

(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2004-500021
(P2004-500021A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(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	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/675	A 6 1 K 31/675	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7076	A 6 1 K 31/7076	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	4 C O 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 171 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-612458 (P2000-612458)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成12年4月21日 (2000. 4. 21)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成13年10月22日 (2001. 10. 22)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/010919		アメリカ合衆国、イリノイ・60064-
(87) 国際公開番号	W02000/063379		6050、アボット・パーク、アボット・
(87) 国際公開日	平成12年10月26日 (2000. 10. 26)		パーク・ロード・100、チャド・037
(31) 優先権主張番号	60/130, 339	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成11年4月21日 (1999. 4. 21)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, MX		弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100105131
			弁理士 井上 満
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P2X3受容体、P2X3受容体活性を変える方法およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、P2X₃受容体、P2X₃受容体の活性を調節する方法およびその方法の使用に関する。詳細にはそのような方法を用いて例えば、脱感作受容体の再感作速度を高めることができる。

hP2X3	1	MNCISDFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLL	33
rP2X3	1	MNCISDFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLL	33
hP2X3	34	IISYFVGWVFLHEKAYQVRDTAIESSVVTKVKG	66
rP2X3	34	IISYFVGWVFLHEKAYQVRDTAIESSVVTKVKG	66
hP2X3	67	SQLYANRVMVSDYVTPPGTISVVFVITKILVY	99
rP2X3	67	SQLYANRVMVSDYVTPPGTISVVFVITKILVY	99
hP2X3	100	ENQMGFCPEISEEKYRCVSDSQCGPERFPGGGI	132
rP2X3	100	ENQMGFCPEISEEKYRCVSDSQCGPERFPGGGI	132
hP2X3	133	LTGRCVNYSSVLR TCE IGGWCPTEVDTVEIPIM	165
rP2X3	133	LTGRCVNYSSVLR TCE IGGWCPTEVDTVEIPIM	165
hP2X3	166	MEAEENFTIFIKNSIRFPLFNFKEGNLLPNLTAR	198
rP2X3	166	MEAEENFTIFIKNSIRFPLFNFKEGNLLPNLTAR	198
hP2X3	199	DMKICRFHPKIDPFQPTLRVGDVVKFAGQDFAK	231
rP2X3	199	DMKICRFHPKIDPFQPTLRVGDVVKFAGQDFAK	231
hP2X3	232	LARTGGVVGKIGWVCDLDAWQDCIPKYSFTR	264
rP2X3	232	LARTGGVVGKIGWVCDLDAWQDCIPKYSFTR	264
hP2X3	265	LDVSEKSSVSPGYNFRF AKYYKMENGSEYRTL	297
rP2X3	265	LDVSEKSSVSPGYNFRF AKYYKMENGSEYRTL	297
hP2X3	298	LKAFGIRFDVLYVGNAGKFNIPITIISSVAAFT	330
rP2X3	298	LKAFGIRFDVLYVGNAGKFNIPITIISSVAAFT	330
hP2X3	331	SVGVGTVLCDIILLNFKGADHYKAKKFEVYNE	363
rP2X3	331	SVGVGTVLCDIILLNFKGADHYKAKKFEVYNE	363
hP2X3	364	ITLKIALLTNPVYPSDQITIAEKQSTDSGAFSIG	396
rP2X3	364	ITLKIALLTNPVYPSDQITIAEKQSTDSGAFSIG	396
hP2X3	397	H	397
rP2X3	397	H	397

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドまたは前記ヒト P 2 X₃ 受容体をコードする前記ポリヌクレオチドと少なくとも 90% 同一のヌクレオチド配列を有する受容体。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドがポリデオキシリボヌクレオチド (DNA) である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドがポリリボヌクレオチド (RNA) である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 4】

前記 DNA が配列番号 15 の配列を有する、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 または 4 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 6】

前記細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞および両生類細胞からなる群から選択される、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

前記細胞が両生類細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。 20

【請求項 8】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチドの転写を指示する 1 以上の制御配列に動作可能に連結された請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドがヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドをコードし、前記ポリペプチドが配列番号 16 のアミノ酸配列を有する、請求項 9 に記載の発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の発現ベクターを有する宿主細胞。 30

【請求項 12】

前記細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞および両生類細胞からなる群から選択される、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】

前記細胞が両生類細胞である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 10 に記載の発現ベクターを有する宿主細胞。

【請求項 16】

前記細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞および両生類細胞からなる群から選択される、請求項 15 に記載の宿主細胞。 40

【請求項 17】

前記細胞が両生類細胞である、請求項 16 に記載の宿主細胞。

【請求項 18】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 16 に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドの製造方法であって、
(a) 前記ポリペプチドの発現に十分な時間および条件下で請求項 11 に記載の宿主細胞を培養する段階；ならびに

(b) 前記ポリペプチドを回収する段階を有する方法。

【請求項 20】

ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドの製造方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に十分な時間および条件下で請求項 15 に記載の宿主細胞を培養する段階；ならびに

(b) 前記ポリペプチドを回収する段階を含む方法。

【請求項 21】

前記ポリペプチドが配列番号 16 のアミノ酸配列を有する精製ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチド。 10

【請求項 22】

P 2 X 受容体活性を調節する化合物の確認方法において、

(a) ヒト P 2 X₃ ポリペプチドを含む P 2 X 受容体を発現する細胞を提供する段階；

(b) 被験化合物を前記 P 2 X 受容体と混合する段階；ならびに

(c)

(i) 前記 P 2 X 受容体または前記 P 2 X 受容体を発現する細胞の活性化に対する前記被験化合物の効果；または

(ii) 前記細胞または前記 P 2 X 受容体への前記被験化合物の結合を測定する段階

を有することを特徴とする方法。 20

【請求項 23】

前記宿主細胞が細菌細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞および両生類細胞からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

段階 (c) (ii) の前記測定を、検出可能部分によって発生する信号を測定することで行う請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記検出可能部分が、蛍光標識、放射能標識、化学発光標識および酵素からなる群から選択される請求項 24 に記載の方法。 30

【請求項 26】

段階 (c) (i) の前記測定を、放射能標識イオン、発色試薬、蛍光プローブまたは電流によって生じる信号を測定することで行う、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記宿主細胞が両生類細胞である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドが配列番号 16 のアミノ酸配列を有する請求項 22 に記載の方法。 40

【請求項 30】

試験サンプル中における P 2 X₃ 受容体の標的ポリヌクレオチドの検出方法において、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドを、1 以上のヒト P 2 X₃ 受容体特異的ポリヌクレオチドプローブまたはその相補配列と接触させて標的 - プローブ複合体を形成する段階；ならびに

(b) 前記試験サンプル中の前記標的 - プローブ複合体の存在を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 31】

試験サンプル中におけるヒト P 2 X₃ 受容体 mRNA の cDNA の検出方法において、

(a) 逆転写を行って cDNA を形成する段階； 50

(b) 段階 (a) で得られた cDNA を増幅する段階 ; ならびに
 (c) 前記被験サンプル中の前記ヒト P2X₃ 受容体の存在を検出する段階
 を有することを特徴とする方法。

【請求項 32】

前記検出段階 (c) が、測定可能な信号を発生させることができる検出可能な部分を利用する段階を有する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

ヒト P2X₃ 受容体または該受容体の部分をコードし、ヒト P2X₃ 受容体ポリペプチドをコードする核酸に選択的にハイブリダイズすることができる単離ポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが配列番号 15 の配列または該配列の一部を有することを特徴とする単離ポリヌクレオチド。 10

【請求項 34】

前記ポリヌクレオチドが組換え法によって製造される請求項 33 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 35】

ヒト P2X₃ 受容体ポリヌクレオチドによってコードされる精製ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが配列番号 16 のアミノ酸配列または該配列の一部を有することを特徴とする精製ポリペプチド。

【請求項 36】

組換え法によって製造される請求項 35 に記載の精製ポリペプチド。 20

【請求項 37】

合成法によって製造される請求項 35 に記載の精製ポリペプチド。

【請求項 38】

配列番号 16 のアミノ酸配列または該配列の免疫反応性断片を有するヒト P2X₃ 受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 39】

試験サンプル中のヒト P2X₃ 受容体の検出方法であって、
 (a) 結果的に生じる複合体の形成に十分な時間および条件下に、ヒト P2X₃ 受容体に特異的に結合する抗体または該抗体の断片と前記試験サンプルを接触させる段階 ; ならびに 30

(b) 前記抗体を含む前記結果的に生じる複合体を検出する段階
 を有し ;

前記抗体が、配列番号 16 のアミノ酸配列または該配列の断片を有するヒト P2X₃ 受容体アミノ酸に特異的に結合することを特徴とする方法。

【請求項 40】

ヒト P2X₃ 受容体ポリペプチドまたは該ポリペプチドの変異体をコードする単離ポリヌクレオチドであって、前記受容体が P2X₃ であるポリヌクレオチド。

【請求項 41】

疼痛を緩和する治療方法であって、

(a) 疼痛を患う対象者を提供する段階 ; および 40

(b) 前記対象者に対して、有効量の P2X₃ 拮抗性化合物を投与する段階
 を有することを特徴とする治療方法。

【請求項 42】

前記拮抗性化合物が P2X₃ ヘテロ多量体チャンネルに対して有効である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

P2X₃ 受容体を活性化する作働薬の効果を増強する方法において、

a) トリアゼン染料とともに前記 P2X₃ 受容体を含む細胞をインキュベートする段階 ;
 b) 前記作働薬が前記 P2X₃ 受容体に結合する上で十分な時間および条件下に、前記インキュベートした細胞を前記作働薬に曝露する段階 50

を有し；段階（a）の前記トリアゼン染料が段階（b）の前記作働薬の前記効果を増強することを特徴とする方法。

【請求項44】

前記 P2X₃ 受容体が哺乳動物由来である、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記哺乳動物が齧歯類またはヒトである、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記トリアゼン染料が、シバクロンブルー、バシレンブルー、リアクティブブルー5およびリアクティブレッド2からなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項47】

前記トリアゼン染料がシバクロンブルーである請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記作働薬がアデノシン5'-三リン酸二ナトリウム(ATP)である、請求項43に記載の方法。

【請求項49】

P2X₃ 受容体上で非選択的P2受容体拮抗薬の阻害活性を遮断する方法であって、

a) P2X₃ 発現細胞をトリアゼン染料とともにインキュベートする段階；

b) 前記インキュベートした細胞を非選択的P2受容体拮抗薬に曝露する段階を有し；

段階（a）の前記トリアゼン染料が前記拮抗薬の前記阻害活性を遮断することを特徴とする方法。

【請求項50】

前記 P2X 受容体が哺乳動物由来である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記哺乳動物が齧歯類またはヒトである、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記拮抗薬がピリドキサル-5-ホスフェート-6-アゾフェニル-2',4'-ジスルホン酸(PPADS)である、請求項49に記載の方法。

【請求項53】

前記トリアゼン染料がシバクロンブルーである、請求項49に記載の方法。

【請求項54】

脱感作P2X₃ 受容体発現細胞のP2X₃ 受容体再感作速度を加速する方法であって、前記脱感作P2X₃ 受容体発現細胞をトリアゼン染料に曝露する段階を有し；前記トリアゼン染料が前記脱感作P2X₃ 受容体発現細胞のP2X₃ 受容体の前記再感作速度を加速することを特徴とする方法。

【請求項55】

前記 P2X₃ 受容体が哺乳動物由来である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記哺乳動物が齧歯類またはヒトである、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記トリアゼン染料がシバクロンブルーである、請求項54に記載の方法。

【請求項58】

哺乳動物で抗侵害受容効果を誘発する方法であって、そのような抗侵害受容効果を必要とする患者に対して、その抗侵害受容効果を果すのに十分な量でP2X受容体拮抗薬を投与する段階を含む方法。

【請求項59】

前記哺乳動物がヒトまたはラットである、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

前記 P2X 受容体拮抗薬が P2X₃ 含有受容体に対する抗侵害受容効果を誘発する、請求項58に記載の方法。

【請求項61】

10

20

30

40

50

前記 P₂X₃ 含有受容体が P₂X₃ である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記拮抗薬が 2', 3' - O - (2, 4, 6 - トリニトロフェニル) - ATP (TNP - ATP) である請求項 58 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は P₂X₃ 受容体、P₂X₃ 受容体の活性を変える方法およびこれらの方法の使用に関する。特に、このような方法はたとえば受容体が脱感作されている場合に、受容体の再感作速度を加速するのに用いることができる。さらに本発明は、哺乳動物における痛みの感覚を最小限にするために、受容体拮抗薬、特に P₂X₃ 受容体拮抗薬を使用することも含む。

10

【0002】

(背景情報)

P₂X₃ 受容体は、ホモ多量体カチオン透過性イオンチャンネルとして、場合によっては、2つの異なる P₂X 受容体サブタイプからなるヘテロマーチャンネルとして機能する (Lewis 他、Nature 377: 432 - 435 (1995); Le 他、J. Neurosci. 18: 7152 - 7159 (1998); Torres 他、Mol. Pharmacol. 54: 989 - 993 (1998))。1対以上の P₂X 受容体サブタイプ、P₂X₂ および P₂X₃ は、ラット節状神経節ニューロンにおけるヘテロマーチャンネルとして機能し、そこで独特の薬理的および電気生理的特性を示す (Lewis 他、同上 (1995))。

20

【0003】

個々の受容体に関して、ラット P₂X₂ 受容体は脊髄、節状および後根神経節にて発現されるが (Brake 他、Nature 371: 519 - 523 (1994))、ラット P₂X₃ 受容体の発現は主に、感覚神経節のニューロンのサブセットに見られる (Chen 他、Nature 377: 428 - 430 (1995); Vulchanova 他、Neuropharmacol. 36: 1229 - 1242 (1997))。両方の受容体の分布は、痛みの伝達における役割と一致している。P₂X₂ および P₂X₃ 受容体サブユニットは、単独で発現された場合に機能性チャンネルを形成し、共発現時に生来の感覚チャンネルに見られる電流に似た特性を持つ、機能性ヘテロ多量体チャンネルも形成できる (Lewis 他、Nature 377: 432 - 435 (1995))。ラット節状神経節の研究による証拠は、P₂X₂ / P₂X₃ ヘテロマーチャンネルと P₂X₂ ホモマーチャンネルの両方が ATP が誘発した電流の原因となることを示している (Virginio 他、J. Physiol. (Lond) 510: 27 - 35 (1998); Thomas 他、J. Physiol. (Lond) 509 (Pt 2): 411 - 417 (1998); Vulchanova 他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8063 - 8067 (1996); Simon 他、Mol. Pharmacol. 52: 237 - 248 (1997))。

30

【0004】

P₂X₂、P₂X₃ および P₂X₂ / P₂X₃ 受容体を活性化する ATP は、脊髄後角および感覚神経節の主要な求心神経において興奮性神経伝達物質として機能する (Holton 他、J. Physiol. (Lond) 126: 124 - 140 (1954))。ATP 誘発による P₂X 受容体の、脊髄中の後根神経節神経末端に対する活性化は、侵害信号に関する主要な神経伝達物質であるグルタミン酸塩の放出を刺激する (Gu 他、Nature 389: 749 - 753 (1997))。したがって、損傷細胞から放出される ATP は、感覚神経の侵害神経末端上の P₂X₂、P₂X₃、P₂X₂ / P₂X₃ 受容体を活性化することによって痛みを誘起することがある。このことは、ヒト疱疹ベースモデルにおける ATP の皮内投与による痛みの誘発 (Bleehen、Br. J. Pharmacol. 62: 573 - 577 (1987))、歯髄中の侵害ニューロン上での

40

50

P₂X₃ 受容体の同定 (Cook 他、Nature 387:505-508 (1997))、P₂X 受容体拮抗薬が動物モデルにおいて鎮痛性であるとの報告 (Driesssen 他、Naunyn-Schmiedergs Arch. Pharmacol. 350:618-625 (1994)) に一致している。この証拠は、P₂X₂ および P₂X₃ が侵害受容体において機能し、これらのヒト P₂X 受容体の活性調節因子が鎮痛剤として有用であることを示唆している。

【0005】

アントラキノンスルホン酸誘導体であるシバクロンブルー [すなわち反応性ブルー - 2 ; 2 - アントラセンスルホン酸、1 - アミノ - 4 - [[4 - [[4 - クロロ - 6 - [(2 - スルホフェニル) アミノ] - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル] アミノ] - 3 - スルホフェニル] アミノ] - 9 , 10 - ジヒドロ - 9 , 10 - ジヒドロ - 9 , 10 - ジオキソ -] は、ATP 媒介信号伝達および P₂X ならびに P₂Y 受容体活性化の阻害剤として、十分に文書で実証されている (Ralevic 他、Pharmacological Reviews 50:413-492 (1998))。シバオロンブルーは、ラット膀胱平滑筋収縮 (Hashimoto 他、Br. J. Pharmacol. 115:636-640 (1995))、ラット盲腸抑制接合ポテンシャル (Manzini 他、Eur. J. Pharmacol. 127:197-204 (1986))、ラット単離歯槽タイプ II 細胞からのリン脂質分泌 (Rice 他、Br. J. Pharmacol. 97:1258-162 (1989))、ラット耳下腺腺房細胞中のカルシウム流入 (Soltoff 他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 165:1279-1285 (1989)) を含む、複数の多様な ATP 媒介生理反応の拮抗薬として作用する。シバクロンブルーも、P₂ 受容体駆動の内向き流および PC12 細胞におけるカルシウム流入の拮抗薬として機能する (Nakazawa 他、Pflugers Arch 418:214-219 (1981); Michel 他、Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 354:562-571 (1996); Surprenant, A., Ciba Found Symp. 198:208-219 (1996))、ゼノプス卵母細胞におけるヌクレオチド外部活性の抑制剤 (Ziganshin 他、Biochem. Pharmacol. 51:897-901 (1996)) の両方として機能する。組換えラット P₂X₁ および P₂X₂ ヌクレオチド受容体も、シバクロンブルーによる阻害に感受性である (Surprenant, A., Chiba Found. Symp. 198:208-219 (1996))。

【0006】

シバクロンブルーの P₂X 受容体機能に対する影響は主に阻害性であるが、ある報告は、P₂X₄ 受容体での増強活性について述べている (Miller 他、Neuropharmacology 37:1579-1586 (1988))。ラット P₂X₄ 受容体を発現する HEK293 細胞において、シバクロンブルーによる前処理は、最大反応に影響を与えずに、ATP の効力を 4 倍増大した (Miller 他、同上 (1998))。

【0007】

外因的に投与した ATP および P₂X 受容体拮抗薬の侵害効果は、実験動物でも証明されている (Bland-Ward 他、Br. J. Pharmacol. 122:366-371 (1997); Hamilton 他、Br. J. Pharmacol. 126:326-332 (1999))。損傷感覚求心神経に局在化している、選択的 P₂ 受容体に仲介された異所性ニューロン興奮性の増加も、慢性的な収縮神経損傷後のラットで最近報告された (Chen 他、Neuroreport 10:2779-2782 (1999))。P₂X 受容体活性化の末梢性侵害作用に加えて、脊髄 P₂X 受容体の刺激も、くも膜下 (i.t.) 投与された P₂ 受容体拮抗薬がげっ歯類において急性および持続性侵害性刺激に対する感度を上昇させる能力によって示されるように、痛覚の原因となる場合がある (Driesssen 他、Brain Res. 666:182-188 (1994); Tsuda 他、Br. J. Pharmacol. 127:449-456 (1999); Tsuda 他、Br. J. Pharmacol. 128:1497-15

04(1999)。

【0008】

哺乳類の生理機能における個々のP2受容体サブタイプの役割を評価する、入手可能なプリン性リガンドの効用は、酵素分解を受けるP2受容体拮抗薬の感受性と、P2受容体サブタイプ-選択性作働薬および拮抗薬の不足により複雑になっている(King他、Trends in Pharmacol. Sci. 19:506-514(1998); Ralevic他、Pharmacol. Rev. 50:413-492(1998))。しかし、組換哺乳類P2受容体サブタイプが最近入手できるようになって、特異性P2受容体サブタイプの薬理学の体系的なキャラクタリゼーションが行えるようになり(King他、同上(1998); Bianchi他、Europ. J. Pharmacol. 376:127-138(1999))、P2X受容体で作用するリガンドの薬理的選択性がさらに明らかになった。たとえば、マウスへのi.t.投与後に抗侵害作用を持つ蛍光ATP類似体、2',3'-O-(2,4,6-トリニトロフェニル)-ATP(TNP-ATP)は(Tsuda他、Br. J. Pharmacol. 127:449-456(1999); Tsuda他、Br. J. Pharmacol. 128:1497-1504(1999))、組換ラットP2X₁、P2X₃およびP2X₂/3受容体における強力なナノモル拮抗薬であることがわかっている(Lewis他、Br. J. Pharmacol. 124:1463-1466(1998); Thomas他、J. Physiol. 5092:411-417(1998))。

10

【0009】

個々のP2受容体のサブタイプ-選択性リガンドはまだ同定されていないため、侵害信号の伝達に關与する特異性P2X受容体サブタイプを解明しようとする努力は、多くが免疫組織化学手法を用いた、受容体の局在化および機能研究に基づくものである。これらの研究によって、ホモマーP2X₃およびヘテロマーP2X₂/3受容体サブタイプの両方は、直径の小さい感覚神経の中樞および末梢末端に選択的に局在化されることが示されている(Chen他、Nature 377:428-431(1995); Lewis他、Nature 377:432-435(1995); Vulchanova他、Neuropharmacol. 36:1229-1242(1997); Vulchanova他、Neuropharmacol. 36:1229-1242(1997); Vulchanova他、Euro. J. Neurosci. 10:3470-3478(1998))。さらに最近のデータは、P2X₃特異性免疫反応性が、ラット坐骨神経の慢性収縮損傷後に損傷した後根神経節および同側の脊髄後角の両方において著しく増加することを示している(Novakovic他、Pain 80:273-282(1999))。

20

30

【0010】

総合すれば、受容体を含む(P2X₃および/またはP2X₂/3)P2X₃の感覚神経への機能的および免疫組織化学的局在化は、これらのP2X受容体が外因性ATPの侵害性の影響を仲介するのに主要な役割を果たすことを示している。したがって、P2X₃受容体の活性化を阻害または抑制する化合物は、痛み刺激を阻害する。通常P2X₃受容体および/またはP2X₂/P2X₃ヘテロマーチャンネルを活性化するATPなどの化合物に対する受容体拮抗薬は、痛みの伝達をうまく阻害することができる。

40

【0011】

上記を考慮すると、P2X受容体、たとえばP2X₃を調節または制御する能力を与える方法が確実に必要とされている。このような受容体の制御によって、そのような治療が必要な患者の痛みを最小限に押さえる能力が与えられる。

【0012】

本明細書において上記または以下で引用するすべての米国特許、米国特許出願および出版物は、引用することによってその全体が本明細書に含まれている。

【0013】

(発明の開示)

50

本発明は、ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドまたはヒト P 2 X₃ 受容体をコード化する前記ポリヌクレオチド配列に 90% 以上同一のヌクレオチド配列を含むレセプターをコード化する単離されたポリヌクレオチドを含む。ポリヌクレオチドはポリデオキシリボヌクレオチド (DNA) またはポリリボヌクレオチド (RNA) でもよい。さらに詳細には、DNA は配列番号 15 によって表される配列を含むことがある。

【0014】

本発明は、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞も含む。宿主細胞はたとえば、細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞または両生類細胞でもよい。

【0015】

加えて本発明は、上述したような、ポリヌクレオチドの転写を指示する 1 個以上の制御配列に、動作可能に結合されたポリヌクレオチドより成る発現ベクターを含む。該ポリヌクレオチドによりコード化されたポリペプチドは、配列番号 16 のアミノ酸配列を含むヒト P 2 X₃ でもよい。本発明は、この発現ベクターを含む宿主細胞も含む。

10

【0016】

さらに本発明は、受容体ポリペプチドであるヒト P 2 X₃ を生成する方法を含み、該方法は (a) 上述した宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に十分な時間と条件によって培養するステップと; (b) 前記ポリペプチドを回収するステップより成る。

【0017】

本発明は、受容体ポリペプチドである精製されたヒト P 2 X₃ も含み、ここでポリペプチドは配列番号 16 のアミノ酸配列を含む。

20

【0018】

本発明はその上、P 2 X 受容体活性を調節する化合物を同定する方法を含み、該方法は (a) ヒト P 2 X₃ ポリペプチドを含む P 2 X 受容体を発現する宿主細胞を提供するステップと; (b) 試験化合物を P 2 X 受容体と混合するステップと; (c) (i) P 2 X 受容体または P 2 X 受容体を発現する細胞の活性化に対する試験化合物の影響または (ii) 細胞または P 2 X 受容体の試験化合物に対する結合のどちらかを測定するステップより成る。細胞は上述したとおりである。ステップ (c) (ii) の測定は、検出可能部分によって発生した信号を測定して行う。検出可能部分はたとえば、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識および酵素より成る群から選択される。ステップ (c) (i) の測定は、放射性標識イオン、色素形成試薬、蛍光プローブまたは電流によって発生する信号を測定して行う。該方法において、ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドは、配列番号 16 のアミノ酸配列を含むことがある。

30

【0019】

本発明はさらに、試験サンプル中の P 2 X₃ 受容体の標的ポリヌクレオチドを検出する方法も含み、該方法は (a) 標的 - プローブ錯体を作成するために、標的ポリヌクレオチドを 1 個以上のヒト P 2 X₃ 受容体特異性ポリヌクレオチドプローブまたはその補体に接触させるステップと; (b) 試験サンプル中の標的 - プローブ錯体の存在を検出するステップより成る。

【0020】

加えて、本発明は、試験サンプル中のヒト P 2 X₃ 受容体 mRNA の cDNA を検出する方法を含み、該方法は (a) cDNA を精製するために逆転写を行うステップと; (b) ステップ (a) で得られた cDNA を増幅するステップと; (c) 試験サンプル中のヒト P 2 X₃ 受容体の存在を検出するステップより成る。この方法では、検出ステップ (c) は、測定可能な信号を生成可能な検出可能部分を利用することを含む。

40

【0021】

本発明は、ヒト P 2 X₃ 受容体またはその一部をコード化し、ヒト P 2 X₃ 受容体ポリペプチドをコード化する核酸に選択的にハイブリダイズできる単離されたポリヌクレオチドも含み、前記ポリヌクレオチドは配列番号 15 の配列またはその一部を含む。ポリヌクレオチドは、組換または合成手法によって生成できる。

【0022】

50

本発明は、ヒト P2X₃ 受容体ポリヌクレオチドによってコード化された精製ポリペプチドも含み、前記ポリペプチドは配列番号 16 のアミノ酸配列またはその一部を含む。ポリヌクレオチドは、組換えまたは合成手法によって生成できる。

【0023】

また本発明は、配列番号 16 のアミノ酸配列またはその免疫反応性フラグメントを含む、ヒト P2X₃ 受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体も含む。

【0024】

本発明は試験サンプル中のヒト P2X₃ 受容体を検出する方法を含むことにも注目する必要がある、該方法は試験サンプルをヒト P2X₃ 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントに、結果として生じる錯体の形成に十分な時間および条件によって接触させるステップと；(b) 抗体を含む結果として生じた錯体を検出するステップであって、配列番号 16 のアミノ酸またはそのフラグメントを含むヒト P2X₃ 受容体アミノ酸に抗体が特異的に結合するステップより成る。

10

【0025】

本発明は加えて、ヒト P2X 受容体ポリペプチドまたはその変種をコード化する単離ポリヌクレオチドを含み、該受容体は P2X₃ である。

【0026】

本発明は、(a) 痛みに苦しむ患者を示すステップと；(b) 該患者に有効量の P2X₃ 拮抗化合物を投与するステップより成る、痛みを軽減するための治療方法も含む。該拮抗化合物は P2X₃ ヘテロマルチマーチャンネルに対して有効である。

20

【0027】

さらに本発明は P2X₃ 受容体を活性化する作働薬の効果を増強する方法も含み、該方法は (a) 前記 P2X₃ 受容体を含む細胞をトリアゼン染料を用いてインキュベートするステップと；(b) 作働薬が P2X₃ 受容体に結合するのに十分な時間と条件によって、インキュベートした細胞を作働薬に曝露するステップより成り、ステップ (a) のトリアゼン染料がステップ (b) の作働薬の効果を強化する。受容体は、ヒトまたはげっ歯類などの哺乳類に由来することがある。トリアゼン染料は、たとえばシバクロンブルー、バシレンブルー、反応性ブルー 5 および反応性レッド 2 より成る群から選択される。作働薬はたとえば、アデノシン 5'-三リン酸二ナトリウムでもよい。

【0028】

本発明は、(a) P2X₃ 発現細胞をトリアゼン染料を用いてインキュベートするステップと；(b) インキュベートした細胞を非選択的 P2 受容体拮抗薬に曝露するステップより成る、P2X₃ 受容体に対する非選択的 P2 受容体拮抗薬の抑制活性を阻害する方法も含み、ここでステップ (a) のトリアゼン染料が拮抗薬の抑制活性を阻害する。P2X 受容体は、げっ歯類やヒトなどの哺乳類から由来することがある。拮抗薬はピリドキサル - 1 - 5 - リン酸 - 6 - アゾフェニル - 2', 4' - ジスルホン酸 (PPADS) でもよい。トリアゼン染料はシバクロンブルーまたは上述の他のトリアゼン染料の 1 つでもよい。

30

【0029】

本発明はさらに、脱感作された P2X₃ 受容体発現細胞をトリアゼン染料に曝露することより成る、脱感作された P2X₃ 受容体発現細胞の P2X₃ 受容体の再感作速度を加速する方法も含み、ここでトリアゼン染料は前記脱感作された P2X₃ 受容体発現細胞の P2X₃ 受容体の前記再感作速度を加速する。P2X₃ 受容体は再度、ヒトやげっ歯類などの哺乳類より由来することがある。トリアゼン染料はシバクロンブルーまたは上述の他のトリアゼン染料の 1 つでもよい。

40

【0030】

哺乳類において抗侵害効果を誘発する方法であって、P2X 受容体拮抗薬をそのような抗侵害効果を必要とする患者に、抗侵害効果を起こすのに十分な量の P2X 受容体を投与するステップより成る方法。ここでも、哺乳類はヒトでもラットでもよい。P2X₃ 受容体拮抗薬は、P2X₃ 含有受容体に対する抗侵害効果を誘発する。受容体はたとえば、P2

50

X₃でもよい。拮抗薬はたとえば、2', 3'-O-(2, 4, 6-トリニトロフェニル)-ATP (TNP-ATP)でもよい。

【0031】

(図面の簡単な説明)

図1は、実施例2のP2X₃ 5' RACE生成物の配列(配列番号13)を表しており、プライマー配列は下線を付け、予測された開始コドン(ATG)はボールド体で示す。

【0032】

図2は、実施例3のP2X₃ 3' RACE生成物の配列(配列番号14)を表しており、プライマー配列は下線を付け、予測された終止コドン(TAG)はボールド体で示す。

【0033】

図3は、ヒトP2X₃受容体ポリペプチドをコードするcDNAの完全読取枠の配列(配列番号15)を表す。開始(ATG)および終止(TAG)コドンはボールド体で示す；プラスミド構成時に導入された、EcoRI(GAATTC)およびNotI(GCGCCGC)を含む5'および3'フランキング配列は下線を付けてある。

【0034】

図4は、ヒト(hP2X₃) (配列番号16)およびラット(rP2X₃) (配列番号17)受容体ポリペプチドの整列させた予測アミノ酸配列を表す。同一残基は囲みで示してある。

【0035】

図5は、ATP刺激を受けたヒトP2X₃受容体に仲介されたカルシウム流入に対する、シバクロンブルーの増強効果を示す。A, Ca²⁺インジケータFluo-4を装填した1321-P2X₃細胞は、シバクロンブルーの存在時(実線)および不在時(点線)に、ATPを用いて処理した。相対的な蛍光は、シバクロンブルーの不在時に得られた最大反応のパーセントとして示してある。B, hP2X₃受容体を発現するアフリカツメガエル卵母細胞は、シバクロンブルーの不在時(大きい電流)および存在時(小さい電流)に、ATPを用いて攻撃した。ATPの添加は水平棒で表す。

【0036】

図6は、シバクロンブルー(CB)が、ATPに誘発されたhP2X₃受容体活性化の作用強度を濃度依存的に著しく上昇させることを示す。ATP濃度効果曲線は、1321N1-hp2X3細胞において、Fluo-4蛍光で決定されるCa²⁺流入を測定することによって、シバクロンブルーの不在時または存在時に決定した：黒四角, シバクロンブルーなし(ATP EC₅₀ = 356 ± 47 nM, E_{max} = 102 ± 3%)；黒三角, 1 μMシバクロンブルー(ATP EC₅₀ = 64 ± 7 nM*, E_{max} = 267 ± 6%*)；黒逆三角, 3 μMシバクロンブルー(ATP EC₅₀ = 46 ± 8 nM*, E_{max} = 330 ± 5%*)；黒菱形, 10 μMシバクロンブルー(ATP EC₅₀ = 60 ± 12 nM*, E_{max} = 345 ± 6%*)。データは、10 μM ATPに対する最大反応のパーセントとして示し、3つの実験の平均(±sem)である(pEC₅₀値に基づく統計解析；対照に比較した場合、*P < 0.05)。

【0037】

図7は、シバクロンブルーがhP2X₃受容体の活性化を増強する効力が、プロトタイプP2X₃作働薬と同様であることを示している。シバクロンブルー濃度効果曲線は、1321N1-hp2X3細胞において、Fluo-4蛍光で決定されるCa²⁺流入を測定することによって、4種類のプロトタイプP2X₃受容体作働薬それぞれについて決定した。完全な増強作用を仲介するのに必要なシバクロンブルーの半最大濃度は以下のとおりであった：黒逆三角, 10 μM ATP(シバクロンブルーEC₅₀ = 1.4 ± 0.5 μM, E_{max} = 504 ± 15%)；黒三角, 10 μM 2-meSATP(シバクロンブルーEC₅₀ = 1.4 ± 0.2 μM, E_{max} = 555 ± 18%)；黒四角, 10 μM BzATP(シバクロンブルーEC₅₀ = 0.9 ± 0.1 μM, E_{max} = 562 ± 12%)；黒菱形, 10 μM -meATP(シバクロンブルーEC₅₀ = 1.4 ± 0.2 μM, E_{max} = 537 ± 14%)。データは、10 μM ATPに対する最大反応

10

20

30

40

50

のパーセントとして示し、3つの実験の平均 (\pm s e m) である。濃度効果曲線は、G r a p h P a d P r i s m の 4 パラメータのロジスティック式を用いて適合させた。

【0038】

図8は、各種トリアゼン染料を用いた h P 2 X₃ 受容体活性の増強作用を示す。構造的に関連した4種類のトリアゼン染料の濃度効果曲線は、1321N1-hp2X₃細胞におけるATP活性化Ca²⁺流入を測定して決定した：黒四角，レッド2 (E C₅₀ = 55 ± 10 μM、E_{m a x} = 600%、固定パラメータ)；黒菱形，バシレンブルー (E C₅₀ = 1.2 ± 0.6 μM、E_{m a x} = 373 ± 17%*)；黒三角，ブルー5 (E C₅₀ = 1.4 ± 0.5 μM、E_{m a x} = 534 ± 14%)；黒逆三角，シバクロンブルー (E C₅₀ = 1.2 ± 0.2 μM、E_{m a x} = 566 ± 17%)。データは、10 μM A T P に対する最大反応のパーセントとして示し、3つの実験の平均 (\pm s e m) である p E C₅₀ 値に基づく統計解析；対照に比較した場合、* P < 0.05)。

【0039】

図9は、シバクロンブルーが P P A D S の抑制活性を阻害することを示す。A, P P A D S によるATP活性化hP2X₃受容体活性の抑制に関する濃度効果曲線は、シバクロンブルーの存在時と不在時に決定した。P P A D S およびシバクロンブルーは、3 μM のATPを添加する前に、同時に加えた：黒四角，シバクロンブルーなし (P P A D S I C₅₀ = 8.6 ± 3 μM、E_{m a x} = 101 ± 4%)；黒丸，1 μM シバクロンブルー (P P A D S I C₅₀ = 14 ± 3 μM、E_{m a x} = 280 ± 6%*)；黒菱形，10 μM シバクロンブルー (P P A D S I C₅₀ = 51 ± 4 μM*、E_{m a x} = 437 ± 6%*)；黒三角，100 μM シバクロンブルー (P P A D S I C₅₀ = 220 ± 186 μM*、E_{m a x} = 488 ± 9%*)。挿入、データはシバクロンブルーの各濃度で見られる最大信号に正規化されている。B, 3 μM A T P によって活性化されたhP2X₃反応のシバクロンブルーによる増強作用の濃度効果曲線は、P P A D S の存在時と不在時に決定した：黒四角，P P A D S なし (シバクロンブルー E C₅₀ = 3.8 ± 3 μM、E_{m a x} = 738 ± 22%)；黒三角，5 μM P P A D S (シバクロンブルー E C₅₀ = 4.5 ± 0.3 μM、E_{m a x} = 682 ± 15%)；黒逆三角，10 μM P P A D S (シバクロンブルー E C₅₀ = 7.5 ± 0.2 μM*、E_{m a x} = 730 ± 7%)；黒菱形，50 μM P P A D S (シバクロンブルー E C₅₀ = 15 ± 1.4 μM*、E_{m a x} = 653 ± 10%)。データは、3 μM A T P に対する最大反応のパーセントとして示し、3つの実験の平均 (\pm s e m) である p E C₅₀ 値に基づく統計解析；対照に比較した場合、* P < 0.05)。

【0040】

図10は、シバクロンブルーが、h P 2 X₃ 受容体の脱感作からの回復速度を著しく上昇させることを示している。シバクロンブルーの濃度効果曲線は、非脱感作および急速脱感作1321-hp2X₃細胞にて決定した：黒四角，非脱感作 (シバクロンブルー E C₅₀ = 3.8 ± 3 μM、E_{m a x} = 738 ± 22%)；黒丸，脱感作 (シバクロンブルー E C₅₀ = 6.4 ± 0.4 μM*、E_{m a x} = 302 ± 5%)；データは、3 μM A T P に対する最大反応のパーセントとして示し、3つの実験の平均 (\pm s e m) である p E C₅₀ 値に基づく統計解析；対照に比較した場合、* P < 0.05)。

【0041】

図11は、シバクロンブルーが、h P 2 X₃ 受容体の迅速な脱感作からの回復速度を著しく上昇させることを示している。A, 1321-hp2X₃細胞は、ATPまたはD-PBSを用いて前処理し(対照曲線)、過剰な細胞外ATPを除去するために2回洗浄し、各種濃度のATPで再攻撃する前に、表示した時間だけインキュベートした。対照曲線(点線)は、偽脱感作した(D-PBS処理)細胞に対するATPの濃度効果を示す。B, 1321-hp2X₃西郷は、ATPを用いて前処理し、過剰な細胞外ATPを除去するために2回洗浄し、各種濃度のATPで再攻撃する前に、表示した時間だけインキュベートした。対照曲線(点線)は、50 μMシバクロンブルーで前処理された、偽脱感作した(D-PBS処理)細胞に対するATPの濃度効果を示す。C, 受容体回復速度を時間に

対する非脱感作反応の%の関数として示す。曲線は $\% \text{control} = \max(1 - \exp(-k * \text{time}))$ の解であり、 $\% \text{control}$ は非脱感作受容体に比較した受容体活性のパーセンテージであり、 \max は61.5分で見られた $\% \text{control}$ 活性であり、 time は分による時間であり、 k は時間定数である。 $t_{1/2}$ (受容体再感作の時間の半分)は、 $\ln(0.5) / -K$ として計算した。

【0042】

図12は、ラットにおける皮内BzATPの急性侵害効果の時間経過を示す。

【0043】

図13は、ラット後足への皮内投与後の、P2X受容体拮抗薬の急性侵害効果の用量-反応の測定値を示す(用量グループ当たり $n=6$)。値は、注射15分後に発生した累積性侵害的な足のフリンチング(flinching)反応の $+/-S.E.M.$ を表す。ビヒクル処理ラットに比較した場合、 $*P < 0.05$ 。 10

【0044】

図14は、rP2X₃受容体を発現する1321N1細胞での10 μ M BzATP刺激によるカルシウム流入を抑制するための、TNP-ATP(黒菱形, IC₅₀ = 40 nM)、TNP-ADP(黒四角, IC₅₀ = 120 nM)およびTNP-AMP(黒三角, IC₅₀ = 3,000 nM)の濃度効果の測定値を示す。RFU = 相対蛍光単位。値は3種類の独立した実験による平均の $\pm S.E.M.$ を示す。

【0045】

図15は、TNP-ATP($F(3, 20) = 8.20, P < 0.05$)とBzATP(1000 nmol/足)との皮内同時投与の効果は、ラットの急性侵害的な足のフリンチングを濃度依存的に減弱するが、TNP-AMP($F(3, 20) = 0.30, P > 0.05$)ではそのような減弱が認められないことを示している(用量グループ当たり $n=6$)。値は、注射15分後に発生した累積性侵害的な足のフリンチング反応の $+/-S.E.M.$ を表す。ビヒクル処理ラットに比較した場合、 $*P < 0.05$ 。 20

【0046】

図16は、TNP-ATP(黒色棒)と5%ホルマリンとの皮内同時投与の効果は、ラットの急性侵害的な足のフリンチングを減弱したが、TNP-AMP(灰色棒)ではそのような減弱が認められないことを示している(用量グループ当たり $n=6$)。フェーズIは、皮内投与すぐの15分後に発生した急性の累積性侵害的反応を示す($F(2, 27) = 5.15, P < 0.05$)。フェーズIIは、ホルマリン注射の30分後からの20分間について記録した、累積性侵害的反応を示す($F(2, 27) = 6.97, P < 0.05$)。値は平均 $\pm S.E.M.$ を示し、ビヒクル処理ラットに比較した場合、 $*P < 0.05$ 。 30

【0047】

図17は、ラットのP2X₃およびP2X_{2/3}受容体の作働薬活性化に対するシバクロンブルーの効果の測定値を示す。(左パネル)BzATP(1 μ M)および, -me ATP(10 μ M)の活性化を向上させるための、シバクロンブルーの代表的な濃度効果曲線(IC₅₀ = 2 μ M)。(右パネル)ラットP2X_{2/3}受容体のBzATP(1 μ M)および, -me ATP(10 μ M)の活性化を向上させるための、シバクロンブルーの代表的な濃度効果曲線。RFU = 相対蛍光単位。 40

【0048】

図18は、ラットの後足へのBzATPおよびシバクロンブルーの皮内同時投与の侵害効果を示す($F(16, 352) = 7.30, P < 0.05$)。ビヒクル反応は、生理的食塩水(白四角)または生理的食塩水とBzATPの同時投与(黒丸)の、急性(注射15分後の累積性反応)の足フリンチング挙動を示している。シバクロンブルー単独の侵害効果は、白四角と点線によって示されている。シバクロンブルーとBzATPの同時投与の効果は、黒丸と実線によって示されている。値は、3つの独立した実験による平均 $\pm S.E.M.$ を表し(用量グループ当たり $n=6$)、BzATP単独の侵害効果と比較した場合、 $*P < 0.05$ 、シバクロンブルー単独の侵害効果と比較した場合、 $+P < 0.05$ 50

。

【0049】

図19は、シバクロンブルーがラットホルマリン試験のフェーズIおよびフェーズIIの両方で侵害性の足フリンチングを増大させることを示している。シバクロンブルー（30および100nmol/足）は、ラット後足にホルマリン（1-5%）とともに皮内に同時投与された。フェーズIの侵害反応は、投与後の15分間について記録した。フェーズIIの侵害反応は、投与30分後からの20分間について記録した。ホルマリン単独の皮内投与用量の増加によって、ビヒクルの注射に比べて侵害反応が著しく上昇する（*P<0.05）。黒い棒は、ホルマリンまたはビヒクル単独の侵害反応を示す。灰色の棒は、ホルマリンまたはビヒクルが存在する場合のシバクロンブルー（30nmol/足）の侵害反応を示す。斜線の棒は、ホルマリンまたはビヒクルが存在する場合のシバクロンブルー（100nmol/足）の侵害反応を示す。値は、平均±S.E.Mを表し（用量グループ当たりn=6）、ホルマリン単独と比較した場合、*P<0.05（各ホルマリン用量でのビヒクル反応）、ビヒクル単独と比較した場合、+P<0.05。

10

【0050】

（発明の詳細な説明）

主題発明は、P2X₃受容体、この受容体の核酸配列、受容体のアミノ酸配列、この受容体の生成方法および各種化学薬品（たとえばシバクロンブルーおよび/またはTNP-ATP）の使用によるP2X₃受容体の活性の変更方法に関する。受容体を外部的に調節する機能によってたとえば、外傷事故などの後、末期疾患時、手術時、手術後、あるいは患者の痛みを医療提供者が管理しなければならないすべての状況において、痛みなどの感覚を制御することができる。

20

【0051】

特に本発明は、受容体の活性を調節する化合物を識別するために、プリン受容体に対する特異的結合について複数の化合物をスクリーニングする方法を提供する。該方法は（a）ヒト（または他の哺乳類）のプリン受容体ポリペプチドコード化配列を発現する細胞を提供することと、（b）試験化合物を細胞と混合することと、（c）プリン受容体またはプリン受容体を発現する細胞の活性化に対する試験化合物の効果を測定すること、を含む。

【0052】

さらに、本発明は試験サンプル中の作働薬または拮抗薬の量を決定する方法を提供する。該方法は（a）ヒト（または他の哺乳類）のプリン受容体ポリペプチドコード化配列を発現する細胞を提供することと、（b）試験化合物を細胞と混合することと、（c）プリン受容体またはプリン受容体を発現する細胞の活性化に対する試験化合物の効果を測定すること、を含む。

30

【0053】

本発明は、興味のあるプリン受容体をコード化する宿主細胞も含む。宿主細胞は、本発明によって含まれるベクターによって遺伝子組換えされており、クローニングベクターまたは発現ベクターでもよい。該ベクターは、動作可能に結合されたプリン受容体をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、その発現を制御する配列を制御する。宿主細胞はプリン受容体を発現するために、安定に形質移入されることが好ましい。宿主細胞は、すでに外因性プリン受容体発現が欠乏していない場合は、そのように組換えられたプリン受容体ヌル細胞であることがさらに好ましい。

40

【0054】

本発明の常法は、別途示さない限り、当業界の技術の範囲内の分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、電気生理学、薬理学の従来技法を採用する。このような技法は文献で十分に説明されている。たとえば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Vols. I and II (D. N. Glover編 1985); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloni

50

ng (1984); Methods In Enzymology シリーズ (S. Colowick and N. Kaplan 編 Academic Press, Inc); Transcription and Translation (Ham es̄、編); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller̄、編 (1987) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (2nd ed., Springer-Verlag); and PCR: A Practical Approach (McPherson̄、編 (1991) IRL Press) を参照すること。 10

【0055】

本明細書および添付請求項で使用されているように、内容が明らかに別のことを示していない限り、単数形の「a」、「an」および「the」は複数の言及も含む。したがってたとえば、「a primer」の言及は2個以上のそのようなプライマーを含み、「an amino acid」の言及は2個以上のそのようなアミノ酸を含む、などのようになる。

【0056】

定義：

本発明の説明に際して、以下の語を採用し、以下に示すように定義する。 20

【0057】

「P2受容体」という語は、天然または合成にかかわらず、リガンドATPのプリン性受容体および/または他のプリンまたはピリミジンヌクレオチドを意味する。P2受容体は「P2X」または「P2Y」受容体として広範に界分類される。これらのタイプは、薬理学、構造および信号形質導入機構が異なる。P2X受容体は一般にリガンドゲート制御イオンチャンネルであるが、P2Y受容体は一般にGタンパク質結合系を通じて作動する。さらに、そして理論によって限定されることなく、P2X受容体は受容体ポリペプチドのマルチマーを含み、該マルチマーは同一または異なるサブタイプのどちらでもよい。結果として、「P2X受容体」という語は適宜に、個々の1個以上の受容体サブユニットはもちろん、それによって構成されるホモマーまたはヘテロマー受容体のことも指す。 30

【0058】

「サブユニット」という語はプリン受容体を呼ぶのに使用される場合、単独または1個以上の他のポリペプチドとともに機能性プリン受容体を形成するポリペプチドを意味する。プリン受容体が2個以上のポリペプチドサブユニットで構成されている場合、サブユニットは同一（ホモマーマルチマーを形成する）または異なっても（ヘテロマーマルチマーを形成する）よい。

【0059】

「P2X_n」という語は、nが1以上の整数であるP2X受容体サブタイプを意味する。発明の時点で7以上のP2X_n受容体サブタイプが単離および/またはキャラクタリゼーションされている。 40

【0060】

「P2X₃受容体作働薬」は、P2X₃受容体に結合し、活性化する化合物である。「活性化する」とは、1個以上の薬理的、生理的または電気生理的反応の誘発を意味する。このような反応は、これに限定されるわけではないが、受容体特異性細胞脱分極の増加を含む。

【0061】

「P2X₃受容体拮抗薬」は、P2X₃受容体に結合し、作働薬による受容体の活性化を阻害する。純粋な拮抗薬は受容体を活性化しないが、一部の物質は作働薬と拮抗薬の特性を混合している。

【0062】

「ポリヌクレオチド」という語は本明細書で使用されているように、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形式を意味する。この語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、この語は二本鎖および一本鎖DNAはもちろん、二本鎖および一本鎖RNAも含む。メチルおよび/またはキャッピングなどの修飾、およびポリヌクレオチドの未修飾形も含む。

【0063】

「変種」という語は、1個以上のヌクレオチドの挿入、欠失または置換において、関連する野生種配列とは異なるオリゴヌクレオチド配列を指すのに用いる。構造保存的突然変異によって発生しなかった場合（以下を参照）、このような変種オリゴヌクレオチドは、「タンパク質変種」として発現され、本明細書で使用されるように、1個以上のアミノ酸の挿入、欠失または置換において、野生種ポリペプチドと異なるポリペプチド配列を示す。タンパク質変種は一次構造（アミノ酸配列）が異なるが、野生種に対して、二次または三次構造、または機能が著しく異なっている場合も、異なっていない場合もある。

10

【0064】

「突然変異体」という語は一般に、遺伝子または染色体の変化の結果として、新しい遺伝子特性または表現型を示す生物または細胞を指す。しかし、ある例では、「突然変異体」は変種タンパク質またはオリゴヌクレオチドに関して使用され、「突然変異」は変種の基礎となる変化を指すことがある。

【0065】

「同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列それぞれの、ヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の正確な対応として定義される。「同一性率」を決定することによって、2個以上のヌクレオチド配列を比較できる。「同一性率」を決定することによって、2個以上のアミノ酸配列も比較できる。Wisconsin Sequence Analysis Package Version 8 (Genetics Computer Group, ウィスコンシン州マディソン)で利用できるプログラム、たとえばGAPプログラムは、2個のポリヌクレオチドの同一性と2個のポリペプチドの同一性の両方をそれぞれ計算できる。同一性率を計算する他のプログラムは、当業者に既知である。

20

【0066】

「類似性」は、適切な場所における2個以上のポリペプチドが同一であるか、電荷または疎水性などの化学的および/または物理的特性を備えている場合、そのポリペプチドのアミノ酸対アミノ酸の正確な比較を意味する。したがって、「類似性率」は比較されたポリペプチド配列間で決定できる。アミノ酸配列の同一性はもちろん、核酸配列の同一性を決定する技術は、当業者に既知であり、（通常はcDNA中間体によって）遺伝子のmRNAの核酸配列を決定すること、それによりコード化されるアミノ酸配列を決定すること、そしてこれを第二のアミノ酸配列と比較することを含む（上の同一性率の説明を参照）。

30

【0067】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では相互に置き換えて使用され、ペプチド結合によって結合されたアミノ酸の分子鎖を意味する。この語は特定の長さの生成物を指すものではない。そのため、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質はポリペプチドの定義に含まれる。この語は、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などの、ポリペプチドの翻訳後の修飾を意味する。加えて、タンパク質フラグメント、類似体、変異または変種タンパク質、融合タンパク質などは、そのようなフラグメントなどがその所期の目的に必要な結合または他の特性を保持している場合、ポリペプチドの意味の範囲内に含まれる。

40

【0068】

本明細書で使用されるように「機能上保存的な突然変異」は、誘導体が作成されたポリペプチドに比べて、実質的に活性が変化していない誘導ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドにおける変化を意味する。このような誘導体はたとえば、実質的にその特性に影響を与えない関連分子における、アミノ酸の挿入、欠失または置換を含むことがある。

50

たとえば誘導体は、たとえばGly/Ala、Val/Ile/Leu、Asp/Glu、Lys/Arg、Asn/Gln、Thr/Ser、Phe/Trp/Tyrなどの置換されたアミノ酸の一般的な電荷、疎水性/親水性、側鎖部分および/または立体バルクを保存する置換などの、保存的アミノ酸置換を含むことができる。

【0069】

「構造上保存的な突然変異」という語は、核酸配列の変化を含むが、変質した変種が誘導されるポリヌクレオチドによってコード化されるポリペプチドと同一のアミノ酸配列を持つポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを意味する。このことが起こるのは、特異性アミノ酸が2個以上の「コドン」すなわち3個のヌクレオチドの配列によってコード化されるために、すなわち遺伝子コードの変質による。

10

【0070】

「組換宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系」、「細胞培養物」、および、単細胞エンティティとして培養された微生物またはさらに高等な真核細胞系を示す他のそのような語は、組換ベクターまたは転移DNAの宿主として使用できる、または使用される細胞を指し、細胞にDNAを導入する方法やその後の細胞の素質については重要でない細胞を指す。この語は、形質移入された元の細胞の子孫を含む。初代培養の細胞も、卵母細胞などの細胞と同様に宿主として使用できる。

【0071】

「ベクター」は、別のポリヌクレオチドセグメントが結合するレプリコンであり、結合したセグメントの複製および/または発現を引き起こすようにする。この語は、発現ベクター、クローニングベクターなどを含む。

20

【0072】

「コード化配列」は、mRNAに転写される、および/またはポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。コード化配列の境界は、5'-末端の翻訳開始コドンと3'-末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード化配列はこれに限定されるわけではないが、mRNA、cDNA、組換ポリヌクレオチド配列を含む。変種または類似体は、コード化配列の一部の欠失、配列の挿入、および/または配列内の1個以上のヌクレオチドの置換によって調製できる。特定部位の突然変異誘発などのヌクレオチド配列の修飾技法は、当業熟練者に周知である。たとえばSambrook他、同上；DNA Cloning, Vols. I and II、同上；Nucleic Acid Hybridization、同上を参照すること。

30

【0073】

「動作可能に結合された」は、説明した構成要素が意図した方法で機能できる関係にある状態を指す。それゆえたとえば、コード化配列に「動作可能に結合された」制御配列は、制御配列に適合する条件下でコード化配列の発現が行われるような方法で結合される。コード化配列は、ポリヌクレオチドの転写を誘発する制御配列に動作可能に結合され、それによって前記ポリヌクレオチドが宿主細胞内で発現される。

【0074】

「形質移入」は、挿入に使用する方法、または挿入されるポリヌクレオチドの分子形とは関係なく、外因性ポリヌクレオチドを宿主細胞に挿入することを指す。ポリヌクレオチド自体の挿入および外因性ポリヌクレオチドを構成するプラスミドまたはベクターの挿入が含まれる。外因性ポリヌクレオチドは、細胞によって直接転写および翻訳され、たとえばプラスミドなどの統合されないベクターとして維持されるか、代わりに、宿主ゲノム内に安定に統合されることがある。「形質移入」は一般に、真核細胞に関して用いられるが、「形質転換」は、原核細胞のポリヌクレオチドへの挿入を指すのに用いられる。真核細胞の「形質転換」は、癌性または腫瘍形成状態の形成も指すことがある。

40

【0075】

「単離された」という語は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す場合、指摘された分子が他の同様な生体巨大分子が実質的にない場合に存在することを意味する。「単離された」という語は本明細書では、75重量%以上、さらに好ましくは85重量%以上、

50

またさらに好ましくは95重量%以上、最も好ましくは98重量%以上の組成物が単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドであることを意味する。特定のポリペプチドをコード化する「単離されたポリヌクレオチド」は、主題ポリペプチドをコード化しない他の核酸分子を実質的に含まないポリヌクレオチドを指す；しかし、分子は本明細書で定義するように、機能上および/または構造上保存的な突然変異を含むことがある。

【0076】

「試験サンプル」は本明細書で使用するように、P2X₃を含むP2X受容体の1つの供給源である、個人の体の構成要素を意味する。これらの試験サンプルは、本明細書で説明する本発明の方法によって評価可能な生体サンプルを含み、全血、組織および細胞調製物などの体液を含む。

10

【0077】

本文を通じて、以下の1文字のアミノ酸の省略形を使用する：

アラニン	A	アルギニン	R
アスパラギン	N	アスパラギン酸	D
システイン	C	グルタミン	Q
グルタミン酸	E	グリシン	G
ヒスチジン	H	イソロイシン	I
ロイシン	L	リジン	K
メチオニン	M	フェニルアラニン	F
プロリン	P	セリン	S
トレオニン	T	トリプトファン	W
チロシン	Y	バリン	V

20

【0078】

上述したように、哺乳類P2X₃受容体、変種受容体をコード化するポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドサブユニット、これらの受容体を作成する方法を本明細書で提供する。本発明は上のP2X受容体だけではなく、受容体および受容体を発現する細胞を用いた、化合物のスクリーニング方法も含む。さらに、受容体の検出に使用できるポリヌクレオチドおよび抗体を、これらの方法で有用な試薬と同様に提供する。受容体とその発現を調整するのに有用な化合物およびポリヌクレオチドも、以下で開示するように提供する。

【0079】

1つの好ましい実施態様において、ポリヌクレオチドは上述のヒトP2X受容体ポリペプチド、または保存的アミノ酸置換を含むそのタンパク質変種をコード化する。

30

【0080】

上述のヒトP2X受容体およびその変種をコード化するDNAは、合成によって、あるいは技法の組合せによって調製したゲノムまたはcDNAから誘導できる。次にDNAは、ヒトP2X受容体を発現させるのに用いるか、または当業者に周知の方法を用いてRNA調製のためのテンプレートとして、または他のP2Xコード化ヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズ可能であり、その結果、他のP2Xコード化ヌクレオチド配列を検出できる分子プローブとして使用できる(Sambrook他、同上を参照)。

【0081】

P2X₃受容体をコード化するcDNAは、適切なDNAライブラリから得られる。cDNAライブラリは、Grunstein他、(1975)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3916に記載された手順を用いてプローブできる。それゆえcDNAを次に、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」とプライマー配列を持ちいて修飾および増幅して、ヒトP2X受容体をコード化する特異性DNAを得ることができる。

40

【0082】

さらに詳細には、PCRは、DNA分子内の望ましい配列の反対端に一致する短いオリゴヌクレオチドプライマー(一般に長さ10~20ヌクレオチド)を使用する。プライマー間の配列は既知である必要はない。最初のテンプレートはRNAでもDNAでもよい。R

50

NAを使用する場合、最初にcDNAに逆転写される。次にcDNAを、熱などの周知の技法を用いて変性させ、適切なオリゴヌクレオチドプライマーをモル過剰に添加する。

【0083】

プライマー伸長は、デオキシヌクレオチド三リン酸またはヌクレオチド類似体の存在下で、DNAポリメラーゼを用いて実施する。得られた生成物は、5' - 末端にそれぞれプライマーを含み、このプライマーは、元の鎖の新たに合成された補体に共有結合されている。複製分子を再度変性させ、生成物が十分に増幅されるまで、プライマーによってハイブリダイズなどを行う。このようなPCR法はたとえば、米国特許第4,965,188号、第4,800,159号、第4,683,202号、第4,683,195号に記載されており、これらの全体は引用することによって本明細書に含まれている。PCRの生成物はクローニングし、プライマー伸長鎖の分離によって誘導されたP2X受容体DNAを含むクローンを選択した。選択はプライマーをハイブリダイゼーションプローブとして用いて行える。

10

【0084】

あるいはまた、各P2X受容体DNAは、ヒトRNAから始まるRT-PCR(逆転写酵素-ポリメラーゼ転写反応)を、方法を用いて生成できる。ヒトRNAは、特異性P2X受容体が発現される、たとえば脳、脊髄、子宮または肺などの細胞または組織から、従来方法を用いて得られる。たとえば、一本鎖cDNAは、標準の逆転写酵素手順を用いてテンプレートとしてのヒトRNAから合成され、cDNAはPCRを用いて増幅される。これは、ヒト組織RNAテンプレートからP2X受容体変種を生成する一例に過ぎない。

20

【0085】

ヒトRNAの逆転写は、Superscript Preamplificationシステム(GibcoBRL、メリーランド州ゲーサズバーグ)による試薬と、以下の方法を用いても実施できる：ポリA+下垂体組織から誘導したRNA(1マイクログラム)(Clontech, Inc. カリフォルニア州パロアルト)と1 μ l(50ナノグラム)のランダムヘキサマープライマーを混合して、最終体積が12 μ lのdH₂Oとなるようにした。この混合物を70 $^{\circ}$ Cまで10分間加熱し、氷上で1分間冷却する。以下の成分を加える：2 μ lの10X PCR緩衝液(200mM Tris-HCl pH 8.4、500mM KCl)、2 μ lの25mM MgCl₂、1 μ lの10mM dNTPミックス、2 μ lの0.1Mジチオトレイトール。反応は25 $^{\circ}$ Cで5分間平衡化させ、その後1 μ l(200単位)のSuperscript II逆転写酵素を加え、インキュベーションを25 $^{\circ}$ Cで10分間継続し、次に42 $^{\circ}$ Cで50分間行う。代わりに、10ピコモルのオリゴdTプライマーを上記の反応混合物中のランダムヘキサマープライマーに換えることができる。この場合、42 $^{\circ}$ Cで2分間、平衡化を行った後、逆転写酵素を加え、インキュベーションを42 $^{\circ}$ Cで50分間行う。逆転写反応は、70 $^{\circ}$ C、15分間のインキュベーションによって停止させ、氷上で冷却する。Rnase H(1 μ l; 2単位)を添加し、混合物を37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、氷上で保存する。

30

【0086】

合成オリゴヌクレオチドは、Warner(1984)が述べたDNA3:401などの自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて調製してもよい。望ましい場合、合成鎖は32P-ATPの存在下でポリヌクレオチドキナーゼを用いた処理によって、反応の標準条件を使用して、32Pにより標識してもよい。ゲノムまたはcDNAライブラリから単離されたものを含むDNA配列は、Zoller(1982)Nucleic Acid Res. 10:6487が述べているような、特定部位の突然変異誘発を含む既知の方法によって修飾してもよい。簡単に言えば、修飾されるDNAは一本鎖配列としてファージ内にひとまとめにされる。次にDNAポリメラーゼによって二本鎖DNAに変換し、修飾されるDNAの部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、その配列内に望ましい修飾を加える。ファージの各鎖の複製を含む、形質転換された細菌の培養は、プラークを得るために寒天内でプレーティングする。理論的には、新しいプラークの50%が、突然変異配列を持つファージを含み、残りの50%が元の配列を持っている。

40

50

ブランクの複製は、ハイブリダイゼーションに適した温度および条件において、正しい鎖によって、標識化された合成プローブにハイブリダイズされるが、未修飾配列によってはハイブリダイズされない。ハイブリダイゼーションによって同定された配列は回収・クローニングされる。あるいは、変種を野生種と区別するのが困難な場合は、配列解析によってクローンを同定する必要がある。いずれの場合も、DNAは配列確認される。

【0087】

特異性P2X受容体をコード化するDNA、または特異性P2X受容体をコード化するヌクレオチド配列に約60~80%同一であるDNA、さらに好ましくは特異性P2X受容体をコード化するヌクレオチド配列に約90%同一であるDNAはいったん生成されると、適切な宿主細胞内での複製のために、次にクローニングベクターまたは発現ベクター内に包含される。ベクターの構成には、当業者に既知の方法を使用する。一般に、適切な制限酵素を用いて、これらの市販酵素の製造者が一般に規定する条件下で処理することによって、部位特異性DNA開裂を実施する。制限酵素によるインキュベーションの後、抽出によってタンパク質を除去し、沈殿によってタンパク質を回収する。開裂したフラグメントは、当業熟練者に既知の方法に従って、たとえばポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動法を用いて分離できる。

10

【0088】

粘着末端開裂フラグメントは、混合物中に存在する適切なデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)の存在下で、E. coli DNAポリメラーゼ1(Klenow)を用いた平滑末端でもよい。S1ヌクレアーゼを用いた処理も使用され、任意の一本鎖DNA部分の加水分解を生じる。

20

【0089】

連結反応は、T4 DNAリガーゼおよびATPを用いた標準緩衝液と温度条件を使用して実施する。あるいは、望ましくないフラグメントの制限酵素消化を用いて、連結反応を防止することができる。

【0090】

標準ベクター構成は一般に、特異性抗生物質抵抗性成分を含む。連結反応混合物は適切な宿主に形質転換され、成功した形質転換体は抗生物質抵抗性または他のマーカーによって選択される。次に、形質転換体によるプラスミドは、通常は、Clewel1他、J. Bacteriol. 110:667(1972)によって報告されたクロラムフェニコール増幅の後に、当業者に既知の方法に従って調製できる。DNAは通常、制限酵素解析および/または配列決定によって単離および分析される。配列決定は、Messing他、Nucleic Acid Res. 9:309(1981)でさらに述べられている、Sanger他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463(1977)の周知のジデオキシ法によるか、Maxam他、Meth. Enzymol. 65:499(1980)が報告した方法によってもよい。バンド圧縮による問題は、GCが豊富な領域で見られることがあるが、Barr他、Biotechniques 4:428(1986)が報告した方法に従って、たとえばT-デアゾグアノシンまたはイノシンを用いて克服される。

30

【0091】

宿主細胞は、クローニングベクターまたは発現ベクターである、本発明のベクターによって遺伝子組換えされる。ベクターはプラスミド、ウィルス粒子、ファージなどの形でもよい。組換えられた宿主細胞は、プロモータの活性化、形質転換体/トランスフェクタントの選択、またはサブユニットをコード化するポリヌクレオチドの増幅に適するように改良された従来の培養液中で培養できる。温度、pHなどの培養条件は一般に、発現用に選択された宿主細胞によって以前使用された条件に似ており、当業熟練者には明白である。

40

【0092】

原核および真核宿主細胞はどちらも、指定された宿主に適合性のある適切な制御配列が使用される場合、望ましいコード化配列の発現に使用できる。たとえば原核宿主の中で、大腸菌がよく使用される。またたとえば、原核生物の発現制御配列はこれに限定されるわけ

50

ではないが、随意にオペレータ部分を含むプロモータ、リボソーム結合部位を含む。原核宿主と適合性のある転移ベクターはたとえば、アンピシリンおよびテトラサイクリン抵抗性を付与するオペロンを含むプラスミド pBR322、抗生物質抵抗性マーカーを付与する配列も含む各種の pUCベクターより誘導できる。これらのマーカーを使用して、選択によって、成功した形質転換体を得ることができる。一般に使用される原核制御配列はこれに限定されるわけではないが、ラクトースオペロン系 (Chang 他、Nature 198:1056 (1977))、トリプトファンオペロン系 (Goeddel 他、Nucleic Acid Res. 8:4057 (1980) によって報告) およびラムダ誘導 P1 プロモータならびにリボソーム結合部位 (Shimatake 他、Nature 292:128 (1981))、trp および lac UV5 プロモータの配列から誘導されるハイブリッド Tac プロモータ (De Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 292:128 (1983)) を含む。上述の系は特に E. coli (大腸菌) と適合性であるが、望ましい場合には、パチルスまたはシュドモナスの菌株などの他の原核宿主も使用できる。

【0093】

真核宿主は培養系に、酵母および哺乳類細胞を含む。Pichia pastoris、Saccharomyces cerevisiae および S. carlsbergensis は一般に使用される酵母宿主である。酵母適合性ベクターは、栄養要求性変異株に原栄養性を付与したり、野生種菌株に重金属に対する耐性を付与したりして、正しい形質転換体を選択できるようにするマーカーを持っている。酵母適合性ベクターは、2- μ の複製起点 (Broach 他、Meth. Enzymol. 101:307 (1983))、CEN3 および ARS1 の組合せ、または適切なフラグメントを宿主細胞ゲノムに包含させる配列などの、複製を行えるようにする他の手段を使用する。酵母ベクターの宿主配列は当業者に既知であり、これに限定されるわけではないが、3-ホスホグリセラートキナーゼ用のプロモータを含む、解糖酵素の合成用のプロモータが挙げられる。たとえば Hess 他、J. Adv. Enzyme Req. 7:149 (1968)、Holland 他、Biochemistry 17:4900 (1978)、Hitzeman, J. Biol. Chem. 255:2073 (1980) を参照すること。たとえば、一部の有用な制御系は、グリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモータまたはアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 調節可能プロモータ、または Consensat et al., Gene 61:265-275 (1987) で述べられているハイブリッド酵母プロモータ ADH2 / GAPDH、GAPDH からさらに誘導されたターミネータ、分泌が望ましい場合は、酵母アルファ因子によるリーダー配列を含む制御系である。加えて、動作可能に結合される転写調節領域と転写開始領域は、野生種生物において天然に結び付けられないようになっている。

【0094】

発現のホストとして利用できる哺乳類細胞系は当業者に既知であり、American Type Culture Collection などの受託者から入手できる。これらはこれに限定されるわけではないが、HeLa 細胞、ヒト胚腎臓 (HEK) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞およびその他が挙げられる。哺乳類細胞の適切なプロモータは当業者に既知であり、サルウイルス 40 (SV40)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、アデノウイルス (ADV)、ウシ乳頭しゅウイルス (BPV)、サイトメガロウイルス (CMV) などによるものなどのウイルスプロモータを含む。哺乳類細胞もターミネータ配列およびポリ A 追加配列を必要とすることがある；発現を増加させるエンハンサ配列も含まれることがあり、遺伝子の増幅を引き起こす配列も望ましいことがある。これらの配列は当業者に既知である。哺乳類細胞における複製に適したベクターはウイルスレプリコン、または P2X 受容体を宿主ゲノム内にコード化する適切な配列を統合できるようにする配列を含むことがある。このような哺乳類発現系の例は、Gopalakrishnan 他、Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. 290:237-246 (1995) で述

べられている。

【0095】

Briggs 他、Neuropharmacol. 34:583-590 (1995) または Stuhmer, Meth. Enzymol. 207:319-345 (1992) で述べられているような標準方法を用いる両生類細胞や、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) で述べられている方法を用いる昆虫細胞などの他の真核系も、このような系にポリヌクレオチドを導入するための方法と同様に知られている。

【0096】

バキュロウイルス発現系を、昆虫宿主細胞内に高濃度の組換え体タンパク質を合成するために使用できる。この系は、哺乳動物細胞と同様の様式でのタンパク質の翻訳後修飾を行いながら、高濃度のタンパク質発現を可能にする。これらの発現系は、バキュロウイルス感染に続いて、昆虫細胞内のクローン化した遺伝子の発現を駆動するために活性化する、ウイルスプロモーターを使用する (O'Reilly ら、(1992)、バキュロウイルス発現ベクター：研究室マニュアル (Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual)、IRL/Oxford University Press)。

【0097】

トランスフェクションは、宿主細胞によるポリヌクレオチドの直接の取り込みおよび類似のものによって、ウイルス中のポリヌクレオチドをパッケージングすることおよび宿主細胞をウイルスで形質導入することを含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の既知の方法であってよく、これは当業者に既知の方法である。選択したトランスフェクション手順はトランスフェクトすべき宿主に依存し、日常的に行っている者によって決定される。

【0098】

レセプターの発現は、レセプターに選択的である放射性リガンドの使用によって検出してよい。しかしながら、本技術分野で既知の任意の放射リガンド結合技術を、レセプターを検出するために使用してよい (たとえば、Winzor ら、(1995)、リガンド結合の定量的特性化 (Quantitative Characterization of Ligand Binding), Wiley-Liss, Inc., NY、Michael 他、Mol. Pharmacol. 51:524-532 (1997))。あるいは、発現を、抗体または機能的測定、すなわち当業者によく既知の方法を用いた ATP-刺激細胞極性化を用いて検出できる。たとえば、アゴニスト刺激 Ca^{2+} 流動、またはアゴニスト刺激 Ca^{2+} 流動のアンタゴニストによる阻害を、COS、CHO または HEK 細胞のような組換え体 $P2X_2$ レセプター cDNA をトランスフェクトした哺乳動物細胞中で測定できる。あるいは、 Ca^{2+} 流動を、一過性または安定に $P2X_3$ およびレセプターを発現するために組換え体技術を用いて調製した、 $P2$ レセプターを天然には発現していない細胞、たとえば 1321N1 ヒト星状細胞腫株中で測定できる。

【0099】

$P2X$ ポリペプチドを、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーまたはレクチンクロマトグラフィーを含む既知の方法によって、同ポリペプチドを発現している組換え体宿主細胞培養液より回収し、精製する。タンパク質の構造を完成させるのに、必要であれば、タンパク質再折り畳み工程を使用できる。最後に、最終精製工程に、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用できる。

【0100】

本発明に含まれるこれらのポリペプチドは、好ましくは $P2X_3$ レセプターに相当するアミノ酸と 40~60% 類似しており、より好ましくは $P2X_3$ レセプターのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

に70～85%類似しており、さらにより好ましくはP2X₃レセプターのアミノ酸配列に少なくとも約90%同一である。

【0101】

本発明のヒトP2Xレセプターポリペプチドまたはその断片はまた、本技術分野で既知の従来の技術、たとえば固相ペプチド合成のような化学合成によって、合成してよい。一般的に、これらの方法は、固体または液体相合成方法を使用する。たとえば、固相ペプチド合成技術に関して、J. M. Stewart and J. D. Young, 固相ペプチド合成 (Solid Phase Peptide Synthesis), 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) および G. Barany and R. B. Merrifield, ペプチド: 解析、合成、生物学 (The Peptide: Analysis, Synthesis, Biology), エディター E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254 を、そして伝統的な溶液合成に関して、M. Bodansky, ペプチド合成の原理 (Principles of Peptide Synthesis), Springer-Verlag, Berlin (1984) および E. Gross and J. Meienhofer, Eds., ペプチド: 解析、合成、生物学 (The Peptide: Analysis, Synthesis, Biology) 上記、Vol. 1 を参照のこと。

10

【0102】

1つの好ましい系において、それぞれが特定のヒトP2Xレセプターをコードしている、そこより由来したDNAまたはRNAのどちらかを、アフリカツメガエル卵母細胞のような細胞内への直接注入によって発現させてよい。この方法を用いて、そのDNAおよびそのmRNAによってコードされたヒトP2X₃レセプターの機能性を以下のように評価することができる。レセプターコードポリヌクレオチドを、機能的なレセプターサブユニットへの翻訳のために卵母細胞内に注入する。発現した変異体ヒトP2X₃レセプターを、電圧クランプ法などのような電気生理学的技術を含むさまざまな技術によって卵母細胞中で査定することができる。

20

【0103】

組換え体宿主細胞内で発現したレセプターを、P2X₃を調節する化合物を同定するために使用してよい。このことに関して、レセプターに対して親和性を示している化合物の結合の特異性を、レセプターを発現している細胞またはこれらの細胞からの膜に対する化合物の親和性を測定することで立証する。これは、細胞、細胞膜または単離したレセプターに対する標識化した(たとえば放射活性)化合物の特異的結合を測定すること、または標準の標識化リガンドの特異的結合を置換する化合物の能力を測定することによって行われてよい。たとえば、上記Michaelら、を参照のこと。変異体レセプターの発現およびこれらの細胞または膜に結合するか、またはこれらの細胞または膜に対する標識化リガンドの結合を阻害する化合物のスクリーニングにより、このレセプターに対して高い親和性を持つ化合物の迅速な選別が提供される。これらの化合物は、アゴニスト、アンタゴニスト、またはレセプターの調節物であってよい。

30

40

【0104】

発現したレセプターをまた、P2Xレセプター活性を調節する化合物に関して選別するために使用してよい。P2X活性を調節する化合物の同定のための1つの方法には、特定のヒトP2Xレセプターポリペプチドを発現している細胞を提供すること、試験化合物をこの細胞と結合させること、およびそのP2Xレセプター活性における試験化合物の効果を測定することが含まれる。細胞は、微生物細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞、両生類細胞、昆虫または他のレセプターを発現している細胞であってよい。好ましくは、細胞は哺乳動物細胞または両生類細胞である。したがって、たとえば、試験化合物を、適切な応答、たとえばP2Xプリノレセプターが宿主細胞に発現している場合の、カルシウムイオン増加による細胞脱分極の刺激または細胞内カルシウム濃度の上昇、P2Yプリノレセプターが

50

発現した場合の細胞内カルシウムイオン濃度および/またはイノシトールリン脂質加水分解の増加およびイノシトールリン酸の形成などを誘発するその能力に関して、またはP2XまたはP2Yプリノレセプターアゴニストまたはアンタゴニストに対する応答を調製する化合物の能力について評価する。

【0105】

細胞内カルシウム濃度は、カルシウムイオン感受性蛍光指示体を用いて解析してよい。細胞蛍光を蛍光計を用いてモニタしてよい。カルシウムイオン感受性蛍光色素の例には、たとえばquin-2(たとえばTsien他、J. Cell. Biol. 94:325(1982)を参照のこと)、fura-2(たとえばGrynkiewicz他、J. Biol. Chem. 260:3440(1985)を参照のこと)、カルシウムグリーン-1、indo-1(たとえば、上記Grynkiewiczら、を参照のこと)、fluo-3(たとえば、Kao他、J. Biol. Chem. 264:8179(1989)を参照のこと)、およびrhod-2(たとえばTsien他、J. Biol. Chem. アブストラクト89a(1987)を参照のこと)および、これらの非特異的エステラーゼ-加水分解可能アセトキシメチルエステルが含まれ、これらはすべて市販されている(モレキュラープローブス(Molecular Probes), Eugeneまたはシグマケミカル社(Sigma Chemical Co.), St. Louis, MO)。

10

【0106】

一般的にP2X_nプリノレセプターを発現するために遺伝子工学的に作製した細胞の膜脱分極は、膜電位の変化に感受性である蛍光色素を用いてモニタしてよい。たとえば、電位感受性蛍光色素が、脱分極している膜内に分割し、結果として細胞内蛍光の検出可能な増加となる。そのような膜電位感受性蛍光色素の例には、3,3'-ジフェニルオキサカルボシアニンヨウ化物(DiOC5)および3,3'-ジプロピルチアジカルボシアニンヨウ化物(DiSC3)のようなカルボシアニン類、ビス-(1,3-ジブチルバルビツール酸)ペンタメチンオキソノール(DiBAC₄(5))またはビス-(1,3-ジブチルバルビツール酸)ペンタメチンオキソノール(DiBAC₄(5))または類似のもののようなオキソノール類が含まれる。

20

【0107】

in situでこれらの色素の蛍光放射を較正するために、蛍光放射を消光する薬剤を使用してよい。したがって、たとえば抗フルオレセイン(モレキュラープローブス(Molecular Probes))はpH7.0でのfluo-3の5nM溶液の蛍光のおよそ87%を消光し、この色素の蛍光放射を較正するのに使用してよい。アセトキシメチルエステル色素誘導体を使用する場合、エステルの不完全な加水分解により、蛍光であるが、カルシウムイオンに不感受性の蛍光指示体となる可能性がある。そのような条件に対するコントロールには、飽和量のカルシウムイオンを、イオノフォアによって細胞内に輸送し、最大蛍光応答を実施すること、およびすべてのアセチルメチルエステルが加水分解された場合、指示体の蛍光を消光するための、マグネシウムイオンの細胞内への輸送が含まれる。そのようなイオンが細胞内に輸送できるような1つの方法は、A23187(たとえば、Pressmanら、(1976)Ann. Rev. Biochem., 45:501を参照のこと)(シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.)、その臭素処理した誘導体(たとえばDeberら、(1985)Anal. Biochem., 146:349)(モレキュラープローブス(Molecular Probes))または本技術分野でよく既知の他のイオノフォアのような、イオノフォアの使用である。

30

40

【0108】

さらに、試験化合物から得られた蛍光データを、それぞれが既知のカルシウムイオン濃度を含んでいる較正剤系列により作製されている較正曲線と比較することによって、細胞の蛍光放射より細胞内カルシウムイオンの量を定量することが好ましい可能性がある。したがって、カルシウムイオンスタンダードを、そこから望ましいスタンダード濃度(群)を

50

達成するように作製してよい、たとえばCaCl₂の保存溶液を調製することで、濃度範囲を持つように作製する。カルシウムイオン感受性蛍光指示体色素の存在下でのスタンダードの蛍光放射を、スタンダード曲線を構築するために使用し、アッセイ中で遺伝子工学的に作製した細胞の細胞内カルシウムイオン濃度をスタンダード曲線より決定する。あるいは、先にカルシウムイオノフォアで処理した細胞を、スタンダード曲線を作製するために使用した指示体色素とカルシウムイオンスタンダードと共にインキュベートする。

【0109】

アッセイは、手動で、または自動化系を使用して構築してよい。ヒトプリノレセプターリガンドを同定している高能力機能性スクリーニングアッセイに対しては、自動化系が好ましい。そのような自動化系の例には、それぞれのウェル中でヒトプリノレセプターポリペプチドをコードし、発現するように遺伝子工学的に作製した細胞を培養する96ウェル培養プレートを提供することが含まれる。このプレートは、蛍光イメージングプレート読みとり器(「FLIPR」)内にのせ、96ウェルそれぞれでの細胞内カルシウム流動の速度を同時に測定する。そのようなFLIPRはモレキュラー デバイセス社(Molecular Devices Corp.), Sunnyvale, CA)より市販されている。FLIPRは、流体を96ウェルプレートのそれぞれのウェル内におよびウェルから定量的に輸送可能であり、したがってカルシウムイオン感受性蛍光指示体色素、候補化合物、プリノレセプターアゴニスト、たとえばATP、UTP、2-メチルチオATP、または類似のもの、および/またはプリノレセプターアンタゴニスト、たとえばスラミン、シバクロンブルー、PPADSまたは類似のものを添加するのに使用できる。FLIPRは、アッセイの経過中いたる所で蛍光データを回収する。

10

20

【0110】

同様の様式において、試験試料中のプリノレセプターアゴニストまたはアンタゴニストを、手動または自動化系を使用して測定してよい。本方法を実施するための自動化系は、プリノレセプターを発現している遺伝子工学的に作製した細胞を各ウェルで培養する、96ウェル培養プレートを提供することを含む。蛍光指示体色素、試験試料、および/またはプリノレセプターアゴニストを、それぞれのウェルに加え、それぞれのウェルからの蛍光放射をFLIPRによって同時にモニタする。

【0111】

P2Xプリノレセプター薬物を、中枢神経系また末梢神経系条件、たとえばてんかん、痛み、鬱、神経変性疾患などを限定しないが含むさまざまな疾患において、そして生殖系の異常、喘息、末梢血管疾患、高血圧、免疫系異常、過敏性腸症候群または早漏において可能性のある治療薬剤と見なされている。

30

【0112】

さらに、DNA、またはそこから派生したRNAを、特異的P2Xレセプターを発現しているDNAに対するオリゴヌクレオチドプローブを設計するのに使用できる。本明細書で使用するときの、語句「プローブ(probe)」は、以上で定義したような、ポリヌクレオチドを含む構造を指し、標的ポリヌクレオチド中に存在する核酸配列に相補的な核酸配列を含む。プローブのポリヌクレオチド領域は、DNA、および/またはRNA、および/または合成ヌクレオチド類似体を含んでよい。そのようなプローブは、野生型および変異体P2Xレセプターをコードしている配列間に存在する可能性のある小さな差を与えるそのような識別を行うことができる方法を設計することが困難である可能性があるという条件付きで、P2Xおよび野生型メッセージからP2X₄変異体を見分けるためのin vitroハイブリッド形成アッセイで有用であり得る。あるいは、PCRに基づいたアッセイを、配列解析のために試料RNAまたはDNAを増幅するのに使用できる。

40

【0113】

さらに、それぞれの特定のP2Xポリペプチドまたはその断片(類)を、本技術分野でよく既知の技術を用いてモノクローナル抗体を調製するのに使用できる。特定のP2Xレセプターまたは関連断片は、以下で概論した組換え体技術を用いて入手することができ、すなわち、レセプターまたは断片を発現している組換え体細胞を、回収および単離できるレ

50

セプターまたは断片量を産出するように培養できる。あるいは、特定のP2Xポリペプチドまたはその断片(類)を、本技術分野で既知のような従来のポリペプチド合成技術を用いて合成できる。特定のP2Xポリペプチドに対する特異性および選択性を提示しているモノクローナル抗体は、測定可能および検出可能な部位、たとえば蛍光部位、放射標識、酵素、化学ルミネセンス標識および類似のもので標識でき、*in vitro*アッセイで使用できる。そのような抗体を、免疫-診断目的のために野生型または変異体P2Xレセプターポリペプチドを同定するのに使用できることが理論づけられている。たとえば、抗体が、脳組織中のアミロイドb1-40 v.1-42を検出するために作製された(Wisniewskiら、(1996) *Biochem. J.* 313:575-580、また、Suzukiら、(1994) *Science* 264:1336-1340、Gravinaら、(1995) *J. Biol. Chem.* 270:7013-7016、およびTurnerら、(1996) *J. Biol. Chem.* 271:8966-8970も参照のこと)。

10

【0114】

レセプター活性のアロステリック調節

ATPおよび他のP2XレセプターアゴニストによるP2Xレセプターの活性化は、細胞膜を横切るイオン勾配を調整し、 Ca^{2+} 、 Na^{+} および K^{+} を含む陽イオンの細胞質濃度を調節し、細胞膜電位の調整に役割を果たす。

【0115】

レセプター活性化のアロステリック調節により、一般的に、レセプターの第二の部位への結合によるアゴニスト誘導レセプター活性化が増強される。シバクロンブルーに関して、本発明は、このP2Xレセプターアゴニストが、ヒトまたはラットのような哺乳動物中に存在するP2X₃レセプターの効果をアロステリックに調節する能力を持つという発見に関連する。

20

【0116】

さらにとりわけ、ヒトP2X₃レセプターを発現している細胞中で、シバクロンブルーは、ATP-活性化 Ca^{2+} 流動および膜貫通電流の程度および強度のおよそ3~7倍の増加を仲介する能力を持つ。最大能力を仲介するのに必要なシバクロンブルー半最大濃度はhP2X₃レセプターを活性化するのに用いたアゴニストに依存する。シバクロンブルーがアゴニスト強度およびP2X₃レセプター活性の絶対的程度を増強するので、これらのアロステリック活性は、P2X₄レセプターにおけるシバクロンブルーの先に報告された効果とは明らか違う(Miller他、Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.* 354:562-571(1998))。したがって、他のリガンドゲート制御イオンチャンネルの特性と一致して、P2X₃レセプター活性は、内因的なアゴニストからは異なったりガンドによってアロステリック的に調節されうる。

30

【0117】

アンタゴニストにおけるシバクロンブルーの効果に関して、たとえば非選択的P2レセプターアンタゴニストであるPPADSは、シバクロンブルー濃度-効果曲線の右側への移動を引き起こし、一方でシバクロンブルーの濃度の増加がPPADSアンタゴニスト効果を減衰させる。

40

【0118】

P2X₃レセプターのラット相同物は、シバクロンブルーへの曝露において、以上および実施例で示したものと同様の結果を示し、このことは、シバクロンブルーの調節活性が種依存的でないことを示唆している。

【0119】

シバクロンブルー仲介P2X₃レセプター増強の機構が、エクトヌクレオチダーゼにおけるそのすでに記載された阻害効果の二次的結果ではないことに注意すべきである(Stout他、*Biochem. Mol. Biol. Int.* 36:927-934(1995))。シバクロンブルー仲介エクト-ATPase活性が寄与因子であった場合、シバクロンブルーはそれのみで、培地中の内因性ATPの濃度の増加によってアゴニスト様活性

50

を仲介する可能性があることが予想される。しかしながら、以下の実施例に相当するデータによってはっきりするように、h P 2 X₃ レセプター活性においてシバクロンブルーの本質的な効果は存在しない。さらに、エト - A T P a s e 阻害の結果としての内因性アゴニストの蓄積は、P 2 X₃ レセプターのみというよりも、すべてのP 2 レセプターサブタイプに効果が期待される。

【0120】

A T Pに加えて、本発明にしたがって、シバクロンブルーを、たとえば2 - m e S A T P、B z A T Pおよび - m e A T Pを含む他のP 2 X₃ レセプターアゴニストによるh P 2 X₃ レセプター活性化を増強するために使用してよい。それぞれの場合、総増強作用を調節するのに必要なシバクロンブルーの半最大濃度は同様であり、このことはレセプターにおけるシバクロンブルーの効果が、アゴニストに依存しないことを示している。したがって医療従事者によって好ましいと判断されるような任意のアゴニストを、シバクロンブルーと組み合わせて使用してよい。

10

【0121】

最大P 2 X₃ レセプターシグナルの程度の増加を調節するのに加えて、シバクロンブルーは、A T P濃度 - 応答曲線の左側への移動を引き起こすことによって、アゴニスト強度を増強する。とりわけ、3 μ Mシバクロンブルーの存在下で、A T Pはシバクロンブルーがない状態よりも7倍強力であり、このことは、シバクロンブルーがh P 2 X₃ レセプターに対するA T Pの親和性および/または効力に影響を与える可能性があり、または多重結合レセプターに対するA T P結合の共同性を増強するのに役に立つことを示唆している。

20

【0122】

シバクロンブルーの調節活性は、非競合的P 2 X₃ アンタゴニスト、P P A D Sの阻害効力が、シバクロンブルーの濃度と逆相関するという発見によって確認される。シバクロンブルーは、P 2 X₃ レセプター活性化の程度を増強する一方で、P P A D S濃度 - 効果曲線の右側への移動を引き起こし、このアロステリック調節剤がアゴニスト活性を減少させることを示している。シバクロンブルーのこの効果は、A T P濃度に依存せず、したがって、レセプター占有の明らかな増加の結果ではない。

【0123】

アゴニスト濃度 - 効果曲線のシバクロンブルー - 仲介左側移動およびアンタゴニスト濃度 - 効果曲線の右側移動は、シバクロンブルーが、P 2 X₃ レセプター活性のアロステリック調節物として機能するという結論を支持する。さらに、P P A D S - 仲介阻害とシバクロンブルー - 仲介増強作用の相互排他性が、P 2 X₃ レセプター機能を調節する調節リガンド間の複合体相互作用を示唆している。

30

【0124】

以上で記述したシバクロンブルーの調節効果は、ラットおよびヒトP 2 X₃ レセプター両方で観察することができ、C a²⁺の活性の少なくとも1000倍であり、このことは、内因的に発現したP 2 X₃ レセプターが低および高親和性相互作用の多様性による機能的調節を受ける可能性があることを示唆している。

【0125】

脱分極に続くレセプター回復の促進

h P 2 X₃ レセプターにおけるA T Pの効果を増強することに加えて、シバクロンブルーはまた、急激に脱分極したレセプターに対するA T P - 応答性を復帰させるその能力によって見られたように、脱分極からのh P 2 X₃ レセプター回復の速度をおよそ6倍増加させる能力を持っている。したがって、本発明にしたがって、シバクロンブルーを、脱分極相に続くP 2 X₃ レセプターの脱感作の速度を増加させるために、患者に投与してよい。

40

【0126】

さらに、シバクロンブルーによるヒトおよびラット両方のP 2 X₃ レセプターの増強作用は、レセプター脱感作の促進と同時に起こる。したがって、本発明にしたがって、同時にレセプターを再感作している間に、レセプターを増強する可能性がある。

50

【0127】

脱感作からの回復の明らかな速度が、50 μ Mのシバクロンブルーの存在下で6倍増加する。脱感作後の不応答期間の半減期の減少は、内因的に発現したP2X₃レセプターが、その機能的回復を促進する調節機構に従属している可能性を示唆している。

【0128】

シバクロンブルーのP2X₃レセプターへの結合が、迅速な構造的変化を導き、結果としてATP-仲介P2X₃レセプター活性化の増強となることが信じられている。この構造的変化はまた、アロステリック調節および機能的脱感作が、連続して起こり、共通の活性機構を共有しうるように、よりゆっくりとした、レセプターの脱分極状態における長期間の効果を仲介する。

【0129】

以上を考慮して、本発明は、シバクロンブルーが、アゴニスト強度および効力を増強し、同様に急性アゴニスト誘導脱感作に続くレセプター再感作を促進することで、ヒトおよびラットP2X₃レセプターを選択的に調節するという新規発見に関する。したがって、もし望むならば、たとえば感覚障害試験で、レセプターを調節し、同様に脱感作を促進するために、またはこれらの2つの効果の内のどちらかを実施するために、シバクロンブルーを患者に投与してよい。

【0130】

治療的な関わり合い

本発明にしたがって、たとえば侵害受容(すなわち痛みを感じる)を減少させるために患者にP2レセプターアンタゴニストを末梢に投与してもよい。たとえば、TNP-ATP(すなわち強力なP2Xレセプターアゴニスト)を、患者での急性または持続性の侵害受容を減少させるために使用してよい。

【0131】

末梢に投与したTNP-ATPは、末梢侵害神経伝達へのP2X₃および/またはP2X_{2/3}レセプター両方の寄与に対する証拠を提供するホルマリン(すなわち炎症刺激)試験において、急性および持続性侵害受容両方を減ずる。この観点は、*in vitro*でのP2X₃およびP2X_{2/3}レセプター活性化を特異的に増強する、および*in vivo*で急性および持続性侵害受容両方を増強するシバクロンブルーの能力によって支持される。

【0132】

*in vivo*でのシバクロンブルーの前侵害受容性効果は、P2X₃レセプター機能を変更しない、他のスルホン酸アントラキノン誘導體、反応性オレンジは皮内ホルマリンの侵害受容性効果を増強しないので、薬理的に特別であることが明らかである。

【0133】

まとめると、以上を考慮し、以下に示す実施例によって明らかになるように、カプサイシン-感受性一次感覚神経上にとても局在している(Vulchanovara, *Neuropharmacol.* 36:1229-1242(1997))、ATP-ゲート制御P2X₃およびP2X_{2/3}レセプターの活性化は、侵害受容神経伝達に寄与している。P2Xレセプターアゴニストの末梢投与は、研究室動物で急性侵害受容応答を起こし、本明細書で例示したようなカラゲーナン、ホルマリンおよびカプサイシンを含む他の毒性刺激の侵害受容効果を増強する(また、Bland-Ward他、*Br. J. Pharmacol.* 122:366-371(1997)、Hamilton他、*Br. J. Pharmacol.* 126:326-332(1999)、Sawynok他、*Eur. J. Pharmacol.* 330:115-121(1997)、Tsuda他、*Br. J. Pharmacol.* 127:449-456(1999)、Tsuda他、*Br. J. Pharmacol.* 128:1497-1504(1999)も参照のこと)。末梢に投与したTNP-ATPが、ラットホルマリン試験での急性および持続性侵害受容両方を減衰させるという証明が、P2X₃および/またはP2X_{2/3}レセプター両方の末梢侵害受容神経伝達への寄与に関する証拠を提供する。この概念はさらに、シバクロンブルーの、

10

20

30

40

50

*in vitro*でのP2X₃およびP2X_{2/3}レセプター活性化を選択的に増強し、*in vivo*で急性および持続性の痛みの両方を増強させる能力によって支持される。したがって、TNP-ATPおよびシバクロンブルーによる、P2レセプターアゴニスト(BzATP)によって、または炎症刺激(ホルマリン)によって産出された侵害受容応答の薬理的な調節により、侵害受容神経伝達におけるP2X₃および/またはP2X_{2/3}レセプター活性化の特異的な役割に関する証拠が提供される。

【0134】

以下で示した実施例は、本発明を実施するための特別な実施様態に関する。実施例は例示的な目的のためのもので提供され、任意の方法において、本発明の意図を制限するつもりはない。

10

【0135】

使用した数(たとえば量、温度など)に関連して、精度を保証するために努力がなされるが、しかしいくつかの実験的誤差および標準偏差がもちろん許容される。

【0136】

実施例 1

P2X₃ポリペプチドをコードすると考えられるヒトcDNA配列の確認

ラットP2X₃受容体の予想アミノ酸配列(NCBI配列番号1103623)を用いて、同様のポリペプチドについてコードしていると考えられるヒトDNA配列について調べた。6種類全ての可能な読取枠にDNA配列をダイナミックに翻訳することで、蛋白配列でヌクレオチドデータベースを検索することが可能なTBLASTNデータベース研究ツール(Altschul(1993), J. Mol. Evol. 36: 390-300)を用いた。遺伝子バンク(Genbank)配列標識部位(STS)データベースを調べることで、ラットP2X₃受容体の領域と高い相同度を有するポリペプチドをコードすると予想される読取枠を含む長さ229塩基対であるヒトゲノム断片が明らかになった。この断片について寄託された配列(遺伝子バンク寄託番号G03901)は以下の通りであった。

20

【0137】

【化1】

```

CCCGAATCGG TGGACTGCTT CTCCACTGTG GTCTGGTCGC TGGGGTACAC
TGGGTTGGTC AAAGCCGCGA TTTTCAGTGT AGTCTCATTC ACNTGNAGGC
GAAAGAGCTG GTGTTGTCAA GTTCTGACTA TGGGCAATGT CCTCTTTTGT
GACCCCATTT GACAGACTCA GCAGTGGGCG CCCATGACCT AGTCATGAGG
GGAGCCAGGA CATCTGTGTG ATCCCAAGG (SEQ ID NO:1)

```

30

上記配列中、「N」は塩基A、T、GおよびCのいずれかを表す。

【0138】

実施例 2

PX_{2/3}cDNAの5'末端の確認

この受容体について完全読取枠を単離すべく、G03901の配列に基づいて、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法で用いるプライマーを設計した。下記の反応で用いたプライマーは以下の通りであった。

40

【0139】

【化2】

プライマー 1s (SEQ ID. NO:2):

5'-TTTACCAACCCAGTGTACCC-3'

プライマー 2s (SEQ ID. NO:3):

5'-ACCACAGTGGAGAAGCAGTC-3'

プライマー 3as (SEQ ID. NO:4):

5'-GAATCGGTGGACTGCTTCTC-3'

プライマー 4as (SEQ ID. NO:5):

5'CGATTTTCAGTGTAGTCTCATTC-3'

10

プライマー 5as (SEQ ID. NO:6):

5'GGGTACTACTGGTTGGTAA-3'

5'RACE アンカー プライマー (SEQ ID. NO:7):

5'CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'

ユニバーサル アダプター プライマー (SEQ ID. NO:8):

5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

20

アダプター プライマー (SEQ ID. NO:9):

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

短縮 ユニバーサル アダプター プライマー (SEQ ID. NO:10):

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

5'hP2X₃ プライマー (SEQ ID. NO:11):

5'-CACCATGAACTGCATATCCGACTTC-3'

3'hP2X₃ プライマー (SEQ ID. NO:12):

5'CTAGTGGCCTATGGAGAAGGC-3'

30

【 0 1 4 0 】

配列 G 0 3 9 0 1 が一部を構成しているゲノム領域由来の cDNA の 5' 末端を確認するため、RACE 法 (cDNA 末端の急速増幅) (Frohman et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8998-9002) を用いた。RT-PCR 段階から確認した cDNA の延長を、5' RACE (登録商標) 試薬系 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて行った。ヒト脳下垂体組織由来のポリ A + RNA (カタログ番号 65894-1、ロット番号 6080167; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) 1mg を、上記のキットで提供された試薬を用いる反応で使用し、RNA 1 μL (1 μg) をプライマー 3as 3 μL (3 pmol) および Rnase を含まない水 (ジエチルピロカルボン酸すなわち DEPC で処理した水) 11 μL と混合し、70 °C で 10 分間加熱し、次に氷上で 1 分間経過させた。10 倍反応緩衝液 (200 mM Tris-HCl pH 8.4、500 mM KCl) 2.5 μL、25 mM MgCl₂ 3 μL、10 mM dNTP ミックス 1 μL および 0.1 M DTT 2.5 μL を加えた。混合物を 42 °C で 2 分間インキュベートしてから、スーパースク립ト (Superscript) II (登録商標) 逆転写酵素 (Life Technolo

40

50

gies) 1 μ Lを加えた。反応液を42 でさらに30分間、70 で15分間、氷上で1分間インキュベートした。RNaseH 1 μ L(2単位)を加え、55 で20分間インキュベートした。cDNAを、キットに入っていたガラスマックス(Glass Max(登録商標))カラムを用いて精製した。カラムから蒸留水(dH₂O)50 μ LにcDNAを溶出させ、凍結乾燥し、dH₂O 21 μ Lに再懸濁させた。以下の反応でcDNAのテーリングを行った。すなわち、dH₂O 7.5 μ L、反応緩衝液(200 mM Tris-HCl pH 8.4、500 mM KCl)2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 1.5 μ L、2 mM dCTP 2.5 μ L、cDNA 10 μ Lを94 で3分間、氷上で1分間、次に37 で10分間インキュベートした。最後に、混合物を70 で10分間インキュベートしてから氷上に置いた。

10

【0141】

cDNAのPCR増幅を以下の段階で行った。10倍ジーンアンプ(Gene Amp)(登録商標)PCR緩衝液(Perkin Elmer, Foster City, CA)(500 mM KCl、100 mM Tris-HCl pH 8.3、15 mM MgCl₂ および0.01% (w/v)ゼラチン)5 μ L、10 mM dNTPミックス1 μ L、アンカープライマー1 μ L(10 pmol)、プライマー5as 1 μ L(10 pmol) およびdH₂O 35 μ Lを含む反応液に、cDNA 5 μ Lを入れた。反応液を1分間95 まで加熱し、80 に2分間維持し、その間にアンプリタック(Ampli taq(登録商標))ポリメラーゼ(Perkin-Elmer)0.5 μ L(2.5単位)を加えた。94 で15秒間、52 で20秒間、72 で1分間という条件下に反応を35周期行った。

20

【0142】

増幅後、製造業者の説明に従って、キアクイック(QiaQuick)(登録商標)PCR産物精製システム(Qiagen, Inc., Chatsworth CA)を用いて、反応生成物を精製した。生成物をTE緩衝液(10 mM Tris、1 mM EDTA pH 8.0)50 μ Lでカラムから溶出し、溶出液1 μ LをPCRでの鋳型DNAとして用いて、後の単離用の特異的生成物のレベルを上昇させた。再増幅には、10倍ジーンアンプ(登録商標)PCR緩衝液5 μ L、10 mM dNTPミックス1 μ L、汎用増幅プライマー1 μ L(10 pmol)、プライマー4as 1 μ L(10 pmol) およびdH₂O 40.5 μ Lも含めた。反応液を95 で1分間加熱し、80 に維持しながらアンプリタック(登録商標)ポリメラーゼ0.5 μ L(2.5単位)を加えた。94 で15秒間、50 で20秒間、72 で1分間という条件下に反応を35周期行った。増幅生成物を、0.8%アガロースゲル電気泳動を用いて分析し、長さ約1.3キロ塩基対の支配的生成物を検出した。この生成物をゲルから掻き取り、キアクイック(登録商標)精製システムを用いて精製した。生成物をdH₂O 50 μ Lでカラムから溶出し、凍結乾燥して容量10 μ Lとした。

30

【0143】

得られたDNA 3 μ Lを、14 で終夜インキュベートしたpCR2.1ベクター(In vitrogen, Carlsbad, CA)とともに連結反応に用いた。連結生成物を用いて、標準的な製造業者プロトコールに従って、クロニングキットから大腸菌の形質転換を行った。プラスミドのEcoRI消化を用いて、得られたクロンの挿入サイズを測定し、PCR生成物に近い大きさの挿入物を含むクローンについて、蛍光染料-読み終り暗号試薬(プリズム(Prism;登録商標)、Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA) およびアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)373型DNA配列決定装置を用いて配列決定を行った。pCR2.1ベクターからのEcoRI部位を含む5' RACE生成物の配列を図1に示してある(配列番号13)。増幅配列(amp limer)(汎用増幅プライマーおよびプライマー4asへの相補配列)の配列に下線を施してある。

40

【0144】

50

実施例 3

P2X₃ cDNAの3'末端の確認

ヒトP2X₃受容体をコードする読取枠の終止コドン周囲の配列を確認するため、ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies)の3'RACE(登録商標)システムを、STS G03901に対して設計されたプライマーとともに用いた。下垂体組織由来のポリA+RNA(500ng)(上記の実施例2参照)を以下のような反応で用いた。そのRNAとアダプタープライマー10ピコモルを最終容量12μLのdH₂O中で混合した。この混合物を70℃で10分間加熱し、次に氷上で1分間冷却した。10倍PCR緩衝液(200mM Tris-HCl pH8.4、500mM KCl)2μL、25mM MgCl₂2μL、10mM dNTPミックス1μLおよび0.1Mジチオトレイトール2μLという成分を加えた。反応液を42℃で2分間平衡としてから、スーパークリプトII(登録商標)逆転写酵素1μL(200単位)を加え、42℃でのインキュベーションを50分間続けた。反応液を70℃で15分間インキュベートすることで反応停止し、氷上で冷却した。RnaseH(1μL;2単位)を加え、混合物を37℃で20分間インキュベートし、氷上で保存した。

【0145】

P2X₃ cDNAの3'末端の増幅を、以下の反応で行った。10倍ジーンアンプ(登録商標)PCR緩衝液5μL、10mM dNTPs 1μL、プライマー1s 1μL(10ピコモル)、簡易汎用増幅プライマー(AUAP)1μL(10ピコモル)およびdH₂O 39.5μLを含むPCR混合物中で、上記で合成した第1のcDNA鎖2μLを用いた。反応液を1分間にわたり95℃まで加熱し、80℃で2分間維持しながら、その間にアンプリタック(登録商標)ポリメラーゼ0.5μL(2.5単位)を加えた。94℃で15秒間、54℃で20秒間、72℃で2分間という条件下に反応を35周期行った。その周期後、反応液を70℃で10分間インキュベートし、4℃で保存した。

【0146】

増幅後、製造業者の説明に従って、キアクイック(登録商標)PCR産物精製システムを用いて、反応生成物を精製した。生成物をTE緩衝液(10mM Tris、1mM EDTA pH8.0)50μLでカラムから溶出し、溶出液1μLをPCRでの鋳型DNAとして用いて、後の単離用の特異的生成物のレベルを上昇させた。再増幅には、10倍ジーンアンプ(登録商標)PCR緩衝液5μL、10mM dNTPミックス1μL、AUAP 1μL(10pmol)、プライマー2s 1μL(10pmol)およびdH₂O 40.5μLも含めた。反応液を95℃で1分間加熱し、80℃に維持しながらアンプリタック(登録商標)ポリメラーゼ0.5μL(2.5単位)を加えた。94℃で15秒間、54℃で20秒間、72℃で2分間という条件下に反応を35周期行った。増幅生成物を、0.8%アガロースゲル電気泳動を用いて分析し、長さ約700塩基対の支配的生成物を検出した。この生成物をゲルから掻き取り、キアクイック(登録商標)精製システムを用いて精製した。生成物をdH₂O 50μLでカラムから溶出し、凍結乾燥して容量10μLとした。

【0147】

得られたDNA3μLを、15℃で3.5時間インキュベートしたpCR2.1ベクター(Invitrogen)とともに連結反応に用いた。連結生成物を用いて、クローニングキットから大腸菌の形質転換を行った。プラスミドのEcoRI消化を用いて、得られたクローンの挿入サイズを測定し、PCR生成物に近い大きさの挿入物を含むクローンについて、蛍光染料-読み終り暗号試薬(プリズム、Applied Biosystems)およびアプライド・バイオシステムズ373型DNA配列決定装置を用いて配列決定を行った。pCR2.1ベクターからのEcoRI部位を含む3'RACE生成物の配列を図2に示してある(配列番号14)。この配列において、増幅配列(AUAPおよびプライマー2sへの相補配列)の配列に下線を施してある。

【0148】

実施例 4

ヒト P2X₃ の完全読取枠を含む cDNA の単離

ヒト P2X₃ メッセージの開始コドンおよび終止コドン周囲の配列に関するデータを用いて、オリゴヌクレオチドプライマーを設計・合成して、mRNA の完全読取枠の RT-PCR ができるようにした。5' hP2X₃ および 3' hP2X₃ と称されるこれらプライマーの配列は上記で示してある。実施例 3 に記載の下垂体 cDNA の一部 (2 μL) について PCR 増幅を行った。増幅において校正熱安定ポリメラーゼ (クローニング Pfu DNA ポリメラーゼ、Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、高忠実性増幅ができるようにした。反応混合物は、cDNA 2 μL、10 倍クローニング Pfu ポリメラーゼ反応緩衝液 (200 mM Tris-HCl (pH 8.8)、100 mM KCl、100 mM (NH₄)₂SO₄、20 mM MgSO₄、1% Triton X-100、1 mg/mL ヌクレアーゼを含まないウシ血清アルブミン) 5 μL、dNTP ミックス 1 μL、5' hP2X₃ プライマー 1 μL (10 ピコモル)、3' hP2X₃ プライマー 1 μL (10 ピコモル) および dH₂O 39.5 μL からなるものであった。反応液を 1 分間にわたり 95 °C まで加熱し、80 °C で 2 分間維持しながら、その間にクローニング Pfu ポリメラーゼ 0.5 μL (1.25 単位) を加えた。94 °C で 20 秒間、52 °C で 20 秒間、72 °C で 3.5 分間という条件下に反応を 35 周期行った。その周期後、反応液を 70 °C で 10 分間インキュベートした。

【0149】

反応生成物を 0.8% アガロースゲルで分離し、約 1.2 kb の生成物を掻き取り、キアquick (登録商標) ゲル精製システムを用いて精製した。DNA を dH₂O 50 μL で溶出し、凍結乾燥し、dH₂O 10 μL に再懸濁した。この DNA 1 μL を再増幅反応で用い、その反応でも 10 倍 Pfu 反応緩衝液 5 μL、dNTP ミックス 1 μL、5' hP2X₃ プライマー 1 μL (10 ピコモル)、3' hP2X₃ プライマー 1 μL (10 ピコモル) および dH₂O 40.5 μL を含有させた。反応液を 1 分間にわたり 95 °C まで加熱し、80 °C で 2 分間維持しながら、その間にクローニング Pfu ポリメラーゼ 0.5 μL (1.25 単位) を加えた。94 °C で 20 秒間、52 °C で 20 秒間、72 °C で 3.5 分間という条件下に反応を 15 周期行った。その周期後、反応液を 70 °C で 10 分間インキュベートした。

【0150】

反応生成物を 0.8% アガロースゲルで分離し、約 1.2 kb の生成物を掻き取り、キアquick (登録商標) ゲル精製システムを用いて精製した。DNA を dH₂O 50 μL で溶出し、凍結乾燥し、dH₂O 15 μL に再懸濁した。得られた精製 PCR 生成物 3 μL を、pCR スクリプト (pCR script; 登録商標) クローニングシステム (Stratagene) を用いる連結反応で用い、その液では pCR スクリプト (登録商標) AmpSK (+) ベクター 0.5 μL (5 ng)、SrfI 制限酵素 1 μL (5 単位)、T4 DNA リガーゼ 1 μL (4 単位) および dH₂O 3 μL も含有させた。反応混合物を室温で 1 時間、次に 65 °C で 10 分間インキュベートした。

【0151】

標準的な製造業者のプロトコールに従い、この反応生成物 1 μL を用いて、XL-2 ブルー万能細胞 (XL-2 blue ultracompetent cells; Stratagene) の形質転換を行った。得られたクローンを制限分析によってスクリーニングし、蛍光染料-読み終り暗号試薬 (プリズム、Applied Biosystems) およびアプライド・バイオシステムズ 310 型 DNA 配列決定装置を用いて配列決定を行った。完全読取枠の配列を図 3 に示してある (配列番号 15)。本発明のヒト P2X₃ の予想される蛋白配列 (配列番号 16) と相当するラットポリペプチドのもの (配列番号 17) との比較を図 4 に示してある。

【0152】

実施例 5

アフリカツメガエル卵母細胞中の組換え P2X₃ 受容体の発現および電気泳動分析
アフリカツメガエルの卵母細胞を準備し、本発明の受容体 DNA を注射し、前述の手順 (50

Briggs et al., (1995), supra) に従って、2 電極電圧クランプを用いて受容体応答を測定した。卵母細胞は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを含む通常のバース (Barth) 液 (90 mM NaCl、1 mM KCl、0.66 mM NaNO_3 、0.74 mM CaCl_2 、0.82 mM MgCl_2 、2.4 mM NaHCO_3 、2.5 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 10 mM NaN - (2 - ヒドロキシ - エチル) - ピペラジン - N' - (2 - エタンスルホン酸) (「HEPES」) 緩衝液、最終 pH 7.55) 中 17 ~ 18 に維持した。しかしながら一部の実験では、細胞の電位を意図的に変動させて、応答電流 - 電圧の関係を確認した。卵母細胞から 200 ~ 400 μm 内に配置したコンピュータ制御電磁弁およびプッシュプル式アプリケーションを用いて、作働薬を簡単に加えた。作働薬投与と同時に、コンピュータによって応答を記録した。プッシュプル式アプリケーションに作働薬とともに拮抗薬を入れ、作働薬投与前に 3 分間以上にわたって過融解することで浴に加えた。ピーク振幅を測定することで、応答を測定した。

【0153】

卵母細胞中に注射するための DNA は、実施例 2 に記載の方法に従って製造した pCDNA3.1 から P2X₃ 挿入物であった。製造業者の説明に従ってキアゲンマキシプレブ (QIAGEN maxiprep) DNA 製造システムを用いて、クローンを成長させ、大量製造した。DNA をエタノール沈殿させ、TE 緩衝液に再懸濁させた。

【0154】

ヒト P2X₃ 受容体の機能分析用に、上記の方法に従って製造したヒト P2X₃ DNA 10 ng をアフリカツメガエル卵母細胞の核に注射した。注射後、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを含む通常のバース液中で 2 ~ 7 日間にわたって卵母細胞をインキュベートした。次に 10 μM ATP に対する応答を記録した。

【0155】

上記の発現および分析の結果は、本発明の受容体が機能性であることを示している。ヒト P2X₃ DNA を注射した卵母細胞は、混合伝導度カチオン電流 (100 ~ 6000 nA) を示すことで ATP の細胞外投与に対して応答した。該当する量の水を注射した卵母細胞は、ATP に応答しなかった。0.7 μM という大体の ATP EC₅₀ が、これら卵母細胞からの濃度 - 応答関係 (0.01 ~ 1000 μM) から得られた。ATP 誘発電流 - 電圧関係も、これらの卵母細胞から記録した。これらは約 0 mV の逆電位を示し、負の膜電位で顕著な内向き整流が記録された。

【0156】

別の P2X 受容体作働薬である、 α - メチレン - ATP は、ATP によって喚起されたものと同様の最大電流を誘発した。ただし、その強度はわずかに低かった (EC₅₀ = 2.1 μM)。第 3 の P2X 受容体作働薬である 2 - メチルチオ - ATP の投与は、ATP および α - メチレン - ATP よりわずかに強力であった (EC₅₀ = 0.4 μM)。非特異的 P2X 受容体拮抗薬であるスラミンまたはピリドキサル - ホスフェート - 6 - アゾフェニル - 2', 4' - ジスルホン酸 (PPADS) を投与することで、応答の機能的拮抗を測定した。いずれの拮抗薬も、ATP (0.3 μM) 誘発電流の完全遮断を生じ、スラミンの方が PPADS (IC₅₀ = 1 μM) と比較して高い効力 (IC₅₀ = 0.3 μM) を示した。

【0157】

要約すると、アフリカツメガエル卵母細胞へのヒト P2X₃ 受容体 DNA の注射によって、細胞表面での機能性 P2X₃ 受容体の発現とこれら受容体のリガンド依存性非特異的カチオンチャンネルとしての機能が生じた。これらの受容体は細胞外 P2 受容体作働薬に応答し、効力の順位は 2 - メチルチオ - ATP > ATP > α - メチレン - ATP であった。これらは内向き整流をも示し、P2 受容体拮抗薬である PPADS およびスラミンの両方によって遮断される。

【0158】

実施例 6

10

20

30

40

50

シバクロンブルー曝露後の細胞内カルシウムレベルの測定

記載がある場合、本実施例およびその後の全ての実施例について、以下の材料、細胞系および培地を使用する。

【0159】

材料

アデノシン5'-トリリン酸二ナトリウム(ATP)、2-メチルチオ-ATP四ナトリウム(2-meSATP)および2-メチレンATPニリチウム(2-meATP)はリサーチ・バイオケミカルズ・インターナショナル(Research Biochemicals International, Natick, MA)から入手した。2'-および3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)-ATPテトラエチルアンモニウム塩(混合異性体)(BzATP)およびシバクロンブルーは、シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)から入手した。G418硫酸塩は、カルバイオケム・ノババイオケム社(Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA)から入手した。ダルベッコの調整イーグル培地(D-MEM)(4.5mg/mLグルコースおよび4mM L-グルタミン含有)およびウシ胎仔血清(FBS)は、ハイクローン・ラボラトリーズ社(Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah)から入手した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(D-PBS)(1mg/mLグルコースおよび3.6mg/Lピルビン酸Naを含有、フェノールレッドは含有せず)、ハイグロマイシンおよびリポフェクタミンは、ライフ・テクノロジー社(Life Technologies, Grand Island, NY)から入手した。フルオ-4AM(Fluo-4AM)は、モレキュラー・プローブス社(Molecular Probes, Eugene, OR)から購入した。

10

20

【0160】

安定な細胞系および細胞培地

ラットP2X₃受容体cDNAは、以前発表された配列(Garcia-Guzman et al., Brain Res. Mol. Brain. Res., 47: 59-66 (1997))と100%同一であった。ヒトP2X₃受容体は、ガルシア-グッツマンら(Garcia-Guzman et al., supra (1997))が報告したものと実質的に同一であった(遺伝子バンク寄託番号Y07683)。唯一の例外は、アルギニンがコードされていたアミノ酸残基126であった。発表されている配列はこの位置にプロリンがコードされている。ヒトP2X₃受容体クローニングの多重複製によって同じ配列が生じたことから、認められた相違はクローニングアーチファクトや配列決定の誤りによるものではないことが示唆された。rP2X₃およびhP2X₃受容体(それぞれ1321rX₃-3および1321hX₃-11)を安定に発現する1321N1ヒト星状細胞腫細胞を、標準的な脂質介在トランスフェクション法を用いて構築した。いずれの細胞系も、10%FBSならびに1321rX₃-3および1321hX₃-11細胞、300μg/mL G418;および1321rX₂-1細胞、100μg/mLハイグロマイシンのような抗生物質を含むD-MEM中で維持した。5%CO₂を含む加湿雰囲気中37°Cで細胞を成長させた。

30

40

【0161】

細胞内Ca²⁺レベルの測定

サイトゾルCa²⁺濃度における作働薬介在の上昇に基づいて、P2X受容体機能を測定した。蛍光Ca²⁺キレート染料(フルオ-4)を、蛍光画像平板読取装置(Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR), Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いる96ウェル法での細胞内Ca²⁺の相対レベルの指標として用いた。細胞を96ウェル黒色壁組織培養プレートで集密状態まで成長させ、アセトキシメチルエステル(AM)型のフルオ-4(1μM)のD-PBS液を加えて23°Cで1~2時間経過させた。シバクロンブルー(4倍濃度50μL)を加え、3分後に作働薬(4倍濃度50μL)を加えた(最終容量=200

50

μL)。各実験を通して1~5秒間隔で蛍光データを収集した。

【0162】

図5aに示したデータは、基底線蛍光と比較した相対蛍光単位でのピーク上昇に基づいたものである。全ての細胞種についての濃度-効果曲線は、シバクロンブルー非存在下で測定した最大ATP介在信号のパーセントとして示してある。濃度応答データを、グラフパッド・プリズム(GraphPad Prism, San Diego, CA)での4パラメタロジスティックヒル式を用いて解析した。データはいずれも平均 \pm 測定標準誤差(sem)として表している。 pIC_{50} 値に基づく学生t検定($P < 0.05$)を用いて統計解析を行った。

【0163】

データから明らかなように、ATP活性化によって細胞質 Ca^{2+} に急速かつ一時的上昇が生じた。 Ca^{2+} 流入曲線の形状は、アフリカツメガエル卵母細胞で測定された電気生理学的データ(下記の実施例9参照)と定性的に類似しており、既報の所見(Bianchi et al., 1999)と一致していた。シバクロンブルー($10\mu\text{M}$)とともに細胞を3分間前インキュベーションすることで、 Ca^{2+} 流入(図5a)および膜間電流(図5b)の両方で測定した最大ATP活性化応答(E_{max})の大きさに3~7倍の上昇があった。シバクロンブルーが介在することで、ラット $P2X_3$ 受容体同族体を発現する細胞を用いた最大ATP応答における同様の307倍の強化があった(データは示していない)。

【0164】

パイロット試験から、シバクロンブルー効果の開始は1分未満で起こったことが示されたことから、3分間の投与前期間を選択して、完全な活性を得るようにした。シバクロンブルー単独では、 $200\mu\text{M}$ 以下の濃度で Ca^{2+} 流入に対する固有の効果は示されず、 1mM 以下の濃度ではアッセイ緩衝液(pH7.2)のpHに対して測定可能な影響を与えなかった。 1mM 以下のシバクロンブルー濃度は $1321\text{N}1$ 細胞で発現される $hP2X_1$ 、 $hP2X_2$ および $hP2X_7$ 受容体の作働薬活性化に変化を与えなかったことから(データは示していない)、シバクロンブルーの強化効果は $P2X_3$ 受容体に対して特異的であった。シバクロンブルー($10\mu\text{M}$)は、既報のように(Miller et al., 1998)、最大以下濃度の作働薬存在下で、 $hP2X_4$ 受容体介在 Ca^{2+} 流入のATP活性化強化を促進した。しかしながら、最大ATP活性化 $hP2X_4$ 応答には上昇は認められなかった。

【0165】

実施例7

シバクロンブルーへの曝露後における受容体電気生理学の特性決定

電気生理学

アフリカツメガエル卵母細胞で発現される $hP2X_3$ 受容体サブタイプについて、標準的な2電極電圧クランプ法を用いて特性決定を行った。すなわち、卵母細胞から覆っている胞細胞を剥離し、各卵母細胞に対してcDNA 12nL ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$)の核内注射を行った。卵母細胞を用いて注射後1~5日間の記録を行い、 96NaCl 、 2.0KCl 、 1.8CaCl_2 、 1.0MgCl_2 、 5.0 ピルビン酸Naおよび 5.0 Na-Hepes (pH7.4) (単位はmM)を含む標準記録液で灌流した($3.5\text{mL}/\text{分}$)。電極($1.5\sim 2.0\text{M}$)を 120mM KCl で満たした。灌流室中で卵母細胞付近に配置した電磁駆動薬剤投与ピペットを用いてATPを加えた。ATPを3.5分ごとに加え、投与時間は代表的には5秒間続くようにした。薬剤ピペットからATPを同時投与する前に少なくとも3分間にわたって、シバクロンブルーを浴に入れた。細胞を -60mV で電圧クランプした。データを取得し、pClampソフトウェア(Axon Instruments, Foster City, CA)を用いて解析を行った。

【0166】

図5bのデータから明らかなように、シバクロンブルー($1\mu\text{M}$)によって、 $1\mu\text{M A}$ TP活性化電流のピーク振幅が対照の $213\pm 49\%$ まで強化された(図5b)。 $hP2$

10

20

30

40

50

X₃ 受容体介在膜間電流の E_{m a x} に対するシバクロンブルーの効果は長期的であったことから、シバクロンブルーへの短時間の(1分間)曝露から9分間まで完全強化が認められた。シバクロンブルー強化効果の開始は急速であった(<1分; データは示していない)。シバクロンブルーと ATP を同時投与することで、3分間の前インキュベーション期間後に観察されたものより見かけの強度および E_{m a x} は低かったが、Ca²⁺ 流入信号の強化が生じた。シバクロンブルー(10 μM)には、ATP 活性化 Ca²⁺ フラックス応答の動態(図5a)や hP2X₃ 受容体の急性脱感作動態(図5b)に対する見かけ上の効果はなかった。

【0167】

シバクロンブルーによる ATP 活性化 hP2X₃ 受容体の強化は濃度依存的であり(図6)、半最大応答(EC₅₀)の観察値は 1.4 ± 0.5 μM であった(図6)。ATP 活性化 hP2X₃ 受容体応答の E_{m a x} 上昇以外に、シバクロンブルーは ATP 濃度-効果曲線の濃度依存的左方向移動も引き起こした(図6)。3 μM のシバクロンブルーが存在した場合に、ATP 活性化 hP2X₃ 受容体信号の大きさは3倍強上昇し(E_{m a x} = 330 ± 5%)、ATP の EC₅₀ は 356 ± 100 nM から 46 ± 8 nM まで低下した(図6)。

【0168】

強化に介在するのに必要なシバクロンブルーの EC₅₀ は、hP2X₃ 受容体を活性化するのに用いられる作働薬とは無関係に類似していた。いずれも P2X₃ 受容体に対する作働薬であることが知られている最大(10 μM)濃度の ATP、BzATP、2-meSATP または -meATP による hP2X₃ 受容体活性化の E_{m a x} は、全てのシバクロンブルー濃度で同様であった(図7)。シバクロンブルーは、以前に ADP、UTP および UDP (100 μM、データは示していない)などの P2X₃ 受容体で不活性化であることが示されている(Garcia-Guzman et al., supra (1997); Bianchi et al., Eur. J. Pharmacol. 376: 127-138 (1999))ヌクレオチドに対して作働薬活性を示さなかった。シバクロンブルーの強化効果は、タプシガルギンを用いた細胞内 Ca²⁺ 蓄積の消耗によって影響されなかったが、過剰の細胞外 EGTA 存在下で完全に消失したことから、ATP 活性化応答の強度上昇は細胞膜を通る Ca²⁺ 流量上昇によるものであったことが示唆された(データは示していない)。

【0169】

実施例 8

ATP による受容体活性化に対するトリアゼン染料の強化能力

バシレンブルー(basilene blue)、リアクティブブルー5、リアクティブレッド2、リアクティブオレンジ14およびリアクティブイエロー2などの構造的にシバクロンブルーと関係があるトリアゼン染料について、ATP による hP2X₃ 受容体活性化強化能力を調べた(図8)。リアクティブオレンジ14およびリアクティブイエロー2はほとんど強化活性を示さなかったが、バシレンブルー、リアクティブブルー5およびリアクティブレッド2は、有意な hP2X₃ 受容体強化を介在した。アントラキノンスルホン酸誘導体であるバシレンブルーおよびリアクティブブルー5は、シバクロンブルーと同様の hP2X₃ 受容体強化の半最大濃度を示した(それぞれ EC₅₀ 値は 1.2 ± 0.6 μM および 1.4 ± 0.5 μM)。リアクティブレッドは、ATP による hP2X₃ 受容体活性化の強化剤としての効力は有意に低かった(EC₅₀ = 50 ± 10 μM)(図8)。調べたトリアゼン染料で本来蛍光性のものはなく、1 mM 以下の濃度でアッセイ緩衝液の pH に影響するものはなかった。

【0170】

実施例 9

PPADS の阻害活性に対するシバクロンブルーの効果およびシバクロンブルーの強化活性に対する PPADS の効果

非選択的 P2 受容体拮抗薬である PPADS による hP2X₃ 受容体の阻害が既報の報告

10

20

30

40

50

で示されている (Garcia - Guzman et al. , Brain Res . Mol . Brain Res . 47 : 59 - 66 (1997)) 。シバクロンブルー非存在下で P P A D S は、A T P 介在 h P 2 X₃ 活性化を阻害し、半最大濃度 (I C₅₀) は $8.6 \pm 3 \mu\text{M}$ であった (図 9 a) 。 $10 \mu\text{M}$ シバクロンブルーで h P 2 X₃ 発現細胞を前処理することで、P P A D S の最大 A T P 活性化シグナル (E_{m a x} = $437 \pm 6\%$) および見かけの I C₅₀ ($51 \pm 3 \mu\text{M}$) の両方が上昇した。シバクロンブルーが A T P の有効強度を高めることでこの効果を介在するか否かを確認するため、1、3、10 または $30 \mu\text{M}$ の A T P を用いて実験を行った。いずれの A T P 濃度でもシバクロンブルーによって、P P A D S 濃度 - 効果曲線に同様の濃度依存的右方向移動が生じた。例えば、シバクロンブルー非存在下では、各 A T P 濃度での P P A D S の見かけの I C₅₀ 値は $3.64 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{M}$ A T P)、 $3.11 \pm 1.0 \mu\text{M}$ ($3 \mu\text{M}$ A T P)、 $4.81 \pm 1.1 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{M}$ A T P)、 $2.67 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ($30 \mu\text{M}$ A T P) であり、P P A D S が P 2 X₃ 受容体で非競合的拮抗薬であることが確認された。同様に、 $100 \mu\text{M}$ 以下のシバクロン濃度で、P P A D S は A T P と非競合的であることが認められた (データは示していない) 。従って、P P A D S の阻害効力に対するシバクロンブルーの効果は A T P 濃度依存的であることが認められ、シバクロンブルーと P P A D S が h P 2 X₃ 受容体で相互排他効果を示すことが示唆された。

【 0 1 7 1 】

この実験に関して、h P 2 X₃ 受容体のシバクロンブルー強化に対する P P A D S の効果を求めた (図 9 b) 。 P P A D S によってシバクロンブルー濃度 - 効果曲線の濃度依存的な右方向への移動が生じ、同時に A T P 活性化の初期強度が低下した (図 9 b) 。 A T P 活性化 h P 2 X₃ 受容体を完全に阻害するのに $50 \mu\text{M}$ P P A D S で十分であったが、シバクロンブルーは、濃度依的に P P A D S の阻害活性を打ち消した。

【 0 1 7 2 】

実施例 1 0

非脱感作受容体および急性脱感作受容体における受容体活性調節剤としてのシバクロンブルーの効果

h P 2 X₃ 受容体活性の調節剤としてのシバクロンブルーの効力を、非脱感作受容体および急性脱感作受容体で求めた (図 1 0) 。 $1321\text{N}1$ - h P 2 X₃ 細胞を 1 分間にわたって $10 \mu\text{M}$ A T P に曝露して、h P 2 X₃ 受容体の急性脱感作を行った。図 1 0 に示したように、非脱感作 h P 2 X₃ 受容体を完全に強化するのに必要なシバクロンブルーの E C₅₀ は $1.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ であった (図 1 0) 。しかしながら、急性脱感作 h P 2 X₃ 受容体は、シバクロンブルー介在強化に対する感受性が低いように見えたことから (E C₅₀ = $6.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$)、最大シグナルを得るには $100 \mu\text{M}$ シバクロンブルーが必要であった。h P 2 X₃ 受容体の初期状態 (非脱感作または急性脱感作) とは無関係に、シバクロンブルー前処理によって最終的には同様の作働薬活性化最大活性が得られたことから、受容体蓄積の程度はいずれの条件下でも同等であることが示唆された (図 1 0) 。

【 0 1 7 3 】

実施例 1 1

h P 2 X₃ 受容体発現細胞を A T P ($10 \mu\text{M}$) で 1 分間前処理することで脱感作し、洗浄して細胞外 A T P を除去し、シバクロンブルーの存在下または非存在下に各種期間にわたってインキュベーションした後に、脱感作受容体に A T P を再負荷した。図 1 1 a は、脱感作直後 (時間 1 . 5 分) には第 2 の A T P 負荷に対する h P 2 X₃ 応答がないことを示している。脱感作とその後の A T P 負荷の間のインキュベーション時間を延長すると、h P 2 X₃ 受容体活性が徐々に回復することが認められ、6 1 . 5 分までに対照 (非脱感作) シグナルに近づいた。

【 0 1 7 4 】

A T P 誘発脱感作後のインキュベーション期間中における $50 \mu\text{M}$ シバクロンブルー添加は、A T P の見かけの効力および脱感作からの回復速度の両方を高めるように見えた (図 1 1 b) 。シバクロンブルーとともに 1 5 分間インキュベーションした後は、脱感作細

胞は対照（非脱感作）細胞と比較してほぼ完全な活性を示したことから、脱感作後の不応期がかなり短いことが示された。留意すべき点として、インキュベーション緩衝液にシバクロンブルーを含有させることで、i) 脱感作からの $hP2X_3$ 受容体の回復速度が上昇し、ii) 最終 E_{max} が上昇し、iii) 作働薬の効力が上昇した（図 11 b）。

【0175】

図 11 c には、 $50 \mu M$ シバクロンブルー存在下および非存在下での対照（非脱感作）シグナルのパーセントとしての急性脱感作後の各種時点での最大受容体シグナルを示してある（図 11 a および b における点線参照）。不応期の半期（ $t_{1/2}$ ）計算値（60 分で認められた活性の 50% を回復するのに要する時間と定義）は、シバクロンブルー非存在下で 15.9 分（ $K_t = 0.0436 / \text{分}$ ）であり、存在下で 2.6 分（ $K_t = 0.2626 / \text{分}$ ）であった。このようにシバクロンブルーは、脱感作からの $hP2X_3$ 受容体の回復速度を 6 倍上昇させる。

10

【0176】

実施例 12

BzATP の侵害受容効果

被験者：

体重 230 ~ 350 g の雄スプレーグ・ドーリーラット成体（Charles River, Wilmington, MA）をケージ当たり 5 匹の群で飼育し、飼料および飲料水は自由に摂取させた。動物は、6:00 ~ 18:00 時間の 12 時間明 - 暗周期とした。動物は各実験につき 1 回のみ用いた。実験プロトコルおよび動物取り扱い手順はどれも、施設内動物ケア・使用委員会（institutional animal care and use committee: IACUC）による承認を受けた。

20

【0177】

薬剤

硫酸モルヒネを入手し（Mallinckrodt, Inc., St. Louis, MO）、0.9% 生理食塩水に溶かした。アデノシン 5' - 三リン酸二ナトリウム（ATP）、2 - メチルチオ - ATP 四ナトリウム（2-meSATP）および - メチレン ATP ニリチウム（-meATP）はリサーチ・バイオケミカルズ・インターナショナル（Research Biochemicals International, Natick, MA）から入手した。2' および 3' - O - (4 - ベンゾイルベンゾイル) - ATP テトラエチルアンモニウム塩（混合異性体）（BzATP）およびシバクロンブルー（リアクティブブルー - 2）は、シグマ・ケミカル社（Sigma Chemical Company, St. Louis, MO）から入手した。TNP - ATP およびフルオ - 4 AM は、モレキュラー・プローブス社（Molecular Probes, Eugene, OR）から購入した。化合物はいずれも溶解したばかりであり、0.9% 生理食塩水で希釈した。G418 硫酸塩は、カルバイオケム - ノババイオケム社（Calbiochem - Novabiochem Corp., La Jolla, CA）から入手した。ダルベッコの調整イーグル培地（D-MEM）（4.5 mg/mL グルコースおよび 4 mM L - グルタミン含有）およびウシ胎仔血清（FBS）は、ハイクローン・ラボラトリーズ社（Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah）から入手した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS）（1 mg/mL グルコースおよび 3.6 mg/L ピルビン酸 Na を含有、フェノールレッドは含有せず）、ハイグロマイシンおよびリポフェクタミンは、ライフ・テクノロジー社（Life Technologies, Grand Island, NY）から入手した。

30

40

【0178】

侵害受容試験

化学誘発持続性疼痛のホルマリン試験について既報の手順を用いて、侵害受容応答を評価した（Abbott et al., Pain 60: 91 - 102 (1995); Tjosens et al., Pain 51: 5 - 17 (1992)）。実験を行ったこと

50

ない動物を個々のプレキシガラスケージに入れ、30分間試験環境に馴致させた。その期間後動物には、ホルマリン溶液(1%、2.5%、5%)、各種用量のBzATP単独、またはTNP-ATPもしくはシバクロンブルーとの併用を、インシュリンゲージ(29G1/2)針を用いて右後足の背側表面に皮下注射した。注射容量は全ての投与で50 μ Lとした。急性侵害受容を評価するため、薬剤投与直後に動物を観察し、1分間にわたって萎縮(flinch)行動(足の引き込み)の回数を記録した。薬剤注射から最初の15~20分間にわたって、順次5分間隔でさらに観察を行った(I相、ホルマリン試験の急性相)。一部の試験については、ホルマリン注射から30分後に観察を開始し、その後20分間続けた(II相、ホルマリン試験の持続相)。各試験について、個別の実験群および対照群でラット6匹を用いた。平均累積萎縮応答を分散分析によって解析し、フィッシャーの最小有意差検定(GB-STAT、Dynamics Microsystem, Inc., Silver Spring, MD)を用いて後見的(post hoc)比較を行った。統計的有意差を $P < 0.05$ で求めた。

10

20

30

40

50

【0179】

ラット後足の背側表面へのBzATPの皮膚内投与(100~1000nmol/足)によって、用量依存性足萎縮応答が生じた(図12)。1000nmol/足のBzATP後の侵害受容足萎縮の大きさは、5%ホルマリンの急性皮膚内投与(ホルマリン試験のI相)後に観察されたものと同様であった。この効果の期間は短期であり、足萎縮応答の大半が薬剤注射後の最初の5分間に起こった。薬剤投与後20分までで、Bz誘発足萎縮応答数に関しては、媒体注射動物との間で有意差はなかった($P > 0.05$)。BzATPによっては、皮膚内ホルマリン投与(ホルマリン試験のII相)後に特徴的に認められるような長期防衛的(nocifensive)足萎縮行動の第2相は生じなかった(データは示していない)(Tjosens et al., Pain 51: 5-17 (1992); Sawynok et al., Eur. J. Pharmacol. 330: 115-121 (1997))。皮膚内BzATPがラットにおいて防衛的挙動を起こす能力は、全身投与モルヒネがBzATP(1000nmol/足)誘発後足萎縮を用量依存的に($ED_{50} = 4 \text{ mg/kg}$ 皮下注射)低減する能力によって裏付けられた(データは示していない)。

【0180】

BzATPの侵害受容効果は、他のP2受容体作働薬による代謝分解に対する感受性が低い、 γ -meATPなどの他のP2受容体作働薬の場合と同様であった(図13)(Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50: 413-492 (1999))。ATPおよび2meSATPなどの他のヌクレオチド作働薬も急性侵害受容足萎縮を生じたが(図13)、調べた用量での最大応答はBzATPの場合に認められたものより有意に小さかった(Bianchi et al., Eur. J. Pharmacol., 376: 127-138 (1999))、ADPの皮膚内投与によっては侵害受容応答は生じなかった($P > 0.05$)。このin vivo活性パターンは、in vitroで組換えラットP2X₃受容体を活性化する表現型P2受容体作働薬の以前の薬理的評価と一致する(Bianchi et al., supra (1999))。これらP2受容体作働薬についてのin vitroでの効力の順位は、BzATP($EC_{50} = 32 \text{ nM}$) > 2meSATP($EC_{50} = 220 \text{ nM}$) > ATP($EC_{50} = 340 \text{ nM}$) > γ -meATP($EC_{50} = 510 \text{ nM}$) >> ADP($EC_{50} > 100000 \text{ nM}$)であった(Bianchi et al., supra (1999))。ヒトP2X₃受容体についても同様の薬理的プロファイルが認められた(Bianchi et al., supra (1999))。

【0181】

実施例13

TNP-ATPの抗侵害受容効果

上記の実施例12は、ラットに対してTNP-ATPを投与するのに使用されるプロトコールを提供する。

【0182】

結果に関して、新規なP2X受容体拮抗薬であるTNP-ATPは、ラットP2X₃受容体を発現する1321N1細胞でBzATP刺激カルシウム電流を強力に阻害した(実施例1参照)。ヒトP2X₃受容体についての示したように(Lewis et al., B. r. J. Pharmacol. 124: 1463-1466 (1998))、末端リン酸基を順次除去することで、ラットP2X₃受容体での拮抗薬効力が大幅に低下し、TNP-AMPは30 μM以下の濃度ではほとんど阻害活性を示さない。これらP2X受容体拮抗薬における効力についての同様の順位が、ラットP2X_{2/3}受容体でも認められた(データは示していない)。

【0183】

皮膚内TNP-ATP(30~300 nmol/足)とBzATP(1000 nmol/足)をラット後足の皮膚表面に併用投与することで、侵害受容足萎縮行動に有意(P<0.05)かつ用量依存的な低下が生じた(図15)。TNP-ATPとBzATPの併用によってBzATP誘発足萎縮行動は低下しなかったことから、TNP-ATPの抗侵害受容効果は薬理的に特異的であるように思われる。

【0184】

同様に、TNP-ATPと5%ホルマリンをラット後足の皮膚表面に併用投与することで、ホルマリン試験の急性(I相)部分において防衛行動に用量依存的な低下が生じた(図16)。さらに、ホルマリン試験の持続期(II相)でもTNP-ATPの抗侵害受容効果が明らかであり、ホルマリン誘発足萎縮における有意な30%低下がTNP-ATPの両用量(30および100 nmol/足)で認められた。BzATPに対する抗侵害受容活性と一致して、TNP-ATPによって、ホルマリン試験の急性(I相)成分および持続性(II相)成分の両方で侵害受容応答が弱められたが、TNP-AMPではそれは認められなかった。

【0185】

実施例14

実施例6には、ラットP2X₃およびP2X_{2/3}受容体に対するシバクロンブルーの効果を評価するのに使用するプロトコルを記載してある。

【0186】

認められた結果に関して、ヒトP2X₃受容体でのアロステリック作用と一致して(上記実施例1および2参照)、シバクロンブルーによって、ラットP2X₃受容体を発現する1321N1細胞でBzATP(1 μM)および, -meATP(10 μM)の両方で刺激したカルシウム電流(それぞれEC₅₀値=580 nMおよび720 nM)において濃度依存性上昇が生じた(図17)。シバクロンブルーの最大促進効果が100 μM以下の濃度で観察されたが、それより高い濃度のシバクロンブルーでは結果が変動し、概してラットP2X₃受容体の作働薬活性化促進における効果が低かった(データは示していない)。この後者の現象は、シバクロンブルーの固有の拮抗薬活性によるものと考えられる(Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50: 413-492 (1998))。

【0187】

0.3~10 μMの濃度範囲でのシバクロンブルーによっても、BzATP(1 μM)および, -meATP(10 μM)によるラットP2X_{2/3}受容体の活性化が促進された(図17)。しかしながらこれらの効果は二相的であり、10 μMを超えるシバクロンブルー濃度ではP2X_{2/3}受容体の作働薬介在活性化の促進が低かった。さらに、30 μMを超えるシバクロンブルー濃度では、, -meATPのラットP2X_{2/3}受容体の活性化と拮抗した。シバクロンブルーはラットP2X_{2/3}受容体のBzATP介在および, -meATP介在の両方の活性化に対して同様の効果を示しており、, -meATPはP2X₂受容体を活性化しないことから、これら二相効果に対する相同P2X₂受容体の寄与は異なるように思われる(Lewis et al., Nature 377: 432-435 (1995); Binachi et al., Eur.

10

20

30

40

50

J. Pharmacol. 376: 127-138 (1999))。これら所見と一致して、シバクロンブルーはラット P2X₂ 受容体の ATP 誘発活性化のみを阻害することが認められた (IC₅₀ = 8 μM) (データは示していない)。

【0188】

さらにシバクロンブルーについては以前に、ヒト P2X₁、P2X₂ および P2X₇ 受容体の作働薬活性化を促進しないことが示されている (Alexander et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291: 1135-1142 (1999))。

【0189】

シバクロンブルーによって P2X₃ 受容体活性化に 10 倍の促進が生じたが、P2X_{2/3} 受容体活性化では最大で 2.5 ~ 4.5 倍の上昇が観察された。これらの異なる効果についての正確な理由は未解明であるが、シバクロンブルーの固有の拮抗薬活性 (Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50: 413-492 (1998)) が、P2X₃ 受容体および P2X_{2/3} 受容体の見かけのアロステリック促進の強さにおいて認められる差に寄与するものと考えられる。

【0190】

実施例 15

シバクロンブルーの侵害受容促進効果

特定濃度のシバクロンブルーは、上記で示した結果から明らかなように、*in vitro* でラットの P2X₃ および P2X_{2/3} 受容体の活性化を選択的に促進できることから、さらに試験を行って、シバクロンブルーがラットにおける BzATP の侵害受容効果を促進する能力を調べた。図 12 に示したデータと一致して、ラット後足への BzATP 単独の皮膚内投与 (10 ~ 300 nmol / 足) によって、侵害受容挙動に用量依存的上昇が生じた (図 17 a ~ d)。シバクロンブルー単独の皮膚内投与 (10 ~ 300 nmol / 足) によって、100 nmol / 足の用量で軽度であるが統計的に有意な侵害受容応答のみを生じた (図 18 a ~ d)。

【0191】

ラット後足へのシバクロンブルーと BzATP の皮膚内併用投与により、BzATP 単独での侵害受容効果と比較して侵害受容足萎縮行動に有意かつ二相の効果を生じた (図 18 a ~ d)。低用量の BzATP では (10 nmol / 足)、シバクロンブルーによって、BzATP 単独の効果と比較して、侵害受容応答に小さいが統計的に有意な (P < 0.05) 促進が生じた (図 18 a)。シバクロンブルーの侵害受容促進効果は、侵害受容性の非常に小さい用量の BzATP (30 nmol / 足) と組み合わせた場合に有意に大きくなった (図 17 b)。それより高い用量の BzATP (100 nmol / 足) では、シバクロンブルーが侵害受容を促進する能力は、30 nmol / 足の用量のみで認められた (図 17 c)。

【0192】

それとは対照的に、シバクロンブルーと高用量の BzATP (300 nmol / 足) とを皮膚内併用投与した場合、BzATP 単独の侵害受容効果と比較して、用量依存的な足萎縮応答阻害が生じた (図 18 d)。

【0193】

実施例 16

シバクロンブルーによるホルマリン侵害受容の促進

皮膚内 BzATP の侵害受容効果を促進する上で、中間用量のシバクロンブルー (30 および 100 nmol / 足) が最も効果的であることが認められたことから、これらの用量のシバクロンブルーについて、ホルマリン試験で侵害受容を促進する能力も調べた。ホルマリン試験の急性期 (I 相) では、皮膚内シバクロンブルー単独で、有意かつ用量依存的な侵害受容応答が生じた (図 16 a)。皮膚内シバクロンブルー (30 および 100 nmol / 足) と各種濃度のホルマリン (1、2.5 および 5%) を併用しても、ホルマリン単独の効果と比較して、ホルマリン試験の急性相 (I 相) での侵害受容が大きくなった (

10

20

30

40

50

図19a)。しかしながら、ホルマリンとシバクロンブルーの侵害受容効果間に有意な相互作用はみとめられなかったことから ($P > 0.05$)、これらの効果はホルマリンと相加的であるように思われた (図19a)。

【0194】

ホルマリン試験の持続的侵害受容成分 (I I相)の間、皮膚内シバクロンブルー単独では、有意な ($P < 0.05$) 侵害受容応答は生じなかった (図19b)。しかしながら、シバクロンブルー (30および100 nmol/足) とホルマリン (1および2.5%) とを併用投与することで、単独で投与したホルマリンまたはシバクロンブルーの侵害受容効果と比較して、有意に大きい足萎縮行動が生じた (図19b)。ホルマリン試験のこの持続性部分では、ホルマリンとシバクロンブルーの侵害受容効果間で相加性より有意に ($P < 0.05$) に大きい相互作用によって示されるように、シバクロンブルーは、1%および2.5%ホルマリンの侵害受容効果を高めた。非常に低い侵害受容用量のホルマリン (1%) では、シバクロンブルーの侵害受容促進効果は二相性であり、30 nmol/足のシバクロンブルーによって、それより高用量のシバクロンブルー (100 nmol/足) の場合と比較して、持続的侵害受容に有意に大きい促進が生じた (図19b)。5%ホルマリンを皮膚内投与することで、それより低用量のホルマリンと比較して有意に大きい侵害受容が生じたが、シバクロンブルーとその用量のホルマリンを併用投与しても、足萎縮行動はそれ以上促進されなかった。

10

【0195】

アロステリックに $P2X_3$ 受容体活性化を調節しない構造的に類似のシバクロンブルー類縁体であるリアクティブオレンジは (Alexander et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291: 1135-1142 (1999))、皮膚内投与後に単独では侵害受容を起こさず (30および100 nmol/足)、ホルマリンと併用投与した場合に急性または持続性の侵害受容足萎縮に対して効果を示さなかったことから、シバクロンブルーの侵害受容促進効果は薬理的に特異的であるように思われる。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例2の $P2X_3$ 5' RACE生成物の配列 (配列番号13) を表しており、プライマー配列は下線を付け、予測された開始コドン (ATG) はボールド体で示す。

30

【図2】

実施例3の $P2X_3$ 3' RACE生成物の配列 (配列番号14) を表しており、プライマー配列は下線を付け、予測された終止コドン (TAG) はボールド体で示す。

【図3】

ヒト $P2X_3$ 受容体ポリペプチドをコードする cDNA の完全読取枠の配列 (配列番号15) を表す。開始 (ATG) および終止 (TAG) コドンはボールド体で示す; プラスミド構成時に導入された、EcoRI (GAATTC) およびNot I (GCGCCGC) を含む 5' および 3' フランキング配列は下線を付けてある。

【図4】

ヒト (h $P2X_3$) (配列番号16) およびラット (r $P2X_3$) (配列番号17) 受容体ポリペプチドの整列させた予測アミノ酸配列を表す。同一残基は囲みで示してある。

40

【図5A】

ATP刺激を受けたヒト $P2X_3$ 受容体に仲介されたカルシウム流入に対する、シバクロンブルーの増強効果を示し、 Ca^{2+} インジケータFluo-4を装填した1321- $P2X_3$ 細胞は、シバクロンブルーの存在時 (実線) および不在時 (点線) に、ATPを用いて処理した。相対的な蛍光は、シバクロンブルーの不在時に得られた最大反応のパーセントとして示してある。

【図5B】

ATP刺激を受けたヒト $P2X_3$ 受容体に仲介されたカルシウム流入に対する、シバクロンブルーの増強効果を示し、h $P2X_3$ 受容体を発現するアフリカツメガエル卵母細胞は

50

、シバクロンブルーの不在時（大きい電流）および存在時（小さい電流）に、ATPを用いて攻撃した。ATPの添加は水平棒で表す。

【図6】

シバクロンブルー（CB）が、ATPに誘発されたhP2X₃受容体活性化の作用強度を濃度依存的に著しく上昇させることを示す。

【図7】

シバクロンブルーがhP2X₃受容体の活性化を増強する作用強度は、プロトタイプのP2X₃作働薬と同様であることを示している。

【図8】

各種トリアゼン染料を用いたhP2X₃受容体活性の増強作用を示す。

10

【図9A】

シバクロンブルーがPPADSの抑制活性を阻害することを示す。Aは、PPADSによるATP活性化hP2X₃受容体活性の抑制に関する濃度効果曲線は、シバクロンブルーの存在時と不在時に決定した。PPADSおよびシバクロンブルーは、3μMのATPを添加する前に、同時に加えた。

【図9A-1】

シバクロンブルーがPPADSの抑制活性を阻害することを示す。データはシバクロンブルーの各濃度で見られる最大信号に正規化されている。

【図9B】

シバクロンブルーがPPADSの抑制活性を阻害することを示す。Bは、3μM ATPによって活性化されたhP2X₃反応のシバクロンブルーによる増強作用の濃度効果曲線は、PPADSの存在時と不在時に決定した。

20

【図10】

シバクロンブルーが、hP2X₃受容体の脱感作からの回復速度を著しく上昇させることを示している。

【図11A】

シバクロンブルーが、hP2X₃受容体の迅速な脱感作からの回復速度を著しく上昇させることを示している。Aは、1321-hP2X₃細胞は、ATPまたはD-PBSを用いて前処理し（対照曲線）、過剰な細胞外ATPを除去するために2回洗浄し、各種濃度のATPで再攻撃する前に、表示した時間だけインキュベートした。

30

【図11B】

シバクロンブルーが、hP2X₃受容体の脱感作からの回復速度を著しく上昇させることを示している。Bは、1321-hP2X₃細胞は、ATPを用いて前処理し、過剰な細胞外ATPを除去するために2回洗浄し、各種濃度のATPで再攻撃する前に、表示した時間だけインキュベートした。

【図11C】

シバクロンブルーが、hP2X₃受容体の脱感作からの回復速度を著しく上昇させることを示している。Cは、受容体回復速度を時間に対する非脱感作反応の%の関数として示す。

【図12】

ラットにおける皮内BzATPの急性侵害効果の時間経過を示す。

40

【図13】

ラット後足への皮内投与後の、P2X受容体拮抗薬の急性侵害効果の用量-反応の測定値を示す（用量グループ当たりn=6）。

【図14】

rP2X₃受容体を発現する1321N1細胞での10μM BzATP刺激によるカルシウム流入を抑制するための、TNP-ATP、TNP-ADPおよびTNP-AMPの濃度効果の測定値を示す。

【図15】

TNP-ATPとBzATP（1000nmol/足）との皮内同時投与の効果は、ラッ

50

トの急性侵害的な足のフリンチングを濃度依存的に減弱するが、TNP - AMPではそのような減弱が認められないことを示している（用量グループ当たり $n = 6$ ）。

【図16A】

TNP - ATP（黒色棒）と5%ホルマリンとの皮内同時投与の効果は、ラットの急性侵害的な足のフリンチングを減弱したが、TNP - AMP（灰色棒）ではそのような減弱が認められないことを示している（用量グループ当たり $n = 6$ ）。フェーズIは、皮内投与直後の15分後に発生した急性の累積性侵害的反応を示す（ $F(2, 27) = 5.15$ 、 $P < 0.05$ ）。

【図16B】

TNP - ATP（黒色棒）と5%ホルマリンとの皮内同時投与の効果は、ラットの急性侵害的な足のフリンチングを減弱したが、TNP - AMP（灰色棒）ではそのような減弱が認められないことを示している（用量グループ当たり $n = 6$ ）。フェーズIIは、ホルマリン注射の30分後からの20分間について記録した、累積性侵害的反応を示す（ $F(2, 27) = 6.97$ 、 $P < 0.05$ ）。

10

【図17A】

ラットの $P2X_3$ および $P2X_2/3$ 受容体の作働薬活性化に対するシバクロンブルーの効果の測定値を示す。BzATP（ $1 \mu M$ ）および α, β -meATP（ $10 \mu M$ ）の活性化を向上させるための、シバクロンブルーの代表的な濃度効果曲線（ $EC_{50} = 2 \mu M$ ）。

【図17B】

ラットの $P2X_3$ および $P2X_2/3$ 受容体の作働薬活性化に対するシバクロンブルーの効果の測定値を示す。ラット $P2X_2/3$ 受容体の BzATP（ $1 \mu M$ ）および α, β -meATP（ $10 \mu M$ ）の活性化を向上させるための、シバクロンブルーの代表的な濃度効果曲線。

20

【図18A】

ラットの後足への BzATP およびシバクロンブルーの皮内同時投与の侵害効果を示す（ $F(16, 352) = 7.30$ 、 $P < 0.05$ ）。

【図18B】

ラットの後足への BzATP およびシバクロンブルーの皮内同時投与の侵害効果を示す（ $F(16, 352) = 7.30$ 、 $P < 0.05$ ）。

30

【図18C】

ラットの後足への BzATP およびシバクロンブルーの皮内同時投与の侵害効果を示す（ $F(16, 352) = 7.30$ 、 $P < 0.05$ ）。

【図18D】

ラットの後足への BzATP およびシバクロンブルーの皮内同時投与の侵害効果を示す（ $F(16, 352) = 7.30$ 、 $P < 0.05$ ）。

【図19A】

シバクロンブルーがラットホルマリン試験のフェーズIで侵害性の足フリンチングを増大させることを示している。

【図19B】

シバクロンブルーがラットホルマリン試験のフェーズIIで侵害の足フリンチングを増大させることを示している。

40

【図19C】

フェーズIにおけるラットホルマリン試験の結果を示す。

【図19D】

フェーズIIにおけるラットホルマリン試験の結果を示す。

【 図 6 】

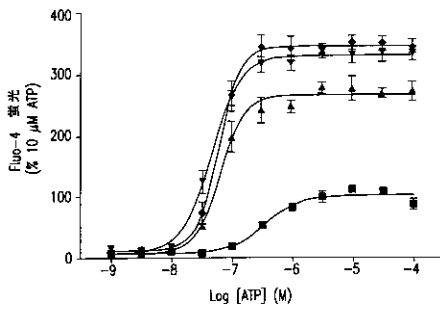


FIG.6

【 図 7 】

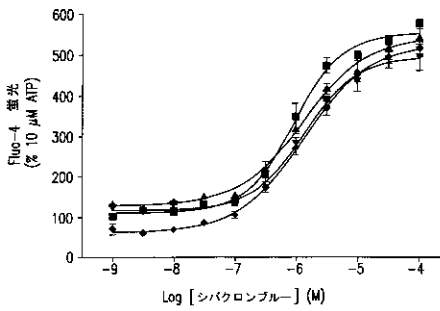


FIG.7

【 図 9 A - 1 】

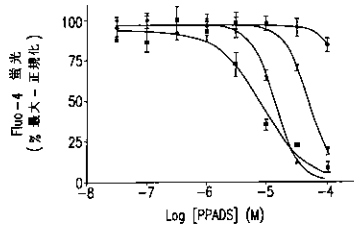


FIG.9A-1

【 図 9 B 】

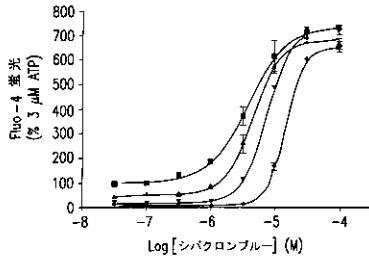


FIG.9B

【 図 8 】

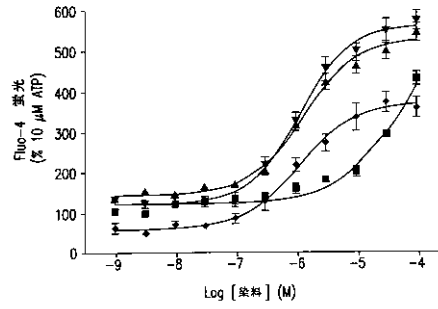


FIG.8

【 図 9 A 】

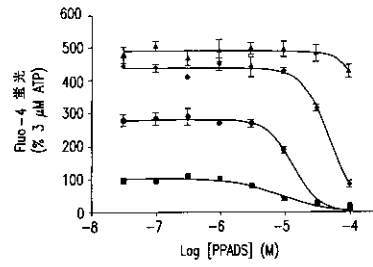


FIG.9A

【 図 10 】

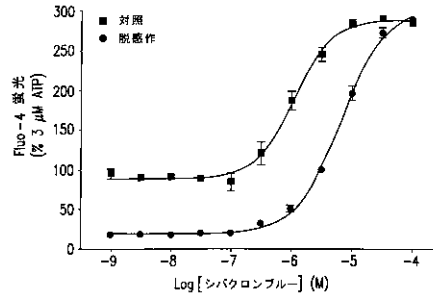


FIG.10

【 図 11 A 】

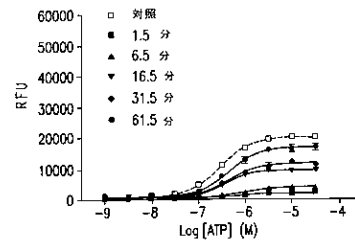
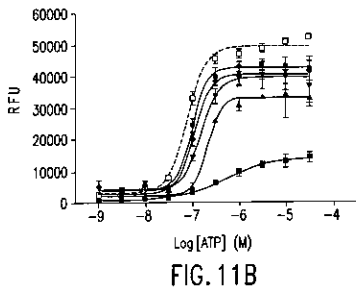
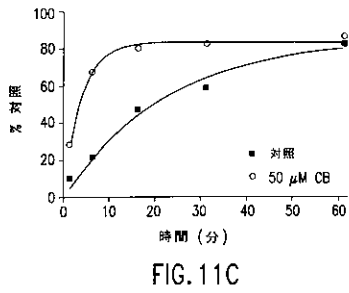


FIG.11A

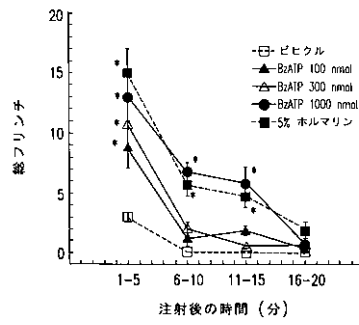
【 図 1 1 B 】



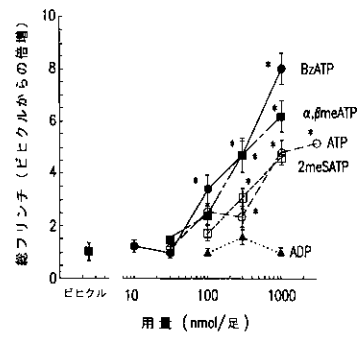
【 図 1 1 C 】



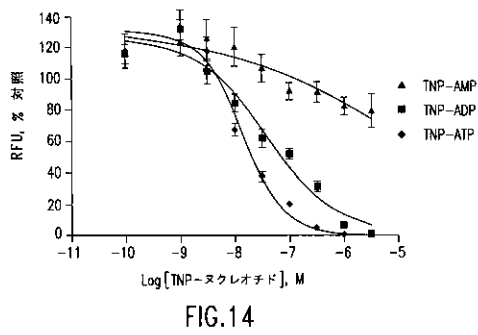
【 図 1 2 】



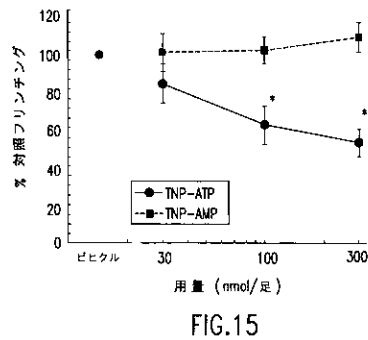
【 図 1 3 】



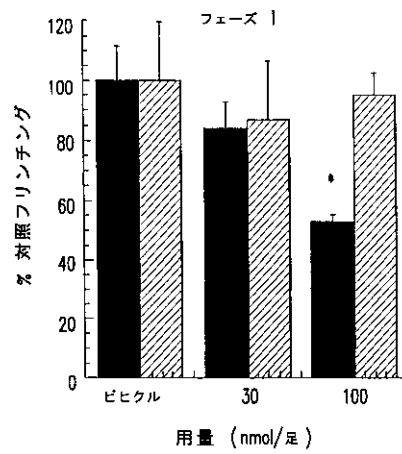
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】

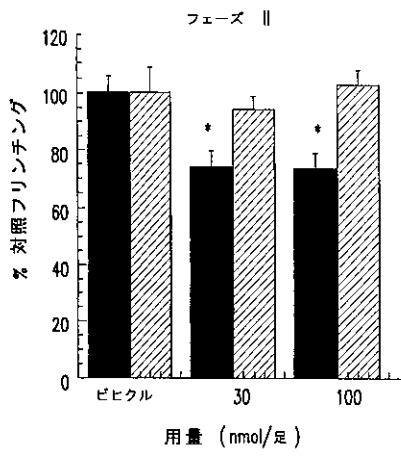


FIG.16B

【 図 1 7 A 】

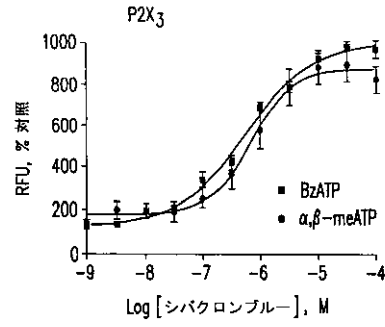


FIG.17A

【 図 1 7 B 】

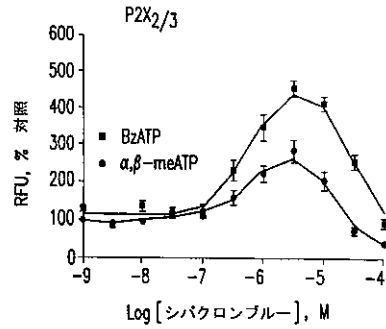


FIG.17B

【 図 1 8 A 】

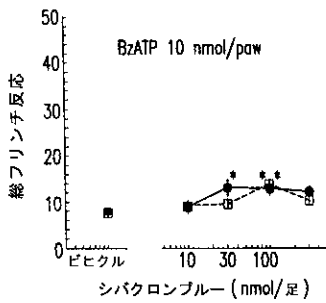


FIG.18A

【 図 1 8 C 】

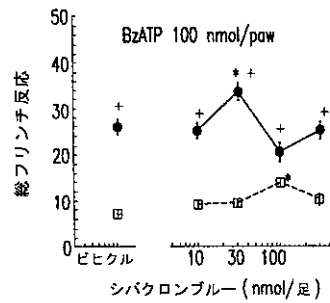


FIG.18C

【 図 1 8 B 】

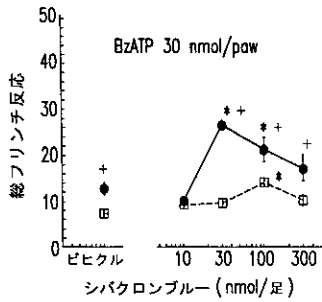


FIG.18B

【 図 1 8 D 】

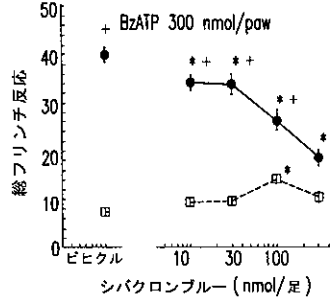


FIG.18D

【 図 1 9 A 】

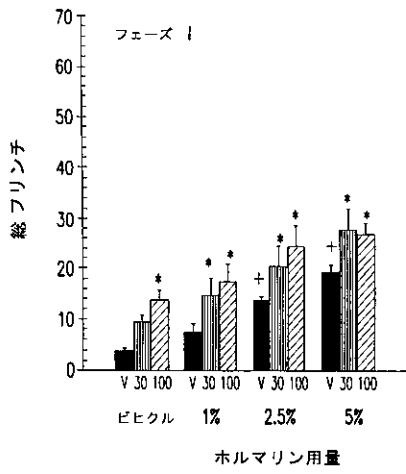


FIG.19A

【 図 1 9 B 】

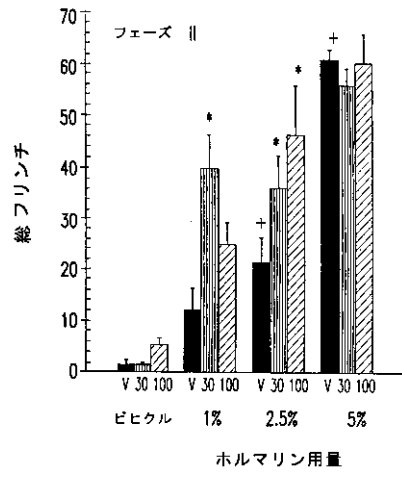


FIG.19B

【 図 1 9 C 】

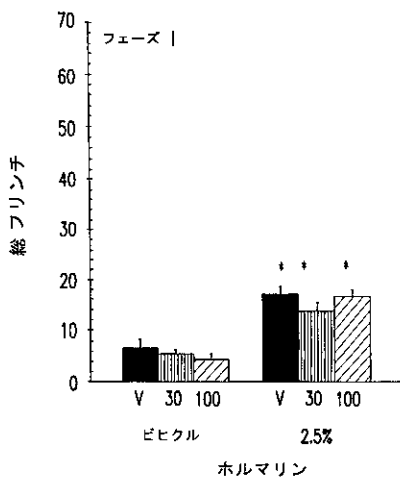


FIG.19C

【 図 1 9 D 】

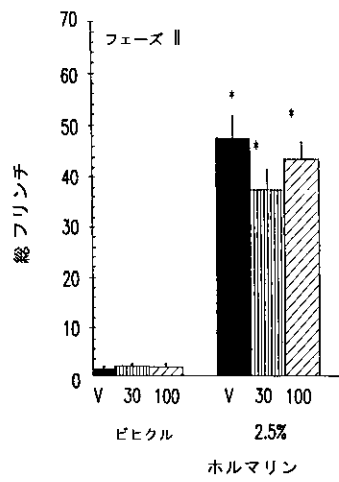


FIG.19D

【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 7 : C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/68, G01N 33/53		A2	(11) International Publication Number: WO 00/63379
(21) International Application Number: PCT/US00/0919		(81) Designated States: CA, JP, MX, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) International Filing Date: 21 April 2000 (21.04.00)		(43) International Publication Date: 26 October 2000 (26.10.00)	
(30) Priority Data: 60/130,339 21 April 1999 (21.04.99) US		Published Without international search report and to be republished upon receipt of that report.	
(71) Applicant: ABBOTT LABORATORIES [US/US]; Dept. 377 Bldg. AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL, 60064-6000 (US).			
(72) Inventors: JARVIS, Michael F.; 356 S. Oldwood Court, Vernon Hills, IL 60061 (US). LYNCH, Kevin J.; 17904 W. Hampshire Drive, Gurnee, IL 60031 (US). BURGARD, Edward C.; 909 Dundick Street, Libertyville, IL 60048 (US). VANBIJSEN, Timothy; 4711 N. Dover Street, Chicago, IL 60640 (US). KOWALUK, Elizabeth A.; 3055 Priscilla Avenue, Highland Park, IL 60035 (US).			
(74) Agents: BECKER, Cheryl L. et al.; Dept. 377 Bldg. AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6000 (US).			
(54) Title: THE P2X ₃ RECEPTOR, METHODS OF ALTERING P2X ₃ RECEPTOR ACTIVITY AND USES THEREOF			
(57) Abstract			
The subject invention relates to the P2X ₃ receptor, methods of modulating the activity of the P2X ₃ receptor and to uses of these methods. In particular, such methods may be used, for example, to accelerate the rate of resensitization of a desensitized receptor.			
hP2X3	1	DNKTSDFFTTEYTKSVVVKSWTIGTINRAVGLL	33
rP2X3	1	DNKTSDFFTTEYTKSVVVKSWTIGTINRAVGLL	33
hP2X3	34	ITSYFVGVWFLHEKAYQVRDIAIESVYTKVKG	66
rP2X3	34	ITSYFVGVWFLHEKAYQVRDIAIESVYTKVKG	66
hP2X3	67	SSIANRVMVSDVYVPPGTSVVFITRMLVY	99
rP2X3	67	SSIANRVMVSDVYVPPGTSVVFITRMLVY	99
hP2X3	100	ENDMOFCPEDEKYRCVSDSGGPEPFRGGI	132
rP2X3	100	ENDMOFCPEDEKYRCVSDSGGPEPFRGGI	132
hP2X3	133	ILGRGVYSSVLRICEIGKWPTEVDVTEFLIM	165
rP2X3	133	ILGRGVYSSVLRICEIGKWPTEVDVTEFLIM	165
hP2X3	166	MEAEVFYFKNSIRFLPFAFKGNLDRLQAR	198
rP2X3	166	MEAEVFYFKNSIRFLPFAFKGNLDRLQAR	198
hP2X3	199	DMTEBPHHKLHFPQDILRVGDVRFAGQDFAR	231
rP2X3	199	DMTEBPHHKLHFPQDILRVGDVRFAGQDFAR	231
hP2X3	232	LARTGVVGLKIDWVCLDKAMQCLPKYSETR	264
rP2X3	232	LARTGVVGLKIDWVCLDKAMQCLPKYSETR	264
hP2X3	265	ILNVEKSSVSPDYNRFARKYKMGSEYRTL	297
rP2X3	265	ILNVEKSSVSPDYNRFARKYKMGSEYRTL	297
hP2X3	298	LKAFGTRFDVLYGNAGKFNITPTLSSVAFT	330
rP2X3	298	LKAFGTRFDVLYGNAGKFNITPTLSSVAFT	330
hP2X3	331	SWGVTVLGDILLENFKGADPKWAFEEVLE	363
rP2X3	331	SWGVTVLGDILLENFKGADPKWAFEEVLE	363
hP2X3	364	ITLRLARLNPVHSDQHEKOSTOSCANSTG	395
rP2X3	364	ITLRLARLNPVHSDQHEKOSTOSCANSTG	395
hP2X3	397	IR	397
rP2X3	397	IR	397

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	JS	Jordan	SF	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SO	Switzerland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MM	Myanmar	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Cote d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroun	KR	Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	St. Lucia	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
DK	Denmark	LR	Liberia	SE	Sweden		
EE	Estonia			SG	Singapore		

WO 00/63379

PCT/US00/18919

1

THE P2X₃ RECEPTOR, METHODS OF ALTERING P2X₃ RECEPTOR ACTIVITY
AND USES THEREOF

The present application is a Continuation-In-Part of pending U.S. patent application Ser. No. 09/191,136, filed on November 13, 1998, which is Continuation-In-Part of U.S. patent application Ser. No. 09/008,526, filed on January 16, 1998, now abandoned, and U.S. patent application Ser. No. 09/008,185, filed on January 16, 1998, now abandoned. The present application also claims priority from U.S. provisional application Ser. No. 60/130,339, filed on April 21, 1999.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Technical Field

The subject invention relates to the P2X₃ receptor, methods of modulating the activity of the P2X₃ receptor and to uses of these methods. In particular, such methods may be used, for example, to accelerate the rate of receptor resensitization, when the receptor has been desensitized. Furthermore, the present invention also encompasses the use of receptor antagonists, in particular, a P2X₃ receptor antagonist, to minimize the sensation of pain in a mammal.

Background Information

P2X receptors function as homomultimeric cation-permeable ion channels and, in some cases, as heteromeric channels consisting of two different P2X receptor subtypes (Lewis et al., *Nature* 377:432-435 (1995); Le et al., *J. Neurosci.* 18:7152-7159 (1998); Torres et al., *Mol. Pharmacol.* 54:989-993 (1998)). At least one pair of P2X receptor subtypes, P2X₂ and P2X₃, functions as a heteromeric channel in rat nodose ganglion

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

2

neurons where it exhibits distinct pharmacological and electrophysiological properties (Lewis et al., *supra* (1995)).

With respect to individual receptors, the rat P2X₂ receptor is expressed in the spinal cord, and in the nodose and dorsal root ganglia (Brake et al., Nature 371:519-523 (1994)), while rat P2X₃ receptor expression is found primarily in a subset of neurons of the sensory ganglia (Chen et al., Nature 377:428-430 (1995); Vulchanova et al., Neuropharmacol. 36:1229-1242 (1997)). The distribution of both receptors is consistent with a role in pain transmission. The P2X₂ and P2X₃ receptor subunits form functional channels when expressed alone, and can also form a functional heteromultimeric channel that has properties similar to currents seen in native sensory channels when co-expressed (Lewis et al., Nature 377:432-435 (1995)). Evidence from studies in rat nodose ganglia indicate that both P2X₂/P2X₃ heteromeric channels and P2X₂ homomeric channels contribute to ATP-induced currents (Virginio et al., J. Physiol. (Lond) 510:27-35 (1998); Thomas et al., J. Physiol. (Lond) 509 (Pt 2):411-417 (1998)); Vulchanova et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8063-8067 (1996); Simon et al., Mol. Pharmacol. 52:237-248 (1997)).

ATP, which activates P2X₂, P2X₃, and P2X₂/P2X₃ receptors, functions as an excitatory neurotransmitter in the spinal cord dorsal horn and in primary afferents from sensory ganglia (Holton et al., J. Physiol. (Lond.) 126:124-140 (1954)). ATP-induced activation of P2X receptors on dorsal root ganglion nerve terminals in the spinal cord stimulates the release of glutamate, a key neurotransmitter involved in nociceptive signaling (Gu et al., Nature 389:749-753 (1997)). Thus, ATP released from damaged cells may evoke pain by activating P2X₂,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

3

P2X₁, or P2X₂/P2X₃ receptors on nociceptive nerve endings of sensory nerves. This is consistent with the induction of pain by intradermally applied ATP in the human blister-base model (Bleehen, Br. J. Pharmacol. 62:573-577 (1978)), the identification of P2X₂ receptors on nociceptive neurons in the tooth pulp (Cook et al., Nature 387:505-508 (1997)), and with reports that P2X receptor antagonists are analgesic in animal models (Driessen et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350:618-625 (1994)). This evidence suggests that P2X₂ and P2X₃ function in nociception, and that modulators of these human P2X receptors may be useful as analgesics.

The utility of cibacron blue [i.e., Reactive Blue-2; 2-Anthracenesulfonic acid, 1-amino-4-[[4-[[4-chloro-6-[(2-sulfophenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-3-sulfophenyl]amino]-9,10-dihydro-9,10-dioxo-], an anthraquinone sulfonic acid derivative, as an inhibitor of ATP-mediated signaling and P2X and P2Y receptor activation, has been well documented (Ralevic et al., Pharmacological Reviews 50:413-492 (1998)). Cibacron blue functions as an antagonist of several diverse ATP-mediated physiological responses, including rat urinary bladder smooth muscle contraction (Hashimoto et al., Br. J. Pharmacol. 115:636-640 (1995)), rat cecum inhibitory junction potentials (Manzini et al., Eur. J. Pharmacol. 127:197-204 (1986)), phospholipid secretion from rat isolated alveolar type II cells (Rice et al., Br. J. Pharmacol. 97:1258-1262 (1989)), and calcium influx in rat parotid acinar cells (Soltoff et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165:1279-1285 (1989)). Cibacron blue also functions both as an antagonist of P2 receptor-operated inward currents and calcium influx in PC12 cells (Nakazawa et al., Pflugers Arch

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

4

418:214-219 (1991); Michel et al., Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 354:562-571 (1996); Surprenant, A., Ciba Found. Symp. 198:208-219 (1996)), and as an inhibitor of ecto-nucleotidase activity in *Xenopus* oocytes (Ziganshin et al., Biochem. Pharmacol. 51:897-901 (1996)). Recombinant rat P2X₁ and P2X₂ receptors are also sensitive to inhibition by cibacron blue (Surprenant, A., Ciba Found. Symp. 198:208-219 (1996)).

Although the effects of cibacron blue on P2X receptor function appear to be primarily inhibitory, one report has described its potentiating activity at the P2X₂ receptor (Miller et al., Neuropharmacology 37:1579-1586 (1998)). In BEK293 cells expressing the rat P2X₂ receptor, pre-treatment with cibacron blue mediated a 4-fold increase in the potency of ATP without affecting the maximum response (Miller et al., *supra* (1998)).

The nociceptive effects of exogenously administered ATP and P2X receptor agonists have also been demonstrated in laboratory animals (Bland-Ward et al., Br. J. Pharmacol. 122:366-371 (1997); Hamilton et al., Br. J. Pharmacol. 126:326-332 (1999)). A selective P2 receptor-mediated increase in ectopic neuronal excitability that is localized to damaged sensory afferents has also been recently reported in rats following chronic constriction nerve injury (Chen et al., NeuroReport 10:2779-2782 (1999)). In addition to the peripheral nociceptive actions of P2X receptor activation, stimulation of spinal P2X receptors may also contribute to nociception as indicated by the ability of intrathecally (i.t.) administered P2 receptor agonists to increase sensitivity to acute and persistent noxious stimuli in rodents (Driessen et al., Brain Res. 666:182-188 (1994); Tsuda et al., Br. J. Pharmacol.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

5

127:449-456 (1999); Tsuda et al., Br. J. Pharmacol. 128:1497-1504 (1999)).

The utility of available purinergic ligands to evaluate the role of individual P2 receptor subtypes in mammalian physiology has been complicated by the susceptibility of P2 receptor agonists to undergo enzymatic degradation, and by the lack of P2 receptor subtype-selective agonists and antagonists (King et al., Trends in Pharmacol. Sci. 19:506-514 (1998); Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50:413-492 (1998)). However, the recent availability of recombinant mammalian P2 receptor subtypes has allowed for the systematic characterization of the pharmacology of specific P2 receptor subtypes (King et al., *supra* (1998); Bianchi et al., Europ. J. Pharmacol. 376:127-138 (1999)) and led to further clarification of the pharmacological selectivity of ligands acting at P2X receptors. For example, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP (TNP-ATP), a fluorescent ATP analog with antinociceptive actions following i.t. administration in mice (Tsuda et al., Br. J. Pharmacol. 127:449-456 (1999); Tsuda et al., Br. J. Pharmacol. 128:1497-1504 (1999)), has been found to be a potent nanomolar antagonist at the recombinant rat P2X₁, P2X₂, and P2X_{2/3} receptors (Lewis et al., Br. J. Pharmacol. 124:1463-1466 (1998); Thomas et al., J. Physiol. 509:411-417 (1998)).

Since subtype-selective ligands for the individual P2 receptors have yet to be identified, efforts to elucidate the specific P2X receptor subtypes involved in the transmission of nociceptive signals has been largely based on receptor localization and functional studies using immunohistochemical techniques. These studies have shown that both the homomeric P2X₂ and heteromeric P2X_{2/3} receptor subtypes are selectively

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

6

localized to the central and peripheral terminals of small diameter sensory neurons (Chen et al., Nature 377:428-431 (1995); Lewis et al., Nature 377:432-435 (1995); Vulchanova et al., Neuropharmacol. 36:1229-1242 (1997); Vulchanova et al., Euro. J. Neurosci. 10:3470-3475 (1998)). Further, recent data has shown that P2X₁ specific immunoreactivity is significantly increased in both the injured dorsal root ganglion and in the ipsilateral spinal dorsal horn following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve (Novakovic et al., Pain 80:273-282 (1999)).

Taken together, the functional and immunohistochemical localization of P2X₁ containing receptors (P2X₁ and/or P2X_{2/3}) on sensory nerves indicates that these P2X receptors may have a primary role in mediating the nociceptive effects of exogenous ATP. Thus, compounds which block or inhibit activation of P2X₁ receptors serve to block the pain stimulus. Receptor antagonists to compounds which normally activate the P2X₁ receptor and/or P2X_{2/3}/P2X₁ heteromeric channels, such as ATP, could successfully block the transmission of pain.

In view of the above, methods are certainly needed which provide the ability to regulate or control the P2X receptors, for example, P2X₁. Control of such receptors provides the ability to minimize pain in patients in need of such treatment.

All U.S. patents, patent applications and publications cited herein, whether *supra* or *infra*, are hereby incorporated by reference in their entirety.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention includes an isolated polynucleotide encoding a human P2X₁ receptor polypeptide or a receptor having a nucleotide sequence at least 90% identical to said polynucleotide

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

7

sequence encoding the human P2X₃ receptor. The polynucleotide may be a polydeoxyribonucleotide (DNA) or a polyribonucleotide (RNA). More specifically, the DNA may comprise the sequence represented by SEQ ID NO:15.

The invention also includes a host cell comprising the polynucleotide. This host cell may be, for example, a bacterial cell, a mammalian cell, a yeast cell or an amphibian cell.

Additionally, the present invention encompasses an expression vector comprising a polynucleotide, as described above, operably linked to at least one control sequence that directs transcription of the polynucleotide. The polypeptide encoded by the polynucleotide may be the human P2X₃ which may comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO:16. The present invention also includes a host cell comprising this expression vector.

Furthermore, the present invention includes a method for producing a human P2X₃ receptor polypeptide, the method comprising the steps of: (a) culturing a host cell, described above, for a time and under conditions sufficient for expression of said polypeptide; and (b) recovering said polypeptide.

The invention also includes a purified human P2X₃ receptor polypeptide, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

Additionally, the present invention encompasses a method for identifying compounds that modulate P2X₃ receptor activity, the method comprising the steps of: (a) providing a host cell that expresses a P2X₃ receptor comprising a human P2X₃ polypeptide; (b) mixing a test compound with the P2X₃ receptor; and (c) measuring either: (i) the effect of the test compound on the activation of the P2X₃ receptor or the cell expressing the P2X₃ receptor, or (ii) the binding of the test compound to the cell or the P2X₃ receptor. The cell may be as described above. The measurement of step (c) (ii) may be performed by measuring a signal generated by a detectable moiety. The detectable moiety may be, for example, selected from the group

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

8

consisting of a fluorescent label, a radiolabel, a chemiluminescent label and an enzyme. The measurement of step (c)(i) may be performed by measuring a signal generated by a radiolabeled ion, a chromogenic reagent, a fluorescent probe or an electrical current. In the method, the human P2X₃ receptor polypeptide may comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

Moreover, the present invention also includes a method for detecting a target polynucleotide of a P2X₃ receptor in a test sample, the method comprising the steps of: (a) contacting the target polynucleotide with at least one human P2X₃ receptor-specific polynucleotide probe or a complement thereof to form a target-probe complex; and (b) detecting the presence of the target-probe complex in the test sample.

Additionally, the present invention encompasses a method for detecting cDNA of human P2X₃ receptor mRNA in a test sample, the method comprising the steps of: (a) performing reverse transcription in order to produce cDNA; (b) amplifying the cDNA obtained from step (a); and (c) detecting the presence of the human P2X₃ receptor in the test sample. In this method, the detection step (c) comprises utilizing a detectable moiety capable of generating a measurable signal.

The invention also includes an isolated polynucleotide encoding a human P2X₃ receptor or a portion thereof and capable of selectively hybridizing to a nucleic acid encoding a human P2X₃ receptor polypeptide, wherein said polynucleotide comprises the sequence of SEQ ID NO:15 or a portion thereof. The polynucleotide may be produced by recombinant or synthetic techniques.

The present invention also includes a purified polypeptide encoded by human P2X₃ receptor polynucleotide wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or a portion thereof. The polypeptide may be produced by recombinant or synthetic techniques.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

9

Also, the present invention includes a monoclonal antibody which specifically binds to a human P2X₁ receptor comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or an immunoreactive fragment thereof.

It should also be noted that the invention encompasses a method for detecting human P2X₁ receptor in a test sample, the method comprising the steps of: (a) contacting the test sample with an antibody or a fragment thereof which specifically binds to the human P2X₁ receptor, for a time and under conditions sufficient for the formation of a resultant complex; and (b) detecting the resultant complex containing the antibody, wherein the antibody specifically binds to human P2X₁ receptor amino acid comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or a fragment thereof.

Additionally, the present invention includes an isolated polynucleotide encoding a human P2X receptor polypeptide or a variant thereof, wherein the receptor is P2X₁.

The invention also includes a therapeutic method for relieving pain comprising: (a) presenting an individual afflicted with pain; and (b) administering to the individual an effective amount of a P2X₁ antagonistic compound. The antagonistic compound may be effective against P2X₁ heteromultimeric channels.

Furthermore, the present invention also includes a method of potentiating the effects of an agonist which activates a P2X₁ receptor comprising the steps of: (a) incubating cells comprising said P2X₁ receptor with a triazene dye; and (b) exposing the incubated cells to the agonist for a time and under conditions sufficient for the agonist to bind to the P2X₁ receptor, wherein the triazene dye of step (a) potentiates the effect of the agonist of step (b). The receptor may be derived from a mammal such as a human or a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

10

rodent. The triazene dye may be selected from the group consisting of, for example, cibacron blue, basilen blue, reactive blue 5 and reactive red 2. The agonist may be, for example, adenosine 5'-triphosphate disodium (ATP).

The present invention also includes a method of blocking the inhibitory activity of a non-selective P2 receptor antagonist on a P2X₃ receptor comprising the steps of: (a) incubating P2X₃-expressing cells with a triazene dye; and (b) exposing the incubated cells to a non-selective P2 receptor antagonist, wherein the triazene dye of step (a) blocks the inhibitory activity of the antagonist. The P2X receptor may be derived from a mammal such as a rodent or a human. The antagonist may be pyridoxal-5-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS). The triazene dye may be cibacron blue or one of the other triazene dyes described above.

Additionally, the present invention encompasses a method of accelerating the rate of P2X₃ receptor resensitization of desensitized P2X₃ receptor-expressing cells comprising the step of exposing the desensitized P2X₃ receptor-expressing cells to a triazene dye, wherein the triazene dye accelerates said rate of resensitization of P2X₃ receptors of said desensitized P2X₃-receptor expressing cells. Again, the P2X₃ receptor may be derived from a mammal such as a human or a rodent. The triazene dye may be cibacron blue or one of the other triazene dyes described above.

A method of inducing antinociceptive effects in a mammal comprising the step of administering a P2X receptor antagonist to a patient in need of such antinociceptive effects in an amount sufficient to effect the antinociceptive effects. Again, the mammal may be a human or a rat. The P2X₃ receptor antagonist induces antinociceptive effects on a P2X₃-containing receptor. The receptor may be, for example, P2X₃. The antagonist may be, for example, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP (TNP-ATP).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

ii

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts the sequence of the P2X₂ 5'RACE product of Example 2 (SEQ ID NO: 13), in which the sequences of primers are underlined and the predicted initiation codon (ATG) is shown in boldface.

Figure 2 depicts the sequence of the P2X₂ 3'RACE product of Example 3 (SEQ ID NO:14), in which the sequences of primers are underlined and the predicted termination codon (TAG) is shown in boldface.

Figure 3 depicts the sequence of the complete open reading frame of cDNA encoding human P2X₂ receptor polypeptide (SEQ ID NO:15). The initiation (ATG) and termination (TAG) codons are shown in boldface; 5' and 3' flanking sequences introduced during plasmid construction, including the EcoRI (GAATTC) and Not I (GCGGCCGC) restriction sites, are underlined.

Figure 4 depicts the aligned predicted amino acid sequences of human (hP2X₂) (SEQ ID NO:16) and rat (r P2X₂) (SEQ ID NO:17) receptor polypeptides. Identical residues are identified by boxing.

Figure 5 illustrates the potentiation effect of cibacron blue on calcium influx mediated by ATP-stimulated human P2X₂ receptors. A, 1321-P2X₂ cells loaded with the Ca²⁺ indicator Fluo-4 were treated with ATP in the presence (*solid line*) or absence (*dashed line*) of cibacron blue. Relative fluorescence is shown as the percent of the maximum response obtained in

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

12

the absence of cibacron blue. B, *Xenopus* oocyte expressing hP2X₃ receptors were challenged with ATP in the absence (small current) and presence (large current) of cibacron blue. ATP application is denoted by the horizontal bar.

Figure 6 illustrates that cibacron blue (CB) significantly increases the potency of ATP-induced hP2X₃ receptor activation in a concentration dependent manner. ATP concentration-effect curves were determined in the absence or presence of cibacron blue by measuring Ca²⁺ influx, as determined by Fluo-4 fluorescence, in 1321N1-hP2X₃ cells: ■, without cibacron blue (ATP EC₅₀ = 356 ± 47 nM, E_{max} = 102 ± 3%); ▲, 1 μM cibacron blue (ATP EC₅₀ = 64 ± 7 nM*, E_{max} = 267 ± 6%*); ▼, 3 μM cibacron blue (ATP EC₅₀ = 46 ± 8 nM*, E_{max} = 330 ± 5%*); ◆, 10 μM cibacron blue (ATP EC₅₀ = 60 ± 12 nM*, E_{max} = 345 ± 6%*). Data are shown as a percent of the maximal response to 10 μM ATP and are the means (± sem) of three experiments (Statistical analysis based on pEC₅₀ values; *P < 0.05 as compared to control).

Figure 7 illustrates that the potency of cibacron blue to potentiate hP2X₃ receptor activation is similar for prototypic P2X₃ agonists. Cibacron blue concentration-effect curves were determined for each of four prototypic P2X₃ receptor agonists by measuring Ca²⁺ influx, as determined by Fluo-4 fluorescence, in 1321N1-hP2X₃ cells. The half-maximal concentrations of cibacron blue required to mediate full potentiation were as follows: ▼, 10 μM ATP (cibacron blue EC₅₀ = 1.4 ± 0.5 μM, E_{max} = 504 ± 15%); ▲, 10 μM 2-meSAMP (cibacron blue EC₅₀ = 1.4 ± 0.2 μM, E_{max} = 555 ± 18%); ■, 10 μM BzATP (cibacron blue EC₅₀ = 0.9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WG 00/63379

PCT/US00/10919

13

$\pm 0.1 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 562 \pm 12\%$); \blacklozenge , $10 \mu\text{M}$ $\alpha\beta$ -meATP (cibacron blue $EC_{50} = 1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 537 \pm 14\%$). Data are shown as a percent of the maximal response to $10 \mu\text{M}$ ATP and are the means (\pm sem) of three experiments. Concentration-effect curves were fitted using a four-parameter logistic equation in GraphPad Prism.

Figure 8 illustrates the potentiation of hP2X₃ receptor activity with various triazene dyes. Concentration-effect curves for four structurally related triazene dyes were determined by measuring ATP-activated Ca²⁺ influx in 1321N1-hP2X₃ cells: \blacksquare , reactive red 2 ($EC_{50} = 55 \pm 10 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 600\%$, fixed parameter); \blacklozenge , basilen blue ($EC_{50} = 1.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 373 \pm 17\%$); \blacktriangle , reactive blue 5 ($EC_{50} = 1.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 534 \pm 14\%$); \blacktriangledown , cibacron blue ($EC_{50} = 1.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 566 \pm 17\%$). Data are shown as a percent of the maximal response to $10 \mu\text{M}$ ATP and are the means (\pm sem) of three experiments (Statistical analysis based on pEC₅₀ values; *P < 0.05 as compared to control).

Figure 9 illustrates that cibacron blue blocks the inhibitory activity of PPADS. A, Concentration-effect curves for the inhibition of ATP-activated hP2X₃ receptor activity by PPADS were determined in the presence and absence of cibacron blue. PPADS and cibacron blue were co-applied 3 minutes before the addition of $3 \mu\text{M}$ ATP: \blacksquare , without cibacron blue (PPADS IC₅₀ = $8.6 \pm 3 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 101 \pm 4\%$); \bullet , $1 \mu\text{M}$ cibacron blue (PPADS IC₅₀ = $14 \pm 3 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}} = 280 \pm 6\%$); \blacklozenge , $10 \mu\text{M}$ cibacron blue (PPADS IC₅₀ = $51 \pm 4 \mu\text{M}$ *, $E_{\text{max}} = 437 \pm 6\%$); \blacktriangle ,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

14

100 μM cibacron blue (PPADS IC_{50} = $220 \pm 186 \mu\text{M}^*$, E_{max} = $488 \pm 9\%^*$). *Inset*, Data are normalized to the maximal signal observed at each concentration of cibacron blue. B, Concentration-effect curves for cibacron blue potentiation of hP2X₃ responses, activated by 3 μM ATP, were determined in the presence and absence of PPADS: ■, without PPADS (cibacron blue EC_{50} = $3.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$, E_{max} = $738 \pm 22\%$); ▲, 5 μM PPADS (cibacron blue EC_{50} = $4.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$, E_{max} = $682 \pm 15\%$); ▼, 10 μM PPADS (cibacron blue EC_{50} = $7.5 \pm 0.2 \mu\text{M}^*$, E_{max} = $730 \pm 7\%$); ◆, 50 μM PPADS (cibacron blue EC_{50} = $15 \pm 1.4 \mu\text{M}^*$, E_{max} = $653 \pm 10\%$). Data are shown as a percent of the maximal response to 3 μM ATP and are the means (\pm sem) of three experiments (Statistical analysis based on pEC_{50} values; * $P < 0.05$ as compared to control).

Figure 10 illustrates that cibacron blue significantly increases the rate of hP2X₃ receptor recovery from desensitization. Cibacron blue concentration-effect curves were determined in non-desensitized and acutely desensitized 1321-hP2X₃ cells: ■, non-desensitized (cibacron blue EC_{50} = $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$, E_{max} = $288 \pm 5\%$); ●, desensitized (cibacron blue EC_{50} = $5.4 \pm 0.4 \mu\text{M}^*$, E_{max} = $302 \pm 5\%$). Data are shown as a percent of the maximal response to 3 μM ATP and are the means (\pm sem) of three experiments (Statistical analysis based on pEC_{50} values; * $P < 0.05$ as compared to control).

Figure 11 illustrates that cibacron blue accelerates the recovery of hP2X₃ receptors from acute desensitization. A, 1321-hP2X₃ cells were pre-treated with ATP or D-EBS (control

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

15

curve), washed twice to remove excess extracellular ATP, and incubated for the time periods shown prior to re-challenge with various concentrations of ATP. The control curve (dashed line) shows the concentration-effect of ATP on mock-desensitized (D-PBS-treated) cells. B, 1321-hP2X₁ cells were pre-treated with ATP, washed twice to remove excess extracellular ATP, and incubated for the time periods shown in the presence cibacron blue prior to re-challenge with various concentrations of ATP. The control curve (dashed line) shows the concentration-effect of ATP on mock-desensitized (D-PBS-treated) cells pre-treated with 50 μ M cibacron blue. C, The rates of receptor recovery are shown as a function of % of the non-desensitized response over time. Curves are solutions of $\%control = \max(1 - \exp(-K_r \cdot time))$, where $\%control$ is the percentage of receptor activity as compared to non-desensitized receptors, \max is the $\%control$ activity observed at 61.5 min, $time$ is the time in minutes and K_r is the time constant. $t_{1/2}$ (half-time of receptor resensitization) was calculated as $\ln(0.5)/-K_r$.

Figure 12 illustrates the time course for the acute nociceptive effects of intradermal BzATP in the rat.

Figure 13 illustrates dose-response determinations for acute nociceptive effects of P2X receptor agonists following intradermal administration into the rat hindpaw (n=6 per dose group). Values represent \pm S.E.M. for the cumulative nociceptive paw flinching responses occurring 15 minutes post injection. *P < 0.05 as compared to vehicle-treated rats.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

FCT/US00/18919

16

Figure 14 represents concentration-effect determinations for TNP-ATP (diamonds, $IC_{50} = 40$ nM), TNP-ADP (squares, $IC_{50} = 120$ nM) and TNP-AMP (triangles, $IC_{50} > 3,000$ nM) to inhibit $10 \mu\text{M}$ BzATP-stimulated calcium flux in 1321N1 cells expressing rP2X₁ receptors. RFU = relative fluorescence units. Values represent mean \pm S.E.M from three separate experiments.

Figure 15 illustrates the effects of intradermal co-administration of TNP-ATP ($F(3,20) = 8.20$, $P < 0.05$), but not TNP-AMP ($F(3,20) = 0.30$, $P > 0.05$), with BzATP (1000 nmol/paw) dose-dependently attenuates acute nociceptive paw flinching in the rat ($n = 6$ per dose group). Values represent mean \pm S.E.M. for the cumulative nociceptive paw flinching responses occurring 15 minutes post-injection. * $P < 0.05$ as compared to vehicle-treated rats.

Figure 16 represents the effects of intradermal co-administration of TNP-ATP (black bars), but not TNP-AMP (gray bars), with 5% formalin attenuated acute nociceptive paw flinching in the rat ($n = 6$ per dose group). Phase I represents cumulative acute nociceptive responses occurring 15 minutes immediately following intradermal administration ($F(2,27) = 5.15$, $P < 0.05$). Phase II represents cumulative nociceptive responses recorded for a 20 minute period beginning 30 minutes post formalin injection ($F(2,27) = 6.97$, $P < 0.05$). Values represent mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$ as compared to vehicle-treated rats.

Figure 17 represents concentration-effect

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

17

determinations for the effects of cibacron blue on agonist activation of rat $P2X_1$ and $P2X_{2/3}$ receptors. (Left panel) Representative concentration-effect curves for cibacron blue ($EC_{50} = 2 \mu M$) to enhance BzATP ($1 \mu M$) and α, β -meATP ($10 \mu M$) activation of rat $P2X_1$ receptors. (Right panel) Representative concentration-effect curves for cibacron blue to enhance BzATP ($1 \mu M$) and α, β -meATP ($10 \mu M$) activation of rat $P2X_{2/3}$ receptors. RFU = relative fluorescence units.

Figure 18 illustrates the nociceptive effects of intradermal co-administration of BzATP and cibacron blue into the hindpaw of the rat ($F(16,352) = 7.30, P < 0.05$). Vehicle responses indicate the effects of saline (open square) or co-administration of saline and BzATP (filled circles) on acute (cumulative responses for the first 15 minutes post-injection) paw flinching behavior. The nociceptive effects of cibacron blue alone are indicated by the open squares and dotted lines. The effects of co-administration of cibacron blue and BzATP are indicated by the filled circles and solid lines. Values represent mean \pm S.E.M. from three separate experiments ($n = 6$ per dose group), * $P < 0.05$ as compared to the nociceptive effects of BzATP alone, + $P < 0.05$ as compared to the nociceptive effects of cibacron blue alone.

Figure 19 illustrates that cibacron blue increases nociceptive paw flinching in both Phase I and Phase II of the rat formalin test. Cibacron blue (30 and 100 nmol/paw) was co-administered with intradermal formalin (1-5%) into the rat hind paw. Phase I nociceptive responses were recorded for the first 15 min following administration. Phase II nociceptive responses were recorded for a 20 minutes period beginning 30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

18

minutes after administration. Intradermal administration of increasing doses of formalin alone produced significant increases in nociceptive responses ($P < 0.05$) as compared to vehicle injections. The black bars indicate nociceptive responses of formalin or vehicle alone. The gray bars indicate nociceptive responses of cibacron blue (30 nmol/paw) in the presence of formalin or vehicle. The hatched bars indicate nociceptive responses of cibacron blue (100 nmol/paw) in the presence of formalin or vehicle. Values represent mean \pm S.E.M. (n = 6 per dose group), * $P < 0.05$ as compared formalin alone (vehicle responses at each formalin dose), + $P < 0.05$ as compared to vehicle alone.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The subject invention relates to the P2X₁ receptor, the nucleic acid sequence of this receptor, the amino acid sequence of the receptor, methods of producing this receptor, and methods of altering the activity of the P2X₁ receptor by use of various chemicals (e.g., cibacron blue and/or TNP-ATP). The ability to externally regulate the receptor may allow one, for example, to control sensations such as pain, following a traumatic accident, during the course of a terminal illness, during surgery, after surgery or during any situation during which a patient's pain must be managed by a medical provider.

In particular, the present invention provides a method for screening a plurality of compounds for specific binding to a purinoreceptor to identify a compound that modulates the activity of the receptor. The method comprises (a) providing a cell that expresses the human (or other mammalian) purinoreceptor polypeptide coding sequence, (b) mixing a test

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/18919

19

compound with the cell, and (c) measuring the effect of the test compound on the activation of the purinoreceptor or the cell expressing the purinoreceptor receptor.

In addition, the invention provides a method for determining the amount of a receptor agonist or antagonist in a test sample. The method comprises (a) providing a cell that expresses the human (or other mammalian) purinoreceptor polypeptide coding sequence, (b) mixing the cell with a test sample, and (c) measuring the effect of the test compound on the activation of the purinoreceptor or the cell expressing the purinoreceptor receptor.

The invention also encompasses a host cell that encodes the purinoreceptor of interest. The host cell is genetically engineered with a vector, also encompassed by the present invention, which may be a cloning vector or an expression vector. The vector comprises a polynucleotide sequence encoding a purinoreceptor operably linked to control sequences that control its expression. Preferably, the host cell is stably transfected to express the purinoreceptor. More preferably, the host cell is a purinoreceptor null cell which, if not already lacking endogenous purinoreceptor expression, has been so engineered.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology, microbiology, recombinant DNA technology, electrophysiology, and pharmacology that are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, for example, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D.N. Glover Ed. 1985);

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

29

Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Transcription and Translation (Hames et al. eds. 1984); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller et al. eds. (1987) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (2nd ed., Springer-Verlag); and PCR: A Practical Approach (McPherson et al. eds. (1991) IRL Press).

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a primer" includes two or more such primers, reference to "an amino acid" includes more than one such amino acid, and the like.

Definitions:

In describing the present invention, the following terms will be employed and are defined as indicated below:

The term "P2 receptor" intends a purinergic receptor for the ligand ATP and/or other purine or pyrimidine nucleotides, whether natural or synthetic. P2 receptors are broadly subclassified as "P2X" or "P2Y" receptors. These types differ in their pharmacology, structure, and signal transduction mechanisms. The P2X receptors are generally ligand-gated ion channels, while the P2Y receptors operate generally through a G protein-coupled system. Moreover, and without intending to be limited by theory, it is believed that P2X receptors comprise multimers of receptor polypeptides, which multimers may be of either the same or

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

21

different subtypes. Consequently, the term "P2X receptor" refers, as appropriate, to the individual receptor subunit or subunits, as well as to the homomeric and heteromeric receptors comprised thereby.

The term "subunit" when used in reference to purinoreceptors intends a polypeptide which, either alone or in combination with one or more other polypeptides, forms a functional purinoreceptor. Where a purinoreceptor comprises more than one polypeptide subunit, the subunits may be either identical (forming a homomeric multimer) or different (forming a heteromeric multimer.)

The term "P2X_n" intends a P2X receptor subtype wherein n is an integer of at least 1. At the time of the invention, at least 7 P2X_n receptor subtypes have been isolated and/or characterized.

A "P2X_n receptor agonist" is a compound that binds to and activates a P2X_n receptor. By "activates" is intended the elicitation of one or more pharmacological, physiological, or electrophysiological responses. Such responses may include, but are not limited to, an increase in receptor-specific cellular depolarization.

A "P2X_n receptor antagonist" is a substance that binds to a P2X_n receptor and prevents agonists from activating the receptor. Pure antagonists do not activate the receptor, but some substances may have mixed agonist and antagonist properties.

The term "polynucleotide" as used herein means a polymeric form of nucleotides of any length, either ribonucleotides or deoxyribonucleotides. This term refers only to the primary structure of the molecule. Thus, the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

22

term includes double- and single-stranded DNA, as well as double- and single-stranded RNA. It also includes modifications, such as by methylation and/or by capping, and unmodified forms of the polynucleotide.

The term "variant" is used to refer to an oligonucleotide sequence which differs from the related wild-type sequence in the insertion, deletion or substitution of one or more nucleotides. When not caused by a structurally conservative mutation (see below), such a variant oligonucleotide is expressed as a "protein variant" which, as used herein, indicates a polypeptide sequence that differs from the wild-type polypeptide in the insertion, deletion or substitution of one or more amino acids. The protein variant differs in primary structure (amino acid sequence), but may or may not differ significantly in secondary or tertiary structure or in function relative to the wild-type.

The term "mutant" generally refers to an organism or a cell displaying a new genetic character or phenotype as the result of change in its gene or chromosome. In some instances, however, "mutant" may be used in reference to a variant protein or oligonucleotide and "mutation" may refer to the change underlying the variant.

"Identity" is defined as an exact nucleotide to nucleotide or amino acid to amino acid correspondence of two polynucleotide sequences or polypeptide sequences, respectively. Two or more nucleotide sequences can be compared by determining their "percent identity". Two or more amino acid sequences can also be compared by determining their "percent identity". The programs available in the Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (available

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

23

from Genetics Computer Group, Madison, WI), for example, the GAP program, are capable of calculating both the identity between two polynucleotides and the identity between two polypeptide sequences, respectively. Other programs for calculating percent identity are known in the art.

"Similarity" means the exact amino acid to amino acid comparison of two or more polypeptides at the appropriate place, where amino acids are identical or possess similar chemical and/or physical properties such as charge or hydrophobicity. Thus, a "percent similarity" then can be determined between the compared polypeptide sequences. Techniques for determining amino acid sequence identity, as well as nucleic acid sequence identity, are well known in the art and include determining the nucleotide sequence of the mRNA for the gene (usually via a cDNA intermediate) and determining the amino acid sequence encoded thereby, and comparing this to a second amino acid sequence (see discussion of percent identity above).

"Polypeptide" and "protein" are used interchangeably herein and indicate a molecular chain of amino acids linked through peptide bonds. The terms do not refer to a specific length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, and proteins are included within the definition of polypeptide. The terms include post-translational modifications of the polypeptide, for example, glycosylations, acetylations, phosphorylations and the like. In addition, protein fragments, analogs, mutated or variant proteins, fusion proteins and the like are included within the meaning of polypeptide, provided that such fragments, etc. retain the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US60/10919

24

binding or other characteristics necessary for their intended use.

A "functionally conservative mutation" as used herein intends a change in a polynucleotide encoding a derivative polypeptide in which the activity is not substantially altered compared to that of the polypeptide from which the derivative is made. Such derivatives may have, for example, amino acid insertions, deletions, or substitutions in the relevant molecule that do not substantially affect its properties. For example, the derivative can include conservative amino acid substitutions, such as substitutions which preserve the general charge, hydrophobicity/hydrophilicity, side chain moiety, and/or steric bulk of the amino acid substituted, for example, Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Asp/Glu, Lys/Arg, Asn/Gln, Thr/Ser, and Phe/Trp/Tyr.

By the term "structurally conservative mutant" is intended a polynucleotide containing changes in the nucleic acid sequence but encoding a polypeptide having the same amino acid sequence as the polypeptide encoded by the polynucleotide from which the degenerate variant is derived. This can occur because a specific amino acid may be encoded by more than one "codon," or sequence of three nucleotides, *i.e.*, because of the degeneracy of the genetic code.

"Recombinant host cells," "host cells," "cells," "cell lines," "cell cultures," and other such terms denoting microorganisms or higher eukaryotic cell lines cultured as unicellular entities refer to cells which can be, or have been, used as recipients for recombinant vectors or other transfer DNA, immaterial of the method by which the DNA is

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

25

introduced into the cell or the subsequent disposition of the cell. The terms include the progeny of the original cell which has been transfected. Cells in primary culture as well as cells such as oocytes also can be used as recipients.

A "vector" is a replicon in which another polynucleotide segment is attached, such as to bring about the replication and/or expression of the attached segment. The term includes expression vectors, cloning vectors, and the like.

A "coding sequence" is a polynucleotide sequence that is transcribed into mRNA and/or translated into a polypeptide. The boundaries of the coding sequence are determined by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, mRNA, cDNA, and recombinant polynucleotide sequences. Variants or analogs may be prepared by the deletion of a portion of the coding sequence, by insertion of a sequence, and/or by substitution of one or more nucleotides within the sequence. Techniques for modifying nucleotide sequences, such as site-directed mutagenesis, are well known to those skilled in the art. See, for example, Sambrook et al., supra; DNA Cloning, Vols. I and II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

"Operably linked" refers to a situation wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. Thus, for example, a control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a manner that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. A coding sequence may be operably linked to control sequences that direct the transcription of the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

26

polynucleotide whereby said polynucleotide is expressed in a host cell.

The term "transfection" refers to the insertion of an exogenous polynucleotide into a host cell, irrespective of the method used for the insertion, or the molecular form of the polynucleotide that is inserted. The insertion of a polynucleotide per se and the insertion of a plasmid or vector comprised of the exogenous polynucleotide are included. The exogenous polynucleotide may be directly transcribed and translated by the cell, maintained as a nonintegrated vector, for example, a plasmid, or alternatively, may be stably integrated into the host genome. "Transfection" generally is used in reference to a eukaryotic cell while the term "transformation" is used to refer to the insertion of a polynucleotide into a prokaryotic cell. "Transformation" of a eukaryotic cell also may refer to the formation of a cancerous or tumorigenic state.

The term "isolated," when referring to a polynucleotide or a polypeptide, intends that the indicated molecule is present in the substantial absence of other similar biological macromolecules. The term "isolated" as used herein means that at least 75 wt.%, more preferably at least 85 wt.%, more preferably still at least 95 wt.%, and most preferably at least 98 wt.% of a composition is the isolated polynucleotide or polypeptide. An "isolated polynucleotide" that encodes a particular polypeptide refers to a polynucleotide that is substantially free of other nucleic acid molecules that do not encode the subject polypeptide; however, the molecule may include functionally and/or structurally conservative mutations as defined herein.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

27

A "test sample" as used herein intends a component of an individual's body that is a source of one of the P2X receptors, including P2X₂. These test samples include biological samples which can be evaluated by the methods of the present invention described herein and include body fluids such as whole blood, tissues and cell preparations.

The following single-letter amino acid abbreviations are used throughout the text:

Alanine	A	Arginine	R
Asparagine	N	Aspartic acid	D
Cysteine	C	Glutamine	Q
Glutamic acid	E	Glycine	G
Histidine	H	Isoleucine	I
Leucine	L	Lysine	K
Methionine	M	Phenylalanine	F
Proline	P	Serine	S
Threonine	T	Tryptophan	W
Tyrosine	Y	Valine	V

As noted above, mammalian P2X₂ receptors, polynucleotides encoding variant receptors or polypeptide subunits thereof, and methods of making these receptors are provided herein. The invention includes not only the above P2X₂ receptor but also methods for screening compounds using the receptor and cells expressing the receptor. Further, polynucleotides and antibodies which can be used in methods for detection of the receptor, as well as the reagents useful in these methods, are provided. Compounds and polynucleotides useful in regulating the receptor and its expression also are provided as disclosed hereinbelow.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

28

In one preferred embodiment, the polynucleotide encodes the aforementioned human P2X receptor polypeptide or protein variants thereof containing conservative amino acid substitutions.

DNA encoding the above mentioned human P2X receptor, and variants thereof, can be derived from genomic or cDNA, prepared by synthesis, or by a combination of techniques. The DNA can then be used to express the human P2X receptor or as a template for the preparation of RNA using methods well known in the art (see, Sambrook *et al.*, *supra*), or as a molecular probe capable of selectively hybridizing to, and therefore detecting the presence of, other P2X-encoding nucleotide sequences.

cDNA encoding the P2X₂ receptor may be obtained from an appropriate DNA library. cDNA libraries may be probed using the procedure described by Grunstein *et al.* (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3961. The cDNA thus obtained can then be modified and amplified using the polymerase chain reaction ("PCR") and primer sequences to obtain the specific DNA encoding the human P2X₂ receptor.

More particularly, PCR employs short oligonucleotide primers (generally 10-20 nucleotides in length) that match opposite ends of a desired sequence within the DNA molecule. The sequence between the primers need not be known. The initial template can be either RNA or DNA. If RNA is used, it is first reverse transcribed to cDNA. The cDNA is then denatured, using well-known techniques such as heat, and appropriate oligonucleotide primers are added in molar excess.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

29

Primer extension is effected using DNA polymerase in the presence of deoxynucleotide triphosphates or nucleotide analogs. The resulting product includes the respective primers at their 5'-termini, covalently linked to the newly synthesized complements of the original strands. The replicated molecule is again denatured, hybridized with primers, and so on, until the product is sufficiently amplified. Such PCR methods are described in for example, U.S. Patent Nos. 4,965,188; 4,800,159; 4,683,202; 4,683,195; incorporated herein by reference in their entireties. The product of the PCR is cloned and the clones containing the P2X receptor DNA, derived by segregation of the primer extended strand, selected. Selection can be accomplished using a primer as a hybridization probe.

Alternatively still, the respective P2X receptor DNA could be generated using a RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) approach starting with human RNA. Human RNA may be obtained from cells or tissue in which the specific P2X receptor is expressed, for example, brain, spinal cord, uterus or lung, using conventional methods. For example, single-stranded cDNA is synthesized from human RNA as the template using standard reverse transcriptase procedures and the cDNA is amplified using PCR. This is but one example of the generation of P2X receptor variants from a human tissue RNA template.

Reverse transcription of human RNAs can also be accomplished utilizing reagents from the Superscript Preamplification System (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) and the following method: Poly A+ RNA (1 microgram) derived from pituitary gland tissue (Clontech, Inc. Palo Alto, CA) and 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

30

μ l (50 nanograms) random hexamer primers are combined in a final volume of 12 μ l dH₂O. This mixture is heated to 70°C for 10 minutes and chilled on ice for 1 minute. The following components are added: 2 μ l 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 1 μ l 10mM dNTP mix, and 2 μ l 0.1 M dithiothreitol. The reaction is equilibrated for 5 minutes at 25°C after which 1 μ l (200 units) Superscript II reverse transcriptase is added and incubation continued at 25°C for 10 minutes, followed by 50 minutes at 42°C. Alternatively, 10 picomoles Oligo dT primer can be substituted for the random hexamer primers in the above reaction mixture. In this case, equilibration is carried out at 42°C for 2 minutes after which the reverse transcriptase is added and incubation continued at 42°C for 50 minutes. The reverse transcription reaction is terminated by incubation at 70°C for 15 minutes and chilled on ice. RNase H (1 μ l; 2 units) is added and the mixture incubated for 20 minutes at 37°C, then stored on ice.

Synthetic oligonucleotides may be prepared using an automated oligonucleotide synthesizer such as that described by Warner (1984) DNA 3:401. If desired, the synthetic strands may be labeled with ³²P by treatment with polynucleotide kinase in the presence of ³²P-ATP, using standard conditions for the reaction. DNA sequences, including those isolated from genomic or cDNA libraries, may be modified by known methods which include site-directed mutagenesis as described by Zoller (1982) Nucleic Acids Res. 10:6487. Briefly, the DNA to be modified is packaged into phage as a single stranded sequence. It is then converted to a double stranded DNA with DNA polymerase using, as a primer,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

31

a synthetic oligonucleotide complementary to the portion of the DNA to be modified, and having the desired modification included in its own sequence. Culture of the transformed bacteria, which contain replications of each strand of the phage, are plated in agar to obtain plaques. Theoretically, 50% of the new plaques contain phage having the mutated sequence, and the remaining 50% have the original sequence. Replicates of the plaques are hybridized to labeled synthetic probe at temperatures and conditions suitable for hybridization with the correct strand, but not with the unmodified sequence. The sequences that have been identified by hybridization are recovered and cloned. Alternatively, it may be necessary to identify clones by sequence analysis if there is difficulty in distinguishing the variant from wild type by hybridization. In any case, the DNA would be sequence-confirmed.

Once produced, DNA encoding the specific P2X receptor, or DNA about 60-80% identical to the nucleotide sequence encoding the specific P2X receptor, and more preferably, DNA about 90% identical to the nucleotide sequence encoding the specific P2X receptor, may then be incorporated into a cloning vector or an expression vector for replication in a suitable host cell. Vector construction employs methods known in the art. Generally, site-specific DNA cleavage is performed by treating with suitable restriction enzymes under conditions that generally are specified by the manufacturer of these commercially available enzymes. After incubation with the restriction enzyme, protein is removed by extraction and the DNA recovered by precipitation. The cleaved fragments may be separated using, for example, polyacrylamide

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

32

or agarose gel electrophoresis methods, according to methods known by those of skill in the art.

Sticky end cleavage fragments may be blunt ended using *E. coli* DNA polymerase I (Klenow) in the presence of the appropriate deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) present in the mixture. Treatment with S1 nuclease also may be used, resulting in the hydrolysis of any single stranded DNA portions.

Ligations are performed using standard buffer and temperature conditions using T4 DNA ligase and ATP. Alternatively, restriction enzyme digestion of unwanted fragments can be used to prevent ligation.

Standard vector constructions generally include specific antibiotic resistance elements. Ligation mixtures are transformed into a suitable host, and successful transformants selected by antibiotic resistance or other markers. Plasmids from the transformants can then be prepared according to methods known to those in the art usually following a chloramphenicol amplification as reported by Clewell et al., J. Bacteriol. 110:667 (1972). The DNA is isolated and analyzed usually by restriction enzyme analysis and/or sequencing. Sequencing may be by the well-known dideoxy method of Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977) as further described by Messing et al., Nucleic Acid Res. 9:309 (1981), or by the method reported by Maxam et al., Meth. Enzymol. 65:499 (1980). Problems with band compression, which are sometimes observed in GC rich regions, are overcome by use of, for example, T-deazoguanosine or inosine, according to the method reported by Barr et al., Biotecniques 4:428 (1986).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

33

Host cells are genetically engineered with the vectors of this invention, which may be a cloning vector or an expression vector. The vector may be in the form of a plasmid, a viral particle, a phage, etc. The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants/transfectants or amplifying the subunit-encoding polynucleotide. The culture conditions, such as temperature, pH and the like, generally are similar to those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to those of skill in the art.

Both prokaryotic and eukaryotic host cells may be used for expression of desired coding sequences when appropriate control sequences that are compatible with the designated host are used. For example, among prokaryotic hosts, *Escherichia coli* is frequently used. Also, for example, expression control sequences for prokaryotes include but are not limited to promoters, optionally containing operator portions, and ribosome binding sites. Transfer vectors compatible with prokaryotic hosts can be derived from, for example, the plasmid pBR322 that contains operons conferring ampicillin and tetracycline resistance, and the various pUC vectors, that also contain sequences conferring antibiotic resistance markers. These markers may be used to obtain successful transformants by selection. Commonly used prokaryotic control sequences include but are not limited to the lactose operon system (Chang et al., *Nature* 198:1056 (1977)), the tryptophan operon system (reported by Goeddel et al., *Nucleic Acid Res.* 8:4057 (1980)) and the lambda-derived P1 promoter and N gene ribosome binding site (Shimatake et

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

34

al., *Nature* 292:128 (1981)), the hybrid Tac promoter (De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292:128 (1983)) derived from sequences of the trp and lac UV5 promoters. The foregoing systems are particularly compatible with *E. coli*; however, other prokaryotic hosts such as strains of *Bacillus* or *Pseudomonas* may be used if desired.

Eukaryotic hosts include yeast and mammalian cells in culture systems. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis* are commonly used yeast hosts. Yeast-compatible vectors carry markers that permit selection of successful transformants by conferring prototrophy to auxotrophic mutants or resistance to heavy metals on wild-type strains. Yeast-compatible vectors may employ the 2- μ origin of replication (Broach et al., *Meth. Enzymol.* 101:307 (1983)), the combination of CEN3 and ARS1 or other means for assuring replication, such as sequences that will result in incorporation of an appropriate fragment into the host cell genome. Control sequences for yeast vectors are known in the art and include but are not limited to promoters for the synthesis of glycolytic enzymes, including the promoter for 3-phosphoglycerate kinase. See, for example, Hess et al., *J. Adv. Enzyme Res.* 7:149 (1968), Holland et al., *Biochemistry* 17:4900 (1978) and Hitzeman, *J. Biol. Chem.* 255:2073 (1980). For example, some useful control systems are those that comprise the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter or alcohol dehydrogenase (ADH) regulatable promoter, or the hybrid yeast promoter ADH2/GAPDH described in Cousens et al., *Gene* 61:265-275 (1987), terminators also derived from GAPDH, and, if secretion is desired, leader sequences from yeast alpha factor. In addition, the transcriptional

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

regulatory region and the transcriptional initiation region which are operably linked may be such that they are not naturally associated in the wild-type organism.

Mammalian cell lines available as hosts for expression are known in the art and are available from depositories such as the American Type Culture Collection. These include but are not limited to HeLa cells, human embryonic kidney (HEK) cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, baby hamster kidney (BHK) cells, and others. Suitable promoters for mammalian cells also are known in the art and include viral promoters such as that from Simian Virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV), adenovirus (ADV), bovine papilloma virus (BPV) and cytomegalovirus (CMV). Mammalian cells also may require terminator sequences and poly A addition sequences; enhancer sequences which increase expression also may be included, and sequences which cause amplification of the gene also may be desirable. These sequences are known in the art. Vectors suitable for replication in mammalian cells may include viral replicons, or sequences which ensure integration of the appropriate sequences encoding the P2X receptors into the host genome. An example of such a mammalian expression system is described in Gopalakrishnan et al., Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. 290:237-246 (1995).

Other eukaryotic systems are also known, as are methods for introducing polynucleotides into such systems, such as amphibian cells, using standard methods such as described in Briggs et al., Neuropharmacol. 34:583-590 (1995) or Stühmer, Meth. Enzymol. 207:319-345 (1992), insect cells using methods described in Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), and the like.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

The baculovirus expression system can be used to generate high levels of recombinant proteins in insect host cells. This system allows for high level of protein expression, while post-translationally processing the protein in a manner similar to mammalian cells. These expression systems use viral promoters that are activated following baculovirus infection to drive expression of cloned genes in the insect cells (O'Reilly et al. (1992) *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, IRL/Oxford University Press).

Transfection may be by any known method for introducing polynucleotides into a host cell, including packaging the polynucleotide in a virus and transducing a host cell with the virus, by direct uptake of the polynucleotide by the host cell, and the like, which methods are known to those skilled in the art. The transfection procedures selected depend upon the host to be transfected and are determined by the routineer.

The expression of the receptor may be detected by use of a radioligand selective for the receptor. However, any radioligand binding technique known in the art may be used to detect the receptor (see, for example, Winzor et al. (1995) *Quantitative Characterization of Ligand Binding*, Wiley-Liss, Inc., NY; Michel et al., *Mol. Pharmacol.* 51:524-532 (1997)). Alternatively, expression can be detected by utilizing antibodies or functional measurements, i.e., ATP-stimulated cellular depolarization using methods that are well known to those skilled in the art. For example, agonist-stimulated Ca^{2+} influx, or inhibition by antagonists of agonist-stimulated Ca^{2+} influx, can be measured in mammalian cells transfected

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US88/10919

37

with the recombinant P2X₂ receptor cDNA, such as COS, CHO or HEK cells. Alternatively, Ca²⁺ influx can be measured in cells that do not naturally express P2 receptors, for example, the 1321N1 human astrocytoma cell line, have been prepared using recombinant technology to transiently or stably express the P2X₂ and receptor.

The P2X polypeptide is recovered and purified from recombinant host cell cultures expressing the same by known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, hydroxyapatite chromatography or lectin chromatography. Protein refolding steps can be used, as necessary, in completing configuration of the protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps.

Those polypeptides encompassed by the present invention are preferably about 40-60% percent similar to the amino acid sequence corresponding to the P2X₂ receptor, more preferably about 70-85% percent similar to the amino acid sequence of the P2X₂ receptor, and even more preferably at least about 90% percent similar to the amino acid sequence of the P2X₂ receptor.

The human P2X receptor polypeptide, or fragments thereof, of the present invention, also may be synthesized by conventional techniques known in the art, for example, by chemical synthesis such as solid phase peptide synthesis. In general, these methods employ either solid or solution phase synthesis methods. See, for example, J. M. Stewart and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

38

Chemical Co., Rockford, IL (1984) and G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254, for solid phase peptide synthesis techniques; and M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin (1984) and E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, supra, Vol. 1, for classical solution synthesis.

In one preferred system, either the DNA or the RNA derived therefrom, each of which encode the specific human P2X₃ receptor, may be expressed by direct injection into a cell, such as a *Xenopus laevis* oocyte. Using this method, the functionality of the human P2X₃ receptor encoded by the DNA or the mRNA can be evaluated as follows. A receptor-encoding polynucleotide is injected into an oocyte for translation into a functional receptor subunit. The function of the expressed variant human P2X₃ receptor can be assessed in the oocyte by a variety of techniques including electrophysiological techniques such as voltage-clamping, and the like.

Receptors expressed in a recombinant host cell may be used to identify compounds that modulate P2X₃. In this regard, the specificity of the binding of a compound showing affinity for the receptor is demonstrated by measuring the affinity of the compound for cells expressing the receptor or membranes from these cells. This may be done by measuring specific binding of labeled (for example, radioactive) compound to the cells, cell membranes or isolated receptor, or by measuring the ability of the compound to displace the specific binding of a standard labeled ligand. See, Michel

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

39

et al., supra. Expression of variant receptors and screening for compounds that bind to, or inhibit the binding of labeled ligand to these cells or membranes, provide a method for rapid selection of compounds with high affinity for the receptor. These compounds may be agonists, antagonists or modulators of the receptor.

Expressed receptors also may be used to screen for compounds that modulate P2X receptor activity. One method for identifying compounds that modulate P2X activity, comprises providing a cell that expresses a specific human P2X receptor polypeptide, combining a test compound with the cell and measuring the effect of the test compound on that P2X receptor activity. The cell may be a bacterial cell, a mammalian cell, a yeast cell, an amphibian cell, an insect or any other cell expressing the receptor. Preferably, the cell is a mammalian cell or an amphibian cell. Thus, for example, a test compound is evaluated for its ability to elicit an appropriate response, e.g., the stimulation of cellular depolarization or increase in intracellular calcium levels due to calcium ion influx if a P2X purinoreceptor is expressed in the host cell, the stimulation of an increase in intracellular calcium ion levels and/or inositolphospholipid hydrolysis and the formation of inositol phosphate if a P2Y purinoreceptor is expressed, or for the compound's ability to modulate the response to a P2X or P2Y purinoreceptor agonist or antagonist.

The level of intracellular calcium may be analyzed using a calcium ion-sensitive fluorescent indicator. Cellular fluorescence may be monitored using a fluorometer. Examples of calcium ion-sensitive fluorescent dyes include, for example, quin-2 (see, e.g., Tsien et al., J. Cell. Biol.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

40

94:325 (1982)), fura-2 (see, e.g., Grynkiewicz et al., J. Biol. Chem. 260:3440 (1985)), calcium green-1, indo-1 (see, e.g., Grynkiewicz et al., *supra*), fluo-3 (see, e.g., Kao et al., J. Biol. Chem. 264:8179 (1989)) and rhod-2 (see, e.g., Tsien et al., J. Biol. Chem. abstract 89a (1987)), and the nonspecific esterase-hydrolyzable acetoxymethyl esters thereof, all of which are commercially available (Molecular Probes, Eugene, OR; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Membrane depolarization of cells genetically engineered to express a P2X_n purinoreceptor may be monitored using a fluorescent dye that is sensitive to changes in membrane potential. For example, the potential-sensitive fluorescent dye partitions into a membrane upon depolarization and results in a detectable increase in cellular fluorescence. Examples of such membrane potential-sensitive fluorescent dyes include carbocyanines, such as 3,3'-dipentylloxacarbocyanine iodide (DiOC₅) and 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (DiSC₃), oxonols, such as bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol (DiBAC₄(5)) or bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol (DiBAC₄(5)), or the like.

In order to calibrate the fluorescence emission of these dyes *in situ*, an agent that quenches the fluorescence emission may be used. Thus, for example, anti-fluorescein (Molecular Probes) quenches approximately 87% of the fluorescence of a 5 nM solution of fluo-3 at pH 7.0, and may be used to calibrate the fluorescence emission of this dye. When acetoxymethyl ester dye derivatives are used, incomplete hydrolysis of the ester may result in a fluorescent indicator that is fluorescent but insensitive to calcium ions. Controls for such a situation include transporting saturating amounts

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

41

of calcium ions into the cell by an ionophore to achieve the maximum fluorescence response and transport of manganese ions into the cell to quench the fluorescence of the indicator if all acetoxymethyl esters have been hydrolyzed. One means by which such ions can be transported into cells is with the use of an ionophore, such as A23187 (see, e.g., Pressman *et al.* (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45:501) (Sigma Chemical Co.), the brominated derivative thereof (see, e.g., Deber *et al.* (1985) *Anal. Biochem.* 146:349) (Molecular Probes), or other ionophores well known in the art.

In addition, it may be desirable to quantify the amount of intracellular calcium ion from the fluorescence emission of a cell by comparing the fluorescence data obtained from the test compounds to a calibration curve that was generating by a series of calibrators each having a known calcium ion concentration. Thus, calcium ion standards are made having a range of concentrations by preparing a stock solution of, e.g., CaCl_2 , from which dilutions may be made to attain the desired standard concentration(s). The fluorescence emission of the standards in the presence of the calcium ion-sensitive fluorescent indicator dye is used to construct a standard curve and the intracellular calcium ion concentration of the genetically engineered cell in the assay is determined from the standard curve. Alternatively, cells previously treated with a calcium ionophore may be incubated with the indicator dye and the calcium ion standards used to generate the standard curve.

The assay may be conducted manually or using an automated system. For a high capacity functional screening assay identifying human purinoreceptor ligands, an automated

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

42

system is preferred. An example of such an automated system comprises providing a 96-well culture plate in each well of which is cultured a cell genetically engineered to encode and express a human purinoreceptor polypeptide. The plate is loaded into a fluorescence imaging plate reader ("FLIPR"), which simultaneously measures the kinetics of intracellular calcium flux in each of the 96 wells. Such an FLIPR is commercially available from Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, CA). The FLIPR is capable of quantitatively transferring fluids into and from each well of the 96-well plate and thus can be used to add the calcium-ion sensitive fluorescent indicator dye, a candidate compound, a purinoreceptor agonist, e.g., ATP, UTP, 2-methylthioATP, or the like, and/or a purinoreceptor antagonist, e.g., suramin, cibacron blue, PPADS, or the like. The FLIPR collects fluorescence data throughout the course of the assay.

In a similar manner, the presence of a purinoreceptor agonist or antagonist in a test sample may be determined using a manual or an automated system. An automated system for practicing the method comprises providing a 96-well culture plate in each well of which a genetically engineered cell that expresses a purinoreceptor is cultured. The fluorescent indicator dye, test sample, and/or purinoreceptor agonist are added to each well and the fluorescence emission from each well is simultaneously monitored by an FLIPR.

P2X purinoreceptor drugs are considered potential therapeutic agents in several disorders including, without limitation, central nervous system or peripheral nervous system conditions, e.g., epilepsy, pain, depression, neurodegenerative diseases, and the like, and in disorders of

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

43

the reproductive system, asthma, peripheral vascular disease, hypertension, immune system disorders, irritable bowel disorder or premature ejaculation.

In addition, the DNA, or RNA derived therefrom, can be used to design oligonucleotide probes for DNAs that express specific P2X receptors. As used herein, the term "probe" refers to a structure comprised of a polynucleotide, as defined above, which contains a nucleic acid sequence complementary to a nucleic acid sequence present in a target polynucleotide. The polynucleotide regions of probes may be composed of DNA, and/or RNA, and/or synthetic nucleotide analogs. Such probes could be useful in *in vitro* hybridization assays to distinguish P2X₁ and P2X₂ variants from wild-type message, with the proviso that it may be difficult to design a method capable of making such a distinction given the small differences that may exist between sequences coding the wild-type and a variant P2X receptor. Alternatively, a PCR-based assay could be used to amplify the sample RNA or DNA for sequence analysis.

Furthermore, each specific P2X polypeptide or fragment(s) thereof can be used to prepare monoclonal antibodies using techniques that are well known in the art. The specific P2X receptor or relevant fragments can be obtained using the recombinant technology outlined below, *i.e.*, a recombinant cell that expresses the receptor or fragments can be cultured to produce quantities of the receptor or fragment that can be recovered and isolated. Alternatively, the specific P2X polypeptide or fragment(s) thereof can be synthesized using conventional polypeptide synthetic techniques as known in the art. Monoclonal

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

44

antibodies that display specificity and selectivity for a particular P2X polypeptide can be labeled with a measurable and detectable moiety, for example, a fluorescent moiety, radiolabels, enzymes, chemiluminescent labels and the like, and used in *in vitro* assays. It is theorized that such antibodies could be used to identify wild-type or variant P2X receptor polypeptides for immuno-diagnostic purposes. For example, antibodies have been generated to detect amyloid β 1-40 v. 1-42 in brain tissue (Wisniewski *et al.* (1996) *Biochem. J.* 313:575-580; also see, Suzuki *et al.* (1994) *Science* 264:1336-1340; Gravina *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7013-7016; and Turnet *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:8966-8970).

Allosteric Modulation of Receptor Activity:

Activation of the P2X receptors by ATP and other P2X receptor agonists regulates ion gradients across the cell membrane, modulates the cytosolic concentrations of cations, including Ca^{2+} , Na^+ and K^+ , and has a role in the regulation of cell membrane potential.

Allosteric modulators of receptor activity generally enhance agonist induced receptor activation by binding to secondary sites on the receptor. With respect to cibacron blue, the present invention relates to the discovery that this P2X receptor antagonist has the ability to allosterically modulate the effects of a P2X₂ receptor present in a mammal such as a human or a rat.

More specifically, in cells expressing the human P2X₂ receptor, cibacron blue has the ability to mediate approximately a 3-7 fold increase in the magnitude and potency of ATP-activated Ca^{2+} influx and transmembrane currents. The

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

45

half-maximal concentration of cibacron blue required to mediate maximal potentiation is independent of the agonist used to activate the hP2X₂ receptor. Since cibacron blue enhances both agonist potency and the absolute magnitude of P2X₂ receptor activation, these allosteric actions are significantly distinct from the previously reported effects of cibacron blue on P2X₄ receptor activity (Miller et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 354:562-571 (1998)). Thus, consistent with the properties of other ligand-gated ion channels, P2X₂ receptor activity may be allosterically modulated by a ligand distinct from the endogenous agonist.

With respect to the effect of cibacron blue on antagonists, the non-selective P2 receptor antagonist, PPADS, for example, causes a rightward shift of the cibacron blue concentration-effect curve, whereas increasing concentrations of cibacron blue attenuate PPADS antagonism.

The rat homolog of the P2X₂ receptor produces similar results to those presented above and in the examples, upon exposure to cibacron blue, suggesting that the modulatory activity of cibacron blue is not species-dependent.

It should be noted that the mechanism of cibacron blue-mediated P2X₂ receptor potentiation is not a secondary result of its previously described inhibitory effect on ectonucleotidases (Stout et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 36:927-934 (1995)). If cibacron blue-mediated ecto-ATPase activity were a contributing factor, it would be expected that cibacron blue alone would mediate agonist-like activity by increasing the level of endogenous ATP in the medium. However, as evidenced by the data corresponding to the examples below, there are no intrinsic effects of cibacron

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

W/O 00/63379

PCT/US00/10919

46

blue on hP2X₃ receptor activity. Furthermore, the accumulation of endogenous agonist as a result of ecto-ATPase inhibition would be expected to affect all P2 receptor subtypes, rather than the P2X₃ receptor alone.

In addition to ATP, in accordance with the present invention, cibacron blue may be utilized to potentiate hP2X₃ receptor activation by other P2X receptor agonists including, for example, 2-meSATP, BzATP and $\alpha\beta$ -meATP. In each case, the half-maximal concentration of cibacron blue required to mediate full potentiation is similar, suggesting that the effect of cibacron blue on the receptor is independent of the agonist. Thus, any agonist, as deemed to be appropriate by a medical practitioner, may be utilized in combination with cibacron blue.

In addition to mediating an increase in the magnitude of the maximal P2X₃ receptor signal, cibacron blue enhances agonist potency by causing a leftward shift of the ATP concentration-response curve. In particular, in the presence of 3 μ M cibacron blue, ATP is 7-fold more potent than in its absence, suggesting that cibacron blue may have an effect on the affinity and/or the efficacy of ATP for the hP2X₃ receptor, or serves to enhance the cooperativity of ATP binding to the multimeric receptor.

The modulatory activity of cibacron blue may be corroborated by the observation that the inhibitory potency of a non-competitive P2X₃ antagonist, PPADS, is inversely related to the concentration of cibacron blue. Cibacron blue, while increasing the magnitude of P2X₃ receptor activation, causes a rightward shift of the PPADS concentration-effect curve demonstrating that this allosteric modulator reduces

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

47

antagonist activity. This effect of cibacron blue is independent of ATP concentration and is thus not a consequence of an apparent increase in receptor occupancy.

The cibacron blue-mediated leftward shift of the agonist concentration-effect curves and rightward shift of the antagonist concentration-effect curves, support the conclusion that cibacron blue functions as an allosteric modulator of P2X₁ receptor activity. Furthermore, the mutual exclusivity of PPADS-mediated inhibition and cibacron blue-mediated potentiation suggests a complex interaction between regulatory ligands that modulate P2X₁ receptor function.

The modulatory effect of cibacron blue described above may be observed at both rat and human P2X₁ receptors, and is at least 1000-fold more potent than the actions of Ca²⁺, suggesting that endogenously expressed P2X₁ receptors might be subject to functional regulation by a multiplicity of low and high-affinity interactions.

Acceleration of Receptor Recovery Subsequent to Desensitization:

In addition to potentiating the effects of ATP at the hP2X₁ receptor, cibacron blue also has the ability to produce approximately a 6-fold increase in the rate of hP2X₁ receptor recovery from desensitization, as evidenced by its ability to restore ATP-responsiveness to acutely desensitized receptors. Therefore, in accordance with the present invention, cibacron blue may be administered to a patient in order to increase the rate of P2X₁ receptor resensitization following a phase of desensitization.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

48

Furthermore, it should be noted that the potentiation of both the human and rat P2X₃ receptors by cibacron blue occurs concomitantly with accelerated receptor resensitization. Thus, in accordance with the present invention, one may potentiate the receptor while simultaneously resensitizing the receptor.

The apparent rate of recovery from desensitization is increased six-fold in the presence of 50 μ M cibacron blue. The decrease in the half-life of the refractory period after desensitization suggests that endogenously expressed P2X₃ receptors may be subject to modulatory mechanisms which facilitate their functional recovery.

It is believed that the binding of cibacron blue to the P2X₃ receptor leads to a rapid conformational change, resulting in the potentiation of ATP-mediated P2X₃ receptor activation. This conformational change also mediates a slower, long-term effect on the desensitization state of the receptor, such that allosteric modulation and functional resensitization occur sequentially and may share a common mechanism of action.

In view of the above, the present invention relates to the novel discovery that cibacron blue selectively modulates human and rat P2X₃ receptors by enhancing agonist potency and efficacy, as well as facilitating receptor resensitization following acute agonist-induced desensitization. Thus, one may administer cibacron blue to a patient in order to both modulate the receptor, if desired, for example, in sensory deficit studies, as well as facilitate resensitization, or to achieve either one of these two effects.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

49

Therapeutic Implications:

In accordance with the present invention, one may also peripherally administer P2 receptor antagonists to a patient in order to, for example, reduce nociception (i.e., the sensation of pain). For example, TNP-ATP (i.e., a potent P2X receptor agonist) may be utilized to reduce acute or persistent nociception in a patient.

Peripherally administered TNP-ATP attenuates both acute and persistent nociception in the formalin (i.e., inflammatory stimulus) test that provides evidence for a contribution of both P2X₁ and/or P2X_{2/3} receptors to peripheral nociceptive neurotransmission. This view is further supported by the ability of cibacron blue to specifically enhance P2X₁ and P2X_{2/3} receptor activation *in vitro* and to enhance both acute and persistent nociception *in vivo*.

The pronociceptive effects of cibacron blue *in vivo* appear to be pharmacologically specific since another anthraquinone sulfonic acid derivative, reactive orange, which does not alter P2X₁ receptor function, does not enhance the nociceptive effects of intradermal formalin.

In summary, in view of the above and as evidenced by the examples presented below, activation of ATP-gated P2X₁ and P2X_{2/3} receptors, which are highly localized on capsaicin-sensitive primary sensory neurons (Vulchanova et al., Neuropharmacol. 36:1229-1242 (1997)), contribute to nociceptive neurotransmission. The peripheral administration of the P2X receptor agonists initiate acute nociceptive responses in laboratory animals and enhance the nociceptive effects of other noxious stimuli including carrageenan, formalin, and capsaicin as illustrated herein (see also Bland-Ward et al., Br. J.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

50

Pharmacol. 122:366-371 (1997); Hamilton et al., Br. J.
Pharmacol. 126:326-332 (1999); Sawynok et al., Eur. J.
Pharmacol. 330:115-121 (1997); Tsuda et al., Br. J. Pharmacol.
127:449-456 (1999); Tsuda et al., Br. J. Pharmacol. 128:1497-
1504 (1999)). The demonstration that peripherally administered
TNP-ATP attenuates both acute and persistent nociception in the
rat formalin test provides evidence for a contribution of both
P2X₃ and/or P2X_{2/3} receptors to peripheral nociceptive
neurotransmission. This concept is further supported by the
ability of cibacron blue to selectively enhance P2X₃ and P2X_{2/3}
receptor activation *in vitro* and to enhance both acute and
persistent pain *in vivo*. Thus, the pharmacological modulation
by TNP-ATP and cibacron blue of nociceptive responses produced
by a P2 receptor agonist (BzATP) or by an inflammatory stimulus
(formalin) provide evidence for a specific role of P2X₃ and/or
P2X_{2/3} receptor activation in nociceptive neurotransmission.

The examples presented below relate to specific
embodiments for carrying out the present invention. The
examples are offered for illustrative purposes only, and are
not intended to limit the scope of the present invention in
any way.

Efforts have been made to ensure accuracy with respect to
numbers used (e.g., amounts, temperatures, etc.), but some
experimental error and deviation should, of course, be allowed
for.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

51

EXAMPLE 1IDENTIFICATION OF A HUMAN cDNA SEQUENCE
LIKELY TO ENCODE P2X₂ POLYPEPTIDE

The predicted amino acid sequence of the rat P2X₂ receptor (NCBI sequence I.D. number 1103623) was used to search for human DNA sequences which would code for similar polypeptides. The TBLASTN database search tool (Altschul (1993) *J. Mol. Evol.* 36:390-300) was used, which allows querying nucleotide databases with a protein sequence by dynamically translating the DNA sequences into all 6 possible reading frames. A search of the Genbank sequence-tagged sites (STS) database revealed a human genomic fragment, 229 basepairs in length, containing an open reading frame which would be predicted to encode a polypeptide having a high degree of homology to a region of the rat P2X₂ receptor. The deposited sequence for this fragment (Genbank accession number G03901) was as follows:

```
CCCGAATCGG TGGACTGCTT CTCCTCTGTG GTCTGGTCCG TGGGGTACAC  
TGGGTTGGTC AAAGCCGCGA TTTTCAGTGT AGTCTCATTC ACNTGNAGGC  
GAAAGAGCTG GTGTTGTCAA GTTCTGACTA TGGGCAATGT CCTCTTTTGT  
GACCCCATTT GACGACTCA GCAGTGGGCG CCCATGACCT AGTCATGAGG  
GGAGCCAGGA CATCTGTGTG ATCCCAAGG (SEQ ID NO:1)
```

Where "N" represents any of the bases A, T, G and C.

EXAMPLE 2IDENTIFICATION OF THE 5' END OF THE P2X₂ cDNA**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 00/63379

PCT/US00/10919

52

Based on the sequence of G03901, primers were designed for use in reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) procedures in an effort to isolate the intact open reading frame for this receptor. The primers used in the reactions described below were as follows:

Primer 1s (SEQ ID. NO:2):

5'-TTTACCAACCCAGTGTACCC-3'

Primer 2s (SEQ ID. NO:3):

5'-ACCACAGTGGAGAAGCAGTC-3'

Primer 3as (SEQ ID. NO:4):

5'-GAATCGGTGGACTGCTTCTC-3'

Primer 4as (SEQ ID. NO:5):

5'CGATTTTCAGTGTAGTCTCATTTC-3'

Primer 5as (SEQ ID. NO:6):

5'GGGCTACACTGGGTTGCTAA-3'

5'RACE Anchor Primer (SEQ ID. NO:7):

5'CUACUACUACUAGGCCACGCGTTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG-3'

Universal Adapter Primer (SEQ ID. NO:8):

5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTTCGACTAGTAC-3'

Adapter Primer (SEQ ID. NO:9):

5'-GGCCACGCGTTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

53

Abridged Universal Adapter Primer (SEQ ID. NO:10):

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

5'hP2X₁ Primer (SEQ ID. NO:11):

5'-CACCATGAACTGCATATCCGACTTC-3'

3'hP2X₂ Primer (SEQ ID. NO:12):

5'CTAGTGGCCTATGGAGAAGGC-3'

To identify the 5' end of the cDNA which is derived from the genomic region which sequence G03901 is part of, the RACE technique (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Frohman et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8998-9002) was employed. Extension of the cDNA identified through the RT-PCR step was accomplished using the 5'RACE™ reagent system (Life Technologies, Gaithersburg, MD). One microgram of poly A+ RNA derived from human pituitary gland tissue (Cat. # 65894-1, Lot # 6080167; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) was used in a reaction using reagents provided in the kit as described; 1 μl (1 μg) of RNA was combined with 3 μl (3pmol) Primer 3as and 11 μl RNase-Free water (water treated with diethylpyrocarbonate, or DEPC) and heated to 70°C for 10 minutes followed by 1 minute on ice. 2.5 μl 10x reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 3 μl 25 mM MgCl₂, 1 μl 10 mM dNTP mix, and 2.5 μl 0.1 M DTT were added. The mix was incubated at 42°C for 2 minutes after which 1 μl Superscript II™ reverse transcriptase (Life Technologies) was added. The reaction was incubated for an additional 30 minutes at 42°C, 15 minutes at 70 °C, and on ice for 1 minute. One microliter of RNase H (2 units) was added and incubated at 55°C for 20 minutes. The cDNA was

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WQ 00/63379

PCT/US00/10919

54

purified using the GlassMax™ columns included in the kit. The cDNA was eluted from the column in 50 µl distilled water (dH₂O), lyophilized, and resuspended in 21 µl dH₂O. Tailing of the cDNA was accomplished in the following reaction: 7.5 µl dH₂O, 2.5 µl reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 1.5 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 µl 2mM dCTP, and 10 µl of the cDNA were incubated at 94°C for 3 minutes, then 1 minute on ice, followed by 10 minutes at 37°C. Finally, the mixture was incubated at 70°C for 10 minutes and then placed on ice.

PCR amplification of the cDNA was performed in the following steps: 5 µl of the cDNA was included in a reaction which also contained 5 µl 10x GeneAmp™ PCR buffer (Perkin Elmer, Foster City, CA) (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3, 15mM MgCl₂, and 0.01%(w/v) gelatin), 1 µl 10 mM dNTP mix, 1µl (10 pmol) Anchor Primer, 1 µl (10 pmol) Primer 5as, and 35 µl dH₂O. The reaction was heated to 95°C for 1 minute, then held at 80°C for 2 minutes, during which 0.5 µl (2.5 units) Amplitaq™ polymerase (Perkin-Elmer) was added. The reaction was cycled 35 times under these conditions: 94°C for 15 seconds, 52°C for 20 seconds, and 72°C for 1 minute.

After the amplification, the reaction products were purified utilizing the QiaQuick™ PCR product purification system (Qiagen, Inc., Chatsworth CA) as per the manufacturer's instructions. The products were eluted from the columns with 50 µl TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0), and one microliter of the eluent was utilized as template DNA in a PCR reaction to increase levels of specific product for subsequent isolation. The reamplification also included: 5 µl 10x GeneAmp™ PCR buffer, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1 µl (10 pmol)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

55

Universal Amplification Primer, 1 μ l (10 pmol) Primer 4as, and 40.5 μ l dH₂O. The reaction was heated to 95°C for 1 minute, then held at 80°C during which 0.5 μ l (2.5 units) Amplitaq™ polymerase was added. The reaction was cycled 35 times under these conditions: 94°C for 15 seconds, 50°C for 20 seconds, and 72°C for 1 minute. Amplification products were analyzed via 0.8% agarose gel electrophoresis and a predominant product of approximately 1.3 kilobase pairs in length was detected. This product was excised from the gel and purified via the QiaQuick™ purification system. The product was eluted from the column with 50 μ l dH₂O and lyophilized to 10 μ l volume.

Three microliters of the resulting DNA was used in a ligation reaction with pCR 2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) incubated at 14°C overnight. The ligation products were used to transform *E. coli* from the cloning kit using standard manufacturer's protocols. Insert sizes of resulting clones were determined using EcoRI digestions of the plasmids and clones containing inserts of the approximate size of the PCR product were sequenced using fluorescent dye-terminator reagents (Prism™, Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA) and an Applied Biosystems Model 373 DNA sequencer. The sequence of the 5'RACE product including the EcoRI sites from the pCR 2.1 vector is shown in Figure 1 (SEQ ID NO:13). The sequences of the amplimers (Universal Amplification Primer and the complement to Primer 4as) are underlined.

Example 3

IDENTIFICATION OF THE 3' END OF THE F2X₁ cDNA

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US99/10919

56

To identify the sequence surrounding the termination codon of the open reading frame encoding the human P2X₂ receptor, the Life Technologies 3'RACE™ System was employed with primers designed to STS G03901. Poly A+ RNA (500 nanograms) derived from pituitary gland tissue (see Example 2, above) was used in the reaction as follows: The RNA and 10 picomoles Adapter Primer were combined in a final volume of 12 μ l dH₂O. This mixture was heated to 70°C for 10 minutes and chilled on ice for 1 minute. The following components were added: 2 μ l 10x PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 2 μ l 25 mM MgCl₂, 1 μ l 10mM dNTP mix, and 2 μ l 0.1M dithiothreitol. The reaction was equilibrated to 42°C for 2 minutes after which 1 μ l (200 units) Superscript II™ reverse transcriptase was added and incubation continued at 42°C for 50 minutes. The reaction was terminated by incubation at 70°C for 15 minutes and chilled on ice. Rnase H (1 μ l; 2 units) was added and the mixture was incubated for 20 minutes at 37°C, then stored on ice.

Amplification of the 3' end of the P2X₂ cDNA was accomplished in the following reactions: 2 μ l of the first strand cDNA synthesized above was used in a PCR mixture also including 5 μ l 10x GeneAmp™ PCR buffer, 1 μ l 10mM dNTPs, 1 μ l (10 picomoles), Primer 1s, 1 μ l (10 picomoles) Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) and 39.5 μ l dH₂O. The reaction was heated to 95°C for 1 minute, then held at 80°C for 2 minutes, during which 0.5 μ l (2.5 units) Amplitaq™ polymerase was added. The reaction was cycled 35 times under these conditions: 94°C for 15 seconds, 54°C for 20 seconds, and 72°C for 2 minutes. After cycling, the reaction was incubated for 10 minutes at 70°C and stored at 4°C.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WQ 00/63379

PCT/US00/10919

57

After the amplification, the reaction products were purified utilizing the QiaQuick™ PCR product purification system as per the manufacturer's instructions. The products were eluted from the columns with 50 μ l TE buffer (10mM Tris, 0.1mM EDTA pH 8.0) and one microliter of the eluent was utilized as template DNA in a PCR reaction to increase levels of specific product for subsequent isolation. The reamplification also included: 5 μ l 10x GeneAmp™ PCR buffer, 1 μ l 10 mM dNTP mix, 1 μ l (10 pmol) AUAP, 1 μ l (10 pmol) Primer 2s, and 40.5 μ l dH₂O. The reaction was heated to 95°C for 1 minute, then held at 80 °C during which 0.5 μ l (2.5 units) Amplitaq™ polymerase was added. The reaction was cycled 35 times under these conditions: 94°C for 15 seconds, 54°C for 20 seconds, and 72°C for 2 minutes. Amplification products were analyzed via 0.8% agarose gel electrophoresis and a predominant product of approximately 700 base pairs in length was detected. This product was excised from the gel and purified via the Qiaquick™ purification system. The product was eluted from the column with 50 μ l dH₂O and lyophilized to 10 μ l volume.

Three microliters of the above DNA was used in a ligation reaction with pCR 2.1 vector (Invitrogen) incubated at 15°C for 3.5 hours. The ligation products were used to transform *E. coli* from the cloning kit. Insert sizes of resulting clones were determined using EcoRI digestions of the plasmids and clones containing inserts of the approximate size of the PCR product were sequenced using fluorescent dye-terminator reagents (Prism, Applied Biosystems) and an Applied Biosystems 373 DNA sequencer. The sequence of the 3'RACE product including the EcoRI sites from the pCR 2.1 vector is shown in

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

58

Figure 2 (SEQ ID NO:14), in which the sequences of the amplimers (AUAP and the complement to Primer 2s) are underlined.

Example 4

ISOLATION OF cDNA CONTAINING THE INTACT
OPEN READING FRAME OF HUMAN P2X₁

Using information on the sequence surrounding the initiation and termination codons of the human P2X₁ message, oligonucleotide primers were designed and synthesized to enable RT-PCR of the intact open reading frame of the mRNA. The sequences of these primers, designated 5'hp2X₁ and 3'hp2X₁, are shown above. PCR amplification was performed on a portion (2ul) of the pituitary gland cDNA described in Example 3. A proofreading thermostable polymerase (Cloned Pfu DNA Polymerase, Strategene, La Jolla, CA) was used in the amplification to ensure high-fidelity amplification. The reaction mixture consisted of 2 µl cDNA, 5 µl 10x cloned Pfu polymerase reaction buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.6), 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml nuclease-free bovine serum albumin), 1 µl dNTP mix, 1µl (10 picomoles) 5'hp2X₁ Primer, 1µl (10 picomoles) 3'hp2X₁ Primer, and 39.5 µl dH₂O. The reaction was heated to 95°C for 1 minute, then held at 80°C for 2 minutes, during which time 0.5 µl (1.25units) cloned Pfu polymerase was added. The reaction was cycled 35 times under the following conditions: 94°C for 20 seconds, 52°C for 20 seconds, and 72°C for 3.5 minutes. After cycling, the reaction was incubated for 10 minutes at 70°C.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

59

The reaction products were separated on a 0.8 % agarose gel and a product of approximately 1.2 kilobases was excised and purified via the QiaQuick™ gel purification system. The DNA was eluted with 50 μ l dH₂O, lyophilized and resuspended in 10 μ l dH₂O. One microliter of this DNA was used in a reamplification reaction which also included 5 μ l 10x Pfu reaction buffer, 1 μ l dNTP mix, 1 μ l (10 picomoles) 5'hp2X₃ Primer, 1 μ l (10 picomoles) 3'hp2X₃ Primer, and 40.5 μ l dH₂O. The reaction was heated to 95°C for 1 minute, then held at 80°C for 2 minutes, during which 0.5 μ l (1.25units) cloned Pfu polymerase was added. The reaction was cycled 15 times under the following conditions: 94°C for 20 seconds, 52°C for 20 seconds, and 72°C for 3.5 minutes. After cycling, the reaction was incubated for 10 minutes at 70°C.

The reaction products were separated on a 0.8 % agarose gel and the 1.2 kilobase product was excised and purified via the QiaQuick™ gel purification system. The DNA was eluted with 50 μ l dH₂O, lyophilized and resuspended in 15 μ l dH₂O. Three microliters of the purified PCR product was used in a ligation reaction using the pCRscript™ cloning system (Stratagene) which also included 0.5 μ l (5ng) of the pCRScript™ Amp SK(+) vector, 1 μ l of pCRScript™ 10x Reaction Buffer, 0.5 μ l of 10mM ATP, 1 μ l (5 units) *Srf* I restriction enzyme, 1 μ l (4 units) T4 DNA ligase, and 3 μ l dH₂O. The reaction mixture was incubated at room temperature for one hour, then at 65°C for 10 minutes.

One microliter of this reaction product was used to transform XL-2 blue ultracompetent cells (Stratagene) as per standard manufacturer's protocols. Resulting clones were screened by restriction analysis and sequenced using

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

60

Fluorescent dye-terminator reagents (Prism, Applied Biosystems) and an Applied Biosystems Model 310 DNA sequencer. The sequence of the intact open reading frame is shown in Figure 3 (SEQ ID NO:15). A comparison of the predicted protein sequence of the human P2X₃ of the present invention (SEQ ID NO:16) with that of the corresponding rat polypeptide (SEQ ID NO:17) is depicted in Figure 4.

Example 5

EXPRESSION AND ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT P2X₃ RECEPTORS IN XENOPUS OOCYTES

Oocytes of *Xenopus laevis* were prepared and injected with receptor DNA of the present invention, and receptor responses were measured using two-electrode voltage-clamp, according to procedures previously described (Briggs et al. (1995), *supra*). Oocytes were maintained at 17-18°C in normal Barth's solution (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.66 mM NaNO₃, 0.74 mM CaCl₂, 0.82 mM MgCl₂, 2.4 mM NaHCO₃, 2.5 mM sodium pyruvate, and 10 mM Na N-(2-hydroxy-ethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) ("HEPES") buffer, final pH 7.55) containing 100 µg/ml gentamicin. Responses were measured at a holding potential of -60 mV in modified Barth's solution containing 10 mM BaCl₂ and lacking CaCl₂ and MgCl₂ (final pH 7.4). However, in some experiments, the cell potential was intentionally varied in order to determine the response current-voltage relationship. Agonist was applied briefly using a computer-controlled solenoid valve and a push/pull applicator positioned to within 200-400 µm from the oocyte. Responses were recorded by computer in synchrony with agonist application. Antagonists were included with agonist in the push/pull applicator and were applied to the bath by superfusion for at least 3 minutes

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

61

before application of agonist. Responses were quantified by measuring the peak amplitude.

DNA for injection into oocytes was the P2X₃ insert from pCDNA3.1 prepared as described in Example 2. The clone was grown up and prepared in large scale using the QIAGEN maxiprep DNA preparation system according to the manufacturer's instructions. The DNA was ethanol precipitated and resuspended in TE buffer.

For functional analysis of human P2X₃ receptors, 10 ng of human P2X₃ DNA prepared as described above were injected into the nucleus of *Xenopus* oocytes. Oocytes were incubated in normal Barth's solution containing 100 µg/ml gentamicin for 2-7 days following injection. The response to 10 µM ATP was then recorded.

The results of the above expression and analysis show the receptors of the present invention to be functional. Oocytes injected with human P2X₃ DNA responded to extracellular application of ATP by exhibiting a mixed-conductance cation current (100-6000 nA). Oocytes injected with an appropriate amount of water did not respond to ATP. An approximate ATP EC₅₀ of 0.7 µM was obtained from concentration-response relationships (0.01-1000 µM) from these oocytes. ATP-induced current-voltage relationships were also recorded from these oocytes. These revealed a reversal potential of approximately zero mV, with pronounced inward rectification recorded at negative membrane potentials.

Another P2X receptor agonist, α,β -methylene-ATP, elicited maximal currents similar to those evoked by ATP, although it was slightly less potent (EC₅₀ = 2.1 µM). Application of a third P2X receptor agonist, 2-methylthio-ATP, was slightly more

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

62

potent ($EC_{50} = 0.4 \mu\text{M}$) than either ATP or α,β -methylene-ATP. Functional antagonism of responses was determined by application of the non-specific P2X receptor antagonists suramin or pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS). Both antagonists produced a complete block of ATP ($0.3 \mu\text{M}$)-induced currents, with suramin displaying increased potency ($IC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$) relative to PPADS ($IC_{50} = 1 \mu\text{M}$).

In summary, injection of human P2X₂ receptor DNA into *Xenopus* oocytes resulted in expression of functional P2X₂ receptors on the cell surface, and these receptors function as ligand-gated non-specific cation channels. These receptors responded to extracellular P2 receptor agonists with a rank order potency of 2-methylthio-ATP > ATP > α,β -methylene-ATP. They also exhibit inward rectification and are blocked by both P2 receptor antagonists PPADS and suramin.

Example 6

Measurement of Intracellular Calcium Levels Subsequent to Cibacron Blue Exposure

The following materials, cell lines and culture apply to this example and all examples which follow, where noted.

Materials

Adenosine 5'-triphosphate disodium (ATP), 2-methylthio-ATP tetrasodium (2-meSATP), and $\alpha\beta$ -methylene ATP dilithium ($\alpha\beta$ -meATP) were obtained from Research Biochemicals International (Natick, MA). 2' & 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP tetraethylammonium salt (mixed isomers) (BzATP) and cibacron blue were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

63

MO). G418 sulfate was obtained from Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, CA). Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (with 4.5 mg ml⁻¹ glucose and 4 mM L-glutamine) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, Utah). Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (with 1 mg ml⁻¹ glucose and 3.6 mg l⁻¹ Na pyruvate, without phenol red), hygromycin and Lipofectamine were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY). Fluo-4 AM was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR).

Stable cell lines and cell culture

The rat P2X₃ receptor cDNA was 100% identical to the previously published sequence (Garcia-Guzman et al., Brain Res. Mol. Brain. Res. 47:59-66 (1997)). The human P2X₃ receptor was essentially identical to that reported by Garcia-Guzman et al, *supra* (1997) (Genbank accession #Y07683). A single exception was at amino acid residue 126, where an arginine was encoded; the published sequence encodes a proline at this position. Multiple replications of cloning the human P2X₃ receptor yielded the same sequence, suggesting that the observed difference is not the result of a cloning artifact or a sequencing error. 1321N1 human astrocytoma cells stably expressing rP2X₃, or hP2X₃ receptors (1321rX₃-3, and 1321hX₃-11, respectively) were constructed using standard lipid-mediated transfection methods. All cell lines were maintained in D-MEM containing 10% FBS and antibiotics as follows: 1321rX₃-3 and 1321hX₃-11 cells, 300 µg ml⁻¹ G418; and 1321rX₂-1 cells, 100 µg ml⁻¹ hygromycin. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

64

Measurement of intracellular Ca²⁺ levels

P2X receptor function was determined on the basis of agonist-mediated increases in cytosolic Ca²⁺ concentration. A fluorescent Ca²⁺ chelating dye (Fluo-4) was used as an indicator of the relative levels of intracellular Ca²⁺ in a 96-well format using a Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Cells were grown to confluence in 96-well black-walled tissue culture plates and loaded with the acetoxymethylester (AM) form of Fluo-4 (1 μM) in D-PBS for 1-2 hours at 23°C. Cibacron blue (50 μl of 4x concentration) was added 3 min before the addition of agonists (50 μl of 4x concentration) (final volume = 200 μl). Fluorescence data was collected at 1 to 5 sec intervals throughout each experimental run.

Data shown in Figure 5a are based on the peak increase in relative fluorescence units as compared to basal fluorescence. Concentration-effect curves for all cell types are shown as a percentage of the maximum ATP-mediated signal measured in the absence of cibacron blue. Concentration response data were analyzed using a four-parameter logistic Hill equation in GraphPad Prism (San Diego, CA). All data are expressed as mean ± sem. Statistical analysis was performed using Student's t-test (P < 0.05) on the basis of pIC₅₀ values.

As evidenced by the data, ATP activation caused a rapid and transient increase in the levels of cytoplasmic Ca²⁺. The shapes of the Ca²⁺ influx curves were qualitatively similar to electrophysiological data (see Example 9 below) measured in *Xenopus oocytes* (Fig 5b), and were consistent with previously reported observations (Blanchi et al, 1999). Pre-incubation of the cells for 3 min with cibacron blue (10 μM) led to a 3-7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

65

fold increase in the magnitude of the maximal ATP-activated response (E_{max}), as measured both by Ca^{2+} influx (Fig 5a) and transmembrane currents (Fig 5b). Cibacron blue mediated a similar 307 fold potentiation of the maximal ATP response using cells expressing the rat P2X₁ receptor homolog (data not shown).

Pilot experiments showed that the onset of the cibacron blue effect occurred in less than 1 min, thus a 3 min pre-application time was selected to ensure full activity. Cibacron blue alone exhibited no intrinsic effect on Ca^{2+} influx at concentrations up to 200 μ M and did not measurably affect the pH of the assay buffer (pH 7.2) at concentrations up to 1 mM. The potentiating effect of cibacron blue was specific for the P2X₁ receptor, since concentrations of cibacron blue up to 1 mM did not alter agonist activation of hP2X₁, hP2X₂ and hP2X₃ receptors expressed in 1321N1 cells (data not shown). Cibacron blue (10 μ M) did enhance the potency of ATP activation of hP2X₁ receptor-mediated Ca^{2+} influx in the presence of sub-maximal concentrations of agonist, as has previously been described (Miller et al., 1998). However, no increase in the maximal ATP activated hP2X₁ response was observed.

Example 7

Characterization of Receptor Electrophysiology Following Exposure to Cibacron Blue

Electrophysiology:

The hP2X₁ receptor subtype expressed in *Xenopus* oocytes was characterized using standard two-electrode voltage-clamp techniques. Briefly, oocytes were denuded of overlying

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

66

follicle cells and intranuclear injections of 12 nl cDNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were performed on each oocyte. Oocytes were used for recordings 1-5 days post-injection and were perfused (3.5 ml/min) with a standard recording solution containing (mM): 96 NaCl, 2.0 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 5.0 Na-pyruvate and 5.0 Na-Hepes (pH 7.4). Electrodes (1.5-2.0 M Ω) were filled with 120 mM KCl. ATP was applied using a solenoid-driven drug application pipette positioned close to the oocyte in the perfusion chamber. ATP was applied every 3.5 min, and application duration typically lasted 5 sec. Cibacron blue was bath applied for at least 3 min before being co-applied with ATP through the drug pipette. Cells were voltage-clamped at -60 mV. Data were acquired and analyzed using pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA).

As evidenced by the data of Figure 5b, cibacron blue (1 μM) produced a potentiation of the peak amplitude of 1 μM ATP-activated currents to $213 \pm 49\%$ of control (Fig 5b). The effect of cibacron blue on the E_{max} of the hP2X₂ receptor-mediated transmembrane current was long-lasting, such that full potentiation was observed up to 9 min after a brief (1 min) exposure to cibacron blue. The onset of the cibacron blue potentiation effect was rapid (<1 min; data not shown). Co-application of cibacron blue and ATP resulted in potentiation of the Ca²⁺ influx signal, albeit with lower apparent potency and E_{max} than observed after a 3 min pre-incubation period. Cibacron blue (10 μM) had no apparent effect on the kinetics of the ATP-activated Ca²⁺ flux response (Fig 5a) or on the acute desensitization kinetics of the hP2X₂ receptor (Fig 5b).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

67

The potentiation of ATP-activated human P2X₃ receptors by cibacron blue was concentration-dependent (Fig 6), with an observed half-maximal response (EC₅₀) of $1.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ (Fig 6). In addition to increasing the E_{max} of the ATP-activated hP2X₃ receptor response, cibacron blue also caused a concentration-dependent leftward shift of the ATP concentration-effect curve (Fig 6). In the presence of 3 μM cibacron blue, the magnitude of ATP-activated hP2X₃ receptor signaling was increased more than 3-fold (E_{max} = $330 \pm 5\%$) whereas the EC₅₀ of ATP was decreased from $356 \pm 100 \text{ nM}$ to $46 \pm 8 \text{ nM}$ (Fig 6).

The EC₅₀ of cibacron blue required to mediate potentiation was similar irrespective of the agonist used to activate hP2X₃ receptors. The E_{max} of hP2X₃ receptor activation by maximal (10 μM) concentrations of either ATP, BzATP, 2-meSATP or $\alpha\beta\text{-meATP}$, all of which are known agonists for the P2X₃ receptor, was similar at all cibacron blue concentrations (Fig 7). Cibacron blue did not confer agonist activity to nucleotides previously shown to be inactive at the P2X₃ receptor (Garcia-Guzman et al., supra (1997); Bianchi et al., *Eur. J. Pharmacol.* 376:127-138 (1999), including ADP, UTP, and UDP (100 μM , data not shown). The potentiating effect of cibacron blue was unaffected by depletion of intracellular Ca²⁺ stores using thapsigargin but was completely abrogated in the presence of excess extracellular EGTA, suggesting that the increased magnitude of the ATP-activated response was due to increased Ca²⁺ flow across the plasma membrane (data not shown).

Example 8

Ability of Triazene Dyes to Potentiate Receptor Activation by ATP

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Triazene dyes structurally related to cibacron blue, including basilen blue, reactive blue 5, reactive red 2, reactive orange 14 and reactive yellow 2, were tested for their ability to potentiate hP2X₃ receptor activation by ATP (Fig 8). Whereas reactive orange 14 and reactive yellow 2 exhibited little or no potentiating activity, basilen blue, reactive blue 5 and reactive red 2 mediated significant hP2X₃ receptor potentiation. The anthraquinone sulfonic acid derivatives, basilen blue and reactive blue 5, exhibited half-maximal concentrations of hP2X₃ receptor potentiation similar to cibacron blue (EC₅₀ values of $1.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ and $1.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$, respectively). Reactive red 2 was significantly less potent as a potentiator of hP2X₃ receptor activation by ATP (EC₅₀ = $55 \pm 10 \mu\text{M}$) (Fig 8). None of the triazene dyes tested were intrinsically fluorescent, nor did they affect the pH of the assay buffer at concentrations up to 1 mM.

Example 2

Effect of Cibacron Blue on Inhibitory Activity of PPADS and Effect of PPADS on Potentiation Activity of Cibacron Blue

The inhibition of hP2X₃ receptors by PPADS, a non-selective P2 receptor antagonist, has been demonstrated previously (Garcia-Guzman et al., Brain Res Mol Brain Res, 47:59-66 (1997)). In the absence of cibacron blue, PPADS inhibited ATP-mediated hP2X₃ activation with a half-maximal concentration (IC₅₀) of $8.6 \pm 3 \mu\text{M}$ (Fig 9a). Pre-treatment of the hP2X₃-expressing cells with 10 μM cibacron blue increased both the maximal ATP-activated signal ($E_{\text{max}} = 437 \pm 6\%$) and the apparent IC₅₀ ($51 \pm 3 \mu\text{M}$) of PPADS. To determine whether

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

69

cibacron blue mediates this effect by increasing the effective potency of ATP, the experiment was performed using 1, 3, 10 or 30 μM ATP. For all concentrations of ATP, cibacron blue produced a similar concentration-dependent rightward shift of the PPADS concentration-effect curves. For example, in the absence of cibacron blue, the apparent IC_{50} values for PPADS at each ATP concentration were $3.64 \pm 1.1 \mu\text{M}$ (1 μM ATP), $3.11 \pm 1.0 \mu\text{M}$ (3 μM ATP), $4.81 \pm 1.1 \mu\text{M}$ (10 μM ATP), $2.67 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (20 μM ATP), confirming that PPADS is a non-competitive antagonist at the P2X_2 receptor. Similarly, PPADS was found to be non-competitive with ATP at concentrations of cibacron blue up to 100 μM (data not shown). The effect of cibacron blue on the inhibitory potency of PPADS was thus found to be independent of ATP concentration, suggesting that cibacron blue and PPADS exhibit mutually exclusive effects at the hP2X_2 receptor.

In the converse of this experiment, the effect of PPADS on cibacron blue potentiation of the hP2X_2 receptor was determined (Fig 9b). PPADS caused a concentration-dependent rightward shift of the concentration-effect curve of cibacron blue, while simultaneously reducing the initial magnitude of ATP activation (Fig 9b). Although 50 μM PPADS was sufficient to fully inhibit ATP-activated hP2X_2 receptors, cibacron blue overcame the inhibitory activity of PPADS in a concentration-dependent manner.

Example 10

Effect of Cibacron Blue As Modulator of Receptor Activity in Non-Desensitized and Acutely Desensitized Receptors

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

70

The potency of cibacron blue as a modulator of hP2X₃ receptor activity was determined in non-desensitized and acutely desensitized receptors (Fig 10). 1321N1-hP2X₃ cells were exposed to 10 μ M ATP for 1 min to acutely desensitize the hP2X₃ receptors. As described in Fig 10, the EC₅₀ of cibacron blue required to fully potentiate non-desensitized hP2X₃ receptors was $1.1 \pm 0.2 \mu$ M (Fig 10). However, acutely desensitized hP2X₃ receptors appeared to be less sensitive to cibacron blue-mediated potentiation (EC₅₀ = $6.4 \pm 0.5 \mu$ M), such that 100 μ M cibacron blue was required to achieve a maximal signal. Regardless of the initial state of the hP2X₃ receptors (non-desensitized or acutely desensitized), cibacron blue pre-treatment ultimately led to a similar agonist-activated maximal activity, suggesting that the size of the receptor pool was comparable under both conditions (Fig 10).

Example 11

Ability of Cibacron Blue to Restore Functional Activation to Acutely Desensitized Receptors Following Exposure to ATP

hP2X₃ receptor-expressing cells were desensitized by pretreatment with ATP (10 μ M) for 1 min, washed to remove extracellular ATP and, after various time periods of incubation with or without cibacron blue, desensitized receptors were rechallenged with ATP. Figure 11a demonstrates the lack of hP2X₃ response to a second challenge with ATP immediately after desensitization (time 1.5 min). Extension of the incubation time between desensitization and subsequent challenge with ATP revealed the progressive recovery of hP2X₃ receptor activity, approaching the control (non-desensitized) signal by 61.5 min.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/18919

71

The addition of 50 μM cibacron blue during the incubation period following ATP-induced desensitization appeared to increase both the apparent potency of ATP and the rate of recovery from desensitization (Fig 11b). After a 15 min incubation with cibacron blue, the desensitized cells showed almost full activity as compared to control (non-desensitized) cells, indicating a considerably shorter refractory period after desensitization. Note that the inclusion of cibacron blue in the incubation buffer leads to i) enhanced rate of recovery of hP2X₁ receptors from desensitization, ii) increased final E_{max} , and iii) increased potency of the agonist (Fig 11b).

Figure 11c shows the maximal receptor signal at various time points following acute desensitization as a percentage of the control (non-desensitized) signal in the presence and absence of 50 μM cibacron blue (see dashed lines in Figures 11a and b). The calculated half-times ($t_{1/2}$) of the refractory period (defined as the time required to restore 50% of the activity observed at 60 min) were 15.9 min ($K_t = 0.0436 \text{ min}^{-1}$) in the absence, and 2.6 min ($K_t = 0.2626 \text{ min}^{-1}$) in the presence, of cibacron blue. Thus, cibacron blue increases the rate of hP2X₁ receptor recovery from desensitization by 6-fold.

Example 12

Nociceptive Effects of BzATP

Subjects: Adult male Sprague-Dawley rats, 230-350 g, (Charles River, Wilmington, MA) were housed in groups of five per cage and given free access to food and water. Animals were on a 12 hr light-dark cycle of 6:00 - 18:00 hr. Animals were

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

72

only used once in each experiment. All experimental protocols and animal handling procedures were approved by an institutional animal care and use committee (IACUC).

Drugs: Morphine sulfate was obtained from Mallinckrodt, Inc. (St. Louis, MO) and was dissolved in a 0.9% saline solution. Adenosine 5'-triphosphate disodium (ATP), 2-methylthio-ATP tetrasodium (2-meSATP), and $\alpha\beta$ -methylene ATP dilithium ($\alpha\beta$ -meATP) were obtained from Research Biochemicals International (Natick, MA). 2' & 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP tetraethylammonium salt (mixed isomers) (BzATP) and cibacron blue (Reactive blue-2) were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). TNP-ATP and Fluo-4AM was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). All compounds were freshly dissolved and diluted in 0.9% saline. G418 sulfate was obtained from Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, CA). Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (with 4.5 mg ml⁻¹ glucose and 4 mM L-glutamine) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, Utah). Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (with 1 mg ml⁻¹ glucose and 3.6 mg l⁻¹ Na pyruvate, without phenol red), hygromycin and Lipofectamine were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY).

Nociceptive testing: Nociceptive responses were assessed using procedures previously described for the formalin test of chemically-induced persistent pain (Abbott et al., Pain 60:91-102 (1995); Tjosen et al., Pain 51:5-17 (1992)). Experimentally naive animals were placed in individual plexiglass cages and allowed 30 minutes to acclimate to the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

73

testing environment. Following this period, animals received subcutaneous injections of either a formalin solution (1, 2.5, 5%), different doses of BzATP alone, or in combination with TNP-ATP or cibacron blue, into the dorsal surface of the right hind paw using an insulin gauge (29G1/2) needle. The volume of injection was 50 μ l for all treatments. To assess acute nociception, animals were observed immediately following drug injections and the number of flinch behaviors (paw withdrawals) was recorded over a 1-minute period. Additional observations were conducted at sequential 5-minute intervals during the first 15-20 minutes following drug injections (Phase I, acute phase of the formalin test). For some experiments, observations began 30 minutes post formalin injection and continued for 20 minutes thereafter (Phase II, persistent phase of the formalin test). For each individual experiment, 6 rats were used in separate experimental and control groups. Mean cumulative flinch responses were analyzed by analysis of variance and post-hoc comparisons were conducted using Fisher's least significant difference test (GB-STAT, Dynamics Microsystems, Inc., Silver Spring, MD). Statistical significance was determined at $P < 0.05$.

The intradermal administration of BzATP (100-1000 nmol/paw) into the dorsal surface of the rat hindpaw produced a dose-dependent paw flinching response (Figure 12). The magnitude of nociceptive paw flinching following 1000 nmol/paw BzATP was equivalent to that observed following the acute intradermal administration of 5% formalin (Phase I of the formalin test). The duration of this effect was short lasting with the majority of paw flinch responses occurring in the first 5-minute interval following drug injection. By 20 minutes

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

74

post drug administration the number of BzATP-induced paw flinch responses was not significantly different ($P > 0.05$) from vehicle injected animals. BzATP did not produce a second phase of prolonged nocifensive paw flinching behavior (data not shown) like that which is characteristically observed following intradermal formalin administration (Phase II of the formalin test) (Tjosen et al., Pain 51:5-17 (1992); Sawynok et al., Eur. J. Pharmacol. 330:115-121 (1997). The ability of intradermal BzATP to produce nocifensive behavior in the rat was supported by the ability of systemically administered morphine to dose-dependently ($ED_{50} = 4 \text{ mg/kg}$, s.c.) reduce BzATP (1000 nmol/paw) induced hindpaw flinching (data not shown).

The nociceptive effects of BzATP were similar to those of other P2 receptor agonists including α, β -meATP (Figure 13) which is less susceptible to metabolic degradation than other P2 receptor agonists (Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50:413-492 (1999)). Other nucleotide agonists including ATP and 2meSATP also produced acute nociceptive paw flinching (Figure 13) but the maximal responses at the doses tested were significantly less than that observed for BzATP. ADP has been previously shown not to activate P2X₃ receptors (Bianchi et al., Eur. J. Pharmacol. 376:127-138 (1999)) and intradermal administration of ADP did not produce any nociceptive responding ($P > 0.05$). This pattern of in vivo activity is consistent with previous pharmacological evaluations of prototypic P2 receptor agonists to activate the recombinant rat P2X₃ receptor *in vitro* (Bianchi et al., *supra* (1999)). The rank order of potency for these P2 receptor agonists *in vitro* was BzATP ($EC_{50} = 32 \text{ nM}$) > 2meSATP ($EC_{50} = 220 \text{ nM}$) > ATP ($EC_{50} = 340 \text{ nM}$) > α, β -meATP ($EC_{50} = 510 \text{ nM}$) >> ADP ($EC_{50} > 100,000 \text{ nM}$)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

75

(Bianchi et al., *supra* (1999)). A similar pharmacological profile was also observed for the human P2X₃ receptor (Bianchi et al., *supra* (1999)).

Example 13

Antinociceptive Effects of TNP-ATP

Example 12 above presents the protocol utilized to administer the TNP-ATP to the rats.

In terms of results, the novel P2X receptor antagonist, TNP-ATP potently inhibited BzATP-stimulated calcium flux (see Example I) in 1321N1 cells expressing the rat P2X₃ receptor (Figure 14). As has been shown for the human P2X₃ receptor (Lewis et al., *Br. J. Pharmacol.* 124:1463-1466 (1998)), sequential removal of the terminal phosphate groups significantly reduces antagonist potency at the rat P2X₃ receptor with TNP-AMP showing little inhibitory activity at concentrations up to 30 μ M. A similar rank order of potency for these P2X receptor antagonists was observed at the rat P2X₃ receptor (data not shown).

Co-administration of intradermal TNP-ATP (30-300 nmol/paw) with BzATP (1000 nmol/paw) into the dorsal surface of the rat hind paw, produced a significant ($P < 0.05$) and dose-dependent reduction in nociceptive paw flinching behavior (Figure 15). The antinociceptive effects of TNP-ATP appear to be pharmacologically specific since co-administration of TNP-AMP with BzATP did not reduce BzATP-induced paw flinching behavior.

Similarly, co-administration of TNP-ATP with 5% formalin into the dorsal surface of the rat hindpaw also dose-dependently reduced nocifensive behaviors in the acute (Phase

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

76

I) portion of the formalin test (Figure 16). In addition, the antinociceptive effects of TNP-ATP were also evident in the persistent phase (Phase II) of the formalin test where a significant 30% reduction in formalin-induced paw flinching was observed at both doses (30 and 100 nmol/paw) of TNP-ATP. Consistent with its antinociceptive activity against BzATP, TNP-ATP, but not TNP-AMP, attenuated nociceptive responses in both the acute (Phase I) and persistent (Phase II) components of the formalin test.

Example 14

Rat P2X₃ and P2X_{2/3} Receptor Activation Enhancement by Cibacron Blue

Example 6 illustrates the protocol utilized to evaluate the effects of cibacron blue on rat P2X₃ and P2X_{2/3} receptors.

With respect to the results observed, consistent with its allosteric actions at the human P2X₃ receptor (see Examples I and II, above), cibacron blue produced a concentration-dependent increase in both BzATP (1 μ M) and α , β -meATP (10 μ M) stimulated calcium flux (EC₅₀ values = 580 and 720 nM, respectively) in 1321N1 cells expressing the rat P2X₃ receptor (Figure 17). While the maximal enhancing effects of cibacron blue were observed at concentrations up to 100 μ M, higher concentrations of cibacron blue produced variable results and were generally less effective in enhancing agonist activation of the rat P2X₃ receptor (data not shown). This latter phenomenon may be attributable to the intrinsic antagonist activity of cibacron blue (Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50:413-492 (1998)).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WQ 00/63379

PCT/US00/10919

77

Cibacron blue over the concentration range of 0.3 - 10 μM also enhanced the activation of the rat $\text{P2X}_{2/3}$ receptor by BzATP (1 μM) and α,β -meATP (10 μM) (Figure 17). However, these effects were biphasic with concentrations of cibacron blue greater than 10 μM producing less enhancement of agonist-mediated activation of the $\text{P2X}_{2/3}$ receptor. Additionally, concentrations of cibacron blue greater than 30 μM antagonized the activation of the rat $\text{P2X}_{1,3}$ receptor by α,β -meATP. A contribution of homomeric P2X_2 receptors to these biphasic effects appears unlikely since cibacron blue produced similar effects on both BzATP- and α,β -meATP-mediated activation of rat $\text{P2X}_{2/3}$ receptors and α,β -meATP does not activate P2X_2 receptors (Lewis et al., Nature 377:432-435 (1995); Binachi et al., Eur. J. Pharmacol. 376:127-138 (1999)). Consistent with these observations, cibacron blue was found to only inhibit ATP-induced activation of the rat P2X_2 receptor ($\text{IC}_{50} = 8 \mu\text{M}$) (data not shown).

Additionally, cibacron blue has been previously shown not to enhance agonist activation of the human P2X_1 , P2X_2 , and P2X_3 receptors (Alexander et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:1135-1142 (1999)).

While cibacron blue produced a 10-fold enhancement of P2X_2 receptor activation, only a maximal 2.5-4.5-fold increase in $\text{P2X}_{2/3}$ receptor activation was observed. While the exact reasons for these differential effects remain unclear, the intrinsic antagonist activity of cibacron blue (Ralevic et al., Pharmacol. Rev. 50:413-492 (1998)) may contribute to the observed differences in the magnitude of the apparent allosteric enhancement of the P2X_2 and $\text{P2X}_{2/3}$ receptors.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

78

Example 15Pronociceptive Effects of Cibacron Blue

Since specific concentrations of cibacron blue selectively can enhance the activation of the rat P2X₁ and P2X_{2/3} receptors *in vitro*, as evidenced by the results presented above, additional studies were conducted to investigate the potential of cibacron blue to enhance the nociceptive effects of BzATP in the rat. Consistent with the data shown in Figure 12, the intradermal administration of BzATP alone (10-300 nmol/paw) into the rat hindpaw produced a dose-dependent increase in nociceptive behavior (Figure 17a-d). The intradermal administration of cibacron blue alone (10-300 nmol/paw) produced only a mild, but statistically significant nociceptive response at a dose of 100 nmol/paw (Figure 18a-d).

The intradermal co-administration of cibacron blue with BzATP into the rat hindpaw produced significant and biphasic effects in nociceptive paw flinching behavior relative to the nociceptive effects of BzATP alone (Figure 18a-d). At a low dose of BzATP (10 nmol/paw), cibacron blue produced a small, but statistically significant ($P < 0.05$) enhancement in nociceptive responding as compared to the effects of BzATP alone (Figure 18a). The pronociceptive effects of cibacron blue were significantly greater when combined with a minimally nociceptive dose of BzATP (30 nmol/paw) (Figure 17b). At a higher dose of BzATP (100 nmol/paw), the ability of cibacron blue to enhance nociception was observed only at the dose of 30 nmol/paw (Figure 17c).

In contrast, the intradermal co-administration of cibacron blue with a high dose of BzATP (300 nmol/paw)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/0919

79

produced a dose-dependent inhibition of paw flinching responses as compared to the nociceptive effects of BzATP alone (Figure 18d).

Example 16

Enhancement of Formalin Nociception by Cibacron Blue

Since intermediate doses of cibacron blue (30 and 100 nmol/paw) were found to be most effective in enhancing the nociceptive effects of intradermal BzATP, these doses of cibacron blue were also examined for their ability to enhance nociception in the formalin test. In the acute phase (Phase I) of the formalin test, intradermal cibacron blue alone produced a significant and dose-dependent nociceptive response (Figure 16a). Co-administration of intradermal cibacron blue (30 and 100 nmol/paw) with various concentrations of formalin (1, 2.5 and 5%) also produced greater nociception in the acute phase (Phase I) of the formalin test as compared to the effects of formalin alone (Figure 19a). However, these effects appeared to be additive with formalin since a significant interaction between the nociceptive effects of formalin and cibacron blue was not observed ($P > 0.05$) (Figure 19a).

During the persistent nociceptive component (Phase II) of the formalin test, intradermal cibacron blue alone did not produce a significant ($P < 0.05$) nociceptive response (Figure 19b). However, co-administration of cibacron blue (30 and 100 nmol/paw) with formalin (1 and 2.5%) produced significantly greater paw flinching behavior relative to the nociceptive effects of either formalin or cibacron blue administered alone (Figure 19b). In this persistent portion of the formalin test,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

80

cibacron blue significantly potentiated the nociceptive effects of 1% and 2.5 % formalin as indicated by a significantly ($P < 0.05$) greater than additive interaction between the nociceptive effects of formalin and cibacron blue. At a minimally nociceptive dose of formalin (1%), the pronociceptive effects of cibacron blue were biphasic with 30 nmol/paw of cibacron blue producing a significantly larger enhancement of persistent nociception as compared to the higher dose of cibacron blue (100 nmol/paw) (Figure 19b). The intradermal administration of 5% formalin produced significantly greater nociception relative to lower doses of formalin, however, co-administration of cibacron blue with this dose of formalin did not produce a further enhancement of paw flinching behavior.

The pro-nociceptive enhancing effects of cibacron blue appear to be pharmacologically specific since a structurally similar cibacron blue analog, reactive orange, which does not allosterically modulate P2X₂ receptor activation (Alexander et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291:1135-1142 (1999)), did not produce nociception alone following intradermal administration (30 and 100 nmol/paw) and had no effect on acute or persistent nociceptive paw flinching when co-administered with formalin (data not shown).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

81

CLAIMS:

1. An isolated polynucleotide encoding a human P2X₃ receptor polypeptide or a receptor having a nucleotide sequence at least 90% identical to said polynucleotide sequence encoding said human P2X₃ receptor.
2. A polynucleotide according to Claim 1, wherein the polynucleotide is a polydeoxyribonucleotide (DNA).
3. A polynucleotide according to Claim 1, wherein the polynucleotide is a polyribonucleotide (RNA).
4. A polynucleotide according to Claim 2, wherein the DNA comprises the sequence of SEQ ID NO:15.
5. A host cell comprising a polynucleotide according to Claim 1 or Claim 4.
6. A host cell according to Claim 5, wherein said cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a mammalian cell, a yeast cell and an amphibian cell.
7. A host cell according to Claim 6, wherein the cell is an amphibian cell.
8. A host cell according to Claim 6, wherein the cell is a mammalian cell.
9. An expression vector comprising a polynucleotide according to Claim 1 operably linked to at least one control sequence that directs transcription of the polynucleotide.
10. The expression vector according to Claim 9,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

82

wherein said polynucleotide encodes a human P2X₃ receptor polypeptide, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

11. A host cell comprising an expression vector according to Claim 9.

12. A host cell according to Claim 11, wherein the cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a mammalian cell, a yeast cell and an amphibian cell.

13. A host cell according to Claim 12, wherein the cell is an amphibian cell.

14. A host cell according to Claim 12, wherein the cell is a mammalian cell.

15. A host cell comprising the expression vector of Claim 10.

16. A host cell according to Claim 15, wherein the cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a mammalian cell, a yeast cell and an amphibian cell.

17. A host cell according to Claim 16, wherein the cell is an amphibian cell.

18. A host cell according to Claim 16, wherein the cell is a mammalian cell.

19. A method for producing a human P2X₃ receptor polypeptide, the method comprising the steps of:

(a) culturing a host cell according to Claim 11 for a time and under conditions sufficient for expression of said polypeptide; and

(b) recovering said polypeptide.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

33

20. A method for producing a human P2X₃ receptor polypeptide, the method comprising the steps of:
(a) culturing a host cell according to Claim 15 for a time and under conditions suitable for expression of said polypeptide; and
(b) recovering said polypeptide.

21. A purified human P2X₃ receptor polypeptide, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

22. A method for identifying compounds that modulate P2X receptor activity, the method comprising the steps of:

- (a) providing a cell that expresses a P2X receptor comprising a human P2X₃ polypeptide;
(b) mixing a test compound with the P2X receptor;
and
(c) measuring either
(i) the effect of the test compound on the activation of the P2X receptor or the cell expressing the P2X receptor, or
(ii) the binding of the test compound to the cell or the P2X receptor.

23. A method according to Claim 22, wherein the host cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a mammalian cell, a yeast cell and an amphibian cell.

24. A method according to Claim 22, wherein said measurement of step (c) (ii) is performed by measuring a signal generated by a detectable moiety.

25. A method according to Claim 24, wherein said detectable moiety is selected from the group consisting of a fluorescent label, a radiolabel, a chemiluminescent label and an enzyme.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 90/63379

PCT/US00/10919

84

26. A method according to Claim 22, wherein said measurement of step (c) (i) is performed by measuring a signal generated by a radiolabeled ion, a chromogenic reagent, a fluorescent probe or an electrical current.

27. A method according to Claim 23, wherein the host cell is a mammalian cell.

28. A method according to Claim 23, wherein the host cell is an amphibian cell.

29. A method according to Claim 22, wherein the human P2X₃ receptor polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

30. A method for detecting a target polynucleotide of a P2X₃ receptor in a test sample, the method comprising the steps of:

- (a) contacting the target polynucleotide with at least one human P2X₃ receptor-specific polynucleotide probe or a complement thereof to form a target-probe complex; and
- (b) detecting the presence of the target-probe complex in the test sample.

31. A method for detecting cDNA of human P2X₃ receptor mRNA in a test sample, the method comprising the steps of:

- (a) performing reverse transcription in order to produce cDNA;
- (b) amplifying the cDNA obtained from step (a); and
- (c) detecting the presence of the human P2X₃ receptor in the test sample.

32. A method according to Claim 31, wherein said detection step (c) comprises utilizing a detectable moiety capable of generating a measurable signal.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

85

33. An isolated polynucleotide encoding a human P2X₃ receptor or a portion thereof and capable of selectively hybridizing to a nucleic acid encoding a human P2X₃ receptor polypeptide, wherein said polynucleotide comprises the sequence of SEQ ID NO:15 or a portion thereof.

34. An isolated polynucleotide according to Claim 33, wherein the polynucleotide is produced by recombinant techniques.

35. A purified polypeptide encoded by a human P2X₃ receptor polynucleotide, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or a portion thereof.

36. A purified polypeptide according to Claim 35 produced by recombinant techniques.

37. A purified polypeptide according to Claim 35 produced by synthetic techniques.

38. A monoclonal antibody which specifically binds to human P2X₃ receptor comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or an immunoreactive fragment thereof.

39. A method for detecting human P2X₃ receptor in a test sample, the method comprising the steps of:

(a) contacting the test sample with an antibody or a fragment thereof which specifically binds to the human P2X₃ receptor, for a time and under conditions sufficient for the formation of a resultant complex; and

(b) detecting the resultant complex containing the antibody,

wherein said antibody specifically binds to human P2X₃ receptor amino acid comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or a fragment thereof.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

36

40. An isolated polynucleotide encoding a human P2X receptor polypeptide or a variant thereof wherein said receptor is P2X₃.
41. A therapeutic method for relieving pain comprising:
(a) presenting an individual afflicted with pain;
and
(b) administering to said individual an effective amount of a P2X₃ antagonistic compound.
42. The method of claim 41 wherein said antagonistic compound is effective against P2X₃ heteromultimeric channels.
43. A method of potentiating the effects of an agonist which activates a P2X₃ receptor comprising the steps of:
a) incubating cells comprising said P2X₃ receptor with a triazene dye;
b) exposing said incubated cells to said agonist for a time and under conditions sufficient for said agonist to bind to said P2X₃ receptor, wherein said triazene dye of step (a) potentiates said effect of said agonist of step (b).
44. The method of claim 43 wherein said P2X₃ receptor is derived from a mammal.
45. The method of claim 44 wherein said mammal is a rodent or a human.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

87

46. The method of claim 43 wherein said triazene dye is selected from the group consisting of cibacron blue, basilen blue, reactive blue 5 and reactive red 2.

47. The method of claim 46 wherein said triazene dye is cibacron blue.

48. The method of claim 43 wherein said agonist is adenosine 5'-triphosphate disodium (ATP).

49. A method of blocking the inhibitory activity of a non-selective P2 receptor antagonist on a P2X₂ receptor comprising the steps of:

- a) incubating P2X₂-expressing cells with a triazene dye;
- b) exposing said incubated cells to a non-selective P2 receptor antagonist, wherein said triazene dye of step (a) blocks said inhibitory activity of said antagonist.

50. The method of claim 49 wherein said P2X₂ receptor is derived from a mammal.

51. The method of claim 50 wherein said mammal is a rodent or a human.

52. The method of claim 49 wherein said antagonist is pyridoxal-5-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS).

53. The method of claim 49 wherein said triazene dye

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

88

is cibacron blue.

54. A method of accelerating the rate of P2X₁ receptor resensitization of desensitized P2X₁ receptor-expressing cells comprising the step of exposing said desensitized P2X₁ receptor-expressing cells to a triazene dye, wherein said triazene dye accelerates said rate of resensitization of P2X₁ receptors of said desensitized P2X₁-receptor expressing cells.

55. The method of claim 54 wherein said P2X₁ receptor is derived from a mammal.

56. The method of claim 55 wherein said mammal is a rodent or a human.

57. The method of claim 54 wherein said triazene dye is cibacron blue.

58. A method of inducing antinociceptive effects in a mammal comprising the step of administering a P2X₁ receptor antagonist to a patient in need of such antinociceptive effects in an amount sufficient to effect said antinociceptive effects.

59. The method of claim 58 wherein said mammal is a human or a rat.

60. The method of claim 58 wherein said P2X₁ receptor antagonist induces antinociceptive effects on a P2X₁-containing receptor.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

89

61. The method of claim 60 wherein said P2X₃-containing receptor is P2X₃.

62. The method of claim 58 wherein said antagonist is 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP (TNP-ATP).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

1/21

CTACTACTACTAGGCCACGGCTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGACCGGGGACGACCAC
 CACCTACCTCCTCAGGCTGCGGCTCGCCGAGGGCCCGGGCGCGAGAGGACCCCTCCTCG
 AGGCCACCCTGGGCCCCCTTCTGAGTGTCCCTGAGCACTCTCTCAGCATGAACATGCATAT
 CCGACTTCTCACCTATGAGACCACCAAGTCGGTGGTGTGAAAAGCTGGACCATCGGGATC
 ATCAACCGAGTAGTTAGCTTCTGATCATCTCCTACTTTGTAGGGTGGGTTTTCTTGCACGA
 GAAGGCTTACAGGTACGGGACACAGCCATTAACTCCTCGGTGGTAACCAAGGTGAAGGGCT
 CCGGACTCTACACCAACAGAGTCATGGATGTGTGATTACGTGACGCCACCTCAGGGCACC
 TCGGTCTTTGTATCATCACCAAGATGATTGTTACTGAAAATCAGATGCAAGGATTTGCCC
 AGAGAGTGAGGAGAAATACCGCTGTGTATCAGACAGCCAGTCCGGGCTGAGCGCTTGCAG
 GGATCCTCCTGCGCGCTGCGTGAACACAGCTCTGCGCTCCGGACCTGTGAGATCCAGGGC
 TGGTCCCCACGGAGGTGGACACAGTGGAAACGCCCATCATGATGGAAGCTGAGAACTTAC
 TATTTTCATCAAGAACAGCATCGGTTTTCCCTCTTCAACTTTGAGAAGGAAACCTCCTTC
 CCAACTGACAGCCAGGGACATGAAGACCTGCGCTTCCACCCGGACAAGGACCTTTCTAC
 CCGATCTTGCGGTAGGGGACGTGGTCAAGTTTTGCGGGCAGGATTTTCCAAACTGGCGCG
 CACGGGGGAGTTCTGGGCATTAAGATCGGCTGGGTGTGCGACTTGGACAAGGCTGGGACC
 AGTGCATCCCCAAATCTCCTTACCCTGACAGGGTTTTCTGAGAAAAGCAGCGTGTCC
 CCAGGCTACAACCTCAGGTTTTGCCAAGTACTACAAAATGGAAAATGGCAGTGAATACCGCAC
 CCTCTGAAGGCTTTTGGCATCCGCTTCGACGTGCTGGTATACGGGAATGCTGGCAAGTTCA
 ACATCATCCCACCATCATCAGCTCTGTGGCGGCTTTACTTCTGTGGGAGTGGGAACTGTT
 CTCTGTGACATCATCTGTCAACTTCTCAGGGGGCCGACCAGTACAAAGCCAAGAAAGTT
 TGAGGAGGTGAATGAGACTACACTGAAAATCG
 (SEQ ID NO:13)

FIG.1

2/21

ACCACAGTGGAGAAGCAGTCCACCGATTGGGGGCTTCTCCATAGGCCACTAGGGCCTCTT
TCCAGGGCCCCACACTCACAAAGGCTCCAGGCTCCCCACAGAGGACCTGCCTGAGCAAGG
GGGCATGGGAGGBAAGAGGGGCTCTCATTCTGCTGCTCATTCCATGAGCATAGCTGGGACC
CAAGTGTCTGGGCTCCGACTGCTCCAGCAGACAGGCAGTGCTCCCTGCTGAGACCCGAGTC
TCACCTTCACTCCTTGCCTGGCCCCATCTGCTTCTAGGACCCCTGGGGCAGGAGCACCTGA
GCCATCCCCTTCCCAAAGAGTAGAGATTATAATGTAGGACAGATGGCCACAAGGGCTACCA
AGTGCCAGGCACCTTACACACGTTATCTCATTTAATCCTTAGAATAATCCTATGAGGTAGA
TATTAGTTTCCCTTGTTTGAAGATAAACCAGGCTCAGAGAGACTGAGTCATTTGCCCCAG
GCCAGATAGCCAGGATGTGAGAGAGCTGGGATTTGAACGTCCTCTGACTAACTCCATCGCC
CACACCCCATGAGAGAAGATGAACTCCCAGGGTCCATCAGCCCTGCTGCTTCAGCGGCTCC
ACCTTGACGGTGATTCCGGTTAATAAAGAGTAAGCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAGTACTAGTCGACGCTGGCC (SEQ ID NO:14)

FIG.2

3/21

GAAITCCTGCAGCCCGGGGGATCCGCCACCATGAACATGCATATCCGACTTCTTCACT
 ATGAGACCACCAAGTCGGTGGTTGTGAAGAGCTGGACCATCGGGATCATCAACCGAGTAGT
 TCAGCTTCTGATCATCCTACTTTGTAGGGTGGTTTTCTTGACGAGAAGGCTTACCAG
 GTACGGGACACAGCCATTGAGTCTCGGTGGTAACCAAGGTGAAGGGCTCCGGACTTACG
 CCAACAGAGTCATGGATGTGTCTGATTACGTGACGCCACCTCAGGGCACCTCGGTCTTGT
 CATCATACCAAGATGATTGTTACTGAAAATCAGATGCAAGGATTCTGCCAGAGAGTGAG
 GAGAAATACCGCTGTGTATCAGACAGCCAGTCCGGCCGTGAGCGTTGCCAGTGGGGGA
 TCCTCACTGGCCGCTGCGTGAACACAGCTCTGTGCTCCGGACCTGTGAGATCCAGGGCTG
 GTGCCACCGAGGTGGACACAGTGGAAACGCCCATCATGATGGAAGCTGAGAACTTCACT
 ATTTTCATCAAGAACAGCATCCGTTTCCCTCTTCAACTTTGAGAAGGGAAACCTCCTTC
 CCAACCTGACAGCCAGGGACATGAAGACCTGCCGCTCCACCCGGACAGGACCCCTTCTG
 CCCCATCTTCCGGGTAGGGGACGTGGTCAAGTTTGGGGACAGGATTTGCCAAACTGGCG
 CGCACGGGGGAGTTCTGGGCATTAAGATCCGCTGGGTGCGACTTGGCAAAGGCTGGG
 ACCAGTGCATCCCAATACTCCTTACCCGGCTCGACAGCGTTTCTGAGAAAAGCAGCGT
 GTCCCAGGCTACAACCTCAGGTTTGGCAAGTACTACAAAATGGAAAATGGCAGTGAGTAC
 CGCACCTCTGAAGGCTTTTGGCATCCGCTTCCAGCTGCTGATGCGGGCCTTACTTCTGTGGAGTGGG
 AGTTCAACATCATCCCAACCATCATCAGCTCTGTGGGGCCTTACTTCTGTGGAGTGGG
 AACTGTTCTCTGTGACATCATCTGCTCAACTTCTCAAGGGGGCCGACAGTACAAAGCC
 AAGAAGTTTGGGAGGTGAATGAGACTACGCTGAAAATCGGGCTTTGACCAACCCAGTGT
 ACCCCAGCGACACAGCCACAGCGGAGAAAGCAGTCCACCGATTCCGGGGCCTTCTCATAGG
 CCACTAGGGGCTAGAGCGGCCGC
 (SEQ ID NO:15)

FIG.3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

4/21

hp2X3	1	MNCISDFFTYETTKSVVKS	WTIGIINR	MVQLL	33
rP2X3	1	MNCISDFFTYETTKSVVKS	WTIGIINR	AVQLL	33
hp2X3	34	IISYFVGWVFLHEKAYQVR	DTAIESSVVT	KVKG	66
rP2X3	34	IISYFVGWVFLHEKAYQVR	DTAIESSVVT	KVKG	66
hp2X3	67	SGLYANRVMDVSDYVTP	PGGTSVFVIIT	KMIVT	99
rP2X3	67	FGRYANRVMDVSDYVTP	PGGTSVFVIIT	KIIVT	99
hp2X3	100	ENQMGGFCPESEEEKYRC	VSDSQCGPERL	PGGGI	132
rP2X3	100	ENQMGGFCPESEEEKYRC	VSDSQCGPERF	PGGGI	132
hp2X3	133	LTGRCVNYSSVLR	TCEIQGWCPTE	VDTVEIPIM	165
rP2X3	133	LTGRCVNYSSVLR	TCEIQGWCPTE	VDTVEMPIM	165
hp2X3	166	MEAE	NFTIFIKNSIR	FLFNFEKGNLLPNL	TAR
rP2X3	166	MEAE	NFTIFIKNSIR	FLFNFEKGNLLPNL	TDK
hp2X3	199	DMKICRFHPDKLP	FCPIILRVGD	VVKFAGQDFAK	231
rP2X3	199	DMKICRFHPDKLP	FCPIILRVGD	VVKFAGQDFAK	231
hp2X3	232	LARTGGV	LGIKIGWCDL	DKAWDQCIPKYSFTR	264
rP2X3	232	LARTGGV	LGIKIGWCDL	DKAWDQCIPKYSFTR	264
hp2X3	265	LDSVSEKSSVSPGYN	FRFAKYKME	NGSEYRTL	297
rP2X3	265	LDSVSEKSSVSPGYN	FRFAKYKME	NGSEYRTL	297
hp2X3	298	LKAFGIRFDV	VYGNAGKFNI	IPTIISSVA	AF
rP2X3	298	LKAFGIRFDV	VYGNAGKFNI	IPTIISSVA	AF
hp2X3	331	SVGVGT	VLCDIILLNF	LKGADQYKAK	KFEVNE
rP2X3	331	SVGVGT	VLCDIILLNF	LKGADHYKAK	KFEVTE
hp2X3	364	TTLKIAAL	TNPVYPSDQIT	IAEKQST	DSCAHSIG
rP2X3	364	TTLKIAAL	TNPVYPSDQIT	IAEKQST	DSCAHSIG
hp2X3	397	H			397
rP2X3	397	H			397

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

5/21

PCT/US00/10919

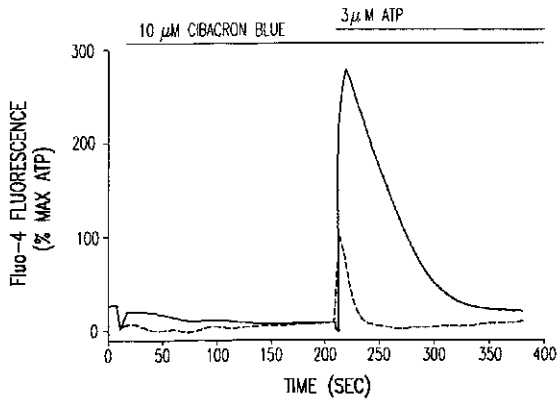


FIG. 5A

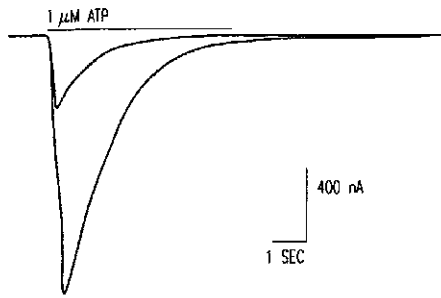


FIG. 5B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

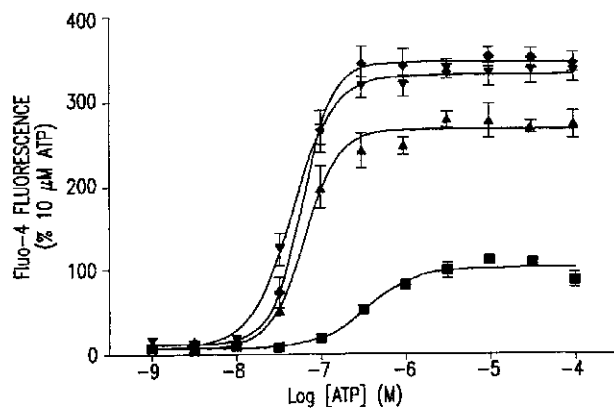


FIG.6

7/21

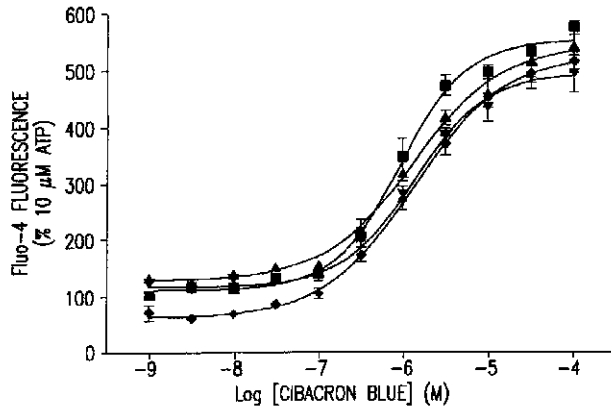


FIG.7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

PCT/US00/10919

8/21

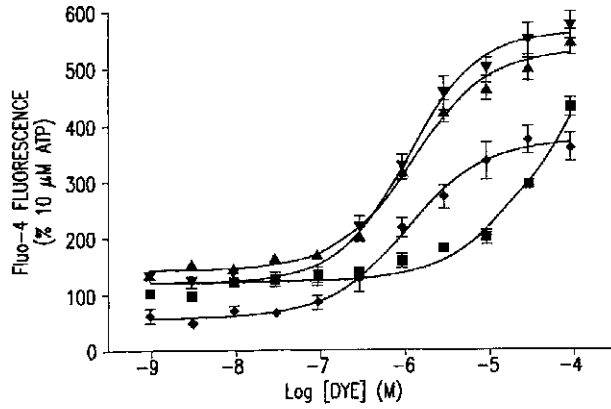


FIG.8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

9/21

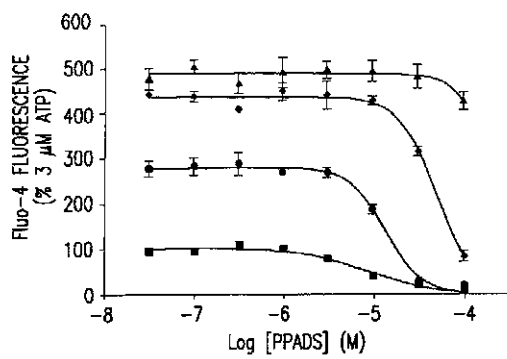


FIG. 9A

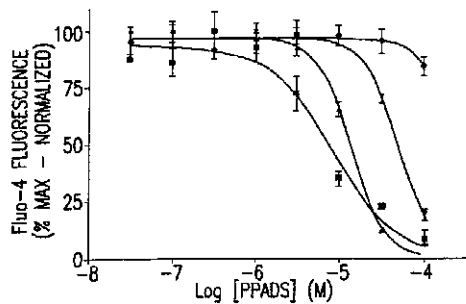


FIG.9A-1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/63379

10/21

PCT/US00/10919

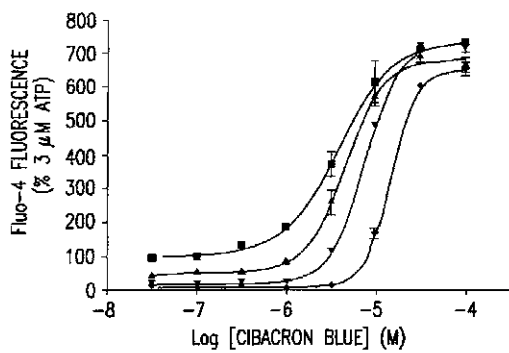


FIG. 9B

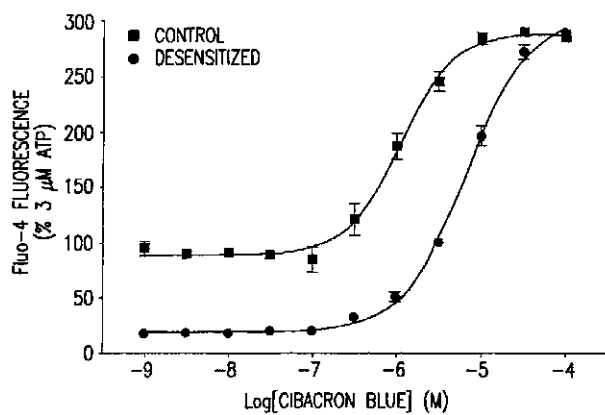


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

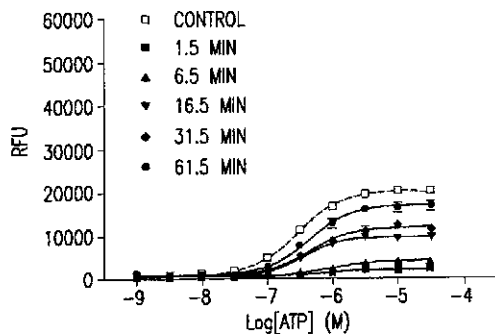


FIG. 11A

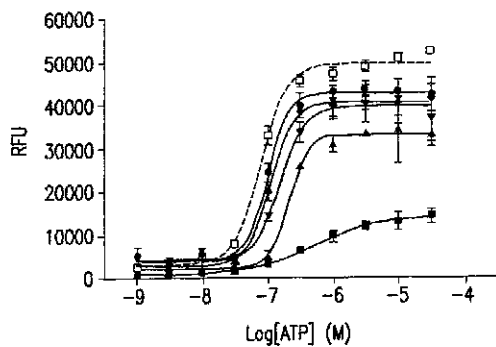


FIG. 11B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

12/21

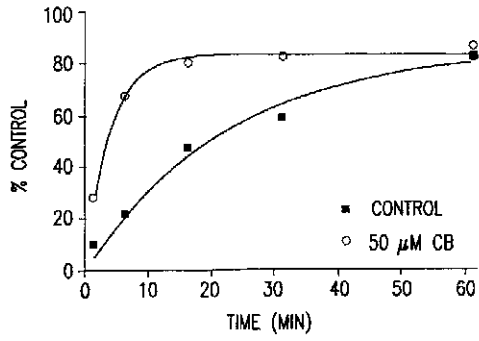


FIG. 11C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

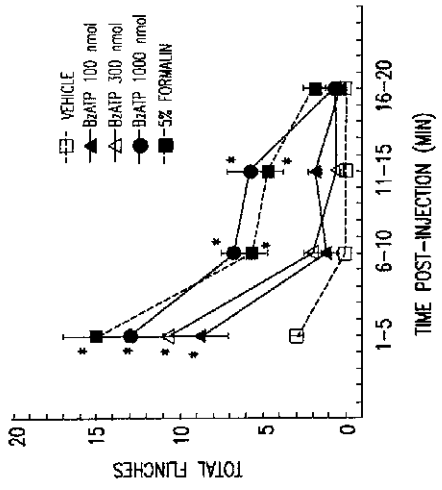


FIG.12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

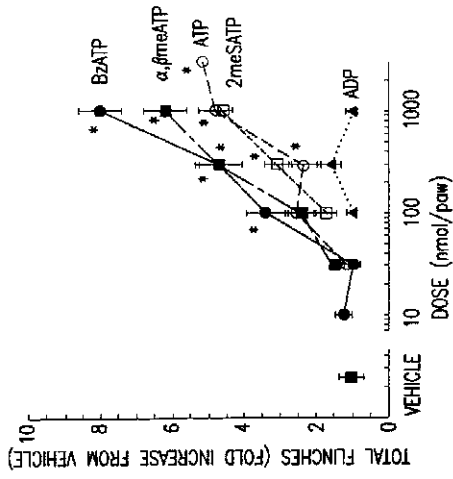


FIG.13

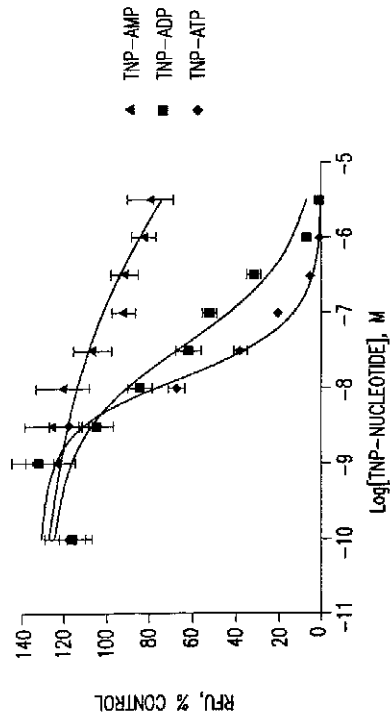


FIG.14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

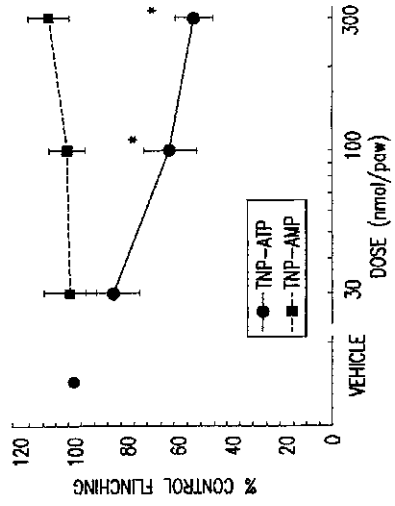


FIG.15

WO 00/63379

PCT/US00/10919

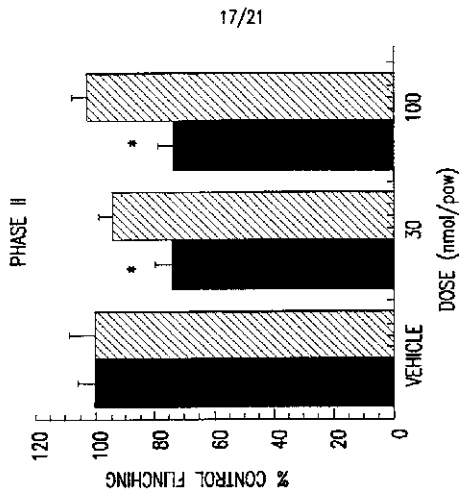


FIG.16B

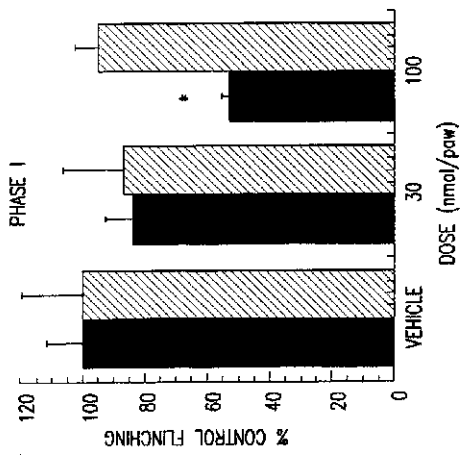


FIG.16A

WO 00/63379

PCT/US00/10919

18/21

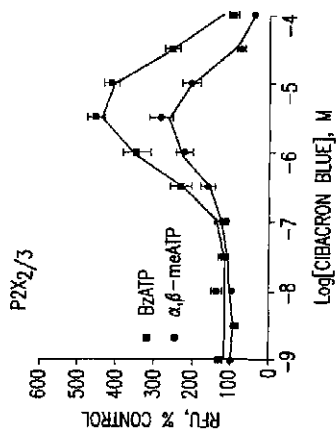


FIG.17B

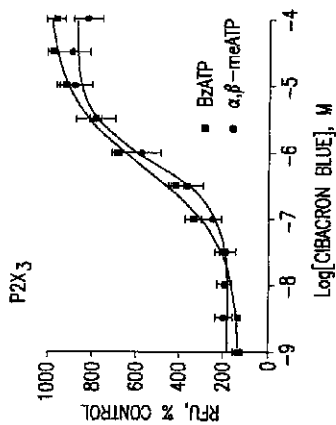
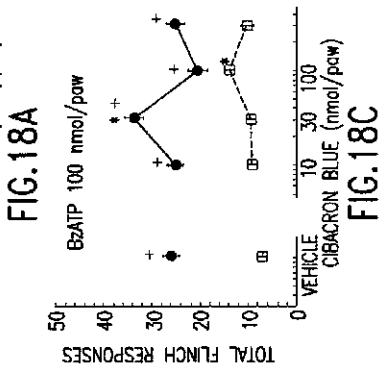
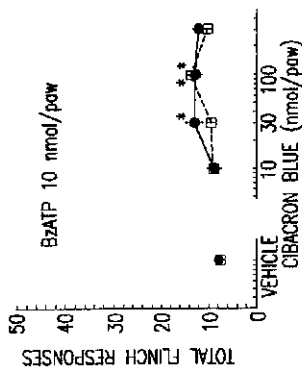
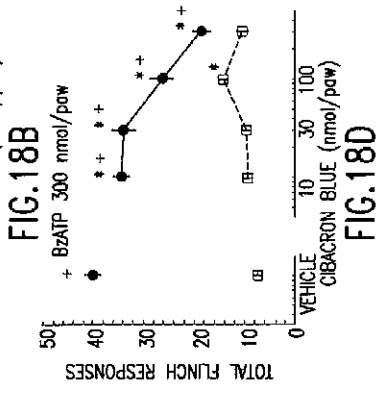
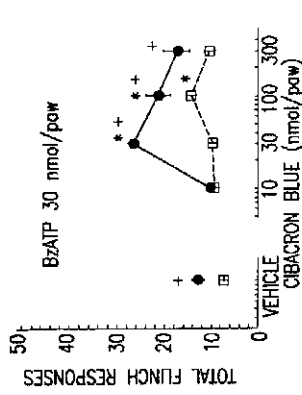


FIG.17A



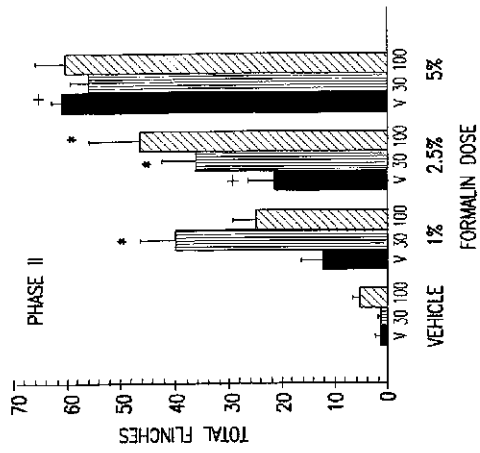


FIG.19B

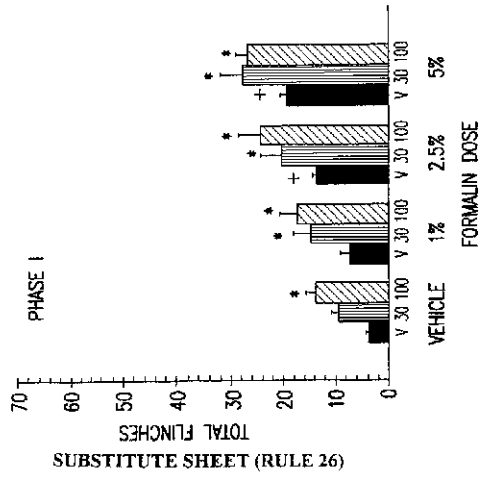


FIG.19A

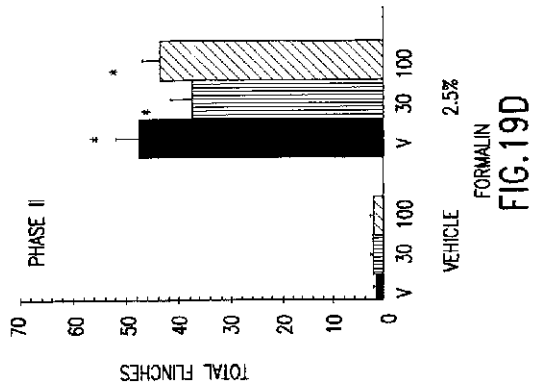


FIG.19D

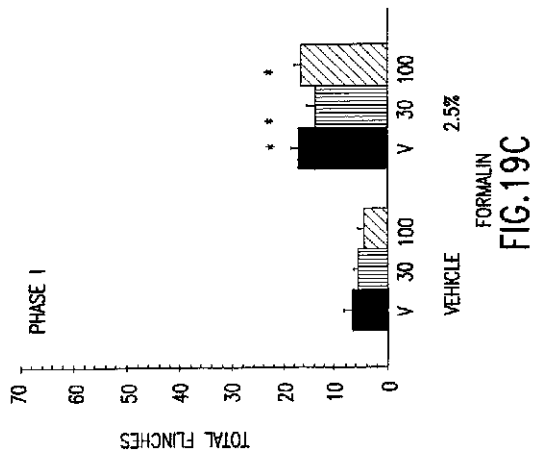


FIG.19C

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 October 2000 (26.10.2000)

PCT

(10) International Publication Number
WO 00/63379 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/68, G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US00/10919
- (22) International Filing Date: 21 April 2000 (21.04.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/130,339 21 April 1999 (21.04.1999) US
- (71) Applicant: ABBOTT LABORATORIES [US/US]; Dept. 377 Bldg., AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).
- (72) Inventors: JARVIS, Michael, E.; 356 S. Oldwood Court, Vernon Hills, IL 60061 (US); LYNCH, Kevin, J.; 17904 W. Hampshire Drive, Gurnee, IL 60031 (US); BERGARD, Edward, C.; 609 Burdick Street, Libertyville, IL 60048 (US); VANBIJSEN, Timothy; 4711 N. Dover Street, Chicago, IL 60640 (US); KOWALUK, Elizabeth, A.; 3055 Prissille Avenue, Highland Park, IL 60035 (US).
- (74) Agents: BECKER, Cheryl, L. et al.; Dept. 377 Bldg., AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).
- (81) Designated States (national): CA, JP, MX.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 15 November 2001

(Continued on next page)

(54) Title: THE P2X₃ RECEPTOR, METHODS OF ALTERING P2X₃ RECEPTOR ACTIVITY AND USES THEREOF

hP2X ₃	1	AKGTSDFFFTYETIRSVVRSWITGTRFAWQLL	33
rP2X ₃	1	AKGTSDFFFTYETIRSVVRSWITGTRFAWQLL	33
hP2X ₃	34	ILISYFVGVWFLHEKAYVRDTAJESSVYTKVKG	66
rP2X ₃	34	ILISYFVGVWFLHEKAYVRDTAJESSVYTKVKG	66
hP2X ₃	67	SLFANRVMQVSDVYVPPQGISVYVITRQIVT	99
rP2X ₃	67	SLFANRVMQVSDVYVPPQGISVYVITRQIVT	99
hP2X ₃	100	ENQMGCFPEPEEKYRVSUSGQRPPEPQGGI	132
rP2X ₃	100	ENQMGCFPEPEEKYRVSUSGQRPPEPQGGI	132
hP2X ₃	133	LTGRDVMYSSVLRICEIQGMCPTVDVTVPTM	165
rP2X ₃	133	LTGRDVMYSSVLRICEIQGMCPTVDVTVPTM	165
hP2X ₃	166	MEAEKFTFTKNSIRFPLFNFERNLLPKLTKR	198
rP2X ₃	166	MEAEKFTFTKNSIRFPLFNFERNLLPKLTKR	198
hP2X ₃	199	QKTRFRFRKDFPFQPIIRVGDVWKFAGQDFAK	231
rP2X ₃	199	QKTRFRFRKDFPFQPIIRVGDVWKFAGQDFAK	231
hP2X ₃	232	LARTGGVLGKIGWVCLDKAWDQCLPKYSPFR	264
rP2X ₃	232	LARTGGVLGKIGWVCLDKAWDQCLPKYSPFR	264
hP2X ₃	265	LDVSEKSSVSPQVNFRAKYVQENQSEYRIL	297
rP2X ₃	265	LDVSEKSSVSPQVNFRAKYVQENQSEYRIL	297
hP2X ₃	298	LKAFGTRFDVLYGNAGKFNILPTLISVAAPT	330
rP2X ₃	298	LKAFGTRFDVLYGNAGKFNILPTLISVAAPT	330
hP2X ₃	331	SVKQVTLCDIILLNFKGADTKRQKFEENF	363
rP2X ₃	331	SVKQVTLCDIILLNFKGADTKRQKFEENF	363
hP2X ₃	364	TTLKIALINPVIHSDQITHEKQSTDSGAIISIG	396
rP2X ₃	364	TTLKIALINPVIHSDQITHEKQSTDSGAIISIG	396
hP2X ₃	397	h	397
rP2X ₃	397	h	397

(57) Abstract: The subject invention relates to the P2X₃ receptor, methods of modulating the activity of the P2X₃ receptor and to uses of these methods. In particular, such methods may be used, for example, to accelerate the rate of resensitization of a desensitized receptor.

WO 00/63379 A3

WO 00/63379 A3



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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/18919
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARCIA-GUZMAN, M. ET AL.: "Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, vol. 47, no. 1-2, July 1997 (1997-07), pages 59-66. XP002105595	1-3,5-9, 11-14, 19,22, 23,26, 28, 30-37, 40,41, 58-61
A	abstract page 60, column 2, line 21 -page 65, column 1, line 10 page 62 -page 64; figures 1-5 page 65, column 2, line 11 - line 49 -/--	4,10, 15-18, 20,21, 24,25, 27,29, 38,39, 42,62
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or cited special reason (as specified) *O* document relating to oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 May 2001	Date of mailing of the international search report 12. 6. 01	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5010 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31) 40 340 2000; Telex: 31 651 eppo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Fuchs, U	

Form PCT/ISA/210, second sheet (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/10919

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 60, column 1, line 5 - line 25 ---	
X	ALEXANDER, K. ET AL.: "Potentiation of ATP-gated human recombinant P2X3 receptor responses by cibatron blue" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 24, no. 1-2, 1998, page 1601 XP000926456 abstract no.: 630.3 the whole document ---	43-48
X	UENO, S. ET AL.: "Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 126, no. 2, January 1999 (1999-01), pages 429-436, XP000926134 abstract page 429, column 2, line 1 -page 430, column 1, line 9 page 433, column 2, line 2 -page 435, column 2, line 54 ---	41,42, 58-62
X	SAWYNOK, J. & REID, A.: "Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic P2X receptor" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 330, no. 2-3, 9 July 1997 (1997-07-09), pages 115-121, XP000926136 cited in the application abstract page 116, column 1, line 3 - line 14 page 119, column 1, line 9 -column 2, line 19 ---	41,58-61
Y	abstract page 116, column 1, line 3 - line 14 page 119, column 1, line 9 -column 2, line 19 ---	42,62
Y	VIRGINIO, C. ET AL.: "Trinitrophenyl-Substituted Nucleotides Are Potent Antagonists Selective for P2X1, P2X3, and Heteromeric P2X2/3 Receptors" MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 53, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 969-973, XP002919965 the whole document --- -/--	42,62

3

File: PCT-SA-210 Date: 06/01/2004 10:51:51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Enter national Application No
PCT/US 00/10919

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 36539 A (ABBOTT LABORATORIES) 22 July 1999 (1999-07-22) cited in the application abstract page 3, line 1 - line 18 page 8, line 14 -page 15, line 32 page 21 -page 24; examples 4,5 page 25 -page 28; claims 1-39 SEQ ID NO: 15 page 31 SEQ ID NO: 16 page 32	1-41, 58-61
A	MILLER, K.J. ET AL.: "Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 37, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1579-1586, XP000926481 cited in the application the whole document	43-57
A	COOK, S.P. ET AL.: "A Memory for Extracellular Ca ²⁺ by Speeding Recovery of P2X Receptors from Desensitization" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 18, no. 22, 15 November 1998 (1998-11-15), pages 9238-9244, XP002168398 the whole document	43-57
P,X	ALEXANDER, K. ET AL.: "Allosteric Modulation and Accelerated Resensitization of Human P2X3 Receptors by Cibacron Blue" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 291, no. 3, December 1999 (1999-12), pages 1135-1142, XP002168399 the whole document	43-57
P,X	TSUDA, M. ET AL.: "Evidence for the involvement of spinal endogenous ATP and P2X receptors in nociceptive responses caused by formalin and capsaicin in mice" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 128, no. 7, December 1999 (1999-12), pages 1497-1504, XP000926133 cited in the application the whole document	41,42, 58,60-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 00/10919
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 41, 42 and 58-62 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventors in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	<input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 00 10919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-42 and 58-62 completely

An isolated polynucleotide encoding a human P2X3 receptor polypeptide or a receptor having a nucleotide sequence at least 90% identical to said polynucleotide sequence encoding said human P2X3 receptor, said polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 15, a host cell comprising said polynucleotide, an expression vector comprising said polynucleotide, said expression vector wherein said polynucleotide encodes a human P2X3 receptor polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16, a host cell comprising said expression vector, a method for producing a human P2X3 receptor polypeptide involving said host cell comprising said expression vector, a purified human P2X3 receptor polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16, a monoclonal antibody which specifically binds to said human P2X3 receptor polypeptide, a method for identifying compounds that modulate P2X3 receptor activity involving a cell that expresses a P2X3 receptor comprising a human P2X3 polypeptide, a method for detecting a target polynucleotide of a P2X3 receptor in a test sample, a method for detecting cDNA of a human P2X3 receptor mRNA in a test sample, a method for detecting human P2X3 receptor in a test sample, a therapeutic method for relieving pain comprising: presenting an individual afflicted with pain and administering to said individual an effective amount of P2X3 antagonistic compound and a method of inducing antinociceptive effects in a mammal comprising: administering a P2X3 receptor antagonist to a patient;

2. Claims: 43-57 completely

a method of potentiating the effects of an agonist which activates a P2X3 receptor comprising: incubating cells comprising said P2X3 receptor with a triazene dye and exposing said incubated cells to said agonist, a method of blocking the inhibitory activity of a non-selective P2 receptor antagonist on a P2X3 receptor comprising: incubating P2X3-expressing cells with a triazene dye and exposing said incubated cells to said non-selective P2 receptor antagonist, a method for accelerating the rate of P2X3 receptor resensitization of desensitized P2X3 receptor-expressing cells comprising: exposing said desensitized P2X3 receptor-expressing cells to a triazene dye.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Patent Application No
PCT/US 00/10919

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9936539 A	22-07-1999	EP 1045903 A US 6214581 B	25-10-2000 10-04-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/02	A 6 1 P 29/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:91	

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100117053

弁理士 相馬 貴昌

(72)発明者 ジャービス, マイケル・エフ

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 1、バーノン・ヒルズ、サウス・オールドウッド・コート・3 5 6

(72)発明者 リンチ, ケビン・ジエイ

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 3 1、ガーニー、ウエスト・ハンブシャー・ドライブ・1 7 9 0 4

(72)発明者 バーガード, エドワード・シー

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 8、リバティビル、バーデイツク・ストリート・6 0 9

(72)発明者 バンビーセン, テイモシー

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 6 4 0、シカゴ、ノース・ドーバー・ストリート・4 7 1 1

(72)発明者 コウオラク, エリザベス・エイ

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 3 5、ハイランド・パーク、プリシラ・アベニュー・3 0 5 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA04 CA09 DA02 GA12 HA17

4B063 QA01 QA08 QA13 QQ08 QQ43 QQ53 QQ61 QQ89 QR32 QR41

QR50 QR56 QR62 QR77 QS25 QS34 QX02 QX07

4B064 AG20 AG27 BH09 CA19 CA20 DA08 DA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 CA24 CA44

4C084 AA16 NA14 ZA081 ZC421

4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA08 ZC42

4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 CA40 DA50 DA76 EA21 EA54 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004500021A5	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2000612458	申请日	2000-04-21
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ジヤービスマイケルエフ リンチケビンジエイ バーガードエドワードシー バンビーセンティモシー コウオラクエリザベスエイ		
发明人	ジヤービス,マイケル・エフ リンチ,ケビン・ジエイ バーガード,エドワード・シー バンビーセン,ティモシー コウオラク,エリザベス・エイ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/16 A61K31/185 A61K31/675 A61K31/7076 A61K38/00 A61K45/00 A61P25/04 A61P29/02 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21 /08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/566		
CPC分类号	A61K31/16 A61K31/185 A61K38/00 A61P25/04 A61P29/02 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/675 A61K31/7076 A61K45/00 A61P25/04 A61P29/02 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/53.Z G01N33 /566 C12N5/00.B C12P21/08 C12R1/91		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/GA12 4B024/HA17 4B063 /QA01 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063 /QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/BH09 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA08 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084 /AA16 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZC421 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA08 4C086/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045 /DA50 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 井上 充 Masarushin大崎		
优先权	60/130339 1999-04-21 US		
其他公开文献	JP2004500021A		

摘要(译)

本发明涉及P2X3受体，调节P2X3受体活性的方法以及这些方法的用途。特别地，例如，可以使用这样的方法来加速脱敏受体的再敏化速率。

