show receptor distribution in the absence of agonist. The lower
15 panels show cells that were labeled with antibody before treatment with 100 nM AVP for 30 min. at 37°C. (B) Plasma membrane receptor expression measured by [³H]AVP was normalized to wild-type V2R plasma membrane expression (approximately 5 pmol/mg). Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiments.

[0041] Fig. 9 illustrates the β arrestin2-GFP translocation and adenylyl cyclase response of V2R, V2R(R137H, Ala6), and V2R(R137H, T362) in HEK-293 cells. (A) In the absence of agonist (Left), GFP fluorescence is cytosolic. Following exposure of the cells to 100 nM AVP for 30 min. at
20 37°C, GFP fluorescence redistributes to punctate areas of plasma membrane (Right). (B) Cells were treated with vehicle or 2.5 μ M AVP for 15 min., and whole cell cAMP was determined as described in the Examples below. The absolute basal and stimulated cAMP responses were presented in units of (counts of [³H]cAMP per min. per well)/(counts of [³H]adenine
25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

uptake per minute per well) and were: mock (0.019 ± 0.009 , 0.017 ± 0.006 , $n = 3$); V2R(R137H) (0.018 ± 0.0045 , 0.040 ± 0.008 , $n = 4$); V2R(R137H,Ala6) (0.020 ± 0.0017 , 0.23 ± 0.040 , $n = 4$); V2R(Ala6) (0.017 ± 0.0006 , 1.3 ± 0.31 , $n = 3$); V2R(R137H,T362) (0.022 ± 0.0056 , 0.22 ± 0.070 , $n = 4$); V2R(T362) (0.015 ± 0.0021 , 1.3 ± 0.34 , $n = 3$); and V2R (0.021 ± 0.0024 , 1.4 ± 0.19 , $n = 4$). Data are expressed as the mean \pm SD of three to four separate experiments.

[0042] Fig. 10 illustrates the expression of wild type α_{1B} -AR and α_{1B} -AR R143A in HEK-293 cells. Cells transiently transfected with cDNA for the wild type α_{1B} -AR (■) or the α_{1B} -AR R143A mutant (□) were exposed to varying concentrations of [3 H]prazosin. (A) Scatchard analysis indicates that the α_{1B} -AR R143A mutants display a lower B_{max} than the wild type α_{1B} -AR. Plasma membrane expression of the wild type α_{1B} -AR varied between 1.5 and 4 pmol/mg of whole cell protein, while the expression of α_{1B} -AR R143A varied between 0.2 and 0.5 pmol/mg. The K_D of the α_{1B} -AR R143A mutant for norepinephrine (NE) was similar to the K_D of the wild type α_{1B} -AR for NE (between 1.5 and 3.5 nM). The data are representative of three independent experiments, with each point measured in duplicate. (B) Fluorescence images of live, unpermeabilized HEK-293 cells expressing the wild type α_{1B} -AR (Left) or the α_{1B} -AR R143A (Right) illustrate the lower surface expression of the α_{1B} -AR R143A compared to the wild type α_{1B} -AR. Cells were labeled with mouse monoclonal anti-HA antibody and mouse anti-IgG FITC-conjugated secondary antibody.

[0043] Fig. 11 illustrates the norepinephrine (NE) stimulation of inositol phosphate (IP) accumulation. HEK-293 cells transiently transfected with cDNA for the wild type α_{1B} -AR or the α_{1B} -AR R143 mutants and stimulated for 30 min. with 10 μ M NE. Inositol phosphate accumulation is measured as described and expressed as the total counts of [3 H]IP per well of cells. The

data are representative of three independent experiments, with each point measured in triplicate.

- 5 [0044] Fig. 12 illustrates the fluorescence images of the wild type α_{1B} -AR-GFP and the α_{1B} -AR R143-GFP mutants in HEK-293 cells. (A) Cells expressing wild type α_{1B} -AR-GFP, when left unstimulated, localize to the plasma membrane (Left). Addition of 10 μ M NE to the cells results in the redistribution of the receptor to endosomes (Right). (B) Cells expressing α_{1B} -AR R143-GFP mutants are localized in endosomes in the absence of agonist.
- 10 [0045] Fig. 13 illustrates the fluorescence images in HEK-293 cells of the association between β arrestin-GFP and the wild type α_{1B} -AR or the α_{1B} -AR R143 mutants. (A) β arrestin-GFP is distributed predominantly in the cytosol when co-expressed with the wild type α_{1B} -AR (Left). Addition of 10 μ M NE causes β arrestin-GFP translocation to the plasma membrane in cells expressing the wild type α_{1B} -AR (Right). (B) β arrestin-GFP is partially translocated to the plasma membrane in the absence of agonist when expressed with the α_{1B} -AR R143 mutants.
- 15 [0046] Fig. 14 illustrates the fluorescence images in HEK-293 cells of the wild type α_{1B} -AR-GFP and the α_{1B} -AR R143E-GFP mutants when cultured with phentolamine or co-expressed with dynamin(K44A). (A) Cells expressing the wild type α_{1B} -AR-GFP (Upper) or α_{1B} -AR R143E-GFP (Lower) were left untreated (Left), cultured in 10 μ M phentolamine at 37°C overnight (Center), or co-expressed with dynamin(K44A) (Right). Both the phentolamine treatment and the co-expression of dynamin(K44A) result in a redistribution of the α_{1B} -AR R143E-GFP from endosomes to the plasma membrane, while the same conditions have no effect on the distribution of the wild type α_{1B} -AR-GFP. (B) Whole cell binding with [³H]prazosin was evaluated in HEK-293 cells expressing the wild type α_{1B} -AR-GFP or the α_{1B} -AR R143E-GFP mutants.
- 20
- 25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

Cells were either left untreated, cultured in 10 μ M phentolamine at 37°C overnight, or co-expressed with dynamin(K44A). The α_{1B} -AR R143E-GFP is expressed at a lower density on the plasma membrane than the wild type α_{1B} -AR-GFP. Expression of the α_{1B} -AR R143E-GFP mutant increases to the level of the wild type receptor when the cells are either cultured in phentolamine or co-expressed with dynamin(K44A).

[0047] Fig. 15 illustrates the fluorescence images illustrating the distribution of the wild type AT_{1A}R-GFP, the AT_{1A}R-R126H-GFP mutant, and β arrestin-GFP in HEK-293 cells. (A) Cells express AT_{1A}R-GFP predominantly on the plasma membrane, and the addition of 1 μ M angiotensin II (AngII) results in the redistribution of the receptor from the plasma membrane to endosomes (Upper). Cells express AT_{1A}R R126H-GFP in endosomes in the absence of agonist, and culturing the cells in 1 μ M L158,809 results in the redistribution of the receptor back to the plasma membrane (Lower). (B) β arrestin-GFP co-expressed with wild type AT_{1A}R is distributed predominantly in the cytosol, and the addition of 1 μ M AngII results in the translocation of β arrestin-GFP to endosomes (Upper). In contrast, β arrestin-GFP co-expressed with AT_{1A}R R126H-GFP is distributed in endosomes in the absence of agonist, and this distribution is enhanced upon addition of 1 μ M AngII (Lower).

[0048] Fig. 16 illustrates the effect of overexpression of the GRKs on the internalization of the AT_{1A}R. (A) Upper panels illustrate the localization of β arrestin-GFP in HEK-293 transfected with wild-type AT_{1A}R, in the presence and absence of AngII. Lower panels illustrate the localization of β arrestin-GFP in HEK-293 transfected with wild-type AT_{1A}R, with the co-transfection of GRKs. (B) Upper panels illustrate the localization of β arrestin-GFP in HEK-293 transfected with the R126H mutant of AT_{1A}R, in the presence and absence of AngII. Lower panels illustrate the localization of β arrestin-GFP in

WO 02/059267

PCT/US02/01701

HEK-293 transfected with R126H mutant of AT_{1A}R, with the co-transfection of GRKs. (C) [³H]-IP accumulation was determined for the above cells.

5 [0049] Fig. 17 illustrates the nucleic acid sequences encoding the modified GPCRs of the present invention. Nucleic acids that differ from the wild-type sequence are in bold and underlined. Sequences are listed in the 5' → 3' orientation.

DETAILED DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS

10 [0050] In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, immunology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Cells, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (2000)];

15 [0051] Unless otherwise stated, the following terms used in the specification and claims have the meanings given below:

20 [0052] An "immunoglobulin" includes antibodies and antibody fragments with immunogenic activity. Preferred immunogenic activity is where the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

immunoglobulin binds to a modified GPCR. An even more preferable immunoglobulin is one that can distinguish between a modified GPCR and a wild-type GPCR. And the most preferable immunoglobulin is that which binds to a modified DRY motif or a DRY motif of a GPCR. The term
5 "antibody" refers to immunoglobulins, including whole antibodies as well as fragments thereof that recognize or bind to specific epitopes. The term antibody encompasses polyclonal, monoclonal, and chimeric antibodies, the last mentioned described in further detail in U.S. Patent Nos. 4,816,397 and 4,816,567. The term "epitope" is used to identify one or more portions of an
10 antigen or an immunogen which is recognized or recognizable by antibodies or other immune system components.

[0053] Exemplary immunoglobulins are intact immunoglobulin molecules, substantially intact immunoglobulin molecules and those portions of an immunoglobulin molecule that contains the paratope. Antibody fragments
15 include those portions known in the art as Fab, Fab', F(ab')₂, F(v), and scFv which portions are preferred for use in the therapeutic methods described herein.

[0054] Fab and F(ab')₂ portions of antibody fragments are prepared by the proteolytic reaction of papain and pepsin, respectively, on substantially
20 intact antibodies by methods that are well-known. See for example, U.S. Patent No. 4,342,566 to Theofilopolous et al. Fab' antibody portions are also well-known and are produced from F(ab')₂ portions followed by reduction of the disulfide bonds linking the two heavy chain portions as with mercaptoethanol, and followed by alkylation with a reagent such as
25 iodoacetamide. An antibody containing intact antibody portions is preferred herein.

[0055] An "antibody combining site" is that structural portion of an antibody comprised of heavy and light chain variable and hypervariable

WO 02/059267

PCT/US02/01701

regions that specifically binds antigen.

[0056] The phrase "monoclonal antibody" in its various grammatical forms refers to an antibody having only one species of antibody combining site capable of immunoreacting with a particular epitope on an antigen. A
5 monoclonal antibody may therefore contain a plurality of antibody combining sites, each immunospecific for a different antigen, e.g., a bispecific (chimeric) monoclonal antibody.

[0057] By "animal" is meant any member of the animal kingdom including vertebrates (e.g., frogs, salamanders, chickens, or horses) and invertebrates
10 (e.g., worms, etc.). "Animal" is also meant to include "mammals." Preferred mammals include livestock animals (e.g., ungulates, such as cattle, buffalo, horses, sheep, pigs and goats), as well as rodents (e.g., mice, hamsters, rats and guinea pigs), canines, felines, primates, lupine, camelid, cervidae, rodent, avian and ichthyies.

[0058] "Antagonist(s)" include all agents that interfere with wild-type
15 and/or modified GPCR binding to an agonist, wild-type and/or modified GPCR desensitization, wild-type and/or modified GPCR binding arrestin, wild-type and/or modified GPCR endosomal localization, and the like, including agents that affect the wild-type and/or modified GPCRs as well as
20 agents that affect other proteins involved in wild-type and/or modified GPCR signaling, desensitization, endosomal localization, resensitization, and the like.

[0059] A DNA sequence is "operatively linked" to an expression control
25 sequence when the expression control sequence controls and regulates the transcription and translation of that DNA sequence. The term "operatively linked" includes having an appropriate start signal (e.g., ATG) in front of the DNA sequence to be expressed and maintaining the correct reading frame to permit expression of the DNA sequence under the control of the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

expression control sequence and production of the desired product encoded by the DNA sequence. If a gene that one desires to insert into a recombinant DNA molecule does not contain an appropriate start signal, such a start signal can be inserted in front of the gene.

5 [0060] "Abnormal GPCR desensitization" and "abnormal desensitization" mean that the GPCR desensitization pathway is disrupted such that the balance between active receptor and desensitized receptor is altered with respect to wild-type conditions. Either there is more active receptor than normal or there is more desensitized receptor than wild-type conditions.
10 Abnormal GPCR desensitization may be the result of a GPCR that is constitutively active or constitutively desensitized, leading to an increase above normal in the signaling of that receptor or a decrease below normal in the signaling of that receptor.

15 [0061] "Arrestin" means all types of naturally occurring and engineered variants of arrestin, including, but not limited to, visual arrestin (sometimes referred to as Arrestin 1), β arrestin 1 (sometimes referred to as Arrestin 2), and β arrestin 2 (sometimes referred to as Arrestin 3).

[0062] "Biologically active fragment" of a modified GPCR means a polypeptide fragment of a modified GPCR which has ability to bind arrestin in an agonist-independent manner, target to endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner, or both.

20 [0063] "Biologically active fragment" of an arrestin means a fragment of arrestin which has the ability to bind a wild-type and/or modified GPCR.

25 [0064] "Biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject; wherein said sample can be blood, serum, a urine sample, a fecal sample, a tumor sample, a cellular wash, an oral sample, sputum, biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells, or cells

WO 02/059267

PCT/US02/01701

which have been incubated in tissue culture.

[0065] As used herein "carboxyl-terminal tail" means the carboxyl-terminal tail of a GPCR. The carboxyl-terminal tail of many GPCRs begins shortly after (within approximately 20 amino acids) the conserved NPXXY motif that marks the end of the seventh transmembrane domain (i.e. what follows the NPXXY motif is the carboxyl-terminal tail of the GPCR). The carboxyl-terminal tail may be relatively long (approximately tens to hundreds of amino acids), relatively short (approximately 10-100 amino acids), or virtually non-existent (less than approximately ten amino acids). As used

5

10

[0066] "Class A receptors" preferably do target to endocytic vesicles or endosomes in HEK-293 cells.

[0067] A "modified class A receptor" means those class A receptors that contain a DRY mutation.

15

[0068] "Class B receptors" preferably do not target to endocytic vesicles or endosomes in HEK-293 cells.

[0069] A "modified class B receptor" means those class B receptors that contain a DRY mutation.

[0070] A DNA "coding sequence" is a double-stranded DNA sequence which is transcribed and translated into a polypeptide *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxyl) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, prokaryotic sequences, cDNA from eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from eukaryotic (e.g., mammalian) DNA, and even synthetic DNA sequences. A polyadenylation signal and transcription termination sequence will usually be

20

25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

located 3' to the coding sequence.

[0071] Transcriptional and translational control sequences are DNA regulatory sequences, such as promoters, enhancers, polyadenylation signals, terminators, and the like, that provide for the expression of a coding sequence in a host cell.

[0072] "Concurrent administration," "administration in combination," "simultaneous administration," or "administered simultaneously" mean that the compounds are administered at the same point in time or sufficiently close in time that the results observed are essentially the same as if the two or more compounds were administered at the same point in time.

[0073] "Conserved abnormality" means an abnormality in the GPCR pathway, including but not limited to, abnormalities in GPCRs, GRKs, arrestins, AP-2 protein, clathrin, protein phosphatase and the like, that may cause abnormal GPCR signaling. This abnormal GPCR signaling may contribute to a GPCR-related disease.

[0074] For a "constitutively desensitized" GPCR, the equilibrium between a GPCR having the ability, versus inability, to properly activate conventional G protein signaling is shifted toward the inability to properly activate conventional G protein signaling. Additionally, the constitutively desensitized GPCRs of the present invention are constitutively phosphorylated, constitutively bind arrestin, constitutively localize in clathrin-coated pits, and/or constitutively localize to endocytic vesicles or endosomes. Constitutively desensitized receptors lack ability to properly respond to agonist and may be desensitized even in the absence of agonist. Constitutively desensitized GPCRs form independent of agonist stimulation of the sensitized GPCR. Constitutively desensitized may cover a host of degrees of inappropriate signaling and a constitutively desensitized receptor may or may not signal at some point during its lifetime.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

[0075] "Detectable molecule" means any molecule capable of detection by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, radioactive, and optical means, including but not limited to, fluorescence, phosphorescence, and bioluminescence and radioactive decay. Detectable molecules include, but are not limited to, GFP, luciferase, β -galactosidase, rhodamine-conjugated antibody, and the like. Detectable molecules include radiolabels, epitope tags, affinity labels, enzymes, fluorescent groups, chemiluminescent groups, and the like. Detectable molecules include molecules which are directly or indirectly detected as a function of their interaction with other molecule(s).

[0076] "Desensitized GPCR" means a GPCR that presently does not have ability to respond to agonist and activate conventional G protein signaling. Desensitized GPCRs of the present invention do not properly respond to agonist, are phosphorylated, bind arrestin, constitutively localize in clathrin-coated pits, and/or constitutively localize to endocytic vesicles or endosomes

[0077] "Desensitization pathway" means any cellular component of the desensitization process, as well as any cellular structure implicated in the desensitization process and subsequent processes, including but not limited to, arrestins, GRKs, GPCRs, AP-2 protein, clathrin, protein phosphatases, and the like. In the methods of assaying of the present invention, the polypeptides may be detected, for example, in the cytoplasm, at a cell membrane, in clathrin-coated pits, in endocytic vesicles, endosomes, any stages in between, and the like.

[0078] "DACs" mean any desensitization active compounds. Desensitization active compounds are any compounds that influence the GPCR desensitization mechanism by either stimulating or inhibiting the process. DACs influence the GPCR desensitization pathway by acting on

WO 02/059267

PCT/US02/01701

any cellular component of the process, as well as any cellular structure implicated in the process, including but not limited to, arrestins, GRKs, GPCRs, AP-2 protein, clathrin, protein phosphatases, and the like. DACs may include, but are not limited to, compounds that inhibit arrestin translocating to a GPCR, compounds that inhibit arrestin binding to a GPCR, compounds that stimulate arrestin translocating to a GPCR, compounds that stimulate arrestin binding to a GPCR, compounds that inhibit GRK phosphorylation of a GPCR, compounds that stimulate GRK phosphorylation of a GPCR, compounds that inhibit protein phosphatase dephosphorylation of a GPCR, compounds that stimulate protein phosphatase dephosphorylation of a GPCR, compounds that regulate the release of arrestin from a GPCR, antagonists of a GPCR, inverse agonists and the like. DACs preferably inhibit or stimulate the GPCR desensitization process without binding to the same ligand binding site of the GPCR as traditional agonists and antagonists of the GPCR.

[0079] A "DNA molecule" refers to the polymeric form of deoxyribonucleotides (adenine, guanine, thymine, or cytosine) in its either single stranded form, or a double-stranded helix. This term refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, inter alia, in linear DNA molecules (e.g., restriction fragments), viruses, plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (i.e., the strand having a sequence homologous to the mRNA).

[0080] "DRY motif" means a highly conserved GPCR motif located near the cytoplasmic boundary of the third transmembrane region and the second

WO 02/059267

PCT/US02/01701

intracellular loop. The DRY motif is most preferably a three amino acid motif: Aspartate-Arginine-Tyrosine, wherein Aspartate is the first amino acid, Arginine is the second amino acid, and tyrosine is the third amino acid (or DRY if using single amino acid substitutions), wherein the DRY is also referred to as formula I. Variations of this amino acid sequence which do not confer agonist-independent binding to arrestin or agonist-independent endosomal localization to the GPCR are also included. For example, the first amino acid may be a Glutamate (i.e. ERY), Leucine, Proline, Glutamine, Threonine, Isoleucine, Cysteine, Glycine, Asparagine, Valine, Histidine, or Alanine. For example, the third amino acid may be a Histidine (i.e. DRH), Tryptophan, Phenylalanine, Serine, Isoleucine, Glutamine, Histidine, Glycine, Cysteine, Leucine, Aspartate, or Alanine. There may be more than one substitution in the DRY motif, or any combination of substitutions. The wild-type DRY motif and preferred modifications are illustrated in Figure 2a.

15 [0081] An "expression control sequence" is a DNA sequence that controls and regulates the transcription and translation of another DNA sequence. A coding sequence is "under the control" of transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then translated into the protein encoded by the coding sequence.

20 [0082] "GFP" means Green Fluorescent Protein which refers to various naturally occurring forms of GFP which may be isolated from natural sources or genetically engineered, as well as artificially modified GFPs. GFPs are well known in the art. See, for example, U.S. Patent Nos. 25 5,625,048; 5,777,079; and 6,066,476. It is well understood in the art that GFP is readily interchangeable with other fluorescent proteins, isolated from natural sources or genetically engineered, including but not limited to, yellow fluorescent proteins (YFP), red fluorescent proteins (RFP), cyan fluorescent

WO 02/059267

PCT/US02/01701

proteins (CFP), blue fluorescent proteins, luciferin, UV excitable fluorescent proteins, or any wave-length in between. As used herein, "GFP" shall mean all fluorescent proteins known in the art.

5 [0083] "GPCR signaling" means GPCR induced activation of G proteins. This may result in, for example, cAMP production.

[0084] "G protein-coupled receptor kinase" (GRK) includes any kinase that has the ability to phosphorylate a GPCR.

[0085] "*Homo sapien* GPCR" means a naturally occurring GPCR in a *Homo sapien*.

10 [0086] "Hybridization" means hydrogen bonding, which may be Watson-Crick, Hoogsteen or reversed Hoogsteen hydrogen bonding, between complementary nucleoside or nucleotide bases. For example, adenine (A) and thymine (T) are complementary nucleobases which pair through the formation of hydrogen bonds.

15 [0087] "Inverse agonist" means a compound which, upon binding to the GPCR, inhibits the basal intrinsic activity of the GPCR. An inverse agonist is a type of antagonist.

[0088] An "isolated" or "purified" GPCR nucleic acid molecule or protein, biologically active portion thereof, or antibody is substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences (preferably protein encoding sequences) that naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5 and 3 ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For purposes of the invention, "isolated" when used to refer to nucleic acid molecules, excludes isolated chromosomes. For example, in various
20
25
embodiments, the isolated GPCR nucleic acid molecule can contain less

WO 02/059267

PCT/US02/01701

than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, or 0.1 kb of nucleotide sequences that naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. An GPCR protein that is substantially free of cellular material includes preparations of GPCR protein
5 having less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of non-GPCR protein. When the GPCR protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, preferably, culture medium represents less than about 30%, 20%, 10%, or 5% of the volume of the protein preparation. When GPCR protein is produced by chemical synthesis, preferably the
10 protein preparations have less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of chemical precursors or non-GPCR chemicals.

[0089] "Modified GPCR" refers to a GPCR that has one or more modifications resulting in a constitutively desensitized GPCR. As such, a modified GPCR may have one or additions, substitutions, or deletions of its
15 amino acid sequence, preferably in its DRY motif.

[0090] "Modified GPCR probe" means a probe that binds specifically across the modified DRY region of nucleic acids encoding those polypeptides.

[0091] "Modified DRY motif" refers to a DRY motif of a GPCR that has
20 one or modifications resulting in an amino acid sequence other than the DRY motif. This modified DRY motif results in a constitutively desensitized GPCR. Most preferably, the modified DRY motif consists of an amino acid other than arginine as the second amino acid. The second amino acid of the DRY motif is preferably Alanine, Aspartate, Glutamate, Histidine, or
25 Asparagine, but may be any amino acid other than Arginine or Lysine, as shown in Fig. 2b.

[0092] "Modified GRK" means a GRK modified such that it alters desensitization.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

[0093] "Naturally occurring GPCR" means a GPCR that is present in nature.

5 [0094] "Odorant ligand" means a ligand compound that, upon binding to a receptor, leads to the perception of an odor including a synthetic compound and/or recombinantly produced compound including agonist and antagonist molecules.

[0095] "Odorant receptor" means a receptor protein normally found on the surface of olfactory neurons which, when activated (normally by binding an odorant ligand) leads to the perception of an odor.

10 [0096] A "modified odorant receptor" will be those odorant receptors that contain a DRY mutation.

[0097] The term "oligonucleotide," as used herein in referring to the probe of the present invention, is defined as a molecule comprised of two or more ribonucleotides, preferably more than three. Its exact size will depend upon many factors which, in turn, depend upon the ultimate function and use of the oligonucleotide.

[0098] An "origin of replication" refers to those DNA sequences that participate in DNA synthesis.

20 [0099] The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human.

[00100] The term "pharmaceutically acceptable carrier," as used herein means a pharmaceutically-acceptable material, composition or vehicle, such as a liquid or solid filler, diluent, excipient, solvent or encapsulating material, involved in carrying or transporting a chemical agent.

25 [00101] "Primatized antibody" means a recombinant antibody containing primate variable sequences or antigen binding portions, and human

constant domain sequences.

[00102] The term "primer" as used herein refers to an oligonucleotide, whether occurring naturally as in a purified restriction digest or produced synthetically, which is capable of acting as a point of initiation of synthesis
5 when placed under conditions in which synthesis of a primer extension product, which is complementary to a nucleic acid strand, is induced, i.e., in the presence of nucleotides and an inducing agent such as a DNA polymerase and at a suitable temperature and pH. The primer may be either single-stranded or double-stranded and must be sufficiently long to
10 prime the synthesis of the desired extension product in the presence of the inducing agent. The exact length of the primer will depend upon many factors, including temperature, source of primer and use of the method. For example, for diagnostic applications, depending on the complexity of the target sequence, the oligonucleotide primer typically contains 15-25 or more
15 nucleotides, although it may contain fewer nucleotides.

[00103] The primers herein are selected to be "substantially" complementary to different strands of a particular target DNA sequence. This means that the primers must be sufficiently complementary to hybridize with their respective strands. Therefore, the primer sequence need not
20 reflect the exact sequence of the template. For example, a non-complementary nucleotide fragment may be attached to the 5' end of the primer, with the remainder of the primer sequence being complementary to the strand. Alternatively, non-complementary bases or longer sequences can be interspersed into the primer, provided that the primer sequence has
25 sufficient complementarity with the sequence of the strand to hybridize therewith and thereby form the template for the synthesis of the extension product.

[00104] As used herein, the terms "restriction endonucleases" and

WO 02/059267

PCT/US02/01701

"restriction enzymes" refer to bacterial enzymes, each of which cut double-stranded DNA at or near a specific nucleotide sequence.

[00105] "Presently" means as a temporal context placing sensitization, desensitization, or resensitization in a time context.

5 [00106] A "promoter sequence" is a DNA regulatory region capable of binding RNA polymerase in a cell and initiating transcription of a downstream (3' direction) coding sequence. For purposes of defining the present invention, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site and extends upstream (5' direction) to include
10 the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence will be found a transcription initiation site (conveniently defined by mapping with nuclease S1), as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase. Eukaryotic promoters will
15 often, but not always, contain "TATA" boxes and "CAT" boxes. Prokaryotic promoters contain Shine-Dalgarno sequences in addition to the -10 and -35 consensus sequences.

[00107] A "replicon" is any genetic element (e.g., plasmid, chromosome, virus) that functions as an autonomous unit of DNA replication *in vivo*; i.e.,
20 capable of replication under its own control.

[00108] "Resensitized GPCR" means a GPCR, which was previously desensitized, which is presently sensitized.

[00109] "Resensitization active compounds" are compounds which result in resensitization of a GPCR.

25 [00110] "Sensitized GPCR" means a GPCR that presently has ability to respond to agonist and activate conventional G protein signaling.

[00111] A "signal sequence" can be included before the coding sequence. This sequence encodes a signal peptide, N-terminal to the polypeptide, that

WO 02/059267

PCT/US02/01701

communicates to the host cell to direct the polypeptide to the cell surface or secrete the polypeptide into the media, and this signal peptide is clipped off by the host cell before the protein leaves the cell. Signal sequences can be found associated with a variety of proteins native to prokaryotes and eukaryotes.

[00112] "Therapeutically effective amount" is meant an amount sufficient to prevent, and preferably reduce some feature of pathology such as for example, elevated blood pressure, respiratory output, etc.

[00113] A cell has been "transformed" by exogenous or heterologous DNA when such DNA has been introduced inside the cell. The transforming DNA may or may not be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell. In prokaryotes, yeast, and mammalian cells for example, the transforming DNA may be maintained on an episomal element such as a plasmid. With respect to eukaryotic cells, a stably transformed cell is one in which the transforming DNA has become integrated into a chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cells containing the transforming DNA. A "clone" is a population of cells derived from a single cell or common ancestor by mitosis. A "cell line" is a clone of a primary cell that is capable of stable growth *in vitro* for many generations.

[00114] Two DNA sequences are "substantially homologous" when at least about 75% (preferably at least about 80%, and most preferably at least about 90 or 95%) of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern hybridization experiment under, for

WO 02/059267

PCT/US02/01701

example, stringent conditions as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Maniatis et al., supra; DNA Cloning, Vols. I & II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

5 [00115] "Unknown or Orphan Receptor" means a GPCR whose function and/or ligands are unknown.

[00116] A "modified orphan receptor" means those orphan receptors that contain a DRY mutation.

10 [00117] A "vector" is a replicon, such as plasmid, phage or cosmid, to which another DNA segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment.

[00118] The invention features modified GPCR polypeptides comprising a modified DRY motif, preferably a substantially pure preparation of a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif, or a recombinant modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif.
15 In preferred embodiments: the polypeptide has biological activity; the polypeptide has an amino acid sequence at least about 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identical to an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing, preferably it has about 65%
20 sequence identity with an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing, and most preferably it has about 92% to about 99% sequence identity with an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing; the polypeptide has an amino acid sequence essentially the same as an amino acid sequence of the invention contained
25 in the Sequence Listing; the polypeptide is at least about 5, 10, 20, 50, 100, or 150 amino acid residues in length; the polypeptide includes at least about 5, preferably at least about 10, more preferably at least about 20, still more preferably at least about 50, 100, or 150 contiguous amino acid residues of

the invention contained in the Sequence Listing. In yet another preferred embodiment, the amino acid sequence which differs in sequence identity by about 7% to about 8% from the amino acid sequences of the invention contained in the Sequence Listing is also encompassed by the invention.

5 [00119] In preferred embodiments: the modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif is encoded by a nucleic acid of the invention contained in the Sequence Listing, or by a nucleic acid having at least about 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% homology with a nucleic acid of the invention contained in the Sequence Listing.

10 [00120] In a preferred embodiment, the subject modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif differs in amino acid sequence at about 1, 2, 3, 5, 10 or more residues from a sequence of the invention contained in the Sequence Listing. The differences, however, are such that the modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif still exhibits a constitutively desensitized biological activity.

15 [00121] In preferred embodiments, the polypeptide includes all or a fragment of an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing; fused, in reading frame, to additional amino acid residues, preferably to residues encoded by genomic DNA 5' or 3' to the genomic DNA which encodes a sequence of the invention contained in the Sequence Listing.

[00122] Polypeptides of the invention include those which arise as a result of alternative transcription events, alternative RNA splicing events, and alternative translational and posttranslational events.

25 [00123] In a preferred embodiment, the encoded modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif differs (e.g., by amino acid substitution, addition or deletion of at least one amino acid residue) in amino acid sequence at about 1, 2, 3, 5, 10 or more residues, from a sequence of

the invention contained in the Sequence Listing. The differences, however, are such that: the encoded GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif still exhibits a constitutively desensitized biological activity.

5 [00124] In preferred embodiments, the encoded polypeptide includes all or a fragment of an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing; fused, in reading frame, to additional amino acid residues, preferably to residues encoded by genomic DNA 5' or 3' to the genomic DNA which encodes a sequence of the invention contained in the Sequence Listing.

10 [00125] Included in the invention are: allelic variations; natural mutants; induced mutants; proteins encoded by DNA that hybridize under high or low stringency conditions to a nucleic acid which encodes a polypeptide of the invention contained in the Sequence Listing (for definitions of high and low stringency see Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 15 New York, 1989, 6.3.1 - 6.3.6, hereby incorporated by reference); and, polypeptides specifically bound by antisera to GPCR polypeptides comprising a modified DRY motif, especially by antisera to an active site or binding domain of modified GPCR polypeptides comprising a modified DRY motif polypeptide. The invention also includes fragments, preferably 20 biologically active fragments. These and other polypeptides are also referred to herein as modified GPCR polypeptide analogs or variants.

[00126] The invention further provides nucleic acids, e.g., RNA or DNA, encoding a polypeptide of the invention. This includes double stranded nucleic acids as well as coding and antisense single strands.

25 [00127] In preferred embodiments, the subject nucleic acid encoding the modified GPCRs comprising a modified DRY motif will include a transcriptional regulatory sequence, e.g., at least one of a transcriptional promoter or transcriptional enhancer sequence, operably linked to the gene

WO 02/059267

PCT/US02/01701

sequence of the modified GPCR comprising a modified DRY motif, e.g., to render the gene sequence encoding the modified GPCR comprising a modified DRY motif suitable for expression in a recombinant host cell.

5 [00128] In yet a further preferred embodiment, the nucleic acid which encodes a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif of the invention, hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid probe corresponding to at least about 8 consecutive nucleotides, comprising the modified DRY motif, of the invention contained in the Sequence Listing; more preferably to at least about 12 consecutive nucleotides of the invention contained in the Sequence Listing; still more preferably to at least about 20 consecutive nucleotides of the invention contained in the Sequence Listing; most preferably to at least about 40 consecutive nucleotides of the invention contained in the Sequence Listing.

10 [00129] In another aspect, the invention provides a substantially pure nucleic acid having a nucleotide sequence which encodes a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif. In preferred embodiments: the encoded polypeptide has biological activity; the encoded polypeptide has an amino acid sequence at least about 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% or 99% homologous to an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing; the encoded polypeptide has an amino acid sequence essentially the same as an amino acid sequence of the invention contained in the Sequence Listing; the encoded polypeptide is at least about 5, 10, 20, 50, 100, or 150 amino acids in length; the encoded polypeptide comprises at least about 5, preferably at least about 10, more preferably at least about 20, still more preferably at least about 50, 100, or 150 contiguous amino acids of the invention contained in the Sequence Listing.

25 [00130] In another aspect, the invention encompasses: a vector including

WO 02/059267

PCT/US02/01701

a nucleic acid which encodes a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif or a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif variant as described herein; a host cell transfected with the vector; and a method of producing a recombinant modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif or modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif variant; including culturing the cell, e.g., in a cell culture medium, and isolating a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif or variant, e.g., from the cell or from the cell culture medium.

5
10 [00131] One embodiment of the invention is directed to substantially isolated nucleic acids. Nucleic acids of the invention include sequences comprising at least about 8 nucleotides in length, more preferably at least about 12 nucleotides in length, even more preferably at least about 15-20 nucleotides in length, that correspond to a subsequence of any one of SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12 or complements thereof. Alternatively, the nucleic acids comprise sequences contained within any ORF (open reading frame), including a complete protein-coding sequence, of which any of SEQ ID NO: 7- SEQ ID NO: 12 forms a part. The invention encompasses sequence-conservative variants and function-conservative variants of these sequences. The nucleic acids may be DNA, RNA, DNA/RNA duplexes, protein-nucleic acid (PNA), or derivatives thereof.

15
20 [00132] In another aspect, the invention features a purified recombinant nucleic acid having at least about 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% homology with a sequence of the invention contained in the Sequence Listing.

25 [00133] The invention also encompasses recombinant DNA (including DNA cloning and expression vectors) comprising these modified DRY motif -derived sequences; host cells comprising such DNA, including fungal,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

bacterial, yeast, plant, insect, and mammalian host cells; and methods for producing expression products comprising RNA and polypeptides encoded by the modified GPCR comprising a modified DRY motif sequences. These methods are carried out by incubating a host cell comprising a modified GPCR comprising a modified DRY motif -derived nucleic acid sequence under conditions in which the sequence is expressed. The host cell may be native or recombinant. The polypeptides can be obtained by (a) harvesting the incubated cells to produce a cell fraction and a medium fraction; and (b) recovering the modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif from the cell fraction, the medium fraction, or both. The polypeptides can also be made by *in vitro* translation.

[00134] In another aspect, the invention features nucleic acids capable of binding mRNA of modified GPCR comprising a modified DRY motif. Such nucleic acid is capable of acting as antisense nucleic acid to control the translation of mRNA of modified GPCRs comprising a modified DRY motif. A further aspect features a nucleic acid which is capable of binding specifically to a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif nucleic acid. These nucleic acids are also referred to herein as complements and have utility as probes and as capture reagents.

[00135] In another aspect, the invention features an expression system comprising an open reading frame corresponding to the nucleic acid of a modified GPCR comprising a modified DRY motif. The nucleic acid further comprises a control sequence compatible with an intended host. The expression system is useful for making polypeptides corresponding to modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif nucleic acid.

[00136] In another aspect, the invention encompasses: a vector including a nucleic acid which encodes a modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif or variant as described herein; a host cell transfected

WO 02/059267

PCT/US02/01701

with the vector; and a method of producing a recombinant modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif or variant; including culturing the cell, e.g., in a cell culture medium, and isolating the modified GPCR polypeptide comprising a modified DRY motif or variant, e.g., from the cell or
5 from the cell culture medium.

[00137] The invention further provides antibodies, preferably monoclonal antibodies, which specifically bind to the polypeptides of the invention. Methods are also provided for producing antibodies in a host animal. The methods of the invention comprise immunizing an animal with at least one
10 modified GPCR comprising a modified DRY motif -derived immunogenic component, wherein the immunogenic component comprises one or more of the polypeptides encoded by any one of SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12 or sequence-conservative or function-conservative variants thereof; or polypeptides that are contained within any ORFs, including complete
15 protein-coding sequences, of which any of SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12 forms a part; or polypeptide sequences contained within any of SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6; or polypeptides of which any of SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6 forms a part. Host animals include any warm blooded animal, including without limitation mammals and birds. Such antibodies have utility
20 as reagents for immunoassays to evaluate the abundance and distribution of modified GPCR comprising a modified DRY motif-specific antigens.

[00138] The present invention is related to modified GPCRs, polypeptides
25 of modified GPCRs, nucleic acid molecules that encode the modified GPCRs, vectors containing the nucleic acid molecules which encode the modified GPCRs, vectors enabling the nucleic acid construction of the modified GPCRs, and cells containing modified GPCRs. The invention

WO 02/059267

PCT/US02/01701

further relates to assay systems using the modified GPCRs, assay systems using the cells containing modified GPCRs, compounds identified using the assay systems, methods of treatment using the compounds identified, methods of disease diagnosis using the assay systems, and kits containing assay reagents of the present invention and cells of the present invention. The invention also may relate to antisense and treatment techniques using the modified GPCR nucleic acids.

[00139] Mutations can be made in the GPCR or modified GPCR such that a particular codon is changed to a codon which codes for a different amino acid. Such a mutation is generally made by making the fewest nucleotide changes possible. A substitution mutation of this sort can be made to change an amino acid in the resulting protein in a non-conservative manner (i.e., by changing the codon from an amino acid belonging to a grouping of amino acids having a particular size or characteristic to an amino acid belonging to another grouping) or in a conservative manner (i.e., by changing the codon from an amino acid belonging to a grouping of amino acids having a particular size or characteristic to an amino acid belonging to the same grouping). Such a conservative change generally leads to less change in the structure and function of the resulting protein. A non-conservative change is more likely to alter the structure, activity or function of the resulting protein. The present invention should be considered to include sequences containing conservative changes which do not significantly alter the activity or binding characteristics of the resulting protein. The present invention should also be considered to include sequences containing non-conservative changes which do not significantly alter the activity or binding characteristics of the resulting protein.

[00140] In a particular embodiment, the modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified so that they localize to

WO 02/059267

PCT/US02/01701

endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner. In a particular embodiment, the modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified so that they bind β arrestin in an agonist-independent manner. In a more preferred embodiment, the modified
5 GPCRs of the present invention both bind β arrestin and localize to endocytic vesicles or endosomes.

[00141] The modified GPCRs of the present invention comprise a modified DRY motif. A DRY motif is a highly conserved GPCR motif located near the cytoplasmic boundary of the third transmembrane region and the second
10 intracellular loop. The DRY motif is most preferably a three amino acid motif: Aspartate-Arginine-Tyrosine (DRY). A modified DRY motif refers to a DRY motif of a GPCR that has one or modifications resulting in an amino acid sequence other than the DRY motif. Most preferably, the modified DRY motif consists of an amino acid other than arginine as the second amino
15 acid. The second amino acid of the DRY motif is preferably Alanine, Aspartate, Glutamate, Histidine, or Asparagine, but may be any amino acid other than arginine or Lysine.

[00142] This modified DRY motif results in a constitutively desensitized GPCR, which was not known prior to the present invention. As described
20 herein, the DRY motif of any GPCR can be modified as described, resulting in a constitutively desensitized GPCR.

[00143] The modified GPCRs can include V2R, but V2R may also be excluded. The modified DRY motif of the V2R R137H can be used to replace the DRY motif of other GPCRs. Preferably, this three amino acid
25 sequence is located near the cytoplasmic boundary of the third transmembrane region and the second intracellular loop. Modified GPCRs containing a mutation of the R of the DRY motif have an increased affinity for arrestin and colocalize with arrestin in endocytic vesicles or endosomes

WO 02/059267

PCT/US02/01701

in an agonist-independent manner. This invention includes (is related to) modified GPCRs which colocalize with arrestin in endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner, preferably due to a mutation of R of the DRY motif.

5 [00144] The modified GPCRs of the present invention may also include modifications to include one or more sites of phosphorylation, preferably clusters of phosphorylation sites, properly positioned in their carboxyl terminal tails, as described in U.S.S.N. 09/993,844 "Modified G-Protein Coupled Receptor," filed November 5, 2001, the contents of which are
10 hereby incorporated by reference in their entirety. The clusters of amino acids may occupy two out of two, two out of three, three out of three, three out of four positions, four out of four, four out of five positions, five out of five, and the like consecutive amino acid positions. These clusters of phosphorylation sites are preferably serine and threonine residues located
15 in the carboxyl-terminal tail of the GPCR. These modifications may be made by discrete point mutations of the amino acid residues, mutations made in the nucleic acid sequence of a GPCR, or by exchanging the carboxyl-terminal tail, in whole or in part, with that of a GPCR having properly positioned clusters of phosphorylation sites. The site of exchange
20 may be after or including the conserved NPXXY motif. As an alternative, a putative site of palmitoylation of a GPCR may be identified at approximately 10 to 25 (preferably 15 to 20) amino acid residues downstream of the conserved NPXXY motif, and the site of exchange may be after or including the palmitoylated cysteine(s). The tails may be exchanged and the modified
25 GPCRs may be constructed accordingly by manipulation of the nucleic acid sequence or the corresponding amino acid sequence.

[00145] The modified GPCRs of the present invention are useful in assays for screening compounds that may alter G protein-coupled receptor (GPCR)

activity. These assays may utilize detectable molecules conjugated to arrestin, GPCR, or other proteins involved in desensitization. Detectable molecules are described herein, and include fluorescent groups (for example, GFP), enzymes (for example, β -galactosidase), radioisotopes, epitope tags, affinity labels, and chemiluminescent groups. Examples of assays in which the present invention may be used include, but are not limited to, those as described in U.S. Patent Nos. 5,891,646 and 6,110,693, the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entireties. Additional examples of assays in which the present invention may be used include, but are not limited to, assays using chemiluminescence, Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) and assays using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technology as described in Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairat, S., Chelsky, "β2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7: 3684 - 3689.

[00146] An illustrative, non-limiting list of known GPCRs with which the present invention may be used is contained in Fig. 1. The receptors are grouped according to classical divisions based on structural similarities and ligands.

[00147] By way of example, the major classes of GPCRs for known receptors are Class A receptors which preferably do target to endocytic vesicles or endosomes in HEK-293 cells, and Class B receptors which preferably do not target to endocytic vesicles or endosomes in HEK-293 cells.

[00148] It has been discovered that after agonists bind GPCRs, G-protein coupled receptor kinases (GRKs) phosphorylate intracellular domains of GPCRs. After phosphorylation, an arrestin protein associates with the GRK-

phosphorylated receptor and uncouples the receptor from its cognate G protein. The interaction of the arrestin with the phosphorylated GPCR terminates GPCR signaling and produces a non-signaling, desensitized receptor.

5 [00149] The arrestin bound to the desensitized GPCR targets the GPCR to clathrin-coated pits for endocytosis by functioning as an adaptor protein, which links the GPCR to components of the endocytic machinery, such as adaptor protein-2 (AP-2) and clathrin. The internalized GPCRs are dephosphorylated and are recycled back to the cell surface desensitized.

10 The present inventors have determined that the stability of the interaction of arrestin with the GPCR dictates the rate of GPCR dephosphorylation, recycling, and resensitization. The involvement of GPCR phosphorylation and dephosphorylation in the desensitization process has been exemplified in U.S.S.N. 09/933,844, filed November 5, 2001, the disclosure of which is

15 hereby incorporated by reference in its entirety.

[00150] The present inventors have discovered that the dependence on agonist, of the arrestin association with the GPCR, may be mediated by the DRY motif of the GPCR. The DRY motif may allow arrestin-GPCR association dependence on agonist.

20 [00151] GPCRs, which normally bind arrestin in an agonist-dependent manner, may be modified to comprise a modified DRY motif. This modification preferably allows the modified GPCR to bind arrestin in the absence of agonist. These modified GPCRs may be useful in screening for antagonists of GPCR activity.

25 [00152] GPCRs have been implicated in a number of disease states, including, but not limited to cardiac indications such as angina pectoris, essential hypertension, myocardial infarction, supraventricular and ventricular arrhythmias, congestive heart failure, atherosclerosis, renal

WO 02/059267

PCT/US02/01701

failure, diabetes, respiratory indications such as asthma, chronic bronchitis, bronchospasm, emphysema, airway obstruction, upper respiratory indications such as rhinitis, seasonal allergies, inflammatory disease, inflammation in response to injury, rheumatoid arthritis, chronic inflammatory
5 bowel disease, glaucoma, gastrointestinal indications such as acid/peptic disorder, erosive esophagitis, gastrointestinal hypersecretion, mastocytosis, gastrointestinal reflux, peptic ulcer, Zollinger-Ellison syndrome, pain, obesity, bulimia nervosa, depression, obsessive-compulsive disorder, organ malformations (for example, cardiac malformations), neurodegenerative
10 diseases such as Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease, multiple sclerosis, Epstein-Barr infection and cancer. As such, modulation of GPCR activity and affinity for arrestin is a mechanism for ameliorating these disease states.

[00153] The present inventors have determined that a conserved
15 abnormality(ies) in any part of the GPCR signaling pathway may cause abnormal GPCR signaling leading to a GPCR-related disease. For example, components of the GPCR signaling pathway, including but not limited to, GPCRs, GRKs, arrestins, protein phosphatases, AP-2 proteins, clathrin, and the like, may express a mutation(s). The mutation(s) may
20 result in, for example, abnormal ligand binding, G protein coupling, GPCR trafficking, and the like, that may cause altered GPCR signaling. These mutations may result in a GPCR that is constitutively desensitized.

[00154] A wild-type GPCR cycles between being (1) sensitized, which means presently able to respond to agonist and activate conventional G
25 protein signaling, (2) desensitized, which means presently unable to respond to agonist and activate conventional G protein signaling, and (3) resensitized, which means again presently able to respond to agonist and activate conventional G protein signaling. This balance can be disrupted,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

resulting, for example, in a constitutively desensitized GPCR. A constitutively desensitized GPCR does not cycle as above. Under wild-type conditions, a GPCR is desensitized subsequent to agonist activation of the sensitized GPCR; whereas, a constitutively desensitized GPCR forms independent of agonist stimulation of the sensitized GPCR. The constitutively desensitized GPCRs of the present invention are most preferably localized in endocytic vesicles or endosomes.

5 [00155] As described herein, the constitutively desensitized GPCRs can be associated with a diseased state. These constitutively desensitized GPCRs do not properly respond to agonist and do not activate conventional G protein signaling. This lack of conventional G protein signaling may be responsible for the diseased state. These constitutively desensitized GPCRs may be constitutively phosphorylated and constitutively bind arrestin. The arrestin binding may result in the GPCR localizing in the endocytic vesicles or endosomes.

10 [00156] Certain conditions can alter the constitutive desensitization of these receptors. Some of these conditions may result in desensitized receptors. Some of the conditions may result in the reversal of the relevant disease state.

15 [00157] For example, mutant receptors which are constitutively desensitized can harbor second mutations which prevent constitutive desensitization, particularly endosomal localization. By way of example, a modified GPCR may have additional mutations, wherein phosphorylation sites (for example, SSSTSS) are converted to non-phosphorylatable sites (for example, AAAAAA) in its carboxyl-terminal tail, that result in decreased 25 β arrestin binding and prevent constitutive desensitization, particularly endosomal localization of the GPCR (Fig. 8). Mutant proteins in the desensitization pathway can inhibit the constitutive desensitization of the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

modified GPCR and its localization in endocytic vesicles or endosomal localization. (Fig. 14). Antagonists of the GPCR can prevent the constitutive desensitization, particularly endosomal localization (Figs. 14 and 15). Compounds which bind other proteins, involved in the desensitization pathway, can also prevent the constitutive desensitization, particularly endosomal localization.

5 [00158] By way of example, a GPCR may have a modification(s) in any part of the GPCR including, but not limited to, in the carboxyl-terminal tail, in the intracellular loop(s), and/or in the cytoplasmic end of the transmembrane region. This modification may, for example, enhance the GPCR affinity for arrestin. If the GPCR affinity for arrestin is sufficiently enhanced by the mutation, the GPCR may become constitutively desensitized. A constitutively desensitized receptor may contribute to the etiology of a GPCR-related disease.

10 [00159] Arrestin also may have a modification(s) in any part thereof that either enhances or reduces the affinity of the arrestin for the GPCR. In addition, AP-2 protein and clathrin may have a modification in any part thereof that either enhances or reduces the ability of arrestins bound to a receptor to remain bound. The altered affinity of arrestin for the GPCR may lead to a constitutively desensitized GPCR, and thus, contribute to the etiology of a GPCR-related disease. Additionally, the expression of arrestin may be increased with respect to wild-type, leading to a constitutively desensitized GPCR.

15 [00160] Further, G protein-coupled receptor kinases (GRKs) may have a modification in any part thereof that either enhances phosphorylation of a GPCR, leading to enhanced affinity of the GPCR for arrestin. The modified GRK may lead to constitutive desensitization, and thus, contribute to the etiology of a GPCR-related disease. Additionally, the expression of GRKs

WO 02/059267

PCT/US02/01701

may be increased with respect to wild-type, leading to a constitutively desensitized GPCR.

[00161] In addition, protein phosphatases may have a modification (e.g., genetic mutation or other functional alteration) in any part thereof that either enhances or reduces dephosphorylation of a GPCR, leading to enhanced or reduced affinity of the GPCR for arrestin. The modification in the protein phosphatases may lead to constitutive desensitization, and thus contribute to the etiology of a GPCR-related disease. Protein phosphatases that may be involved in the GPCR signaling pathway, include, for example, calcium regulated serine threonine phosphatases. Examples of Ca-regulated serine

10 threonine phosphatases include the PPEF1/PPEF2 family of phosphatases.

[00162] In a particular embodiment, the modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified so that a percentage greater than basal levels localize to endocytic vesicles or endosomes in absence of agonist stimulation.

15

Modified GPCRs

[00163] The present invention is related to modified GPCRs. Most preferably, the modified GPCRs of the present invention are modified such that they constitutively localize in endocytic vesicles or endosomes.

20

Normally, agonist binds GPCR, the activated GPCR is phosphorylated, binds arrestin, and is targeted to endocytic vesicles or endosomes. The phosphorylated domain may be in the carboxyl-terminal domain. The present inventors determined that modifications in regions of the GPCR other than the carboxyl-terminal domain can control the binding of the GPCR to arrestin. They determined that modifications can enable GPCR binding to arrestin in the absence of agonist. Modifications can form a constitutively desensitized receptor.

25

5 [00164] The present inventors have discovered that specific amino acid motifs may be involved in agonist-dependent formation of a GPCR/arrestin complex, and thus ultimately may promote recruitment of arrestin to endocytic vesicles or endosomes. Modification of these amino acid motifs may alleviate the agonist-dependence of the formation of the GPCR/arrestin complex. Most preferably, the amino acid motif involved in agonist-dependent formation of a GPCR/arrestin complex may be the DRY motif.

10 [00165] Most preferably, the modified GPCRs of the present invention comprise one or more modifications in the DRY motif. The DRY motif may be modified in 1, 2, or 3 of 3 amino acids, but must be modified at least in the Arginine. The DRY motif may be modified in whole or in part. A DRY motif is a highly conserved GPCR motif located near the cytoplasmic boundary of the third transmembrane region and the second intracellular loop. The DRY motif is most preferably a three amino acid motif: Aspartate-Arginine-Tyrosine (DRY). Modifications of this motif can form a
15 constitutively desensitized receptor.

[00166] By way of example, as shown in Fig. 3, the V2R has a DRY motif at amino acids 136-138. Modifications of the DRY motif may promote
20 agonist-independent formation of a GPCR/arrestin complex and constitutive localization to the endocytic vesicles or endosomes. The α_{1B} -AR receptor comprises a DRY motif at amino acids 142-144 that promotes formation of a GPCR/arrestin complex and localizes to endocytic vesicles or endosomes. The AT_{1A}R receptor comprises a DRY motif at amino acids 125-127 that
25 also promotes formation of a GPCR/arrestin complex and localizes to the endocytic vesicles or endosomes.

[00167] The present invention includes the polypeptide sequences of these modified GPCRs. The modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified in the DRY motif to localize to

WO 02/059267

PCT/US02/01701

endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner. The polypeptide sequences of the modified GPCRs of the present invention include sequences having one or more additions, deletions, substitutions, or mutations. These mutations are preferably substitution mutations made in a conservative manner (i.e., by changing the codon from an amino acid belonging to a grouping of amino acids having a particular size or characteristic to an amino acid belonging to the same grouping). Such a conservative change generally leads to less change in the structure and function of the resulting protein. The present invention should be considered to include sequences containing conservative changes which do not significantly alter the activity or binding characteristics of the resulting protein. The present invention should also be considered to include sequences containing non-conservative changes which do not significantly alter the activity or binding characteristics of the resulting protein.

5

10

15 **[00168]** The present invention further includes isolated nucleic acid molecules that encode modified GPCRs. It should be appreciated that also within the scope of the present invention are DNA sequences encoding modified GPCRs which code for a modified GPCR having the same amino acid sequence as the modified GPCRs, but which are degenerate. By "degenerate" it is meant that a different three-letter codon is used to specify a particular amino acid.

20

25 **[00169]** To create a modified GPCR containing a modified DRY motif according to the present invention, a GPCR comprising a DRY motif may have one or more additions, substitutions, deletions, or mutations of amino acid residues in its DRY motif such that the modified GPCR is a constitutively desensitized receptor. By way of example, discrete point mutations of the amino acid residues may be made to provide a modified GPCR. By way of example, three consecutive amino acids may be mutated

WO 02/059267

PCT/US02/01701

to provide a modified GPCR. By way of example, the Arginine may be mutated to any amino acid other than Lysine, most preferably Alanine, Glutamate, Aspartate, Asparagine, or Histidine, to provide a modified GPCR.

5 [00170] In addition, to create a modified GPCR containing a modified DRY motif, mutations may be made in a nucleic acid sequence of a GPCR such that a particular codon is changed to a codon which codes for a different amino acid. Such a mutation is generally made by making the fewest nucleotide changes possible. A substitution mutation of this sort can be made to change an amino acid in the resulting protein to create a modified DRY motif forming a constitutively desensitized receptor. Also by way of example, discrete point mutations of the nucleic acid sequence may be made.

10 [00171] Furthermore, to provide modified GPCRs of the present invention, a GPCR which binds arrestin in an agonist-dependent manner may also have its DRY motif, in whole or in part, exchanged with that of a GPCR having a modified DRY motif that forms a constitutively desensitized receptor. Preferably, the DRY motif of a GPCR which binds arrestin in an agonist-dependent manner is exchanged at an amino acid residue in close proximity to the DRY motif.

15 [00172] Modified GPCRs may be generated by molecular biological techniques standard in the genetic engineering art, including but not limited to, polymerase chain reaction (PCR), restriction enzymes, expression vectors, plasmids, and the like. By way of example, vectors may be designed to enhance the agonist-independent affinity of a GPCR for arrestin. PCR amplified DNA fragments of a GPCR to be modified may be digested by appropriate restriction enzymes and subcloned into the vector, such as pcDNA3.1/zeo or pEGFP-N3. Modifications of the DNA may be

WO 02/059267

PCT/US02/01701

introduced by standard molecular biological techniques as described above.

[00173] As may be shown by standard receptor binding assays, the modified GPCRs are essentially indistinguishable from their wild-type counterparts except for an agonist-independent affinity for arrestin, and thus, constitutive endosomal localization. For example, the modified GPCRs possess similar affinity for antagonists or inverse agonists, and the like.

[00174] By way of example, V2R may have a modification R137H (Fig. 3) resulting in modified endocytic targeting as shown in Figure 5. This modified V2R may be implicated in nephrogenic diabetes insipidus (NDI).

Methods of Assaying GPCR Activity

[00175] The modified GPCRs of the present invention are useful in methods of assaying GPCR activity. The modified GPCRs of the present invention may be used in assays to study GPCRs that have stronger than desired interactions or associations with arrestins and GPCRs that have unknown interactions or associations with arrestins. Methods of the present invention that use the modified GPCRs provide a sensitive assay and may provide for enhanced detection, for example, of arrestin/GPCRs in endocytic vesicles or endosomes. The assays using the modified GPCRs of the present invention may be useful for screening compositions, compounds, sample solutions, and the like for antagonists, inverse agonists, desensitization active compounds, resensitization active compounds, and the like. Once identified, these compounds may be useful as drugs capable of modulating GPCR activity and useful in the treatment of one or more of the disease states in which GPCRs have been implicated.

[00176] In a preferred assay according to the present invention, cells are provided that express modified GPCRs of the present invention and these

cells may further contain a conjugate of an arrestin and a detectable molecule.

5 [00177] Arrestin coupled to a detectable molecule may be detected and monitored as it functions in the GPCR pathway. The location of the arrestin may be detected, for example, evenly distributed in the cell cytoplasm, concentrated at a cell membrane, concentrated in clathrin-coated pits, localized in endocytic vesicles or endosomes, and the like. The proximity of arrestin to a GPCR may be monitored, as well as the proximity to any other cell structure. The change in this proximity in the presence of antagonist can be analyzed. For example, in response to antagonist arrestin may be detected in proximity to GPCRs at a cell membrane, concentrated with GPCRs in clathrin-coated pits, colocalized with a GPCR on endocytic vesicles or endosomes, and the like.

10 [00178] Preferably, the modified GPCRs of the present invention have an increased affinity for arrestin in the absence of agonist and provide a stable complex of the modified GPCR with arrestin, and thereby promote colocalization of the modified GPCR with arrestin into endocytic vesicles or endosomes in the absence of agonist. In the methods of assaying of the present invention, arrestin may be detected, for example, in the cytoplasm, concentrated in proximity to modified GPCRs at a cell membrane, concentrated in proximity to modified GPCRs in clathrin-coated pits, colocalized with a modified GPCR on endocytic vesicles or endosomes, and the like. Preferably the arrestin may be detected colocalized with a GPCR on endocytic vesicles or endosomes. Preferably, compounds may alter this colocalization of arrestin with a GPCR on endocytic vesicles or endosomes.

20 [00179] The association of arrestin with a modified GPCR on endocytic vesicles or endosomes may be detected in absence of agonist. The colocalization of arrestin with a modified GPCR on endocytic vesicles or

WO 02/059267

PCT/US02/01701

endosomes may be disrupted in the presence of antagonist. The association of arrestin with GPCRs on endocytic vesicles or endosomes may give a strong, readily recognizable signal. Under magnification of 40X objective lens, the signal may be doughnut-like in appearance. The signal
5 resulting from the compartmentalization of arrestin and GPCR colocalized in endocytic vesicles or endosomes is typically easy to detect. Similarly, blocking this association is easy to detect. Examples of detection methods are described herein. Such methods include, for example, polarization microscopy, BRET, FRET, evanescent wave excitation microscopy, and
10 standard or confocal microscopy.

[00180] The methods of assessing GPCR pathway activity of the present invention may comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof which targets to an endocytic vesicle or endosome without
15 agonist, (b) attaching the modified GPCR or biologically active fragment thereof to a substrate, (c) exposing the modified GPCR or biologically active fragment thereof to an arrestin, and (e) determining the interaction of the modified GPCR with arrestin.

[00181] The methods of assessing GPCR pathway activity may comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof, (b)
20 expressing the modified GPCR or biologically active fragment in a cell that comprises arrestin, and (c) determining the interaction of the modified GPCR with arrestin.

[00182] The methods of assessing GPCR pathway activity may comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof, (b)
25 detecting cellular localization of GPCR within the cell.

[00183] The arrestin may be in proximity to the modified GPCR. The arrestin, the modified GPCR, and/or the arrestin/modified GPCR complex may be detected, for example, in endocytic vesicles or endosomes, in

WO 02/059267

PCT/US02/01701

clathrin-coated pits, concentrated in proximity to a cell membrane, and the like. Preferably, the arrestin, the modified GPCR, and/or the arrestin/modified GPCR complex may be detected in endocytic vesicles or endosomes. The arrestin, the modified GPCR, and/or the arrestin/modified GPCR complex thus may be detected in endocytic vesicles or endosomes 5 absence of agonist. The association of arrestin with a GPCR in endocytic vesicles or endosomes may give a strong, readily recognizable signal that persists for extended periods of time.

[00184] The modified GPCRs of the present invention can be used to 10 screen for second site mutations which prevent endosomal localization and may be relevant for disease modulation. Mutant GPCRs which are constitutively desensitized can harbor second site mutations which prevent constitutive endosomal localization. By way of example, a mutant receptor may also have a mutation in its carboxyl-terminal tail, such as SSSTSS 15 mutated to AAAAAA, that results in decreased β arrestin binding and results in prevention of constitutive endosomal localization (Fig. 8). The methods for identifying second site suppressor mutations in the GPCRs comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof; (b) expressing said modified GPCR or biologically active fragment thereof in a 20 cell that expresses arrestin; (c) exposing said cell to mutagens; (d) detecting location of the GPCR within the cell, and determining whether the mutagen inhibits endosomal localization of the GPCR, and (e) identifying the second site mutation. The methods for identifying second site suppressor mutations in the GPCRs comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active 25 fragment thereof comprising additional mutations generated by standard molecular biological techniques such as PCR; (b) expressing said modified GPCR or biologically active fragment thereof in a cell that comprises arrestin; (c) detecting location of the mutated GPCR within the cell, and

WO 02/059267

PCT/US02/01701

determining whether the mutation inhibits endosomal localization of the GPCR, and (e) identifying the second site mutation. This approach may also be used for the identification of second site suppressors in proteins implicated in the GPCR desensitization pathway, such as, for example,

5

[00185] Mutant proteins in the desensitization pathway may be identified in the above screen. For example, mutant proteins in the endocytosis pathway can prevent the constitutive endosomal localization. By way of example, a dynamin(K44A) mutant prevents constitutive endosomal localization of the desensitized receptors, which, in the presence of wild-type

10

dynamin, constitutively localize in endosomes (Fig. 14).
[00186] Preferably, the arrestin and/or the GPCR are conjugated to a detectable molecule, as described herein.

15

Methods of screening

[00187] The modified GPCRs of the present invention may be used to screen compositions, compounds, sample solutions, chemical libraries, combinatorial libraries, mimetic libraries, immunoglobulins and the like for antagonists, inverse agonists, agents that interfere with constitutive endosomal localization of the modified GPCR, and the like. The modified GPCRs accordingly enable screening for the above agents in the absence of agonist. By way of example, figures 14 and 15 illustrate antagonist interfering with constitutive endosomal localization of the GPCR. Likewise, other antagonists and the like could be identified accordingly.

20

25

[00188] The methods of assessing GPCR pathway activity of the present invention may comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof thereof which targets to an endocytic vesicle or endosome without agonist, (b) attaching the modified GPCR or biologically active

WO 02/059267

PCT/US02/01701

fragment thereof to a substrate, (c) exposing the modified GPCR or biologically active fragment thereof to a candidate compound, (d) exposing said modified GPCR or biologically active fragment thereof to an arrestin (or biologically active fragment thereof), and (e) determining if arrestin binding is
5 blocked by said candidate compound.

[00189] The methods of identifying compounds that interfere with agonist-independent arrestin binding to a modified GPCR, may comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof, (b) expressing said modified GPCR or biologically active fragment thereof in a
10 cell that comprises arrestin, (c) exposing the cell to a candidate compound, (d) detecting cellular localization of arrestin within the cell, and determining whether the candidate compound interferes with endosomal localization of arrestin.

[00190] The methods of identifying compounds that interfere with agonist-independent endosomal localization of the modified GPCR, may comprise (a) preparing a modified GPCR or biologically active fragment thereof; (b) expressing said modified GPCR or biologically active fragment thereof in a
15 cell that comprises arrestin; (c) exposing the cell to a candidate compound; (d) detecting location of the modified GPCR within the cell, and determining whether the candidate compound interferes with endosomal localization of the modified GPCR.
20

[00191] Preferably, the arrestin and/or the modified GPCR are conjugated to a detectable molecule, as described herein.

[00192] By way of example, compounds and sample solutions may be
25 screened for GPCR antagonist or inverse agonist activity using the modified GPCRs of the present invention. Cells that express at least one modified GPCR of the present invention and that further comprise a conjugate of an arrestin and a detectable molecule are provided. The cells are exposed to

WO 02/059267

PCT/US02/01701

compositions to be tested. It is detected whether exposure to the compound interferes with endosomal localization of the arrestin or modified GPCR, interference being an indication that the composition has GPCR antagonist or inverse agonist activity. The modified GPCR may also be conjugated to a detectable molecule, preferably at the carboxyl-terminus. As explained above, modifications to GPCRs as in the present invention should not affect the natural affinity of the GPCR for antagonists or inverse agonists.

5

[00193] Further by way of example, compounds, compositions, and sample solutions may be screened for GPCR resensitization activity using the modified GPCRs of the present invention. First cells that express at least one first modified GPCR of the present invention and that further comprise a conjugate of an arrestin and a detectable molecule are provided. The first cells are exposed to compounds or sample solutions to be tested. It is detected whether interaction of the arrestin with the first modified GPCR is decreased after exposure to the composition. For compositions which decrease the interaction of the arrestin with the first modified GPCR, the cell and solution are then exposed to the known agonist or ligand of the receptor. It is then determined whether interaction of the arrestin with the first modified GPCR is increased after exposure to agonist or ligand, indicating that the composition has resensitization activity. Interaction of the arrestin with the modified GPCR may be detected in endocytic vesicles or endosomes, in clathrin-coated pits, in proximity to a cell membrane, and the like, as would be known in the art. Then second cells that express at least one second modified GPCR of the present invention and that further comprise a conjugate of an arrestin and a detectable molecule are provided. The second modified GPCR is not related to the first modified GPCR. The second cells are exposed to the compositions to be tested. It is detected whether interaction of the arrestin with the second modified GPCR is

10

15

20

25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

decreased or not after exposure to the composition. For compositions which decrease the interaction of the arrestin with the second modified GPCR, the cell and solution are then exposed to the known agonist or ligand of the receptor; an increase in interaction being an indication that the composition has GPCR resensitization activity independent of the GPCR expressed.

5 Interaction of the arrestin with the modified GPCR may be detected in endocytic vesicles or endosomes, in clathrin-coated pits, in proximity to a cell membrane, and the like. Preferably, the first detection step detects interaction of the arrestin with the modified GPCR in endocytic vesicles or endosomes, the second detection step detects interaction of the arrestin with the modified GPCR in clathrin-coated pits or in proximity to a cell membrane, and the third detection step detects interaction of the arrestin with the modified GPCR in endocytic vesicles or endosomes.

10 [00194] In addition to compounds that target the GPCRs directly (as shown in Fig. 14 and 15). Compounds which target other proteins involved in the desensitization pathway can also prevent constitutive desensitization, particularly the localization to endocytic vesicles or endosomes. By way of example, a compound which inhibits dynamin would prevent constitutive endosomal localization of the desensitized receptors, which in the absence of a dynamin inhibitor, and constitutively localize in endosomes. The above dynamin inhibitor may mimic the effects of the dynamin(K44A) mutant, which demonstrates the functioning of such inhibitor.

Cell Free Assays

15 [00195] A modified GPCR or biologically active fragment thereof can be analyzed in cell free assays.

[00196] In cell-free assays of the present invention, a substrate having deposited thereon a modified GPCR of the present invention is provided. A fluid containing a conjugate of an arrestin and a detectable molecule may

WO 02/059267

PCT/US02/01701

also be provided.

[00197] The modified GPCR and arrestin may be obtained from whole cells and used in the cell-free assay after purification. The modified GPCR has arrestin binding sites and may be supported in a multilayer or bilayer lipid vesicle. The vesicle supporting the modified GPCR may be deposited on the substrate, and the modified GPCR may be supported in the lipid vesicle and deposited on the substrate such that the arrestin binding sites are exposed to arrestin. The substrate may be any artificial substrate on which the modified GPCR may be deposited, including but not limited to, glass, plastic, diamond, ceramic, semiconductor, silica, fiber optic, biocompatible monomer, biocompatible polymer, polymer beads (including organic and inorganic polymers), and the like.

The Conjugates

[00198] The cells used in the methods of assaying of the present invention may comprise a conjugate of an arrestin protein and a detectable molecule. In the cells and methods of the present invention, the cells may also comprise a conjugate of a modified GPCR of the present invention and a detectable molecule.

[00199] All forms of arrestin, naturally occurring and engineered variants, including but not limited to, visual arrestin, β arrestin 1 and β arrestin 2, may be used in the present invention. The modified GPCRs of the present invention may interact to a detectable level with all forms of arrestin.

[00200] Detectable molecules that may be used to conjugate with the arrestin include, but are not limited to, molecules that are detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, radioactive, and optical means, including but not limited to bioluminescence, phosphorescence, and fluorescence. Detectable molecules include, but are not limited to, GFP, luciferase, β -galactosidase, rhodamine-conjugated

WO 02/059267

PCT/US02/01701

antibody, and the like. Detectable molecules include radioisotopes, epitope tags, affinity labels, enzymes, fluorescent groups, chemiluminescent groups, and the like. Detectable molecules include molecules which are directly or indirectly detected as a function of their interaction with other molecule(s).

5 These detectable molecules should be a biologically compatible molecule and should not compromise the ability of the arrestin to interact with the GPCR system and the interaction of the arrestin with the GPCR system must not compromise the ability of the detectable molecule to be detected. Preferred detectable molecules are optically detectable molecules, including
10 optically detectable proteins, such that they may be excited chemically, mechanically, electrically, or radioactively to emit fluorescence, phosphorescence, or bioluminescence. More preferred detectable molecules are inherently fluorescent molecules, such as fluorescent proteins, including, for example, Green Fluorescent Protein (GFP). The
15 detectable molecule may be conjugated to the arrestin protein by methods as described in Barak et al. (U.S. Patent Nos. 5,891,646 and 6,110,693). The detectable molecule may be conjugated to the arrestin at the front-end, at the back-end, or in the middle.

[00201] The modified GPCRs or biologically active fragments thereof may
20 also be conjugated with a detectable molecule. Preferably, the carboxyl-terminus of the modified GPCR is conjugated with a detectable molecule. A carboxyl-terminal tail conjugated or attached to a detectable molecule can be used in a carboxyl-terminal tail exchange to provide the modified GPCRs of the present invention.

25 [00202] If the modified GPCR is conjugated with a detectable molecule, proximity of the modified GPCR with the arrestin may be readily detected. In addition, if the modified GPCR is conjugated with a detectable molecule, compartmentalization of the modified GPCR with the arrestin may be readily

WO 02/059267

PCT/US02/01701

confirmed. The detectable molecule used to conjugate with the modified GPCRs may include those as described above, including, for example, optically detectable molecules, such that they may be excited chemically, mechanically, electrically, or radioactively to emit fluorescence, phosphorescence, or bioluminescence. Preferred optically detectable molecules may be detected by immunofluorescence, luminescence, fluorescence, and phosphorescence.

[00203] For example, the modified GPCRs may be antibody labeled with an antibody conjugated to an immunofluorescence molecule or the modified GPCRs may be conjugated with a luminescent donor. In particular, the modified GPCRs may be conjugated with, for example, luciferase, for example, *Renilla* luciferase, or a rhodamine-conjugated antibody, for example, rhodamine-conjugated anti-HA mouse monoclonal antibody. Preferably, the carboxyl-terminal tail of the modified GPCR may be conjugated with a luminescent donor, for example, luciferase. The modified GPCR, preferably the carboxyl-terminal tail, also may be conjugated with GFP as described in L. S. Barak et al. "Internal Trafficking and Surface Mobility of a Functionally Intact β_2 -Adrenergic Receptor-Green Fluorescent Protein Conjugate", *Mol. Pharm.* (1997) 51, 177 - 184.

Cell Types and Substrates

[00204] The cells of the present invention may express at least one modified GPCR of the present invention. The cells may further comprise a conjugate of an arrestin protein and a detectable molecule. Useful cells include eukaryotic and prokaryotic cells, including, but not limited to, bacterial cells, yeast cells, fungal cells, insect cells, nematode cells, plant cells, and animal cells. Suitable animal cells include, but are not limited to, HEK-293 cells, HeLa cells, COS cells, and various primary mammalian cells.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

An animal model expressing a conjugate of an arrestin and a detectable molecule throughout its tissues or within a particular organ or tissue type, may also be used.

5 [00205] The cells of the present invention may express one modified protein that results in agonist-independent localization of GPCRs to endocytic vesicles or endosomes.

[00206] A substrate may have deposited thereon a plurality of cells of the present invention. The substrate may be any suitable biological substrate, including but not limited to, glass, plastic, ceramic, semiconductor, silica, 10 fiber optic, diamond, biocompatible monomer, or biocompatible polymer materials.

Expression of Modified GPCRs

15 [00207] Another feature of this invention is the expression of the DNA sequences disclosed herein. As is well known in the art, DNA sequences may be expressed by operatively linking them to an expression control sequence in an appropriate expression vector and employing that expression vector to transform an appropriate unicellular host.

[00208] Such operative linking of a DNA sequence of this invention to an expression control sequence, of course, includes, if not already part of the 20 DNA sequence, the provision of an initiation codon, ATG, in the correct reading frame upstream of the DNA sequence.

[00209] A wide variety of host/expression vector combinations may be employed in expressing the DNA sequences of this invention. Useful 25 expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Such vectors may be plasmids, linear DNA, and the like, and may be introduced into hosts via standard methods such as transformation, transfection, gene guns, and the like. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial

WO 02/059267

PCT/US02/01701

plasmids (e.g., *E. coli* plasmids col E1, pCR1, pBR322, pMB9 and their derivatives), plasmids such as RP4; phage DNA (e.g., the numerous derivatives of phage λ , e.g., NM989), and other phage DNA (e.g., M13 and filamentous single stranded phage DNA); yeast plasmids such as the 2 μ

5 plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

10 [00210] Any of a wide variety of expression control sequences (i.e., sequences that control the expression of a DNA sequence operatively linked to it) may be used in these vectors to express the DNA sequences of this invention. Such useful expression control sequences include, for example,

15 the early or late promoters of SV40, CMV, vaccinia virus, polyoma virus or adenovirus, the *lac* system, the *trp* system, the *TAC* system, the *TRC* system, the *LTR* system, the major operator and promoter regions of phage λ , the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, the promoters of acid phosphatase (e.g., Pho5), the promoters of the yeast α -mating factors, and other sequences

20 known to control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses, and various combinations thereof.

[00211] A wide variety of unicellular host cells are also useful in expressing the DNA sequences of this invention. These hosts may include well known eukaryotic and prokaryotic hosts, such as strains of *E. coli*,

25 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungi such as yeasts (e.g. *Saccharomyces*), plant cells, nematode cells, and animal cells, such as HEK-293, CHO, RI.I, B-W and L-M cells, African Green Monkey kidney cells (e.g., COS-1, COS-7, BSC1, BSC40, and BMT10 cells), insect cells (e.g.,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

Sf9 cells), and human cells and plant cells in tissue culture.

[00212] It will be understood that not all vectors, expression control sequences and hosts will function equally well to express the DNA sequences of this invention. Neither will all hosts function equally well with the same expression system. However, one skilled in the art will be able to select the proper vectors, expression control sequences, and hosts without undue experimentation to accomplish the desired expression without departing from the scope of this invention. For example, in selecting a vector, the host must be considered, because the vector must be operable therein. The vector's copy number, the ability to control that copy number, and the expression of any other proteins encoded by the vector, such as antibiotic markers, will also be considered.

[00213] In selecting an expression control sequence, a variety of factors will normally be considered. These include, for example, the relative strength of the system, its controllability, and its compatibility with the particular DNA sequence or gene to be expressed, particularly as regards potential secondary structures. Suitable unicellular hosts will be selected by consideration of, e.g., their compatibility with the chosen vector, their secretion characteristics, their ability to fold proteins correctly, and their fermentation requirements, as well as the toxicity to the host of the product encoded by the DNA sequences to be expressed, and the ease of purification of the expression products.

[00214] Considering these and other factors a person skilled in the art will be able to construct a variety of vector/expression control sequence/host combinations that will express the DNA sequences of this invention on fermentation or in large scale animal culture.

[00215] It is further intended that modified GPCR analogs may be prepared from nucleotide sequences of the protein complex/subunit derived

within the scope of the present invention. Analogs, such as fragments of modified GPCRs, may be produced, for example, by pepsin digestion of modified GPCR material. Other analogs, such as muteins, can be produced by standard site-directed mutagenesis of modified GPCR coding sequences.

5 Analogs which function like modified GPCRs, such as small molecules, whether functioning as promoters or inhibitors, may be identified by known *in vivo* and/or *in vitro* assays.

[00216] As mentioned above, a DNA sequence encoding a modified GPCR can be prepared synthetically rather than cloned. The DNA
10 sequence can be designed with the appropriate codons for the modified GPCR amino acid sequence. In general, one will select preferred codons for the intended host if the sequence will be used for expression. The complete sequence is assembled from overlapping oligonucleotides prepared by standard methods and assembled into a complete coding
15 sequence. See, e.g., Edge et al., *Nature*, 292:756-762 (1981); Nambiar et al., *Science*, 223:1299-1301 (1984); Jay et al., *J. Biol. Chem.*, 259:6311-6317 (1984).

[00217] Synthetic DNA sequences allow convenient construction of genes which will express GPCR analogs or "muteins". Alternatively, DNA encoding
20 muteins can be made by site-directed mutagenesis of native or modified GPCR genes or cDNAs, and muteins can be made directly using conventional polypeptide synthesis.

[00218] A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins is described in Christopher J. Noren, Spencer J.
25 Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science*, 244:182-188 (April 1989). This method may be used to create analogs with unnatural amino acids. Generally, unnatural amino acids are commercially available from vendors such as Aldrich and Bachem. Examples of unnatural amino

acids include, homoserine, homocysteine, N- α -methylarginine, norleucine, N-methylisoleucine, phenylglycine, hydroxyproline, pyroglutamine, ornithine, 2-aminoisobutyric acid, 2-aminobutyric acid, β -cyclohexylalanine, 3-(1-naphthyl)alanine, 3-(2-naphthyl)alanine, citrulline, pipercolinic acid, piperazic acid, 4-chlorophenylalanine, 4-fluorophenylalanine and sarcosine.

Methods of detection

[00219] Methods of detecting the intracellular location of the conjugate of arrestin and a detectable molecule, the intracellular location of a GPCR fused to a detectable molecule, or interaction of the arrestin, which is conjugated to a detectable molecule, with a GPCR or any other cell structure, including for example, the concentration of arrestin at a cell membrane, colocalization of arrestin with GPCR in endocytic vesicles or endosomes, and concentration of arrestin in clathrin-coated pits, and the like, will vary dependent upon the detectable molecule(s) used. One skilled in the art readily will be able to devise detection methods suitable for the detectable molecule(s) used. For optically detectable molecules, any optical method may be used where a change in the fluorescence, bioluminescence, or phosphorescence may be measured due to a redistribution or reorientation of emitted light. Such methods include, for example, polarization microscopy, BRET, FRET, evanescent wave excitation microscopy, and standard or confocal microscopy.

[00220] In a preferred embodiment, arrestin may be conjugated to GFP and the arrestin-GFP conjugate may be detected by confocal microscopy. In another preferred embodiment, arrestin may be conjugated to a GFP and the modified GPCR may be conjugated to an immunofluorescent molecule; the conjugates may be detected by confocal microscopy. In an additional preferred embodiment, arrestin may be conjugated to a GFP, and the carboxy-terminus of the modified GPCR may be conjugated to a luciferase.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

These conjugates can be detected by bioluminescence resonance emission technology. In a further preferred embodiment, arrestin may be conjugated to a luciferase, and the modified GPCR may be conjugated to a GFP. The luciferase/GFP conjugates may be detected by bioluminescence resonance
5 emission technology. The methods of the present invention are directed to detecting GPCR activity. The methods of the present invention allow enhanced monitoring of the GPCR pathway in real time.

Diagnostic and Therapeutic Treatments

10 [00221] The possibilities of both diagnostic and therapeutic treatments that are raised by the existence of the GPCR derive from the fact that the factors appear to participate in direct and causal protein-protein interaction between a ligand thereto, and those factors that thereafter initiate an intracellular
15 signal. As discussed earlier and elaborated further on herein, the present invention contemplates pharmaceutical intervention in the cascade of reactions in which the native or modified GPCRs are implicated, to modulate the activity initiated by the GPCR.

[00222] Thus, in instances where it is desired to reduce or inhibit the activity resulting from a particular stimulus or factor, an appropriate inhibitor
20 of the GPCR could be introduced to block the interaction of the GPCR with a ligand. Correspondingly, instances in which insufficient activation of a G protein or second messenger is taking place could be remedied by introduction of additional quantities of the GPCR or its chemical or pharmaceutical cognates, analogs, fragments and the like.

25 [00223] The present invention further contemplates therapeutic compositions useful in practicing the therapeutic methods of this invention. A subject therapeutic composition includes, in admixture, a pharmaceutically acceptable excipient (carrier) and one or more of an agonist, antagonist, or

WO 02/059267

PCT/US02/01701

DAC of the GPCR, as described herein as an active ingredient. In a preferred embodiment, the composition comprises a drug capable of modulating the specific binding of the GPCR with a ligand on a target cell.

Antibodies

5 [00224] Also, antibodies including both polyclonal and monoclonal antibodies, and drugs that modulate the production or activity of the modified GPCRs and/or their biologically active fragments or subunits may possess certain diagnostic applications and may for example, be utilized for the purpose of detecting and/or measuring conditions such as viral infection
10 or the like. For example, the modified GPCR or fragments or subunits thereof may be used to produce both polyclonal and monoclonal antibodies, to the modified GPCR or fragments or subunits thereof, in a variety of cellular media, by known techniques such as the hybridoma technique utilizing, for example, fused mouse spleen lymphocytes and myeloma cells.
15 Likewise, small molecules that mimic or antagonize the activity(ies) of the modified GPCRs of the invention may be discovered or synthesized, and may be used in diagnostic and/or therapeutic protocols.

[00225] The present invention likewise extends to the development of antibodies against the modified GPCR(s), including naturally raised and
20 recombinantly prepared antibodies. For example, the antibodies could be used to screen expression libraries to obtain the gene or genes that encode the modified GPCR(s). Such antibodies could include both polyclonal and monoclonal antibodies prepared by known genetic techniques, as well as bi-specific (chimeric) antibodies, and antibodies including other functionalities
25 suiting them for additional diagnostic use conjunctive with their capability of modulating modified GPCR activity. Preferably, the anti-modified-GPCR antibody used in the diagnostic methods of this invention is an affinity purified polyclonal antibody. More preferably, the antibody is a monoclonal

WO 02/059267

PCT/US02/01701

antibody (mAb). In addition, it is preferable for the anti-modified-GPCR antibody fragments used herein be in the form of Fab, Fab', F(ab')₂, F(v), or scFv.

5 [00226] The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Methods for producing monoclonal anti-GPCR antibodies are also well-known in the art. See Niman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4949-4953 (1983). Typically, the GPCR or a peptide analog is used either alone or conjugated to an immunogenic carrier, as the immunogen in the before described procedure for producing anti-GPCR
10 monoclonal antibodies. The culture is maintained under conditions and for a time period sufficient for the hybridoma to secrete the antibodies into the medium. The hybridomas are screened for the ability to produce an antibody that immunoreacts with the GPCR or peptide analog. The antibody-containing medium is then collected. The antibody can then be
15 further isolated by well-known techniques. Immortal, antibody-producing cell lines can also be created by techniques other than fusion, such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. See, e.g., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow, Ed and Lane, David (Cold Spring Harbor Press, 1999).

20 [00227] Media useful for the preparation of these compositions are both well-known in the art and commercially available and include synthetic culture media, inbred mice and the like. An exemplary synthetic medium is Dulbecco's minimal essential medium (DMEM; Dulbecco et al., *Virology* 8:396 (1959)) supplemented with 4.5 gm/l glucose, 20 mm glutamine, and 20% fetal calf serum. A preferred inbred mouse strain is the Balb/c.

25 [00228] Methods for producing polyclonal anti-polypeptide antibodies are well-known in the art. See U.S. Patent No. 4,493,795 to Nestor et al. A monoclonal antibody, and immunologically active fragments thereof, can be

prepared using the hybridoma technology described in *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow, Ed and Lane, David (Cold Spring Harbor Press, 1999), which is incorporated herein by reference. Briefly, to form the hybridoma from which the monoclonal antibody composition is produced, a
5 myeloma or other self-perpetuating cell line is fused with lymphocytes obtained from the spleen of a mammal hyperimmunized with a GPCR. Splenocytes are typically fused with myeloma cells using polyethylene glycol (PEG) 6000 MW. Fused hybrids are selected by their sensitivity to HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) supplemented media. Hybridomas
10 producing a monoclonal antibody useful in practicing this invention are identified by their ability to immunoreact with the present GPCR and their ability to inhibit specified GPCR activity in target cells.

[00229] In particular, antibodies against specifically phosphorylated factors can be selected and are included within the scope of the present invention for their particular ability in following activated protein. Thus, activity of the
15 modified GPCR or of the specific polypeptides believed to be causally connected thereto may therefore be followed directly by the assay techniques discussed herein, through the use of an appropriately labeled quantity of the modified GPCR or antibodies or analogs thereof.

[00230] Panels of monoclonal antibodies produced against modified GPCR peptides can be screened for various properties; i.e., isotype, epitope, affinity, and the like. Of particular interest are monoclonal
20 antibodies that neutralize the activity of the modified GPCR or its subunits. Such monoclonals can be readily identified in GPCR assays. High affinity antibodies are also useful when immunoaffinity purification of native or recombinant modified GPCRs is possible.

[00231] Thus, the modified GPCR(s), their analogs and/or analogs, and any antagonists or antibodies that may be raised thereto, are capable of use

WO 02/059267

PCT/US02/01701

in connection with various diagnostic techniques, including immunoassays, such as a radioimmunoassay, using for example, an antibody to the GPCR(s) that has been labeled by either radioactive addition, or radiiodination.

5 [00232] In an immunoassay, a control quantity of the antagonists or antibodies thereto, or the like may be prepared and labeled with an enzyme, a specific binding partner and/or a radioactive element, and may then be introduced into a cellular sample. After the labeled material or its binding partner(s) has had an opportunity to react with sites within the sample, the
10 the resulting mass may be examined by known techniques, which may vary with the nature of the label attached. For example, antibodies against specifically phosphorylated factors may be selected and appropriately employed in the exemplary assay protocol, for the purpose of following activated protein as described above.

15 [00233] In the instance where a radioactive label, such as, but not limited to, the isotopes ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{56}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , and ^{186}Re are used, known currently available counting procedures may be utilized. In the instance where the label is an enzyme, detection may be accomplished by any of the presently utilized colorimetric,
20 spectrophotometric, fluorospectrophotometric, amperometric or gasometric techniques discussed herein and as known in the art.

[00234] As suggested earlier, the diagnostic method of the present invention comprises examining a cellular sample or medium by means of an assay including an effective amount of an antagonist to a modified
25 GPCR/protein, such as an anti-modified-GPCR antibody, preferably an affinity-purified polyclonal antibody, and more preferably a mAb. In addition, it is preferable for the anti-modified-GPCR antibody fragments used herein to be in the form of Fab, Fab', F(ab')₂, F(v), or scFv. As previously

WO 02/059267

PCT/US02/01701

discussed, patients capable of benefitting from this method include those suffering from cancer, a pre-cancerous lesion, a viral infection or other like pathological condition or disease. Methods for isolating the modified GPCR, inducing anti-modified-GPCR antibodies, and determining and optimizing the ability of anti-modified-GPCR antibodies to assist in the examination of the target cells are all well-known in the art.

5 [00235] The present invention includes an assay system which may be prepared in the form of a test kit for the quantitative analysis of the extent of the presence of the modified GPCRs, or to identify drugs or other agents that may mimic or block their activity. The system or test kit may comprise a labeled component prepared by one of the radioactive and/or enzymatic techniques discussed herein, coupling a label to the modified GPCR(s), their agonists and/or antagonists, and one or more additional immunochemical reagents, at least one of which is a free or immobilized ligand, capable either of binding with the labeled component, its binding partner, one of the components to be determined or their binding partner(s).

Antisense Compositions and Use Thereof

20 [00236] In another embodiment, antisense compositions and methods are provided for modulating the expression of genes identified by the above described methods. Preferable antisense compositions are those which target nucleic acids identified using a systematic *in silico* discovery method disclosed herein or known in the art. Preferred antisense compositions can target, for example, SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 12. (Fig. 17)

25 [00237] It is preferred to target specific nucleic acids for antisense. "Targeting" an antisense composition to a particular nucleic acid would preferably be to a nucleic acid which encodes a protein, wherein the nucleic acid is one identified by a systematic *in silico* process disclosed herein. The

WO 02/059267

PCT/US02/01701

gene can be from a pathogenic organism. The targeting includes determination of a site or sites within the target gene for the antisense reaction (e.g., joinder of the sense and antisense strands to thereby modulate function of the gene or gene transcript). Preferred antisense compositions are those that recognize and bind with a site encompassing the translation initiation or termination codon of the open reading frame (ORF) of the gene. Since, as is known in the art, the translation initiation codon is typically 5'-AUG (in transcribed mRNA molecules; 5'-ATG in the corresponding DNA molecule), the translation initiation codon is also referred to as the "AUG codon," the "start codon" or the "AUG start codon". A minority of genes have a translation initiation codon having the RNA sequence 5'-GUG, 5'-UUG or 5'-CUG, and 5'-AUA, 5'-ACG and 5'-CUG have been shown to function *in vivo*. Thus, the terms "translation initiation codon" and "start codon" can encompass many codon sequences, even though the initiator amino acid in each instance is typically methionine (in eukaryotes) or formylmethionine (in prokaryotes).

[00238] It is also known in the art that eukaryotic and prokaryotic genes may have two or more alternative start codons, any one of which may be preferentially utilized for translation initiation in a particular cell type or tissue, or under a particular set of conditions. In the context of the invention, "start codon" and "translation initiation codon" refer to the codon or codons that are used *in vivo* to initiate translation of an mRNA molecule transcribed from a gene encoding a protein which was identified by a systematic *in silico* method disclosed herein or one of the sequences disclosed herein.

[00239] A translation termination codon (or "stop codon") of a gene transcript may have one of three sequences, i.e., 5'-UAA, 5'-UAG and 5'-UGA (the corresponding DNA sequences are 5'-TAA, 5'-TAG and 5'-TGA,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

respectively). The terms "start codon region" and "translation initiation codon region" refer to a portion of such an mRNA or gene that encompasses from about 25 to about 50 contiguous nucleotides in either direction (i.e., 5' or 3') from a translation initiation codon. Similarly, the terms
5 "stop codon region" and "translation termination codon region" refer to a portion of such an mRNA or gene that encompasses from about 25 to about 50 contiguous nucleotides in either direction (i.e., 5' or 3') from a translation termination codon. Preferred antisense compositions would recognize and bind to areas containing a termination codon and/or an initiation codon of
10 any target gene or the mRNA transcript it encodes.

[00240] The open reading frame (ORF) or "coding region," which is known in the art to refer to the region between the translation initiation codon and the translation termination codon, is also a region which may have preferred targets of the antisense compositions. Other target regions include the 5' untranslated region (5'-UTR) and the 3' untranslated region (3'-UTR). The
15 5'-UTR is known in the art to refer to the portion of an mRNA in the 5' direction from the translation initiation codon, and thus including nucleotides between the 5' cap site and the translation initiation codon of an mRNA or corresponding nucleotides on the gene. The 3' untranslated region (3'-UTR)
20 is known in the art to refer to the portion of an mRNA in the 3' direction from the translation termination codon, and thus including nucleotides between the translation termination codon and 3' end of an mRNA or corresponding nucleotides on the gene. The 5' cap of an mRNA comprises an N7-methylated guanosine residue joined to the 5'-most residue of the mRNA via
25 a 5'-5' triphosphate linkage. The 5' cap region of an mRNA is considered to include the 5' cap structure itself, and the first 50 nucleotides adjacent to the cap. The 5' cap region may also be a preferred target region for an

WO 02/059267

PCT/US02/01701

antisense composition.

[00241] In eukaryotic organisms, the genes are composed of introns and exons, with the exons containing the material which will encode the protein product of the gene. The intronic material, although transcribed from the gene to produce the mRNA, will be excised from the mRNA transcript prior to its translation into a protein. The exons are spliced together to form a continuous mRNA sequence. The mRNA splice sites, i.e., intron-exon junctions, may also be preferred target regions of antisense compositions, and are particularly useful in situations where aberrant splicing is implicated in disease, or where an overproduction of a particular mRNA splice product is implicated in disease. Aberrant fusion junctions due to rearrangements or deletions are also preferred targets. It has also been found that introns can also be effective, and therefore preferred, target regions for antisense compositions targeted, for example, to DNA or pre-mRNA.

[00242] Once one or more target sites are identified in the genes identified using a systematic discovery process, oligonucleotides are chosen which are sufficiently complementary to the target, i.e., hybridize sufficiently well and with sufficient specificity, to result produce the desired biological outcome (e.g., inhibition and/or prevention of the GPCR-associated disease or condition, modulation of the activity of the modulated GPCR, modulation of the activity of the arrestin).

[00243] In the context of this invention, "hybridization" means hydrogen bonding, which may be Watson-Crick, Hoogsteen or reversed Hoogsteen hydrogen bonding, between complementary nucleoside or nucleotide bases. For example, adenine (A) and thymine (T) are complementary nucleobases which pair through the formation of hydrogen bonds. "Complementary," as used herein, refers to the capacity for precise pairing between typically two

WO 02/059267

PCT/US02/01701

nucleotides. For example, if a nucleotide at a certain position of an oligonucleotide is capable of hydrogen bonding with a nucleotide at the same position of a DNA or RNA molecule, then the oligonucleotide and the DNA or RNA are considered to be complementary to each other at that position. The oligonucleotide and the DNA or RNA are complementary to each other when a sufficient number of corresponding positions in each molecule are occupied by nucleotides which can hydrogen bond with each other. It is understood in the art that the sequence of an antisense acid to be specifically hybridizable. Alternatively, oligonucleotides which form triple helices with the gene can be supplied. An antisense composition typically is specifically hybridizable when binding of the composition to the target DNA or RNA molecule interferes with the normal function of the target DNA or RNA to cause a loss of utility. The loss of utility occurs when there is a sufficient degree of complementarity to avoid non-specific binding of the antisense composition to non-target sequences under conditions in which specific binding is desired. Preferred conditions for specific binding are physiological conditions in the case of *in vivo* assays or therapeutic treatment, and in the case of *in vitro* assays, under conditions in which the assays are performed.

[00244] Preferred antisense compositions contemplated would be for use as research reagents and diagnostics. For example, antisense oligonucleotides, which are able to inhibit gene expression, are often used by those of ordinary skill to elucidate the function of particular genes. Antisense compositions are also used, e.g., to distinguish between functions of various members of a biological pathway. Antisense modulation has, therefore, been harnessed for research use.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

5 [00245] Oligonucleotides have been employed as therapeutic moieties in the treatment of disease states in animals and man. It is thus established that oligonucleotides can be useful therapeutic modalities that can be configured to be useful in treatment regimes for treatment of cells, tissues and animals, especially humans. In the context of this invention, the term "oligonucleotide" refers to an oligomer or polymer of ribonucleic acid (RNA) or deoxyribonucleic acid (DNA) or mimetics thereof. This term includes oligonucleotides composed of naturally-occurring nucleobases, sugars and covalent internucleoside (backbone) linkages as well as oligonucleotides having non-naturally-occurring portions which function similarly. Such modified or substituted oligonucleotides are often preferred over native forms because of desirable properties such as, e.g., enhanced cellular uptake, enhanced affinity for nucleic acid target and increased stability in the presence of nucleases.

15 [00246] While antisense oligonucleotides are a preferred form of antisense composition, the present invention comprehends other oligomeric antisense compositions, including but not limited to oligonucleotide mimetics such as are described below. The antisense compositions in accordance with this invention preferably comprise from about 8 to about 30 nucleobases (i.e., from about 8 to about 30 linked nucleosides, and all lengths in between). The antisense compositions can be longer than 30 (e.g., 35, 40, 45, 50, 55, 20 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 or more as well as ranges in between). However, more preferred antisense compositions are comprise from about 12 to about 25 nucleobases and all lengths in between.

25 [00247] As is known in the art, a nucleoside is a base-sugar combination. The base portion of the nucleoside is normally a heterocyclic base. The two most common classes of such heterocyclic bases are the purines and the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

pyrimidines. Nucleotides are nucleosides that further include a phosphate group covalently linked to the sugar portion of the nucleoside. For those nucleosides that include a pentofuranosyl sugar, the phosphate group can be linked to either the 2', 3' or 5' hydroxyl moiety of the sugar. In forming
5 oligonucleotides, the phosphate groups covalently link adjacent nucleosides to one another to form a linear polymeric composition. In turn, the respective ends of this linear polymeric structure can be further joined to form a circular structure. However, open linear structures are generally preferred for use as antisense compositions. Within the oligonucleotide
10 structure, the phosphate groups are commonly referred to as forming the internucleoside backbone of the oligonucleotide. The normal linkage or backbone of RNA and DNA is a 3' to 5' phosphodiester linkage.

[00248] Specific examples of preferred antisense compositions useful in this invention include oligonucleotides containing modified backbones or
15 non-natural internucleoside linkages. As defined in this specification, oligonucleotides having modified backbones include those that retain a phosphorus atom in the backbone and those that do not have a phosphorus atom in the backbone. For the purposes of this specification, and as
20 sometimes referenced in the art, modified oligonucleotides that do not have a phosphorus atom in their internucleoside backbone can also be considered to be oligonucleosides.

[00249] Preferred modified oligonucleotide backbones for use in antisense compositions include, for example, phosphorothioates, chiral
25 phosphorothioates, phosphorodithioates, phosphotriesters, aminoalkylphosphotriesters, methyl and other alkyl phosphonates including 3'-alkylene phosphonates and chiral phosphonates, phosphinates, phosphoramidates including 3'-amino phosphoramidate and

WO 02/059267

PCT/US02/01701

aminoalkylphosphoramidates, thionophosphoramidates,
thionoalkylphosphonates, thionoalkylphosphotriesters, and
boranophosphates having normal 3'-5' linkages, 2'-5' linked analogs of
these, and those having inverted polarity wherein the adjacent pairs of
5 nucleoside units are linked 3'-5' to 5'-3' or 2'-5' to 5'-2'. Various salts,
mixed salts and free acid forms are also included. For additional methods
for preparing such phosphorus containing linkages, see for example, U.S.
Pat. Nos.: 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196;
5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131;
10 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925;
5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799;
5,587,361; and 5,625,050.

[00250] Preferred modified oligonucleotide backbones, which do not
include a phosphorus atom, may have backbones that are formed by short
15 chain alkyl or cycloalkyl internucleoside linkages, mixed heteroatom and
alkyl or cycloalkyl internucleoside linkages, or one or more short chain
heteroatomic or heterocyclic internucleoside linkages. These include those
having morpholino linkages (formed in part from the sugar portion of a
nucleoside); siloxane backbones; sulfide, sulfoxide and sulfone backbones;
20 formacetyl and thioformacetyl backbones; methylene formacetyl and
thioformacetyl backbones; alkene containing backbones; sulfamate
backbones; methyleneimino and methylenehydrazino backbones; sulfonate
and sulfonamide backbones; amide backbones; and others having mixed N,
O, S and CH₂ component parts. For methods of preparing modified
25 oligonucleotide backbones which lack phosphorous atoms, see, e.g., U.S.
Pat. Nos.: 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141;
5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677;

WO 02/059267

PCT/US02/01701

5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240;
5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070;
5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; and 5,677,439.

[00251] Other preferred oligonucleotide mimetics include replacement of
5 both the sugar and the internucleoside linkage, i.e., the backbone, of the
nucleotide units are replaced with novel groups. The base units are
maintained for hybridization with an appropriate nucleic acid target
composition. One such oligomeric composition, an oligonucleotide mimetic
that has been shown to have excellent hybridization properties, is referred to
10 as a peptide nucleic acid (PNA). In PNA compositions, the sugar-backbone
of an oligonucleotide is replaced with an amide containing backbone, in
particular an aminoethylglycine backbone. The nucleobases are retained
and are bound directly or indirectly to aza nitrogen atoms of the amide
portion of the backbone. For discussion of such methods, see for example,
15 U.S. Pat. Nos. 5,539,082; 5,714,331; and 5,719,262 and Nielsen et al.,
Science, 1991, 254: 1497-1500.

[00252] Most preferred embodiments of the invention are oligonucleotides
with phosphorothioate backbones and oligonucleosides with heteroatom
backbones, and in particular $\text{—CH}_2\text{—NH—O—CH}_2\text{—}$,
20 $\text{—CH}_2\text{—N(CH}_3\text{)—O—CH}_2\text{—}$ (known as a methylene (methylimino) or MMI
backbone), $\text{—CH}_2\text{—O—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—}$, $\text{—CH}_2\text{—N(CH}_3\text{)—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—}$
and $\text{—O—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$ (wherein the native phosphodiester
backbone is represented as $\text{—O—P—O—CH}_2\text{—}$) and amide backbones
such as those described in U.S. Pat. No. 5,602,240. Also preferred are
25 oligonucleotides having morpholino backbone structures, such as those
described in U.S. Pat. No. 5,034,506.

[00253] Modified oligonucleotides used as antisense compositions as

WO 02/059267

PCT/US02/01701

contemplated herein may also contain one or more substituted sugar moieties. Preferred oligonucleotides comprise one of the following at the 2' position: —OH; F—, O—, S—, or N-alkyl; O—, S—, or N-alkenyl; O—, S— or N-alkynyl; or O-alkyl-O-alkyl, wherein the alkyl, alkenyl and alkynyl may be substituted or unsubstituted C₁ to C₁₀ alkyl or C₂ to C₁₀ alkenyl and alkynyl. Particularly preferred are O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, and O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, where n and m are from 1 to about 10. Other preferred oligonucleotides may comprise one of the following at the 2' position: C₁ to C₁₀ lower alkyl, substituted lower alkyl, alkaryl, aralkyl, O-alkaryl or O-aralkyl, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocycloalkyl, heterocycloalkaryl, aminoalkylamino, polyalkylamino, substituted silyl, an RNA cleaving group, a reporter group, an intercalator, a group for improving the pharmacokinetic properties of an oligonucleotide, or a group for improving the pharmacodynamic properties of an oligonucleotide, and other substituents having similar properties. A preferred modification includes 2'-methoxyethoxy (2'-O-CH₂-CH₂-OCH₃, also known as 2'-O-(2-methoxyethyl) or 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78: 486-504), i.e., an alkoxyalkoxy group. Another preferred modification includes 2'-dimethylaminoethoxyethoxy (i.e., a O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ group, also known as 2'-DMAOE) and 2'-dimethylaminoethoxyethyl (also known in the art as 2'-O-dimethylaminoethoxyethyl or 2'-DMAEOE).

[00254] Other preferred modifications to the antisense compositions contemplated include 2'-methoxy (2'-O—CH₃), 2'-aminopropoxy (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) and 2'-fluoro (2'-F). Similar modifications may also be made at other positions on the oligonucleotide, particularly at the 3' position of the sugar on the 3' terminal nucleotide or in 2'-5' linked oligonucleotides

WO 02/059267

PCT/US02/01701

and the 5' position of 5' terminal nucleotide. Oligonucleotides may also have sugar mimetics, such as cyclobutyl moieties in place of the pentofuranosyl sugar. For methods of preparing such modified sugar structures, see for example, U.S. Pat. Nos.: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; and 5,700,920.

[00255] Oligonucleotides may also include nucleobase (often referred to in the art simply as "base") modifications or substitutions. As used herein, "unmodified" or "natural" nucleobases include the purine bases adenine (A) and guanine (G), and the pyrimidine bases thymine (T), cytosine (C) and uracil (U). The invention also contemplates the use of modified nucleobases in the antisense compositions. Such modified nucleobases include other synthetic and natural nucleobases, such as 5-methylcytosine (5-me-C), 5-hydroxymethyl cytosine, xanthine, hypoxanthine, 2-aminoadenine, 6-methyl and other alkyl derivatives of adenine and guanine, 2-propyl and other alkyl derivatives of adenine and guanine, 2-thiouracil, 2-thiothymine and 2-thiocytosine, 5-halouracil and cytosine, 5-propynyl uracil and cytosine, 6-azo uracil, cytosine and thymine, 5-uracil (pseudouracil), 4-thiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl and other 8-substituted adenines and guanines, 5-halo (e.g., particularly 5-bromo, 5-trifluoromethyl) and other 5-substituted uracils and cytosines, 7-methylguanine and 7-methyladenine, 8-azaguanine and 8-azaadenine, 7-deazaguanine and 7-deazaadenine and 3-deazaguanine and 3-deazaadenine. Additional nucleobases would be known to the skilled artisan. See, for example, U.S. Pat. No. 3,687,808; THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING, 858-859 (Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990); Englisch *et al.*,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

ANGEWANDTE CHEMIE, v.30, p. 613 (International Edition, 1991); and Sanghvi, Y. S., Chapter 15, ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, 289-302 (Crooke *et al.*, CRC Press, 1993). Certain of these nucleobases are particularly useful for increasing the binding affinity of the oligomeric
5 compositions of the invention. These include 5-substituted pyrimidines, 6-azapyrimidines and N-2, N-6 and O-6 substituted purines, including 2-aminopropyladenine, 5-propynyluracil and 5-propynylcytosine. 5-methylcytosine substitutions have been shown to increase nucleic acid duplex stability by 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., *et al.*, 1993) and are presently
10 preferred base substitutions, even more particularly when combined with 2'-O-methoxyethyl sugar modifications.

[00256] Another oligonucleotide modification contemplated for use in the antisense compositions involves chemically linking to the oligonucleotide one or more moieties or conjugates which enhance the activity, cellular
15 distribution or cellular uptake of the oligonucleotide. Such moieties include but are not limited to lipid moieties such as a cholesterol moiety (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6), cholic acid (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053-60), a thioether, e.g., hexyl-S-tritylthiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306-9; and
20 Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765-70), a thiocholesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533-8), an aliphatic chain, e.g., dodecandiol or undecyl residues (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10: 1111-8; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259: 327-30; and Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75: 49-54), a phospholipid, e.g.,
25 di-hexadecyl-rac-glycerol or triethyl-ammonium 1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3-H-phosphonate (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-4; and Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777-83), a polyamine

WO 02/059267

PCT/US02/01701

5 or a polyethylene glycol chain (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969-73), or adamantane acetic acid (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-4), a palmitoyl moiety (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229-237), or an octadecylamine or
hexylamino-carbonyl-oxysterol moiety (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923-937).

[00257] Methods for preparing such oligonucleotide conjugates would be known in the art and include but are not limited to U.S. Pat. Nos.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538;
10 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469;
15 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 and 5,688,941.

[00258] One or more of the positions in a given compound can be modified. It is not necessary for all positions in a given compound to be uniformly modified, and in fact more than one of the aforementioned modifications may be incorporated in a single compound or even at a single nucleoside within an oligonucleotide.
20

[00259] The present invention also includes antisense compositions which are chimeric compositions. "Chimeric" antisense compositions or "chimeras" in the context of antisense compositions, are compounds which contain two or more chemically distinct regions, each made up of at least one monomer
25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

unit, i.e., a nucleotide in the case of an oligonucleotide compound. These oligonucleotides typically contain at least one region wherein the oligonucleotide is modified so as to confer upon the oligonucleotide increased resistance to nuclease degradation, increased cellular uptake, and/or increased binding affinity for the target nucleic acid. An additional region of the oligonucleotide may serve as a substrate for enzymes capable of cleaving RNA:DNA or RNA:RNA hybrids. By way of example, RNase H is a cellular endonuclease which cleaves the RNA strand of an RNA:DNA duplex. Activation of RNase H, therefore, results in cleavage of the RNA target, thereby greatly enhancing the efficiency of oligonucleotide inhibition of gene expression. Consequently, comparable results can often be obtained with shorter oligonucleotides when chimeric oligonucleotides are used, compared to phosphorothioate deoxyoligonucleotides hybridizing to the same target region. Cleavage of the RNA target can be routinely detected by gel electrophoresis and, if necessary, associated nucleic acid hybridization techniques known in the art.

[00260] Chimeric antisense compounds of the invention may be formed as composite structures of two or more oligonucleotides, modified oligonucleotides, oligonucleosides and/or oligonucleotide mimetics as described above. Such compounds have are also known as hybrids or gapmers. Methods of preparing such hybrids include but are not limited to the teachings of U.S. Pat. Nos.: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; and 5,700,922.

[00261] The antisense compounds contemplated herein may be conveniently and routinely made through the well-known technique of solid phase synthesis. The oligonucleotides can be prepared for example using

WO 02/059267

PCT/US02/01701

the equipment and techniques of Applied Biosystems. Any other means for such synthesis known in the art may additionally or alternatively be employed.

5 [00262] The antisense compounds of the invention are synthesized *in vitro* and do not include antisense compositions of biological origin, or genetic vector constructs designed to direct the *in vivo* synthesis of antisense molecules. The compounds of the invention may also be admixed, encapsulated, conjugated or otherwise associated with other molecules, molecule structures or mixtures of compounds, as for example, liposomes, 10 receptor targeted molecules, oral, rectal, topical or other formulations, for assisting in uptake, distribution and/or absorption. Methods and preparations for such uptake, distribution and/or absorption assisting formulations include, but are not limited to, U.S. Pat. Nos.: 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 15 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; and 5,595,756.

20 [00263] The contemplated antisense compounds and compositions disclosed herein also include any pharmaceutically acceptable salts, esters, or salts of such esters, or any other compound which, upon administration to an animal including a human, is capable of providing (directly or indirectly) the biologically active metabolite or residue thereof. Accordingly, for 25 example, the disclosure is also drawn to prodrugs and pharmaceutically acceptable salts of the antisense compounds of the invention, pharmaceutically acceptable salts of such prodrugs, and other bioequivalents.

Pharmaceutical compositions

5 [00264] The preparation of therapeutic compositions which contain polypeptides, analogs or active fragments as active ingredients is well understood in the art. Typically, such compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions, however, solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection can also be prepared. The preparation can also be emulsified. The active therapeutic ingredient is often mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the composition can contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents which enhance the effectiveness of the active ingredient.

15 [00265] A GPCR agonist, antagonist, or DAC obtained by the methods disclosed herein can be formulated into the therapeutic composition as neutralized pharmaceutically acceptable salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the polypeptide or antibody) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed from the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, and the like.

25 [00266] The therapeutic compositions are conventionally administered intravenously, as by injection of a unit dose, for example. The term "unit

WO 02/059267

PCT/US02/01701

dose" when used in reference to a therapeutic composition of the present invention refers to physically discrete units suitable as unitary dosage for humans, each unit containing a predetermined quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required diluent (i.e., carrier, or vehicle).

5
10
15
[00267] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compositions lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED50 with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any composition used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range which includes the IC50 (i.e., the concentration of the test composition which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

20
25
[00268] The compositions are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in a therapeutically effective amount. The quantity to be administered depends on the subject to be treated, capacity of the subject's immune system to utilize the active ingredient, and degree of modulation of GPCR activity desired. Precise amounts of active ingredient required to be administered depend on the judgment of the practitioner and are peculiar to each individual. However, suitable dosages may range from about 0.001 to 30, preferably about 0.01 to about 25, and more preferably

WO 02/059267

PCT/US02/01701

about 0.1 to 20 milligrams of active ingredient per kilogram body weight of individual per day and depend on the route of administration. Suitable regimes for initial administration and booster shots are also variable, but are typified by an initial administration followed by repeated doses at one or
5 more hour intervals by a subsequent injection or other administration. Alternatively, continuous intravenous infusion sufficient to maintain concentrations of ten nanomolar to ten micromolar in the blood are contemplated.

[00269] The skilled artisan will appreciate that certain factors may
10 influence the dosage required to effectively treat a subject, including but not limited to, the severity of the disease or condition, disorder, or disease, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of the composition(s) can include a single treatment or,
15 preferably, can include a series of treatments. In a preferred example, a subject is treated with the composition in the range of between about 0.1 to 20 mg/kg body weight, one time per week for between about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. It will also be
20 appreciated that the effective dosage of the composition used for treatment may increase or decrease over the course of a particular treatment. Changes in dosage may result and become apparent from the results of diagnostic assays as described herein.

[00270] The therapeutic compositions may further include an effective
25 amount of the GPCR agonist, antagonist, or DAC and one or more of the following active ingredients: an antibiotic, a steroid, and the like.

[00271] The term "prodrug" indicates a therapeutic agent that is prepared

WO 02/059267

PCT/US02/01701

in an inactive form that is converted to an active form (i.e., drug) within the body or cells thereof by the action of endogenous enzymes or other chemicals and/or conditions. In particular, prodrug versions of the oligonucleotides of the invention can be prepared as SATE
5 ((S-acetyl-2-thioethyl) phosphate) derivatives according to the methods disclosed for example in WO 93/24510 and in WO 94/26764.

[00272] The term "pharmaceutically acceptable salts" refers to physiologically and pharmaceutically acceptable salts of the compounds of the invention: i.e., salts that retain the desired biological activity of the parent
10 compound and do not impart undesired toxicological effects thereto. The compounds for modulating any of the disclosed genes, gene transcripts or proteins encoded thereby include antisense compounds as well as other modulatory compounds.

[00273] Pharmaceutically acceptable base addition salts for use with
15 antisense as well as other modulatory compounds are formed with metals or amines, such as alkali and alkaline earth metals or organic amines. Examples of metals used as cations are sodium, potassium, magnesium, calcium, and the like. Examples of suitable amines are
20 N,N'-dibenzylethylenediamine, chlorprocaine, choline, diethanolamine, dicyclohexylamine, ethylenediamine, N-methylglucamine, and procaine (see, e.g., Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharma. Sci., 1977, 66: 1-19). The base addition salts of acidic compounds are prepared by
25 contacting the free acid form with a sufficient amount of the desired base to produce the salt in the conventional manner. The free acid form may be regenerated by contacting the salt form with an acid and isolating the free acid in the conventional manner. The free acid forms differ from their respective salt forms somewhat in certain physical properties such as

WO 02/059267

PCT/US02/01701

solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to their respective free acid for purposes of the present invention. As used herein, a "pharmaceutical addition salt" includes a pharmaceutically acceptable salt of an acid form of one of the components of the compositions of the invention.

5 These include organic or inorganic acid salts of the amines. Preferred acid salts are the hydrochlorides, acetates, salicylates, nitrates and phosphates. Other suitable pharmaceutically acceptable salts are known in the art and include basic salts of a variety of inorganic and organic acids, such as, for example, with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, hydrobromic acid,

10 sulfuric acid or phosphoric acid); with organic carboxylic, sulfonic, sulfo- or phospho- acids or N-substituted sulfamic acids, for example acetic acid, propionic acid, glycolic acid, succinic acid, maleic acid, hydroxymaleic acid, methylmaleic acid, fumaric acid, malic acid, tartaric acid, lactic acid, oxalic acid, gluconic acid, glucaric acid, glucuronic acid, citric acid, benzoic acid,

15 cinnamic acid, mandelic acid, salicylic acid, 4-aminosalicylic acid, 2-phenoxybenzoic acid, 2-acetoxybenzoic acid, embonic acid, nicotinic acid or isonicotinic acid; and with amino acids, such as the 20 alpha-amino acids involved in the synthesis of proteins in nature, for example glutamic acid or aspartic acid, and also with phenylacetic acid, methanesulfonic acid,

20 ethanesulfonic acid, 2-hydroxyethanesulfonic acid, ethane-1,2-disulfonic acid, benzenesulfonic acid, 4-methylbenzenesulfonic acid, naphthalene-2-sulfonic acid, naphthalene-1,5-disulfonic acid, 2- or 3-phosphoglycerate, glucose-6-phosphate, N-cyclohexylsulfamic acid (with the formation of cyclamates), or with other acid organic compounds, such as

25 ascorbic acid.

[00274] Pharmaceutically acceptable salts of compounds may also be prepared with a pharmaceutically acceptable cation. Suitable

WO 02/059267

PCT/US02/01701

pharmaceutically acceptable cations are well known in the art and include alkaline, alkaline earth, ammonium and quaternary ammonium cations. Carbonates or hydrogen carbonates are also possible.

5 [00275] For oligonucleotides, preferred examples of pharmaceutically acceptable salts include but are not limited to (a) salts formed with cations such as sodium, potassium, ammonium, magnesium, calcium, polyamines such as spermine and spermidine, etc.; (b) acid addition salts formed with inorganic acids, for example hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, phosphoric acid, nitric acid and the like; (c) salts formed with organic
10 acids such as, for example, acetic acid, oxalic acid, tartaric acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, gluconic acid, citric acid, malic acid, ascorbic acid, benzoic acid, tannic acid, palmitic acid, alginic acid, polyglutamic acid, naphthalenesulfonic acid, methanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, naphthalenedisulfonic acid, polygalacturonic acid, and the like; and (d) salts
15 formed from elemental anions such as chlorine, bromine, and iodine.

[00276] The antisense compounds and other modulatory compounds described herein can be utilized in pharmaceutical compositions by adding an effective amount of an antisense compound or other modulatory compound to a suitable pharmaceutically acceptable diluent or carrier. Use
20 of the compounds and methods of the invention may also be useful prophylactically.

[00277] The antisense compounds of the invention are useful for research and diagnostics, because these compounds hybridize to nucleic acids encoding a gene identified using the systematic discovery technique or a
25 mRNA transcript thereof. Such hybridization allows the use of sandwich and other assays to easily be constructed to exploit this fact. Hybridization of the antisense oligonucleotides of the invention with a nucleic acid encoding

WO 02/059267

PCT/US02/01701

a gene or gene transcript identified by a systematic discovery method can be detected by means known in the art. Such means may include, for example, conjugation of an enzyme to the oligonucleotide, radiolabelling of the oligonucleotide or any other suitable detection means. Kits using such
5 detection means for detecting the level of a transcript of a gene in a sample may also be prepared.

[00278] The present invention also includes pharmaceutical antisense compositions and formulations which include the antisense compounds and other modulatory compounds and compositions of the invention. The
10 pharmaceutical compositions of the present invention may be administered in a number of ways depending upon whether local or systemic treatment is desired and upon the area to be treated.

[00279] In certain embodiments, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of
15 treatment. This may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, e.g., in conjunction with a wound dressing after surgery, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes,
20 such as sialastic membranes, or fibers. In one embodiment, administration can be by direct injection at the site (or former site) of a malignant tumor or neoplastic or pre-neoplastic tissue.

[00280] For topical application, the compositions may be combined with a carrier so that an effective dosage is delivered, based on the desired
25 activity.

[00281] Pharmaceutical compositions and formulations for topical

administration may include transdermal patches, ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids and powders. Conventional pharmaceutical carriers, aqueous, powder or oily bases, thickeners and the like may be necessary or desirable.

5 [00282] For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium
10 hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets may be coated by methods well known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they
15 may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia);
20 non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer, salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate.

25 [00283] Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled release of the active composition.

[00284] The compositions may be formulated for parenteral administration

WO 02/059267

PCT/US02/01701

by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

[00285] For administration by inhalation, the compositions for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray, presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the composition and a suitable powder base such as lactose or starch.

[00286] The compositions may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compositions may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

[00287] The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device that may contain one or more unit dosage forms

WO 02/059267

PCT/US02/01701

containing the active ingredient. The pack may for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

5 [00288] Pharmaceutical compositions (e.g., gene, gene transcript or protein product modulatory agents as described herein) of the present invention include, but are not limited to, solutions, emulsions, and liposome-containing formulations. These compositions may be generated from a variety of components that include, but are not limited to, preformed liquids, self-emulsifying solids and self-emulsifying semisolids.

10 [00289] The pharmaceutical formulations of the present invention, which may conveniently be presented in unit dosage form, may be prepared according to conventional techniques well known in the pharmaceutical industry. Such techniques include the step of bringing into association the active ingredients with the pharmaceutical carrier(s) or excipient(s). In
15 general, the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active ingredients with liquid carriers or finely divided solid carriers or both, and then, if necessary, shaping the product.

[00290] In one embodiment of the present invention, the pharmaceutical compositions may be formulated and used as foams. Pharmaceutical
20 foams include formulations such as, but not limited to, emulsions, microemulsions, creams, jellies and liposomes. While basically similar in nature, these formulations vary in the components and the consistency of the final product. The preparation of such compositions and formulations is generally known to those skilled in the pharmaceutical and formulation arts
25 and may be applied to the formulation of the compositions of the present invention.

[00291] The compositions of the present invention may be prepared and formulated as emulsions. Emulsions are typically heterogenous systems of one liquid dispersed in another in the form of droplets usually exceeding 0.1 m in diameter. See, e.g., Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms* v. 1, p. 199 (Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York); Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 2, p. 335; Higuchi et al., in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 301 (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985). Emulsions are often biphasic systems comprising of two immiscible liquid phases intimately mixed and dispersed with each other. In general, emulsions may be either water-in-oil (w/o) or of the oil-in-water (o/w) variety. When an aqueous phase is finely divided into and dispersed as minute droplets into a bulk oily phase, the resulting composition is called a water-in-oil (w/o) emulsion. Alternatively, when an oily phase is finely divided into and dispersed as minute droplets into a bulk aqueous phase the resulting composition is called an oil-in-water (o/w) emulsion. Emulsions may contain additional components in addition to the dispersed phases and the active drug which may be present as a solution in either the aqueous phase, oily phase or itself as a separate phase. Pharmaceutical excipients such as emulsifiers, stabilizers, dyes, and anti-oxidants may also be present in emulsions as needed. Pharmaceutical emulsions may also be multiple emulsions that are comprised of more than two phases such as, for example, in the case of oil-in-water-in-oil (o/w/o) and water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsions. Such complex formulations often provide certain advantages that simple binary emulsions do not. Multiple emulsions in which individual oil droplets of an o/w emulsion enclose small water droplets constitute a w/o/w emulsion. Likewise a system of oil droplets enclosed in globules of water stabilized in an oily continuous provides an o/w/o

emulsion.

[00292] Emulsions are characterized by little or no thermodynamic stability. Often, the dispersed or discontinuous phase of the emulsion is well dispersed into the external or continuous phase and maintained in this form through the means of emulsifiers or the viscosity of the formulation. Either of the phases of the emulsion may be a semisolid or a solid, as is the case of emulsion-style ointment bases and creams. Other means of stabilizing emulsions entail the use of emulsifiers that may be incorporated into either phase of the emulsion. Emulsifiers may broadly be classified into four categories: synthetic surfactants, naturally occurring emulsifiers, absorption bases, and finely dispersed solids (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms* v. 1, p. 199 (Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York).

[00293] Synthetic surfactants, also known as surface active agents, have found wide applicability in the formulation of emulsions and have been reviewed in the literature (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 1, p. 199). Surfactants are typically amphiphilic and comprise a hydrophilic and a hydrophobic portion. The ratio of the hydrophilic to the hydrophobic nature of the surfactant has been termed the hydrophile/lipophile balance (HLB) and is a valuable tool in categorizing and selecting surfactants in the preparation of formulations. Surfactants may be classified into different classes based on the nature of the hydrophilic group: nonionic, anionic, cationic and amphoteric (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*).

[00294] Naturally occurring emulsifiers used in emulsion formulations include lanolin, beeswax, phosphatides, lecithin and acacia. Absorption bases possess hydrophilic properties such that they can soak up water to

form w/o emulsions yet retain their semisolid consistencies, such as anhydrous lanolin and hydrophilic petrolatum. Finely divided solids have also been used as good emulsifiers, especially in combination with surfactants and in viscous preparations. These include polar inorganic
5 solids, such as heavy metal hydroxides, non-swelling clays (e.g., bentonite, attapulgite, hectorite, kaolin, montmorillonite, colloidal aluminum silicate and colloidal magnesium aluminum silicate), pigments and nonpolar solids (e.g., carbon or glyceryl tristearate).

[00295] A large variety of non-emulsifying materials are also included in emulsion formulations and contribute to the properties of emulsions. These include fats, oils, waxes, fatty acids, fatty alcohols, fatty esters, humectants, hydrophilic colloids, preservatives and antioxidants (Block, in
10 Pharmaceutical Dosage Forms, v.1 p.385 (Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York)).

[00296] Hydrophilic colloids or hydrocolloids include naturally occurring gums and synthetic polymers, such as polysaccharides (e.g., acacia, agar, alginic acid, carrageenan, guar gum, karaya gum, and tragacanth), cellulose derivatives (e.g., carboxymethylcellulose and carboxypropylcellulose), and synthetic polymers (e.g., carbomers, cellulose ethers, and carboxyvinyl
20 polymers). These disperse or swell in water to form colloidal solutions that stabilize emulsions by forming strong interfacial films around the dispersed-phase droplets and by increasing the viscosity of the external phase.

[00297] Since emulsions often contain a number of ingredients such as carbohydrates, proteins, sterols and phosphatides that may readily support the growth of microbes, these formulations often incorporate preservatives. Commonly used preservatives included in emulsion formulations include
25

methyl paraben, propyl paraben, quaternary ammonium salts, benzalkonium chloride, esters of p-hydroxybenzoic acid, and boric acid. Antioxidants are also commonly added to emulsion formulations to prevent deterioration of the formulation. Antioxidants used may be free radical scavengers (e.g.,
5 tocopherols, alkyl gallates, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene) or reducing agents (e.g., ascorbic acid and sodium metabisulfite), and antioxidant synergists (e.g., citric acid, tartaric acid, and lecithin).

[00298] The application of emulsion formulations via dermatological, oral
10 and parenteral routes and methods for their manufacture have been reviewed in the literature (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 1, p. 199). Emulsion formulations for oral delivery have been very widely used because of reasons of ease of formulation, efficacy from an absorption and bioavailability standpoint. (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 1, p.
15 245 (Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York); Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*). Mineral-oil base laxatives, oil-soluble vitamins and high fat nutritive preparations are among the materials that have commonly been administered orally as o/w emulsions.

[00299] In one embodiment of the present invention, the compositions of
20 oligonucleotides and nucleic acids are formulated as microemulsions. A microemulsion may be defined as a system of water, oil and amphiphile which is a single optically isotropic and thermodynamically stable liquid solution (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, v. 1, p. 245). Typically
25 microemulsions are systems that are prepared by first dispersing an oil in an aqueous surfactant solution and then adding a sufficient amount of a fourth component, generally an intermediate chain-length alcohol to form a transparent system. Therefore, microemulsions have also been described

WO 02/059267

PCT/US02/01701

as thermodynamically stable, isotropically clear dispersions of two immiscible liquids that are stabilized by interfacial films of surface-active molecules (Leung and Shah, in *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, 185-215 (Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York). Microemulsions commonly are prepared via a combination of three to five components that include oil, water, surfactant, cosurfactant and electrolyte. Whether the microemulsion is of the water-in-oil (w/o) or an oil-in-water (o/w) type is dependent on the properties of the oil and surfactant used and on the structure and geometric packing of the polar heads and hydrocarbon tails of the surfactant molecules (Schott, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 271 (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985).

[00300] Surfactants used in the preparation of microemulsions include, but are not limited to, ionic surfactants, non-ionic surfactants, Brij 96, polyoxyethylene oleyl ethers, polyglycerol fatty acid esters, tetraglycerol monolaurate (ML310), tetraglycerol monooleate (MO310), hexaglycerol monooleate (PO310), hexaglycerol pentaoleate (PO500), decaglycerol monocaprate (MCA750), decaglycerol monooleate (MO750), decaglycerol sequioleate (SO750), decaglycerol decaoleate (DAO750), alone or in combination with co-surfactants. The co-surfactant, usually a short-chain alcohol such as ethanol, 1-propanol, and 1-butanol, serves to increase the interfacial fluidity by penetrating into the surfactant film and consequently creating a disordered film because of the void space generated among surfactant molecules.

[00301] Microemulsions may, however, be prepared without the use of co-surfactants and alcohol-free self-emulsifying microemulsion systems are known in the art. The aqueous phase may typically be, but is not limited to,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

water, an aqueous solution of the drug, glycerol, PEG300, PEG400, polyglycerols, propylene glycols, and derivatives of ethylene glycol. The oil phase may include, but is not limited to, materials such as Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, fatty acid esters, medium chain (C8-C12) mono-, di-, and tri-glycerides, polyoxyethylated glyceryl fatty acid esters, fatty alcohols, polyglycolized glycerides, saturated polyglycolized C8-C10 glycerides, vegetable oils and silicone oil.

[00302] Microemulsions are particularly of interest from the standpoint of drug solubilization and the enhanced absorption of drugs. Lipid based microemulsions (both o/w and w/o) have been proposed to enhance the oral bioavailability of drugs, including peptides (Constantinides et al., Pharm. Res., 1994, 11:1385-90; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13: 205). Microemulsions afford advantages of improved drug solubilization, protection of drug from enzymatic hydrolysis, possible enhancement of drug absorption due to surfactant-induced alterations in membrane fluidity and permeability, ease of preparation, ease of oral administration over solid dosage forms, improved clinical potency, and decreased toxicity (Constantinides et al., 1994; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85: 138-143). Often microemulsions may form spontaneously when their components are brought together at ambient temperature. This may be particularly advantageous when formulating thermolabile drugs, peptides or oligonucleotides. Microemulsions have also been effective in the transdermal delivery of active components in both cosmetic and pharmaceutical applications. It is expected that the microemulsion compositions and formulations of the present invention will facilitate the increased systemic absorption of oligonucleotides and nucleic acids and other active agents from the gastrointestinal tract, as well as improve the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

local cellular uptake of oligonucleotides and nucleic acids and other active agents within the gastrointestinal tract, vagina, buccal cavity and other areas of administration.

5 [00303] Microemulsions of the present invention may also contain additional components and additives such as sorbitan monostearate (Grill 3), Labrasol, and penetration enhancers to improve the properties of the formulation and to enhance the absorption of the oligonucleotides and nucleic acids of the present invention. Penetration enhancers used in the microemulsions of the present invention may be classified as belonging to 10 one of five broad categories—surfactants, fatty acids, bile salts, chelating agents, and non-chelating non-surfactants (Lee et al., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Each of these classes has been discussed above.

15 [00304] There are many organized surfactant structures besides microemulsions that have been studied and used for the formulation of drugs. These include monolayers, micelles, bilayers and vesicles. Vesicles, such as liposomes, are useful because of their specificity and the duration of action. As used in the present invention, the term "liposome" means a vesicle composed of amphiphilic lipids arranged in a spherical bilayer or 20 bilayers.

[00305] Liposomes are unilamellar or multilamellar vesicles which have a membrane formed from a lipophilic material and an aqueous interior. The aqueous portion contains the composition to be delivered. Cationic liposomes possess the advantage of being able to fuse to the cell wall. 25 Non-cationic liposomes, although not able to fuse as efficiently with the cell wall, are taken up by macrophages *in vivo*. Selection of the appropriate liposome depending on the agent to be encapsulated would be evident

WO 02/059267

PCT/US02/01701

given what is known in the art.

5 [00306] In order to cross intact mammalian skin, lipid vesicles must pass through a series of fine pores, each with a diameter less than 50 nm, under the influence of a suitable transdermal gradient. Therefore, it is desirable to use a liposome which is highly deformable and able to pass through such fine pores.

10 [00307] Further advantages of liposomes include: (a) liposomes obtained from natural phospholipids are biocompatible and biodegradable; (b) liposomes can incorporate a wide range of water and lipid soluble drugs; (c) liposomes can protect encapsulated drugs in their internal compartments from metabolism and degradation (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms). Important considerations in the preparation of liposome formulations are the lipid surface charge, vesicle size and the aqueous volume of the liposomes.

15 [00308] Liposomes are useful for the transfer and delivery of active ingredients to the site of action. Because the liposomal membrane is structurally similar to biological membranes, when liposomes are applied to a tissue, the liposomes start to merge with the cellular membranes. As the merging of the liposome and cell progresses, the liposomal contents are emptied into the cell where the active agent may act.

20

[00309] Another embodiment also contemplates the use of liposomes for topical administration. Such advantages include reduced side-effects related to high systemic absorption of the administered drug, increased accumulation of the administered drug at the desired target, and the ability to administer a wide variety of drugs, both hydrophilic and hydrophobic, into the skin. Several reports have detailed the ability of liposomes to deliver

25

agents including high-molecular weight DNA into the skin. Compounds including analgesics, antibodies, hormones and high-molecular weight DNAs have been administered to the skin. The majority of applications resulted in the targeting of the upper epidermis.

5 [00310] Liposomes fall into two broad classes. Cationic liposomes are positively charged liposomes which interact with the negatively charged DNA molecules to form a stable complex. The positively charged DNA/liposome complex binds to the negatively charged cell surface and is internalized in an endosome. Due to the acidic pH within the endosome, the
10 liposomes are ruptured, releasing their contents into the cell cytoplasm (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1987, 147:980-985).

[00311] Liposomes which are pH-sensitive or negatively-charged, entrap DNA rather than complex with it. Since both the DNA and the lipid are similarly charged, repulsion rather than complex formation occurs.
15 Nevertheless, some DNA is entrapped within the aqueous interior of these liposomes. pH-sensitive liposomes have been used to deliver DNA encoding the thymidine kinase gene to cell monolayers in culture. Expression of the exogenous gene was detected in the target cells (Zhou et al., *J. Controlled Release*, 1992, 19: 269-74).

20 [00312] Another contemplated liposomal composition includes phospholipids other than naturally-derived phosphatidylcholine. Neutral liposome compositions, for example, can be formed from dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) or dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). Anionic liposome compositions generally are formed from dimyristoyl
25 phosphatidylglycerol, while anionic fusogenic liposomes are formed primarily from dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE). Another type of liposomal composition is formed from phosphatidylcholine (PC) such as, for example,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

soybean PC, and egg PC. Another type is formed from mixtures of phospholipid and/or phosphatidylcholine and/or cholesterol.

5 [00313] "Sterically stabilized" liposomes, which refers to liposomes comprising one or more specialized lipids that, when incorporated into liposomes, result in enhanced circulation lifetimes relative to liposomes lacking such specialized lipids are also contemplated. Examples of sterically stabilized liposomes are those in which part of the vesicle-forming lipid portion of the liposome (A) comprises one or more glycolipids, such as monosialoganglioside GM1, or (B) is derivatized with one or more hydrophilic polymers, such as a polyethylene glycol (PEG) moiety. While 10 not wishing to be bound by any particular theory, it is thought in the art that, at least for sterically stabilized liposomes containing gangliosides, sphingomyelin, or PEG-derivatized lipids, the enhanced circulation half-life of these sterically stabilized liposomes derives from a reduced uptake into cells of the reticuloendothelial system (RES) (Allen et al., FEBS Lett., 1987, 223: 42; Wu et al., Can. Res., 1993, 53: 3765).

15 [00314] Many liposomes comprising lipids derivatized with one or more hydrophilic polymers, and methods of preparation thereof, are known in the art. See, e.g., Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53: 2778) described liposomes comprising a nonionic detergent, 2C12 15G, that contains a PEG moiety. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167: 79) noted that hydrophilic coating of polystyrene particles with polymeric glycols results in significantly enhanced blood half-lives. Synthetic phospholipids modified by the attachment of carboxylic groups of polyalkylene glycols (e.g., PEG) are 20 described by Sears (U.S. Pat. Nos. 4,426,330 and 4,534,899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268: 235) described experiments demonstrating that liposomes comprising phosphatidylethanolamine (PE) derivatized with PEG

WO 02/059267

PCT/US02/01701

or PEG stearate have significant increases in blood circulation half-lives. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029: 91) extended such observations to other PEG-derivatized phospholipids, e.g., DSPE-PEG, formed from the combination of distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE) and PEG. Liposomes having covalently bound PEG moieties on their external surface are described in European Patent No. EP 0 445 131 B1 and WO 90/04384 to Fisher. Liposome compositions containing 1-20 mole percent of PE derivatized with PEG, and methods of use thereof, are described by, e.g., Woodle et al. (U.S. Pat. Nos. 5,013,556 and 5,356,633) and Martin et al. (U.S. Pat. No. 5,213,804 and European Patent No. EP 0 496 813 B1). Liposomes comprising a number of other lipid-polymer conjugates are disclosed in WO 91/05545 and U.S. Pat. No. 5,225,212 (both to Martin et al.) and in WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Liposomes comprising PEG-modified ceramide lipids are described in WO 96/10391 (Choi et al.). U.S. Pat. No. 5,540,935 (Miyazaki et al.) and U.S. Pat. No. 5,556,948 (Tagawa et al.) describe PEG-containing liposomes that can be further derivatized with functional moieties on their surfaces.

[00315] Methods of encapsulating nucleic acids in liposomes is also known in the art. See, WO 96/40062 to Thierry et al. discloses methods for encapsulating high molecular weight nucleic acids in liposomes. U.S. Pat. No. 5,264,221 to Tagawa et al. discloses protein-bonded liposomes and asserts that the contents of such liposomes may include an antisense RNA. U.S. Pat. No. 5,665,710 to Rahman et al. describes certain methods of encapsulating oligodeoxynucleotides in liposomes.

[00316] Surfactants find wide application in formulations such as emulsions (including microemulsions) and liposomes. The most common way of classifying and ranking the properties of the many different types of

surfactants, both natural and synthetic, is by the use of the hydrophile/lipophile balance (HLB). The nature of the hydrophilic group (also known as the "head") provides the most useful means for categorizing the different surfactants used in formulations (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, p.285 (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)).

5 [00317] If the surfactant molecule is not ionized, it is classified as a nonionic surfactant. Nonionic surfactants find wide application in pharmaceutical and cosmetic products and are usable over a wide range of pH values. In general their HLB values range from 2 to about 18 depending on their structure. Nonionic surfactants include nonionic esters such as ethylene glycol esters, propylene glycol esters, glyceryl esters, polyglyceryl esters, sorbitan esters, sucrose esters, and ethoxylated esters. Nonionic alkanolamides and ethers such as fatty alcohol ethoxylates, propoxylated alcohols, and ethoxylated/propoxylated block polymers are also included in

10 this class. The polyoxyethylene surfactants are the most popular members of the nonionic surfactant class.

[00318] If the surfactant molecule carries a negative charge when it is dissolved or dispersed in water, the surfactant is classified as anionic. Anionic surfactants include carboxylates such as soaps, acyl lactylates, acyl amides of amino acids, esters of sulfuric acid such as alkyl sulfates and ethoxylated alkyl sulfates, sulfonates such as alkyl benzene sulfonates, acyl isethionates, acyl taurates and sulfosuccinates, and phosphates. The most important members of the anionic surfactant class are the alkyl sulfates and the soaps.

25 [00319] If the surfactant molecule carries a positive charge when it is dissolved or dispersed in water, the surfactant is classified as cationic. Cationic surfactants include quaternary ammonium salts and ethoxylated

WO 02/059267

PCT/US02/01701

amines. The quaternary ammonium salts are the most used members of this class.

5 [00320] If the surfactant molecule has the ability to carry either a positive or negative charge, the surfactant is classified as amphoteric. Amphoteric surfactants include acrylic acid derivatives, substituted alkylamides, N-alkylbetaines and phosphatides.

[00321] The use of surfactants in drug products, formulations and in emulsions has been reviewed (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, 285 (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988).

10 [00322] In one embodiment, the present invention employs various penetration enhancers to effect the efficient delivery of nucleic acids and other agents, particularly oligonucleotides, to the skin of animals. Most drugs are present in solution in both ionized and nonionized forms. However, usually only lipid soluble or lipophilic drugs readily cross cell membranes. It has been discovered that even non-lipophilic drugs may cross cell membranes if the membrane to be crossed is treated with a penetration enhancer. In addition to aiding the diffusion of non-lipophilic drugs across cell membranes, penetration enhancers also enhance the permeability of lipophilic drugs.

15 [00323] Penetration enhancers may be classified as belonging to one of five broad categories, i.e., surfactants, fatty acids, bile salts, chelating agents, and non-chelating non-surfactants (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Each of the above mentioned classes of penetration enhancers are described below in greater detail.

20 [00324] Another embodiment of the invention contemplates

pharmaceutical compositions comprising surfactants. Surfactants (or "surface-active agents") are chemical entities which, when dissolved in an aqueous solution, reduce the surface tension of the solution or the interfacial tension between the aqueous solution and another liquid, with the result that absorption of oligonucleotides through the mucosa is enhanced. In addition to bile salts and fatty acids, these penetration enhancers include, for example, sodium lauryl sulfate, polyoxyethylene-9-lauryl ether and polyoxyethylene-20-cetyl ether (Lee et al., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 1991, 92); and perfluorochemical emulsions, such as FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40: 252).

[00325] Another embodiment contemplates the use of various fatty acids and their derivatives to act as penetration enhancers include, for example, oleic acid, lauric acid, capric acid (*n*-decanoic acid), myristic acid, palmitic acid, stearic acid, linoleic acid, linolenic acid, dicaprinate, tricaprinate, monoolein (1-monooleoyl-rac-glycerol), dilaurin, caprylic acid, arachidonic acid, glycerol 1-monocaprinate, 1-dodecylazacycloheptan-2-one, acylcarnitines, acylcholines, C1-10 alkyl esters thereof (e.g., methyl, isopropyl and *t*-butyl), and mono- and di-glycerides thereof (i.e., oleate, laurate, caprate, myristate, palmitate, stearate, linoleate, and the like) (Lee et al., 1991; Muranishi, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 1990, 7: 1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44: 651-4).

[00326] The compositions comprising the active agents of the invention may further comprise bile salts. The physiological role of bile includes the facilitation of dispersion and absorption of lipids and fat-soluble vitamins (Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, N.Y., 1996, pp. 934-935). Various natural bile salts, and their synthetic derivatives, act as

WO 02/059267

PCT/US02/01701

penetration enhancers. Thus, the term "bile salts" includes any of the naturally occurring components of bile as well as any of their synthetic derivatives. The bile salts of the invention include, for example, cholic acid (or its pharmaceutically acceptable sodium salt, sodium cholate),
5 dehydrocholic acid (sodium dehydrocholate), deoxycholic acid (sodium deoxycholate), glucolic acid (sodium glucolate), glycholic acid (sodium glycocholate), glycodeoxycholic acid (sodium glycodeoxycholate), taurocholic acid (sodium taurocholate), taurodeoxycholic acid (sodium taurodeoxycholate), chenodeoxycholic acid (sodium chenodeoxycholate),
10 ursodeoxycholic acid (UDCA), sodium tauro-24,25-dihydro-fusidate (STDHF), sodium glycodihydrofusidate and polyoxyethylene-9-lauryl ether (POE) (Lee et al., 1991; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, 1990; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263: 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79: 579-83).

[00327] The invention further contemplates compositions comprising chelating agents. Chelating agents can be defined as compounds that remove metallic ions from solution by forming complexes therewith, with the
20 result that absorption of oligonucleotides through the mucosa is enhanced. With regards to their use as penetration enhancers for use when the active agent is an antisense agent, chelating agents have the added advantage of also serving as DNase inhibitors, as most characterized DNA nucleases require a divalent metal ion for catalysis and are thus inhibited by chelating agents (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618: 315-39). Chelating agents of the
25 invention include but are not limited to disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA), citric acid, salicylates (e.g., sodium

WO 02/059267

PCT/US02/01701

salicylate, 5-methoxysalicylate and homovanilate), N-acyl derivatives of collagen, laureth-9 and N-amino acyl derivatives of beta-diketones (enamines) (Lee et al., 1991; Muranishi, 1990; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14: 43-51).

5 [00328] The invention also contemplates pharmaceutical compositions comprising active agents and non-chelating non-surfactants. Non-chelating non-surfactant penetration enhancing compounds can be defined as compounds that demonstrate insignificant activity as chelating agents or as surfactants, but that nonetheless enhance absorption of oligonucleotides through the alimentary mucosa (Muranishi, 1990). This class of penetration enhancers include, for example, unsaturated cyclic ureas, 1-alkyl- and 10 1-alkenylazacyclo-alkanone derivatives (Lee et al., 1991); and non-steroidal anti-inflammatory agents such as diclofenac sodium, indomethacin and phenylbutazone (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39: 621-6).

15 [00329] For pharmaceutical compositions comprising oligonucleotides, agents that enhance uptake of oligonucleotides at the cellular level may also be added to the pharmaceutical and other compositions of the present invention. For example, cationic lipids, such as lipofectin (Junichi et al., U.S. Pat. No. 5,705,188), cationic glycerol derivatives, and polycationic molecules, such as polylysine (Lollo et al., PCT Application WO 97/30731), are also known to enhance the cellular uptake of oligonucleotides.

20 [00330] Other agents may be utilized to enhance the penetration of the administered nucleic acids, including glycols such as ethylene glycol and propylene glycol, pyrrols such as 2-pyrrol, azones, and terpenes (e.g., limonene and menthone).

25 [00331] Certain compositions of the present invention also incorporate

WO 02/059267

PCT/US02/01701

carrier compounds in the formulation. As used herein, "carrier compound" or "carrier" can refer to a nucleic acid, or analog thereof, which is inert (i.e., does not possess biological activity per se) but is recognized as a nucleic acid by *in vivo* processes that reduce the bioavailability of a nucleic acid having biological activity by, for example, degrading the biologically active nucleic acid or promoting its removal from circulation. The coadministration of a nucleic acid and a carrier compound, typically with an excess of the latter substance, can result in a substantial reduction of the amount of nucleic acid recovered in the liver, kidney or other extracirculatory reservoirs, presumably due to competition between the carrier compound and the nucleic acid for a common receptor. For example, the recovery of a partially phosphorothioate oligonucleotide in hepatic tissue can be reduced when it is coadministered with polyinosinic acid, dextran sulfate, polycytidic acid or 4-acetamido-4'-isothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonic acid (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5: 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6: 177-183).

[00332] The pharmaceutical compositions disclosed herein may also comprise excipients. In contrast to carrier compounds described above, these excipients include a pharmaceutically acceptable solvent, suspending agent or any other pharmacologically inert vehicle for delivering one or more nucleic acids or other active agents to an animal. The excipient may be liquid or solid and is selected, with the planned manner of administration in mind, so as to provide for the desired bulk, consistency, etc., when combined with a nucleic acid or other active agent and the other components of a given pharmaceutical composition. Typical pharmaceutical carriers include, but are not limited to, binding agents (e.g., pregelatinized maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose, etc.);

WO 02/059267

PCT/US02/01701

fillers (e.g., lactose and other sugars, microcrystalline cellulose, pectin, gelatin, calcium sulfate, ethyl cellulose, polyacrylates or calcium hydrogen phosphate, etc.); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc, silica, colloidal silicon dioxide, stearic acid, metallic stearates, hydrogenated vegetable oils, corn starch, polyethylene glycols, sodium benzoate, sodium acetate, etc.);
5 disintegrants (e.g., starch, sodium starch glycolate, etc.); and wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate, etc.).

[00333] Pharmaceutically acceptable organic or inorganic excipients suitable for non-parenteral administration which do not deleteriously react with nucleic acids can also be used to formulate the compositions of the present invention. Suitable pharmaceutically acceptable carriers include, but are not limited to, water, salt solutions, alcohols, polyethylene glycols, gelatin, lactose, amylose, magnesium stearate, talc, silicic acid, viscous paraffin, hydroxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidone and the like.

[00334] Formulations for topical administration of nucleic acids and other contemplated active agents may include sterile and non-sterile aqueous solutions, non-aqueous solutions in common solvents such as alcohols, or solutions of the nucleic acids in liquid or solid oil bases. The solutions may also contain buffers, diluents and other suitable additives. Pharmaceutically acceptable organic or inorganic excipients suitable for non-parenteral administration which do not deleteriously react with nucleic acids or other contemplated active agents can be used.

[00335] The compositions of the present invention may additionally contain other adjunct components conventionally found in pharmaceutical compositions, at their art-established usage levels. Thus, for example, the compositions may contain additional, compatible, pharmaceutically-active materials such as, e.g., antipruritics, astringents, local anesthetics or

WO 02/059267

PCT/US02/01701

anti-inflammatory agents, or may contain additional materials useful in physically formulating various dosage forms of the compositions of the present invention, such as dyes, flavoring agents, preservatives, antioxidants, opacifiers, thickening agents and stabilizers. However, such materials, when added, should not unduly interfere with the biological activities of the components of the compositions of the present invention. The formulations can be sterilized and, if desired, mixed with auxiliary agents, e.g., lubricants, preservatives, stabilizers, wetting agents, emulsifiers, salts for influencing osmotic pressure, buffers, colorings, flavorings and/or aromatic substances and the like which do not deleteriously interact with the nucleic acid(s) of the formulation.

[00336] Aqueous suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension including, for example, sodium carboxymethylcellulose, sorbitol and/or dextran. The suspension may also contain stabilizers.

[00337] In another related embodiment, compositions of the invention may contain one or more antisense compound or other active agents. Two or more combined compounds may be used together or sequentially.

Test Kits

[00338] In a further embodiment of this invention, commercial test kits suitable for use by a medical specialist may be prepared to determine the presence or absence of predetermined modified GPCR activity or predetermined GPCR activity capability in suspected target cells. In accordance with the testing techniques discussed above, one class of such kits will contain at least the labeled GPCR or its binding partner, for instance an antibody specific thereto, and directions, of course, depending upon the

WO 02/059267

PCT/US02/01701

assay method selected, e.g., "competitive," "sandwich," "DASP" and the like. The kits may also contain peripheral reagents such as buffers, stabilizers, components for detecting molecules in the kit, etc.

5 [00339] Accordingly, a test kit may be prepared for the demonstration of the presence or capability of cells for predetermined GPCR activity, comprising:

10 (a) a predetermined amount of at least one labeled immunochemically reactive component obtained by the direct or indirect attachment of a modified GPCR or a specific binding partner thereto, to a detectable label; and

(b) other reagents.

[00340] More specifically, the diagnostic test kit may comprise:

15 (a) as a control, a known amount of a modified GPCR (or a modified GPCR binding partner, or in the alternative, bound to a suitable tag, or plural such end products, etc. (or their binding partners) one of each; and

(b) if necessary, other reagents.

20 [00341] In a further variation, the test kit may be prepared and used for the purposes stated above, which operates according to a predetermined protocol (e.g. "competitive," "sandwich," "double antibody," etc.), and comprises:

(a) a labeled component which has been obtained by coupling a GPCR to a detectable label;

25 (b) one or more additional immunochemical reagents of which at least one reagent is a ligand or an immobilized ligand, which ligand is selected from the group consisting of:

WO 02/059267

PCT/US02/01701

- (i) a ligand capable of binding with the labeled component (a);
- (ii) a ligand capable of binding with a binding partner of the labeled component (a);
- (iii) a ligand capable of binding with at least one of the component(s) to be determined; and
- (iv) a ligand capable of binding with at least one of the binding partners of at least one of the component(s) to be determined.

[00342] In accordance with the above, an assay system for screening potential drugs effective to modulate the activity of the GPCR may be prepared. The modified GPCRs may be introduced into a test system, and the prospective drug may also be introduced into the resulting cell culture, and the culture thereafter examined to observe any changes in the GPCR activity (e.g., signaling, recycling, affinity for arrestin, and the like) in the cells.

15 **Knock-out mice and animals**

[00343] For use as disease models and to test compounds identified herein, modified GPCR transgenic and knock-out mice and animals may be produced and utilized. For use as disease models and to test compounds identified herein, transgenic and knock-out mice and animals comprising modified components of the desensitization pathway described herein may be produced and utilized.

[00344] An additional aspect of the present invention is a knockout mouse, the cells of the mouse containing at least one inactive endogenous arrestin gene (including for example, visual arrestin-gene, β arrestin-1-gene, and β arrestin-2 gene). The mouse may be a complete knockout or

WO 02/059267

PCT/US02/01701

homozygous for the inactive endogenous arrestin gene, or the mouse may be a partial knockout or heterozygous for the inactive endogenous arrestin gene.

5 [00345] The knockout mouse may be useful for verification that a compound is in fact an arrestin inhibitor. For example, the knockout mouse of the present invention may be used as a model for comparison with wild-type mice that have been treated with an arrestin inhibitor. This comparison may be used to verify that the compound administered to the wild-type mice is an arrestin inhibitor.

10 [00346] The knockout mouse may also be useful for verification that a compound is in fact an arrestin activator. For example, partial knockout mice that have been treated with an arrestin activator may be used as a model for comparison with wild-type mice and complete knockout mice. This comparison may be used to verify that the compound administered is
15 an arrestin activator.

[00347] The production of arrestin knockout mice can be carried out in view of the disclosure provided herein and in light of techniques known to those skilled in the art, such as described in U.S.S.N. 09/469,554, filed
20 December 22, 1999, U.S. Patents Nos. 5,767,337 to Roses et al.; 5,569,827 to Kessous-Elbaz et al.; and 5,569,824 to Donehower et al. (the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entirety); and A. Harada et al., *Nature* 369, 488 (1994).

[00348] The cells of the knockout mouse of the present invention contain
25 at least one inactive endogenous arrestin gene (including, for example, visual arrestin-gene, β arrestin-1-gene, and β arrestin-2 gene). The mouse may be a complete knockout or homozygous for the inactive endogenous

WO 02/059267

PCT/US02/01701

arrestin gene, or the mouse may be a partial knockout or heterozygous for the inactive endogenous arrestin gene.

5 [00349] Preferred mice for carrying out the present invention include those which contain at least one inactive endogenous visual arrestin-gene, β arrestin-1-gene, and β arrestin-2 gene. Knockout mice containing at least one inactive endogenous visual arrestin-gene may be used to monitor activity in eyes. Knockout mice containing at least one inactive endogenous β arrestin-1-gene and/or β arrestin-2 gene may be used to monitor activity in a wide variety of other organs.

10 [00350] An example of mice for carrying out the present invention are as disclosed below.

15 [00351] Although the present invention has been described in detail with reference to examples above, it is understood that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention, and would be readily known to the skilled artisan. Additionally, the invention is not to be construed to be limited by the following examples.

EXAMPLES

20 [00352] The invention will be further explained by the following illustrative examples which are intended to be non-limiting.

[00353] *Materials* - Arginine vasopressin was obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO), and [³H]-AVP from Amersham (Piscataway, NJ). Norepinephrine (NE) was obtained from Research Biochemical International (Natick, MA), [³H]prazosin was from NEN (Boston, MA), phentolamine and angiotensin II (AngII) were from Sigma.

25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

L158,809 (2-ethyl-5,7-dimethyl-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-3H-imidazo[4,5-b]pyridine; CAS registry number 133240-46-7) was a generous gift from Dr. E. Escher (Université de Sherbrooke, PQ, Canada). The golden hamster wild type $\alpha_{1\beta}$ -AR, and R143A was a gift obtained from Dr. S. Cotecchia (Université de Lausanne, Switzerland). HEK-293 and COS cells were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cell culture reagents were from Life Technologies (Rockville, MD) and Cellco (Kensington, MD).

[00354] *Cell Culture and Transfection* - For V2R experiments: HEK-293 cells were grown in Eagle's minimal essential medium with Earle's salt (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and a 1:100 dilution of penicillin/streptomycin (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Cells were transiently transfected with plasmid cDNA using a modified calcium phosphate co-precipitation method as described in Barak et al., 1997, *Mol. Pharmacol.*, 51:177-84. For $\alpha_{1\beta}$ -AR and AT_{1a}R experiments: Cells were transiently transfected in 10 cm² dishes (Falcon) with 1 μ g receptor or GRK plasmid cDNA in pCDNA3.1(-) using above modified calcium phosphate transfection coprecipitation method for inositol phosphate and binding assays. For confocal microscopy, cells were transiently transfected in collagen (Sigma) coated 35 mm² glass bottom confocal dishes (MatTek, Ashland, MA) with Lipofectamine @2000 and Opti-MEM media (Life Technologies) using a standard method (Ciccarone, V., et al., 1999, *Focus* 21.2, 54-55). Cells for confocal microscopy were transfected with 30 ng of β arrestin or receptor plasmid cDNA in pEGFP and 250 ng of dynamin(K44A), GRK, or receptor in pCDNA3.1/zeo.

[00355] *Receptor Binding and Adenylyl Cyclase Production* - For V2R experiments: HEK-293 cells transiently expressing receptor cDNA were

WO 02/059267

PCT/US02/01701

plated into 12 well Falcon dishes. The cells were washed twice in cold MEM and a 250 μ l solution of 2% BSA in 4°C MEM containing various concentrations of [3 H]AVP was added to each well for 30 minutes. Non-specific binding was determined in the presence of a 100-fold excess of cold AVP. The cells were then washed three times with cold MEM/BSA and the bound [3 H]AVP was extracted with 250 μ l of 0.5M NaOH in PBS, neutralized with HCl, and measured using a liquid scintillation counter. cAMP production in intact HEK-293 cells containing V2R variants was measured as described in Barak et al., *Mol. Pharmacol.*, 51:177-84 (1997). For α_{1B} -AR and AT $_{1A}$ R experiments: Transiently transfected HEK-293 cells in 10 cm 2 dishes were washed twice in cold binding buffer (MEM + 2% bovine serum albumin [BSA]), incubated for 1 hour at room temperature in binding buffer with varying concentrations of [3 H]prazosin (0.25 nM – 8 nM), and washed three times in cold binding buffer to remove unbound ligand. Cell bound [3 H]prazosin was measured using a scintillation counter. Nonspecific binding was determined in the presence of 1000-fold molar excess of phentolamine (10 μ M). For binding assays done to measure the effect of the co-expression of dynamin(K44A) or the addition of phentolamine in Figure 14, a fixed concentration of 8 nM [3 H]prazosin was used.

[00356] Inositol Phosphate Determination - Transiently transfected HEK-293 cells in 10 cm 2 dishes were plated onto 12-well plates (Falcon) coated with 25 mg/ml poly-D-lysine (Sigma) and incubated overnight in MEM + 10% FBS (fetal bovine serum) at 37°C. To assay for inositol phosphate production, cells were incubated overnight at 37°C in labeling media (1 μ Ci/0.5 ml/well of [3 H]inositol in MEM + 5% fetal bovine serum). Cells were washed with MEM, 20 mM HEPES, pH 7.4, 20 mM LiCl for 5 minutes at 37°C and then treated with agonist. Total inositol phosphate was extracted

WO 02/059267

PCT/US02/01701

and separated as previously described in Cotecchia, S., et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 1633-1639.

5 [00357] *Confocal Microscopy* - HEK-293 cells were plated on the day following transfection onto collagen (Sigma Chemical, St. Louis, MO) treated 35 mm² glass-bottomed culture dishes. Confocal microscopy was performed with a Zeiss laser-scanning microscope (LSM-510). GFP images were collected using the 488 nm argon excitation and a 505 nm long pass filter. For $\alpha_{1\beta}$ -AR and AT_{1A}R experiments: HEK-293 cells were transiently transfected in 35 mm² confocal dishes. Cells were stimulated with 10 μ M NE or 1 μ M AngII and incubated at 37°C for 30 minutes before viewing. 10 Alternatively, cells were cultured overnight at 37°C in 10 μ M phentolamine or 1 μ M L158,809. Confocal microscopy was performed at 100x magnification with a Zeiss laser-scanning microscope (LSM-510). GFP and FITC images were collected using 488-nm excitation and a 505-nm long-pass filter. 15

[00358] *Antibody Labeling* - Live transfected cells were plated in 35 mm² dishes with glass-bottomed wells. They were incubated at room temperature with a 1:100 dilution of rhodamine-tagged antiHA mouse monoclonal antibody (Boehringer, Indianapolis, IN) in a 2% BSA/MEM solution with 10 mM HEPES for 40 minutes, washed three times in MEM/HEPES, and examined by fluorescence and confocal microscopy with the Zeiss LSM-5 10.

[00359] *Whole Cell Phosphorylation* - Receptor phosphorylation was performed essentially as described in Barak et al., J. Biol. Chem., 274:7565-7569 (1999). Equivalent amounts of receptor, as determined by [³H]AVP binding on whole cells, and the amount of solubilized protein in each sample were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and processed 25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

for autoradiography.

[00360] *Receptor Immunoprecipitation and Western Blotting* - HEK-293 cells were stimulated with or without AVP for 10 minutes, washed with ice-cold PBS, scraped into precipitation buffer as described in Barak et al., *J. Biol. Chem.*, 274:7565-7569 (1999), and solubilized for 1 hour at 4°C. After centrifugation, supernatants were collected and HA-tagged receptors were immunoprecipitated at 4°C using the anti-HA 12CA5 mouse monoclonal antibody (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Recovered proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with the anti-HA rabbit polyclonal antibody (BAbCO, Richmond, CA).

Example 1

Construction of plasmid DNA

[00361] The N-terminal HA-tagged human vasopressin type II receptor, the V2R(Ala6), and the V2R(T362) were expressed in pcDNA3.1/zeo (Oakley, R. H. , Laporte, S. A. , Holt, J. A. , Barak, L. S. & Caron, M. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32248-32257). Their R137H analogues were generated by the polymerase chain reaction and inserted into the expression vector pEGFPN3 (Clontech, Palo Alto, CA) with stop codons intact using *SacI/SalI* restriction sites (Fig. 17, SEQ ID NO: 7). The green fluorescent protein conjugates of the wild type human V2 and V2R(R137H) receptors were generated by the polymerase chain reaction from the human V2R and human V2R(R137H) cDNA and inserted in frame at *XhoI/SalI* and *SacI/SalI* restriction sites of pEGFP-N3. β arrestin 2-GFP (S65T) was constructed as described in Shi et al., *Biochemistry*, 37:4869-4874 (1998).

[00362] The N-terminus HA epitope-tagged constructs were generated by

PCR using 5' primers containing the HA sequence (TAGCCATACGACGTCCCAG-ACTACGCT) followed by the gene sequence and cloned into pcDNA3.1/zeo (Invitrogen) and pEGFP-N3 (CLONTECH) at the *NheI/HindIII* and *NheI/SalI* sites, respectively. Dynamin(K44A) and β arrestin-GFP were constructed as previously described (Zhang, et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:27005-27014. and Barak, et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:27497-27500).

[00363] α_{1B} -AR R143H, R143E, and R143N were generated by PCR and inserted into the *NheI/SacII* and the *XhoI/PstI* sites of pcDNA3.1/zeo and pEGFP-N3, respectively (Fig. 17, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11).

[00364] The rat AT_{1A}R R126H was generated by PCR and cloned into pcDNA3.1/zeo and pEGFP-N3 at the *NheI/HindIII* and *NheI/SalI* sites, respectively (Fig. 17, SEQ ID NO: 12).

15 Example 2

Expression and signaling of the V2R and V2R(R137H) in HEK-293 cells

[00365] The V2R(R137H) mutation occurs in a conserved GPCR region associated with G protein coupling rather than receptor-ligand interactions. To begin to assess the effect of the R137H mutation, cells expressing the V2R and V2R(R137H) receptors were compared with respect to ligand binding, plasma membrane expression levels, and downstream signaling. The affinity of the V2R(R137H) mutant for the ligand AVP was compared to the affinity of wild-type V2R for the ligand AVP. The expression levels of V2R and V2R(R137H) on the plasma membrane were compared, and cAMP accumulation was measured in cells expressing the V2R and V2R(R137H) receptors to compare signaling.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

[00366] The HEK-293 whole cell binding data presented in Fig. 4A indicate that the wild type V2R and V2R(R137H) have the same affinity for AVP. In contrast, the Scatchard Plot (inset A) suggests that plasma membrane V2R(R137H) expression is much lower. This finding is confirmed by comparing the amount of fluorescence originating from HA-tagged V2R (Fig. 4B, left panel) and V2R(R137H) (Fig. 4B right panel) at the surface of live, unpermeabilized HEK-293 cells labeled with rhodamine-conjugated anti-HA antibody. Fig. 4C shows the amount of whole cell, AVP stimulated (0 to 250 nM) cAMP production in HEK-293 cells transfected with wild type V2R or V2R(R137H). Essentially no adenylyl cyclase activity above basal is observed in the V2R(R137H) transfected cells. These data indicate that the V2R(R137H) NDI may arise from an inability of the receptor to activate G protein.

Example 3

Distribution and trafficking of the V2R and V2R(R137H) in response to AVP

[00367] Many GPCRs express mutations that uncouple the receptors from G proteins without affecting receptor expression at the plasma membrane. Even though plasma membrane expression of the V2R(R137H) is relatively small, its intracellular complement in the absence of agonist is relatively large, as described in reference Schoneberg et al., *Hum. Mutat.*, 12:196-205 (1998). Thus, the R137H mutation may also affect the trafficking mechanisms that determine receptor localization, as described in Schoneberg et al., *Embo. J.*, 15:1283-1291 (1996).

[00368] In order to study V2R and V2R(R137H) trafficking in HEK-293 cells, a strategy using V2R- or V2R(R137H) green fluorescent protein

WO 02/059267

PCT/US02/01701

chimeras were used. Fig. 5 demonstrates that in the absence of agonist, V2R-GFP fluorescence originated predominantly from the plasma membrane (upper left panel). The addition of 100 nM AVP produces a loss of membrane fluorescence and a redistribution of V2R to endocytic vesicles (upper right panel) in a manner similar to wild type V2R. Vesicles can be observed in either the cytosol or in the perinuclear region, depending on the time after agonist addition or the position of the confocal slice through the cell. In contrast, the majority of V2R(RI37H)-GFP is cytosolic and vesicular (Fig. 5, lower left panel) in the absence of agonist, and exposure to 100 nM AVP for 30 minutes does not appreciably alter V2R(RI37H)GFP distribution.

Example 4

Distribution and trafficking of β arrestin in HEK-293 cells expressing the V2R or V2R(RI37H) in response to AVP

[00369] AVP-mediated endocytosis of the V2R in HEK-293 cells has been demonstrated to require β arrestins, as described in Barak et al., *J. Biol. Chem.*, 274:7565-7569 (1999). The observed vesicular localization of the V2R(RI37H)-GFP in the absence or presence of AVP is characteristic of β arrestin-mediated endocytosis and suggests that the V2R(RI37H) may bind β arrestin sufficiently well without agonist to promote its own internalization. To examine the interaction of β arrestin with the V2R(RI37H) in live HEK-293 cells, either the V2R or V2R(RI37H) and a β arrestin 2-GFP fusion protein was transfected, as described in Lohse, et al., *Science*, 248:1547-1550 (1990) and Barak et al., *J. Biol. Chem* 274:7565-7569 (1999). When β arrestin2-GFP is expressed with the V2R in the absence of agonist, the fluorescence is cytosolic and homogeneous (Fig. 6, upper left panel). Addition of AVP results in the translocation of β arrestin to plasma membrane V2R, and the subsequent AP2-directed clustering of the β arrestin-receptor complex in

clathrin-coated vesicles, and internalization of the β arrestin-receptor complex into endosomes. The appearance of β arrestin2-GFP in endosomes following AVP treatment is indicated by the vesicular distribution of GFP fluorescence shown in Fig. 6 (upper right panel and insert).

5 [00370] In contrast to the findings for the V2R, β arrestin2-GFP is distributed in endosomes in cells expressing the V2R(R137H) independent of agonist (Fig. 6 lower left and right panels). The localization of β arrestin-GFP in endocytic vesicles (insets) suggests that the intracellular V2R(R137H) population may arise from plasma membrane receptors through a β arrestin-directed process. This suggests that the inability of V2R(R137H) to activate G proteins may be due in part to a ligand independent desensitization rather than an inability to activate G proteins.

10

Example 5

Inhibition of internalization of the V2R or V2R(R137H) β arrestin complex in the presence of dominant negative dynamin

15 [00371] The cytosolic protein dynamin is required for the separation of clathrin-coated vesicles from the plasma membrane, and overexpression of the dynamin(K44A) variant, which competitively inhibits clathrin-coated vesicle dissociation, has been used to assess clathrin mediated GPCR internalization, as described in Zhang et al., *J. Biol. Chem.*, 274:10999-11006 (1999). To determine if the spontaneous association of β arrestin with the receptor in the absence of agonist is sufficient to induce receptor internalization, the ability of dynamin(K44A) to redistribute the complement of cytosolic β arrestin2-GFP to the plasma membrane in cells expressing the V2R(R137H) was assessed.

20

25

[00372] In HEK-293 cells in the absence of agonist the expression of

WO 02/059267

PCT/US02/01701

5 dynamin(K44A) with the V2R did not significantly change the homogeneous cytosolic distribution of β arrestin-GFP. In contrast, after 30 minutes of AVP treatment β arrestin-GFP remained at the plasma membrane in a punctate distribution and did not traffic into endocytic vesicles, compare Fig. 7A (Left panel) and Fig. 6. Thus, dynamin(K44A) expression inhibited the internalization of the V2R- β arrestin complex via clathrin-coated pits. In the absence of agonist the simultaneous expression of dynamin(K44A) and V2R(R137H) produced a plasma membrane distribution of β arrestin 2-GFP similar to the β arrestin 2-GFP distribution observed for the V2R in the presence of agonist (Fig. 7A, Left panel). AVP addition did not appreciably change the plasma membrane distribution of β arrestin2-GFP (Fig. 7A, Right panel); however β arrestin2-GFP coated vesicles did become apparent in some cells. The ability of dynamin(K44A) to redistribute the complement of cytosolic β arrestin2-GFP to the plasma membrane in cells expressing the V2R(R137H) suggests that the spontaneous association of β arrestin with the receptor in the absence of agonist, is sufficient to induce receptor internalization.

Example 6

Constitutive phosphorylation of the V2R(R137H)

20 [00373] The affinity between many GPCRs and β arrestin is regulated by GRK phosphorylation. Therefore, the phosphorylation states of the V2R and V2R(R137H) expressed in HEK-293 cells in the absence and presence of AVP was studied. Western blot analysis of immunoprecipitated V2R revealed three major species of this receptor migrating at approximately 70, 50, and 40 kDa (Fig. 7B, arrows, left panel). The amount of basal phosphorylation observed for each V2R species was minimal and only the 50 kDa form was phosphorylated in response to agonist (Fig. 7B, right

panel). Western blot analysis of immunoprecipitated V2R(R137H) revealed forms of this receptor migrating at approximately 70 and 40 kDa (Fig. 7B, left panel) that were sensitive to digestion by Endoglycosidase H and PNGase A (data not shown) that most probably represent immature glycosylated forms of the receptor (Sadeghi, H. & Birnbaumer, M. (1999) *Glycobiology* 9:731-737; Sadeghi, H. M. , Innamorati, G. & Birnbaumer, M. (1997) *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 17:433-445). Each of these forms of the V2R(R137H) were constitutively phosphorylated (Fig. 7B, right panel). Although a 50 kDa species of the V2R(R137H) was not detected on the Western blot, the more sensitive phosphorylation assay revealed a small amount of agonist mediated phosphorylation to this form of the receptor (Fig. 7B, middle arrow, right panel), which is most probably membrane associated. Moreover, the 50 kDa form of the V2R(R137H) was also phosphorylated in the absence of agonist. Therefore, it appears that the abnormal phenotypic behavior of the V2R(R137H) may primarily reflect the constitutive association of β arrestin with a phosphorylated receptor.

Example 7

Reversal of V2R(R137H) constitutive desensitization and β arrestin affinity

[00374] An increased receptor affinity for arrestins in the absence of agonist could mask the ability of the V2R(R137H) to couple normally to G-protein and stimulate cAMP. Since arrestins both desensitize GPCRs and promote their internalization, interventions that decrease arrestin affinity for the V2R(R137H) may reestablish a more normal receptor response.

[00375] Alanine substitution and C-tail truncation mutants of the wild type V2R (the V2R(Ala6) and V2R(T362) respectively) demonstrated that a

WO 02/059267

PCT/US02/01701

single cluster of three serines in the tail of the V2R GPCR can substantially decrease the receptor's ability to bind β arrestin, as described in Barak et al., *J. Biol. Chem.*, 274:7565-7569 (1999). Analogous mutants were constructed for the V2R(R137H), V2R(R137H, Ala6) and V2R(R137H, T362).

5 The mutants demonstrated a decreased β arrestin affinity that normalized the receptor localization at the plasma membrane and corrected its ability to stimulate adenylyl cyclase. Fig. 8A (upper panels) shows representative images of HA-tagged V2R, V2R(R137H, Ala6), and V2R(R137H, T362) on live, unpermeabilized HEK-293 cells labeled with rhodamine-anti HA antibody. Each receptor subtype is easily observable at the plasma

10 membrane by rhodamine fluorescence in the absence of agonist. The result contrasts to findings demonstrating relatively little antibody-labeled V2R(R137H) on the surface of unpermeabilized HEK-293 cells (Fig.4). Addition of AVP to cells containing V2R, V2R(R137H,Ala6) and

15 V2R(R137H,T362) results in the loss of plasma membrane fluorescence and the appearance of cytosolic fluorescence as a result of receptor endocytosis (Fig. 8A lower panels). The return of the plasma membrane population of V2R(R137H) tail mutants towards wild type levels was confirmed by the binding of AVP (Fig. 8B).

20 **[00376]** That the V2R(R137H,Ala6) and V2R(R137H,T362) receptor mutants have a lower affinity for β arrestin is demonstrated in Fig. 9A, using the β arrestin2-GFP fusion protein. In contrast to the findings for the V2R(R137H), the V2R(R137H,Ala6) and V2R(R137H,T362) are not

25 constitutively associated with β arrestin as indicated by the homogenous distribution of β arrestin2-GFP in the cytoplasm of cells in the absence of hormone. Addition of AVP promotes β arrestin2-GFP redistribution to punctuate at the plasma membrane, but its subsequent redistribution with

the receptor into endocytic vesicles does not occur. The inability of β arrestin 2-GFP to remain associated and traffic with V2R in which the serine cluster has been removed reflects decreased receptor affinity for arrestins.

5 [00377] The reduced ability of the V2R(RI37H, Ala6) and V2R(RI37H, T362) to bind β arrestins may improve their ability to stimulate cAMP. Fig. 9B shows that the basal cAMP responses of all the receptor variants are similar. Consistent with findings made in COS-7 cells, a small agonist-mediated increase in cAMP concentration over basal cAMP for the V2R(RI37H) was observed. Mutation of the serine cluster in the
10 V2R(RI37H) C-tail resulted in a six-fold enhancement in cAMP production of both the V2R(RI37H,Ala6) and V2R(RI37H,T362) mutants (Fig. 9B). These data suggest that the V2R(RI37H) interacts with G-protein, albeit less well than the wild type V2R, and that its strong affinity for arrestin markedly inhibits this interaction.

15

Example 8

Expression of wild type α_{1B} -AR and α_{1B} -AR R143E in HEK-293 cells

[00378] The plasma membrane expression of α_{1B} -AR and α_{1B} -AR R143E were determined by whole cell binding of [³H]prazosin, as shown in Figure 10. Scatchard plot analysis indicates that the B_{max} of the α_{1B} -AR R143E is
20 markedly lower than the wild type α_{1B} -AR. This observation was confirmed by immunofluorescence using live, unpermeabilized cells expressing wild type α_{1B} -AR or α_{1B} -AR R143E tagged with an HA-epitope. Cells were incubated with an anti-HA antibody followed by a FITC labeled secondary antibody. The amount of fluorescence originating from the plasma membrane of the
25 cells expressing the α_{1B} -AR R143E (Figure 10B, right panel) is much lower than the wild type α_{1B} -AR (left panel), indicating a reduced surface expression

of the α_{1B} -AR R143E.

Example 9

Signaling of the α_{1B} -AR and α_{1B} -AR R143 mutants

5 [00379] To determine if the α_{1B} -AR R143 mutants are constitutively desensitized, the α_{1B} -AR R143 mutants (R143 mutants here refers to substitution with Alanine, Glutamic acid, Histidine, or Asparagine), the [³H]IP accumulation in HEK-293 cells expressing wild type α_{1B} -AR or α_{1B} -AR R143 mutants was measured (Figure 11). Cells expressing wild type α_{1B} -AR displayed a low accumulation of [³H]-IP in the absence of agonist, with a 6- fold increase upon addition of 10 μ M NE. In contrast, the α_{1B} -AR R143 mutants displayed a significantly impaired ability to mediate an agonist- induced IP response. In contrast, the AT_{1A}R R126H mutant when stimulated with 1 μ M AngII only displays a slight impairment of signaling compared to the stimulated wild type AT_{1A}R.

15 Example 10

Localization of α_{1B} -AR and α_{1B} -AR R143-GFP mutants in response to norepinephrine (NE)

20 [00380] Since the lack of membrane expression of the α_{1B} -AR R143A shown by the binding data might suggest an impairment of receptor processing, we determined the cellular localization of wild type α_{1B} -AR and the α_{1B} -AR R143 mutants using chimeras of the receptors tagged at the C-terminus with green fluorescent protein (GFP). Figure 12A illustrates that when HEK-293 cells are transfected with wild type α_{1B} -AR-GFP, the fluorescence signal as revealed by confocal microscopy originates predominantly from the plasma membrane in the absence of agonist. Addition of 10 μ M NE to cells expressing wild type α_{1B} -AR-GFP results in a

loss of plasma membrane expression and the redistribution of the receptor to endocytic vesicles. In contrast, Figure 12B illustrates that even in the absence of agonist, the α_{1B} -AR R143-GFP mutants are localized predominantly in endocytic vesicles, similar to what was found with the constitutively desensitized V2R R137H. Exposure of cells expressing α_{1B} -AR R143-GFP mutants to agonist enhanced the endosomal distribution of the remaining plasma membrane receptor (data not shown).

Example 11

Distribution of β arrestin-GFP in HEK-293 Cells Expressing α_{1B} -AR

[00381] Agonist-stimulated α_{1B} -ARs have been previously shown to promote the translocation of cytosolic β arrestin to the plasma membrane, an event that is associated with the desensitization and endocytosis of activated receptors (Mhaouty-Kodja, S., et al., 1999, Mol. Pharmacol. 55: 339-347). To observe how the distribution of β arrestin is affected by the α_{1B} -AR R143 mutants, we co-expressed β arrestin-GFP with these receptors in HEK-293 cells. Figure 13A illustrates that in the absence of agonist, β arrestin-GFP is uniformly distributed in the cytosol of cells expressing the wild type α_{1B} -AR, and that the addition of 10 μ M NE to the cells results in the rapid translocation of β arrestin-GFP to the plasma membrane. This pattern of translocation is reminiscent of so-called class A receptors such as the β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) (Oakley, R.H., et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 17201-17210). Activation of class A receptors leads to plasma membrane translocation of β arrestin without its subsequent co-trafficking into endocytic vesicles, as is the case for class B receptors such as the V2R (Oakley, R.H., et al). In cells co-expressing β arrestin-GFP and the α_{1B} -AR R143 mutants, the localization of β arrestin-GFP also appears partially at the plasma membrane without the addition of agonist, in contrast to its distribution with the wild type

α_{1B} -AR (Figure 13B). The ability of the mutants to translocate β arrestin-GFP in the absence of agonist suggests that they have a higher affinity for β arrestin than does the wild type receptor without agonist (Oakley, R.H., et al.). The addition of 10 μ M NE to cells co-expressing β arrestin-GFP and the α_{1B} -AR R143 mutants enhances this translocation (data not shown).

Example 12

Reversal of the α_{1B} -AR R143 Constitutive Desensitization with Antagonist or dynamin(K44A)

[00382] The low membrane expression and intracellular localization of the mutant receptors as revealed by the receptor-GFP constructs may reflect their inability to ever reach the plasma membrane. For instance, the receptors may be inappropriately folded and/or processed in the endoplasmic reticulum. However, if the loss of expression is due to their constitutive association with β arrestin, as shown in Figure 14B, it would suggest that the mutant receptors traffic to the plasma membrane before being internalized into endocytic vesicles. Two approaches were employed to determine if the α_{1B} -AR R143E mutants could be trapped on the plasma membrane, reversing the constitutive internalization in endocytic vesicles. The first method utilized a selective antagonist to the α_{1B} -AR, phentolamine. Figure 14A illustrates that HEK-293 cells transfected with the wild type α_{1B} -AR-GFP express the receptor predominantly at the plasma membrane (upper left panel). HEK-293 cells transfected with the wild type α_{1B} -AR-GFP and cultured overnight in the presence of 10 μ M phentolamine showed no alteration in the expression of the receptor at the plasma membrane (upper center panel). However, the α_{1B} -AR R143E-GFP in HEK-293 cells was predominantly localized inside endocytic vesicles (lower left panel), while in the presence of phentolamine a complete reversal was observed and the

mutants were localized at the plasma membrane (lower center panel). The second method employed to reverse the constitutive desensitization was the co-expression of the receptors with dynamin(K44A), an endocytic protein variant that competitively inhibits the fission of clathrin-coated vesicles from the plasma membrane (Zhang, J., et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 27005-27014). α_{1B} -AR R143E-GFP when co-expressed with dynamin(K44A) was unable to undergo endocytosis and its expression remained at the plasma membrane (lower right panel). Whole cell binding (Figure 14B) confirmed that while the untreated α_{1B} -AR R143E cells displayed a lower receptor expression on the plasma membrane compared to the wild type α_{1B} -AR, the presence of an antagonist or the co-expression of dynamin(K44A) was able to increase the expression of the α_{1B} -AR R143E on the plasma membrane to the level of the wild type α_{1B} -AR.

Example 13

15 **Distribution of β arrestin in HEK-293 Cells Expressing $AT_{1A}R$**

[00383] To determine if the constitutive desensitization resulting from mutation of the DRY motif arginine could be extended to another GPCR, we repeated the receptor-GFP localization and β arrestin-GFP translocation experiments using the $AT_{1A}R$. Figure 15A illustrates that wild type $AT_{1A}R$ -GFP when transfected into HEK-293 cells is expressed predominantly on the plasma membrane, and that addition of 1 μ M angiotensin II (AngII) results in the internalization of the receptor into endocytic vesicles. In contrast, $AT_{1A}R$ R126H-GFP transfected into HEK-293 cells is localized in endocytic vesicles without the addition of agonist. Furthermore, when cells expressing $AT_{1A}R$ R126H-GFP are cultured in the $AT_{1A}R$ selective antagonist, L158,809, a reversal of the receptor localization back to the plasma membrane occurs. Figure 15B illustrates that β arrestin-GFP is

uniformly distributed in the cytosol of HEK-293 cells expressing the wild type AT_{1A}R, and that addition of 1 μM AngII causes redistribution of the βarrestin-GFP into endocytic vesicles. In contrast, βarrestin-GFP when co-expressed with the AT_{1A}R R126H is distributed predominantly in endocytic vesicles in the absence of agonist. Addition of 1 μM AngII to cells expressing AT_{1A}R R126H resulted in an enhanced distribution of βarrestin-GFP into endocytic vesicles.

Example 14

Signaling of the AT_{1A}R R126H in the Presence or Absence of GRKs

[00384] Given the fact that other GPCRs with DRY motif Arginine mutations lost their ability to couple to G proteins and that AT_{1A}R R126H is able to translocate βarrestin-GFP in the absence of agonist (as shown in Figure 15B), AT_{1A}R R126H was predicted to also exhibit a loss of signaling phenotype. However, HEK cells transfected with the AT_{1A}R R126H and stimulated with AngII were able to accumulate [³H]-IP at levels identical to HEK cells transfected with wild type AT_{1A}R and stimulated with AngII (Figure 16C). To determine if the signaling of the AT_{1A}R R126H could be abolished by overexpressing GRKs and what effect this has on the localization of βarrestin-GFP, we transfected HEK cells with wild type AT_{1A}R or AT_{1A}R R126H either with or without equal amounts of GRK plasmid cDNA. Cells were either co-transfected with βarrestin-GFP for confocal microscope viewing, or incubated with [³H]-inositol to measure [³H]-IP accumulation. Figure 16A (left top and bottom panels) shows that in HEK cells transfected with βarrestin-GFP and the wild type AT_{1A}R, the localization of βarrestin-GFP is distributed throughout the cytosol with or without the co-transfection of GRKs. Upon the addition of 1 μg AngII to these cells, after 5 minutes the βarrestin-GFP translocates to endocytic vesicles (Figure 16a, right panels,

top and bottom). Figure 16B illustrates that HEK cells transfected with β arrestin-GFP and AT_{1A}R R126H results in a partial translocation of β arrestin-GFP to endocytic vesicles (top left panel), with a notable amount of β arrestin-GFP remaining in the cytosol. This remaining cytosolic β arrestin-GFP translocates to endocytic vesicles upon the addition of 1 μ g AngII, as shown in Figure 16B (top right panel). HEK cells transfected with β arrestin-GFP, AT_{1A}R R126H, and GRKs, however, result in a complete translocation of β arrestin-GFP to endocytic vesicles without the addition of agonist as shown in Figure 16B (bottom left panel). The β arrestin-GFP remains completely localized in endocytic vesicles when these cells are exposed to 1 μ g AngII (Figure 16B, bottom right panel). To measure the signaling ability of cells overexpressing GRKs with the wild type AT_{1A}R or R126H, HEK cells were transiently transfected with 1 μ g receptor cDNA either with or without equal amounts of GRK cDNA. These cells were then incubated in [³H]-inositol, and the [³H]-IP accumulation was measured in the basal state or upon the addition of 1 μ g AngII. Figure 16C indicates that both the wild type AT_{1A}R and AT_{1A}R R126H accumulate equivalent amounts of [³H]-IP upon stimulation with 1 μ g AngII. However, the overexpression of GRKs is able to completely abolish the accumulation of [³H]-IP in AT_{1A}R R126H cells stimulated with agonist, whereas the wild type AT_{1A}R only experiences a decrease in [³H]-IP accumulation when stimulated with agonist.

Example 15

Increased arrestin expression results in constitutively desensitized GPCRs

[00385] As described above, GRKs expressed at levels above background can result in constitutive endosomal localization of the GPCR. The increased (with respect to wild-type) levels of GRK results in increased

WO 02/059267

PCT/US02/01701

phosphorylation of the GPCR. The hyper-phosphorylated GPCR has increased (with respect to wild-type) affinity for arrestin, resulting in increased (with respect to wild-type) constitutive endosomal localization of the GPCR.

5 [00386] Likewise, arrestin will be expressed at levels above background, will have increased GPCR binding, and therefore will result in constitutive desensitization, most preferably constitutive endosomal localization of the GPCR.

Example 16

10 **The presence of Phosphorylation sites in the GPCRs result in constitutively desensitized GPCRs**

[00387] As described in Figure 9, the SSSTSS to AAAAAA mutation in the V2R C-terminal tail (as described in U.S.S.N. 09/993,844, and incorporated by reference in its entirety, and Oakley et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:19452-19460) inhibits the constitutive endosomal localization of the GPCR. The mutation of highly phosphorylatable amino acids (such as Serine and Threonine) to lesser phosphorylatable amino acids (such as Alanine) of the phosphorylation sites of the C-terminal tail of the GPCR results in decreased GPCR phosphorylation by the GRKs, decreased arrestin binding to the GPCR, and decreased endosomal localization of the GPCR.

20 [00388] Likewise, at phosphorylation sites of C-terminal tails of certain GPCRs, the mutation of lesser phosphorylatable amino acids to highly phosphorylatable amino acids (as described in U.S.S.N. 09/993,844 and Oakley et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:19452-19460) will result in increased phosphorylation of the GPCR. These phosphorylation sites can be added at

the C-terminal tails of the modified GPCRs of the present invention. The resulting modified GPCR would have, in addition to a modified DRY motif, highly phosphorylatable amino acids in its C-terminal tail, will be hyper-phosphorylated, will bind arrestin with increased affinity (with respect to wild-type). This will result in constitutive desensitization, most preferably constitutive endosomal localization of the GPCR.

Example 17

Uses of Arrestin Knockout Mice

[00389] By way of example, the arrestin knockout mice of the present invention will be used as a mouse model of arrestin inhibitors. The antagonists identified as arrestin inhibitors will be analyzed in wild-type mice. The arrestin knockout mice of the present invention will be used to determine if the arrestin antagonists function as would an arrestin knockout.

Example 18

Production of Arrestin Knockout Mice

[00390] By way of example, β arrestin-2 knockout (β arr2-KO) mice were generated by inactivation of the gene by homologous recombination. A bacteriophage λ library of mouse 129SvJ genomic DNA (Stratagene, La Jolla, CA) was screened with the rat β arr2 cDNA (H. Attramadal et al., *J Biol. Chem.* 267, 17882 (1992)). Positive phages were identified and analyzed by restriction digest. A 12-kb β arr2 fragment was digested with *Bam* HI, subcloned into pBluescript KS(-) and sequenced. The targeting vector was assembled by blunt-end ligation of a pHSV-TK cassette (from pIC19R/MCI-TK, M. R. Capecchi, University of Utah), a 2.8-kb *Nco* I-*Bam* HI β arr2 fragment, a pGK-neo cassette (from plasmid pD383, R. Hen, Columbia University) which replaced the 0.8 kb *Bam* HI-*Hind* III fragment of β arr2, and

WO 02/059267

PCT/US02/01701

a 4.5 kb *Hind* III β arr2 fragment into pBluescript KS(-). This targeting vector was linearized with *Not* I and was electroporated into mouse embryonic stem cells. Genomic DNA from transfectants resistant to G418 and gancyclovir were isolated and screened by Southern (DNA) blot analysis using a 0.2 kb 5' external β arr2 probe and a 0.3 kb 3' external β arr2 probe. Chimeric animals were generated by microinjecting these ES cells into C57BL/6 blastocysts. Five chimeric male pups were obtained and mated with C57BL/6 females. Germline transmission was confirmed by Southern blotting. Heterozygous offspring were intercrossed to obtain homozygous mice. Wild-type and mutant mice used in this study were age-matched, 3 to 5 month old, male siblings. For protein immunoblot analysis, whole cell lysates were prepared by polytron homogenization in lysing buffer (10 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA, 1 protease inhibitor tablet / 10 mL (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, USA), 1% nonidet-40). Polyacrylamide gels were loaded with 25 μ g protein/ lane and equivalent protein loading was confirmed by Ponceau S staining of the gels. After transfer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, proteins were blotted with polyclonal antibodies to β arrestin-2 or β arrestin-1 (H. Attramadal et al., *J Biol.Chem.* 267:17882-17890 (1992)). Bands were visualized with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase and an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Piscataway, NJ).

[00391] Mice lacking β arrestin-2 were identified by Southern DNA blot analysis and the absence of β arrestin-2 was confirmed by protein immunoblotting of extracts from brainstem, periaqueductal gray (PAG) tissue, spleen, lung and skin. The β arr2-KO mice were viable and had no gross phenotypic abnormalities.

[00392] β arrestin-1 knockout mice and visual arrestin knockout mice may

be generated and identified in an analogous manner, substituting inactivation of β arrestin-1 gene and visual arrestin-gene accordingly.

5 [00393] While the invention has been described and illustrated herein by references to various specific material, procedures and examples, it is understood that the invention is not restricted to the particular material combinations of material, and procedures selected for that purpose. Numerous variations of such details can be implied as will be appreciated by those skilled in the art.

10 [00394] The following is a list of documents related to the above disclosure and particularly to the experimental procedures and discussions. The following documents, as well as any documents referenced in the foregoing text, should be considered as incorporated by reference in their entirety.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

- Attramadal, H. , Arriza, J. L. , Aoki, C. , Dawson, T. M. , Codina, J. , Kwatra, M. M. , Snyder, S. H. , Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17882-17890
- 5 Barak, L. S. , Oakley, R. H. , Laporte, S. A. and Caron, M. G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 93-98
- Barak, L. S. , Warabi, K. , Feng, X. , Caron, M. G. & Kwatra, M. M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 7565-7569
- 10 Barak, L. S. , Ferguson, S. S. , Zhang, J. & Caron, M. G. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27497-27500
- Barak, L. S. , Ferguson, S. S. , Zhang, J. , Martenson, C. , Meyer, T. & Caron, M. G. (1997) *Mol. Pharmacol.* 51, 177-184
- Barak, L. S. , Menard, L. , Ferguson, S. S. , Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) *Biochemistry* 34, 15407-15414
- 15 Ferguson, S. S. , Barak, L. S. , Zhang, J. & Caron, M. G. (1996) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 1095-1110
- Ferguson, S. S. , Menard, L. , Barak, L. S. , Koch, W. J. , Colapietro, A. M. & Caron, M. G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24782-24789
- 20 Kim, K.-M., Valenzano, K. J., Robinson, S. R., Yao, W. D., Barak, L. S., Caron, M. G. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 37409-37414
- Laporte, S. A. , Oakley, R. H. , Holt, J. A. , Barak, L. S. & Caron, M. G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 23120-23126
- Laporte, S. A. , Oakley, R. H. , Zhang, J. , Holt, J. A. , Ferguson, S. S. , Caron, M. G. & Barak, L. S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96,

WO 02/059267

PCT/US02/01701

3712-3717

Menard, L. , Ferguson, S. S. , Zhang, J. , Lin, F. T. , Lefkowitz, R. J. , Caron, M. G. & Barak, L. S. (1997) *Mol. Pharmacol.* 51, 800-808

5 Mhaouty-Kodja, S. , Barak, L. S. , Scheer, A. , Abuin, L. , Diviani, D. , Caron, M. G. & Cotecchia, S. (1999) *Mol. Pharmacol.* 55, 339-347

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., Caron, M. G. (2001). *J. Biol. Chem.* 276: 19452-19460

Oakley, R. H. , Laporte, S. A. , Holt, J. A. , Caron, M. G. & Barak, L. S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 17201-17210

10 Oakley, R. H. , Laporte, S. A. , Holt, J. A. , Barak, L. S. & Caron, M. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 32248-32257

Wilbanks, A. M., Laporte, S. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. (2002) Manuscript submitted.

15 Zhang, J. , Barak, L. S. , Anborgh, P. H. , Laporte, S. A. , Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 10999-11006

Zhang, J. , Barak, L. S. , Winkler, K. E. , Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27005-27014

CLAIMS

What Is Claimed Is:

1. An isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof comprising a DRY motif, wherein the DRY motif is modified to contain an amino acid other than arginine at position 2, and wherein the modified GPCR or biologically active fragment thereof is constitutively desensitized in absence of agonist.
2. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated and modified GPCR binds arrestin, localizes to clathrin-coated pits, or localizes in endocytic vesicles or endosomes in absence of agonist.
3. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated, modified GPCR is derived from a naturally occurring GPCR of Figure 1.
4. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated, modified GPCR is a Homo sapien GPCR.
5. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated, modified GPCR is a Class A GPCR.
6. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated, modified GPCR is a Class B GPCR.
7. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated, modified GPCR is an orphan GPCR.
8. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated, modified GPCR is derived from an odorant or taste GPCR.
9. The isolated modified GPCR of claim 1, wherein the isolated modified GPCR comprises a modified DRY motif selected from the group of

Figure 2B.

10. A polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1 - 6 and wherein the polypeptide when expressed in a cell binds arrestin in absence of agonist.

11. A polypeptide of Figure 1, wherein the polypeptide comprises a modified DRY motif wherein the arginine of the DRY motif is any naturally occurring amino acid or synthetic amino acid except arginine.

12. A polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1 - 6, and wherein the polypeptide when expressed in a cell localized to endocytic vesicles or endosomes in absence of agonist.

13. A nucleic acid encoding an isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof of claim 1.

14. A nucleic acid selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 7-12.

15. A nucleic acid encoding a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID Nos.: 1 - 6.

16. A vector comprising a nucleic acid of claim 14.

17. A host cell comprising the expression vector of claim 16.

18. A method of identifying a compound which inhibits arrestin binding to a GPCR comprising:

a) preparing an isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof which targets to an endocytic vesicle or endosome without agonist;

b) attaching the isolated modified GPCR or biologically active

WO 02/059267

PCT/US02/01701

fragment thereof to a substrate;

c) exposing the isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof to a candidate compound;

d) exposing the isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof to an arrestin or biologically active fragment of arrestin; and

e) detecting whether interaction of the arrestin protein with the GPCR is decreased after exposure to the test compound, the decrease in interaction being an indication that the compound has activity in inhibiting arrestin binding to the GPCR.

19. A method of identifying a compound for GPCR antagonist or inverse agonist activity comprising:

a) preparing an isolated modified GPCR or biologically active fragment thereof which targets to an endosome or endocytic vesicle without agonist;

b) expressing the modified GPCR or biologically active fragment thereof in a cell that also expresses a conjugate of arrestin and a detectable molecule;

c) exposing the cell a candidate compound;

d) detecting whether interaction of the arrestin protein with the GPCR is decreased after exposure to the test compound, the decrease in interaction being an indication that the compound has activity.

20. The method of claim 18 or 19, wherein the modified GPCR is a class A receptor.

21. The method of claim 18 or 19, wherein the modified GPCR is

a class B receptor.

22. The method of claim 18 or 19, wherein the modified GPCR is an odorant or taste receptor.

23. The method of claim 18 or 19, wherein the modified GPCR is an orphan receptor.

24. The method of claim 19, wherein the modified GPCR is conjugated to a detectable molecule.

25. The method of claim 19, wherein the detectable molecule is a radioisotope, an epitope tag, an affinity label, an enzyme, a fluorescent group, or a chemiluminescent group.

26. A compound identified by the method of Claim 18 or 19.

27. A pharmaceutical composition for the treatment of a condition mediated by a GPCR in mammals comprising a therapeutically effective amount of a compound of Claim 26 and a pharmaceutically acceptable carrier.

28. A non-human transgenic animal which expresses a modified GPCR of Figure 3.

29. The animal of claim 28, wherein the animal is a mouse

30. The animal of claim 28, wherein the non-human transgenic animal is a primate, a feline, a canine, a porcine, a bovine, a caprine, or an ovine.

31. A method of detecting a modified GPCR in a biological sample comprising assaying the biological sample with an antibody which recognizes and binds to the modified GPCR and determining whether the

antibody bound the modified GPCR.

32. A method of detecting a nucleic acid of claim 14 in a biological sample comprising

- (a) exposing the biological sample to a modified GPCR probe; and
- (b) determining whether the modified GPCR probe bound the nucleic acid of the biological sample.

33. A composition comprising a substrate and one or more nucleic acids of claim 14 or fragments thereof which encode a motif of formula I, wherein formula I is a modified DRY motif.

34. A kit for detecting a modified GPCR in a biological sample comprising an antibody which recognizes and binds to the modified GPCR and reagents which detect the antibody that binds to the modified GPCR.

35. An isolated immunoglobulin which recognizes and binds to a modified GPCR.

36. The immunoglobulin of claim 35, wherein the immunoglobulin is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a human antibody, a bispecific antibody, a humanized antibody, a primatized antibody, or an antibody fragment.

37. The immunoglobulin of claim 35, wherein the antibody fragment is Fab, Fab', F(ab')₂, F(v), and scFv.

38. A method of inhibiting constitutive desensitization of a GPCR by administering an effective amount of 2-ethyl-5,7-dimethyl-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-3H-imidazo[4,5-b]pyridine or phentolamine to a patient in need thereof.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

FIGURE 1
Human G Protein-Coupled Receptor Family
 (Receptors known as of January, 1999)

CLASS	LIGAND	NUMBER	TISSUE	PHYSIOLOGY	THERAPEUTICS
•Class I Rhodopsin like	•Amine				
	•Acetylcholine (muscarinic & nicotinic)	5	Brain, Nerves, Heart	Neurotransmitter	Acuity, Alzheimer's
	•Adrenoreceptors	6	Brain, Kidney, Lung	Glucocorticogenesis	Diabetes, Cardiovascular
	• α_1 Adrenoreceptors	3	Kidney, Heart	Muscle Contraction	Cardiovascular, Respiratory
	•Beta Adrenoreceptors	3	Brain, Kidney, GI	Neurotransmitter	Cardiovascular, Parkinson's
	•Dopamine	5	Vascular, Heart, Brain	Vascular Permeability	Anti-inflammatory, Ulcers
	•Histamine	2	Most Tissues	Neurotransmitter	Depression, Insomnia, Analgesic
	•Serotonin (5-HT)	16			
	•Peptide				
	•Angiotensin	2	Vascular, Liver, Kidney	Vasoconstriction	Cardiovascular, Endocrine
	•Bradykinin	1	Liver, Blood	Vasodilation,	Anti-inflammatory, Asthma
	•C5a anaphylatoxin	1	Blood	Immune System	Anti-inflammatory
	•Forsk-leu-phe	3	Blood	Chemottractant	Anti-inflammatory
	•Interleukin-8	1	Blood	Chemottractant	Anti-inflammatory
	•Chemokine	6	Blood	Chemottractant	Anti-inflammatory
	•Orexin	2	Brain	Fat Metabolism	Obesity
	•Neurotrophin	1	Brain	Bronchodilator, Pain	Airway Diseases, Anesthetic
	•CKK (Ghrelin)	2	Gastrointestinal	Modify, Fat Absorption	Gastrointestinal, Obesity, Parkinson's
	•Endothelin	2	Heart, Bronchus, Brain	Muscle Contraction	Cardiovascular, Respiratory
	•Melanocortin	5	Kidney, Brain	Metabolic Regulation	Anti-inflammatory, Analgesics
	•Neuropeptide Y	5	Nerves, Intestine, Blood	Neurotransmitter	Behavior, Memory, Cardiovascular
	•Neurotensin	1	Brain,	CNS	Cardiovascular, Analgesic
	•Opioid	3	Brain,	CNS	Depression, Analgesic
	•Somatostatin	5	Brain, Gastrointestinal	Neurotransmitter	Oncology, Alzheimer's
	•Tachykinin (Substance P, NKA)	3	Brain Nerves	Neurohormone	Depression, Analgesic
	•Thrombin	3	Platelets, Blood Vessels	Coagulation	Anti-coagulant, Anti-inflammatory
	•Vasopressin like	4	Arteries, Heart, Bladder	Water Balance	Anti-diuretic, Diabetic Complications
	•Galanin	1	Brain, Pancreas	Neurotransmitter	Analgesics, Alzheimer's
	•Hormone protein				
	•Follicle stimulating hormone	1	Ovary, Testis	Endocrine	Fertility
	•Luteal phase-inhibiting hormone	1	Ovary, Testis	Endocrine	Fertility

1/25

WO 02/059267

PCT/US02/01701

2/25

	Thyroid	Endocrine	Thyroidism, Metabolism
•Thyrotropin	1	Photoreception	Ophthalmic Diseases
•Rhodopsin	5	Smell	Olfactory Diseases
•Oxytocin	4(-1000)	Vasodilation, Pain Inflammation	Cardiovascular, Analgesic
•Prostanoid	5	Cell proliferation	Cancer, Anti-inflammatory
•Prostaglandin	2	Inflammation	Cancer
•Lysophosphatidic Acid	2	Cell proliferation	Cardiovascular, Arthritis
•Sphingosine-1-phosphate	1	Inflammation	Cardiovascular
•Leukotriene	1	Platelet Regulation	Cardiovascular, Respiratory
•Prostacyclin	1	Vasodilation	Cardiovascular, Respiratory
•Thromboxane	1	Vasodilation	Cardiovascular, Respiratory
•Nucleoside-like	4	Multiple Effects	Cardiovascular, Respiratory
•Adenosine	4	Relaxes Muscle	Cardiovascular, Respiratory
•Purinoreceptors	4	Sensory Perception	Analgesics, Memory
•Cannabis	2	Inflammation	Anti-inflammatory, Anti-asthmatic
•Platelet activating factor	1	Reproduction	Prostate Cancer, Endometriosis
•Guanylylarginine-releasing hormone like	1	Thyroid Regulation	Metabolic Regulation
•Gonadotropin-releasing hormone	1	Neuroendocrine	Oncology, Alzheimer's
•Thyrotropin-releasing hormone	1	Neuroendocrine	Regulation of Circadian Cycle
•Growth hormone-inhibiting factor	1	Neuroendocrine	
•Melatonin	1	Digestion	
		Calcium Resorption	Obesity, Gastrointestinal
•Secretin	1	Calcium Resorption	Osteoporosis
•Calcitonin	1	Neuroendocrine	Stress, Mood, Obesity
•Corticotropin releasing factor/orexin	1	Sugar/Fat Metabolism	Diabetes, Obesity
•Gastric inhibitory peptide (GIP)	1	Glucagonogenesis	Cardiovascular
•Glucagon	1	Neuroendocrine	Cardiovascular, Diabetes, Obesity
•Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1)	1	Calcium Regulation	Growth Regulation
•Growth hormone-releasing hormone	1	Metabolism	Osteoporosis
•Parathyroid hormone	1	Metabolism	Metabolic Regulation
•PACAP	1	Metabolism	Metabolic Regulation
•Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)	1	Metabolism	Metabolic Regulation
		Metabolism	Gastrointestinal
•Metabotropic Glutamate	7	Sensory Perception	Hearing, Vision
•GABA _B	1	Neurotransmitter	Mood Disorders
•Extracellular Calcium Sensing	1	Calcium Regulation	Cataracts, GI Tumors

•Class II Secretin like

•Class III

Fig. 1, pg. 2

WO 02/059267

PCT/US02/01701

3/25

FIGURE 2

(a)

Wild-type DRY motif

D = may also be, preferably, E, L, P, Q, T, I, C, G, N, V, H, or A.

Y = may also be, preferably, W, F, S, I, Q, H, G, C, L, D, or A.

R = may also be, preferably, H, or C, or another amino acid, wherein GPCR is not constitutively desensitized

(b)

Modified DRY motif

2nd amino acid = any amino acid other than R or K, preferably A, D, E, N, and H.

WO 02/059267

PCT/US02/01701

4/25

FIGURE 3

The mutated amino acid at the second position of the DRY motif is underlined.

VASOPRESSIN V2 RECEPTOR - (Human)
accession P30518

R137H

```

1 MIMASTTSVAV FGHFSLPPLP SNSSQERPLD TRDPLLARAE IALLSIVFVA VALSNGLVLA
61 ALARERRECH WAPIHVFIGH LCLADLAVAL FQVLPQLAWK ATRDRFGPDA LCRAVKYLQM
121 VGMVASSYMI LAMTLDHHRH ICRPMLAYRH GSGAHNRNPV LVANAFSLLL SLPQLPIFAQ
181 RNVVGGSSQVT DCWACPAEPW GRRTYVTWIA LAMVFAVPTLG IACQVLIIFR RIHASLVFEGF
241 SERFGGRRRG RRTGSPFGEA HVSAAVAKTV RMTLVIVVVY VLCWAPFPLV QLWAWDFEA
301 FLEGAPFVLL MLLASLNSCT NPWYASFSS SVSSELRSLL CCARGRTPPS LGPQDSCTT
361 ASSSLAKDTS S
(SEQ ID NO:1)

```

ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1B-ADRENOCEPTOR).
(Golden hamster)

ACCESSION P18841

R143E

```

1 MNPDLDTGHN TSAPAQWCEL KDANFTGPNQ TSSNSTLPQL DVTRAI SVGL VLGAFILFAI
61 VGNILVILSV ACNRHLRTP NYFIVNLAIA DLLLSPTVLP PSATLEVLGY WVLGRIFCDI
121 WAAVDVLCCT ASILSLCAIS IDAYTGVRY S LQYPTLVTRR KAILALLSWV VLSTVISIGP
181 LLGWKEPAPN DDKKCGVTEE PFYALFSSLG SFYIPLAVIL VMYCRVYIVA KRITKNLEAG
241 VMKEMSNKKE LTLRIHSKNP HEDTLSSTKA KGHNPRSSIA VKLFPKFSREK KAAKTLGIIV
301 GMFILCWLFP FIALPLGSLP STLKPPDAVF KVVFWLGYFN SCLNPIIYPC SSKFPRAFM
361 RILGQCQRSG RRRRRRRLG ACAYTYRPWT RGGSLERSQS RKDSLDDSGS CMSGSRITLP
421 SASPSFGYLG RGAQPLELC AYPWKSGAL LSLPEPPGRR GRILDSGLPT FKLLGEPEEP
481 GTEGDASNGG CDATDLANG QPGFKSNMPL APGHF
(SEQ ID NO:2)

```

R143A

```

1 MNPDLDTGHN TSAPAQWCEL KDANFTGPNQ TSSNSTLPQL DVTRAI SVGL VLGAFILFAI
61 VGNILVILSV ACNRHLRTP NYFIVNLAIA DLLLSPTVLP PSATLEVLGY WVLGRIFCDI
121 WAAVDVLCCT ASILSLCAIS IDAYTGVRY S LQYPTLVTRR KAILALLSWV VLSTVISIGP
181 LLGWKEPAPN DDKKCGVTEE PFYALFSSLG SFYIPLAVIL VMYCRVYIVA KRITKNLEAG
241 VMKEMSNKKE LTLRIHSKNP HEDTLSSTKA KGHNPRSSIA VKLFPKFSREK KAAKTLGIIV
301 GMFILCWLFP FIALPLGSLP STLKPPDAVF KVVFWLGYFN SCLNPIIYPC SSKFPRAFM
361 RILGQCQRSG RRRRRRRLG ACAYTYRPWT RGGSLERSQS RKDSLDDSGS CMSGSRITLP
421 SASPSFGYLG RGAQPLELC AYPWKSGAL LSLPEPPGRR GRILDSGLPT FKLLGEPEEP
481 GTEGDASNGG CDATDLANG QPGFKSNMPL APGHF
(SEQ ID NO:3)

```

R143H

WO 02/059267

PCT/US02/01701

5/25

1 MNPDLDTGHN TSAFAQWGEI KDNFTGPNQ TSSNSTLPQL DVTRAI SVGL VLGAFILFAI
 61 VGNILVILSV ACNRHLRPT NYFIVNLAIA DLLLSFTVLP FSATLEVLGY WVLGRIFCDI
 121 WAADVLCCT ASILSLCAIS IDHIVGVVYS LQYPTLVTRR KAILALLSVN VLSTVISIGP
 181 LLGWKEPAPN DDKRCGVTEE PFYALFSSLG SPYIPLAVIL VMYCRVYIVA KRITKNLEAG
 241 VMKEMSNKE LTLRIHSKNF HEDTLSSTKA KGHNPRSSIA VKLFRKFSREK KAAKTLGIIV
 301 GMFILCWLPP FIALPLGSLF STLKPPDAVF KVVFWLGYFN SCLNPIIYPC SSKFPRAFM
 361 RILGQCQRSG RRRRRRRLG ACAYTYRPWT RGSLEBSQS RKDSLDDSGS CMSSGQRITP
 421 SASPSPGYLG RGAQPLELC AYPEWKS GAL LSLPEPPGRR GRILDSGPLFT FKLLGEPESP
 481 GTEGDASNGG CDATDLANG QPGFKSNMPL APGHF
 (SEQ ID NO:4)

R143N

1 MNPDLDTGHN TSAFAQWGEI KDNFTGPNQ TSSNSTLPQL DVTRAI SVGL VLGAFILFAI
 61 VGNILVILSV ACNRHLRPT NYFIVNLAIA DLLLSFTVLP FSATLEVLGY WVLGRIFCDI
 121 WAADVLCCT ASILSLCAIS IDNIVGVVYS LQYPTLVTRR KAILALLSVN VLSTVISIGP
 181 LLGWKEPAPN DDKRCGVTEE PFYALFSSLG SPYIPLAVIL VMYCRVYIVA KRITKNLEAG
 241 VMKEMSNKE LTLRIHSKNF HEDTLSSTKA KGHNPRSSIA VKLFRKFSREK KAAKTLGIIV
 301 GMFILCWLPP FIALPLGSLF STLKPPDAVF KVVFWLGYFN SCLNPIIYPC SSKFPRAFM
 361 RILGQCQRSG RRRRRRRLG ACAYTYRPWT RGSLEBSQS RKDSLDDSGS CMSSGQRITP
 421 SASPSPGYLG RGAQPLELC AYPEWKS GAL LSLPEPPGRR GRILDSGPLFT FKLLGEPESP
 481 GTEGDASNGG CDATDLANG QPGFKSNMPL APGHF
 (SEQ ID NO:5)

angiotensin II receptor, type 1 (AT1A) [Rattus norvegicus].
 ACCESSION NP_112247

R126H

1 MALNSSAEDG IKRIQDDCPK AGRHSYIFVM IPTLYSIIFV VGIFGNSLVV
 IVIYFYMKLEK
 61 TVASVFLNL ALADLCFLLT CPLNAVYAM EYRWPFGNHL CKIASASVTF
 NLYASVPLLT
 121 CLSIDHYLAI VHPKSRRLR TMLVAKVTCI IIVLMAGLAS LPAVIHENVY
 FIENTNITVC
 181 AFHYESRNST LPIGLGLTKN ILGFLPPLI ILTSYTLIKW ALKKAYEIQK
 NKPRNDIIPR
 241 IIMAVLFFP PSWVPHQIFT FLDVLIQLGV IHDCKISDIV DTAMFITICI
 AYPNCLNPL
 301 FYGFLGKFK KYFLQLLKYI PPKAKSHSSL STRMSTLSYR PSDNMSSAK
 KPASCPEVE
 (SEQ ID NO:6)

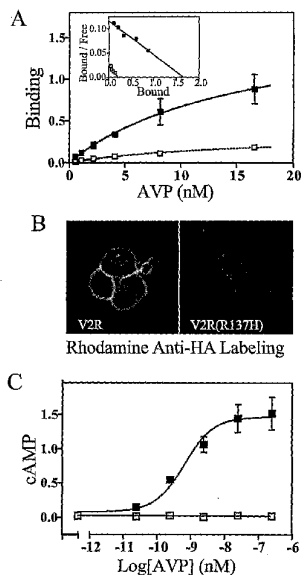


FIGURE 4

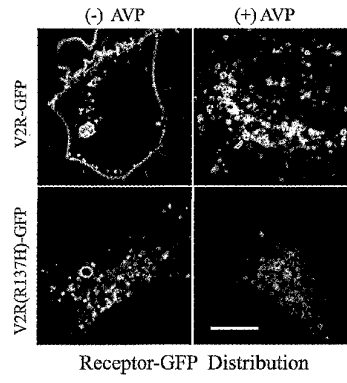


FIGURE 5

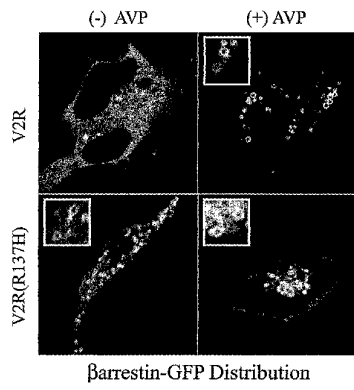


FIGURE 6

A β arrestin-GFP in the presence of dynamin(k44A)

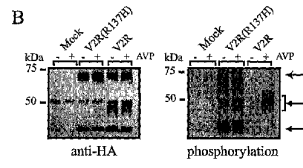


FIGURE 7

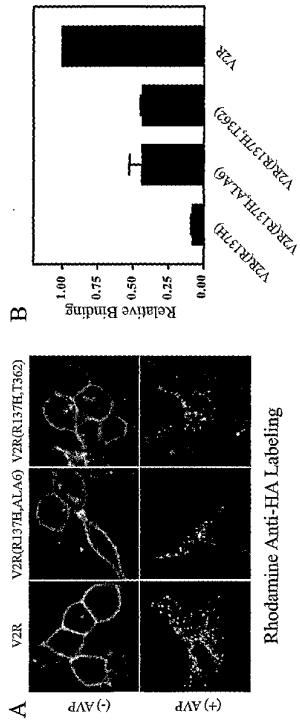


FIGURE 8

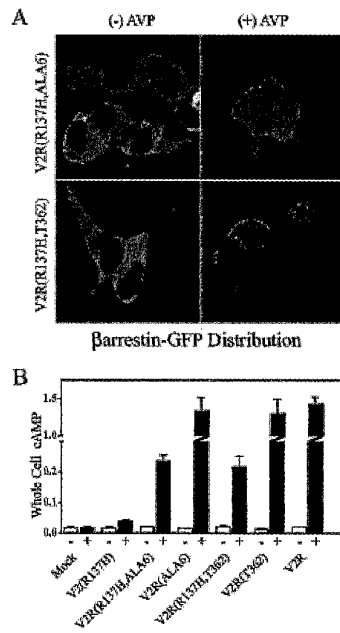


FIGURE 9

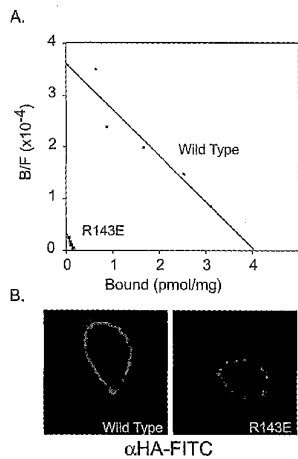


FIGURE 10

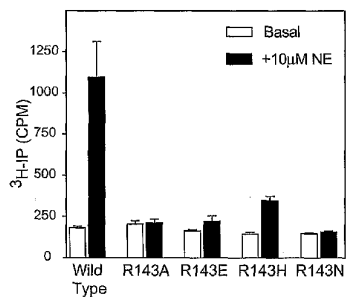


FIGURE 11

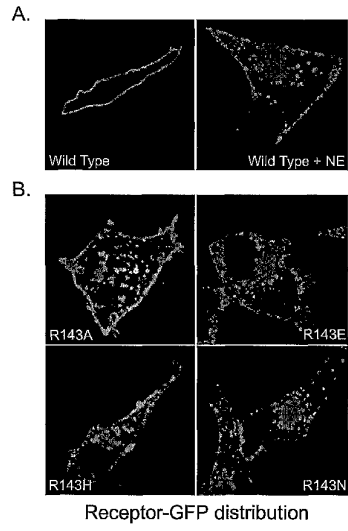


FIGURE 12

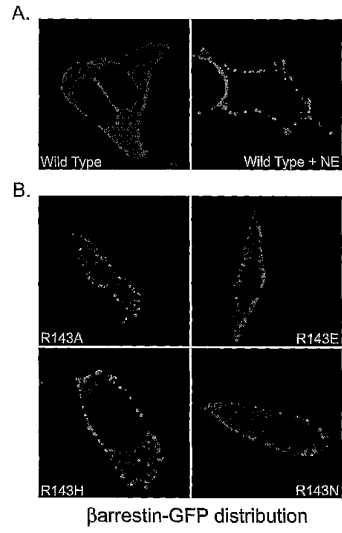


FIGURE 13

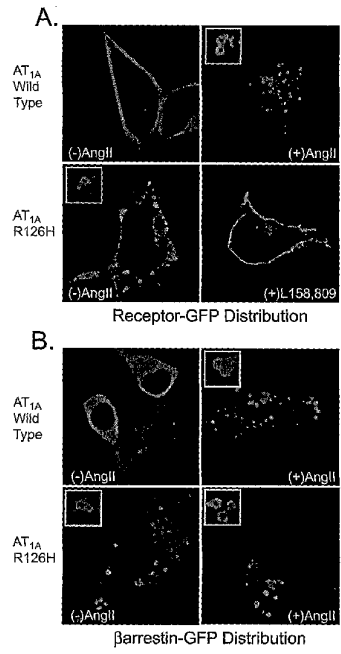


FIGURE 15

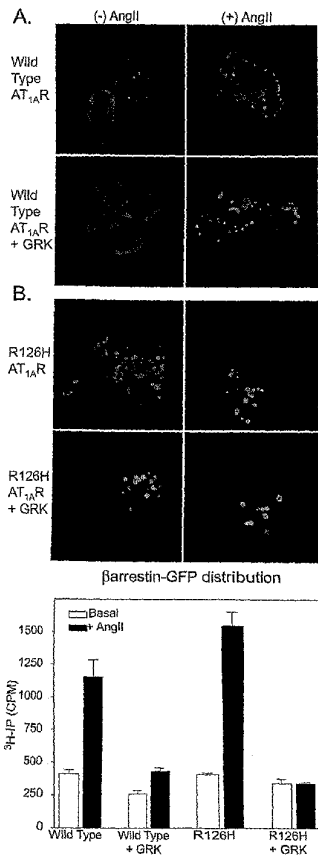


FIGURE 16

WO 02/059267

PCT/US02/01701

19/25

FIGURE 17

Homo sapiens arginine vasopressin receptor 2
ACCESSION NM_000054

R137H

```
atgct
6 catggcgctcc accacttccg ctgtgcctgg gcateccctct ctgccacgcc
tgcccagcaa
66 cagcagccag gagaggccac tggacacccc ggacccgctg
ctagcccggg cggagetggc
126 gctgctctcc atagtclttg tggctgtggc cctgagcaat
ggcctggctg tggcggccct
186 agctcggcgg ggcggcggg gccactgggc acccacaac
gtttcattg gccacttgtg
246 cctggccgac ctggccgtgg ctctgttcca agtctgtccc
cagctggcct ggaaggccac
306 cgaccgcttc ogtggccag atgcctgtg tggggcctg
aagtatctgc agatgggtgg
366 catgtatgcc tctctctaca tgatcctggc catgacgctg
gaccaccacc gtgccatctg
426 cgtcccatg ctggcgtacc gccatggaag tggggctcac
tggaacgggc cggtgctagt
486 ggcttgggcc ttctcgtccc ttctcagcct gccccagctc
ttcatcttcg cccagcgcaa
546 cgtggaagggt ggcagcgggg tcaactgaetg ctgggcctg
tttgccgagc cctggggcgg
606 tcgcacctat gtcacctgga ttgcctgat ggtgttcgtg
gcacctaccg tgggtatcgc
666 cgcctgccag gtgctcactt tccgggagat tcatgccagt
ctggtgccag ggccatcaga
726 gaggcctggg gggcgccgca ggggacgccc gacaggcagc
cccgtgagg gagcccactg
786 gtcagcagct gtggccaaga ctgtgaggat gacgctagtg
attgtggtcg tctatgtgct
846 gtgctgggca cccttctcc tggcgcagct gtgggcccgg
tgggaccggg aggcacctct
906 ggaagggggc ccctttgtg tactcatgtt gctggccagc
ctcaacagct gcaccaacc
966 ctggatctat gcattttca gcagcagcgt gtctcagag
ctgcgaagct tgcctcgtg
1026 tgcccgggga cgcacccac ccagcctggg tcccgaagat
gagtcctgca ccacggccag
1086 ctctctccctg gccaaaggaca ctctcatgctg a
(SEQ ID NO:7)
```

WO 02/059267

PCT/US02/01701

20/25

Syrian golden hamster alpha-1B adrenergic receptor mRNA
ACCESSION J04084

R143H

```
1 atgaat ccgatctgg acaccggcca caacacatca
gcacctgccc
47 aatggggaga gttgaaagat gccaaacttca ctggccocaa
ccagacctcg agcaactcca
107 cactgcccc gctggacgtt accagggcca tctctgtggg
cctggtgctg gggccttca
167 tctctttgc cattgtgggc aacatcctgg tcatectgtc
agtggcctgc aatgggcacc
227 tgcggagcc caccactac ttcattgtca acctggccat
tgetgacctg ctgttgagtt
287 tcacagtct gcccttctcc getaccotag aagtgtctgg
ctactgggtt ctggggcgca
347 tcttctgtga catctgggca gcggtggaoc tctgtgctg
tacggcctcc atcctgagcc
407 tatgtgccc ctccattgat caetacattg gggtgcgcta
ctctctgag taacccactc
467 tggtcaccog caggaaggcc atcttggcac tctcagtggt
gtgggttttg tccacggtca
527 tctccatcgg gcctctcctt ggatggaaag aaccagcgcc
caacgacgac aaggaaatgg
587 gagtcacoga agaacccttc tatgccctct tttcctcct
gggctccttc taactccac
647 tegcggtcat tctggtcatg tactgccggg tctacalcgt
ggccaagagg accaccaaga
707 acctggaggg tggagtcatg aaggagatgt ccaactccaa
ggagctgacc ctgaggatcc
767 actcaagaa ctttcatgag gacaccotca cgaataccaa
ggccaagggc cacaaaccca
827 ggagttccat agctgtcaaa ctttttaagt tctccaggg
aaagaaagca gccaaaacct
887 tgggcattgt ggtcggaatg ttcattctgt gttggetccc
cttcttcate gctctccac
947 ttggctcctt gttctcact ctcaagcccc eggacgcgt
gttcaaggtg gtattctggc
1007 tgggctactt caacagctgc ctcaacccca tcatctaccc
gtgctccagc aaggagttca
1067 agcgcgctt catgcgctac cttgggtgcc agtgccgtag
tggccgtcgc cgcgcgcgc
1127 gccgtcgtct gggcgcgtgc gcttacacct atggccgtg
gacgcgcggc ggtctgctgg
1187 agcgtatgca gtcgcggaag gactccctgg acgacagcgg
cagctgcatg agtggcagcc
1247 agaggacct gccctcggcg tggccagcc cgggtacct
gggtcgcgga gcgcagccac
1307 cactggagct gtgcccctac ccgaatgga aatccggggc
```

WO 02/059267

PCT/US02/01701

21/25

totgctcagt ctgocagagc
1367 ctccgggtcg ccgcggtcgc ctgactctg ggccctctt
cactttcaag ctcttgggag
1427 agccggagag ccggggcacc gagggcgatg ccagcaatgg
gggctgagac gcaacgaccg
1487 acctggccaa tgggcagccc ggtttcaaga gcaacatgcc
tctggcaccg gggcactttt
1547 ag
(SEQ ID NO:8)

R143A

1 atgaat ccgactctgg acaccggcca caacacatca
gcacctgccc
47 aatggggaga gttgaaagat gccaaactca ctggcccca
ccagacctg agcaactcca
107 cactgcccc gctggacgtt accagggcca tctctgtggg
cctgggtctg gggccttca
167 tctcttttgc cattgtgggc aacatcctgg tcatcctgc
agtggcctgc aatcggcacc
227 tgcggagccc caccaactac ttcattgtca acctggcoat
tgctgacctg ctgttgagtt
287 tcacagtcct gccctctctc gctaccctag aagtgttgg
ctactgggtt ctggggcgca
347 tcttctgtga catctgggca gcggtggacg tctctgtctg
tacggcctcc atcctgagcc
407 tatgtgcoat ctccattgat acctacattg gggtgcgcta
ctctctgcag taccactc
467 tggtcacccg caggaaggcc atcttgccac tctcagtg
gtgggttttg tccacggtea
527 tctccatcgg gcctctcctt ggatggaaag aaccagcgc
caacgacgac aaggaatggg
587 gagtccaccg agaacccttc tatgccctct tttcctccct
gggctccttc tacatccac
647 teggggtcat tctggtcatg tactgccggg tctacatcgt
ggccaagagg accaccaaga
707 acctggaggc tggagtcatg aaggagatgt ccaactcca
ggagctgacc ctgaggatcc
767 actccaagaa ctttctatgag gacaccctca gcagtacca
ggccaagggc cacaaccca
827 ggagttccat agctgtcaaa ctttttaagt tctccagga
aaagaagca gccaaaacct
887 tgggcattgt ggtcgaatg ttcactctgt gttggctccc
cttctctcgc gctctccac
947 ttggctccct gttctccact ctcaagcccc eggagcctg
gttcaagggtg gtattctggc
1007 tgggctactt caacagctgc ctcaaccca tcatctacc
gtgctccagc aaggagttca
1067 agcggcctt catgcgtatc cttgggtgcc agtgccgtag

WO 02/059267

PCT/US02/01701

22/25

tggccgtcgc cgccgcgcgc
 1127 gccgtcgtct gggcgcgtgc gcttacacct atcggccgtg
 gacgcgcggc ggcctcgtgg
 1187 acgatcgcga gtccgcgaag gactccctgg acgacagcgg
 cagctgcatg agtggcagcc
 1247 agaggacct gccctcggcg tcgccagcc cgggctacct
 gggtcgcgga gcgcagccac
 1307 cactggagct gtgcgcctac cccgaatgga aatccggggc
 tctgctcagt ctgccagagc
 1367 ctccgggtcg ccggcgtcgc ctgcactctg ggcacctctt
 cactttcaag ctcttgggag
 1427 agccggagag ccgggcacc gagggcgatg ccagcaatgg
 gggctgcgac gcaacgaccg
 1487 acctggccaa tgggcagccc ggtttcaaga gcaacatgcc
 tctggcaccg gggcactttt
 1547 ag
 (SEQ ID NO:9)

RI43E

1 atgaat ccgatctgg acaccggcca caacacatca
 gcacctgccc
 47 aatggggaga gttgaaagat gccaaactca ctggcccdca
 ccagacctcg agcaactca
 107 cactgcccca gctggacgtt accagggcca tctctgtggg
 cctggtgctg ggcgccttca
 167 tctcttttgc cattgtgggc aacatcctgg tcatcctgtc
 agtggcctgc aatggcacc
 227 tgcggacgcc caccaactac ttcattgtca acctggccat
 tgotgacctg ctgttgagtt
 287 tcacagtctt gcccttctcc getaccctag aagtgccttg
 ctactgggtt ctggggcgca
 347 tcttctgtga catctggcca gcggtggaag tctgtgtgtg
 tacggcctcc atcctgagcc
 407 tatgtgccat ctccattgat **gag**tacattg gggtgcgcta
 ctctctgcag taacctactc
 467 tggtcacccg caggaaaggc atcttggcac tctcagtg
 gtgggttttg tccacggta
 527 tctccatcgg gctctctctt ggatggaaag aaccagegcc
 caacgacgac aaggaaatgcg
 587 gagtcaccga agaacccttc tatgccctct tttctcct
 gggctccttc tacatccac
 647 tcgcggtcat tctggtcatg tactgccggg tctacatogt
 ggccaagagg accaccaaga
 707 acctggagge tggagtcatg aaggagatgt ccaactcoaa
 ggagctgacc ctgaggatcc
 767 actccaagaa ctttcatgag gacacctca gcagtaccaa
 ggccaagggc cacaaccoca

WO 02/059267

PCT/US02/01701

23/25

827 ggagttccat agctgtcaaa ctttttaagt totccaggga
aaagaaagca gccaaaacct
887 tgggcattgt ggtcggaatg ttcattctgt gttggtccc
cttttcacg gctctccac
947 tgggtccct gttctccact ctcaagcccc cggacgcgt
gttcaagggtg gattctgtg
1007 tgggctactt caacagctgc ctcaaccoca tcatctacc
gtgctccagc aaggagtcca
1067 agcggcctt catgctatc cttgggtgcc agtgccgtg
tggccgtcgc cgcgcgcgc
1127 gcgctgctt gggcgcgtgc gcttacacct atcgccgtg
gacgcgcgcg ggcctcgtg
1187 agcgtcgcg gtcgggaag gactccctgg acgacagcgg
cagctgcctg agtggcagcc
1247 agaggacct gccctcggcg tggccagcc cgggctacct
gggtcgcgga gcgcagccac
1307 cactggagct gtgcccctac ccgaatgga aatccggggc
tctgctcagt ctgcccagagc
1367 ctccgggtcg ccgcgctgc ctgactctg ggcctctct
cactttcaag ctcttggag
1427 agccggagag cccgggcacc gagggcgatg ccagcaatg
gggtgcgac gcaacgacc
1487 acctggccaa tgggcagccc ggtttcaaga gcaacatgc
tctggcacc gccactttt
1547 ag
(SEQ ID NO:10)

R143N

1 atgaat ccgactctgg acaccggcca caacacatca
gcaoctgccc
47 aatggggaga gttgaaagat gccaaactca ctggcccca
ccagacctcg agcaactcca
107 cactgoccca gctggacgtt accagggccca tctctgtggg
cctgggtcgtg ggcgccttca
167 tctcttttgc cattgtgggc aacatcctgg tcatctgtc
agtggcctgc aatcggcacc
227 tgggagccc caccaactac ttcattgtca acctggccat
tgctgacctg ctgttgagtt
287 tcacagctct gcccttctcc gctaccctag aagtgcttgg
ctactgggtt ctggggcgca
347 tctctgtga catctgggca ggggtggacg tctgtgtctg
tacggcctcc atctgagcc
407 tatgtgcat ctccattgat aactacattg ggggtgcgcta
ctctctcag taccocactc
467 tggtcaccg caggaagccc atcttggcac tctcagtg
gtgggttttg tccacgtca
527 tctccatcgg gcctctctt ggatggaaag aaccagcgc
caacgacgac aaggaatgctg

WO 02/059267

PCT/US02/01701

24/25

587 gagtcaccga agaacccttc tatgccctct tttcctccct
 gggctccttc tacatccca
 647 tgcggtcat tctggtcctg tactgccggg tctacatcgt
 ggccaaggagg accaccaaga
 707 acctggaggc tggagtcctg aaggagatgt ccaactccaa
 ggagctgacc ctgaggatcc
 767 actccaagaa ctttctatgag gacaccctca gcagtaccaa
 ggccaagggc cacaaaccca
 827 ggagttccat agctgtcaaa ctttttaagt tctccaggga
 aaagaagca gccaaaacct
 887 tgggcattgt ggtcggatg ttcattctgt gttggctccc
 cttcttcctc gctctcccac
 947 ttggctccct gttctccact ctcaagcccc cggagcgcgt
 gttcaagggtg gtattctggc
 1007 tgggctactt caacagctgc ctcaacccca tcatctaccc
 gtgctccagc aaggagtcca
 1067 agcggcctt catgctatc cttgggtgcc agtgccgtag
 tggccgtcgc cgcgccgcc
 1127 gccgtcgtct gggcgcgtgc gcttacacct atcggccgtg
 gacgcgcgcg ggcctcgttg
 1187 agcagtcgca gtcgcggaag gactccctgg acgacagcgg
 cagctcctg agtggcagcc
 1247 agaggacct gccctcggcg tcgccagcc cgggctacct
 gggctcgcga gcgcagccac
 1307 cactggagct gtgcgcctac cccgaatgga aatccggggc
 tetgctcagt ctgcagagc
 1367 ctccgggtcg ccgcggtcgc ctgcactctg ggcccctctt
 cactttcaag ctcttgggag
 1427 agccggagag ccggggcacc gagggcgtg ccagcaatgg
 gggctgcgac gcaacgaccg
 1487 acctggccaa tgggcagccc ggtttcaaga gcaacatgcc
 tctggcacc cggcaactttt
 1547 ag
 (SEQ ID NO:11)

Rattus norvegicus Angiotensin II receptor, type 1 (AT1AR)

ACCESSION NM_030985

R126H

1 a tggcccttaa ctcttctgct gaagatggta tcaaaagaat
 42 ccaagatgac tgccccaagg ctggcaggca cagttacata
 ttgtcatga tccctaccct
 102 ctacagcctc atctttgtgg tgggaatatt tggaaacagc
 ttggtggatga ttgtcaittt
 162 cttttacatg aagctgaaga ctgtggccag cgtctttctt
 ctcaatctcg ccttgggtga
 222 cttatgcttt ttgctgactt gtcccctgtg ggcagttctat
 accgctatgg agtaccgctg

WO 02/059267

PCT/US02/01701

25/25

282 gcccttgggc aatcacctat gtaagatcgc ttcggccagc
gtgacgttca acctctacgc
342 cagtggttcc cttctcacgt gtctcagcat cgaccctac
ctggccatcg tccaccaat
402 gaagtctcgc cttgcgcga cगतgctggt ggccaaagtc
acctgcatca tcatctggct
462 gatggctggc ttggccagtt tggcagctgt catccaccga
aatgtatact tcatcgagaa
522 caccaatata acagtgtgcg cgtttcatta tgagtctcgg
aattcgacgc tccccatagg
582 gctgggcctt accaagaata ttctgggctt cttgttccct
ttccttatac ttctcaccag
642 ctataccctt atttggaaag ctctaaagaa ggcttatgaa
attcaaaaga acaaaccaag
702 aaacgatgac atcttttaga taattatggc gattgtgctt
ttctttctct ttctctgggt
762 cccccacaa atattcactt tcctggatgt gctgattcag
ctggggctca tccatgactg
822 taaaatttct gacatcgtgg acactgcat gcccatcacc
atctgcatag cgtattttaa
882 caactgcctg aaccctctgt tctacggctt tctggggaag
aaatttaaaa agtatttctt
942 ccagctcctg aaatatattc ccccaaggc caagtccac
tcaagcctgt ctacgaaat
1002 gagcacgctt tcttacggc cttcggataa catgagctca
tcggccaaaa agcctgcctc
1062 ttgttttgag gtggagtga
(SEQ ID NO:12)

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059267 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/705, 16/00, C12N 5/10, 15/00, 15/09, 15/12, 15/63, G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US02/01701
- (22) International Filing Date: 23 January 2002 (23.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/263,406 23 January 2001 (23.01.2001) US
Not furnished 22 January 2002 (22.01.2002) US
- (71) Applicant: DUKE UNIVERSITY [US/US]; Erwin Road, Durham, NC 27708 (US).
- (72) Inventors: BARAK, Larry, S.; 5248 Inverness Drive, Durham, NC 27712 (US); OAKLEY, Robert, H.; 703 Braden Drive, Durham, NC 27713 (US); CARON, Marc, G.; 803 Pleasant Green Road, Hillsborough, NC 27278 (US); LAPORTE, Stephane, A.; 820 Ave de L'epope, Outremont, Quebec, H2V3V3 (CA); WILBANKS, Alyson; 8101 Reynard Road, Chapel Hill, NC 27516 (US).
- (74) Agents: BAUM, Allen, R., et al.; Burns, Doane, Swecker and Mathis, L.L.P., P.O. Box 1404, Alexandria, UT 22313-1404 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, 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).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 10 July 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059267 A3

(54) Title: CONSTITUTIVELY DESENSITIZED G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

(57) Abstract: The present invention relates to modified G-protein coupled receptors (GPCRs). The modified GPCRs of the present invention include GPCRs that have been modified to have altered DRY motifs such that the modified GPCRs are constitutively desensitized. As such, the modified GPCRs of the present invention preferably localize to endocytic vesicles or endosomes in an agonist-independent manner. The invention also relates to methods of screening compounds and sample solutions for GPCR activity using the modified GPCRs.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/01701
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 14/705, 16/00; C12N 5/10, 15/00, 15/09, 15/12, 15/63; G01N 33/53 US CL : 435/7.2, 320.1, 325; 530/350, 387.1; 536/23.5; 800/2 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) U.S. : 435/7.2, 320.1, 325; 530/350, 387.1; 536/23.5; 800/2		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALEWINSSE et al. The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H2 receptor. Molecular Pharmacology. May 2000, Vol. 57, pages 890-898.	18-27, 31, 34-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*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	
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)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2003 (24.04.2003)	Date of mailing of the international search report 02 MAY 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Melissa D. Roberts for Michael Pak Telephone No. 703-308-1235	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/01701
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 1-17,28-30,32 and 33 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: The claims require sequence search and the sequence was not in compliance.
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
		<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/01701

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
BRS, STN, MEDLINE

search terms: g-protein coupled receptor, mutagenesis, constitutive desensitization

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 1/00	A 6 1 P 1/00	4 C 0 6 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/06	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/08	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 D 233/24	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 D 471/04	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/705	C 0 7 D 233/24	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 D 471/04	1 0 7 Z
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/50	Z
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,

GH,GM,HR,HU, ID, IL, IN, IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P
L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オークリー, ロバート・エイチ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 7 1 3 , ダーラム, ブレイデン・ドライヴ 7 0 3

(72)発明者 キャロン, マーク・ジー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 2 7 8 , ヒルズボロ, プレザント・グリーン・ロード 8
0 3

(72)発明者 ラポール, ステファン・エイ

カナダ国ケベック州エイチ 2 ヴィ・ 3 ヴィ 3 , ウトルモン, アヴニユ・デレペ 8 2 0

(72)発明者 ウィルバンクス, アリソン

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 1 6 , チャペル・ヒル, レイナード・ロード 8 1 0 1

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA40 CB01 DA13 DA36 FA11 FA16 FB03 FB05 FB07
FB08 FB12 GC15
4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA01 CA04 CA09 CA11 DA02 DA05
DA11 EA02 EA03 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA11 HA14
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ05 QQ13 QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42
QR55 QR59 QR62 QR80 QR82 QS05 QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C065 AA04 BB06 CC01 DD03 EE02 HH02 JJ01 KK02 KK05 LL01
PP09
4C084 AA17 NA14 ZA012 ZA022 ZA052 ZA082 ZA122 ZA152 ZA162 ZA332
ZA342 ZA362 ZA402 ZA422 ZA452 ZA592 ZA602 ZA662 ZA682 ZA702
ZA812 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB312 ZC022 ZC352
4C086 AA01 AA02 BC38 CB05 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA05
ZA08 ZA12 ZA15 ZA16 ZA33 ZA34 ZA36 ZA40 ZA42 ZA45
ZA59 ZA60 ZA66 ZA68 ZA70 ZA81 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
ZB31 ZC02 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	组成型脱敏G蛋白偶联受体		
公开(公告)号	JP2004524834A	公开(公告)日	2004-08-19
申请号	JP2002559554	申请日	2002-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	杜克盐湖城大学		
申请(专利权)人(译)	杜克盐湖城大学		
[标]发明人	バラックラリーエス オークリーロバートエイチ キャロンマークジー ラポールステファンエイ ウィルバンクスアリソン		
发明人	バラック,ラリー・エス オークリー,ロバート・エイチ キャロン,マーク・ジー ラポール,ステファン・エイ ウィルバンクス,アリソン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/41 A61K31/417 A61K31/437 A61K31/64 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/06 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/08 A61P43/00 C07D233/24 C07D471/04 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K31/41 A61K31/64 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/06 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/705 C07K14/723		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/417 A61K31/437 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/06 A61P27/16 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/08 A61P43/00.111 C07D233/24 C07D471/04.107.Z C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.P G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C065/AA04 4C065/BB06 4C065/CC01 4C065/DD03 4C065/EE02 4C065/HH02 4C065/JJ01 4C065/KK02 4C065/KK05 4C065/LL01 4C065/PP09 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA082 4C084/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA602 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA812 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZC022 4C084/ZC352 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC38 4C086/CB05 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01		

