

(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2005-503124

(P2005-503124A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 9
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
		D
		N
	審査請求 有 予備審査請求 有	(全 199 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-581491 (P2002-581491)	(71) 出願人	500203709
(86) (22) 出願日	平成14年2月14日 (2002.2.14)		アムジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月13日 (2003.8.13)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004397		20, サウザンド オークス, ワン
(87) 国際公開番号	W02002/083736		アムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開日	平成14年10月24日 (2002.10.24)	(74) 代理人	100062007
(31) 優先権主張番号	60/269,040		弁理士 川口 義雄
(32) 優先日	平成13年2月14日 (2001.2.14)	(74) 代理人	100113332
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質共役受容体分子及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) ポリペプチド及びこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、GPCRポリペプチドを生産するための選択的結合物質、ベクター、宿主細胞及び方法を提供する。本発明はさらに、GPCRポリペプチドに関連する疾患、障害及び状態の診断、治療、改善、及び／又は予防のための医薬組成物及び方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 1、配列番号 3 又は配列番号 5 のいずれかに示すヌクレオチド配列、
(b) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
(c) (a) 又は (b) のいずれかのヌクレオチド配列の相補物に、少なくとも中ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は
(d) (a) 又は (b) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 2】

- (a) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドに少なくとも約 70% 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
(b) 配列番号 1、配列番号 3 又は配列番号 5 のいずれかに示すヌクレオチド配列、又は (a) のヌクレオチド配列の、対立遺伝子変異体又はスプライシング変異体をコードするヌクレオチド配列、
(c) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有するか、あるいは抗原性である、少なくとも約 25 個のアミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、配列番号 3 又は配列番号 5 のいずれかに示すヌクレオチド配列の領域、あるいは (a) 又は (b) のいずれかのヌクレオチド配列の領域、
(d) 少なくとも約 16 個のヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 3 又は配列番号 5 のいずれかのヌクレオチド配列の領域、又は (a) から (c) のいずれかのヌクレオチド配列の領域、
(e) (a) から (d) のいずれかのヌクレオチド配列の相補物に、少なくとも中ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は
(f) (a) から (d) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 3】

- (a) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個の保存的アミノ酸置換を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
(b) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個のアミノ酸挿入を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
(c) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個のアミノ酸欠失を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
(d) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、C 末端及び／又は N 末端トランケーションを備える、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
(e) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、1 個のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端トランケーション、又は N 末端トランケーションである少なくとも 1 つの修飾を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド、
(f) 少なくとも約 16 個のヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) から (e) のい

10

20

30

40

50

ずれかのヌクレオチド配列、

(g) (a) から (f) のいずれかのヌクレオチド配列の相補物に、少なくとも中ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は

(h) (a) から (e) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸分子を含むベクター。

【請求項 5】

請求項 4 のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 6】

真核細胞である、請求項 5 の宿主細胞。

【請求項 7】

原核細胞である、請求項 5 の宿主細胞。

【請求項 8】

GPCR ポリペプチドを発現するように適切な条件下で請求項 5 に記載の宿主細胞を培養すること、及び場合によっては前記培養から前記ポリペプチドを単離することを含む、GPCR ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 9】

請求項 8 の方法によって生産されるポリペプチド。

【請求項 10】

前記核酸分子が、前記 GPCR ポリペプチドをコードする DNA に作動可能に連結された、天然 GPCR ポリペプチドについてのプロモーター DNA 以外のプロモーター DNA を含む、請求項 8 の方法。

【請求項 11】

GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、及び Smith-Waterman アルゴリズムから成る群より選択されるコンピュータプログラムを使用してパーセント同一性を決定する、請求項 2 に記載の単離核酸分子。

【請求項 12】

請求項 5、6 又は 7 のいずれかに記載の細胞を化合物に接触させること、及び前記細胞において GPCR ポリペプチド活性又は GPCR ポリペプチド産生を測定することを含む、化合物が GPCR ポリペプチド活性又は GPCR ポリペプチド産生を阻害するかどうかを判定する方法。

【請求項 13】

配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 14】

(a) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのオーソログについてのアミノ酸配列、

(b) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列、

(c) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有するか、あるいは抗原性であり、少なくとも約 25 個のアミノ酸残基を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列のフラグメント、又は

(d) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、あるいは (a) 又は (b) のいずれかのアミノ酸配列の、対立遺伝子変異体又はスプライシング変異体についてのアミノ酸配列

を含む単離ポリペプチド。

【請求項 15】

(a) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペ

10

20

30

40

50

プチドの活性を有する、少なくとも1個の保存的アミノ酸置換を含む、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列、

(b) ポリペプチドが、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、少なくとも1個のアミノ酸挿入を含む、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列、

(c) ポリペプチドが、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、少なくとも1個のアミノ酸欠失を含む、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列、

(d) ポリペプチドが、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、C末端及び／又はN末端トランケーションを備える、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列、又は

(e) ポリペプチドが、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、1個のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端トランケーション、又はN末端トランケーションである少なくとも1つの修飾を含む、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項16】

配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、請求項1、2又は3のいずれかの核酸分子によってコードされている単離ポリペプチド。

【請求項17】

GAP、BLASTP、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、及びSmith-Watermanアルゴリズムから成る群より選択されるコンピュータプログラムを使用してパーセント同一性を決定する、請求項14に記載の単離ポリペプチド。

【請求項18】

請求項13、14又は15のいずれかのポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合物質又はそのフラグメント。

【請求項19】

配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列又はそのフラグメントを含むポリペプチドに特異的に結合する、請求項18の選択的結合物質又はそのフラグメント。

【請求項20】

抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項21】

ヒト化抗体である、請求項18の選択的結合物質。

【請求項22】

ヒト抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項23】

ポリクローナル抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項24】

モノクローナル抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項25】

キメラ抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項26】

CDR移植抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項27】

抗イディオタイプ抗体又はそのフラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項28】

可変領域フラグメントである、請求項18の選択的結合物質。

【請求項29】

10

20

30

40

50

F a b 又は F a b ' フラグメントである。請求項 28 の可変領域フラグメント。

【請求項 30】

配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドについての特異性を備える、少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む選択的結合物質又はそのフラグメント。

【請求項 31】

検出可能標識に結合している、請求項 18 の選択的結合物質。

【請求項 32】

G P C R ポリペプチドの生物活性に拮抗する、請求項 18 の選択的結合物質。

【請求項 33】

請求項 18 に記載の選択的結合物質の有効量を患者に投与することを含む、G P C R ポリペプチドに関連する疾患、状態、又は障害を治療するため、予防するため又は改善するための方法。

【請求項 34】

配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生される選択的結合物質。

【請求項 35】

請求項 13、14 又は 15 のいずれかに記載のポリペプチドに結合することができる選択的結合物質を産生するハイブリドーマ。

【請求項 36】

抗 G P C R 抗体又は請求項 18 のフラグメントを使用して G P C R ポリペプチドを検出する又は G P C R ポリペプチドの量を測定する方法。

【請求項 37】

請求項 18 の選択的結合物質を含む、生物学的試料中の G P C R ポリペプチドを検出する又は G P C R ポリペプチドの量を測定するためのキット。

【請求項 38】

請求項 13、14 又は 15 のいずれかのポリペプチド及び医薬適合性の製剤物質を含有する組成物。

【請求項 39】

医薬適合性の製剤物質が、担体、アジュバント、可溶化剤、安定剤、又は抗酸化剤である、請求項 38 の組成物。

【請求項 40】

請求項 13、14 又は 15 のいずれかのポリペプチドの誘導体を含むポリペプチド。

【請求項 41】

水溶性ポリマーで共有結合修飾されている、請求項 40 のポリペプチド。

【請求項 42】

水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、又はポリビニルアルコールである、請求項 41 のポリペプチド。

【請求項 43】

請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸分子及び医薬適合性の製剤物質を含有する組成物。

【請求項 44】

前記核酸分子がウイルスベクター内に含まれる、請求項 43 の組成物。

【請求項 45】

請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸分子を含むウイルスベクター。

【請求項 46】

異種アミノ酸配列に融合した、請求項 13、14 又は 15 のいずれかのポリペプチドを含む融合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 47】

異種アミノ酸配列が I g G 定常ドメイン又はそのフラグメントである、請求項 46 の融合ポリペプチド。

【請求項 48】

請求項 13、14 又は 15 のいずれかのポリペプチド又は請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸がコードするポリペプチドを患者に投与することを含む、医学的状態を治療するため、予防するため又は改善するための方法。

【請求項 49】

(a) 試料中の、請求項 13、14 又は 15 のいずれかのポリペプチド又は請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸がコードするポリペプチドの存在又は発現量を判定すること、及び 10

(b) 前記ポリペプチドの発現又は発現量に基づいて病的状態又は病的状態への感受性を診断すること

を含む、被験者において病的状態又は病的状態への感受性を診断する方法。

【請求項 50】

(a) 移植に適した膜、及び

(b) 請求項 13、14 又は 15 のいずれかのタンパク質を分泌する、前記膜内に被包された細胞

を含み、前記膜が、前記タンパク質には透過性であり、前記細胞に有害な物質には不透過性である、デバイス。 20

【請求項 51】

(a) 請求項 13、14 又は 15 のいずれかのポリペプチドを化合物に接触させること、及び

(b) 前記化合物への GPCR ポリペプチドの結合の程度を測定することを含む、GPCR ポリペプチドに結合する化合物を特定する方法。

【請求項 52】

前記化合物に結合したときのポリペプチドの活性を測定することをさらに含む、請求項 51 の方法。

【請求項 53】

請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸分子を動物に投与することを含む、動物においてポリペプチドのレベルを調節する方法。 30

【請求項 54】

請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト哺乳類。

【請求項 55】

請求項 54 に記載のトランスジェニック哺乳類を化合物に接触させること、及び前記哺乳類において GPCR ポリペプチド活性又は GPCR ポリペプチド産生を測定することを含む、化合物が GPCR ポリペプチド活性又は GPCR ポリペプチド産生を阻害するかどうかを判定するための方法。

【請求項 56】

保持体に結合した、請求項 1、2 又は 3 のいずれかの核酸分子。 40

【請求項 57】

請求項 1、2 又は 3 のいずれかの少なくとも 1 個の核酸分子を含む、核酸分子のアレイ。

【請求項 58】

2 位のアスパラギン酸、8 位のロイシン、12 位のグルタミン酸、13 位のプロリン、15 位のトレオニン、24 位のロイシン、25 位のバリン、27 位のロイシン、35 位のイソロイシン又はロイシン、49 位のセリン、52 位のイソロイシン、82 位のイソロイシン、83 位のロイシン、87 位のアラニン、90 位のロイシン、91 位のバリン、94 位のリシン又はメチオニン、111 位のバリン、123 位のメチオニン、126 位のアラニン、129 位の N、131 位のトレオニン、134 位のアラニン、135 位のトレオニン、136 位のアラニン、138 位のバリン、141 位のトレオニン、152 位のメチオニ 50

ン、154位のセリン、159位のアルギニン、160位のグリシン、161位のメチオニン、162位のロイシン又はバリン、163位のセリン、179位のバリン、187位のロイシン、190位のトレオニン、197位のバリン、198位のアスパラギン、199位のバリン、205位のグルタミン、210位のトレオニン、216位のアルギニン、217位のアルギニン、227位のセリン、238位のロイシン、249位のトレオニン、258位のトレオニン又はイソロイシン、262位のバリン、266位のロイシン、269位のロイシン、285位のロイシン、290位のアラニン、293位のトレオニン、295位のアルギニン、300位のアルギニン、301位のアルギニン、304位のアルギニン、305位のトレオニン、306位のグルタミン、307位のアラニン、308位のアルギニン、310位のセリン、319位のグリシン、320位のセリン、321位のロイシン、322位のセリン、324位のトレオニン、325位のアスパラギン酸、326位のグリシン、327位のバリン、329位のアルギニン、330位のセリン、332位のアルギニン、334位のプロリン、339位のグリシン、340位のロイシン、341位のグルタミン、及び342位のバリンである、少なくとも1個の保存的アミノ酸置換を含み、配列番号2に示すポリペプチドの活性を有する、配列番号2に示すアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）ポリペプチド及びこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、選択的結合物質、ベクター、宿主細胞及びGPCRポリペプチドを生産するための方法に関する。本発明はさらに、GPCRポリペプチドに関連する疾患、障害及び状態の診断、治療、改善及び／又は予防のための医薬組成物及び方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

核酸分子の特定、クローニング、発現及び操作における技術的進歩とヒトゲノムの解読は、新規治療法の発見を大きく加速した。迅速な核酸配列決定手法は、今や未曾有の速度で配列情報を生み出すことができ、コンピュータ解析と組み合わせ、オーバーラップ配列の部分的ゲノム及び全体的ゲノムへの構築ならびにポリペプチドコード領域の特定を可能にする。予測アミノ酸配列を既知のアミノ酸配列のデータベース集積と比較することにより、これまでに特定された配列及び／又は構造指標との相同性の程度を決定することが可能となる。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングと発現は、構造的及び機能的分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子及びコードされるポリペプチドの操作は、治療薬として使用するための生成物に有益な特性を付与しうる。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

この10年間にわたるゲノム研究の重要な技術的進歩にもかかわらず、ヒトゲノムに基づく新規治療薬の開発の潜在的可能性はまだほとんど理解されていない。潜在的に有益なポリペプチド治療薬をコードする多くの遺伝子、又は治療薬分子のための「標的」として働きうるポリペプチドをコードする遺伝子は、いまだ特定されていない。従って、診断上又は治療上の恩恵を有する新規ポリペプチド及びそれらをコードする核酸分子を特定することが本発明の1つの目的である。

40

【0004】

Gタンパク質共役受容体（GPCR）は、哺乳類細胞におけるシグナル伝達カスケードの必須成分である内在性膜タンパク質の大きなスーパーファミリーを含む。このスーパーファミリーの成員によって行われるシグナル伝達の過程は、ホルモン又は神経伝達物質のような細胞外分子のGタンパク質共役受容体への結合、ヘテロ三量体型Gタンパク質とGタンパク質受容体の相互作用、及びその後のGタンパク質によるエフェクター分子の活性化

50

を含む (Fraserら、1994、Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 49:113-56 参照)。GPCRポリペプチドの特徴は、 α ヘリックス構造内の脂質二重層にまたがる20個から28個の疎水性残基の7つの膜貫通ドメイン、疎水性ドメインを結ぶ6つの細胞内と細胞外の交互の疎水性ループ、及び細胞外のアミノ末端領域と細胞内のカルボキシル末端領域を含む (Fraserら、1994 参照)。

【0005】

過去15年以上にわたり、Gタンパク質共役受容体を標的とする350近くの治療薬が市場に導入されて成功を収め、Gタンパク質共役受容体が、ヒト疾患の治療のための治療標的として、確立され、立証された経緯を有することが示された。明らかに、この分野において、疾患又は障害を診断する、治療する、改善する又は予防する上で役割を果たしうるこのスーパーファミリーの他の成員の特定と特性づけが必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、新規GPCR核酸分子及びコードされるポリペプチドに関する。

【0007】

本発明は、

- (a) 配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかに示すヌクレオチド配列、
- (b) 配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
- (c) (a)又は(b)のいずれかのヌクレオチド配列の相補物に、少なくとも中ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は
- (d) (a)又は(b)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

20

【0008】

本発明は、

- (a) コードするポリペプチドが配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、
- (b) 配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかに示すヌクレオチド配列あるいは(a)のヌクレオチド配列の、対立遺伝子変異体又はスプライシング変異体をコードするヌクレオチド配列、
- (c) コードするポリペプチドが配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有するか、あるいは抗原性である、少なくとも約25個のアミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかに示すヌクレオチド配列の領域、あるいは(a)又は(b)のいずれかのヌクレオチド配列の領域、
- (d) 少なくとも約16個のヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかのヌクレオチド配列の領域、又は(a)から(c)のいずれかのヌクレオチド配列の領域、
- (e) (a)から(d)のいずれかのヌクレオチド配列の相補物に、少なくとも中ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は
- (f) (a)から(d)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

30

40

【0009】

本発明はさらに、

- (a) コードするポリペプチドが配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも1個の保存的アミノ酸置換を含む、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配

50

列、

(b) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個のアミノ酸挿入を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(c) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個のアミノ酸欠失を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(d) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、C 末端及び／又は N 末端トランケーションを備える、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、 10

(e) コードするポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、1 個のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端トランケーション、又は N 末端トランケーションである少なくとも 1 つの修飾を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド、

(f) 少なくとも約 16 個のヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) から (e) のいずれかのヌクレオチド配列、

(g) (a) から (f) のいずれかのヌクレオチド配列の相補物に、少なくとも中ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は 20

(h) (a) から (e) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

【0010】

本発明は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸を含む単離ポリペプチドを提供する。

【0011】

本発明はまた、

(a) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのオーソログについてのアミノ酸配列、

(b) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列、 30

(c) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有するか、又は抗原性であり、少なくとも約 25 個のアミノ酸残基を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列のフラグメント、又は

(d) 配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、あるいは (a) 又は (b) のいずれかのアミノ酸配列の、対立遺伝子変異体又はスプライシング変異体についてのアミノ酸配列

を含む単離ポリペプチドを提供する。

【0012】

本発明は、

(a) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、少なくとも 1 個の保存的アミノ酸置換を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、

(b) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、少なくとも 1 個のアミノ酸挿入を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、

(c) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、少なくとも 1 個のアミノ酸欠失を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、 40

(d) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、C 末端及び／又は N 末端トランケーションを備える、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、又は

(e) ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、1 個のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端トランケーション、又は N 末端トランケーションである少なくとも 1 つの修飾を含む、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列

を含む単離ポリペプチドを提供する。

【0013】

本発明はさらにまた、2 位のアスパラギン酸、8 位のロイシン、12 位のグルタミン酸、13 位のプロリン、15 位のトレオニン、24 位のロイシン、25 位のバリン、27 位のロイシン、35 位のイソロイシン又はロイシン、49 位のセリン、52 位のイソロイシン、82 位のイソロイシン、83 位のロイシン、87 位のアラニン、90 位のロイシン、91 位のバリン、94 位のリシン又はメチオニン、111 位のバリン、123 位のメチオニン、126 位のアラニン、129 位の N、131 位のトレオニン、134 位のアラニン、135 位のトレオニン、136 位のアラニン、138 位のバリン、141 位のトレオニン、152 位のメチオニン、154 位のセリン、159 位のアルギニン、160 位のグリシン、161 位のメチオニン、162 位のロイシン又はバリン、163 位のセリン、179 位のバリン、187 位のロイシン、190 位のトレオニン、197 位のバリン、198 位のアスパラギン、199 位のバリン、205 位のグルタミン、210 位のトレオニン、216 位のアルギニン、217 位のアルギニン、227 位のセリン、238 位のロイシン、249 位のトレオニン、258 位のトレオニン又はイソロイシン、262 位のバリン、266 位のロイシン、269 位のロイシン、285 位のロイシン、290 位のアラニン、293 位のトレオニン、295 位のアルギニン、300 位のアルギニン、301 位のアルギニン、304 位のアルギニン、305 位のトレオニン、306 位のグルタミン、307 位のアラニン、308 位のアルギニン、310 位のセリン、319 位のグリシン、320 位のセリン、321 位のリシン、322 位のセリン、324 位のトレオニン、325 位のアスパラギン酸、326 位のグリシン、327 位のバリン、329 位のアルギニン、330 位のセリン、332 位のアルギニン、334 位のプロリン、339 位のグリシン、340 位のロイシン、341 位のグルタミン、及び 342 位のバリンである、少なくとも 1 個の保存的アミノ酸置換を含み、配列番号 2 に示すポリペプチドの活性を有する、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。

【0014】

また、GPCR アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドも提供する。

【0015】

本発明はまた、ここで示すような単離核酸分子を含む発現ベクター、ここで示すような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびに、前記宿主細胞を培養すること及び場合によってはそのようにして生産したポリペプチドを単離することを含む、GPCR ポリペプチドを生産する方法を提供する。GPCR 活性のアゴニスト又はアンタゴニストの特定のためのスクリーニング法において使用するために細胞表面上又は細胞膜上で該ポリペプチドを発現することを所望する場合がありますので、発現されたポリペプチドの単離を任意ケースとして記述している。

【0016】

GPCR ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物も、本発明に包含される。GPCR ポリペプチドの発現及びレベル上昇（循環レベルの上昇を含む）を可能にするように、GPCR 核酸分子を動物に導入する。選択的に、内因性 GPCR ポリペプチドの発現を妨げる（すなわち、GPCR ポリペプチド遺伝子ノックアウトを有するトランスジェニック動物を作製する）ように、GPCR 核酸分子を動物に導入する。前記トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳類、より好ましくはラット又はマウスのようなげっ歯類である。

10

20

30

40

50

【0017】

本発明のGPCRポリペプチドの誘導体も提供する。

【0018】

さらに、本発明のGPCRポリペプチドに特異的に結合することができる抗体及びペプチドのような選択的結合物質を提供する。そのような抗体及びペプチドはアゴニスト又はアンタゴニストでありうる。

【0019】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド又は選択的結合物質と、1つ又はそれ以上の医薬適合性の製剤物質を含有する医薬組成物も、本発明に包含される。医薬組成物は、本発明のヌクレオチド又はポリペプチドの治療上有効な量を提供するために使用される。本発明はまた、前記ポリペプチド、核酸分子及び選択的結合物質を使用する方法を対象とする。 10

【0020】

本発明のGPCRポリペプチド及び核酸分子は、ここで列挙するものを含めて、疾患及び障害を治療する、予防する、改善する及び／又は検出するために使用しうる。

【0021】

本発明はまた、GPCRポリペプチドに結合する試験分子を特定するために試験分子を検定する方法を提供する。この方法は、GPCRポリペプチドを試験分子に接触させて、試験分子がポリペプチドに結合する度合を測定することを含む。この方法はさらに、そのような試験分子がGPCRポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストであるかどうかを判定することを含む。本発明はさらに、分子がGPCRポリペプチドの発現又はGPCRポリペプチドの活性に及ぼす影響を調べる方法を提供する。 20

【0022】

GPCRポリペプチドの発現を調節し、レベルを変化させる（すなわち上昇させるか又は低下させる）方法も、本発明に包含される。1つの方法は、GPCRポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与することを含む。もう1つの方法では、GPCRポリペプチドの発現を調節する又は変化させるエレメントを含む核酸分子を投与してもよい。これらの方法の例は、ここでさらに記述するような遺伝子治療、細胞治療及びアンチセンス治療を含む。

【0023】

GPCRポリペプチドは、そのリガンドを特定するために使用できる。様々な形態の「発現クローニング」が、受容体についてのリガンドをクローニングするために使用されてきた（例えばDavisら、1996、Cell, 87:1161-69参照）。これらやその他のGPCRリガンドクローニング実験をここで詳細に説明する。GPCRリガンドの単離は、GPCRシグナル伝達経路の新規アゴニスト及び／又はアンタゴニストの特定又は開発を可能にする。そのようなアゴニスト及びアンタゴニストは、GPCRリガンド、抗GPCRリガンド抗体及びそれらの誘導体、低分子、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、それらのいずれもが、ここで列挙するものを含めて、潜在的に1つ又はそれ以上の疾患又は障害を治療するために使用できる。 30

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

ここで使用する章の見出しは、構成目的のためだけのものであり、記述される主題を限定すると解釈されるべきではない。この明細書において引用する参考文献は、明白に参照してここに組み込まれる。 40

【0025】

（定義）

「GPCR遺伝子」又は「GPCR核酸分子」又は「GPCRポリヌクレオチド」の語は、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかに示すヌクレオチド配列を含む又は前記ヌクレオチド配列から成る核酸分子、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及びここで定義するような核酸分子を表わす。 50

【0026】

「GPCRポリペプチド対立遺伝子変異体」の語は、一生物又は生物個体群の染色体上の所与の遺伝子座を占める遺伝子の、いくつかの可能な天然に生じる交替形態の1つを表わす。

【0027】

「GPCRポリペプチドスプライシング変異体」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すGPCRポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写におけるイントロン配列の選択的プロセッシングによって生じる核酸分子、通常はRNAを表わす。

【0028】

「単離核酸分子」の語は、(1)全核酸をソース細胞から単離するとき天然に認められるタンパク質、脂質、炭水化物又は他の物質の少なくとも約50%から分離されたか、(2)「単離核酸分子」が自然の状態で結合しているポリペプチドの全部又は一部に結合していないか、(3)自然の状態では結合していないポリペプチドに作動可能に結合しているか、又は(4)自然の状態ではより大きなポリヌクレオチド配列の一部としては生じない、本発明の核酸分子を表わす。好ましくは、本発明の単離核酸分子は、その天然環境では認められない、ポリペプチド生産におけるその使用あるいはその治療、診断、予防又は研究用途に干渉するであろう何らかの他の汚染核酸分子又は夾雑物を実質的に含まない。

【0029】

「核酸配列」又は「核酸分子」の語は、DNA又はRNA配列を表わす。この語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、及び2,6-ジアミノプリンのような、但しこれらに限定されない、DNA及びRNAの既知の塩基類似体のいずれかから形成される分子を包含する。

【0030】

「ベクター」の語は、コード情報を宿主細胞に転移するために使用される何らかの分子(例えば核酸、プラスミド又はウイルス)を表わすために用いられる。

【0031】

「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適し、挿入される異種核酸配列の発現を指令する及び／又は制御する核酸配列を含むベクターを表わす。発現は、転写、翻訳、及びイントロンが存在する場合にはRNAスプライシングなどのプロセスを含むが、これらに限定されない。

【0032】

「作動可能に連結された」の語は、ここでは、そのように記述されるフランキング配列が、それらの通常の機能を果たすように立体配置されている又は構築されている、フランキング配列の配置を表わすために用いられる。従って、コード配列に作動可能に連結されたフランキング配列は、コード配列の複製、転写及び／又は翻訳を生じさせうる。例えば、コード配列は、プロモーターがそのコード配列の転写を指令することができるとき、その

10

20

30

40

50

プロモーターに作動可能に連結されている。フランキング配列は、それが正しく機能する限り、コード配列と隣接している必要はない。従って、例えば、介在非翻訳転写配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在することができ、そのプロモーター配列は、それでもやはりコード配列に「作動可能に連結されている」とみなすことができる。

【0033】

「宿主細胞」の語は、形質転換された細胞、又は核酸配列で形質転換され、その後目的とする選択遺伝子を発現することができる細胞を表わすために用いられる。この語は、その子孫が形態又は遺伝的特性において元の親と同一であるか否かに関わらず、選択遺伝子が存在する限り、該親細胞の子孫を包含する。

【0034】

「GPCRポリペプチド」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド及び関連ポリペプチドを表わす。関連ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、GPCRポリペプチドフラグメント、GPCRポリペプチドオーソログ、GPCRポリペプチド変異体及びGPCRポリペプチド誘導体を包含する。GPCRポリペプチドは、ここで定義するような成熟ポリペプチドであってもよく、またそれらを調製する方法に依存して、アミノ末端のメチオニン残基を有していてもよく又は有していてもよい。

【0035】

「GPCRポリペプチドフラグメント」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドのアミノ末端（リーダー配列を伴う又は伴わない）のランケーション及び／又はカルボキシル末端のランケーションを含むポリペプチドを表わす。「GPCRポリペプチドフラグメント」の語はまた、GPCRポリペプチドオーソログ、GPCRポリペプチド誘導体又はGPCRポリペプチド変異体のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端ランケーション、あるいはGPCRポリペプチド対立遺伝子変異体又はGPCRポリペプチドスプライシング変異体がコードするポリペプチドのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端ランケーションを表わす。GPCRポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングから又はインビボプロテアーゼ活性から生じうる。GPCRポリペプチドの膜結合形態も本発明によって意図される。好ましい実施態様では、ランケーション及び／又は欠失は、約10個のアミノ酸、又は約20個のアミノ酸、又は約50個のアミノ酸、又は約75個のアミノ酸、又は約100個のアミノ酸、又は約100個を超えるアミノ酸を含む。このようにして生産されるポリペプチドフラグメントは、約25個の隣接アミノ酸、又は約50個のアミノ酸、又は約75個のアミノ酸、又は約100個のアミノ酸、又は約150個のアミノ酸、又は約200個のアミノ酸、又は約200個を超えるアミノ酸を含む。そのようなGPCRポリペプチドフラグメントは、場合によってはアミノ末端のメチオニン残基を含みうる。そのようなフラグメントは、例えばGPCRポリペプチドに対する抗体を作製するために使用されることが認識される。

【0036】

「GPCRポリペプチドオーソログ」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すGPCRポリペプチドアミノ酸配列に対応する、もう1つ別の種からのポリペプチドを表わす。例えば、マウスとヒトのGPCRポリペプチドは相互のオーソログとみなされる。

【0037】

「GPCRポリペプチド変異体」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すGPCRポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を伴う又は伴わない）と比較して、1個又はそれ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（内部欠失及び／又はGPCRフラグメントなど）、及び／又は付加（内部付加及び／又はGPCR融合ポリペプチドなど）を有するアミノ酸配列を含むGPCRポリペプチドを表わす。変異体は、天然に生じうる（例えばGPCRポリペプチド対立遺伝子変異体、GPCRポリペプチドオーソログ及びGPCRポリペプチドスプライシング変異体）か又は人工的に構築しうる。そのよう

10

20

30

40

50

なGPCRポリペプチド変異体は、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかに示すDNA配列に対応して異なるDNA配列を有する対応核酸分子から調製しうる。好ましい実施態様では、変異体は、1~3、又は1~5、又は1~10、又は1~15、又は1~20、又は1~25、又は1~50、又は1~75、又は1~100、又は100個を超えるアミノ酸の置換、挿入、付加及び／又は欠失、又はそれらの組合せを含み、この場合、置換は保存的であってもよく又は非保存的であってもよい。

【0038】

「GPCRポリペプチド誘導体」の語は、化学修飾された、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチド、ここで定義するようなGPCRポリペプチドフラグメント、GPCRポリペプチドオーソログ又はGPCRポリペプチド変異体を表わす。「GPCRポリペプチド誘導体」の語はまた、化学修飾された、ここで定義するようなGPCRポリペプチド対立遺伝子変異体又はGPCRポリペプチドスプライシング変異体がコードするポリペプチドを表わす。

10

【0039】

「成熟GPCRポリペプチド」の語は、リーダー配列を欠くGPCRポリペプチドを表わす。成熟GPCRポリペプチドはまた、アミノ末端（リーダー配列を伴う又は伴わない）及び／又はカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、大きな前駆体からより小さなポリペプチドへの開裂、N結合及び／又はO結合グリコシル化などのような他の修飾も含みうる。

【0040】

「GPCR融合ポリペプチド」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチド、ここで定義するようなGPCRポリペプチドフラグメント、GPCRポリペプチドオーソログ、GPCRポリペプチド変異体又はGPCR誘導体の、アミノ末端又はカルボキシル末端における1個又はそれ以上のアミノ酸（異種タンパク質又はペプチドなど）の融合を表わす。「GPCR融合ポリペプチド」の語はまた、ここで定義するようなGPCRポリペプチド対立遺伝子変異体又はGPCRポリペプチドスプライシング変異体がコードするポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端における1個又はそれ以上のアミノ酸の融合を表わす。

20

【0041】

「生物活性GPCRポリペプチド」の語は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの、特徴的な少なくとも1つの活性を有するGPCRポリペプチドを表わす。さらに、GPCRポリペプチドは免疫原として活性でありうる。すなわち、GPCRポリペプチドは、それに対する抗体が惹起されうる少なくとも1個のエピトープを含む。

30

【0042】

「単離ポリペプチド」の語は、（1）源細胞から単離されて天然に認められるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物又は他の物質の少なくとも約50%が分離されたか、（2）「単離ポリペプチド」が自然の状態で結合しているポリペプチドの全部又は一部が（共有結合によって又は非共有結合相互作用によって）結合していないか、（3）自然の状態でDNAは結合していないポリペプチドに（共有結合によって又は非共有結合相互作用によって）作動可能に結合しているか、又は（4）自然の状態で生じない、本発明のポリペプチドを表わす。好ましくは、前記単離ポリペプチドは、その天然環境では認められない、その治療、診断、予防又は研究用途を妨害するであろう何らかの他の汚染ポリペプチド又は夾雑物を実質的に含まない。

40

【0043】

「同一性」の語は、この分野において既知であるように、配列を比較することによって決定される、2個又はそれ以上のポリペプチド分子の配列あるいは2個又はそれ以上の核酸分子の配列の間の関係を表わす。この分野では、「同一性」はまた、ケースによっては、2個又はそれ以上のヌクレオチド配列あるいは2個又はそれ以上のアミノ酸配列の鎖の間の対合によって決定される、核酸分子又はポリペプチドの間の配列関連性の程度を意味す

50

る。「同一性」は、特定の数学的モデル又はコンピュータプログラム（すなわち「アルゴリズム」）によって処理される、ギャップ整列（もし存在する場合は）を含む2個又はそれ以上の配列のより小さいものの間の同一対合のパーセントを測定する。

【0044】

「類似性」の語は、関連するが、「同一性」と異なる概念であり、「類似性」は、同一対合と保存的置換対合の両方を含めた関連性の尺度を表わす。2個のポリペプチド配列が、例えば、10/20個の同一アミノ酸を有し、残りの部分がすべて非保存的置換である場合、パーセント同一性及び類似性はいずれも50%となる。同じ例で、さらに5個の部分に保存的置換が存在する場合には、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75%（15/20）になる。それ故、保存的置換が存在する場合には、2つのポリペプチドの間のパーセント類似性は、それら2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高くなる。

10

【0045】

核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質に関して使用するとき、「天然に生じる」又は「天然の」の語は、自然の状態で認められ、ヒトによって操作されていない物質を表わす。同様に、ここで使用するとき「非天然に生じる」又は「非天然の」の語は、自然の状態では認められないか、あるいはヒトによって構造的に修飾された又は合成された物質を表わす。

【0046】

「有効量」及び「治療上有効な量」の語は各々、ここで示すGPCRポリペプチドの1つ又はそれ以上の生物活性の観察可能なレベルを保持するために使用されるGPCRポリペプチド又はGPCR核酸分子の量を表わす。

20

【0047】

ここで使用するとき「医薬適合性の担体」又は「生理的に許容される担体」の語は、医薬組成物としてのGPCRポリペプチド、GPCR核酸分子又はGPCR選択的結合物質の供給送達を達成する又は促進するのに適した1又はそれ以上の製剤材料を表わす。

【0048】

「抗原」の語は、抗体のような選択的結合物質が結合することができ、それに加えて、その抗原のエピトープに結合することができる抗体を作製するために動物において使用することができる分子又は前記分子の一部を表わす。

30

【0049】

「選択的結合物質」の語は、GPCRポリペプチドに対して特異性を有する1分子又は複数の分子を表わす。ここで使用するとき、「特異的」及び「特異性」の語は、ヒトGPCRポリペプチドに結合し、ヒト非GPCRポリペプチドには結合しない、選択的結合物質の能力を表わす。しかし、選択的結合物質はまた、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドのオーソログ、すなわちマウス及びラットGPCRポリペプチドのような、その種間変異型にも結合しうることが認識される。

【0050】

「形質導入」の語は、通常はファージによる、1つの細菌からもう1つ別の細菌への遺伝子の移入を表わすために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核細胞配列の獲得及び移入を表わす。

40

【0051】

「トランスフェクション」の語は、細胞による異種又は外来性DNAの取込みを表わすために用いられ、外来性DNAが細胞膜の内側に導入されたとき、その細胞は「トランスフェクション」されたことになる。多くのトランスフェクション手法がこの分野において周知であり、ここでも開示する。例えば、Grahamら、1973、Virology 52:456; Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986); 及びChuら、198

50

1、Gene 13:197参照。そのような手法は、1又はそれ以上の外来性DNA部分を適切な宿主細胞に導入するために使用することができる。

【0052】

ここで使用するとき「形質転換」の語は、細胞の遺伝的特徴における変化を表わし、細胞が新しいDNAを含むように修飾されたとき、その細胞は形質転換されたことになる。例えば、細胞がその天然の状態から遺伝的に修飾されている場合、その細胞は形質転換されている。トランスフェクション又は形質導入後、形質転換DNAは、細胞の染色体に物理的に組み込むことによってその細胞のDNAと組み換えてもよく、複製されないエピソードエレメントとして一過性に保持してもよく、あるいはプラスミドとして独立して複製させてもよい。DNAが細胞の分裂を伴って複製されるとき、その細胞は安定に形質転換されたとみなされる。

10

【0053】

(核酸分子及び／又はポリペプチドの関連性)

関連核酸分子が、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかの核酸分子の対立遺伝子変異体又はスプライシング変異体を包含すること、及び上記ヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することは明白である。関連核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドと比較して、1個又はそれ以上のアミノ酸残基の置換、修飾、付加及び／又は欠失を含む、又は基本的にそれらから成るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。そのような関連GPCRポリペプチドは、例えば、1又はそれ以上のN結合又はO結合グリコシル化部位の付加及び／又は欠失、あるいは1個又はそれ以上のシステイン残基の付加及び／又は欠失を含みうる。

20

【0054】

関連核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかのGPCRポリペプチドの少なくとも約25個の隣接アミノ酸、又は約50個のアミノ酸、又は約75個のアミノ酸、又は約100個のアミノ酸、又は約150個のアミノ酸、又は約200個のアミノ酸、又は約200個を超えるアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、GPCR核酸分子のフラグメントを包含する。

【0055】

さらに、関連GPCR核酸分子はまた、ここで定義するような中ストリンジェンシー又は高ストリンジェンシー条件下で、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかのGPCR核酸分子、又は配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すようなアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子、又はここで定義するような核酸フラグメント、又はここで定義するようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの、完全に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含する。関連配列に関してcDNA、ゲノム又は合成DNAライブラリーをスクリーニングするために、ここで提供するGPCR配列を使用してハイブリダイゼーションプローブを作製しうる。ここで述べるような配列整列化アルゴリズムを使用して、既知の配列に有意の同一性を示すGPCRポリペプチドのDNA及び／又はアミノ酸配列の領域が容易に決定され、それらの領域は、スクリーニング用のプローブを設計するために使用しうる。

30

【0056】

「高ストリンジェンシー条件」の語は、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、有意の不对合DNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計される条件を表わす。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主として温度、イオン強度、及びホルムアミドのような変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーション及び洗浄についての「高ストリンジェンシー条件」の例は、65℃から68℃で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム又は42℃で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム及び50%ホルムアミドである。Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Andersonら、

40

50

Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited) 参照。

【0057】

よりストリンジェントな条件（より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド又は他の変性剤）も使用しうる。しかし、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受ける。非特異的及び／又はバックグラウンドハイブリダイゼーションの低下のために、他の作用物質をハイブリダイゼーション及び洗浄緩衝液に含めてもよい。その例は、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% ピロリン酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、 NaDodSO_4 、(SDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA（又はもう1つ別の非相補的DNA）、及び硫酸デキストランであるが、他の適切な作用物質も使用できる。これらの添加剤の濃度及び種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的な影響を及ぼすことなく変化させることができる。ハイブリダイゼーション実験は通常pH 6.8-7.4で実施する；しかし、典型的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーションの速度はほとんどpHに無関係である。Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited) 参照。

【0058】

DNA二重鎖の安定性に影響を及ぼす因子は、塩基の組成、長さ、塩基対不對合の割合を含む。当業者は、これらの変数を適応させ、種々の配列関連性のDNAがハイブリッドを生成することを可能にするように、ハイブリダイゼーション条件を調整することができる。完全に対合するDNA二重鎖の融点は、次の等式によって推定することができる：

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / \text{N} - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

〔式中、Nは、生成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション又は洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の（グアニン+シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全対合ハイブリッドに関しては、融点は、各々1%の不適合対合について約1℃ずつ低下する。〕

【0059】

「中ストリンジェンシー条件」の語は、「高ストリンジェンシー条件」下で起こりうるよりも大きな割合の塩基対不適合対合を有するDNA二重鎖が生成しうる条件を表わす。典型的な「中ストリンジェンシー条件」の例は、50℃から65℃で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム又は37℃から50℃で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム及び20%ホルムアミドである。例として、0.015Mナトリウムイオン中50℃の「中ストリンジェンシー条件」は、約21%の不適合対合を生じる。

【0060】

「高ストリンジェンシー条件」と「中ストリンジェンシー条件」の間に絶対的な区別が存在しないことは、当業者には認識される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）で、完全に対合する長いDNAの融点は約71℃である。65℃で洗浄すると（同じイオン強度で）、これによって約6%の不適合対合が生じる。より関連性の遠い配列を捕獲するためには、当業者は単に温度を下げるか又はイオン強度を上げるだけでよい。

【0061】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl*中の融点の良好な推定が、次の式によって与えられる：

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} / \text{A-T塩基対} + 4^{\circ}\text{C} / \text{G-C塩基対}$$

* 6Xクエン酸ナトリウム塩溶液 (SSC) 中のナトリウムイオン濃度は1Mである。Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes 683 (Brown and Fox編集、1981) 参照。

10

20

30

40

50

【0062】

オリゴヌクレオチドについての高ストリンジェンシー洗浄条件は、通常、6X SSC、0.1% SDS 中、オリゴヌクレオチドの T_m より低い 0℃ から 5℃ の温度である。

【0063】

もう 1 つの実施態様では、関連核酸分子は、配列番号 1、配列番号 3 又は配列番号 5 のいずれかに示すヌクレオチド配列と少なくとも約 70% 同一であるヌクレオチド配列を含む又は前記ヌクレオチド配列から成る。好ましい実施態様では、前記ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 又は配列番号 5 のいずれかに示すヌクレオチド配列と約 75%、又は約 80%、又は約 85%、又は約 90%、又は約 95%、96%、97%、98% 又は 99% 同一である。関連核酸分子は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有するポリペプチドをコードする。

10

【0064】

核酸配列における相違は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列に関する、アミノ酸配列の保存的及び／又は非保存的修飾を生じうる。

【0065】

配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列への保存的修飾（及びそのコードするヌクレオチドへの対応する修飾）は、GPCR ポリペプチドに類似した機能的及び化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。これに対し、GPCR ポリペプチドの機能的及び／又は化学的特徴の実質的な修飾は、（a）例えばシート又はらせんコンフォメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（b）標的部位における分子の電荷又は疎水性、あるいは（c）側鎖のかさ（バルク）、を維持することへの影響が有意に異なる、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成しうる。

20

【0066】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その部位のアミノ酸残基の極性又は電荷にほとんど又は全く影響がないように、天然アミノ酸残基を非天然残基で置換することを含みうる。さらにまた、「アラニンスキャニング突然変異誘発」に関してこれまでに記述されているように、ポリペプチド内の何らかの天然残基をアラニンで置換してもよい。

【0067】

保存的アミノ酸置換はまた、典型的には生物系における合成によってではなく化学的ペプチド合成によって組み込まれる、非天然に生じるアミノ酸残基を包含する。これらは、ペプチドミメティック、及びアミノ酸部分の他の逆（reversed又はinverted）形態を含む。

30

【0068】

天然に生じる残基は、共通の側鎖特性に基づいて次のクラスに分類しうる：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の方向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；及び
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

【0069】

例えば、非保存置換は、これらのクラスの 1 つの成員をもう 1 つ別のクラスからの成員と交換することを含みうる。そのような置換残基は、非ヒト GPCR ポリペプチドと相同なヒト GPCR ポリペプチドの領域に導入するか、又は前記分子の非相同領域に導入しうる。

【0070】

そのような交換を行う場合、アミノ酸の疎水親水指数が考慮しうる。各々のアミノ酸には、その疎水性と電荷特性に基づいて疎水親水指数が割り当てられている。疎水親水指数は：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルア

50

ラニン (+2.8) ; システイン / シスチン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; ア
 ラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; トレオニン (-0.7) ; セリン (-0.
 8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒ
 スチジン (-3.2) ; グルタミン酸塩 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパ
 ラギン酸塩 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リシン (-3.9) ; 及びアルギ
 ニン (-4.5) である。

【0071】

タンパク質に相互作用性生物機能を付与する上でのアミノ酸疎水親水指数の重要性はこの
 分野で一般的に理解されている (Kyteら、1982、J. Mol. Biol. 157
 : 105-31)。一部のアミノ酸が同様の疎水親水指数又はスコアを持つ他のアミノ酸
 を置換して、それでもなお同様の生物活性を保持しうることが知られている。疎水親水指
 数に基づく変更を行う場合、疎水親水指数が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1
 以内であるものが特に好ましく、±0.5以内であることがより一層好ましい。

10

【0072】

また、同様のアミノ酸の置換は、特に、本発明の場合のように、それによって創造される
 生物機能的に等価のタンパク質又はペプチドが免疫学的実施態様における使用を意図され
 ている場合には、親水性に基づいて有効に実施することができる。タンパク質の最大局所
 平均親水性は、その隣接アミノ酸の親水性に支配されるので、その免疫原性及び抗原性、
 すなわち該タンパク質の生物学的性質と相関する。

【0073】

これらのアミノ酸残基には次のような親水値が割り当てられている：アルギニン (+3.
 0) ; リシン (+3.0) ; アスパラギン酸塩 (+3.0±1) ; グルタミン酸塩 (+3.
 0±1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン酸 (+0.2
) ; グリシン (0) ; トレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5±1) ; アラニン (-
 0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3
) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン
 (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; 及びトリプトファン (-3.4)。類似
 する親水値に基づいて変更を行う場合、親水値が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、
 ±1以内であるものが特に好ましく、±0.5以内であることがより一層好ましい。また
 、親水性に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープも特定しうる。これらの領域は「エ
 ピトープコア領域」とも称される。

20

30

【0074】

所望アミノ酸置換 (保存的又は非保存的) は、そのような置換を所望する時点で当業者が
 決定することができる。例えば、アミノ酸置換は、GPCRポリペプチドの重要な残基を
 特定するため、又はここで述べるGPCRポリペプチドのアフィニティーを高める又は低
 下させるために使用できる。アミノ酸置換の例を表Iに示す。

【0075】

【表1】

表 I
アミノ酸置換

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ヲロイソ	Leu
Leu	ヲロイソ, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ヲロイソ	Leu

10

20

【0076】

当業者は、周知の手法を用いて配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すポリペプチドの適切な変異体を決定することができる。生物活性を破壊することなく変化させる該分子の適切な領域を特定するには、当業者は、活性にとって重要ではないと考えられる領域を標的としうる。例えば、同じ種から又は他の種からの類似活性を有する類似ポリペプチドが既知であるとき、当業者はGPCRポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似ポリペプチドと比較しうる。そのような比較により、類似ポリペプチドの間で保存されている該分子の残基及び部分を特定することができる。そのような類似ポリペプチドに関して保存されていないGPCR分子の領域における変化は、GPCRポリペプチドの生物活性及び／又は構造に有害な影響を及ぼす可能性が低いであろうことは認識される。当業者はまた、比較的保存された領域であっても、活性を保持しながら、天然に生じる残基を化学的に類似するアミノ酸で置換しうることを理解する。それ故、生物活性にとって又は構造にとって重要であると考えられる領域でも、生物活性を破壊せずに、あるいはポリペプチド構造に有害な影響を及ぼさずに、保存的アミノ酸に置換に供することが可能である。

30

40

【0077】

さらに、当業者は、活性又は構造にとって重要な類似ポリペプチド内の残基を特定する構造-機能試験を検討することができる。そのような比較に鑑みて、類似ポリペプチド内の活性又は構造にとって重要なアミノ酸残基に対応する、GPCRポリペプチド内のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者は、GPCRポリペプチドのそのような予測上の重要アミノ酸残基を化学的に類似するアミノ酸で置換することを選択しうる。

【0078】

当業者はまた、類似ポリペプチドの構造に関して三次元構造及びアミノ酸配列を分析することができる。そのような情報を考慮して、GPCRポリペプチドのアミノ酸残基の整列

50

をその三次元構造に関して予測しうる。タンパク質の表面に存在すると予測されるアミノ酸残基は他の分子との重要な相互作用に関与すると考えられるので、当業者は、そのような残基に根本的な変化を与えないように選択することができる。さらに、当業者は、各々のアミノ酸残基に1個のアミノ酸置換基を含む試験変異体を作製することができる。前記変異体は、当業者に既知の活性検定を用いてスクリーニングすることができる。そのような変異体は、適切な変異体についての情報を収集するために使用できる。例えば、特定アミノ酸残基への変化が、活性の破壊、活性の望ましくない低下、又は不適切な活性をもたらすことが発見されれば、そのような変化を有する変異体は回避される。言い換えれば、そのような常用実験から収集される情報に基づいて、当業者は、単独で又は他の突然変異と組み合わせて、さらなる置換を回避すべきであるアミノ酸を容易に決定することができる。 10

【0079】

いくつかの学術公表文献が二次構造の予測を取り上げている。Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422-27; Chouら、1974、Biochemistry 13: 222-45; Chouら、1974、Biochemistry 113: 211-22; Chouら、1978、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-48; Chouら、1978、Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276; 及びChouら、1979、Biophys. J. 26: 367-84参照。さらに、二次構造の予測を助けるためにコンピュータプログラムが現在使用可能である。二次構造を予測する1つの方法はホモロジーモデリングに基づく。例えば、30%以上の配列類似性又は40%以上の配列類似性を有する2個のポリペプチド又はタンパク質は、しばしば類似した構造トポロジーを持つ。近年のタンパク質構造データベース(PDB)の拡大は、ポリペプチド又はタンパク質構造内の潜在的な折りたたみ数を含めて、二次構造の高い予測性を提供してきた。Holmら、1999、Nucleic Acids Res. 27: 244-47参照。所与のポリペプチド又はタンパク質内には限られた数の折りたたみが存在すること、及びひとたび決定的に重要な数の構造が解明されれば、構造予測が劇的により正確になるであろうことが示唆されてきた(Brennerら、1997、Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76)。 20

【0080】

二次構造を予測するさらなる方法は、「スレッディング法」(Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 377-87; Sipplら、1996、Structure 4: 15-19)、「プロファイル分析」(Bowieら、1991、Science, 253: 164-70; Gribskovら、1990、Methods Enzymol. 183: 146-59; Gribskovら、1987、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4355-58)、及び「進化的連鎖」(Holmら(前出)及びBrennerら、前出参照)を含む。 30

【0081】

好ましいGPCRポリペプチド変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列に比べてグリコシル化部位の数及び／又は様式が変化したグリコシル化変異体を含む。1つの実施態様では、GPCRポリペプチド変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列よりも多い又は少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合グリコシル化部位は、Asn-X-Ser又はAsn-X-Thrの配列によって特徴付けられ、前記の式中、Xで表わすアミノ酸残基はプロリン以外のいずれのアミノ酸残基であってもよい。この配列を創造するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖を付加する潜在的な新しい部位を提供する。選択的に、この配列を取り除く置換は、既存のN結合糖鎖を取り除く。また、1又はそれ以上のN結合グリコシル化部位(典型的には天然に生じるもの)を取り除き、1又はそれ以上の新しいN結合部位を創造する、N結合型糖鎖の再構成も提供される。さらなる好ましいGPCR変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかに示すアミノ酸配列に比べて 40 50

1 個又はそれ以上のシステイン残基が欠失している又はもう 1 つ別のアミノ酸（例えばセリン）で置換されているシステイン変異体を含む。システイン変異体は、不溶性封入体の単離後のように、GPCR ポリペプチドを生物活性立体構造に折りたたまなければならないときに有用である。システイン変異体は、通常天然タンパク質よりも少ないシステイン残基を持ち、通常非対合システインの相互作用を最小限にするよう、等しい数のシステイン残基を有する。

【0082】

他の実施態様では、GPCR ポリペプチド変異体は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個のアミノ酸挿入を含む配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、または配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有し、少なくとも 1 個のアミノ酸欠失を含む配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列、を含む。GPCR ポリペプチド変異体はまた、カルボキシル末端及び／又はアミノ末端トランケーションを有し、さらに配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すようなアミノ酸配列を含む。GPCR ポリペプチドさらに、1 個のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端トランケーション、又はアミノ末端トランケーションである少なくとも 1 つの修飾を含み、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すようなアミノ酸配列を含む。

10

20

【0083】

さらなる実施態様では、GPCR ポリペプチド変異体は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すようなアミノ酸配列に少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列を含む。好ましい実施態様では、GPCR ポリペプチド変異体は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すようなアミノ酸配列に少なくとも約 75 %、又は約 80 %、又は約 85 %、又は約 90 %、又は約 95、96、97、98 又は 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。GPCR ポリペプチド変異体は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有する。

【0084】

さらに、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は他の GPCR ポリペプチドは、ホモダイマーを形成するために相同ポリペプチドに、又はヘテロダイマーを形成するために異種ポリペプチドに、融合しうる。異種ポリペプチド及びポリペプチドは、GPCR 融合ポリペプチドの検出及び／又は単離を可能にするエピトープ；細胞外ドメイン又は膜貫通及び細胞内ドメインのような、膜貫通受容体タンパク質又はその部分；膜貫通受容体タンパク質に結合するリガンド又はその部分；触媒として活性である酵素；ロイシンジッパードメインのような、オリゴマー化を促進するポリペプチド又はペプチド；免疫グロブリン定常領域のような、安定性を高めるポリペプチド又はペプチド；及び配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列を含むポリペプチドとは異なる治療上の活性を有するポリペプチド、又は他の GPCR ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0085】

融合は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は他の GPCR ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端のいずれかで実施することができる。融合は、リンカー又はアダプター分子なしに直接であってもよく、あるいはリンカー又はアダプター分子を通してであってもよい。リンカー又はアダプター分子は、1 個又はそれ以上のアミノ酸残基、典型的には約 20 個から約 50 個のアミノ酸残基でありうる。リンカー又はアダプター分子はまた、DNA 制限エンドヌクレアーゼについての開裂部位又は融合分子の分離を可能にするプロテアーゼについての開裂部位を含むように設計しうる。ひとたび構築されれば、ここで述べる方法によって融合ポリペプチドを誘導体化できることは認識される。

50

【0086】

本発明のさらなる実施態様では、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は他のGPCRポリペプチドを、ヒトIgGのFc領域の1又はそれ以上のドメインに融合する。抗体は、2つの機能的に独立した部分、すなわち、抗原に結合する、「Fab」として知られる可変ドメイン、及び補体の活性化及び食細胞による攻撃などの効果器機能に関与する、「Fc」として知られる定常ドメインを含む。Fcは長い血清半減期を持ち、一方Fabは短命である。Caponら、1989、Nature 337:525-31。治療タンパク質と共に構築するとき、Fcドメインは、より長い半減期を提供するか、又はFc受容体結合、プロテインA結合、補体固定などの機能、そしておそらく胎盤移行の機能も組み込むことができる。表IIは、この分野において既知である一部のFc融合の使用を要約している。 10

【0087】

【表2】

表II

治療タンパク質とのFc融合

Fcの形態	融合パートナー	治療上の意味	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	淋巴瘤病、未分化大細胞淋巴瘤腫、T細胞白血病	米国特許第5,480,981号
マウスFcγ2a	IL-10	抗炎症、移植片拒絶反応	Zhengら、1995、J.Immunol.154:5590-600
IgG1	TNF受容体	敗血症性ショック	Fisherら、1996、N.Engl.J.Med.334:1697-1702;Van Zeeら、1996、J.Immunol.156:2221-30
IgG、IgA、IgM又はIgE(第一ドメインを除く)	TNF受容体	炎症、自己免疫疾患	米国特許第5,808,029号
IgG1	CD4受容体	AIDS	Caponら、1989、Nature 337:525-31
IgG1、IgG3	IL-2のN末端	抗癌作用、抗ウイルス作用	Harvillら、1995、Immunotech.1:95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症、骨密度	W097/23614号
IgG1	レプチンのN末端	抗肥満	1997年12月11日出願のPCT/US97/23183号
ヒトIgCγ1	CTLA-4	自己免疫疾患	Linsley、1991、J.Exp.Med.,174:561-69

【0088】

1つの例では、ヒトIgGヒンジ、CH2、及びCH3領域を、当業者に既知の方法を用いてGPCRポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端のいずれかで融合しうる。もう1つの例では、ヒトIgGヒンジ、CH2、及びCH3領域を、GPCRポリペプチドフラグメント（例えばGPCRポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端又はカルボキシル末端のいずれかで融合しうる。 40

【0089】

生じるGPCR融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムを使用して精製しうる。Fc領域に融合したペプチド及びタンパク質は、融合していない対応物よりも実質的に長いインビボ半減期を示すことが認められた。また、Fc領域への融合は融合ポリペプチドの二量体化/多量体化を可能にする。前記Fc領域は、天然に生じるFc領域であるか、又は治療品質、循環時間又は凝集低下のような、ある種の品質を改善するように 50

変化していてもよい。

【0090】

関連核酸分子及びポリペプチドの同一性及び類似性は既知の方法によって容易に算定される。そのような方法は、Computational Molecular Biology (A. M. Lesk編集、Oxford University Press 1988) ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D. W. Smith編集、Academic Press 1993) ; Computer Analysis of Sequence Data (第1部、A. M. GriffinとH. G. Griffin編集、Humana Press 1994) ; G. von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987) ; Sequence Analysis Primer (M. GribskovとJ. Devereux編集、M. Stockton Press 1991) ; 及びCarilloら、1988、SIAM J. Applied Math., 48:1073に述べられているものを含むが、これらに限定されない。

10

【0091】

同一性及び／又は類似性を決定する好ましい方法は、検討する配列の間に最大の対合を与えるように設計される。同一性及び類似性を決定する方法は、公的に使用可能なコンピュータプログラムの中に述べられている。2つの配列の間の同一性及び類似性を決定する好ましいコンピュータプログラム法は、GAP (Devereuxら、Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, ウィスコンシン州 (WI))、BLASTP、BLASTN、及びFASTA (Altschulら、1990、J. Mol. Biol. 215:403-10)を含めて、GCGプログラムパッケージを含むが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 及び他のソース (Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, メリーランド州 (MD)) ; Altschulら、1990、前出) から公的に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性を決定するために使用しうる。

20

30

【0092】

2個のアミノ酸配列を整列するための一部の整列化スキームは、この2個の配列の短い領域だけの対合をもたらすと考えられ、この小さな整列領域は、2個の完全長配列の間に有意の関係が存在しない場合でも、非常に高い配列同一性を有しうる。従って、好ましい実施態様では、選択整列化法 (GAPプログラム) は、特許請求するポリペプチドの少なくとも50個の隣接アミノ酸にわたる整列をもたらす。

【0093】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, ウィスコンシン州 (WI)) を使用して、パーセント配列同一性を決定しようとする2個のポリペプチドを、それらのそれぞれのアミノ酸が至適対合するように整列する (アルゴリズムによって決定される「対合スパン (matched span)」)。ギャップ開放ペナルティー (3X平均対角として算定される ; 「平均対角 (average diagonal)」は、使用する比較マトリックスの対角の平均である ; 「対角」は特定の比較マトリックスによって各々の完全なアミノ酸対合に割り当てられるスコア又は数である) 及びギャップ伸長ペナルティー (通常0.1Xギャップ開放ペナルティー)、ならびにPAM 250又はBLOSUM 62のような比較マトリックスをアルゴリズムと共に使用する。標準比較マトリックスもアルゴリズムによって使用される (Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺3、1978) (PAM 250比較マトリックス) ; Henikoffら、1992

40

50

、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19 (BLOSUM 62 比較マトリックス) 参照)。

【0094】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは次のものを含む：

アルゴリズム：NeedlemanとWunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53；

比較マトリックス：BLOSUM 62 (Henikoffら、前出)；

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

類似性の閾値：0

10

GAPプログラムは上記のパラメータに関して有用である。上述したパラメータは、GAPアルゴリズムを使用したポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータである（末端ギャップについてのペナルティを伴わない）。

【0095】

核酸分子の配列比較のための好ましいパラメータは次のものを含む：

アルゴリズム：NeedlemanとWunsch、前出；

比較マトリックス：対合=+10、不適正対合=0；

ギャップペナルティ：50

ギャップ長ペナルティ：3

GAPプログラムは上記のパラメータに関しても有用である。上述したパラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

20

【0096】

他の例示アルゴリズム、ギャップ開放ペナルティ、ギャップ伸長ペナルティ、比較マトリックス、及び類似性の閾値も、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, 1997年9月に示されているものを含めて、使用しうる。行うべき個々の選択は当業者には明白であり、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNAのように、実施する特定の比較、及びそれに加えて、その比較が所与の配列の対の間であるか（この場合はGAP又はBest Fitが一般に好ましい）又は1個の配列と配列の大きなデータベースとの間であるか（この場合はFASTA又はBLASTAが好ましい）に依存する。

30

【0097】

（核酸分子）

GPCRポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、化学合成、cDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリーのスクリーニング、及び／又はcDNAのPCR増幅を含むがこれらに限定されない、様々な方法で容易に入手することができる。

【0098】

ここで使用する組換えDNA法は、一般にSambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories Press, 1989) 及び／又はCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、編集、Green Publishers Inc. 及びWiley and Sons 1994) に示されているものである。本発明は、ここで述べるような核酸分子及びそのような分子を得るための方法を提供する。

40

【0099】

GPCRポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が他の種から特定された場合、その遺伝子の全部又は一部を、オーソログ又は同じ種からの関連遺伝子を特定するためのプローブとして使用しうる。前記プローブ又はプライマーは、GPCRポリペプチドを発現すると考えられる様々な組織ソースからのcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用しうる。さらに、配列番号1、配列番号3又は配列番号5のいずれかに示す

50

ような配列を有する核酸分子の部分又は全体を使用して、G P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を特定し、単離するためにゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。典型的には、スクリーニングから得られる偽陽性の数を最小限に抑えるために、スクリーニングには中又は高ストリンジェンシー条件が用いられる。

【0100】

G P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現されたタンパク質の性質に基づいた陽性クローンの検出を使用する、発現クローニングによっても特定されうる。典型的には、宿主細胞の表面で発現され、提示されるクローン化タンパク質への抗体又は他の結合パートナー（例えば受容体又はリガンド）の結合によって核酸ライブラリーをスクリーニングする。前記抗体又は結合パートナーは、所望クローンを発現する細胞を特定するために検出可能な標識で修飾する。

10

【0101】

下記で述べる説明によって実施される組換え発現手法により、これらのポリヌクレオチドを生産し、コードされたポリペプチドを発現することができる。例えば、G P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することにより、当業者は、容易に所望ヌクレオチド配列を大量に生産することができる。その後前記配列を使用して検出プローブ又は増幅プライマーを作製することができる。選択的に、G P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することができる。前記発現ベクターを適切な宿主に挿入することにより、コードされたG P C R ポリペプチドが大量に生産されうる。

20

【0102】

適切な核酸配列を得るためのもう1つの方法はポリメラーゼ連鎖反応（P C R）である。この方法では、逆転写酵素を使用してポリ（A）+ R N A 又は全 R N A から c D N A を調製する。次に、典型的にはG P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする c D N A の2つの別々の領域に相補的な、2個のプライマーをT a q ポリメラーゼのようなポリメラーゼと共に c D N A に加えると、前記ポリメラーゼが2個のプライマーの間の c D N A 領域を増幅する。

【0103】

G P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製するもう1つの手段は、E n g e l s ら、1989、A n g e w . C h e m . I n t l . E d . 28:716-34が述べられているような、当業者に周知の方法を用いる化学合成である。これらの方法は、とりわけ、核酸合成のための、ホスホトリエステル法、ホスホルアミダイト法及びH-ホスホネート法を包含する。そのような化学合成のための好ましい方法は、標準ホスホルアミダイト化学を使用するポリマー支援合成である。典型的には、G P C R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするD N A は数百ヌクレオチドの長さである。これらの方法を使用すると、約100ヌクレオチドより大きい核酸は、いくつかのフラグメントとして合成できる。その後、それらのフラグメントと一緒に連結して、G P C R 遺伝子の完全長ヌクレオチド配列を形成することができる。通常、前記ポリペプチドのアミノ末端をコードするD N A フラグメントは、メチオニン残基をコードするA T G を有する。このメチオニンは、宿主細胞において産生されるポリペプチドがその細胞から分泌されるように設計されているか否かに依存して、G P C R ポリペプチドの成熟形態に存在してもよく、又は存在しなくてもよい。当業者に既知の他の方法も同様に使用しうる。

30

40

【0104】

一部の実施態様では、核酸変異体は、所与の宿主細胞におけるG P C R ポリペプチドの至適発現のために変化したコドンを含む。個々のコドンの変化は、発現のために選択するG P C R ポリペプチドと宿主細胞に依存する。そのような「コドンの至適化」は、様々な方法によって、例えば所与の宿主細胞において高度発現される遺伝子での使用のために好ましいコドンを選択することによって、実施できる。高度発現細菌遺伝子のコドン選択のための、「E c o _ h i g h . C o d」のようなコドン出現頻度表を組み込んだコンピュータアルゴリズムが使用でき、t h e U n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n

50

Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, ウィスコンシン州 (WI)) によって提供されている。他の有用なコドン出現頻度表は、「C elegans_high.cod」、「C elegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」及び「Yeast_high.cod」を包含する。

【0105】

一部の 경우에는、GPCR 폴리펩티드 변異체를 코드하는 핵산 분자를調製することが望ましいと考えられる。변異체를 코드하는 핵산 분자는、プライマー가 所望点突然変異を有する、部位指定突然変異誘発、PCR増幅、又は他の適切な方法を使用して生産しうる（突然変異誘発手法の説明については、Sambrookら（前出）及びAusubelら、前出参照）。Engelsら（前出）が述べた方法を用いる化学合成も、そのような変異体を生産するために使用しうる。当業者に既知の他の方法も同様に使用しうる。

10

【0106】

（ベクター及び宿主細胞）

GPCR 폴리펩티드의 아미노酸配列을 코드하는 핵산 분자는、標準連結手法を用いて適切な発現ベクターに挿入される。ベクターは、典型的には使用する特定宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち遺伝子の増幅及び／又は遺伝子の発現が起こりうるように、ベクターは宿主細胞機構と適合性である）。GPCR 폴리펩티드의 아미노酸配列을 코드하는 핵산 분자는、原核生物、酵母、昆虫（バキュロウイルス系）及び／又は真核生物宿主細胞において増幅／発現されうる。宿主細胞の選択は、一部には、GPCR 폴리펩티드가翻訳後修飾（例えばグリコシル化及び／又はリン酸化）されるかどうかに依存する。翻訳後修飾される場合には、酵母、昆虫又は哺乳類宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説については、Meth. Enz., 第185巻（D. V. Goeddel編集、Academic Press 1990）参照。

20

【0107】

典型的には、前記宿主細胞のいずれかで使用する発現ベクターは、プラスミドの維持のため及び外来ヌクレオチド配列のクローニングと発現のための配列を含む。一部の実施態様では集合的に「フランキング配列」と称される、そのような配列は、典型的には次のヌクレオチド配列の1個又はそれ以上を含む：プロモーター、1個又はそれ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、スプライス供与部位及びスプライス受容部位を含む完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列을 코드하는配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現すべきポリペプチ드를 코드하는 핵산을挿入するためのポリリンカー領域、及び選択マーカーエレメント。これらの配列の各々을下記で論じる。

30

【0108】

場合によっては、前記ベクターは、「タグ」코드配列、すなわちGPCR 폴리펩티드 코드配列の5'又は3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含む；このオリゴヌクレオチド配列は、ポリHis（ヘキサHisなど）、又はFLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）のようなもう1つの「タグ」、又はそれに対する市販の抗体が存在するmyc을 코드하는。このタグは、典型的にはポリペプチ드의発現時にポリペプチ드에融合され、宿主細胞からのGPCR 폴리펩티드의アフィニティー精製の手段として使用できる。アフィニティー精製は、例えば該タグに対する抗体를アフィニティー基質として使用するカラムクロマトグラフィーによって実施できる。場合によっては、その後、開裂のためにある種のペプチダーゼを使用することなどの様々な手段によって、精製GPCR 폴리펩티드から前記タグ을除去することができる。

40

【0109】

フランキング配列は、相同（すなわち宿主細胞と同じ種及び／又は系統から）、異種（宿主細胞の種又は系統以外の種から）、ハイブリッド（すなわち2つ以上のソースからのフランキング配列の組合せ）、又は合成であってもよく、あるいはフランキング配列は、G

50

P C R ポリペプチド発現を調節するように正しく機能する天然配列であってもよい。フランキンギング配列のソースは、それ自体、フランキンギング配列がその中で機能性であること及び宿主細胞機構によって活性化されうることを条件として、いかなる原核又は真核生物、脊椎動物又は無脊椎動物、あるいは植物であってもよい。

【0110】

本発明のベクターにおいて有用なフランキンギング配列は、この分野で周知のいくつかの方法のいずれかによって入手しうる。典型的には、ここで有用な－G P C R 遺伝子フランキンギング配列以外の－フランキンギング配列は、地図作製によって及び／又は制限エンドヌクレアーゼ消化によってあらかじめ特定され、それ故、適切な制限粘度ヌクレアーゼを使用して適切な組織ソースから単離することができる。一部の場合には、フランキンギング配列の完全ヌクレオチド配列が既知でありうる。この場合には、核酸合成又はクローニングに関してこ

10

【0111】

フランキンギング配列の全部又は一部だけが既知である場合、P C R を使用して、及び／又は適切なオリゴヌクレオチド及び／又は同じか又はもう1つの宿主細胞からのフランキンギング配列フラグメントでゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、前記フランキンギング配列を入手しうる。フランキンギング配列が不明である場合は、フランキンギング配列を含むDNAのフラグメントを、例えばコード配列又はさらに別の1個又はそれ以上の遺伝子を含むDNAのより大きな断片から単離しうる。単離は、適切なDNAフラグメントを生成する制限エンドヌクレアーゼ消化、及びそれに続いて、アガロースゲル精製、Q i a g e n (登録商標) カラムクロマトグラフィー (C h a t s w o r t h, カリフォルニア州 (C A)) 又は当業者に既知の他の方法を用いた単離によって実施しうる。この目的を達成するための適切な酵素の選択は当業者には容易に明らかである。

20

【0112】

複製起点は、典型的には市販のものが購入される原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は宿主細胞におけるベクターの増幅を助ける。一定コピー数までのベクターの増幅は、一部の場合には、G P C R ポリペプチドの至適発現のための重要でありうる。選択ベクターが複製起点部位を含まない場合には、既知の配列に基づいて化学合成し、該ベクター内に連結してもよい。例えば、プラスミド p B R 3 2 2 (N e w E n g l a n d B i o l a b s, B e v e r l y, マサチューセッツ州 (M A)) からの複製起点は大部分のグラム陰性菌に適しており、様々な起点 (例えば S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (V S V)、あるいは H P V 又は B P V のようなパピローマウイルス) が哺乳類細胞におけるクローニングベクターのために有用である。一般に、複製起点成分は哺乳類発現ベクターには必要ない (例えば S V 4 0 起点は、初期プロモーターを含むというだけの理由でしばしば使用される)。

30

【0113】

転写終結配列は、典型的にはポリペプチドコード領域の末端の3'側に位置し、転写を終結させる働きをする。通常、原核細胞における転写終結配列は、ポリ-T配列がそれに続く、G-Cに富むフラグメントである。前記配列はライブラリーからクローンから容易にクローン化されるか、さらにはベクターの一部として市販のものが購入されるが、ここで述べるような核酸合成のための方法を用いて容易に合成することもできる。

40

【0114】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培地で成長する宿主細胞の生存と増殖のために必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、(a) 抗生物質又は他の毒素、例えば原核宿主細胞についてはアンピシリン、テトラサイクリン又はカナマイシン、に対する耐性を与える；(b) 細胞の栄養要求欠損を補う；又は(c) 複合培地からは得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子も原核及び真核宿主細胞における選択のために使用しうる。

50

【0115】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用しうる。増幅は、成長に不可欠なタンパク質の生産のためにより需要の大きい遺伝子が、組換え細胞の連続する世代の染色体内で縦列反復される過程である。哺乳類細胞のための適切な選択マーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）及びチミジンキナーゼを含む。哺乳類細胞形質転換体を、該形質転換体だけがベクター内に存在する選択遺伝子によって唯一生存に適應する、淘汰圧下に置く。培地中の選択剤の濃度を連続的に変化させ、それによって選択遺伝子とGPCRポリペプチドをコードするDNAの両方の増幅を導く条件下で該形質転換細胞を培養することによって、淘汰圧を課す。結果として、増幅したDNAからより高い量のGPCRポリペプチドが合成される。

10

【0116】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始のために必要であり、シャインーダルガーノ配列（原核生物）又はコザック配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、典型的にはプロモーターの3'側及び発現されるGPCRポリペプチドのコード配列の5'側に位置する。シャインーダルガーノ配列は多様であるが、典型的にはポリプリンである（すなわち高いA-G含量を有する）。多くのシャインーダルガーノ配列が特定されており、それらの各々がここで述べる方法を用いて容易に合成でき、原核生物ベクターにおいて使用できる。

【0117】

リーダー又はシグナル配列は、GPCRポリペプチドを宿主細胞から外部へと指令するために使用しうる。典型的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列をGPCR核酸分子のコード領域内に置くか、又は直接GPCRポリペプチドコード領域の5'末端に置く。多くのシグナル配列が特定されており、選択する宿主細胞において機能性であるものはいずれも、GPCR核酸分子に関連して使用しうる。それ故、シグナル配列はGPCR核酸分子に相同であるか（天然に生じる）又は異種でありうる。さらに、シグナル配列はここで述べる方法を用いて化学合成することができる。ほとんどの場合、シグナルペプチドの存在を通しての宿主細胞からのGPCRポリペプチドの分泌は、分泌されたGPCRポリペプチドからシグナルペプチドの除去をもたらす。シグナル配列はベクターの成分であってもよく、又はベクター内に挿入するGPCR核酸分子の一部であってもよい。

20

【0118】

GPCRポリペプチドコード領域に連結された天然GPCRポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列又はGPCRポリペプチドコード領域に連結された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列の使用は、本発明の範囲内に含まれる。選択する異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセッシングされるもの、すなわちシグナルペプチダーゼによって開裂されるものでなければならない。天然GPCRポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセッシングしない原核宿主細胞については、前記シグナル配列を、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ又は熱安定エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列で置換する。酵母分泌については、天然GPCRポリペプチドシグナル配列を酵母インベルターゼ、 α 因子又は酸性ホスファターゼリーダーで置換しうる。哺乳類細胞の発現においては天然シグナル配列で十分であるが、他の哺乳類シグナル配列も適する。

30

40

【0119】

真核宿主細胞発現系においてグリコシル化を所望する場合のように、一部の場合には、様々なプレ配列を、グリコシル化又は収率を改善するように操作しうる。例えば、特定シグナルペプチドのペプチダーゼ開裂部位を変化させてもよく、又は同様にグリコシル化に影響を及ぼしうるプロ配列を付加してもよい。最終タンパク質産物は、-1位に（成熟タンパク質の第一アミノ酸に対して）、完全には除去されなかったと考えられる、発現に付随する1個又はそれ以上の付加アミノ酸を有しうる。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合した、ペプチダーゼ開裂部位に認められる1個又は2個のアミノ酸残基を有しうる。選択的に、一部の酵素開裂部位の使用は、該酵素が成熟ポリペプチド内のそのよ

50

うな領域を切断する場合、わずかにランケートされた形態の所望 G P C R ポリペプチドを生じうる。

【0120】

多くの場合、核酸分子の転写はベクター内に 1 又はそれ以上のイントロンが存在することによって高められる。これは特に、ポリペプチドが真核宿主細胞、とりわけ哺乳類宿主細胞において生産される場合に当てはまる。使用するイントロンは、特に使用する遺伝子が完全長ゲノム配列又はそのフラグメントである場合に、G P C R 遺伝子内で天然に生じうる。イントロンが遺伝子内で天然に生じない場合は（大部分の c D N A の場合）、イントロンをもう 1 つ別のソースから入手しうる。イントロンは有効に転写されねばならないので、フランキング配列及び G P C R 遺伝子に対するイントロンの位置は一般に重要である。そこで、G P C R c D N A 分子が転写されるとき、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の 3' 側及びポリ-A 転写終結配列の 5' 側である。好ましくは、この 1 個又はそれ以上のイントロンは、コード配列を中断しないように c D N A の一方の側又は他方の側（すなわち 5' 又は 3'）に位置する。ウイルス、原核及び真核（植物又は動物）生物を含めて、いかなるソースからのいかなるイントロンも、それを挿入する宿主細胞と適合性であることを条件として、本発明を実施するために使用しうる。場合によっては、2 個以上のイントロンをベクターにおいて使用しうる。

10

【0121】

本発明の発現ベクター及びクローニングベクターは、典型的には、宿主生物によって認識され、G P C R ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子（一般に約 100 ~ 1000 塩基対）の転写を制御する、構造遺伝子の開始コドンの上流（すなわち 5' 側）に位置する非転写配列である。プロモーターは慣例的に 2 つのクラスのいずれかに分類される：誘導的プロモーター及び構成的プロモーター。誘導的プロモーターは、養分の存在又は不在あるいは温度変化のような、培養条件のある種の変化にตอบสนองして、それらの制御下にある D N A からの高いレベルの転写を開始させる。構成的プロモーターは、他方で、連続的な遺伝子産物の生産を開始させる；すなわち、遺伝子発現への制御はほとんどあるいは全く存在しない。様々な潜在的宿主細胞によって認識される数多くのプロモーターが広く知られている。適切なプロモーターを、そのソース D N A から制限酵素消化によって取り出し、所望プロモーター配列をベクターに挿入することによって、G P C R ポリペプチドをコードする D N A に作動可能に連結する。天然 G P C R プロモーター配列が、G P C R 核酸分子の増幅及び／又は発現を指令するために使用しうる。しかしながら、天然プロモーターに比べてより高い転写と発現タンパク質のより高い収率を得ようとする場合、及び使用のために選択した宿主細胞系と適合性である場合には、異種プロモーターが好ましい。

20

30

【0122】

原核生物宿主に関する使用に適したプロモーターは、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（t r p）プロモーター系；及び t a c プロモーターのようなハイブリッドプロモーターを包含する。他の既知の細菌プロモーターも適する。それらの配列は公開されており、当業者は、有用な制限部位を与えるために必要に応じてリンカー又はアダプターを使用して、それらを所望 D N A 配列に連結することができる。

40

【0123】

酵母宿主に関する使用に適したプロモーターもこの分野において周知である。酵母エンハンサーは酵母プロモーターと共に好都合に使用される。哺乳類宿主細胞に関する使用に適したプロモーターは周知であり、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス 2 など）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、及び最も好ましくはシミアンウイルス 40（S V 40）のようなウイルスのゲノムから得られるものを含むが、これらに限定されない。他の適切な哺乳類プロモーターは、異種哺乳類プロモーター、例えば熱ショックプロモーター及びアクチンプロモーターを包含する。

50

【0124】

GPCR遺伝子発現を制御する上で興味深いと考えられるさらなるプロモーターは、次のものを含むが、これらに限定されない：SV40初期プロモーター領域（BernoisとChambon、1981、Nature 290：304-10）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'ロングターミナルリピートに含まれるプロモーター（Yamamotoら、1980、Cell 22：787-97）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78：1444-45）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら、1982、Nature 296：39-42）； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Kamaroffら、1978、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75：3727-31）；又はtacプロモーター（DeBoerら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80：21-25）。組織特異性を示し、トランスジェニック動物において使用されてきた、次のような動物転写制御領域も興味深い：膵腺房細胞において活性なエラスターゼII遺伝子制御領域（Swiftら、1984、Cell 38：639-46；Ornitzら、1986、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50：399-409（1986）；MacDonald、1987、Hepatology 7：425-515）；膵 β 細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahan、1985、Nature 315：115-22）；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedlら、1984、Cell 38：647-58；Adamesら、1985、Nature 318：533-38；Alexanderら、1987、Mol. Cell. Biol. 7：1436-44）；精巣、乳房、リンパ系細胞及びマスト細胞において活性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域（Lederら、1986、Cell 45：485-95）；肝において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkertら、1987、Genes and Devel. 1：268-76）；肝において活性な α フェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlaufら、1985、Mol. Cell. Biol. 5：1639-48；Hammerら、1987、Science 235：53-58）；肝において活性な α 1アンチトリプシン遺伝子制御領域（Kelseyら、1987、Genes and Devel. 1：161-71）；骨髄性細胞において活性な β グロビン遺伝子制御領域（Mogramら、1985、Nature 315：338-40；Kolliasら、1986、Cell 46：89-94）；脳内の乏突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readheadら、1987、Cell 48：703-12）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域（Sani、1985、Nature 314：283-86）；及び視床下部において活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域（Masonら、1986、Science 234：1372-78）。

【0125】

高等真核生物による、本発明のGPCRポリペプチドをコードするDNAの転写を高めるために、エンハンサー配列をベクターに挿入してもよい。エンハンサーは、転写を高めるようにプロモーターに作用する、通常約10～300塩基対の長さの、DNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは比較的方向や位置に無関係である。それらは転写単位の5'側及び3'側で認められている。哺乳類遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が知られている（例えばグロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α フェトプロテイン及びインスリン）。典型的には、しかしながら、ウイルスからのエンハンサーが使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが、真核生物プロモーターの活性化のための例示的なエンハンサーエレメントである。エンハンサーはGPCR核酸分子の5'側又は3'側でベクターにスプライシングされうるが、典型的にはプロモーターから5'側の部位に位置する。

【0126】

本発明の発現ベクターは、市販されているベクターのような出発ベクターから構築しうる。そのようなベクターは、所望フランキンク配列の全部を含んでいてもよく、又は全部は含んでいなくてもよい。ここで述べるフランキンク配列の1個又はそれ以上が既にベクター内に存在していない場合、それらをここに入手して、ベクターに連結しうる。各々のフランキンク配列を得るために使用する方法は、当業者には周知である。

【0127】

本発明を実施するための好ましいベクターは、細菌、昆虫及び哺乳類宿主細胞と適合性であるベクターである。そのようなベクターは、とりわけ特に、pCRII、pCR3及びpCDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, カリフォルニア州 (CA))、pBSII (Stratagene, La Jolla, カリフォルニア州 (CA))、pET15 (Novagen, Madison, ウィスコンシン州 (WI))、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, ニュージャージー州 (NJ))、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, カリフォルニア州 (CA))、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- α (国際公開公報第WO90/14363号) 及びpFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, ニューヨーク州 (NY)) を包含する。

【0128】

さらなる適切なベクターは、コスミド、プラスミド又は改変ウイルスを含むが、これらに限定されず、但し、ベクター系が選択宿主細胞と適合性でなければならないことは認識される。そのようなベクターは、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高いコピー数のColE1ベースのファージミド; Stratagene Cloning Systems, La Jolla, カリフォルニア州 (CA))、Taq増幅したPCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えばTOPO (商標) TA Cloning (登録商標) キット及びPCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体; Invitrogen) のようなプラスミド、及びバキュロウイルス発現系 (pBacPAKプラスミド誘導体; Clontech) のような哺乳類、酵母又はウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。

【0129】

ベクターを構築し、GPCRポリペプチドをコードする核酸分子をベクターの適切な部位に挿入した後、完成したベクターを増幅及び／又はポリペプチド発現のために適切な宿主細胞に挿入しうる。GPCRポリペプチドについての発現ベクターの選択宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム法、電気穿孔法、微量注入法、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、又は他の既知の手法を含めて、周知の方法によって実施しうる。選択する方法は、一部には使用する宿主細胞の種類に依存する。これらの方法や他の適切な方法は当業者に周知であり、例えばSambrookら (前出) の中に示されている。

【0130】

宿主細胞は、原核宿主細胞 (大腸菌など) 又は真核宿主細胞 (酵母、昆虫又は脊椎動物細胞など) のいずれでもよい。宿主細胞は、適切な条件下で培養したとき、GPCRポリペプチドを合成し、その後それを培地から収集するか (宿主細胞がGPCRポリペプチドを培地中に分泌する場合) 又はGPCRポリペプチドを産生する宿主細胞から直接採集する (GPCRポリペプチドが分泌されない場合) ことができる。適切な宿主細胞の選択は、所望発現レベル、活性のために望ましい又は必要なポリペプチド修飾 (グリコシル化又はリン酸化など) 及び生物活性物質への折りたたみの容易さのような、様々な因子に依存する。

【0131】

いくつもの適切な宿主細胞がこの分野で知られており、多くはthe American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, , バージニア州 (VA) から入手しうる。それらの例は、チャイニーズハムスター卵巣細

10

20

30

40

50

胞 (CHO)、CHO DHFR (-) 細胞 (Urlaubら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:4216-20)、ヒト胚腎 (HEK) 293 又は 293 T 細胞、あるいは 3T3 細胞を含むが、これらに限定されない。適切な哺乳類宿主細胞の選択、及び形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生産及び精製のための方法はこの分野において既知である。他の適切な哺乳類細胞系は、サル COS-1 及び COS-7 細胞系、及び CV-1 細胞系である。さらなる例としての哺乳類宿主細胞は、形質転換細胞系を含めて、霊長類細胞系及びげっ歯類細胞系を含む。正常二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養から誘導される細胞株ならびに一次外植片も適する。候補細胞は、選択遺伝子において遺伝子型的に欠損していてもよく、又は優性作用性選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳類細胞系は、マウス神経芽細胞種 N2A 細胞、HeLa、マウス L-929 細胞、Swiss、Balb-c 又は NIH マウスから誘導される 3T3 系統、BHK 又は HaK ハムスター細胞系統を含むが、これらに限定されない。これらの細胞系は各々、タンパク質発現の分野の当業者には既知であり、入手可能である。

10

【0132】

本発明に適した宿主細胞として同様に有用であるのは細菌細胞である。例えば、大腸菌 (E. coli) の様々な菌株 (例えば HB101、DH5α、DH10 及び MC1061) がバイオテクノロジーの分野における宿主細胞として周知である。枯草菌 (B. subtilis)、Pseudomonas spp.、他の Bacillus spp.、Streptomyces spp. などこの方法において使用しうる。

20

【0133】

当業者に既知の多くの菌株の酵母細胞も、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として入手可能である。好ましい酵母細胞は、例えば Saccharomyces cerevisiae 及び Pichia pastoris を包含する。

【0134】

さらに、所望する場合は、昆虫細胞系が本発明の方法において使用しうる。そのような系は、例えば、Kittsら、1993、Biotechniques, 14:810-17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-72; 及び Lucklowら、1993、J. Virol., 67:4566-79 に述べられている。好ましい昆虫細胞は Sf-9 及び Hi5 (Invitrogen) である。

30

【0135】

グリコシル化 GPCR ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物も使用しうる。例えば、トランスジェニック乳生産動物 (例えば雌牛又はヤギ) を使用して、動物の乳において本発明のグリコシル化ポリペプチドを得ることができる。また、GPCR ポリペプチドを生産するために植物も使用しうるが、一般に、植物で起こるグリコシル化は哺乳類細胞で生じるものとは異なっており、ヒト治療用途には適さないグリコシル化生成物を生じうる。

【0136】

(ポリペプチドの生産)

40

GPCR ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準培地を使用して培養しうる。前記培地は通常、細胞の発育と生存に必要なすべての栄養素を含む。大腸菌細胞を培養するための適切な培地は、例えば LB 肉汁 (LB) 及び/又は テリフィック肉汁 (TB) を包含する。真核細胞を培養するための適切な培地は、Roswell Park Memorial Institute 培地 1640 (RPMI 1640)、最小必須培地 (MEM) 及び/又はダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を包含し、それらはすべて、培養する個々の細胞系の必要に応じて血清及び/又は成長因子を補足しうる。昆虫細胞についての適切な培地は、必要に応じてイーストレート、ラクトアルブミン加水分解産物及び/又はウシ胎仔血清を補足したグレース培地である。

【0137】

50

典型的には、トランスフェクトした細胞又は形質転換細胞の選択的増殖に有用な抗生物質又は他の化合物を補足物として培地に加える。使用すべき化合物は、それによって宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントによって決定される。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合には、培地に加える化合物はカナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物は、アンピシリン、テトラサイクリン及びネオマイシンを包含する。

【0138】

宿主細胞によって生産されるGPCRポリペプチドの量は、この分野において既知の標準的方法によって評価することができる。そのような方法は、限定を伴わずに、ウエスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分離、免疫沈降法、及び／又はDNA結合ゲルシフト分析のような活性検定法を包含する。

10

【0139】

GPCRポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計されている場合、大部分のポリペプチドは細胞培地中に認められうる。しかし、GPCRポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合には、該ポリペプチドは細胞質及び／又は核内（真核宿主細胞の場合）又はサイトゾル内（グラム陰性菌宿主細胞の場合）に存在する。

【0140】

宿主細胞の細胞質及び／又は核内（真核宿主細胞の場合）又はサイトゾル内（細菌宿主細胞の場合）に存在するGPCRポリペプチドについては、当業者に既知の何らかの標準手法を用いて細胞内物質（グラム陰性菌についての封入体を含む）を宿主細胞から抽出することができる。例えば、フレンチプレス、均質化、及び／又は音波処理とそれに続く遠心分離によって宿主細胞を溶解し、ペリプラズム及び／又は細胞質の内容物を放出させることができる。

20

【0141】

GPCRポリペプチドがサイトゾル内で封入体を形成した場合、その封入体はしばしば細胞内膜及び／又は細胞外膜に結合することができ、それ故、主として遠心分離後のペレット物質中で認められる。このペレット物質を、その後、極値pHで処理するか、あるいはアルカリ性pHでのジチオトレイトール又は酸性pHでのトリスカルボキシエチルホスフィンのような還元剤の存在下に、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素又は尿素誘導体のようなカオトロピック試薬で処理して、封入体を放出させ、破壊分離して、可溶化することができる。次にこの可溶化したGPCRポリペプチドを、ゲル電気泳動、免疫沈降法などを用いて分析することができる。GPCRポリペプチドを単離することを所望する場合は、ここで述べる方法やMarstonら、1990、Meth. Enz.、182:264-75に述べられている方法のような標準的方法を用いて単離しうる。

30

【0142】

一部の場合には、単離した時にGPCRポリペプチドが生物活性でないことがある。ポリペプチドをその三次構造へと「リフォールディング」する又は転換するため、及びジスルフィド結合を生成するための様々な方法が、生物活性を回復するために使用できる。そのような方法は、前記可溶化ポリペプチドを、一定濃度のカオトロピック試薬の存在下で通常は7を超えるpHに接触させることを含む。このカオトロピック試薬の選択は、封入体可溶化のために使用する選択試薬と非常に類似するが、通常このカオトロピック試薬はより低い濃度で使用され、可溶化に使用するカオトロピック試薬と必ずしも同じではない。ほとんどの場合、リフォールディング／酸化溶液はまた、還元剤、あるいはタンパク質のシステイン架橋の形成において起こるジスルフィド交換を可能にする特定のレドックス潜在能を生じさせるような特定比率で還元剤プラスその酸化形態を含む。一般的に使用されるレドックス対の一部は、システイン／シスタミン、グルタチオン（GSH）／ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトール（DTT）／ジチアンDTT、及び2-2-メルカプトエタノール（bME）／ジチオ-b（ME）を含む。多くの場合、共溶媒を使用しうるか、又はリフォールディングの効率を高めるために必要であると考えられ、この

40

50

ために使用されるより一般的な試薬は、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどを包含する。

【0143】

GPCRポリペプチドの発現時に封入体が有意の度合で形成されない場合には、このポリペプチドは、細胞ホモジネートの遠心分離後主として上清中に認められる。ここで述べるような方法を用いて前記ポリペプチドを上清からさらに単離しうる。

【0144】

溶液からのGPCRポリペプチドの精製は様々な手法を用いて実施することができる。前記ポリペプチドが、そのカルボキシル末端又はアミノ末端のいずれかにヘキサヒスチジン（GPCRポリペプチド／ヘキサHis）又はFLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, コネチカット（CT））のような他の低分子量ペプチド又はmyc（Invitrogen）などのタグを含むように合成されている場合は、該溶液を、カラムマトリックスが前記タグに高いアフィニティーを持つアフィニティークラムを通すことによる1段階工程で精製しうる。

10

【0145】

例えば、ポリヒスチジンは高いアフィニティーと特異性でニッケルに結合する。それ故、GPCRポリペプチド／ポリHisの精製にはニッケルのアフィニティークラム（Qiagen（登録商標）ニッケルカラムなど）が使用できる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology §10.11.8（Ausubelら、編集、Green Publishers Inc. 及びWiley and Sons 1993）参照。

20

【0146】

さらに、GPCRポリペプチドは、GPCRポリペプチドを特異的に認識し、結合することができるモノクローナル抗体の使用を通して精製することができる。

【0147】

精製のための他の適切な方法は、限定を伴わずに、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動（天然ゲル電気泳動を含む）とそれに続くゲル溶出、及び分取等電点電気泳動（「IsoPrime」機器／手法、Hoefler Scientific, San Francisco, カリフォルニア州（CA））を包含する。一部の 경우에는、2又はそれ以上の精製手法を組み合わせて高い純度を達成してもよい。

30

【0148】

GPCRポリペプチドはまた、Merrifieldら、1963、J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら、1985、Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; 及びStewartとYoung, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 1984) に示されているようなこの分野で既知の手法を用いた化学合成法（固相ペプチド合成など）によっても調製しうる。そのようなポリペプチドは、アミノ末端上のメチオニンと共に又はメチオニンなしで合成しうる。化学合成したGPCRポリペプチドは、ジスルフィド架橋を形成するためにこれらの参考文献で述べられている方法を用いて酸化しうる。化学合成GPCRポリペプチドは、組換えによって生産された又は天然ソースから精製された対応するGPCRポリペプチドと同等の生物活性を有すると期待され、それ故組換え又は天然GPCRポリペプチドと交換可能に使用しうる。

40

【0149】

GPCRポリペプチドを得るもう1つの手段は、GPCRポリペプチドが天然に認められるソース組織及び／又は流体のような生物学的試料からの精製によるものである。そのような精製は、ここで述べるようなタンパク質精製のための方法を用いて実施できる。精製の間のGPCRポリペプチドの存在は、例えば、組換え生産したGPCRポリペプチド又はそのペプチドフラグメントに対して作製した抗体を用いて監視しうる。

50

【0150】

核酸及びポリペプチドを生産するための多くの付加的な方法がこの分野において既知であり、これらの方法を使用してGPCRポリペプチドに特異性を有するポリペプチドを生産することができる。例えば、mRNAとそのコードするペプチドの間の融合タンパク質の生産を述べた、Robertsら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:12297-303参照。また、Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73も参照のこと。加えて、米国特許第5,824,469号は、特定生物機能を実施することができるオリゴヌクレオチドを得るための方法を述べている。この方法は、各々が5'ランダム配列、中央の事前選択配列及び3'ランダム配列を有する、オリゴヌクレオチドの不均一なプールを生成することを含む。生じた不均一プールを、所望生物機能を示さない細胞個体群に導入する。次に細胞のサブ個体群を、あらかじめ定められた生物機能を示すものに関してスクリーニングする。そのサブ個体群から、所望生物機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを単離する。

10

【0151】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；及び同第5,817,483号は、ペプチド又はポリペプチドを生産するための方法を述べている。これは、確率的遺伝子又はそのフラグメントを生産すること、そしてこれらの遺伝子を、確率的遺伝子によってコードされる1又はそれ以上のタンパク質を産生する宿主細胞に導入することによって実施される。次に前記宿主細胞をスクリーニングして、所望活性を有するペプチド又はポリペプチドを生産するクローンを特定する。

20

【0152】

ペプチド又はポリペプチドを生産するもう1つの方法は、Athersys, Inc. によって出願された国際公開公報第WO99/15650号に述べられている。「遺伝子発見のための遺伝子発現のランダム活性化(Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery)」(RAGE-GD)として知られるこの方法は、インサイチュー組換え法による内在性遺伝子発現の活性化又は遺伝子の過剰発現を含む。例えば、非相同的又は非正統的組換えにより、遺伝子の発現を活性化することができる調節配列を標的細胞に組み込むことによって内在性遺伝子の発現を活性化する又は上昇させる。標的DNAをまず放射線に供して、遺伝子プロモーターを挿入する。このプロモーターは最終的には遺伝子の前方の切断点に位置し、害遺伝子の転写を開始させる。これは所望ペプチド又はポリペプチドの発現をもたらす。

30

【0153】

これらの方法はまた、包括的GPCRポリペプチド発現ライブラリーを創造するためにも使用でき、このライブラリーはその後、生化学的アッセイ、細胞アッセイ、及び全生物アッセイ(例えば植物、マウスなど)のような様々なアッセイにおいて高流量表現型スクリーニングのために使用できることは認識される。

【0154】

(合成)

ここで述べる核酸及びポリペプチド分子が組換え法及び他の手段によって生産しうることは、当業者に認識される。

40

【0155】

(選択的結合物質)

「選択的結合物質」の語は、1個又はそれ以上のGPCRポリペプチドに特異性を有する分子を表わす。適切な選択的結合物質は、抗体及びその誘導体、ポリペプチド、及び小分子を含むが、これらに限定されない。適切な選択的結合物質はこの分野で既知の方法を用いて調製しうる。本発明の例示的GPCRポリペプチド選択的結合物質は、GPCRポリペプチドの一定の部分に結合し、それによって該ポリヌクレオチドがGPCRポリペプチド受容体に結合するのを阻害することができる。

【0156】

50

GPCRポリペプチドに結合する抗体及び抗体フラグメントのような選択的結合物質は、本発明の範囲内に包含される。該抗体は、単一特異性ポリクローナル、モノクローナル(MABs)、組換え、キメラ、相補性決定領域(CDR)移植のようなヒト化、ヒト、鎖鎖、及び／又は二重特異性、を含むポリクローナル、ならびにそのフラグメント、変異体又は誘導体でありうる。抗体フラグメントは、GPCRポリペプチド上のエピトープに結合する該抗体の部分を含む。そのようなフラグメントの例は、完全長抗体の酵素的開裂によって生成されるFab及びF(ab)'フラグメントを包含する。他の結合フラグメントは、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現のような、組換えDNA手法によって生成されるものを含む。

【0157】

10

GPCRポリペプチドに対するポリクローナルは抗体、一般に、GPCRポリペプチドとアジュバントの多回皮下注射又は腹腔内注射により動物(例えばウサギ又はマウス)において作製される。キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシチログロブリン又はダイズトリプシン阻害因子のような、免疫される宿主細胞において免疫原性である輸送タンパク質にGPCRポリペプチドを複合することは有用である。また、ミョウバンのような凝集物質も、免疫応答を増強するために使用される。免疫後、前記動物から採血し、その血清を抗GPCR抗体力価に関して検定する。

【0158】

20

GPCRポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養中の連続細胞系統による抗体分子の産生を提供する何らかの方法を用いて作製される。モノクローナル抗体を作製するための適切な方法の例は、Kohlerら、1975、Nature 256:495-97のハイブリドーマ法及びヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor, 1984、J. Immunol. 133:3001; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)を包含する。また、GPCRポリペプチドと反応性であるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系統も本発明によって提供される。

【0159】

30

本発明のモノクローナル抗体は、治療薬としての使用のために改変しうる。1つの実施態様は、重(H)及び／又は軽(L)鎖の一部が、特定種から誘導される又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体における対応配列と同一又は相同であり、前記鎖の残りの部分は、もう1つ別の種から誘導される又はもう1つ別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体内の対応配列と同一又は相同である、「キメラ」抗体である。また、そのような抗体のフラグメントも、それらが所望生物活性を示す限り、包含される。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55参照。

【0160】

40

もう1つの実施態様では、本発明のモノクローナル抗体は「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法はこの分野において周知である。米国特許第5,585,089号及び同第5,693,762号参照。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外のソースからその中に導入された1個又はそれ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、ヒト抗体の対応領域をげっ歯類の相補性決定領域の少なくとも一部で置き換えることにより、この分野で記述されている方法を用いて(Jonesら、1986、Nature 321:522-25; Riechmannら、1998、Nature 332:323-27; Veyhoeyenら、1988、Science 239:1534-36)実施することができる。

【0161】

GPCRポリペプチドに結合するヒト抗体も本発明に包含される。内在性免疫グロブリンの不在下でヒト抗体の集成を生産することができるトランスジェニック動物(例えばマウス)を使用して、場合によっては担体に複合した、GPCRポリペプチド抗原(すなわち

50

少なくとも6個の隣接アミノ酸を有する)で免疫することによってそのような抗体を作製する。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-58; Bruggemannら、1993、Year in Immunol. 7:33参照。1つの方法では、そのようなトランスジェニック動物は、その内部の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖をコードする内在性遺伝子座を無効にし、ヒト重鎖及び軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって作製する。次に、部分的に改変された動物(すなわち完全な改変未満を有するもの)を交雑して、すべての所望免疫系改変を有する動物を得る。免疫原を投与したとき、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に免疫特異的な可変領域を含む、ヒト(例えばマウスではなく) 10 アミノ酸配列を有する抗体を産生する。国際特許願第PCT/US96/05928号及び同第PCT/US93/06926号参照。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、国際特許願第PCT/US91/245号及び同第PCT/GB89/01207号、及び欧州特許第546073B1号及び同第546073A1号に述べられている。ヒト抗体はまた、宿主細胞における組換えDNAの発現によって又はここで述べるようなハイブリドーマ細胞における発現によって作製することができる。

【0162】

選択的实施態様では、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから生産することもできる(Hoogenboomら、1991、J. Mol. Biol. 227:381; Marksら、1991、J. Mol. Biol. 222:581)。これらの方法 20 は、糸状バクテリオファージの表面に抗体リストを提示し、その後選択抗原へのそれらの結合によってファージを選択することを通して、免疫選択を模倣する。そのような手法の1つは国際特許願第PCT/US98/17364号に述べられており、これは、そのようなアプローチを使用したMPL受容体及びmsk受容体についての高親和性及び機能性アゴニスト抗体の単離を説明している。

【0163】

キメラ、CDR移植及びヒト化抗体は、典型的には組換え法によって作製される。ここで述べる材料及び方法を使用して、前記抗体をコードする核酸を宿主細胞に導入し、発現させる。好ましい実施態様では、CHO細胞のような哺乳類宿主細胞において前記抗体を作製する。モノクローナル(例えばヒト)抗体は、宿主細胞における組換えDNA発現によ 30 って又はここで述べるようなハイブリドーマ細胞における発現によって生成されうる。

【0164】

本発明の抗GPCR抗体は、GPCRポリペプチドの検出と定量のための競合結合測定法、直接及び間接サンドイッチ測定法、及び免疫沈降測定法(Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)のような既知の検定法において使用しうる。前記抗体は、用いる検定法にとって適切な親和性でGPCRポリペプチドに結合する。

【0165】

診断適用のために、一部の实施態様では、抗GPCR抗体を検出可能な成分で標識しうる 40 。検出可能成分は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを生じることができるものでありうる。例えば、検出可能成分は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I、⁹⁹Tc、¹¹¹In又は⁶⁷Gaのような放射性同位体;フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリンのような蛍光又は化学発光化合物;アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ又はホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素(Bayerら、1990、Meth. Enz. 184:138-63)でありうる。

【0166】

競合結合測定法は、限られた量の抗GPCR抗体との結合に関して被験試料分析物(GPCRポリペプチド)と競合する標識標準品(例えばGPCRポリペプチド又はその免疫反応性部分)の能力に基づく。被験試料中のGPCRポリペプチドの量は、前記抗体に結合 50

する標準品の量に逆比例する。結合する標準品の量の測定を容易にするために、前記抗体は典型的には競合の前又は後に不溶化されるので、該抗体に結合している標準品と分析物は、結合しないままの標準品及び分析物とは好都合に分離されうる。

【0167】

サンドイッチ測定法は、典型的には2個の抗体の使用を含み、それらの抗体の各々は、検出する及び／又は定量するタンパク質の異なる免疫原性部分又はエピトープに結合することができる。サンドイッチ測定法では、被験試料分析物は、典型的には保持体に固定された第一抗体によって結合され、その後第二抗体が分析物に結合して、不溶性の3つの部分から成る複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号参照。前記第二抗体は、それ自体が検出可能成分で標識されていてもよく（直接サンドイッチ測定法）又は検出可能成分で標識した抗免疫グロブリン抗体を使用して測定してもよい（間接サンドイッチ測定法）。例えば、サンドイッチ測定法の1つのタイプは酵素結合イムノソルベント測定法（ELISA）であり、この場合検出可能成分は酵素である。

10

【0168】

抗GPCR抗体を含む選択的結合物質はまた、インビボ画像化においても有用である。検出可能成分で標識した抗体を動物に、好ましくは血流中に投与し、検定する宿主において前記標識抗体の存在と位置を測定する。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、又はこの分野で既知の他の検出手段により、動物において検出可能ないかなる成分で標識されていてもよい。

【0169】

抗体を含む、本発明の選択的結合物質は、治療薬として使用しうる。これらの治療薬は一般に、それぞれGPCRポリペプチドの生物活性の少なくとも1つを増強する又は低減するので、アゴニスト又はアンタゴニストである。1つの実施態様では、本発明のアンタゴニスト抗体は、インビボ又はインビトロで、GPCRポリペプチドに特異的に結合することができ、GPCRポリペプチドの機能的活性を阻害する又は排除することができる抗体又はその結合フラグメントである。好ましい実施態様では、選択的結合物質、例えばアンタゴニスト抗体は、GPCRポリペプチドの機能的活性を少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約80%阻害する。もう1つの実施態様では、選択的結合物質は、インビトロ又はインビボで、GPCRポリペプチド結合パートナー（リガンド又は受容体）と相互作用し、それによってGPCRポリペプチドの活性を阻害する又は排除することができる、抗GPCRポリペプチド抗体でありうる。アゴニスト及びアンタゴニスト抗GPCRポリペプチド抗体を含めて、選択的結合物質は、この分野において周知のスクリーニングアッセイによって特定される。

20

30

【0170】

本発明はまた、GPCR選択的結合物質（抗体など）及び生物学的試料においてGPCRポリペプチドレベルを検出するために有用な他の試薬を含むキットに関する。そのような試薬は、検出可能標識、遮断血清、陽性及び陰性対照試料、及び検出試薬を含みうる。

【0171】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイテクノロジーが本発明によって利用できることは認識される。DNAマイクロアレイは、ガラスのような保持体上に配置された核酸の微小で高密度のアレイである。アレイ内の各々の細胞又はエレメントは、相補的核酸配列（例えばmRNA）とのハイブリダイゼーションの標的として働く、単一核酸種の数多くのコピーを含む。DNAマイクロアレイテクノロジーを用いた発現プロファイルの作成では、まずmRNAを細胞又は組織標本から抽出し、次に酵素的に蛍光標識cDNAに転換する。この物質をマイクロアレイにハイブリダイズさせ、非結合cDNAを洗浄して除去する。その後、アレイ上に示された個々の遺伝子の発現を、各々の標的核酸分子に特異結合している標識cDNAの量を測定することによって視覚化する。このようにして、数千個の遺伝子の発現を、生物学的物質の単一試料から平行して、高スループットで定量することができる。

40

【0172】

50

この高スループット発現プロファイル作成は、次のものを含むがこれらに限定されない、本発明の G P C R 分子に関する幅広い適用を有する：治療薬のための標的としての G P C R 疾患関連遺伝子の特定と確認；関連 G P C R 分子及びその阻害因子の分子毒性；臨床試験のための個体群の層別と代理マーカーの生成；及び高スループットスクリーニングにおいて選択化合物の特定を助けることによる、関連 G P C R ポリペプチド小分子薬剤開発の促進。

【0173】

(化学的誘導体)

G P C R ポリペプチドの化学修飾誘導体は、ここで述べる開示に従い、当業者によって調製されうる。G P C R ポリペプチド誘導体は、該ポリペプチドに天然結合している分子の種類又は位置のいずれかに関して、異なるように修飾される。誘導体は、1個又はそれ以上の天然結合化学基の欠失によって形成される分子を包含しうる。配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、又は他の G P C R ポリペプチドは、1個又はそれ以上のポリマーの共有結合によって修飾しうる。例えば、選択するポリマーは典型的には水溶性であるので、それが結合するタンパク質は、生理的環境のような水性環境では沈降しない。ポリマーの混合物は適切なポリマーの範囲内に包含される。好ましくは、最終産物製剤の治療用途のために、前記ポリマーは治療上許容される。

10

【0174】

各々のポリマーはいかなる分子量であってもよく、分枝又は非分枝のいずれでもよい。各々のポリマーは、典型的には約2 k D aから約100 k D aまで（「約」の語は、水溶性ポリマーの製剤中、いくつかの分子が言明される分子量より大きい又は小さいことを示す）の平均分子量を有する。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは約5 k D aから約50 k D aまで、より好ましくは約12 k D aから約40 k D aまで、最も好ましくは約20 k D aから約35 k D aまでである。

20

【0175】

適切なポリマー又はその混合物は、N結合又はO結合糖質、糖類、リン酸塩、ポリエチレングリコール（P E G）（モノー（C₁～C₁₀））、アルコキシ又はアリアルオキシポリエチレングリコールを含めて、タンパク質を誘導体化するために使用されてきたP E Gの形態を含む）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン（例えば約6 k D aの低分子量デキストランなど）、セルロース、又は他の糖質ベースのポリマー、ポリー（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオル（例えばグリセロール）、及びポリビニルアルコールを含むが、これらに限定されない。また、共有結合G P C R ポリペプチド多量体を調製するために使用しうる二官能性架橋分子も本発明に包含される。

30

【0176】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用する適切な条件下で実施しうる。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に次の段階を含む：（a）配列番号2、配列番号4又は配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド又は他の G P C R ポリペプチドが、1個又はそれ以上のポリマー分子に結合する条件下で、該ポリペプチドを該活性化ポリマー分子（該ポリマー分子の反応性エステル又はアルデヒド誘導体など）と反応させること、及び（b）反応産物を得ること。至適反応条件は、既知のパラメータと所望する結果に基づいて決定できる。例えば、タンパク質に対するポリマー分子の比率が大きいほど、結合するポリマー分子のパーセンテージは高くなる。1つの実施態様では、G P C R ポリペプチド誘導体はアミノ末端に単一ポリマー分子部分を有しうる。例えば米国特許第5, 234, 784号参照。

40

【0177】

ポリペプチドのP E G化は、この分野において既知のP E G化反応のいずれかを用いて特異的に実施しうる。そのような反応は、例えば、次の参考文献中に述べられている：F r

50

ancisら、1992、Focus on Growth Factors 3: 4-10; 欧州特許第0154316号及び同第0401384号、; 及び米国特許第4, 179, 337号。例えば、PEG化は、ここで述べるような反応性ポリエチレングリコール分子（又は類似反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応又はアルキル化反応を通して実施しうる。アシル化反応については、選択するポリマーは単一反応エステル基を有していなければならない。還元的アルキル化については、選択ポリマーは単一反応性アルデヒド基を有していなければならない。反応性アルデヒドは、例えば、水安定なポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド又はそのモノC₁~C₁₀アルコキシ又はアリールオキシ誘導体である（米国特許第5, 252, 714号参照）。

【0178】

もう1つの実施態様では、GPCRポリペプチドはビオチンに化学結合しうる。次にこのビオチン/GPCRポリペプチド分子をアビジンと結合させて、四価のアビジン/ビオチン/GPCRポリペプチド分子を生じさせる。また、GPCRポリペプチドをジニトロフェノール（DNP）又はトリニトロフェノール（TNP）と共有結合させ、生じた複合体を抗DNP又は抗TNP-IgMで沈殿させて、10の原子価を有するデカマー複合体を生成しうる。

【0179】

一般に、本発明のGPCRポリペプチド誘導体の投与によって軽減されうる又は調節されうる条件は、GPCRポリペプチドに関してここで述べたものを包含する。しかし、ここで開示するGPCRポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較して、付加的な活性、高い又は低い生物活性、あるいは長い又は短い半減期のような他の特徴を有しうる。

【0180】

（遺伝子操作非ヒト動物）

さらに、GPCRポリペプチドの発現レベルが有意に低下する又は発現が完全に排除されるように、天然GPCRポリペプチドをコードする遺伝子が破壊された（すなわち「ノックアウトされた」）、マウス、ラット又は他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ又は他の家畜のような非ヒト動物は、本発明の範囲内に包含される。そのような動物は、米国特許第5, 557, 032号に述べられているような手法及び方法を用いて作製しうる。

【0181】

本発明はさらに、その動物についてのGPCR遺伝子又は異種GPCR遺伝子とその動物によって過剰発現され、それによって「トランスジェニック」動物が創造される、マウス、ラット又は他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ又は他の家畜のような非ヒト動物を包含する。そのようなトランスジェニック動物は、米国特許第5, 489, 743号及び国際公開公報第WO94/28122号に述べられているような周知の方法を用いて作製しうる。

【0182】

本発明はさらに、本発明のGPCRポリペプチドの1個又はそれ以上についてのプロモーターが、天然GPCRポリペプチドの1個又はそれ以上の発現レベルを変化させるように活性化されている又は不活性化されている（例えば相同的組換え法によって）、非ヒト動物を包含する。

【0183】

これらの非ヒト動物は薬剤候補物スクリーニングのために使用しうる。そのようなスクリーニングでは、前記動物への薬剤候補物の影響を測定しうる。例えば、薬剤候補物はGPCR遺伝子の発現を低下又は上昇させうる。一部の実施態様では、前記動物を薬剤候補物に接触させた後、生産されるGPCRポリペプチドの量を測定しうる。さらに、一部の実施態様では、薬剤候補物の前記動物への実際の影響を検出しうる。例えば、特定遺伝子の過剰発現は、疾患又は病的状態を生じさせる若しくは疾患又は病的状態に結びつくことがある。そのような場合、薬剤候補物が前記遺伝子の発現を低下させる能力、又は薬剤候補物が病的状態を予防する又は抑制する能力を試験することができる。他の例では、ポリペプチドのフラグメントのような特定代謝産物の生成が、疾患又は病的状態を生じさせる若

10

20

30

40

50

しくは疾患又は病的状態に結びつくことがある。そのような場合、薬剤候補物がそのような代謝産物の生成を低下させる能力、又は薬剤候補物が病的状態を予防する又は抑制する能力を試験することができる。

【0184】

(GPCRポリペプチド活性の他の調節因子に関する検定)

一部の状況下では、GPCRポリペプチドの活性の調節因子、すなわちアゴニスト又はアンタゴニストである分子を特定することが望ましいと考えられる。GPCRポリペプチドを調節する天然又は合成分子は、ここで述べるような、1又はそれ以上のスクリーニングアッセイを使用して特定しうる。そのような分子は、半ビボ又はインビボで、注射によって、経口送達、移植装置などによって投与しうる。

10

【0185】

「試験分子」は、GPCRポリペプチドの活性を調節する(すなわち上昇させる又は低下させる)能力に関して評価中である分子を表わす。最も一般的には、試験分子はGPCRポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子が、GPCR遺伝子発現に影響を及ぼすことによって、又はGPCRポリペプチドの結合パートナー(例えば受容体又はリガンド)に結合することなどによって、GPCRポリペプチド活性を間接的に調節しうることも想定される。1つの実施態様では、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、さらに一層好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数でGPCRポリペプチドに結合する。

【0186】

GPCRポリペプチドと相互作用する化合物を特定するための方法は本発明に包含される。一部の実施態様では、試験分子とGPCRポリペプチドの相互作用を可能にする条件下で、GPCRポリペプチドを試験分子と共にインキュベートし、相互作用の程度を測定する。試験分子は、実質的に精製された形態で又は粗混合物としてスクリーニングすることができる。

20

【0187】

一部の実施態様では、GPCRポリペプチドアゴニスト又はアンタゴニストは、GPCRポリペプチドと相互作用してその活性を調節する、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、又は低分子量分子でありうる。GPCRポリペプチドの発現を調節する分子は、GPCRポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか又はGPCRポリペプチドの発現を指令又は制御する核酸配列に相補的であって、発現のアンチセンス調節因子として働く核酸を包含する。

30

【0188】

ひとたび試験分子がGPCRポリペプチドと相互作用することが特定されれば、この分子を、GPCRポリペプチド活性を上昇させる又は低下させる能力に関してさらに評価しうる。GPCRポリペプチドと試験分子の相互作用の測定は、細胞ベースの結合測定法、膜結合測定法、溶液相アッセイ及び免疫測定法を含む、いくつかの様式で実施しうる。一般に、試験分子をGPCRポリペプチドと共に規定された期間インキュベートし、生物活性を測定する1又はそれ以上のアッセイによってGPCRポリペプチド活性を決定する。

【0189】

GPCRポリペプチドと試験分子の相互作用はまた、免疫測定法においてポリクローナル又はモノクローナル抗体を使用して直接測定することもできる。選択的に、ここで述べるようなエピトープタグを含むGPCRポリペプチドの修飾形態が、溶液中及び免疫測定法において使用しうる。

40

【0190】

GPCRポリペプチドが結合パートナー(例えば受容体又はリガンド)との相互作用を通して生物活性を発揮する場合、様々なインビトロアッセイを使用して、対応する結合パートナー(選択的結合物質、受容体又はリガンド)へのGPCRポリペプチドの結合を測定しうる。これらのアッセイは、試験分子を、GPCRポリペプチドの結合パートナーへの結合の速度及び/又は程度を上昇させる又は低下させる能力に関してスクリーニングする

50

ために使用しうる。1つのアッセイでは、GPCRポリペプチドをマイクロタイタープレート
の穴に固定する。放射能標識GPCRポリペプチド結合パートナー（例えばヨウ素化
GPCRポリペプチド結合パートナー）と試験分子を、一度に1つずつ（いずれかの順番
で）又は同時に、前記の穴に加えることができる。インキュベーション後、穴を洗浄し、
シンチレーション計数器を使用して放射能を測定し、結合パートナーがGPCRポリペプ
チドに結合した程度を測定することができる。典型的には、分子を一定範囲の濃度にわた
って試験し、結果の評価における正確さを期すために試験アッセイの1又はそれ以上のエ
レメントを欠く一連の対照穴を使用することができる。この方法の1つの選択肢は、タン
パク質の「位置」を逆にすること、すなわちGPCRポリペプチド結合パートナーをマイ
クロタイタープレートの穴に固定し、試験分子と放射能標識GPCRポリペプチドをイン
キュベートして、GPCRポリペプチド結合の程度を測定することを含む。例えば、Cu
rrent Protocols in Molecular Biology、第18
章（Ausubelら、編集、Green Publishers Inc. 及びWil
ley and Sons 1995）参照。

10

【0191】

放射能標識に代わるものとして、GPCRポリペプチド又はその結合パートナーをビオチ
ンに複合してもよく、その後、比色定量法によって又はストレプトアビジンの蛍光標識に
よって検出する、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）又はアルカリホスフ
ァターゼ（AP）のような酵素に結合したストレプトアビジンを使用して、ビオチニル化
タンパク質の存在を検出することができる。ビオチンに複合したGPCRポリペプチド又
はGPCRポリペプチド結合パートナーに対する抗体も、AP又はHRPに連結した酵素
結合ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーション後の検出のために使用しうる。

20

【0192】

GPCRポリペプチド又はGPCRポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビー
ズ、アクリルビーズ、又は他の種類のそのような不活性固相基質への結合によって固定す
ることもできる。基質-タンパク質複合体を、相補的タンパク質と被験化合物を含む溶液
中に入れることができる。インキュベーション後、遠心分離によってビーズを沈殿させ、
ここで述べる方法を用いてGPCRポリペプチドとその結合パートナーの間での結合の量
を評価することができる。選択的に、基質-タンパク質複合体をカラムに固定して、試験
分子と相補的タンパク質をそのカラムに通すこともできる。その後、ここで述べる手法の
いずれか（例えば放射能標識又は抗体結合）を使用してGPCRポリペプチドとその結合
パートナーの間での複合体の形成を評価することができる。

30

【0193】

GPCRポリペプチド結合タンパク質とGPCRポリペプチド結合パートナーの間での複
合体の形成を上昇させる又は低下させる試験分子を特定するために有用なもう1つのイン
ビトロアッセイは、BIAコアアッセイシステム（Pharmacia, Piscata
way, ニュージャージー州（NJ））のような表面プラズモン共鳴検出器システムであ
る。BIAコアシステムは製造者によって規定されているように使用される。このアッセ
イは基本的に、検出機内に位置するデキストラン被覆センサーチップにGPCRポリペプ
チド又はGPCRポリペプチド結合パートナーを共有結合することを含む。次に被験化合
物とその他の相補的タンパク質を同時に又は連続的に、センサーチップの入ったチェンバ
ーに注入することができる。結合する相補的タンパク質の量は、センサーチップのデキス
トラン被覆面に物理的に結合する分子量の変化と、検出器システムによって測定される分
子量の変化に基づいて評価することができる。

40

【0194】

一部の場合には、2個又はそれ以上の被験化合物と一緒に、GPCRポリペプチドとGP
CRポリペプチド結合パートナーの間での複合体の形成を上昇させる又は低下させるそれ
らの能力に関して評価することが望ましいと考えられる。これらの場合、ここで述べるア
ッセイは、そのような付加被験化合物を第一被験化合物と同時に又は第一被験化合物の後
に加えることによって容易に変更することができる。アッセイの残りの段階はここで述べ

50

る通りである。

【0195】

ここで述べるようなインビトロアッセイは、GPCRポリペプチドとGPCRポリペプチド結合パートナーの間での複合体の形成への作用に関して多数の化合物をスクリーニングするために好都合に使用しうる。前記アッセイは、ファージディスプレイにおいて生成される化合物、合成ペプチド及び化学合成ライブラリーをスクリーニングするために自動化しうる。

【0196】

GPCRポリペプチドとGPCRポリペプチド結合パートナーの間での複合体の形成を上昇させる又は低下させる化合物はまた、GPCRポリペプチド又はGPCRポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞及び細胞系統を使用した細胞培養においてもスクリーニングしうる。細胞及び細胞系統はいかなる哺乳類からも入手しうるが、好ましくはヒト又は他の霊長類、イヌ、又はげっ歯類ソースからのものである。その表面にGPCRポリペプチド結合パートナーを発現する細胞へのGPCRポリペプチドの結合を試験分子の存在下又は不在下で評価し、例えばGPCRポリペプチド結合パートナーに対するビオチニル化抗体を使用したフローサイトメトリーによって、結合の程度を測定することができる。ここで述べるタンパク質結合測定法において陽性と判定された化合物をさらに評価するために、細胞培養アッセイが好都合に使用できる。

10

【0197】

細胞培養はまた、薬剤候補物の影響をスクリーニングするためにも使用できる。例えば、薬剤候補物はGPCR遺伝子の発現を低下又は上昇させうる。一部の実施態様では、細胞培養を薬剤候補物に接触させた後、生産されるGPCRポリペプチド又はGPCRポリペプチドフラグメントの量を測定しうる。一部の実施態様では、細胞培養への薬剤候補物の実際の影響を検出しうる。例えば、特定遺伝子の過剰発現は細胞培養に特定の影響を及ぼしうる。そのような場合、薬剤候補物が前記遺伝子の発現を上昇又は低下させる能力、又は薬剤候補物が細胞培養への特定の影響を予防する又は抑制する能力を試験することができる。他の例では、ポリペプチドのフラグメントのような特定代謝産物の生成が、疾患又は病的状態を生じさせる若しくは疾患又は病的状態に結びつくことがある。そのような場合、薬剤候補物が細胞培養におけるそのような代謝産物の生成を低下させる能力を試験することができる。

20

30

【0198】

(タンパク質の取込み)

tatタンパク質配列(HIVからの)を使用してタンパク質を細胞に内在化させることができる。例えばFalwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:664-68参照。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸配列(Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R;配列番号7) (「タンパク質形質導入ドメイン」又はTAT-PDTと称される)は、細胞の細胞質膜と核膜を横切る送達を仲介すると述べられてきた。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72;及びNagaharaら、1998、Nat. Med. 4:1449-52参照。これらの方法では、腹腔内投与後組織に侵入するFITC-構築物(FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R;配列番号8)を調製し、そのような構築物の細胞への結合を蛍光活性化細胞選別(FACS)分析によって検出する。tat-β-gal融合タンパク質で処理した細胞はβ-gal活性を示す。注入後、そのような構築物の発現が、肝臓、腎臓、肺、心臓及び脳組織を含む多くの組織において検出できる。そのような構築物は細胞に入り込むためにある程度の変性を受け、それ自体、細胞への侵入後にリフォールディングを必要とするであろうと考えられる。

40

【0199】

それ故、tatタンパク質配列が所望ポリペプチドを細胞に取込まれるために使用しうることは認識される。例えば、tatタンパク質配列を使用して、GPCR分子の活性を

50

阻害するためにGPCRアンタゴニスト（抗GPCR選択的結合物質、小分子、可溶性受容体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドなど）を細胞内投与することができる。ここで使用するとき、「GPCR分子」の語は、ここで定義するようなGPCR核酸分子及びGPCRポリペプチドの両方を表わす。所望する場合には、これらの手順を使用してGPCRタンパク質そのものを細胞内に投与することもできる。Straus、1999、Science 285:1466-67も参照のこと。

【0200】

（GPCRポリペプチドを使用した細胞ソースの特定）

本発明のある実施態様によれば、GPCRポリペプチドに関連するある種の細胞型のソースを判定することは有用であると考えられる。例えば、適切な治療を選択する上での助けとして、疾患又は病的状態の由来を決定することは有用である。一部の実施態様では、GPCRポリペプチドをコードする核酸はプローブとして使用でき、該細胞の核酸をそのようなプローブでスクリーニングすることによってここで述べる細胞を特定することができる。他の実施態様では、細胞内のGPCRポリペプチドの存在を試験し、それによってそのような細胞がここで述べるタイプのものであるかどうかを決定するために、抗GPCRポリペプチド抗体を使用しうる。

10

【0201】

（GPCRポリペプチド組成物及び投与）

治療組成物は本発明の範囲内である。そのようなGPCRポリペプチド医薬組成物は、投与様式に適合するように選択した医薬的又は生理的に許容される製剤物質との混合物中に、治療上有効な量のGPCRポリペプチド又はGPCR核酸分子を含有しうる。医薬組成物は、投与様式に適合するように選択した医薬的又は生理的に許容される製剤物質との混合物中に、治療上有効な量の1又はそれ以上のGPCRポリペプチド選択的結合物質を含有しうる。

20

【0202】

許容される製剤物質は、好ましくは使用される用量及び濃度で受容者に非毒性である。

【0203】

医薬組成物は、例えば組成物のpH、浸透圧モル濃度、粘度、透明度、色など張性、において、不穏性、安定性、溶解又は放出速度、吸着又は浸透を変化させる、維持する、又は保存するための製剤物質を含みうる。適切な製剤物質は、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシンなど）、抗菌剤、抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウムなど）、緩衝剤（ホウ酸塩、炭酸水素塩、トリス-HCl、クエン酸塩、リン酸塩又は他の有機酸など）、充填剤（マンニトール又はグリシンなど）、キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など）、錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン又はヒドロキシプロピル β -シクロデキストリンなど）、増量剤、単糖類、二糖類及び他の糖質（グルコース、マンノース又はデキストリンなど）、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなど）、着色剤、着香剤及び希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）、低分子量ポリペプチド、塩形成性対イオン（ナトリウムなど）、防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素など）、溶媒（グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコールなど）、糖アルコール（マンニトール又はソルビトールなど）、沈殿防止剤、界面活性剤又は湿潤剤（ブルニック；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート20又はポリソルベート80のようなポリソルベート；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロール又はチロキサパルなど）、安定性促進剤（スクロース又はソルビトールなど）、張度増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物—好ましくは塩化ナトリウム又は塩化カリウム—又はマンニトール、ソルビトールなど）、供給送達媒質、希釈剤、賦形剤及び／又は製薬佐剤を含むが、これらに限定されない。Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版、A. R. Gennaro編集、Mack Publishing

30

40

50

Company 1990) 参照。

【0204】

至適医薬組成物は、例えば予定投与経路、送達様式及び所望用量に応じて、当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (前出) 参照。そのような組成物は、GPCRポリペプチドの物理的状态、安定性、インビボでの放出速度、及びインビボでのクリアランス速度に影響を及ぼしうる。

【0205】

医薬組成物の主要媒質又は担体は、水性又は非水性のいずれでもよい。例えば、注射用の適切な媒質又は担体は、場合によって非経口投与用組成物に共通する他の物質を補足した、水、生理食塩水又は人工脳脊髄液でありうる。中性緩衝食塩水又は血清アルブミンと混合した食塩水はさらなる例示的媒質である。他の例示的医薬組成物は、ソルビトール又は適切な代用物をさらに含みうる、約pH7.0~8.5のトリス緩衝液又は約pH4.0~5.5の酢酸緩衝液を包含する。本発明の1つの実施態様では、GPCRポリペプチド組成物は、凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態で、所望純度を有する選択組成物を至適製剤物質 (Remington's Pharmaceutical Sciences、前出) と混合することによって保存用に調製しうる。さらに、GPCRポリペプチド生成物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤しうる。

【0206】

GPCRポリペプチド医薬組成物は非経口送達用に選択することができる。選択的に、前記組成物は、吸入又は経口のように消化管を通しての送達用に選択しうる。そのような医薬適合性の組成物の調製はこの分野の技術範囲内である。

【0207】

製剤成分は、投与部位にとって許容される濃度で存在する。例えば、組成物を生理的pH又はわずかに低いpH、典型的には約5から約8のpH範囲内に保持するために緩衝液を使用する。

【0208】

非経口投与を想定するとき、本発明で使用するための治療組成物は、医薬適合性の媒質中に所望GPCR分子を含有する、発熱物質不含の非経口的に許容される水溶液の形態をとりうる。非経口注射のための特に適切な媒質は、GPCR分子が、適切に保存される無菌等張液として製剤されている無菌蒸留水である。さらにもう1つの製剤は、蓄積注射によって送達されうる、生成物の制御又は持続放出を提供する、注射用ミクロスフェア、生体受食性粒子、高分子化合物 (ポリアクチン酸又はポリグリコール酸など)、ビーズ又はリポソームのような作用物質を含有する所望分子の製剤を含みうる。ヒアルロン酸も使用でき、これは循環中での存在期間持続を促進する作用を有すると考えられる。所望分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能薬剤の送達装置を包含する。

【0209】

1つの実施態様では、医薬組成物は吸入用に製剤しうる。例えば、GPCRポリペプチドは、吸入用乾燥粉末として製剤しうる。GPCRポリペプチド又は核酸分子の吸入溶液も、エーロゾル送達用の推進薬と共に製剤しうる。さらにもう1つの実施態様では、溶液を噴霧することができる。肺投与は国際公開公報第WO94/20069号の中でさらに説明されており、これは化学修飾したタンパク質の肺送達を述べている。

【0210】

また、一部の製剤は経口的に投与しうると想定される。本発明の1つの実施態様では、この様式で投与するGPCRポリペプチドは、錠剤及びカプセルのような固形投与形態の配合において慣例的に使用される担体と共に又は担体なしで製剤することができる。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大であり、前全身性分解が最小である、胃腸管の所定位置で製剤の活性部分を放出するように設計しうる。GPCRポリペプチドの吸収を促進するために付加的な作用物質を含有することができる。希釈剤、着香剤、低融点ろう、植物油、潤滑剤、沈殿防止剤、錠剤崩壊剤及び結合剤も使用しうる。

【0211】

もう1つの医薬組成物は、錠剤の製造に適する非毒性賦形剤との混合物中に有効量のGPCRポリペプチドを含みうる。錠剤を無菌水又は他の適切な媒質に溶解することにより、溶液を単位投与形態で調製することができる。適切な賦形剤は、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム又は炭酸水素ナトリウム、ラクトース又はリン酸カルシウムのような不活性希釈剤；デンプン、ゼラチン又はアカシアのような結合剤；あるいはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又は滑石のような潤滑剤を含むが、これらに限定されない。

【0212】

さらなるGPCRポリペプチド医薬組成物は、持続又は制御送達製剤中にGPCRポリペプチドを含有する製剤を含めて、当業者には明白である。リポソーム担体、生体受食性微粒子又は多孔性ビーズのような様々な他の持続又は制御送達手段及び蓄積注射を製剤するための手法も当業者に既知である。例えば、医薬組成物の供給送達のための多孔性ポリマー微粒子の制御放出を述べた、国際特許願第PCT/US93/00829号参照。

【0213】

持続放出製剤のさらなる例は、成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態の半透性ポリマー基質を含む。持続放出基質は、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号及び欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタミン酸塩のコポリマー（Sidmanら、1983、Biopolymers 22:547-56）、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）（Langerら、1981、J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277及びLanger、1982、Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら、前出）又はポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）を包含しうる。持続放出組成物はまた、この分野で既知のいくつかの方法のいずれかによって製造できる、リポソームを含みうる。例えば、Eppsteinら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92；及び欧州特許第036676号、同第088046号及び同第143949号参照。

【0214】

インビボ投与に使用するGPCR医薬組成物は、典型的には無菌でなければならない。これは無菌ろ過膜を通する過によって達成しうる。前記組成物を凍結乾燥する場合、凍結乾燥及び還元の前又は後のいずれかに、この方法を用いた滅菌を実施しうる。非経口投与用組成物は凍結乾燥形態又は溶液として保存しうる。さらに、非経口組成物は一般に、無菌アクセス口を備えた容器、例えば皮下注射針によって貫通しうる栓を備えた静脈内溶液バッグ又はバイアルに入れる。

【0215】

ひとたび医薬組成物が製剤されれば、溶液、懸濁液、ゲル、乳剤、固体、あるいは脱水粉末又は凍結乾燥粉末として無菌バイアル中で保存しうる。組成物のような製剤は、即時使用形態又は投与前に還元する必要がある形態（例えば凍結乾燥）のいずれかで保存しうる。

【0216】

特定実施態様では、本発明は、単回用量投与単位を生産するためのキットを対象とする。前記キットは各々、乾燥タンパク質が入った第一容器と水性製剤が入った第二容器の両方を含みうる。単区画又は多区画予備充填注射器（例えば液体シリンジ及びリオシリンジ）を含むキットも本発明の範囲内に包含される。

【0217】

治療的に使用されるGPCR医薬組成物の有効量は、例えば、治療の背景と目的に依存する。当業者は、それ故、治療のための適切な用量レベルが、一部には、送達される分子、GPCR分子を使用する適応症、投与経路、及び患者のサイズ（体重、体表面積又は器官の大きさ）と状態（年齢及び全身状態）によって異なることを認識する。従って、臨床医は、至適治療効果を得るために用量を調節し、投与経路を変更しうる。典型的用量は、上

10

20

30

40

50

述した因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで又はそれ以上の範囲をとりうる。他の実施態様では、用量は約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；又は $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；又は約 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲をとりうる。

【0218】

投与頻度は、使用する製剤中の GPCR 分子の薬物動態パラメータに依存する。典型的には、臨床医は、所望効果を達成する用量に達するまで組成物を投与する。組成物は、それ故、単回投与として、経時的な2回又はそれ以上の投与として（同じ量の所望分子を含んでいてもよく又は含んでいなくてもよい）、あるいは移植装置又はカテーテルによる持続注入として投与しうる。適切な用量のさらなる改善は、当業者によって常套的に行われ、当業者が常套的に実施する作業の範囲内である。適切な用量は、適切な用量-応答データの使用を通して確認しうる。 10

【0219】

医薬組成物の投与経路は、既知の方法によって、例えば経口的；静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、又は病巣内経路による注射を通して；持続放出システムによって；又は移植装置によって為される。所望する場合には、前記組成物は、ボーラス注射によって又は注入によって持続的に、又は移植装置によって投与しうる。

【0220】

選択的に又は付加的に、該組成物は、所望分子が吸収された又は被包された膜、スポンジ又は他の適切な物質の移植によって局所的に投与しうる。移植装置を使用する場合は、装置を適切な組織又は器官に移植することができ、拡散、時間指定放出ボーラス又は連続投与によって所望分子を送達しうる。 20

【0221】

一部の場合、GPCR ポリペプチド医薬組成物をエキスビボ的に使用することが望ましいと考えられる。そのような場合には、患者から取り出した細胞、組織又は器官を GPCR ポリペプチド医薬組成物に接触させ、その後前記細胞、組織又は器官を患者の体内に移植してもどす。

【0222】

また一部の場合には、ここで述べるような方法を使用して、GPCR ポリペプチドを発現し、分泌するように遺伝子操作した一定の細胞を移植することによって GPCR ポリペプチドを送達することができる。そのような細胞は、動物細胞又はヒト細胞のいずれでもよく、また自己由来、異種又は外因性のいずれでもよい。場合によっては、前記細胞を不朽化してもよい。免疫応答の可能性を低下させるために、前記細胞を被包して周辺組織への浸潤を避けることもできる。被包材料は、典型的には生体適合性であり、タンパク質産物の放出は許容するが、患者の免疫系又は周辺組織からの他の有害因子による細胞の破壊を防ぐ、半透性ポリマー囲い又は膜である。 30

【0223】

ここで述べるように、単離細胞個体群（幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなどのような）を1又はそれ以上の GPCR ポリペプチドで処理することが望ましいと考えられる。これは、GPCR ポリペプチドが細胞膜透過性の形態である場合には、ポリペプチドを直接単離細胞に接触させることによって実施できる。 40

【0224】

本発明のさらなる実施態様は、治療用ポリペプチドのインビトロでの生産及び遺伝子治療又は細胞治療による治療用ポリペプチドの生産と送達のための細胞及び方法（例えば相同的組換え及び／又は他の組換え生産法）に関する。相同的組換え及び他の組換え法を使用して、通常は転写沈黙性である GPCR 遺伝子又は過少発現遺伝子を含む細胞を改変し、それによって治療上有効な量の GPCR ポリペプチドを発現する細胞を生産しうる。

【0225】

相同的組換えはもともと、転写活性遺伝子において突然変異を誘発する又は矯正する遺伝 50

子を標的するために開発された手法である。K u c h e r l a p a t i、1989、P r o g . i n N u c l . A c i d R e s . & M o l . B i o l . 36:301。基本的手法は、哺乳類ゲノムの特定領域内に特定突然変異を導入するため (T h o m a s ら、1986、C e l l 44:419-28; T h o m a s と C a p e c c h i、1987、C e l l 51:503-12; D o e t s c h m a n ら、1988、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 85:8583-87) 又は欠陥遺伝子内の特定突然変異を矯正するため (D o e t s c h m a n ら、1987、N a t u r e 330:576-78) の方法として開発された。例示的な相同的組換え手法は、米国特許第5, 272, 071号; 欧州特許第9193051号及び同第505500号; 国際特許願第PCT/US90/07642号、及び国際公開公報第WO91/09955号に述べられている。 10

【0226】

相同的組換えを通して、ゲノム内に挿入されるDNA配列は、標的DNAに結合することによって目的とする遺伝子の特定領域に位置づけられる。標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的な(相同な)ヌクレオチド配列である。DNA複製過程の間に、ゲノムの特定領域に相補的な標的DNAの小片を親鎖と接触させる。ハイブリダイズすること、それ故、共有する相同領域を通して内在性DNAの他の小片と組み換わることは、細胞内に挿入されたDNAの一般的特性である。この相補鎖が、突然変異又は異なる配列又は付加ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに結合する場合、組換えの結果としてこの鎖も新たに合成された鎖に組み込まれる。校正機能の結果として、DNAのこの新しい配列は鋳型として働くことができる。このようにして、移入されたDNAはゲノム内に組み込まれる。 20

【0227】

標的DNAのこれらの小片に結合するのは、GPCRポリペプチドの発現と相互作用しうる又は発現を制御しうるDNAの領域、例えばフランキング配列である。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサー又は外来転写調節エレメントは、所望GPCRポリペプチドをコードするDNAの転写に影響を及ぼすのに十分な近傍性と方向で、意図する宿主細胞のゲノム内に挿入される。制御エレメントは宿主細胞ゲノム内に存在するDNAの一部を制御する。それ故、所望GPCRポリペプチドの発現は、GPCR遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、GPCR遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを備えた内在性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA(目的とする内在性遺伝子と相同な領域を含む)の使用によって達成されうる。 30

【0228】

1つの例示的な方法では、細胞内の所望標的遺伝子(すなわち所望内在性細胞遺伝子)の発現を、少なくとも調節配列、エクソン及びスプライス供与部位を含むDNAの導入によって、あらかじめ選択した部位での細胞ゲノム内への相同的組換えを通して変化させる。これらの成分を、これが実際に新しい転写単位(DNA構築物中に存在する前記調節配列、エクソン及びスプライス供与部位は内在性遺伝子に作動可能に連結されている)の生産をもたらすように、染色体(ゲノム)DNAに導入する。これらの成分が染色体DNAに導入された結果として、所望内在性遺伝子の発現が変化する。 40

【0229】

ここで述べるような変化した遺伝子発現は、得られたままの細胞内で通常はサイレントである(発現されない)遺伝子を活性化すること(又は発現を生じさせること)、ならびに得られたままの細胞内で生理的に有意のレベルでは発現されない遺伝子の発現を上昇させることを包含する。これらの実施態様は、さらに、得られたままの細胞において起こる調節又は誘導のパターンとは異なるように調節又は誘導のパターンを変化させること、及び得られたままの細胞で発現される遺伝子の発現を低下させること(完全に排除することを含む)を包含する。

【0230】

相同的組換えを使用して、細胞の内在性GPCR遺伝子からGPCRポリペプチド産生を上昇させる又は生じさせることができる1つの方法は、まず、部位特異的組換えシステム（例えばCre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）からの組換え配列を、細胞の内在性ゲノムGPCRポリペプチドコード領域の上流（すなわち5'側）に置く、相同的組換えを使用することを含む。ゲノムGPCRポリペプチドコード領域のすぐ上流に置いた部位に相同な組換え部位を含むプラスミドを、適切な組換え酵素と共に改変細胞系統に導入する。この組換え酵素は、プラスミドの組換え部位を通して、細胞系統内のゲノムGPCRポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位への前記プラスミドの組込みを生じさせる（BaubonisとSauer, 1993, Nucleic Acids Res. 21: 2025-29; O'Gormanら、1991, Science 251: 1351-55）。転写を上昇させることが知られている何らかのフランキング配列（例えばエンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド内に適切に位置づけられれば、細胞の内在性GPCR遺伝子からの新たな又は高いGPCRポリペプチド産生をもたらす、新しい又は改変された転写単位を創造するように組み込まれる。

【0231】

部位特異的組換え配列が、細胞の内在性ゲノムGPCRポリペプチドコード領域のすぐ上流に置かれた細胞系統を使用するさらなる方法は、相同的組換えを用いて前記細胞系統のゲノム内の別の第二組換え部位を導入することである。次に適切な組換え酵素をこの2つの組換え部位の細胞系統に導入して、細胞の内在性GPCR遺伝子からの新たな又は高いGPCRポリペプチド産生をもたらす、新しい又は改変された転写単位を創造する、組換え事象（欠失、逆位及び転位）を生じさせる（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）。

【0232】

細胞内在性GPCR遺伝子からのGPCRポリペプチドの発現を上昇させる又は生じさせるためのさらなるアプローチは、細胞内在性GPCR遺伝子からの新たな又は高いGPCRポリペプチド産生をもたらすように、1個又はそれ以上の遺伝子の発現を上昇させる又は生じさせること（例えば転写因子）及び／又は1個又はそれ以上の遺伝子の発現を低下させること（例えば転写リプレッサー）を含む。この方法は、非天然に生じるポリペプチド（例えば転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞の内在性GPCR遺伝子からの新たな又は高いGPCRポリペプチド産生が生じるように細胞内に導入することを含む。

【0233】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。ある実施態様では、例示的DNA構築物は、（a）1個又はそれ以上の標的配列、（b）調節配列、（c）エクソン、及び（d）不對スプライス供与部位を含む。前記DNA構築物中の標的配列は、エレメント（b）から（d）が内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるように、細胞内の標的遺伝子へのエレメント（a）から（d）の組込みに関する。もう1つの実施態様では、DNA構築物は、（a）1個又はそれ以上の標的配列、（b）調節配列、（c）エクソン、（d）スプライス供与部位、（e）イントロン、及び（f）スプライス受容部位を含み、前記標的配列は、エレメント（b）から（f）が内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるようにエレメント（a）から（f）の組込みに関する。前記標的配列は、それとの相同的組換えが起こる細胞染色体DNA内のあらかじめ選択された部位と相同である。前記構築物において、エクソンは一般に調節配列の3'側であり、スプライス供与部位はエクソンの3'側である。

【0234】

ここで示すGPCRポリペプチドの核酸配列のように、特定遺伝子の配列が既知である場

合、前記遺伝子の選択領域に相補的なDNAの断片を合成する、又は目的とする領域の境界となる特異的認識部位で天然DNAを適切に制限切断することなどによって入手することができる。このハイブリダイゼーションがDNA複製の間に起こる場合、このDNA断片及びそれに連結された付加配列は岡崎フラグメントとして働き、DNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。本発明は、それ故、GPCRポリペプチドをコードするヌクレオチドを包含し、かかるヌクレオチドは標的配列として使用しうる。

【0235】

GPCRポリペプチド細胞治療、例えばGPCRポリペプチドを産生する細胞の移植も意図される。この実施態様は、GPCRポリペプチドの生物活性形態を合成し、分泌することができる細胞を移植することを含む。そのようなGPCRポリペプチド産生細胞は、GPCRポリペプチドの天然プロデューサーである細胞か、又は所望GPCRポリペプチドをコードする遺伝子又はGPCRポリペプチドの発現を上昇させる遺伝子での形質転換によってGPCRポリペプチドを産生する能力が上昇した組換え細胞でありうる。そのような修飾は、遺伝子を送達することならびにその発現と分泌を促進することに適したベクターによって実現しうる。異種のポリペプチドの投与によって起こりうるような、GPCRポリペプチドを投与する患者における潜在的免疫応答を最小限に抑えるために、GPCRポリペプチドを産生する天然細胞は、ヒト由来であり、ヒトGPCRポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、GPCRポリペプチドを産生する組換え細胞は、ヒトGPCRポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

10

20

【0236】

移植細胞は、周辺組織への浸潤を避けるために被包してもよい。ヒト又は非ヒト動物細胞は、GPCRポリペプチドの放出を許容するが、患者の免疫系又は周辺組織からの他の有害因子による細胞の破壊を防ぐ、生体適合性の半透性ポリマーに包み又は膜内に入れて患者に移植しうる。選択的に、半ビボでGPCRポリペプチドを産生するように形質転換した患者自身の細胞を、そのような被包なしで患者に直接移植してもよい。

【0237】

生細胞の被包のための手法はこの分野において既知であり、被包細胞の調製及び患者へのそれらの移植は常套的に実施しうる。例えば、Baetgeら（国際公開公報第WO95/05452号及び国際特許願第PCT/US94/09299号）は、生物活性分子の有効送達のために遺伝子操作した細胞を含有する膜カプセルを述べている。このカプセルは生体適合性であり、容易に回収できる。前記カプセルは、哺乳類宿主に移植したときインビボで下方調節を受けないプロモーターに作動可能に連結された生物活性分子をコードするDNA配列を含む、組換えDNA分子でトランスフェクトした細胞を被包している。このデバイスは、生細胞から受容者の体内の特定部位への分子の送達を提供する。加えて、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；及び同第5,106,627号も参照のこと。生細胞を被包するためのシステムは、国際公開公報第WO91/10425号（Aebischerら）の中で述べられている。また、国際公開公報第WO91/10470号（Aebischerら）；Winnら、1991、Exper. Neurol. 113:322-29；Aebischerら、1991、Exper. Neurol. 111:269-75；及びTrescoら、1992、ASAIO 38:17-23も参照のこと。

30

40

【0238】

GPCRポリペプチドのインビボ及びインビトロ遺伝子治療の送達も考慮される。遺伝子治療手法の1つの例は、構成的又は誘導的プロモーターに作動可能に連結して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成しうる、GPCRポリペプチドをコードするGPCR遺伝子（ゲノムDNA、cDNA及び／又は合成DNA）を使用することである。前記プロモーターは、構築物を挿入する細胞又は組織型において活性であることを条件として、内在性GPCR遺伝子に相同であってもよく、又は異種であってもよい。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、場合によっては、部位特異的組込み用に設計されたDNA分子（例えば相

50

同的組換えに有用な内在性配列)、組織特異的プロモーター、エンハンサー又はサイレンサー、親細胞に比べて選択的利点を提供することができるDNA分子、形質転換細胞を特定するための標識として有用なDNA分子、陰性選択システム、細胞特異的結合物質(例えば細胞ターゲティングに関して)、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターからの発現を促進する転写因子、及びベクターの生産を可能にする因子を含みうる。

【0239】

遺伝子治療DNA構築物は、その後、ウイルス又は非ウイルスベクターを使用して細胞に導入することができる(半ビボ又はインビボで)。遺伝子治療DNA構築物を導入する1つの手段は、ここで述べるようなウイルスベクターによるものである。レトロウイルスベクターのようなある種のベクターは、前記DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、遺伝子を染色体DNAに組み込むことができる。他のベクターはエピソームとして機能し、遺伝子治療DNA構築物は細胞質内にとどまる。

10

【0240】

さらに他の実施態様では、標的細胞におけるGPCR遺伝子の制御発現のために調節エレメントを含めることができる。そのようなエレメントは適切な効果器に応答して発動する。このようにして、所望するときに治療ポリペプチドを発現させることができる。1つの慣例的な制御手段は、小分子結合ドメイン及び、DNA結合タンパク質又は転写活性化タンパク質のような、生物学的プロセスを開始させることができるドメインを含むキメラタンパク質を二量化するために小分子二量化剤又はラパログ(rapalog)の使用を含む(国際公開公報第WO96/41865号、同第WO97/31898号及び同第WO97/31899号参照)。前記タンパク質は、導入遺伝子の転写を開始するために使用できる。

20

【0241】

選択的な調節テクノロジーは、目的とする遺伝子から発現されるタンパク質を凝集物又はクラスターとして細胞の内部で貯蔵する方法を利用する。目的遺伝子を、小胞体内での凝集タンパク質の保持を生じさせる条件凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現させる。貯蔵タンパク質は細胞の内部で安定であり、不活性である。前記タンパク質は、しながら、条件凝集ドメインを除去し、それによって該タンパク質が細胞から分泌されるように凝集物又はクラスターを破壊して切り離す薬剤(例えば小分子リガンド)を投与することにより、放出することができる。Aridorら、2000、Science 287:816-17及びRiveraら、2000、Science 287:826-30参照。

30

【0242】

他の適切な制御手段又は遺伝子スイッチは、ここで述べるシステムを含むが、これらに限定されない。ミフェプリストン(RU486)はプロゲステロンアンタゴニストとして使用される。修飾プロゲステロン受容体リガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子の二量体を形成し、それを核内へと通過させてDNAに結合することによって転写を活性化する。リガンド結合ドメインは、受容体が天然リガンドに結合する能力を排除するように修飾する。修飾ステロイドホルモン受容体システムは、米国特許第5,364,791号及び国際公開公報第WO96/40911号及び同第WO97/10337号において詳述されている。

40

【0243】

さらにもう1つの制御システムは、エクジソン受容体(細胞質受容体)に結合してそれを活性化する、エクジソン(ショウジョウバエステロイドホルモン)を使用する。この受容体はその後核内に転位して、特異的DNA応答エレメント(エクジソン応答遺伝子からのプロモーター)に結合する。エクジソン受容体は、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、及び転写を開始させるためのリガンド結合ドメインを含む。エクジソンシステムは、米国特許第5,514,578号及び国際公開公報第WO97/38117号、同第WO96/37609号及び同第WO93/03162号に詳述されている。

【0244】

50

もう1つの制御手段は、正のテトラサイクリン制御性トランス活性化因子を使用する。このシステムは、転写を活性化するポリペプチドに連結された突然変異tetリプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランス活性化因子タンパク質を生じる突然変異tet R-4アミノ酸変化、すなわちテトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。そのようなシステムは、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号及び同第5,654,168号に述べられている。

【0245】

さらなる発現制御システム及び核酸構築物は、Innovir Laboratories Inc.への米国特許第5,741,679号及び同第5,834,186号に述べられている。

10

【0246】

インビボ遺伝子治療は、GPCR核酸分子の局所注入により又は他の適切なウイルス又は非ウイルス送達ベクターにより、GPCRポリペプチドをコードする遺伝子を細胞に導入することによって実施しうる。Hefti 1994、Neurobiology 25:1418-35。例えば、標的細胞への送達のために、GPCRポリペプチドをコードする核酸分子をアデノ関連ウイルス(AAV)ベクターに組み込むことができる（例えばJohnson, 国際公開公報第WO95/34670号；国際特許願第PCT/US95/07178号参照）。組換えAAVゲノムは、典型的には、機能性プロモーターに作動可能に連結されたGPCRポリペプチドをコードするDNA配列に隣接するAAV逆方向末端反復配列及びポリアデニル化配列を含む。

20

【0247】

適切な選択的ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、αウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、及びパピローマウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボでのウイルス仲介遺伝子導入システムを述べている。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようにインビトロで処理したヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に供給するためのプロセスの例を提供している。遺伝子治療手法の実施のためのさらなる方法と材料は、米国特許第5,631,236号（アデノウイルスベクターを含む）、同第5,672,510号（レトロウイルスベクターを含む）、同第5,635,399号（サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む）に述べられている。

30

【0248】

非ウイルス送達法は、リポソームを介した遺伝子導入、裸のDNAの送達（直接注入）、受容体を介した導入（リガンド-DNA複合体）、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿法、及び微粒子衝撃法（例えば遺伝子ガン）を含むが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料及び方法はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組み込み用に設計されたDNA配列、親細胞に比べて選択的利点を提供することができるDNA配列、形質転換細胞を特定するための標識、陰性選択システム及び発現制御システム（安全措置）、細胞特異的結合物質（細胞ターゲティング用）、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を促進する転写因子、ならびにベクターの製造の方法を含む。遺伝子治療手法の実施のためのそのような付加的な方法及び材料は、米国特許第4,970,154号（電気穿孔法を含む）、同第5,679,559号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有システムを述べる）、同第5,676,954号（リポソーム担体を含む）、同第5,593,875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を述べる）及び同第4,945,050号（生物活性粒子が細胞の表面を貫通して細胞の内部に組み込まれる速度で、前記粒子を細胞に推進するプロセスを述べる）、及び国際公開公報第WO96/40958号（核リガンドを含む）に述べられている。

40

50

【0249】

GPCR遺伝子治療又は細胞治療が、同じか又は異なる細胞内への1個又はそれ以上の付加ポリペプチドの送達をさらに含むことも想定される。そのような細胞は患者に別々に導入してもよく、又は前記細胞が上述した被包膜のような単一移植装置に含まれていてもよく、又は前記細胞がウイルスベクターによって別々に改変されてもよい。

【0250】

遺伝子治療によって細胞における内在性GPCRポリペプチドの発現を上昇させる1つの手段は、GPCRポリペプチドプロモーターに1個又はそれ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、この場合エンハンサーエレメントはGPCR遺伝子の転写活性を上昇させる働きをすることができる。使用するエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化しようとする組織に基づいて選択し、その組織においてプロモーターの活性化をもたらすことが知られているエンハンサーエレメントを選択する。例えば、GPCRポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「発動 (turn on)」すべきであれば、1c kプロモーターエンハンサーエレメントが使用しうる。ここでは、付加する転写エレメントの機能性部分を、標準クローニング手法を用いてGPCRポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入しうる（及び場合によっては、ベクター及び／又は5'及び／又は3'フランキンク配列に挿入しうる）。「相同的組換え構築物」として知られるこの構築物は、その後半ピボ又はインピボで所望細胞に導入することができる。

【0251】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を修飾することによってGPCRポリペプチド発現を低下させるために使用できる。そのような修飾は、典型的には相同的組換え法によって実施される。例えば、不活性化のために選択したGPCR遺伝子のプロモーターの全部又は一部を含むDNA分子を、転写を調節するプロモーターの断片を除去する及び／又は置換するように操作することができる。例えば、標準分子生物学手法を用いて前記プロモーターの転写活性化因子のTATAボックス及び／又は結合部位を欠失させうる；そのような欠失はプロモーター活性を阻害し、それによって対応するGPCR遺伝子の転写を抑制する。プロモーター内のTATAボックス又は転写活性化因子結合部位の欠失は、TATAボックス及び／又は転写活性化因子結合部位ヌクレオチドの1個又はそれ以上が、1個又はそれ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は挿入によって突然変異している、GPCRポリペプチドプロモーター（調節されるGPCR遺伝子と同じか又は関連する種からの）の全部又は該当部分を含むDNA構築物を作製することによって実施しうる。結果として、TATAボックス及び／又は活性化因子結合部位は、低下した活性を有するか又は完全に不活性化される。典型的には修飾されたプロモーターセグメントに隣接する天然（内在性）5'及び3'DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを同時に含むこの構築物は、直接又はここで述べるようなウイルスベクターによって適切な細胞に導入しうる（エクスピボ又はインピボで）。典型的には、細胞のゲノムDNAへの前記構築物の組込みは相同的組換えを通して行われ、この場合前記プロモーター構築物内の5'及び3'DNA配列は、内在性染色体DNAへのハイブリダイゼーションによって修飾プロモーター領域を組み込むのを助ける働きをすることができる。

【産業上の利用可能性】

【0252】

（治療用途）

GPCR核酸分子、ポリペプチド、及びそれらのアゴニスト及びアンタゴニストはここで列挙するものを含めて、多くの疾患、障害又は状態を治療する、診断する、改善する、又は予防するために使用できる。

【0253】

GPCRポリペプチドアゴニスト及びアンタゴニストは、GPCRポリペプチド活性を調節し、成熟形態のGPCRポリペプチドの少なくとも1つの活性を上昇させる又は低下させる分子を包含する。アゴニスト又はアンタゴニストは、GPCRポリペプチドと相互作用し、それによってその活性を調節する、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質又は低分子

10

20

30

40

50

量分子のような補因子でありうる。潜在的ポリペプチドアゴニスト又はアンタゴニストは、該タンパク質の細胞外ドメインの一部又は全部を含む、GPCRポリペプチドの可溶性形態又は膜結合形態と反応する抗体を包含する。GPCRポリペプチド発現を調節する分子は、典型的には、発現のアンチセンス調節因子として働くことができる、GPCRポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0254】

脂肪組織においてGPCRポリペプチドの発現が検出されているので、GPCR核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニスト及びアンタゴニスト（抗GPCR選択的結合物質を含むが、これらに限定されない）は脂肪代謝に関わる疾患の治療又は診断のために有用であると考えられる。そのような疾患の例は、肥満、糖尿病、及び脂質代謝異常（例えば異脂血症（*d i s l i p i d e m i a*））を含むが、これらに限定されない。本発明の分子はまた、ガンに関連する体重減少（すなわち悪液質）、及びAIDS、神経性食欲不振に関連するもののような異常体重減少の他の状態の治療への適用も有すると考えられる。脂肪代謝に関連する他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

10

【0255】

GPCRポリペプチドはまた、生物学的に炎症のメディエーターとして機能しうる。GPCRの発現又は活性化を調節する分子は、それ故、肺疾患（例えば喘息、慢性気管支炎及び関連気道閉塞性疾患）、アレルギー及びアレルギー反応（例えばアレルギー性鼻炎、接触皮膚炎及びアレルギー性結膜炎）、アングナ、脳痙縮、糸球体腎炎肝炎、内毒素血症、ブドウ膜炎、及び同種移植拒絶反応のような、ロイコトリエンを介した炎症性疾患を含むが、必ずしもこれらに限定されない、関連疾患又は異常状態の治療のための薬剤として有用であると考えられる。

20

【0256】

精巣においてGPCRポリペプチドの発現が検出されているので、GPCR核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニスト及びアンタゴニストは、精巣を冒す疾患及び状態を診断する又は治療する上で有用であると考えられる。そのような疾患及び状態の例は、雄性不妊症及び精巣癌を含むが、これらに限定されない。精巣の発育及び機能に関連する他の疾患及び状態は、本発明の範囲内に包含される。

【0257】

より広くは、本発明のGPCR分子は、過剰量又は不十分な量のGPCR（シグナル伝達）活性に関連する他の異常状態を治療する方法を提供しうる。一般に、GPCRの活性が過剰である場合には、いくつかのアプローチが使用しうる。1つのアプローチは、GPCRへのリガンドの結合を遮断することによるか、又は第二シグナルを阻害して、それによって異常状態を緩和することにより、活性化を阻害するのに有効な量で、医薬適合性の担体と共に阻害因子化合物（アンタゴニスト）を被験者に投与することを含む。もう1つのアプローチでは、内部で生成された又は別個に投与したアンチセンス配列などによる発現遮断手法を用いて、内在性GPCRをコードする遺伝子の発現を阻害することができる。

30

【0258】

GPCRポリペプチド機能のアゴニスト又はアンタゴニストは、治療する状態に適切であるように、1又はそれ以上のサイトカイン、成長因子、抗生物質、抗炎症薬、及び／又は化学療法剤と組み合わせて使用しうる（同時に又は連続的に）。

40

【0259】

有害なレベルのGPCRポリペプチドによって生じる又は仲介される他の疾患又は障害は、本発明の範囲内に包含される。有害なレベルは、GPCRポリペプチドの過剰レベル及びGPCRポリペプチドの正常以下のレベルを含む。

【0260】

（GPCR核酸及びポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物活性ポリペプチドをコードしないものを含む）は、GPCR遺伝子及び関連遺伝子の位置を染色体上に特定するために使用しうる。遺伝子地図の作製は、PCR増幅やインサイチュハイブリダイゼーションのようなこの分野で既知

50

の手法によって実施しうる。

【0261】

GPCR核酸分子（それ自体は生物活性ポリペプチドをコードしないものを含む）は、哺乳類組織又は体液標本中のGPCR核酸分子の存在に関して、定性的又は定量的に試験するための診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であると考えられる。

【0262】

1個又はそれ以上のGPCRポリペプチドの活性を阻害することが望ましい場合には、他の方法も使用しうる。そのような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）又はGPCR mRNAに相補的であり、ハイブリダイズする核酸分子によって行われうる。例えば、GPCR遺伝子の少なくとも一部に相補的な配列を有するアンチセンスDNA又はRNA分子を細胞に導入することができる。アンチセンスプローブは、ここで開示するGPCR遺伝子の配列を用いて使用可能な手法によって設計しうる。典型的には、そのような各々のアンチセンス分子は、各々の選択GPCR遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。その後前記アンチセンス分子が対応するGPCR mRNAにハイブリダイズするとき、このmRNAの翻訳が妨げられる又は低下する。アンチセンス阻害因子は、細胞又は生物におけるGPCRポリペプチドの低下又は不在に関する情報を提供する。

10

【0263】

あるいは、遺伝子治療は、1個又はそれ以上のGPCRポリペプチドのドミナントネガティブ阻害因子を創造するために使用しうる。この場合、各選択GPCRポリペプチドの突然変異型ポリペプチドをコードするDNAを調製し、ここで述べるようなウイルス又は非ウイルス法を用いて患者の細胞に導入することができる。そのような各々の突然変異体は、典型的にはその生物学的役割において内在性ポリペプチドと競合するように設計される。

20

【0264】

さらに、GPCRポリペプチドは、生物活性であるか否かに関わらず、免疫原として使用しうる、すなわちこのポリペプチドは、それに対する抗体が惹起されうる少なくとも1つのエпитープを含む。GPCRポリペプチドに結合する選択的結合物質（ここで述べるような）は、体液又は細胞試料においてGPCRポリペプチドの存在を検出するための標識携帯での使用を含むが、これに限定されない、インビボ及びインビトロでの診断目的に使用しうる。前記抗体はまた、ここで列挙するものを含めて、多くの疾患及び障害を予防する、治療する、又は診断するためにも使用しうる。該抗体は、GPCRポリペプチドの特徴的な少なくとも1つの活性を低下させる又は遮断するようにGPCRポリペプチドに結合しうるか、又はGPCRポリペプチドの特徴的な少なくとも1つの活性を上昇させる（GPCRポリペプチドの薬物動態を上昇させることによる場合を含む）ようにポリペプチドに結合しうる。

30

【0265】

GPCRポリペプチドは、「発現クローニング」戦略を使用してGPCRリガンドをクローニングするために使用できる。放射能標識（¹²⁵ヨウ素）GPCRポリペプチド又は「親和性／活性標識」GPCRポリペプチド（Fc融合又はアルカリホスファターゼ融合など）は、GPCRリガンドを発現する細胞型、細胞系統又は組織を特定するための結合アッセイにおいて使用できる。そのような細胞又は組織から単離したRNAは、その後cDNAに転換して、哺乳類発現ベクターにクローニングし、哺乳類細胞（例えばCOS又は293）にトランスフェクトして、発現ライブラリーを作製することができる。放射能標識又は標識GPCRポリペプチドは、その後、GPCRリガンドを発現する、このライブラリー中の細胞のサブセットを特定し、単離するための親和性試薬として使用できる。次にこれらの細胞からDNAを単離し、哺乳類細胞にトランスフェクトして、GPCRリガンドを発現する細胞の分画が最初のライブラリーにおけるよりも何倍も高い第二の発現ライブラリーを創造する。GPCRリガンドを含む単一組換えクローンが単離されるまで、この濃縮過程を何度も反復することができる。GPCRリガンドの単離は、GPCRシ

40

50

グナル伝達経路の新規アゴニスト及びアンタゴニストを特定する又は開発するために有用である。そのようなアゴニスト及びアンタゴニストは、GPCRリガンド、抗GPCRリガンド抗体、小分子又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。

【0266】

本発明のヒトGPCR核酸はまた、対応する染色体GPCRポリペプチド遺伝子を単離するための有用なツールである。ヒトGPCRゲノムDNAは、遺伝性組織変性疾患を特定するために使用できる。

【0267】

下記の実施例は例示のみを意図しており、いかなる意味においても本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

10

【実施例1】

【0268】

ラットGPCRポリペプチド遺伝子のクローニング

一般に、ラットGPCRポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、分析するために、Sambrookら（前出）に述べられているような材料及び方法を使用した。

【0269】

ラットGPCRポリペプチドをコードするcDNA配列を単離するために、専有発現配列タグ（EST）データベースの相同性に基づく検索を実施した。白色脂肪組織cDNAライブラリーからの部分クローンが、潜在的Gタンパク質共役受容体をコードすることが認められた。GPCRポリペプチドについての完全長cDNA配列を作製するために、ラット脂肪細胞Marathon cDNA RACEキット（Clontech）を使用し、製造者に指示されている条件を用いてRACEを実施した。2回の連続的PCR反応を行った。第1回目の反応（PCR1）では、Marathon cDNA RACEキットからのAP1プライマーを、プライマー：5'-A-A-G-A-G-G-A-C-C-A-G-G-C-G-G-C-A-G-G-G-A-A-T-A-T-3'（配列番号9）と共に使用した。第2回目の反応（PCR2）では、前記キットからのAP2プライマーを、プライマー：5'-T-A-T-C-C-C-C-A-A-A-A-T-C-C-A-A-T-G-C-C-T-A-C-G-3'（配列番号10）と共に使用した。生じたRACE DNAをPCR IIベクター（Invitrogen）に連結し、大腸菌に形質転換した。陽性クローンを配列決定し、コンセンサス配列を構築した。RACEによって決定される配列から誘導した信頼性の高いPCRとプライマーを使用して完全長クローンを得た。増幅反応は、総容量49 µL中に、ラット脂肪細胞cDNA（Marathon cDNA RACEキットで調製した）、プライマー：5'-C-G-G-G-C-A-G-G-T-G-G-G-T-G-A-T-G-A-G-G-T-T-A-G-3'（配列番号11）及び5'-G-C-T-G-C-T-G-G-G-C-C-A-T-T-T-G-T-C-T-T-C-A-T-3'（配列番号12）、反応緩衝液10 µL（100 mMトリシン、pH 5.7、25%グリセロール及び425 mM KOAc）、dNTP 4 µL（各々1 mM）、rtTh 1 µL（Perkin Elmer、2 U/µL）、及びVentポリメラーゼ1 µL（New England Biolabs、0.01 U/µL）を含んだ。反応は、94℃で10秒間、62℃で1分間、及び68℃で5分間を35サイクル実施した。熱循環器の温度が65℃に達したとき、10 mM MgOAc 1 µLを加えた。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分析し、適切なフラグメントをゲルから切り出して、GENECLEANキット（Bio101；Vista、カリフォルニア州（CA））を用いて精製した。精製DNAをPCRscriptキット（Stratagene；La Jolla、カリフォルニア州（CA））を用いてクローン化し、増幅DNAを含むクローンを大腸菌において回収した。その後、挿入物のDNA配列を決定した。

20

30

40

【0270】

完全長ラットGPCR cDNAクローンも、ラット白色脂肪組織から構築したオリゴdTプライムcDNAライブラリーから単離した。全RNAは、TRIzol Reag

50

ent (Life Technologies; Rockville, メリーランド州 (MD)) を用いて雌性 Wistar ラット白色脂肪組織から単離した。Dynal Dynabeads を用いて全 RNA からメッセンジャー RNA を精製した。cDNA を合成し、mRNA 2.7 μ g 及び cDNA 合成とプラスミドクロニングのための the Superscript Plasmid System (Life Technologies) を使用してベクター、pSPORT1 にクロニングした。前記 cDNA を電気穿孔法によって DH10B 大腸菌 (Life Technologies) に導入した。CsCl 勾配で精製したプラスミド DNA を、100 万個以上の非増幅 cDNA クローンを含む 100 ml テリフィック肉汁培養から採集した。Genetrapp システム (Life Technologies) を使用して、CsCl 勾配精製したプラスミド cDNA 5 μ g をプライマー: 5'-T-G-C-T-G-T-C-T-C-A-T-C-G-A-G-G-G-G-G-A-A-3' (配列番号 13) でスクリーニングした。救い出したプラスミドの 5 分の 1 を DH10B 大腸菌細胞に電気穿孔で導入し、100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天平板に塗布した。Hybond N+ ナイロン膜 (Amersham; Piscataway, ニュージャージー州 (NJ)) 及び末端標識プライマー (5'-G-A-A-T-A-G-G-G-C-C-G-G-A-A-G-C-A-T-T-G-T-3'; 配列番号 14) を使用してコロニーハイブリダイゼーションを実施した。ハイブリダイズしたコロニーを、プライマー: 5'-C-C-T-C-C-T-C-A-T-C-C-G-A-G-C-C-T-G-T-C-T-G-G-3' (配列番号 15) 及び 5'-C-C-T-T-T-G-T-G-T-C-A-G-C-C-A-C-C-T-A-G-G-A-T-G-C-3' (配列番号 16) を使用した PCR によって再スクリーニングした。1 つの陽性単離コロニーを、100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 中で一晚増殖させた。Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を使用してプラスミド DNA を単離し、配列決定した。マウス GPCR ポリペプチドについての完全長 cDNA の配列分析は、マウス GPCR 遺伝子が 351 アミノ酸のタンパク質をコードする 1053 塩基対のオープンリーディングフレームを含むことを示唆した (図 3A から 3C)。

【実施例 2】

【0271】

マウス GPCR ポリペプチド遺伝子のクロニング

一般に、マウス GPCR ポリペプチドをコードする遺伝子をクロニングし、分析するために、Sambrook ら (前出) に述べられているような材料及び方法を使用した。

【0272】

マウス GPCR ポリペプチドをコードする cDNA 配列を単離するために、ラット GPCR cDNA 配列を使用して専有ゲノムデータベースを検索した。マウス骨髄 cDNA ライブラリーからの cDNA クローンが、ラットクローンの 5' 末端に対合すると特定された。このクローンを回収し、その完全な配列を決定した。ラット GPCR ポリペプチドについての完全長 cDNA の配列分析は、ラット GPCR 遺伝子が 351 アミノ酸のタンパク質をコードする 1053 塩基対のオープンリーディングフレームを含むことを示唆した (図 2A から 2D)。

【実施例 3】

【0273】

ヒト GPCR ポリペプチド遺伝子のクロニング

一般に、ヒト GPCR ポリペプチドをコードする遺伝子をクロニングし、分析するために、Sambrook ら (前出) に述べられているような材料及び方法を使用した。

【0274】

ヒト GPCR ポリペプチドをコードする cDNA 配列を単離するために、³²P-dCTP で標識した 700 塩基対のラット GPCR プローブ (プライマー: 5'-C-C-T-C-C-T-C-A-T-C-C-G-A-G-C-C-T-G-T-C-T-G-G-3'; 配列番号 15 及び 5'-C-C-T-T-T-G-T-G-T-C-A-G-C-

10

20

30

40

50

C-A-C-C-T-A-G-G-A-T-G-C-3' ; 配列番号16を使用してラットG P C R c D N A 配列からP C Rによって調製した) を使用して、ブランクハイブリダイゼーションによってヒト白色脂肪組織c D N A ファージライブラリー (C l o n e t e c h) をスクリーニングした。組換えファージを約 5×10^4 形質転換体/150 mm

L B 平板で大腸菌 X L 1 - b l u e 系統に接種した。正に荷電したナイロンフィルターを取り出し、5 x S S C、5 x デンハルト溶液、0.5 % S D S 及び $200 \mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子D N A 中、45℃で3時間プレハイブリダイズした。次にこのフィルターを、5 n g / m l の標識プローブを補足した同じ溶液中、45℃で一晩ハイブリダイズした。前記フィルターをまず2 x S S C 及び0.1 % S D S 中、室温で20分間ずつ2回洗い、次に0.5 x S S C 及び0.1 % S D S 中、45℃で30分間ずつ2回洗った。その後増感紙を使用して-80℃の温度で5日間、前記フィルターをX線に暴露した。2枚のフィルターを整列して陽性ハイブリダイズブランクを決定した。36個の陽性ブランクを採取し、一次スクリーニングで用いたのと同じ方法を使用して二次スクリーニングのために再び接種した。二次スクリーニングによって16個の陽性ブランクが生じた。 10

【0275】

二次スクリーニングで特定した組換えファージを、c r e - リコンビナーゼを発現する大腸菌 B M 2 5 . 8 系統に形質導入した。l o x P 部位でのc r e - リコンビナーゼを介した部位特異的組換えの結果として、p T r i p l e x ファージミドを切り出した。感染したB M 2 5 . 8 細胞をL B / アンピシリン平板に塗布し、一晩インキュベートした。正に荷電した82 mm フィルター (N E N ; B o s t o n , マサチューセッツ州 (M A)) を 20
上述したように取り出し、先に述べた700塩基対の標識ラットG P C R プローブを用いて三次スクリーニングを実施した。プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションは先に述べたように実施した。陽性平板につき2個のコロニーを、 $100 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含むL B 培地中で増幅した。プラスミドD N A を調製し、c D N A 挿入物の2本の鎖を配列決定した。ヒトG P C R をコードするD N A は2.5 k b の長さであることが認められた。ヒトG P C R ポリペプチドについての完全長c D N A の配列分析は、ヒトG P C R 遺伝子が346アミノ酸のタンパク質をコードする1038塩基対のオープンリーディングフレームを含むことを示唆した (図1 A から1 B) 。

【0276】

図4は、ヒトG P C R ポリペプチド (h u _ G P C R ; 配列番号2)、マウスG P C R ポリペプチド (m u _ G P C R ; 配列番号4) 及びラットG P C R ポリペプチド (r a _ G P C R ; 配列番号6) のアミノ酸配列の整列化を示す。ヒトG P C R ポリペプチドは、マウス及びラットG P C R ポリペプチドの両方と78%の同一性を共有する。マウスG P C R ポリペプチドとラットG P C R ポリペプチドは90%の同一性を共有する。ヒト、マウス及びラットG P C R ポリペプチドの構造は、各々のポリペプチドが7つの膜貫通ドメインを有することから、G タンパク質共役受容体ファミリーの他の成員の構造に匹敵する。 30

【実施例4】

【0277】

G P C R m R N A の発現

多数のヒトc D N A 試料におけるG P C R m R N A 発現を評価するために、P R I S M 40

T a q m a n システムを用いた定量的P C R を実施した (ヒトポリA + はC l o n t e c h L a b o r a t o r i e s より入手した; c D N A はS u p e r S c r i p t A m p l i f i c a t i o n S y s t e m ; G i b c o B R L を使用して作製した) 。

2個のプライマーと、我々がヒトG P C R 配列から誘導した発蛍光性プローブを使用してP R I S M T a q m a n 反応を実施した。生じたデータをヒトハウスキーパー遺伝子シクロフィリンに基準化し、ヒトシクロフィリンコピー数に対するG P C R コピー数の比として報告した。ヒトG P C R m R N A 発現の測定のための反応は、プライマー: 5' - T - T - C - A - C - G - T - T - G - G - C - C - A - T - G - A - A - C - A - 3' (配列番号17) 及び5' - A - A - A - T - A - C - C - T - G - T - C - C - G - C - A - G - C - C - 3' (配列番号18)、ならびに発蛍光性プローブ: 5' - (6 - F 50

AM) - C - C - G - T - A - A - G - G - A - A - C - A - C - G - A - T - G - C -
T - C - C - C - G - G - (TAMRA) - 3' (配列番号19; 式中、「6-FAM」
は5' レポーター染料、6-カルボキシフルオレセインであり、「TAMRA」は3' 消
光剤、6-カルボキシテトラメチルローダミンである) を含んだ。ヒトシクロフィリンm
RNA 発現の測定のための反応は、プライマー: 5' - G - T - C - G - A - C - G - G
- C - G - A - G - C - C - C - 3' (配列番号20) 及び5' - T - C - T - T - T -
G - G - G - A - C - C - T - T - G - T - C - T - G - C - 3' (配列番号21)、な
らびに発蛍光性プローブ: 5' - (6-FAM) - T - G - G - G - C - C - G - C - G
- T - C - T - C - C - T - T - T - G - A - G - C - T - (TAMRA) - 3' (配列
番号22) を含んだ。GPCR mRNA 発現の最高レベルは精巣と白色脂肪組織において検出された(図5)。

【0278】

GPCR mRNA の発現をノーザンブロット分析によって検討する。多数のヒト組織ノ
ーザンブロット (Clontech) を、ヒトGPCRポリペプチドcDNAクローンか
ら単離した適切な制限フラグメントでプローブする。このプローブを標準手法を用いて³
²P-dCTPで標識する。

【0279】

ノーザンブロットを、ハイブリダイゼーション溶液 (5XSSC、50%脱イオン化ホル
ムアミド、5Xデンハルト溶液、0.5%SDS及び100mg/ml変性サケ精子DNA)
中、42℃で2時間プレハイブリダイズし、その後5ng/mlの標識プローブを含
む新鮮ハイブリダイゼーション溶液中42℃で一晩ハイブリダイズする。ハイブリダイ
ゼーション後、フィルターを2XSSC及び0.1%SDS中、室温で10分間ずつ2回洗
い、次に0.1XSSC及び0.1%SDS中、65℃で30分間ずつ2回洗う。その後
、これらのブロットをオートラジオグラフィーに暴露する。

【0280】

GPCR mRNA の発現をインサイチューハイブリダイゼーションによって局在決定す
る。正常胚及び成体マウス組織のパネルを4%パラホルムアミドに固定し、パラフィンに
包埋して、5µmの切片にする。切片にした組織を0.2M HCl中で透過性を上げ、
プロテイナーゼKで消化して、トリエタノールアミン及び無水酢酸でアセチル化する。切
片をハイブリダイゼーション溶液 (300mM NaCl、20mMトリス-HCl、pH8.0、5mM
EDTA、1Xデンハルト溶液、0.2%SDS、10mM DTT、0.25mg/ml tRNA、25µg/mlポリA、25µg/mlポリC及び5
0%ホルムアミド) 中、60℃で1時間プレハイブリダイズし、その後10%デキストラ
ン及びヒトGPCR遺伝子に相補的な 2×10^4 cpm/µlの³²P-標識アンチセン
スリボプローブを含む同じ溶液中、60℃で一晩ハイブリダイズする。このリボプローブ
は、標準手法を用いてヒトGPCR cDNAを含むクローンのインビトロ転写によって
得る。

【0281】

ハイブリダイゼーション後、切片をハイブリダイゼーション溶液中で洗浄し、RNAアーゼ
Aで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、その後0.1XSSC中、5
5℃で30分間洗う。次に切片をNTB-2乳剤 (Kodak, Rochester, ニ
ューヨーク州 (NY)) 中に液浸し、4℃で3週間暴露して、現像し、ヘマトキシリンと
エオシンで対比染色する。脳 (1矢状切断及び2冠状切断)、胃腸管 (食道、胃、十二指
腸、空腸、回腸、近位結腸及び遠位結腸)、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リン
パ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、雄性及び雌性生殖器 (雌性では卵巣、卵管及び
子宮; 雄性では精巣、精巣上体、前立腺、精囊及び輸精管)、BAT及びWAT (皮下、
腎周囲)、骨 (大腿骨)、皮膚、胸、及び骨格筋に関して、暗視野及び標準照明により組
織形態及びハイブリダイゼーションシグナルを同時に分析する。

【実施例5】

【0282】

GPCRポリペプチドの生産

A：細菌におけるGPCRポリペプチドの発現

PCRを用いて、該配列の5'末端と3'末端に対応するプライマーを使用してGPCRポリペプチドをコードする鋳型DNA配列を増幅する。増幅したDNA産物は、発現ベクターへの挿入を可能にする制限酵素部位を含むように修飾してもよい。PCR産物をゲル精製し、標準組換えDNA法を用いて発現ベクターに挿入する。luxプロモーター及びカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpAMG21(ATCC番号98113)のような例示的ベクターを、挿入したDNAの方向指示クローニングのためにBamHIとNdeIで消化する。連結した混合物を電気穿孔法によって大腸菌宿主株に形質転換し、形質転換体をカナマイシン耐性に関して選択する。選択したコロニーからのプラスミドDNAを単離し、DNA塩基配列決定に供して、挿入物の存在を確認する。 10

【0283】

形質転換した宿主細胞を、誘導の前に30℃で、30μg/mLカナマイシンを含む2xYT培地中でインキュベートする。30ng/mLの最終濃度までN-(3-オキソヘキサノイル)-D-ホモセリンラク톤を加え、その後30℃又は37℃で6時間インキュベートして遺伝子発現を誘導する。培養の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁と溶解、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって、GPCRポリペプチドの発現を評価する。

【0284】

GPCRポリペプチドの封入体を次のように精製する。細菌細胞を遠心分離によってペレット化し、水に再懸濁する。この細胞懸濁液を音波処理によって溶解し、195,000×gで5-10分間遠心分離してペレット化する。上清を廃棄し、前記ペレットを洗って、ホモジナイザーに移す。ペレットをパーコル溶液(75%液体パーコル及び0.15M NaCl)5mL中で均一に懸濁するまでホモジナイズし、その後希釈して、21,600×gで30分間遠心分離する。前記封入体を含む勾配分画を回収し、プールする。この単離した封入体をSDS-PAGEによって分析する。 20

【0285】

大腸菌が産生したGPCRポリペプチドに対応するSDSポリアクリルアミドゲル上の単一バンドをゲルから切り出し、そのN末端アミノ酸配列を、基本的にMatsudaら、1987、J. Biol. Chem. 262:10-35が述べたようにして決定する。 30

【0286】

B. 哺乳類細胞におけるGPCRポリペプチドの発現

PCRを用いて、該配列の5'末端と3'末端に対応するプライマーを使用してGPCRポリペプチドをコードする鋳型DNA配列を増幅する。増幅したDNA産物は、発現ベクターへの挿入を可能にする制限酵素部位を含むように修飾してもよい。PCR産物をゲル精製し、標準組換えDNA法を用いて発現ベクターに挿入する。エプスタイン-バーウィルス複製起点を含む例示的ベクター、pCEP4(Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州(CA))が、293-EBNA-1細胞におけるGPCRポリペプチドの発現のために使用しうる。増幅してゲル精製したPCR産物をpCEP4ベクターに連結し、リポフェクションによって293-EBNA細胞に導入する。トランスフェクトした細胞を100μg/mLヒグロマイシン中で選択し、生じた薬剤耐性培養を集密まで増殖させる。次に前記細胞を無血清培地で72時間培養する。順化培地を取り出し、GPCRポリペプチド発現をSDS-PAGEによって分析する。 40

GPCRポリペプチドの発現は銀染色法によって検出する。選択的に、GPCRポリペプチドを、IgG定常ドメイン又はFLAGエピトープのようなエピトープタグを有する融合タンパク質として生産し、それを、前記ペプチドタグに対する抗体を使用したウェスタンブロット分析によって検出することができる。

【0287】

GPCRポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出すか、又はGPCR 50

融合タンパク質をエピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製して、ここで述べるようなN末端アミノ酸配列分析に供する。

【0288】

C. 哺乳類細胞におけるGPCRポリペプチドの発現と精製

GPCRポリペプチド発現構築物を、リポフェクション又はリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを使用して293 EBNA又はCHO細胞に導入する。

【0289】

産生されるGPCRポリペプチドについての機能性試験を実施するため、ヒグロマイシン選択293 EBNAクローンのプールから多量の順化培地を生成する。前記細胞を500 cmのNuncトリプルフラスコ中で80%の集密度に増殖させ、その後培地採集の1週間前に無血清培地に切り替える。順化培地を取り出し、精製まで-20℃で凍結する。 10

【0290】

順化培地を下記で述べるようにアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。前記培地を解凍し、0.2 μmフィルターに通す。プロテインGカラムをpH 7.0のPBSで平衡させ、その後ろ過した培地を充填する。A₂₈₀での吸光度が基線値に達するまでカラムをPBSで洗う。GPCRポリペプチドをpH 2.7の0.1 Mグリシン-HClでカラムから溶出し、直ちにpH 8.5の1 Mトリス-HClで中和する。GPCRポリペプチドを含む分画をプールし、PBS中で透析して、-70℃で保存する。

【0291】

ヒトGPCRポリペプチド-Fc融合ポリペプチドの第Xa因子開裂のために、アフィニティークロマトグラフィーで精製したタンパク質をpH 8.0の50 mMトリス-HCl、100 mM NaCl、2 mM CaCl₂中で透析する。制限プロテアーゼ第Xa因子を透析したタンパク質に1/100 (w/w)で加え、試料を室温で一晩消化する。 20

【実施例6】

【0292】

抗GPCRポリペプチド抗体の作製

GPCRポリペプチドに対する抗体は、生物学的又は化学合成によって生産した精製タンパク質又はGPCRペプチドで免疫することによって入手しうる。抗体を作製するための適切な手順は、HudsonとBay, Practical Immunology (第2版、Blackwell Scientific Publications)に述べられているものを含む。 30

【0293】

抗体生産のための1つの手順では、動物(典型的にはマウス又はウサギ)にGPCR抗原(GPCRポリペプチドなど)を注射し、ELISAによって測定したとき十分な血清力価を有するものをハイブリドーマ生産のために選択する。免疫した動物の脾臓を採集し、単細胞懸濁液として調製して、そこから脾細胞を回収する。この脾細胞をマウス骨髓腫細胞(Sp2/0-Ag14細胞など)に融合し、まず200 U/mLペニシリン、200 μg/mL硫酸ストレプトマイシン及び4 mMグルタミンを含むDMEM中でインキュベートし、次にHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミンプテリン及びチミジン)中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各々の融合ウエルから取り出し、ELISAによって抗GPCR抗体産生に関して試験する。 40

【0294】

ヒトIg遺伝子座を担うトランスジェニックマウスの免疫、及び抗体可変ドメインの突然変異誘発によって作製されるような合成抗体ライブラリーのスクリーニングなどの、抗GPCR抗体を得るための選択的手順も使用しうる。

【実施例7】

【0295】

トランスジェニックマウスにおけるGPCRポリペプチドの発現

GPCRポリペプチドの生物活性を評価するため、肝特異的Apoeプロモーターの制御下のGPCRポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする構築物を作製する。この構 50

築物の送達は、GPCRポリペプチドの機能に関して有益な生理的变化を生じさせると期待される。同様に、 β -アクチンプロモーターの制御下の完全長GPCRポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達は偏在的発現をもたらすと予想される。

【0296】

これらの構築物を作製するために、PCRを用いて、所望配列の5'末端と3'末端に対応し、増幅産物の発現ベクターへの挿入を可能にする制限酵素部位を組み込んだプライマーを使用してGPCRポリペプチドをコードする鋳型DNA配列を増幅する。増幅後、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化して、標準組換えDNA手法を用いて発現ベクターに連結する。例えば、増幅したGPCRポリペプチド配列を、Grahamら、1997、Nature Genetics, 17: 272-74及びRayら、1991、Genes Dev. 5: 2265-73が述べているように、ヒト β -アクチンプロモーターの制御下の発現ベクターにクローニングすることができる。

10

【0297】

連結後、反応混合物を使用して電気穿孔法によって大腸菌宿主株に形質転換し、形質転換体を薬剤耐性に関して選択する。選択したコロニーからのプラスミドDNAを単離し、DNA塩基配列決定に供して、適切な挿入物の存在と突然変異の不在を確認する。2回のCsCl密度勾配遠心分離を通してGPCRポリペプチド発現ベクターを精製し、適切な制限酵素で開裂して、GPCRポリペプチド導入遺伝子を含む線状化したフラグメントをゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを5 mM トリス、pH 7.4及び0.2 mM EDTA中に2 mg/mLの濃度で再懸濁する。

20

【0298】

BDF1×BDF1交配マウスからの単細胞胚を記述されているように（国際公開公報第WO97/23614号）注入する。胚をCO₂培養器中で一晚培養し、15-20の二細胞胚を偽妊娠CD1雌性マウスの卵管に移す。微量注入胚の移植から得られた子を、次のようにしてゲノムDNA試料中に組み込んだ導入遺伝子のPCR増幅によってスクリーニングする。耳片を耳緩衝液（20 mM トリス、pH 8.0、10 mM EDTA、0.5% SDS及び500 mg/mL プロテイナーゼK）20 mL中、55℃で一晩消化する。次に試料をTE200 mLで希釈し、この耳試料2 mLを、適切なプライマーを用いたPCR反応において使用する。

【0299】

8週齢で、トランスジェニック創始者動物及び対照動物を犠牲剖検し、生理学的分析に供する。脾臓の部分切除し、Total RNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて全細胞RNAを脾臓から単離して、導入遺伝子の発現をRT-PCRによって測定する。次のようにSuperScript (商標) Pre-amplification System (Gibco-BRL)を使用して脾臓から回収したRNAをcDNAに変換する。発現ベクター配列内の、GPCRポリペプチド導入遺伝子の3'側に位置する適切なプライマーを使用して、導入遺伝子転写産物からcDNA合成を開始させる。トランスジェニック創始者動物及び対照動物からの全脾臓RNA 10 mgをプライマー1 mMと共に70℃で10分間インキュベートし、氷上に置く。次にこの反応に10 mM トリス-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、各dNTP 10 mM、0.1 mM DTT及びSuperScript II逆転写酵素200 Uを補足する。42℃で50分間インキュベートした後、72℃で15分間加熱して反応を停止させ、RNアーゼH 2 Uにより37℃で20分間消化する。その後GPCRポリペプチドに特異的なプライマーを使用するPCRによって試料を増幅する。

30

40

【実施例8】

【0300】

トランスジェニックマウスにおけるGPCRポリペプチドの生物活性
安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルランで麻酔して、心臓穿刺によって採血する。試料を血液学的検査と血清化学分析に供する。最終瀉血後、X線撮影を実施する。肉眼的解剖の際に、主要内臓器官を重量分析に供する。

50

【0301】

肉眼的解剖後、組織（すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、全胃腸管、腎臓、生殖器、皮膚及び乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節及び骨格筋）を切除し、組織学的検査のために10%緩衝重鉛-ホルマリンに固定する。固定後、前記組織をパラフィンブロックに加工し、3mmの切片を得る。すべての切片をヘマトキシリンとエオシンで染色し、その後組織学的分析に供する。

【0302】

トランスジェニックマウス及び対照マウスの両方の脾臓、リンパ節及びパイアー斑を、次のようにB細胞及びT細胞特異的抗体による免疫組織学分析に供する。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン化し、脱イオン水中で水和する。前記切片を3%過酸化水素でクエンチングし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, ペンシルバニア州 (PA)) で遮断して、ラットモノクローナル抗マウスB220及びCD3 (Harlan, Indianapolis, インディアナ州 (IN)) 中でインキュベートする。DABを色素原 (BioTek, Santa Barbara, カリフォルニア州 (CA)) として、ビオチニル化ウサギ抗ラット免疫グロブリン及びペルオキシダーゼ複合ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, カリフォルニア州 (CA)) によって抗体結合を検出する。切片をヘマトキシリンで対比染色する。

【0303】

剖検後、トランスジェニック動物及び対照同腹子からのMLN及び脾臓と胸腺の切片を切除する。100mmナイロン細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, ニュージャージー州 (NJ)) の底に対してシリンジの平らな先端で組織を静かに摩砕して単細胞懸濁液を調製する。細胞を2回洗い、計数して、その後各組織からの約 1×10^6 細胞を、20 μ L容量中0.5 μ g CD16/32 (Fc γ II/III) Fcブロックと共に10分間インキュベートする。次に試料を、100 μ L容量のPBS (Ca⁺ 及びMg⁺ を欠く)、0.1%ウシ血清アルブミン及び0.01%アジ化ナトリウム中、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4又はCD8 (PharMingen, San Diego, カリフォルニア州 (CA)) に対するFITC又はPE複合モノクローナル抗体の0.5 μ g抗体により、2-8℃で30分間染色する。抗体結合後、細胞を洗って、FACScan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

【0304】

本発明を好ましい実施態様の見地から説明したが、当業者には変法及び修正が生じることが明白である。それ故、付属の特許請求の範囲は、特許請求するような本発明の範囲内に含まれるそのようなすべての等価変法をカバーすることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0305】

【図1A】 ヒトGPCR遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号1）及びヒトGPCRポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図1B】 ヒトGPCR遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号1）及びヒトGPCRポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図2A】 マウスGPCR遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号3）及びマウスGPCRポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図2B】 マウスGPCR遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号3）及びマウスGPCRポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図2C】 マウスGPCR遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号3）及びマウスGPCRポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図2D】 マウスGPCR遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号3）及びマウスGPCRポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図 3 A】ラット G P C R 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号 5）及びラット G P C R ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号 6）を示す。

【図 3 B】ラット G P C R 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号 5）及びラット G P C R ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号 6）を示す。

【図 3 C】ラット G P C R 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号 5）及びラット G P C R ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号 6）を示す。

【図 4】ヒト G P C R ポリペプチド（h u _ G P C R；配列番号 2）、マウス G P C R ポリペプチド（m u _ G P C R；配列番号 4）及びラット G P C R ポリペプチド（r a _ G P C R；配列番号 6）のアミノ酸配列の整列化を示す。推定上の膜貫通ドメインを指示している（下線部）。

【図 5】定量的 P C R により、いくつかのヒト組織において測定した G P C R m R N A 発現のレベルを示す。

10

【図 1 A】

FIG. 1A

```

atg tac aac ggg tgc tgc atc gag ggg gac acc atc tcc cag 48
Met Tyr Asn Gly Ser Cys Arg Ile Glu Gly Asp Thr Ile Ser Gln
1 5 10 15

gtg atg cgg cgg ctg ctc att gtg gcc ttt gtg ctg ggc gca cta ggc 96
Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Val Ala Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly
20 25 30

aat ggg gtc gcc ctg tgt ggt ttc tgc ttc cac atg aag acc tgg aag 144
Asn Gly Val Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys
35 40 45

ccc agc act gtt tac ctt ttc aat ttg gcc gtg gct gat ttc ctc ctt 192
Pro Ser Thr Val Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu
50 55 60

atg atc tgc ctg cct ttt cgg aca gac tat tac ctc aga cgt aga cac 240
Met Ile Cys Leu Pro Phe Arg Thr Asp Tyr Trp Leu Arg Arg Arg His
65 70 75 80

tgg gct ttt ggg gac att ccc tgc cga gtg ggg ctc ttc acg ttg gcc 208
Trp Ala Phe Gly Asp Ile Pro Cys Arg Val Gly Leu Phe Thr Leu Ala
85 90 95

atg aac agg gcc ggg agc atc gtg ttc ctt acg gtg gtc gct ggg gac 336
Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr Val Val Ala Ala Asp
100 105 110

agg tat ttc aaa gtg gtc csc ccc cac cac ggg gtg aac act atc tcc 384
Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Ala Val Asn Thr Ile Ser
115 120 125

acc cgg gtg ggg gct ggc atc gtc tgc acc ctg tgg gcc ctg gtc atc 432
Thr Arg Val Ala Ala Gly Ile Val Cys Thr Leu Trp Ala Leu Val Ile
130 135 140

ctg gga aca gtg tat ctt ttg ctg gag aac cat ctc tgc gtg caa gag 480
Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Leu Glu Asn His Leu Cys Val Gln Glu
145 150 155 160

acg gcc gtc tcc tgt gag agc ttc atc atg gag tgg gcc aat ggc tgg 528
Thr Ala Val Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp
165 170 175

cat gar atc atg ttc cag ctg gag ttc ttt atg ccc ctc ggc atc atc 576
His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Met Pro Leu Gly Ile Ile
180 185 190

tta ttt tgc tcc ttc aag att gtt tgg agc ctg agg cgg agg cag cgg 624
Leu Phe Cys Ser Phe Lys Ile Val Trp Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln
195 200 205

```

【図 1 B】

FIG. 1B

```

ctg gcc aga cag gct cgg atg aag aag cgg acc cgg ttc atc atg gtg 672
Leu Ala Arg Gln Ala Arg Met Lys Lys Ala Thr Arg Phe Ile Met Val
210 215 220

gtg gca att gtg ttc atc aca tgc tac ctg ccc agc gtg tct gct aga 720
Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro Ser Val Ser Ala Arg
225 230 235 240

ctc tat ttc ctc tgg aag gtg ccc tgg agt gcc tgc gat ccc tct gtc 768
Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val
245 250 255

cat ggg gcc ctg cac ata acc ctc agc ttc acc tac atg aac agc atg 816
His Gly Ala Leu His Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met
260 265 270

ctg gat ccc ctg gtg tat tat ttt toa agc ccc tcc ttt ccc aaa ttc 864
Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe
275 280 285

tac aac aag ctc aaa atc tgc agt ctg aaa ccc aag cag cca gga cac 912
Tyr Asn Lys Leu Lys Ile Cys Ser Leu Lys Pro Lys Gln Pro Gly His
290 295 300

toa aaa aca caa agg cgg gaa gag atg oca att tgg aac ctc ggt cgc 960
Ser Lys Thr Gln Arg Pro Glu Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Gly Arg
305 310 315 320

agg agt tgc atc agt gtg gca aat agt ttc caa agc cag tct gat ggg 1008
Arg Ser Cys Ile Ser Val Ala Asn Ser Phe Gln Ser Glu Ser Asp Gly
325 330 335

caa tgg gat ccc cac att gtt gag tgg ccc 1038
Gln Trp Asp Pro His Ile Val Glu Trp His
340 345

```

【図 2 A】

FIG. 2A

gaaaagaca aaacacgaaa aagaanaagtc atctccaggg ctgactatga caacagatct 60
 gtacgatgta tagogtcgga cccccagagt gaaacccaga satgtacact cgtgggaac 120
 cgtcttcacc ccagagcttg aaccagctgc agctctcaac tctgtagggg acgtgaagct 180
 cgtgatccaa gctagagga aaggacttgc tgcctgcttt catttctcg ctgaagtctc 240
 tctctggggt gcagcgcctg catccoaagg tgaatagggt agggccacag ctgotagagg 300
 agccttagtg ttogtagagg cagctctgcc tctgtgcggg caacctbgy atg cea gtc 358
 Met Pro Val 1
 ctc tct coa act gct atg gcc aac ggg tgc tgc tgt ctc atc gag ggg 406
 Leu Ser Pro Thr Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Leu Ile Glu Gly 15
 gag ccc atc tcc cag gtg atg cct cct cta cta atc atc ctg gtc ttc gtg 454
 Glu Pro Ile Ser Glu Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Leu Val Phe Val 35
 ctt ggc gcc ctg ggc aac ggc ata gcc ctg tgc ggc ttc tgc ttt cac 502
 Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Ile Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His 45
 atg aag acc tgg aag tca agc act atc taa ctt ttc aac ttg gct gfg 550
 Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val 65
 gcc gat ttt ctc ctc atg atc tgc tta ccc ctt cgg aca gac taa taa 598
 Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg Thr Asp Tyr Tyr 75
 ctc aga cgc aga cao tgg att ttt tgg gat atc gcc tgc ctg ctg gtc 646
 Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Phe Gly Asp Ile Ala Cys Arg Leu Val 85
 ctc ttc aag ctg gcc atc aat agg gcc ggg agc att gtc ttc ctc act 694
 Leu Phe Lys Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr 105
 gtg gtg gct gtg gat agg tat ttc aaa ggc gtc cac ccc cac cat atg 742
 Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Met 125
 gtg aat gcc atc tcc aac cgg act gcc gcc gcc aac gcc tgt gtc ctc 790
 Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Thr Ala Cys Val Leu 135
 tgg act tgg gtc atc ttg ggg act gta tat ctt ctt atg agt agt ccc 838
 Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Met Glu Ser His 155

【図 2 B】

FIG. 2B

ctg tgt stg cag ggg aca ctg tog tcc tgt gag agc ttc atc atg gag 886
 Leu Cys Val Glu Gly Thr Leu Ser Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu 165
 tca gcc aac ggg tgg cac gat gtc atg ttc cag ctg gag ttc ttc ctg 934
 Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Val Met Phe Glu Leu Glu Phe Phe Leu 180
 ccc ctg aca atc atc tgc ttc tgc tgc gtc aac gtt gtt tgg agc ctg 982
 Pro Leu Thr Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Val Asn Val Val Trp Ser Leu 200
 aga cgg agg cag cag ctg acc aga cag gct cgg atg agg agg gcc acc 1030
 Arg Arg Arg Glu Glu Leu Thr Arg Arg Glu Ala Arg Met Arg Arg Ala Thr 215
 cgg ttc atc atg gtg gtg gct tct gtg ttc atc acg tgt taa ctg ccc 1078
 Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro 230
 agc gtg ctg gct agg ctc taa ttc ctc tgg acg gtg ccc act agt gcc 1126
 Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Thr Trp Val Pro Thr Ser Ala 245
 tgt gac ccc tct gtc cac aca gcc ctc cac gtc acc ctg agc ttc acc 1174
 Cys Asp Pro Ser Val His Thr Ala Leu His Val Thr Leu Ser Phe Thr 260
 taa ctg aac agt atg gct gat ccc ctt gta tat taa ttc taa agc ccc 1222
 Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro 280
 tgc ctc ccc aaa ttc taa gcc aag ctc aca atc tgc agc ctg aag ccc 1270
 Ser Leu Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Thr Ile Cys Ser Leu Lys Pro 295
 aaa cgc cca gaa cgc acg aag acg cgg agc tca gaa gag atg cca att 1318
 Lys Arg Pro Gly Arg Thr Lys Thr Arg Arg Ser Glu Glu Met Pro Ile 310
 tgc aac ctc tgc agt aag ago tcc atc gat ggg gaa aat cgt tcc gat 1366
 Ser Asn Leu Cys Ser Lys Ser Ser Ile Arg Gly Ala Asn Arg Ser Glu 325
 agc cca tct gac ggg cag tgg gat ctc caa gtg tgt tgaatgcaat 1412
 Arg Pro Ser Asp Gly Glu Thr Asp Leu Glu Val Cys 340
 taagacaac accccaacaa cgaagcagag aatggagcaa tbtgagctaa atctgaagg 1472
 tggaggaact gaagatgtcc cctcccaact ttagctgtat cttctcaact caggtagaaa 1532
 tggagtcac cctgtgtgac cttttccaga aggttccaaa ccggttggtt gttgttaaat 1592

【図 2 C】

FIG. 2C

actctgatag caatggtgaa ggggcagctg gtgagt-gta aggaacagct ggggtctcgg 1652
 ttaggaaacta cctggagccc gtgtgctttt gcatagctga gaaagagggt atgagctcgg 1712
 ctgggtcttg ttctagctcg gagagagtta acgatctcaa taactctcgt gtatttctcg 1772
 gaectgaanaa aatgaanaat gcactgagtc aatacactta ttctcagctg agcgagaccc 1832
 tttaactgcag gacacccgga cctagccttt ttttaaatc ttctctgggg agctctcaaa 1892
 ctttccaagg ttgaacatc cagcttgccc agggggggcg caaaaagatc ctattctaac 1952
 ctgtctggcg ccaagatatt ttgtgatatt taagtgtttt cactctttgt tttttttttg 2012
 ttgcatttc aaagaagatg ctgagggant tgcacactg atatacgtta tctgttctcc 2072
 agtgggaact gagagcctgt ttaaggcagc aatggctggg ggggggtgct tctgttatt 2132
 tgggtgggtt taattcaagc atggttgttc ttaactgntt aatgcagtga tttagctga 2192
 aatctctctc tctcaagctt ttgtttaac cagagtatgt tgtcccaccc tgtccagcat 2252
 cctgtctgtt ttgtcttttg gtctgggca ttgaacttgg gaacttattc gagccaggca 2312
 agcactgacc actgaactgc actcccaaac ccttctgccc ccttttagct gtgagttgt 2372
 tagccaactt ttggggagaa gcaagcact agaggtggca gcaacagttt agctcaatgt 2432
 cctttctgta gtgtctagac ttctgttcag ccaatcgggt cctcatctgg gggcctccct 2492
 caagcaacta tgttctccaa aatactacc agaattctca cagctagggt attctgtgaa 2552
 agtccaggtt gccctctgct tggagaagga gaactagaat cgtgttaac cttagtccaa 2612
 ctttcaagcc acaaaagtgg tgacagcat taactctctc cagttccacg ggtactctcc 2672
 ccaggggaagg gacattgaca ttatgtcta aagacataaa tttagtcttc cttcaagttg 2732
 tccctgtggt tctcttggcc agaggtgttg aagctaggtt gogaaactca gtctgactgc 2792
 agggctgggt agaaagctca gttagtaaac aggtctgccc caacgccc aacctgagta 2852
 tccctgagac ccaagtggta gggagaaccc aaatcccaaa ggtgtttctg tctccacct 2912
 atgtccagc atgctacat gacgcctatg gacgpgcgc acaccccac accaaatana 2972
 ttaagtcaat aaaaatttta ttggctaac ggtcaagttt gaactttagt ttaagtctt 3032
 attagacatg tctctgtagg gaagactta tttaacccca ctcagtttg agtccagca 3092
 ggggttaatac tgatgccaaa ggggttggga gaaattcaaa tgactgtata cttatagca 3152
 tgagaactct gtgttccaa ggtctgccc gaagaagacc atgtctcgtt agtattgat 3212

【図 3 A】

FIG. 3A

tggtagcgtt gcaagtaacg gtccgaatt cccgggtoga cccacgctc cgtcaaaacta 60
 gaaaagaaa atcgtcccca ggggtgacc cagcgacaag tctgtcgtt ggtctgcatc 120
 agaccccca gctcagactt ggaatgtac gcttttggaa aactgctctc gctcagagc 180
 ctgacccagc tgcaggtctc acctctgtag ggggaatgca gctgtgcatc caggtctgag 240
 agaaaggacc tctgtcggc ttctattcc tgaactgaat tgggtgatga ggttaggggc 300
 ccagctgcca aggggaacca tagtgtcag ataggcagct gtgcctttgt gtcagccacc 360
 tagg atg ctc ttc ctc tct ccc agt gct atg gac aac ggg tog tgc tgt 408
 Met Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys 1
 ctc atc gag ggg gaa ccc atc acc cag gla atg cca cct tta ctc atc 457
 Leu Ile Glu Gly Glu Pro Ile Thr Glu Val Met Pro Pro Leu Leu Ile 20
 ctg gcc ttc ctg ctt gaa gcc ctg ggc aac ggc cta gcc ctg tgt ggt 505
 Leu Ala Phe Leu Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Leu Ala Leu Cys Gly 35
 ttc tgc ttt cac atg aac acc tgg aag tog ago act att taa ctc ttc 553
 Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe 80
 aac ttg gct gta gcc gat ttt ctc ctc atc atc tgc cta ccc ctt cgg 601
 Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg 65
 aca gac tac taa ctc aga cgt agt cat tgg att ttg ggg gat att ccc 649
 Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Leu Gly Asp Ile Pro 80
 tgc cgc ctg gtc ctc ttc atg ctg gcc atg aat agg gcc gga agc att 697
 Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile 100
 gtc ttc ctc act gtg gtc gcc gtg gac aga tat ttc aaa gtg gtc cac 745
 Val Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His 115
 ccc cac cat atg gtg aac gcc atc tcc aat cgg act gca gct gcc atc 793
 Pro His His Met Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Ile 130
 gtc tgt gtc ctc tgg act ttg gtc atc ttg ggc act gtc tat ctt ctg 841
 Val Cys Val Leu Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu 145

【図 2 D】

FIG. 2D

aaataaatag ttgttgcaaa actataatcg ctccaaaaa 3251

【図 3 B】

FIG. 3B

```
atg gag agt cac ctg tgt gtg cgg ggg atg gtg tca tct tgt gag agt 889
Met Glu Ser His Leu Cys Val Arg Gly Met Val Ser Ser Cys Glu Ser
160 165 170 175

ttc atc atg gag tca gcc aac ggg tgg cac gat atc atg ttc cag ctg 937
Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Ile Met Phe Gln Leu
180 185 190

gag ttc ttc ctg ccc ctg acc atc atc ttg ttc tgc tcc ttc aaa gtt 985
Glu Phe Phe Leu Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Phe Lys Val
195 200 205

gtt tgg agc ctg aga cag agg caa cag ctg acc aga cag gct cgg atg 1033
Val Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Ket
210 215 220

agg agg gcc acc cgg ttc atc atg gtg gtg gct tcc gtg ttc atc acg 1081
Arg Arg Ala Thr Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr
225 230 235

tgt tac ctg ccc agc gtg ttg ggg agg ctc tac ttc ctc tgg acg gtg 1129
Cys Tyr Leu Pro Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val
240 245 250 255

ccc tcc agt gct tgt gac ccc tct gtc aac ata gct ctc cat gtc acc 1177
Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val His Ile Ala Leu His Val Thr
260 265 270

ctg agt ctc acc tac ctg aac agc atg ctg gac cct ctt gtg tac tac 1225
Leu Ser Leu Thr Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr
275 280 285

ttt tca agc ccc tog ttc ccc aaa ttc tac gcc aag ctc aaa atc cgc 1273
Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Lys Ile Arg
290 295 300

agc ttg aaa ccc aga cgc cca gga cgc tog cag gca cgg agg tog gaa 1321
Ser Leu Lys Pro Arg Arg Pro Gly Arg Ser Gln Ala Arg Arg Ser Glu
305 310 315

geg atg cca att tog aat ctc tgt cgt aag agt tcc acc gat gtg gta 1369
Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Cys Arg Lys Ser Ser Thr Asp Val Val
320 325 330 335

aat agt tcc cag agg cgg tct gac ggg cag tgg ggt ctc caa gtg tgt 1417
Asn Ser Ser Gln Arg Pro Ser Asp Gly Gln Trp Gly Leu Gln Val Cys
340 345 350

tgaatgccat gaagacaaat ggcccagcag caaagcagag acctggggcna ctgtgagtta 1477
aatctgaagg gtgagggaact tgaanaatga cagcccccnc ccccccacca cccgcccgcc 1537
cgcccgcgtc tttctcagct gtgtctttct cactcaagta gaagcaaat ctaaaaaata 1597
```

【図 3 C】

FIG. 3C

```
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggcggcgg ctctagagga tocaagetta cgtacgcgtg 1657
catgcgcgct c 1668
```

【図 4】

FIG. 4

TM1

hu_GPCR 1 MYNGSCCRIEGDTISQVMPPLLI~~VAFVLGALGNGVALCGFCF~~ 42
mu_GPCR 1 MPVLSPTAMDNGSCCLIEGEPISQVMPPLLL~~LVFVLGALGNGIALCGFCF~~ 50
ra_GPCR 1 MLFLSPSAMDNGSCCLIEGEPITQVMPPLLL~~LAFLLGALGNGIALCGFCF~~ 50
* * * * *

TM2 細胞外ループ 1

hu_GPCR 43 HMKTWKPSTVYLFNLAVADFLLMICLPFR~~TDYLLRRRHWA~~FGDIPCRVGL 92
mu_GPCR 51 HMKTWKSSTIYLFNLAVADFLLMICLP~~LR~~TDYLLRRRH~~WIFGDIACRLV~~ 100
ra_GPCR 51 HMKTWKSSTIYLFNLAVADFLLMICLP~~LR~~TDYLLRRRH~~WILGDI~~PCRLV~~L~~ 100
* * * * *

TM3 TM4

hu_GPCR 93 FTLAMNRAGSIVFLTVVAADRYFKVVHPHHAVNTISTRVAAGIVCTLWAL 142
mu_GPCR 101 FKLAMNRAGSIVFLTVVAADRYFKVVHPHHMVNAISNR~~TAAATACVLWTL~~ 150
ra_GPCR 101 FMLAMNRAGSIVFLTVVAADRYFKVVHPHHMVNAISNR~~TAAAI~~CVLW~~TL~~ 150
* * * * *

細胞外ループ 2 TM5

hu_GPCR 143 VILGTVYLLLENHLCVQETAVSCESFIMESANGWHDIMFQ~~LEFFFMPLGII~~ 192
mu_GPCR 151 VILGTVYLLMESHLCVQGTLSCESFIMESANGWHDV~~MFQLEFFLPLTII~~ 200
ra_GPCR 151 VILGTVYLLMESHLCVRGMVSSCESFIMESANGWHDIMFQ~~LEFFLPLTII~~ 200
* * * * *

TM6

hu_GPCR 193 LFCSFKIVWSLRRRQQLARQARMKATRFIMVVAIVFITCYLPSVSARLY 242
mu_GPCR 201 LFCSVNVVWSLRRRQQLTRQARMRRATRFIMVVASVFITCYLPSVLARLY 250
ra_GPCR 201 LFCSFKVWSLRQRQQLTRQARMRRATRFIMVVASVFITCYLPSVLARLY 250
* * * * *

細胞外
ループ 3 TM7

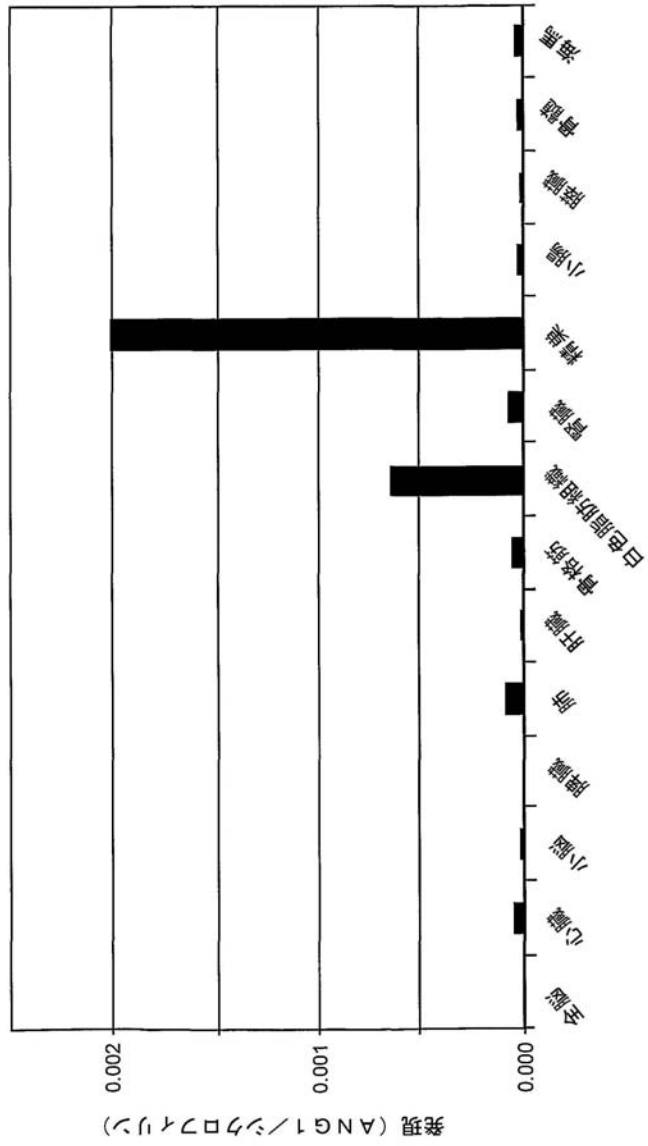
hu_GPCR 243 FLWTVPSSACDPSVHGALHITLSFTYMNSMLDPLVYFSSPSFPKFYNKL 292
mu_GPCR 251 FLWTVPTSACDPSVHTALHVTLSFTYLSMLDPLVYFSSPSLPKFYAKL 300
ra_GPCR 251 FLWTVPSSACDPSVHTALHVTLSTYLSMLDPLVYFSSPSFPKFYAKL 300
* * * * *

hu_GPCR 293 KICSLKPKQPGHSKTQRPEEMPISNLGRRSCISVANSFQSQSDGQWDPHI 342
mu_GPCR 301 TICSLKPKRPGRTKTRRSEEMPISNLCSKSSIDGANRSQRPSDGQWDLQV 350
ra_GPCR 301 KIRSLKPRRPGRSQARRSEEMPISNLCKSSTDVVNSSQRPSDGQWGLQV 350
* * * * *

hu_GPCR 343 VEW 346
mu_GPCR 351 C 351
ra_GPCR 351 C 351

【図 5】

FIG. 5



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083736 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/705

(74) Agent: ZUHN, Donald; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/04397

(22) International Filing Date: 14 February 2002 (14.02.2002)

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/269,040 14 February 2001 (14.02.2001) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/269,040 (CON) Filed on 14 February 2001 (14.02.2001)

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (*for all designated States except US*): AMGEN, INC. [US/US]; Amgen, Inc. M/S 27-4-A, One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).

Published:

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): ELLIOTT, Steven, G. [US/US]; 1040 Golden Crest Avenue, Newbury Park, CA 91320 (US); ROGERS, Norma [US/US]; 4042 Milano Place, Moorpark, CA 93021 (US); BUSSE, Leigh, Anne [US/US]; 887 Yearling Court, Camarillo, CA 93010 (US).

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



WO 02/083736 A2

(54) Title: G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides G-Protein Coupled Receptor (GPCR) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing GPCR polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with GPCR polypeptides.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR MOLECULES AND USES THEREOF

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application No. 60/269,040, filed on February 14, 2001, the disclosure of which is explicitly incorporated by reference herein.

Field of the Invention

The present invention relates to G-Protein Coupled Receptor (GPCR) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also relates to selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing GPCR polypeptides. The invention further relates to pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with GPCR polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression, and manipulation of nucleic acid molecules and the deciphering of the human genome have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics. Rapid nucleic acid sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping sequences into partial and entire genomes and the identification of polypeptide-encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks. The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides may confer advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

In spite of the significant technical advances in genome research over the past decade, the potential for the development of novel therapeutics based on the human genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially beneficial polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act as "targets" for therapeutic molecules, have still not been identified. Accordingly, it is an

WO 02/083736

PCT/US02/04397

object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

G-protein Coupled Receptors (GPCRs) comprise a large superfamily of
 5 integral membrane proteins that are critical constituents of the signal transduction
 cascade in mammalian cells. The process of signal transduction effected by members
 of this superfamily involves the binding of an extracellular molecule, such as a
 hormone or neurotransmitter, to the G-protein coupled receptor, the interaction of the
 G-protein receptor with a heterotrimeric G-protein, and the subsequent activation of
 10 an effector molecule by the G-protein (*See Fraser et al., 1994, Prog. Nucleic Acid
 Res. Mol. Biol.* 49:113-56). The characteristic features of GPCR polypeptides include
 seven transmembrane domains of 20-28 hydrophobic residues that span the lipid
 bilayer in an α -helical arrangement, six alternating intracellular and extracellular
 hydrophilic loops connecting the hydrophobic domains, and an extracellular amino-
 15 terminal region and intracellular carboxyl-terminal region (*See Fraser et al., 1994*).

Over the past fifteen years, nearly 350 therapeutic agents targeting G- protein
 coupled receptors have been successfully introduced onto the market, demonstrating
 that G-protein coupled receptors have an established, proven history as therapeutic
 targets for the treatment of human disease. Clearly there is a need in the art for the
 20 identification and characterization of other members of this superfamily that may play
 a role in diagnosing, treating, ameliorating, or preventing diseases or disorders.

Summary of the Invention

The present invention relates to novel GPCR nucleic acid molecules and
 25 encoded polypeptides.

The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising:

- (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID
 NO: 3, or SEQ ID NO: 5;
- (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of
 30 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (c) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately
 stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of either (a) or (b);
 or

WO 02/083736

PCT/US02/04397

(d) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of either (a) or (b).

The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising:

5 (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of 10 the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of (a);

(c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of (a) or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the 15 polypeptide fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic;

(d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

20 (e) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (d); or

(f) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (d).

25

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative 30 amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid

WO 02/083736

PCT/US02/04397

insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, an amino acid insertion, an amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (f); or

(h) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (e).

The present invention provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising:

(a) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(b) an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

WO 02/083736

PCT/US02/04397

- (c) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic; or
- 5 (d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 or the amino acid sequence of either (a) or (b).

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising:

- 10 (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 15 (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
- 20 (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, an amino acid insertion, an amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
- 25 30

The invention still further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one conservative amino acid substitution that is a aspartic acid at position 2; leucine at position 8;

WO 02/083736

PCT/US02/04397

glutamic acid at position 12; proline at position 13; threonine at position 15; leucine at position 24; valine at position 25; leucine at position 27; isoleucine or leucine at position 35; serine at position 49; isoleucine at position 52; isoleucine at position 82; leucine at position 83; alanine at position 87; leucine at position 90; valine at position 91; lysine or methionine at position 94; valine at position 111; methionine at position 123; alanine at position 126; N at position 129; threonine at position 131; alanine at position 134; threonine at position 135; alanine at position 136; valine at position 138; threonine at position 141; methionine at position 152; serine at position 154; arginine at position 159; glycine at position 160; methionine at position 161; leucine or valine at position 162; serine at position 163; valine at position 179; leucine at position 187; threonine at position 190; valine at position 197; asparagine at position 198; valine at position 199; glutamine at position 205; threonine at position 210; arginine at position 216; arginine at position 217; serine at position 227; leucine at position 238; threonine at position 249; threonine or isoleucine at position 258; valine at position 262; leucine at position 266; leucine at position 269; leucine at position 285; alanine at position 290; threonine at position 293; arginine at position 295; arginine at position 300; arginine at position 301; arginine at position 304; threonine at position 305; glutamine at position 306; alanine at position 307; arginine at position 308; serine at position 310; glycine at position 319; serine at position 320; lysine at position 321; serine at position 322; threonine at position 324; aspartic acid at position 325; glycine at position 326; valine at position 327; arginine at position 329; serine at position 330; arginine at position 332; proline at position 334; glycine at position 339; leucine at position 340; glutamine at position 341; and valine at position 342; wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

25

Also provided are fusion polypeptides comprising GPCR amino acid sequences.

The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing a GPCR polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced. Isolation of the expressed polypeptide is described as optional because there may be instances where it is desired to express the polypeptide

30

WO 02/083736

PCT/US02/04397

on the cell surface or on a cell membrane for use in screening methods for the identification of agonists or antagonists of GPCR activity.

5 A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a GPCR polypeptide is also encompassed by the invention. The GPCR nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of a GPCR polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the GPCR nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that prevents expression of endogenous GPCR polypeptide (*i.e.*, generates a transgenic animal possessing a GPCR polypeptide gene knockout). The
10 transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

Also provided are derivatives of the GPCR polypeptides of the present invention.

15 Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the GPCR polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the invention and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical
20 compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

The GPCR polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders,
25 including those recited herein.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule that binds to a GPCR polypeptide. The method comprises contacting a GPCR polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises
30 determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a GPCR polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of GPCR polypeptide or on the activity of GPCR polypeptide.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or decreasing) levels of a GPCR polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding a GPCR polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a GPCR polypeptide may be administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and anti-sense therapy as further described herein.

GPCR polypeptides can be used for identifying ligands thereof. Various forms of "expression cloning" have been used for cloning ligands for receptors (*See, e.g.*, Davis *et al.*, 1996, *Cell*, 87:1161-69). These and other GPCR ligand cloning experiments are described in greater detail herein. Isolation of the GPCR ligand(s) allows for the identification or development of novel agonists and/or antagonists of the GPCR signaling pathway. Such agonists and antagonists include GPCR ligand(s), anti-GPCR ligand antibodies and derivatives thereof, small molecules, or antisense oligonucleotides, any of which can be used for potentially treating one or more diseases or disorders, including those recited herein.

Brief Description of the Figures

Figures 1A-1B illustrate the nucleotide sequence of the human GPCR gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence of human GPCR polypeptide (SEQ ID NO: 2);

Figures 2A-2D illustrate the nucleotide sequence of the murine GPCR gene (SEQ ID NO: 3) and the deduced amino acid sequence of murine GPCR polypeptide (SEQ ID NO: 4);

Figures 3A-3C illustrate the nucleotide sequence of the rat GPCR gene (SEQ ID NO: 5) and the deduced amino acid sequence of rat GPCR polypeptide (SEQ ID NO: 6);

Figure 4 illustrates the amino acid sequence alignment of human GPCR polypeptide (hu_GPCR; SEQ ID NO: 2), murine GPCR polypeptide (mu_GPCR; SEQ ID NO: 4) and rat GPCR polypeptide (ra_GPCR; SEQ ID NO: 6). Putative transmembrane domains are indicated (underling);

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Figure 5 illustrates the level of GPCR mRNA expression as determined in several human tissues by quantitative PCR.

Detailed Description of the Invention

5 The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

Definitions

10 The terms "GPCR gene" or "GPCR nucleic acid molecule" or "GPCR polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, and nucleic acid molecules as defined
15 herein.

The term "GPCR polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

20 The term "GPCR polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of GPCR polypeptide amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

25 The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated
30 nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N⁶-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N⁶-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N⁶-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxymethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "vector" is used to refer to any molecule (e.g., nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "GPCR polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 and related polypeptides. Related polypeptides include GPCR polypeptide fragments, GPCR polypeptide orthologs, GPCR polypeptide variants, and GPCR polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. GPCR polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "GPCR polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. The term "GPCR polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of GPCR polypeptide orthologs, GPCR polypeptide derivatives, or GPCR polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by GPCR polypeptide allelic variants or GPCR polypeptide splice variants. GPCR polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a GPCR polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids, or more than about 200 amino acids. Such GPCR polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to GPCR polypeptides.

The term "GPCR polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to GPCR polypeptide amino acid sequence as set forth in any

WO 02/083736

PCT/US02/04397

of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. For example, mouse and human GPCR polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "GPCR polypeptide variants" refers to GPCR polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or GPCR polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or GPCR fusion polypeptides) as compared to the GPCR polypeptide amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (*e.g.*, GPCR polypeptide allelic variants, GPCR polypeptide orthologs, and GPCR polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such GPCR polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "GPCR polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, GPCR polypeptide fragments, GPCR polypeptide orthologs, or GPCR polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "GPCR polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by GPCR polypeptide allelic variants or GPCR polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "mature GPCR polypeptide" refers to a GPCR polypeptide lacking a leader sequence. A mature GPCR polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like.

The term "GPCR fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, GPCR polypeptide fragments, GPCR polypeptide orthologs, GPCR

WO 02/083736

PCT/US02/04397

polypeptide variants, or GPCR derivatives, as defined herein. The term "GPCR fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by GPCR polypeptide allelic variants or GPCR polypeptide splice variants, as defined herein.

5 The term "biologically active GPCR polypeptides" refers to GPCR polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In addition, a GPCR polypeptide may be active as an immunogen; that is, the GPCR polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

10 The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated
15 polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or
20 research use.

The term "identity," as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or
25 polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithms").

30 The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity," "similarity" refers to a measure of relatedness that includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example,

WO 02/083736

PCT/US02/04397

there are five more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the percent similarity between two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

5 The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

10 The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a GPCR polypeptide or GPCR nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the GPCR polypeptides as set forth herein.

15 The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the GPCR polypeptide, GPCR nucleic acid molecule, or GPCR selective binding agent as a pharmaceutical composition.

20 The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for a GPCR polypeptide. As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human GPCR polypeptides and not to bind to human non-GPCR polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat GPCR polypeptides.

30 The term "transduction" is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, e.g., Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Such related GPCR polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

Related nucleic acid molecules also include fragments of GPCR nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids, or more than 200 amino acid residues of the GPCR polypeptide of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

In addition, related GPCR nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the GPCR nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the GPCR sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of GPCR polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 65-68°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used – however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization

WO 02/083736

PCT/US02/04397

experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. *See Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - 600/N - 0.72(\% \text{formamide})$$

where N is the length of the duplex formed, $[\text{Na}^+]$ is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 50-65°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, "moderately stringent conditions" of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly stringent conditions" and "moderately stringent conditions." For example, at 0.015 M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

$T_m = 2^{\circ}\text{C per A-T base pair} + 4^{\circ}\text{C per G-C base pair}$

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. *See Suggs et al., Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown and Fox, eds., 1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the T_m of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

Conservative modifications to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of GPCR polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of GPCR polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis."

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

WO 02/083736

PCT/US02/04397

- 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;
 3) acidic: Asp, Glu;
 4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human GPCR polypeptide that are homologous with non-human GPCR polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. The hydropathic indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those that are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1);

WO 02/083736

PCT/US02/04397

serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those that are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the GPCR polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the GPCR polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

Table I
Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

- A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be
- 5 changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a GPCR polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and
- 10 portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the GPCR molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a GPCR polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute
- 15 chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.
- 20 Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a GPCR polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of GPCR polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of GPCR polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins that have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. See Holm *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds

WO 02/083736

PCT/US02/04397

in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

Additional methods of predicting secondary structure include "threading"

5 (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253:164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58), and "evolutionary linkage" (See Holm *et al.*, *supra*, and Brenner *et al.*, *supra*).

10 Preferred GPCR polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In one embodiment, GPCR polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in any
15 of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions
20 that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred GPCR variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are
25 deleted or substituted with another amino acid (*e.g.*, serine) as compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Cysteine variants are useful when GPCR polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native
30 protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

In other embodiments, GPCR polypeptide variants comprise an amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the

WO 02/083736

PCT/US02/04397

polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or an amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. GPCR polypeptide variants also comprise an amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. GPCR polypeptide variants further comprise an amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, an amino acid insertion, an amino acid deletion, carboxyl-terminal truncation, or amino-terminal truncation and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

In further embodiments, GPCR polypeptide variants comprise an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In preferred embodiments, GPCR polypeptide variants comprise an amino acid sequence that is at least about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical percent to the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. GPCR polypeptide variants possess at least one activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other GPCR polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a GPCR fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide

WO 02/083736

PCT/US02/04397

which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other GPCR polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other GPCR polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other GPCR polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

25

Table II

Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> ,

WO 02/083736

PCT/US02/04397

			1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig C γ 1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the GPCR polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of a GPCR polypeptide fragment (*e.g.*, the predicted extracellular portion of GPCR polypeptide).

The resulting GPCR fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides are readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to those described in *Computational Molecular Biology* (A.M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D.W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, *supra*). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the claimed polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span," as determined by the algorithm). A gap opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 0.1X the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix is also used by the algorithm (see Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supp. 3 1978)(PAM250 comparison matrix); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915-19 (BLOSUM 62 comparison matrix)).

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, *supra*);

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

5

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following:

10

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

15

Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, and thresholds of similarity may be used, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

20

25

Nucleic Acid Molecules

30

The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of a GPCR polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and/or *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). The invention provides for

5 nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

Where a gene encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express

10 the GPCR polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives

15 obtained from the screening.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of GPCR polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other

20 binding partner (*e.g.*, receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to

25 express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of a GPCR polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid

30 sequence of a GPCR polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded GPCR polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from

WO 02/083736

PCT/US02/04397

poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region
5 between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester,
10 phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these
15 methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of a GPCR gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the GPCR polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is
20 designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of a GPCR polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the GPCR polypeptide and host cell selected for
25 expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version
30 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding GPCR polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be

WO 02/083736

PCT/US02/04397

produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a GPCR polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a GPCR polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*, glycosylated and/or phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, *see Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the GPCR polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or

WO 02/083736

PCT/US02/04397

another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the GPCR polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified GPCR polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences that normally function to regulate GPCR polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein – other than the GPCR gene flanking sequences – will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of

WO 02/083736

PCT/US02/04397

suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of a GPCR polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (e.g., SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and

WO 02/083736

PCT/US02/04397

thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes a GPCR polypeptide. As a result, increased quantities of GPCR polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of a GPCR polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct a GPCR polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of a GPCR nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of a GPCR polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with a GPCR nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the GPCR nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a GPCR polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted GPCR polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of a GPCR nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native GPCR polypeptide signal sequence joined to a GPCR polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to a GPCR polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native GPCR polypeptide signal sequence, the signal sequence is

WO 02/083736

PCT/US02/04397

substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native GPCR polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell
5 expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a
10 particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site,
15 attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired GPCR polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a
20 polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the GPCR gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking
25 sequences and the GPCR gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when a GPCR cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that it does not
30 interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the GPCR polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding GPCR polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native GPCR promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of a GPCR nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase; a tryptophan (*trp*) promoter system; and hybrid promoters such as the *tac* promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Additional promoters which may be of interest in controlling GPCR gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bemoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Komaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a GPCR polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300

WO 02/083736

PCT/US02/04397

bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to a GPCR nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those that are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (International Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid; Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (*e.g.*, TOPO[™] TA Cloning[®] Kit and PCR2.1[®] plasmid derivatives; Invitrogen), and mammalian, yeast or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives; Clontech).

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a GPCR polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide

WO 02/083736

PCT/US02/04397

expression. The transformation of an expression vector for a GPCR polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected
5 will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under
10 appropriate conditions, synthesizes a GPCR polypeptide that can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as
15 glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells
20 (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines,
25 and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines
30 include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (e.g., HB101, DH5 α , DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., other *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in Kitts *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14:810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72; and Lucklow *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 67:4566-79. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

One may also use transgenic animals to express glycosylated GPCR polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce GPCR polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

Polypeptide Production

Host cells comprising a GPCR polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of a GPCR polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If a GPCR polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the GPCR polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For a GPCR polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by centrifugation.

If a GPCR polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized GPCR polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the GPCR polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

In some cases, a GPCR polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually
5 above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent
10 plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cupric chloride, dithiothreitol (DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be
15 used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a GPCR polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant
20 after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

The purification of a GPCR polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (GPCR polypeptide/hexaHis) or other small
25 peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or *myc* (Invitrogen) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel.
30 Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of GPCR polypeptide/polyHis. *See, e.g., Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Additionally, GPCR polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to a GPCR polypeptide.

Other suitable procedures for purification include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, HPLC, electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

GPCR polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized GPCR polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized GPCR polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding GPCR polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural GPCR polypeptide.

Another means of obtaining GPCR polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the GPCR polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The presence of the GPCR polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced GPCR polypeptide or peptide fragments thereof.

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for GPCR polypeptide. See, *e.g.*, Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure

WO 02/083736

PCT/US02/04397

involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened
5 for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

U.S. Patent Nos. 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells
10 which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in International Pub. No. WO99/15650, filed by Athersys, Inc. Known as "Random
15 Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell that is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate
20 recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create
25 comprehensive GPCR polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (e.g., plant, mouse, etc.).

30 Synthesis

It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Selective Binding Agents

The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more GPCR polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules.

- 5 Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary GPCR polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the GPCR polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to a GPCR polypeptide receptor.

- Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind
10 GPCR polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs); recombinant; chimeric; humanized, such as complementarity-determining region (CDR)-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an
15 epitope on the GPCR polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

- 20 Polyclonal antibodies directed toward a GPCR polypeptide generally are produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of GPCR polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a GPCR polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine
25 thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-GPCR antibody titer.

- Monoclonal antibodies directed toward GPCR polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by
30 continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are

WO 02/083736

PCT/US02/04397

hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with GPCR polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind GPCR polypeptides. Using transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production such antibodies are produced by immunization with a GPCR polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immuno.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals (*i.e.*, those having less than the full complement of modifications) are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino

WO 02/083736

PCT/US02/04397

acid sequences, including variable regions that are immunospecific for these antigens. See International App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, International App. Nos. PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in International App. No. PCT/US98/17364, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (*e.g.*, human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-GPCR antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of GPCR polypeptides. The antibodies will bind GPCR polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-GPCR antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In , or ^{67}Ga ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase,

WO 02/083736

PCT/US02/04397

β -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184:138-63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (*e.g.*, a GPCR polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an GPCR polypeptide) for binding with a limited amount of anti-GPCR antibody. The amount of a GPCR polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte that remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody that is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-GPCR antibodies, are also useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a GPCR polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a GPCR polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a GPCR polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the

WO 02/083736

PCT/US02/04397

selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of a GPCR polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an anti-GPCR polypeptide antibody that is capable of interacting with a GPCR polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating GPCR polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-GPCR polypeptide antibodies, are identified by screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising GPCR selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting GPCR polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

Microarrays

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence (*e.g.*, mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the GPCR molecules of the invention, including, but not limited to: the identification and validation of GPCR disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related GPCR molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and enhancing related GPCR polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of GPCR polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. GPCR polypeptide derivatives are modified in a manner that is different – either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other GPCR polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2 kDa to about 100 kDa (the term “about” indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C₁-C₁₀), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules that may be used to prepare covalently attached GPCR polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for

WO 02/083736

PCT/US02/04397

preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of:
(a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other GPCR polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the GPCR polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,234,784.

The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (*see* U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, GPCR polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/GPCR polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/GPCR polypeptide molecules. GPCR polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present GPCR polypeptide derivatives include those described herein for GPCR polypeptides. However, the GPCR polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Genetically Engineered Non-Human Animals

5 Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which the genes encoding native GPCR polypeptide have been disrupted (i.e., "knocked out") such that the level of expression of GPCR polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

10 The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of a GPCR gene for that animal or a heterologous GPCR gene is over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and International Pub. No. WO 94/28122.

15 The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the GPCR polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (e.g., by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native GPCR polypeptides.

20 These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the GPCR gene. In certain embodiments, the amount of GPCR polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

Assaying for Other Modulators of GPCR Polypeptide Activity

WO 02/083736

PCT/US02/04397

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of GPCR polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate GPCR polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

“Test molecule” refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a GPCR polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a GPCR polypeptide. However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate GPCR polypeptide activity indirectly, such as by affecting GPCR gene expression, or by binding to a GPCR polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a GPCR polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

Methods for identifying compounds that interact with GPCR polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a GPCR polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with a GPCR polypeptide, and the extent of the interaction is measured. The test molecule can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

In certain embodiments, a GPCR polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with GPCR polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate GPCR polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding a GPCR polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of GPCR polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a test molecule has been identified as interacting with a GPCR polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or decrease GPCR polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test molecule with GPCR polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and immunoassays. In general, a test molecule is incubated with a GPCR polypeptide for

WO 02/083736

PCT/US02/04397

a specified period of time, and GPCR polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with GPCR polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay.

5 Alternatively, modified forms of GPCR polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In the event that GPCR polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (*e.g.*, a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a GPCR polypeptide to the
10 corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of a GPCR polypeptide to its binding partner. In one assay, a GPCR polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled GPCR polypeptide binding partner (for example, iodinated
15 GPCR polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the GPCR polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of
20 control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing GPCR polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled GPCR polypeptide, and determining the extent of GPCR polypeptide binding. *See, e.g.*,
25 *Current Protocols in Molecular Biology*, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, a GPCR polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase
30 (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorimetrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a GPCR polypeptide or to a GPCR polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

A GPCR polypeptide or a GPCR polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation, the
5 beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a GPCR polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary protein passing through the column. The formation of a complex between a GPCR polypeptide and its binding
10 partner can then be assessed using any of the techniques described herein (*e.g.*, radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule that increases or decreases the formation of a complex between a GPCR polypeptide binding protein and a GPCR polypeptide binding partner is a surface plasmon
15 resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either GPCR polypeptide or a GPCR polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be
20 injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by the detector system.

25 In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a GPCR polypeptide and a GPCR polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound.
30 The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between a GPCR polypeptide and GPCR polypeptide binding partner. The assays

WO 02/083736

PCT/US02/04397

may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a GPCR polypeptide and a GPCR polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either GPCR polypeptide or GPCR polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of a GPCR polypeptide to cells expressing GPCR polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a GPCR polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the GPCR gene. In certain embodiments, the amount of GPCR polypeptide or a GPCR polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

Internalizing Proteins

The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See, e.g., Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 7) of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara

WO 02/083736

PCT/US02/04397

et al., 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 8), which penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.

- 5 Cells treated with a *tat*- β -gal fusion protein will demonstrate β -gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.

- 10 It will thus be appreciated that the *tat* protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the *tat* protein sequence, a GPCR antagonist (such as an anti-GPCR selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of a GPCR molecule. As used herein, the term
15 "GPCR molecule" refers to both GPCR nucleic acid molecules and GPCR polypeptides as defined herein. Where desired, the GPCR protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. *See also*, Straus, 1999, *Science* 285:1466-67.

20 Cell Source Identification Using GPCR Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a GPCR polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain
25 embodiments, nucleic acids encoding a GPCR polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-GPCR polypeptide antibodies to test for the presence of GPCR polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are of the types described herein.

30

GPCR Polypeptide Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such GPCR polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of a GPCR polypeptide or a GPCR nucleic acid molecule in

WO 02/083736

PCT/US02/04397

admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more GPCR polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides – preferably sodium or potassium chloride – or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. See *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled

WO 02/083736

PCT/US02/04397

artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the GPCR molecule.

5 The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are
10 further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, GPCR polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional
15 formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the GPCR polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The GPCR polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or
20 for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range
25 of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired GPCR molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile
30 distilled water in which a GPCR molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product

WO 02/083736

PCT/US02/04397

which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

5 In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, GPCR polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. GPCR polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in
10 International Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, GPCR polypeptides that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in
15 the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the GPCR polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable
20 oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of GPCR polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another
25 appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

30 Additional GPCR polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving GPCR polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, biodegradable microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those

WO 02/083736

PCT/US02/04397

skilled in the art. *See, e.g.*, International App. No. PCT/US93/00829, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable
5 polymer matrices in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.*
10 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. *See, e.g.*, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046,
15 and 143949.

The GPCR pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and
20 reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in
25 sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (*e.g.*, lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first
30 container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (*e.g.*, liquid syringes and lyosyringes).

The effective amount of a GPCR pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the GPCR molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 µg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 5 µg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the GPCR molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, *e.g.*, orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use GPCR polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to GPCR polypeptide

WO 02/083736

PCT/US02/04397

pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, a GPCR polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the GPCR polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the like) with one or more GPCR polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production methods) for both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent GPCR gene, or an under-expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of GPCR polypeptides.

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44:419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-87) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous recombination techniques are described

WO 02/083736

PCT/US02/04397

in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; International App. No. PCT/US90/07642, and International Pub No. WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of a GPCR polypeptide, *e.g.*, flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired GPCR polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of the desired GPCR polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the GPCR gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a GPCR gene.

In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA that includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct

WO 02/083736

PCT/US02/04397

are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, GPCR polypeptide production from a cell's endogenous GPCR gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (*i.e.*, 5' to) the cell's endogenous genomic GPCR polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic GPCR polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic GPCR polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased GPCR polypeptide production from the cell's endogenous GPCR gene.

A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic GPCR polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin.*

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Biotechnol., 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased GPCR polypeptide production from the cell's endogenous GPCR gene.

5 An additional approach for increasing, or causing, the expression of GPCR polypeptide from a cell's endogenous GPCR gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased GPCR polypeptide production from the cell's endogenous GPCR gene. This method includes the introduction of a non-naturally
10 occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased GPCR polypeptide production from the cell's endogenous GPCR gene results.

The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target
20 gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the
25 preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of GPCR polypeptide presented herein, a piece of DNA that is
30 complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any

WO 02/083736

PCT/US02/04397

additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a GPCR polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

5 GPCR polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing GPCR polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of GPCR polypeptide. Such GPCR polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of GPCR polypeptides or may be recombinant cells whose ability to
10 produce GPCR polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired GPCR polypeptide or with a gene augmenting the expression of GPCR polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a
15 GPCR polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing GPCR polypeptide be of human origin and produce human GPCR polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing GPCR polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human GPCR polypeptide.

20 Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of GPCR polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue.
25 Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce GPCR polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (International Pub. No. WO
30 95/05452 and International App. No. PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters

WO 02/083736

PCT/US02/04397

that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, see U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in
 5 International Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). See also, International Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38:17-23.

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of GPCR polypeptides is also
 10 envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the GPCR gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding a GPCR polypeptide that may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous GPCR gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which
 15 the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (*e.g.*, endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify
 20 transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene
 25 therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

30 In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the GPCR gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a small

WO 02/083736

PCT/US02/04397

molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (*see* International Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

5 An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell.
10 The proteins can be released, however, by administering a drug (*e.g.*, small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. *See Aridor et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and *Rivera et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

15 Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding
20 domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and International Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone), which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then
25 translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and International Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

30 Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline)

WO 02/083736

PCT/US02/04397

linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories Inc.

5 *In vivo* gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding GPCR polypeptide into cells via local injection of a GPCR nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti 1994, *Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding a GPCR polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the
10 targeted cells (*see, e.g.*, Johnson, International Pub. No. WO 95/34670; International App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a GPCR polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus,
15 adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic
20 protein by the delivery of human cells that have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

25 Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (*e.g.*, gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for
30 site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional

WO 02/083736

PCT/US02/04397

methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and International Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

It is also contemplated that GPCR gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

A means to increase endogenous GPCR polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the GPCR polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the GPCR gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene – enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a GPCR polypeptide is to be “turned on” in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the GPCR polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a “homologous recombination construct,” can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease GPCR polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the GPCR gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding GPCR gene. The deletion of the TATA box or the

WO 02/083736

PCT/US02/04397

transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the GPCR polypeptide promoter (from the same or a related species as the GPCR gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

Therapeutic Uses

GPCR nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including those recited herein.

GPCR polypeptide agonists and antagonists include those molecules which regulate GPCR polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity of the mature form of the GPCR polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with GPCR polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of GPCR polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate GPCR polypeptide expression typically include nucleic acids encoding GPCR polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

Since GPCR polypeptide expression has been detected in the fat tissue, GPCR nucleic acid molecules, polypeptides, agonists and antagonists thereof (including, but not limited to, anti-GPCR selective binding agents) may be useful for the treatment or diagnosis of diseases involving fat metabolism. Examples of such diseases include,

WO 02/083736

PCT/US02/04397

but are not limited to, obesity, diabetes, and aberrant lipid metabolism (for example, dislipidemia). The molecules of the present invention may also have application to the treatment of weight loss associated with cancer (*i.e.*, cachexia) and other conditions of abnormal weight loss, such as those relating to AIDS, anorexia nervosa.

5 Other diseases associated with fat metabolism are encompassed within the scope of the invention.

GPCR polypeptides may also function biologically as mediators of inflammation. Molecules which regulate GPCR expression or activation may therefore be useful as agents for the treatment of related diseases or abnormal
10 conditions, including but not necessarily limited to inflammatory diseases mediated by leukotrienes, such as pulmonary disorders (for example, asthma, chronic bronchitis, and related obstructive airway diseases), allergies and allergic reactions (for example, allergic rhinitis, contact dermatitis, and allergic conjunctivitis), angina, cerebral spasm, glomerular nephritis, hepatitis, endotoxemia, uveitis, and allograft
15 rejection.

Since GPCR polypeptide expression has been detected in the testes, GPCR nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof may be useful in diagnosing or treating diseases and conditions affecting the testes. Examples of such diseases and conditions include, but are not limited to, male infertility and
20 testicular carcinoma. Other diseases and conditions associated with the development and function of the testes are encompassed within the scope of this invention.

More broadly, the GPCR molecules of the present invention may provide methods of treating other abnormal conditions related to an excess or insufficient amount of GPCR (signaling) activity. In general, if the activity of the GPCR is in
25 excess, several approaches are available. One approach will comprise administering to a subject an inhibitor compound (antagonist) along with a pharmaceutically acceptable carrier in an amount effective to inhibit activation by blocking binding of the ligand to the GPCR, or by inhibiting a second signal and thereby alleviating the abnormal condition. In another approach, expression of the gene encoding the
30 endogenous GPCR can be inhibited using expression blocking techniques, such as by antisense sequences either internally generated or separately administered.

Agonists or antagonists of GPCR polypeptide function may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth

WO 02/083736

PCT/US02/04397

factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

Other diseases or disorders caused by or mediated by undesirable levels of GPCR polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable
5 levels include excessive levels of GPCR polypeptides and sub-normal levels of GPCR polypeptides.

Uses of GPCR Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not
10 themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the GPCR gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

GPCR nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic
15 assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of a GPCR nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more GPCR polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control
20 sequences (triple helix formation) or to GPCR mRNA. For example, antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of a GPCR gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of the GPCR gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5'
25 end) of each selected GPCR gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding GPCR mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a GPCR polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative
30 inhibitor of one or more GPCR polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected GPCR polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

In addition, a GPCR polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to a GPCR polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of GPCR polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to a GPCR polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a GPCR polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of a GPCR polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the GPCR polypeptide).

GPCR polypeptides can be used to clone GPCR ligands using an "expression cloning" strategy. Radiolabeled (¹²⁵Iodine) GPCR polypeptide or "affinity/activity-tagged" GPCR polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type, cell line, or tissue that expresses a GPCR ligand. RNA isolated from such cells or tissues can then be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (e.g., COS or 293) to create an expression library. Radiolabeled or tagged GPCR polypeptide can then be used as an affinity reagent to identify and isolate the subset of cells in this library expressing a GPCR ligand. DNA is then isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing the GPCR ligand would be many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone containing the GPCR ligand is isolated. Isolation of GPCR ligands is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the GPCR signaling pathway. Such agonists and antagonists include GPCR ligands, anti-GPCR ligand antibodies, small molecules or antisense oligonucleotides.

The human GPCR nucleic acids of the present invention are also useful tools for isolating the corresponding chromosomal GPCR polypeptide genes. The human GPCR genomic DNA can be used to identify heritable tissue-degenerating diseases.

The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

Example 1: Cloning of the Rat GPCR Polypeptide Gene

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze genes encoding rat GPCR polypeptides.

To isolate cDNA sequences encoding rat GPCR polypeptide, a homology-based search of a proprietary expressed sequence tag (EST) database was performed.

- 5 A partial clone from a white adipose tissue cDNA library was found to encode a potential G-protein coupled receptor. To generate the full-length cDNA sequence for GPCR polypeptide, RACE was performed using a rat adipocyte Marathon cDNA RACE kit (Clontech) and the conditions suggested by the manufacturer. Two successive PCR reactions were carried out. In the first reaction (PCR1), the AP1 primer from the Marathon cDNA RACE kit was used with the primer 5'-A-A-G-A-G-G-A-C-C-A-G-G-C-G-G-C-A-G-G-A-A-T-A-T-3' (SEQ ID NO: 9). In the second reaction (PCR2), the AP2 primer from the kit was used with the primer 5'-T-A-T-C-C-C-C-A-A-A-T-C-C-A-A-T-G-C-C-T-A-C-G-3' (SEQ ID NO: 10). The resulting RACE DNA was ligated into the PCRII vector (Invitrogen) and transformed
- 15 into *E. coli*. Positive clones were sequenced, and a consensus sequence was constructed. A full-length clone was obtained using a high fidelity PCR and primers derived from the sequence determined by RACE. Amplification reactions contained rat adipocyte cDNA (prepared with the Marathon cDNA RACE kit), the primers 5'-C-G-G-G-C-A-G-G-T-G-G-T-G-A-T-G-A-G-G-T-T-A-G-3' (SEQ ID NO: 11) and 5'-G-C-T-G-C-T-G-G-G-C-C-A-T-T-T-G-T-C-T-T-C-A-T-3' (SEQ ID NO: 12), 10 μ L reaction buffer (100 mM Tricine, pH 5.7, 25% glycerol, and 425 mM KOAc), 4 μ L of dNTPs (1mM each), 1 μ L of rtTh (Perkin Elmer, 2 U/ μ L), and 1 μ L of Vent polymerase (New England Biolabs, 0.01 U/ μ L), in a total volume of 49 μ L. Reactions were performed at 94°C for 10 seconds, 62°C for 1 minute, and 68°C for 5 minutes for
- 25 35 cycles. When the temperature of the thermal cycler reached 65°C, 1 μ L of 10 mM MgOAc was added. The PCR product obtained was analyzed by agarose gel electrophoresis, and the appropriate fragment was then excised from the gel and purified using a GENECLEAN kit (Bio101; Vista, CA). The purified DNA was cloned using the PCRscript kit (Stratagene; La Jolla, CA) and a clone containing the
- 30 amplified DNA was recovered in *E. coli*. The DNA sequence of the insert was then determined.

A full-length rat GPCR cDNA clone was also isolated from an oligo-dT primed cDNA library constructed from rat white adipose tissue. Total RNA was isolated from female Wistar rat white adipose tissue using TRIzol Reagent (Life

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Technologies; Rockville, MD). Messenger RNA was purified from the total RNA using Dynal Dynabeads. The cDNA was synthesized and cloned into the vector, pSPORT1, using 2.7 µg of mRNA and the Superscript Plasmid System for cDNA synthesis and plasmid cloning (Life Technologies). The cDNA was the introduced into DH10B *E. coli* (Life Technologies) by electroporation. CsCl gradient-purified plasmid DNA was harvested from a 100 ml Terrific Broth culture containing over 1 million unamplified cDNA clones. Using the Genetrapp system (Life Technologies), 5 µg of CsCl gradient purified plasmid cDNA was screened with the primer 5'-T-G-C-T-G-T-C-T-C-A-T-C-G-A-G-G-G-G-A-A-3' (SEQ ID NO: 13).

One-fifth of the rescued plasmid was electroporated in DH10B *E. coli* cells and then plated onto LB agar plates containing 100 µg/ml of ampicillin. Colony hybridization was performed using Hybond N+ nylon membranes (Amersham; Piscataway, NJ) and an end-labeled primer (5'-G-A-A-T-A-G-G-G-C-C-G-G-A-A-G-C-A-T-T-G-T-3'; SEQ ID NO: 14). Hybridized colonies were rescreened by PCR using the primers 5'-C-C-T-C-C-T-C-A-T-C-C-G-A-G-C-C-T-G-T-C-T-G-G-3' (SEQ ID NO: 15) and 5'-C-C-T-T-T-G-T-G-T-C-A-G-C-C-A-C-C-T-A-G-G-A-T-G-C-3' (SEQ ID NO: 16). One positive isolated colony was grown overnight in LB containing 100 µg/ml of ampicillin. Plasmid DNA was isolated using a Plasmid Maxi Kit (Qiagen), and sequenced. Sequence analysis of the full-length cDNA for murine GPCR polypeptide indicated that the murine GPCR gene comprises a 1053 bp open reading frame encoding a protein of 351 amino acids (Figure 3A-3C).

Example 2: Cloning of the Murine GPCR Polypeptide Gene

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze genes encoding murine GPCR polypeptides.

To isolate cDNA sequences encoding murine GPCR polypeptide, the rat GPCR cDNA sequence was used to search a proprietary genomics database. A cDNA clone from a mouse bone marrow cDNA library was identified that matched the 5' end of the rat clone. The clone was recovered and its complete sequence was determined. Sequence analysis of the full-length cDNA for rat GPCR polypeptide indicated that the rat GPCR gene comprises a 1053 bp open reading frame encoding a protein of 351 amino acids (Figures 2A-2D).

Example 3: Cloning of the Human GPCR Polypeptide Gene

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze genes encoding human GPCR polypeptides.

To isolate cDNA sequences encoding human GPCR polypeptide, a ³²P-dCTP labeled 700 bp rat GPCR probe (prepared by PCR from the rat GPCR cDNA sequence using the primers 5'-C-C-T-C-C-T-C-A-T-C-C-G-A-G-C-C-T-G-T-C-T-G-G-3'; SEQ ID NO: 15 and 5'-C-C-T-T-T-G-T-G-T-C-A-G-C-C-A-C-C-T-A-G-G-A-T-G-C-3'; SEQ ID NO: 16) was used to screen a human white adipose tissue cDNA phage library (Clontech) by plaque hybridization. Recombinant phages were plated onto the *E. coli* strain XL1-blue at approximately 5 x 10⁴ transformants per 150 mm LB plate. Positively charged nylon filters were lifted and prehybridized in 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 0.5% SDS, and 200 µg/ml denatured salmon sperm DNA for 3 hours at 45°C. The filters were then hybridized overnight at a temperature of 45°C in the same solution supplemented with 5 ng/ml of labeled probe. The filters were first washed twice in 2x SSC and 0.1% SDS for 20 minutes at room temperature, and then the filters were washed twice in 0.5x SSC and 0.1% SDS at 45°C for 30 minutes. The filters were then exposed to x-ray film with intensifying screens at a temperature of -80°C for 5 days. Positive hybridizing plaques were determined by aligning to duplicate filters. Thirty-six positive plaques were picked and re-plated for a secondary screen using the same methods employed in the primary screening. The secondary screening produced 16 positive plaques.

Recombinant phage identified in the second screen was transduced into the *E. coli* strain BM25.8, which expresses cre-recombinase. The pTriplEx phagemid was excised as a result of cre-recombinase-mediated site-specific recombination at the loxP sites. The infected BM25.8 cells were plated on LB/ampicillin plates and incubated overnight. Positively charged 82 mm filters (NEN; Boston, MA) were lifted as described, and a tertiary screen was performed using the 700 bp labeled rat GPCR probe described herein. Pre-hybridization and hybridization were performed as described herein. Overnight exposure showed that all but two plates contained nearly 100% positive colonies. Two colonies per positive plate were amplified in LB media containing 100 mg/ml ampicillin. The plasmid DNA was prepared and both strands of cDNA insert were sequenced. DNA encoding human GPCR was found to be 2.5 kb in length. Sequence analysis of the full-length cDNA for human GPCR polypeptide indicated that the human GPCR gene comprises a 1038 bp open reading

WO 02/083736

PCT/US02/04397

frame encoding a protein of 346 amino acids (Figures 1A-1B).

Figure 4 illustrates an amino acid sequence alignment of human GPCR polypeptide (hu_GPCR; SEQ ID NO: 2), murine GPCR polypeptide (mu_GPCR; SEQ ID NO: 4) and rat GPCR polypeptide (ra_GPCR; SEQ ID NO: 6). The human GPCR polypeptide shares a 78% identity with both the murine and rat GPCR polypeptides. The murine and rat GPCR polypeptides share a 90% identity. The structure of the human, murine, and rat GPCR polypeptides parallels that of other members of the G-protein coupled receptor family in that each polypeptide possesses seven transmembrane domains.

10

Example 4: GPCR mRNA Expression

Quantitative PCR using the PRISM Taqman system was performed to assess GPCR mRNA expression in multiple human cDNA samples (human poly A+ was obtained from Clontech Laboratories; cDNA was prepared using the SuperScript Amplification System; Gibco BRL). PRISM Taqman reactions were performed using two primers and a fluorogenic probe that were derived from the human GPCR sequence. The data generated was then normalized to the human housekeeper gene cyclophilin and reported as a ratio of GPCR copy number to human cyclophilin copy number. Reactions for the quantitation of human GPCR mRNA expression contained the primers 5'-T-T-C-A-C-G-T-T-G-G-C-C-A-T-G-A-A-C-A-3' (SEQ ID NO: 17) and 5'-A-A-A-T-A-C-C-T-G-T-C-C-G-C-A-G-C-C-3' (SEQ ID NO: 18), and the fluorogenic probe 5'-(6-FAM)-C-C-G-T-A-A-G-G-A-A-C-A-C-G-A-T-G-C-T-C-C-G-G-(TAMRA)-3' (SEQ ID NO: 19; wherein "6-FAM" is the 5' reporter dye 6-carboxyfluorescein and "TAMRA" is the 3' quencher 6-carboxytetramethylrhodamine). Reactions for the quantitation of human cyclophilin mRNA expression contained the primers 5'-G-T-C-G-A-C-G-G-C-G-A-G-C-C-3' (SEQ ID NO: 20) and 5'-T-C-T-T-T-G-G-A-C-C-T-T-G-T-C-T-G-C-3' (SEQ ID NO: 21), and the fluorogenic probe 5'-(6-FAM)-T-G-G-G-C-C-G-C-G-T-C-T-C-T-T-T-G-A-G-C-T-(TAMRA)-3' (SEQ ID NO: 22). The highest levels of GPCR mRNA expression were detected in testes and white adipose tissue (Figure 5).

20

The expression of GPCR mRNA is examined by Northern blot analysis. Multiple human tissue northern blots (Clontech) are probed with a suitable restriction fragment isolated from a human GPCR polypeptide cDNA clone. The probe is

WO 02/083736

PCT/US02/04397

labeled with ^{32}P -dCTP using standard techniques.

Northern blots are prehybridized for 2 hours at 42°C in hybridization solution (5X SSC, 50% deionized formamide, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, and 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA) and then hybridized at 42°C overnight in fresh
 5 hybridization solution containing 5 ng/ml of the labeled probe. Following hybridization, the filters are washed twice for 10 minutes at room temperature in 2X SSC and 0.1% SDS, and then twice for 30 minutes at 65°C in 0.1X SSC and 0.1% SDS. The blots are then exposed to autoradiography.

10 The expression of GPCR mRNA is localized by *in situ* hybridization. A panel of normal embryonic and adult mouse tissues is fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μm . Sectioned tissues are permeabilized in 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections are prehybridized for 1 hour at 60°C in hybridization
 15 solution (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml tRNA, 25 $\mu\text{g/ml}$ polyA, 25 $\mu\text{g/ml}$ polyC and 50% formamide) and then hybridized overnight at 60°C in the same solution containing 10% dextran and 2×10^4 cpm/ μl of a ^{32}P -labeled antisense riboprobe complementary to the human GPCR gene. The riboprobe is obtained by *in*
 20 *vitro* transcription of a clone containing human GPCR cDNA sequences using standard techniques.

Following hybridization, sections are rinsed in hybridization solution, treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed in 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Sections are then immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY),
 25 exposed for 3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Tissue morphology and hybridization signal are simultaneously analyzed by darkfield and standard illumination for brain (one sagittal and two coronal sections), gastrointestinal tract (esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon), pituitary, liver, lung, heart, spleen, thymus, lymph nodes,
 30 kidney, adrenal, bladder, pancreas, salivary gland, male and female reproductive organs (ovary, oviduct, and uterus in the female; and testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, and vas deferens in the male), BAT and WAT (subcutaneous, perirenal), bone (femur), skin, breast, and skeletal muscle.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

Example 5: Production of GPCR PolypeptidesA. Expression of GPCR Polypeptides in Bacteria

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a GPCR polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary vector, such as pAMG21 (ATCC no. 98113) containing the lux promoter and a gene encoding kanamycin resistance is digested with Bam HI and Nde I for directional cloning of inserted DNA. The ligated mixture is transformed into an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for kanamycin resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of the insert.

Transformed host cells are incubated in 2xYT medium containing 30 µg/mL kanamycin at 30°C prior to induction. Gene expression is induced by the addition of N-(3-oxohexanoyl)-dl-homoserine lactone to a final concentration of 30 ng/mL followed by incubation at either 30°C or 37°C for six hours. The expression of GPCR polypeptide is evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Inclusion bodies containing GPCR polypeptide are purified as follows. Bacterial cells are pelleted by centrifugation and resuspended in water. The cell suspension is lysed by sonication and pelleted by centrifugation at 195,000 xg for 5 to 10 minutes. The supernatant is discarded, and the pellet is washed and transferred to a homogenizer. The pellet is homogenized in 5 mL of a Percoll solution (75% liquid Percoll and 0.15 M NaCl) until uniformly suspended and then diluted and centrifuged at 21,600 xg for 30 minutes. Gradient fractions containing the inclusion bodies are recovered and pooled. The isolated inclusion bodies are analyzed by SDS-PAGE.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to *E. coli*-produced GPCR polypeptide is excised from the gel, and the N-terminal amino acid sequence is determined essentially as described by Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10-35.

B. Expression of GPCR Polypeptide in Mammalian Cells

WO 02/083736

PCT/US02/04397

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a GPCR polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into
5 expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), that contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of GPCR polypeptides in 293-EBNA-1 cells. Amplified and gel purified PCR products are ligated into pCEP4 vector and introduced into 293-EBNA cells by lipofection. The transfected cells are
10 selected in 100 µg/mL hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and GPCR polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

GPCR polypeptide expression may be detected by silver staining.
15 Alternatively, GPCR polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag, such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the peptide tag.

GPCR polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or GPCR fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and
20 subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

C. Expression and Purification of GPCR Polypeptide in Mammalian Cells

GPCR polypeptide expression constructs are introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

25 To conduct functional studies on the GPCR polypeptides that are produced, large quantities of conditioned media are generated from a pool of hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells are cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media is harvested and frozen at -20°C until purification.

30 Conditioned media is purified by affinity chromatography as described below. The media is thawed and then passed through a 0.2 µm filter. A Protein G column is equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column is washed with PBS until the absorbance at A₂₈₀ reaches a baseline. GPCR polypeptide is eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and

WO 02/083736

PCT/US02/04397

immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing GPCR polypeptide are pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

For Factor Xa cleavage of the human GPCR polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein is dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa is added to the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 6: Production of Anti-GPCR Polypeptide Antibodies

Antibodies to GPCR polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with GPCR peptides produced by biological or chemical synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific Publications).

In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or rabbits) are injected with a GPCR antigen (such as a GPCR polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells), are first incubated in DMEM with 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, and are then incubated in HAT selection medium (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each fusion well and tested for anti-GPCR antibody production by ELISA.

Alternative procedures for obtaining anti-GPCR antibodies may also be employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

Example 7: Expression of GPCR Polypeptide in Transgenic Mice

To assess the biological activity of GPCR polypeptide, a construct encoding a GPCR polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of GPCR polypeptide. Similarly, a construct containing the full-length GPCR polypeptide under the control of the beta

WO 02/083736

PCT/US02/04397

actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a GPCR polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified GPCR polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human β -actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The GPCR polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the GPCR polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described (International Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO₂ incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 mL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 mL of TE, and 2 mL of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScript™ Preamplification System

WO 02/083736

PCT/US02/04397

(Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the GPCR polypeptide transgene, is used to prime cDNA synthesis from the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice.

5 The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for GPCR

10 polypeptide.

Example 8: Biological Activity of GPCR Polypeptide in Transgenic Mice

Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isoflurane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to

15 hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands,

20 bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

25 The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B cell and T cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3% hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and

30 incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB as a chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with hematoxylin.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed
5 twice, counted, and approximately 1×10^6 cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5 μg CD16/32(Fc γ III/II) Fc block in a 20 μL volume. Samples are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100 μL volume of PBS (lacking Ca^{+} and Mg^{+}), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5 μg antibody of
10 FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

While the present invention has been described in terms of the preferred
15 embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising:
 - (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5;
 - (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (c) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of either (a) or (b);
 - 10 or
 - (d) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of either (a) or (b).

2. An isolated nucleic acid molecule comprising:
 - 15 (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of
 - 20 the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of (a);
 - (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of (a) or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the
 - 25 polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic;
 - (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
 - 30 (e) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (d);
 - or
 - (f) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (d).

WO 02/083736

PCT/US02/04397

3. An isolated nucleic acid molecule comprising:
- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, an amino acid insertion, an amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
 - (g) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (f); or
 - (h) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (e).
4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

5. A host cell comprising the vector of Claim 4.
6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.
- 5 7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.
8. A process of producing a GPCR polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and
10 optionally isolating the polypeptide from the culture.
9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.
10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises
15 promoter DNA other than the promoter DNA for the native GPCR polypeptide operatively linked to the DNA encoding the GPCR polypeptide.
11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group
20 consisting of GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.
12. A process for determining whether a compound inhibits GPCR polypeptide activity or GPCR polypeptide production comprising exposing a cell
25 according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring GPCR polypeptide activity or GPCR polypeptide production in said cell.
13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
30
14. An isolated polypeptide comprising:
- (a) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

WO 02/083736

PCT/US02/04397

- (b) an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 5 (c) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic; or
- (d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the
- 10 amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 or the amino acid sequence of either (a) or (b).

15. An isolated polypeptide comprising:

- (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID
- 15 NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID
- NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the
- 20 polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID
- NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the
- polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ
- 25 ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID
- NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the
- polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ
- ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
- 30 (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID
- NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid
- substitution, an amino acid insertion, an amino acid deletion, C-terminal truncation,
- or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide
- set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

5

17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

10

18. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or a fragment thereof.

20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.

20

21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.

22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.

25

23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.

24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.

30

25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.
27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.
28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.
29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.
30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable label.
32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes GPCR polypeptide biological activity.
33. A method for treating, preventing, or ameliorating a GPCR polypeptide-related disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.
34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
35. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to any of Claims 13, 14, or 15.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

36. A method of detecting or quantitating the amount of GPCR polypeptide using the anti-GPCR antibody or fragment of Claim 18.
37. A kit for detecting or quantitating the amount of GPCR polypeptide in
5 a biological sample, comprising the selective binding agent of Claim 18.
38. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
- 10 39. The composition of Claim 38, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.
- 15 40. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.
41. The polypeptide of Claim 40 that is covalently modified with a water-soluble polymer.
- 20 42. The polypeptide of Claim 41, wherein the water-soluble polymer is polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols, or polyvinyl alcohol.
- 25 43. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
44. The composition of Claim 43, wherein said nucleic acid molecule is
30 contained in a viral vector.
45. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/083736

PCT/US02/04397

46. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.

47. The fusion polypeptide of Claim 46, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

48. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical condition comprising administering to a patient the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.

10

49. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

20

50. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and

said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

25

51. A method of identifying a compound that binds to a GPCR polypeptide comprising:

(a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a compound; and

(b) determining the extent of binding of the GPCR polypeptide to the compound.

30

WO 02/083736

PCT/US02/04397

52. The method of Claim 51, further comprising determining the activity of the polypeptide when bound to the compound.

53. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

54. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

10

55. A process for determining whether a compound inhibits GPCR polypeptide activity or GPCR polypeptide production comprising exposing a transgenic mammal according to Claim 54 to the compound, and measuring GPCR polypeptide activity or GPCR polypeptide production in said mammal.

15

56. A nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 attached to a solid support.

57. An array of nucleic acid molecules comprising at least one nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

20

58. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one conservative amino acid substitution that is a aspartic acid at position 2; leucine at position 8; glutamic acid at position 12; proline at position 13; threonine at position 15; leucine at position 24; valine at position 25; leucine at position 27; isoleucine or leucine at position 35; serine at position 49; isoleucine at position 52; isoleucine at position 82; leucine at position 83; alanine at position 87; leucine at position 90; valine at position 91; lysine or methionine at position 94; valine at position 111; methionine at position 123; alanine at position 126; N at position 129; threonine at position 131; alanine at position 134; threonine at position 135; alanine at position 136; valine at position 138; threonine at position 141; methionine at position 152; serine at position 154; arginine at position 159; glycine at position 160; methionine at position 161; leucine or valine at position 162; serine at position 163; valine at position 179; leucine at position 187; threonine at position 190;

25

30

WO 02/083736

PCT/US02/04397

valine at position 197; asparagine at position 198; valine at position 199; glutamine at position 205; threonine at position 210; arginine at position 216; arginine at position 217; serine at position 227; leucine at position 238; threonine at position 249; threonine or isoleucine at position 258; valine at position 262; leucine at position 266;

5 leucine at position 269; leucine at position 285; alanine at position 290; threonine at position 293; arginine at position 295; arginine at position 300; arginine at position 301; arginine at position 304; threonine at position 305; glutamine at position 306; alanine at position 307; arginine at position 308; serine at position 310; glycine at position 319; serine at position 320; lysine at position 321; serine at position 322;

10 threonine at position 324; aspartic acid at position 325; glycine at position 326; valine at position 327; arginine at position 329; serine at position 330; arginine at position 332; proline at position 334; glycine at position 339; leucine at position 340; glutamine at position 341; and valine at position 342; wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

15

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 1A

```

atg tac aac ggg tgc tgc tgc cgc atc gag ggg gac acc atc tcc cag 48
Met Tyr Asn Gly Ser Cys Cys Arg Ile Glu Gly Asp Thr Ile Ser Gln
1 5 10 15

gtg atg ccg ccg ctg ctg att gtg gcc ttt gtg ctg ggc gca cta ggc 96
Val Met Pro Leu Leu Ile Val Ala Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly
20 25 30

aat ggg gtc gcc ctg tgt ggt ttc tgc ttc cac atg aag acc tgg aag 144
Asn Gly Val Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys
35 40 45

ccc agc act gtt tac ctt ttc aat ttg gcc gtg gct gat ttc ctg ctt 192
Pro Ser Thr Val Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu
50 55 60

atg atc tgc ctg cct ttt cgg aca gac tat tac ctg aga cgt aga cac 240
Met Ile Cys Leu Pro Phe Arg Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His
65 70 75 80

tgg gct ttt ggg gac att ccc tgc cga gtg ggg ctg ttc acg ttg gcc 288
Trp Ala Phe Gly Asp Ile Pro Cys Arg Val Gly Leu Phe Thr Leu Ala
85 90 95

atg aac agg gcc ggg agc atc gtg ttc ctt acg gtg gtg gct gcg gac 336
Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr Val Val Ala Ala Asp
100 105 110

agg tat ttc aaa gtg gtc cac ccc cac cgc gtg aac act atc tcc 384
Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Ala Val Asn Thr Ile Ser
115 120 125

acc cgg gtg gcg gct ggc atc gtc tgc acc ctg tgg gcc ctg gtc atc 432
Thr Arg Val Ala Ala Gly Ile Val Cys Thr Leu Trp Ala Leu Val Ile
130 135 140

ctg gga aca gtg tat ctt ttg ctg gag aac cat ctg tgc gtg caa gag 480
Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Leu Glu Asn His Leu Cys Val Gln Gln
145 150 155 160

acg gcc gtc tcc tgt gag agc ttc atc atg gag tgc gcc aat ggc tgg 528
Thr Ala Val Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp
165 170 175

cat gac atc atg ttc cag ctg gag ttc ttt atg ccc ctg ggc atc atc 576
His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Met Pro Leu Gly Ile Ile
180 185 190

tta ttt tgc tcc ttc aag att gtt tgg agc ctg agg cgg agg cag cag 624
Leu Phe Cys Ser Phe Lys Ile Val Trp Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln
195 200 205

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 1B

ctg gcc aga cag gct cgg atg aag aag cgg acc cgg ttc atc atg gtg	672
Leu Ala Arg Gln Ala Arg Met Lys Lys Ala Thr Arg Phe Ile Met Val	
210 215 220	
gtg gca att gtg ttc atc aca tgc tac ctg ccc agc gtg tet gct aga	720
Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro Ser Val Ser Ala Arg	
225 230 235 240	
ctc tat ttc ctc tgg acg gtg ccc tgc agt gcc tgc gat ccc tct gtc	768
Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val	
245 250 255	
cat ggg gcc ctg cac ata acc ctc agc ttc acc tac atg aac agc atg	816
His Gly Ala Leu His Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met	
260 265 270	
ctg gat ccc ctg gtg tat tat ttt tca agc ccc tcc ttt ccc aaa ttc	864
Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe	
275 280 285	
tac aac aag ctc aaa atc tgc agt ctg aaa ccc aag cag coa gga cac	912
Tyr Asn Lys Leu Lys Ile Cys Ser Leu Lys Pro Lys Gln Pro Gly His	
290 295 300	
tca aaa aca caa agg ccg gaa gag atg coa att tgc aac ctc ggt cgc	960
Ser Lys Thr Gln Arg Pro Glu Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Gly Arg	
305 310 315 320	
agg agt tgc atc agt gtg gca aat agt ttc caa agc cag tet gat ggg	1008
Arg Ser Cys Ile Ser Val Ala Asn Ser Phe Gln Ser Gln Ser Asp Gly	
325 330 335	
caa tgg gat ccc cac att gtt gag tgg cac	1038
Gln Trp Asp Pro His Ile Val Glu Trp His	
340 345	

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 2A

```

gaaaaagaca aaaccagaaa aagaaaagtc atctccaggg ctogatatag caacgagtct 60
gtagcatgta tagcgtcggg cccccagct gcaaccaga aatgtacact cgtgggaaac 120
cgcttgccac ccagagcctg acccagctgc aggcctcaac tctgtagggg acgtgcagct 180
cgtgatccaa gctaggaga aaggacttgc tgccggcttt catttctctg ctgaagtctc 240
tctcgtgggt gcagcgctg catcccaggg tgatgaggtt aggggcccag ctgctagagg 300
agccctagtg ttgggatagg cagctgtgcc tctgtgccgg ccacotttg atg cca gtc 358
Met Pro Val
1

ctc tct cca act gct atg gac aac ggg tgg tgc tgt ctc atc gag ggg 406
Leu Ser Pro Thr Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys Leu Ile Glu Gly
5 10 15

gag ccc atc tcc cag gtg atg cct cct cta ctc atc ctg gtc ttc gtg 454
Glu Pro Ile Ser Gln Val Met Pro Pro Leu Ile Leu Val Phe Val
20 25 30 35

ctt ggc gcc ctg ggc aac ggc ata gcc ctg tgc ggc ttc tgc ttt cac 502
Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Ile Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His
40 45 50

atg aag acc tgg aag tca agc act att tac ctt ttc aac ttg gct gtg 550
Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val
55 60 65

gcc gat ttt ctc ctc atg atc tgc tta ccc ctt cgg aca gac tac tac 598
Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg Thr Asp Tyr Tyr
70 75 80

ctc aga cgc aga cac tgg att ttt gga gat atc gcc tgt cgc ctg gtc 646
Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Phe Gly Asp Ile Ala Cys Arg Leu Val
85 90 95

ctc ttc aag ctg gcc atg aat agg gcc ggg agc att gtc ttc ctc act 694
Leu Phe Lys Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr
100 105 110 115

gtg gtg gct gtg gat agg tat ttc aaa gtg gtc cac ccc cac cat atg 742
Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Met
120 125 130

gtg aat gcc atc tcc aac cgg act gcc gcc gcc acc gcc tgt gtc ctc 790
Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Thr Ala Cys Val Leu
135 140 145

tgg act ttg gtc atc ttg ggg act gtg tat ctt ctg atg gag agt cac 838
Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Met Glu Ser His
150 155 160

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 2B

```

ctg tgt gtg cag ggg aca ctg teg tcc tgt gag agc ttc atc atg gag 886
Leu Cys Val Gln Gly Thr Leu Ser Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu
165 170 175

tca gcc aac ggg tgg cac gat gtc atg ttc cag ctg gag ttc ttc ctg 934
Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Val Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Leu
180 185 190 195

ccc ctg aca atc atc ttg ttc tgc tgc gtc aac gtt gtt tgg agc ctg 982
Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Val Asn Val Val Trp Ser Leu
200 205 210

aga cgg agg cag cag ctg acc aga cag gct cgg atg agg agg gcc acc 1030
Arg Arg Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Met Arg Arg Ala Thr
215 220 225

cgg ttc atc atg gtg gtg gct tct gtg ttc atc acg tgt tac ctg ccc 1078
Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro
230 235 240

agc gtg ctg gct agg ctc tac ttc ctc tgg acg gtg ccc act agt gcc 1126
Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Thr Ser Ala
245 250 255

tgt gac ccc tct gtc cac aca gcc ctc cac gtc acc ctg agc ttc acc 1174
Cys Asp Pro Ser Val His Thr Ala Leu His Val Thr Leu Ser Phe Thr
260 265 270 275

tac ctg aac agt atg ctg gat ccc ctt gta tat tac ttc tca agc ccc 1222
Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro
280 285 290

tcg ctc ccc aaa ttc tac gcc aag ctc aca atc tgc agc ctg aag ccc 1270
Ser Leu Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Thr Ile Cys Ser Leu Lys Pro
295 300 305

aaa cgc cca gga cgc acg aag acg cgg agg tca gaa gag atg cca att 1318
Lys Arg Pro Gly Arg Thr Lys Thr Arg Arg Ser Glu Glu Met Pro Ile
310 315 320

tcg aac ctc tgc agt aag agc tcc atc gat ggg gca aat cgt tcc cag 1366
Ser Asn Leu Cys Ser Lys Ser Ser Ile Asp Gly Ala Asn Arg Ser Gln
325 330 335

agg cca tct gac ggg cag tgg gat ctc caa gtg tgt tgaatgccat 1412
Arg Pro Ser Asp Gly Gln Trp Asp Leu Gln Val Cys
340 345 350

taagacaacac agcccaacaa cgaggcagag aaatgggcaa tgtgaggttaa atctgaagg 1472

tgaggagactt gaagatgtcc cctcccactc ttagctgtat ctttctcact caggtagaaa 1532

tgggatccac cctgcttgac cttttocaga aggttccaaa ccggttggtt gtgttttaaat 1592

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 2C

```

actctgatag caatggtgaa ggggcagcgt gtgagtgtga aggaaccgt ggggtgcggg 1652
ttaggaacta cctggagccc gtgtcgcttt gcatggctga gaaaagcggg atgagcctgg 1712
ctgggtcttg ttctagctcg gagagagtta acgatctcaa taactcgtcg gtatttctcg 1772
gactgaaaaa aatagaaact gcactgagtc aatacaacta ttccagctg agcgagaccc 1832
tttactgcag gacacccgga cctagccgtt tttttaaatg ttccctgggg agcctccaca 1892
catttcaagg ttggaacatc caggtggccc aggagggcag caaaaagaat ctattctaac 1952
cttgctggcg ccacgatatt ttgctgattt taagtgggtt catcctttgt tttctctttg 2012
tttgctggcg aaagaagatg ctgagggaact tgtccacctg atatcagcta tcgtttctcc 2072
agtgggaact gagagcctgt ttaaggcagc aatgggtggg ggggggtgct tcctgggtatt 2132
tgggtgggtt taattcaagc atggttgttc ttactcgtt aatgcattga tttagctga 2192
aatcctccct totcaagtct ttgtttaato cacagtatgt tgtccaccc tgtccagcat 2252
cctcgtctgt tttgtctttg gtgtgggca ttgaacttgg gacottatto gagccaggca 2312
agcactgacc actgaactgc actcccaaac ccttctgtgc ccttttagct gtacgttgt 2372
tagccaactt ttgggagaaa gcaaagcact agaggtggca gcaacagttt agctcaatgt 2432
cctttctgca gtgtctagac ttctgtcag ccactcgggt ctctatttgg gggcctccct 2492
caagcacata tgttctccca aatactacc agaattctca cagctagggt attctgtgaa 2552
agtccaggct gccctgtctc tggagaagga gaaatagaat ccgtgttaac cttagtccca 2612
cttcaagcc aaaaaagtg tgacagccat tcactctctc cagttccag ggtactctcc 2672
ccagggaagg gaccttgaca ttatgtcta aagacataaa ttagatgctc ctcaagggtg 2732
tcctctggc ttctcttgc agaggtgttg aagcctaggt gcgaaaaaca gtctgactgc 2792
agggctgggt agaaggctca gtaggtaaac aggtctgcog ccaagccacc aacctgagta 2852
tccttgagac ccactggta ggagaacacc aaatcccaa ggtggtctcg tcctccacct 2912
atgttcacgc atgcgcacat gcacgcacgc gcacgcgcgc acaccaccc accaaataca 2972
ttaatgcaat aaaaaattta ttggctacac ggtcaagttt gaattctagt ttaaatgctt 3032
attagacatg tgctcgtagg gaagacttta tttaaccoca ctacgttttg atgttcagca 3092
gggttaatac tgatgcocaa ggttttggga gcaaattcaa tgactgtaca ctcataagca 3152
tgagaaatct gttgttccca ggtctgcctg gaagaagaco atgtgcgtgt agtagttgat 3212

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 2D

aaataaatag ttgtgaaca actataatcg ctccaaaaa

3251

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 3A

```

tggtacgcct gcaggtaccg gtcgcgaatt ccggggtcga cccacgcgc cgcaaaacta 60
gaaaagcraa atcgteccca ggggtggacc cagcgacaag tctgctggt ggctggcato 120
agacccccaa gctgcagcct ggcaatgtac gcttttggaa aactgcteto gctcagago 180
ctgaccacgc tgcaggettc acctctgtag gggacatgca gcttgtgac caggctgagg 240
agaaaggaoe tgctgtcggc ttctattcc tgactgaagt tgggtgatga ggtaggggc 300
ccagctgcca aggggaacca tagtgttcag ataggcagct gtgcctttgt gtcagccacc 360
tagg atg ctc ttc ctc tot ccg agt gct atg gac aac ggg tgc tgc tgt 409
Met Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys
1 5 10 15

ctc atc gag ggg gaa ccc atc acc cag gta atg cca cot tta ctc atc 457
Leu Ile Glu Gly Glu Pro Ile Thr Gln Val Met Pro Pro Leu Leu Ile
20 25 30

ctg gcc ttc ctg ctt gga gcc ctg ggc aac ggc cta gcc ctg tgt ggt 505
Leu Ala Phe Leu Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Leu Ala Leu Cys Gly
35 40 45

ttc tgc ttt cac atg aag acc tgg aag tgc agc act att tac ctt ttc 553
Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe
50 55 60

aac ttg gct gta gcc gat ttt ctc ctc atg atc tgc cta ccc ctt cgg 601
Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg
65 70 75

aca gac tac tac ctc aga cgt agg cat tgg att ttg ggg gat att ccc 649
Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Leu Gly Asp Ile Pro
80 85 90 95

tgc cgc ctg gtc ctc ttc atg ctg gcc atg aat agg gcc gga agc att 697
Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile
100 105 110

gtc ttc ctc act gtg gtg gcc gtg gac agg tat ttc saa gtg gtc cac 745
Val Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His
115 120 125

ccc cac cat atg gtg aac gcc atc tcc aat cgg act gca gct gcc atc 793
Pro His His Met Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Ile
130 135 140

gtc tgt gtc ctc tgg act ttg gtc atc ttg ggg act gtg tat ctt ctg 841
Val Cys Val Leu Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu
145 150 155

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 3B

```

atg gag agt cac ctg tgt gtg cgg ggg atg gtg tca tct tgt gag agc 889
Met Glu Ser His Leu Cys Val Arg Gly Met Val Ser Ser Cys Glu Ser
160 165 170 175

ttc atc atg gag tca gcc aac ggg tgg cac gat atc atg ttc cag ctg 937
Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Ile Met Phe Gln Leu
180 185 190

gag ttc ttc ctg ccc ctg acc atc atc ttg ttc tgc tcc ttc aaa gtt 985
Glu Phe Phe Leu Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Phe Lys Val
195 200 205

gtt tgg agc ctg aga cag agg caa cag ctg acc aga cag gct cgg atg 1033
Val Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Met
210 215 220

agg agg gcc acc cgg ttc atc atg gtg gtg gct tcc gtg ttc atc acg 1081
Arg Arg Ala Thr Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr
225 230 235

tgt tac ctg ccc agc gtg ttg gcg agg ctc tac ttc ctc tgg acg gtg 1129
Cys Tyr Leu Pro Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val
240 245 250 255

ccc tcc agt gct tgt gac ccc tct gtc cac ata gct ctc cat gtc acc 1177
Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val His Ile Ala Leu His Val Thr
260 265 270

ctg agt ctc acc tac ctg aac agc atg ctg gac cct ctt gtg tac tac 1225
Leu Ser Leu Thr Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr
275 280 285

ttt tca agc ccc tcg ttc ccc aaa ttc tac gcc aag ctc aaa atc cgc 1273
Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Lys Ile Arg
290 295 300

agc ttg aaa ccc aga cgc cca gga cgc tcg cag gca cgg agg tcg gaa 1321
Ser Leu Lys Pro Arg Arg Pro Gly Arg Ser Gln Ala Arg Arg Ser Glu
305 310 315

gag atg cca att tcg aat ctc tgt cgt aag agt tcc acc gat gtg gta 1369
Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Cys Arg Lys Ser Ser Thr Asp Val Val
320 325 330 335

aat agt tcc cag agg ccg tct gac ggg cag tgg ggt ctc caa gtg tgt 1417
Asn Ser Ser Gln Arg Pro Ser Asp Gly Gln Trp Gly Leu Gln Val Cys
340 345 350

tgaatgccat gaagacaaat ggccagcag caaagcagag acctgggcaa ctgtgagtta 1477

aatctgaagg stgagggaact tgaaaaatga cagccccccc ccccgccca cccgccgccc 1537

cgccccgcctc tttctcagct gtgtctttct cactcaagta gaagcaaaat ctataaaaaa 1597

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 3C

```
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggcggcgg ctctagagga tccaagotta cgtacggctg 1657
catgcgacgt c                                     1668
```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 4

```

                                TM1
hu_GPCR 1      MYNGSCCRIEGDTISQVMPLLIVAFVIGALNGVALCGPCF 42
mu_GPCR 1      MPVLSPTAMDNGSCCLIRGBPISQVMPLLILVFVIGALNGGIALCGPCF 50
ra_GPCR 1      MLFLSPSAMDNGSCCLIRGBPITQVMPLLILAFLLIGALNGGIALCGPCF 50
          * **** * * . ***** . ***** . *****

                                TM2      extracellular loop 1
hu_GPCR 43     HMKTWKPSTYVYLFNLAVADFLMLICLPETDYVLRRRHWAFGDIPCRVGL 92
mu_GPCR 51     HMKTWKSSTYVYLFNLAVADFLMLICLPETDYVLRRRHWIFGDIACRIVL 100
ra_GPCR 51     HMKTWKSSTYVYLFNLAVADFLMLICLPETDYVLRRRHWILGDIPCRIVL 100
          ***** ** .***** ***** ** * . *

                                TM3      TM4
hu_GPCR 93     FTLAMNRAGSIVFLTVVADRYFKVHPHHAVNTISTRVAAGIVCTLMAL 142
mu_GPCR 101    FKLAMNRAGSIVFLTVVADRYFKVHPHHMVNAISNRTAATACVLWTL 150
ra_GPCR 101    FMLAMNRAGSIVFLTVVADRYFKVHPHHMVNAISNRTAATAVCVLTWL 150
          * ***** * * . * * * * * * * * * * * * * * *

                                extracellular loop 2      TM5
hu_GPCR 143    VILGTVVYLLENHLCVOSTAVSCESFIMESANGWHDIMFOLEFFMPLGII 192
mu_GPCR 151    VILGTVVYLLMESHLCVQGTLSCESFIMESANGWHDVMOLEFFLPLTYI 200
ra_GPCR 151    VILGTVVYLLMESHLCVRGMVSCSFIMESANGWHDIMFOLEFFLPLTYI 200
          ***** . * **** . ***** .***** . * *

                                TM6
hu_GPCR 193    LFCSFKIVWSLRRRQQLAROARMKATRFIMVVAIVFITCYLPSVSARLY 242
mu_GPCR 201    LFCSVNVVWSLRRRQQLTROARMRATRFIMVVASVFITCYLPSVLARLY 250
ra_GPCR 201    LFCSFKVWSLRRRQQLTROARMRATRFIMVVASVFITCYLPSVLARLY 250
          **** . ***** .***** . ***** ***** ****

                                extracellular
                                loop 3      TM7
hu_GPCR 243    FLWTVPSACDPSVHGALHITLSFTVNSMLDPLVYVFSSPSPFKFYNKL 292
mu_GPCR 251    FLWTVPTSACDPSVHTALHITLSFTVNSMLDPLVYVFSPSSLPKFYAKL 300
ra_GPCR 251    FLWTVPSACDPSVHTALHITLSFTVNSMLDPLVYVFSPSSPFKFYAKL 300
          ***** .***** * * . * * * * * ***** * * * *

hu_GPCR 293    KICSLKPKQPGHSKTQRPEEMPISNLGRRSCISVANSFQSQSDGGQWDPHI 342
mu_GPCR 301    TICSLKPKRPGRKTRRSEMPISNLCSSIDGARRSORPSDGGQWDLQV 350
ra_GPCR 301    KIRSLKPRRPGRSQARRSEMPISNLCRKSSTDVNSSQRPSDGGQWLQV 350
          * **** . * * . . * ***** . * . * * * * * .

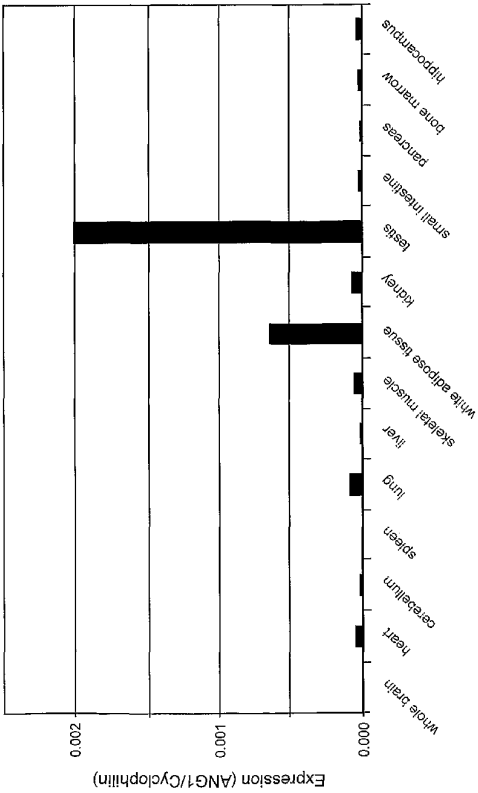
hu_GPCR 343    VBWH 346
mu_GPCR 351    C 351
ra_GPCR 351    C 351

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

FIG. 5



WO 02/083736

PCT/US02/04397

SEQUENCE LISTING

<110> Elliott, Steven G.
Rogers, Norma
Busse, Leigh Anne

<120> G-Protein Coupled Receptor Molecules and Uses Thereof

<130> 02-076-A

<140>
<141>

<150> 60/269,040
<151> 2001-02-14

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1038
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1038)

<400> 1
atg tac aac ggg tgg tgc tgc cgc atc gag ggg gac acc atc tcc cag 48
Met Tyr Asn Gly Ser Cys Cys Arg Ile Glu Gly Asp Thr Ile Ser Gln
1 5 10 15
gtg atg ccg ccg ctg ctc att gtg gcc ttt gtg ctg ggc gca cta ggc 96
Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Val Ala Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly
20 25 30
aat ggg gtc gcc ctg tgt ggt ttc tgc ttc cac atg aag acc tgg aag 144
Asn Gly Val Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys
35 40 45
ccc agc act gtt tac ctt ttc aat ttg gcc gtg gct gat ttc ctc ctt 192
Pro Ser Thr Val Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu
50 55 60
atg atc tgc ctg cct ttt cgg aca gac tat tac ctc aga cgt aga cac 240
Met Ile Cys Leu Pro Phe Arg Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His
65 70 75 80
tgg gct ttt ggg gac att ccc tgc cga gtg ggg ctc ttc acg ttg gcc 288
Trp Ala Phe Gly Asp Ile Pro Cys Arg Val Gly Leu Phe Thr Leu Ala
85 90 95
atg aac agg gcc ggg agc atc gtg ttc ctt acg gtg gtg gct gcg gac 336
Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr Val Val Ala Ala Asp
100 105 110
agg tat ttc aaa gtg gtc cac ccc cac cac gcg gtg aac act atc tcc 384
Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Ala Val Asn Thr Ile Ser
115 120 125

WO 02/083736

PCT/US02/04397

```

acc cgg gtg ggg gct ggc atc gtc tgc acc ctg tgg gcc ctg gtc atc 432
Thr Arg Val Ala Ala Gly Ile Val Cys Thr Leu Trp Ala Leu Val Ile
130 135 140

ctg gga aca gtg tat ctt ttg ctg gag aac cat ctc tgc gtg caa gag 480
Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Leu Glu Asn His Leu Cys Val Gln Glu
145 150 155 160

acg gcc gtc tcc tgt gag agc ttc atc atg gag tgg gcc aat ggc tgg 528
Thr Ala Val Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp
165 170 175

cat gac atc atg ttc cag ctg gag ttc ttt atg ccc ctc ggc atc atc 576
His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Met Pro Leu Gly Ile Ile
180 185 190

tta ttt tgc tcc ttc aag att gtt tgg agc ctg agg cgg agg cag cag 624
Leu Phe Cys Ser Phe Lys Ile Val Trp Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln
195 200 205

ctg gcc aga cag gct cgg atg aag aag gcg acc cgg ttc atc atg gtg 672
Leu Ala Arg Gln Ala Arg Met Lys Lys Ala Thr Arg Phe Ile Met Val
210 215 220

gtg gca att gtg ttc atc aca tgc tac ctg ccc agc gtg tct gct aga 720
Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro Ser Val Ser Ala Arg
225 230 235 240

ctc tat ttc ctc tgg acg gtg ccc tgg agt gcc tgc gat ccc tct gtc 768
Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val
245 250 255

cat ggg gcc ctg cac ata acc ctc agc ttc acc tac atg aac agc atg 816
His Gly Ala Leu His Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met
260 265 270

ctg gat ccc ctg gtg tat tat ttt tca agc ccc tcc ttt ccc aaa ttc 864
Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe
275 280 285

tac aac aag ctc aaa atc tgc agt ctg aaa ccc aag cag cca gga cac 912
Tyr Asn Lys Leu Lys Ile Cys Ser Leu Lys Pro Lys Gln Pro Gly His
290 295 300

tca aaa aca caa agg cgg gaa gag atg cca att tgc aac ctc ggt cgc 960
Ser Lys Thr Gln Arg Pro Glu Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Gly Arg
305 310 315 320

agg agt tgc atc agt gtg gca aat agt ttc caa agc cag tct gat ggg 1008
Arg Ser Cys Ile Ser Val Ala Asn Ser Phe Gln Ser Gln Ser Asp Gly
325 330 335

caa tgg gat ccc cac att gtt gag tgg cac 1038
Gln Trp Asp Pro His Ile Val Glu Trp His
340 345

<210> 2
<211> 346
<212> PRT

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Tyr Asn Gly Ser Cys Cys Arg Ile Glu Gly Asp Thr Ile Ser Gln
 1           5           10           15

Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Val Ala Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly
 20           25           30

Asn Gly Val Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys
 35           40           45

Pro Ser Thr Val Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu
 50           55           60

Met Ile Cys Leu Pro Phe Arg Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His
 65           70           75           80

Trp Ala Phe Gly Asp Ile Pro Cys Arg Val Gly Leu Phe Thr Leu Ala
 85           90           95

Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr Val Val Ala Ala Asp
100           105           110

Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Ala Val Asn Thr Ile Ser
115           120           125

Thr Arg Val Ala Ala Gly Ile Val Cys Thr Leu Trp Ala Leu Val Ile
130           135           140

Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Glu Asn His Leu Cys Val Gln Glu
145           150           155           160

Thr Ala Val Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp
165           170           175

His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Met Pro Leu Gly Ile Ile
180           185           190

Leu Phe Cys Ser Phe Lys Ile Val Trp Ser Leu Arg Arg Gln Gln
195           200           205

Leu Ala Arg Gln Ala Arg Met Lys Lys Ala Thr Arg Phe Ile Met Val
210           215           220

Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro Ser Val Ser Ala Arg
225           230           235           240

Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val
245           250           255

His Gly Ala Leu His Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met
260           265           270

Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe
275           280           285

Tyr Asn Lys Leu Lys Ile Cys Ser Leu Lys Pro Lys Gln Pro Gly His
290           295           300

Ser Lys Thr Gln Arg Pro Glu Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Gly Arg

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

```

305              310              315              320
Arg Ser Cys Ile Ser Val Ala Asn Ser Phe Gln Ser Gln Ser Asp Gly
              325              330              335
Gln Trp Asp Pro His Ile Val Glu Trp His
              340              345

<210> 3
<211> 3251
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (350) .. (1402)

<400> 3
gaaaaagaca aaaccagaaa aagaaaagtc atctccaggg ctgatctag caacgagtct 60
gtagcatgta tagcgtcgga cccccagct gcaaccaga aatgtacact cgtgggaaac 120
cgcttgccac ccagagcctg acccagctgc aggccttaac tctgtagggg acgtgcagct 180
cgtgatccaa gcctaggaga aaggacttgc tgcgggcttt catttcctgg ctgaagtttc 240
tctcgtgggt gcagcgctg catccaggg tgatgaggtt agggggccag ctgctagagg 300
agccctagtg ttccgatagg cagctgtgoc tetgtgocgg ccaccttgg atg cca gtc 358
Met Pro Val
1

ctc tot cca act gct atg gac aac ggg tgg tgc tgt ctc atc gag ggg 406
Leu Ser Pro Thr Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys Leu Ile Glu Gly
5 10 15

gag ccc atc tcc cag gtg atg cct cct cta ctc atc ctg gtc ttc gtg 454
Glu Pro Ile Ser Gln Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Leu Val Phe Val
20 25 30 35

ctt ggc gcc ctg ggc aac ggc ata gcc ctg tgc ggc ttc tgc ttt cac 502
Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Ile Ala Leu Cys Gly Phe Cys Phe His
40 45 50

atg aag acc tgg aag tca agc act att tac ctt ttc aac ttg gct gtg 550
Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Val
55 60 65

gcc gat ttt ctc ctc atg atc tgc tta ccc ctt cgg aca gac tac tac 598
Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg Thr Asp Tyr Tyr
70 75 80

ctc aga cgc aga cac tgg att ttt gga gat atc gcc tgt cgc ctg gtc 646
Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Phe Gly Asp Ile Ala Cys Arg Leu Val
85 90 95

ctc ttc aag ctg gcc atg aat agg gcc ggg agc att gtc ttc ctc act 694
Leu Phe Lys Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val Phe Leu Thr
100 105 110 115

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

```

gtg gtg gct gtg gat agg tat ttc aaa gtg gtc cac ccc cac cat atg 742
Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro His His Met
120 125 130

gtg aat gcc atc tcc aac cgg act gcc gcc gcc acc gcc tgt gtc ctc 790
Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Thr Ala Cys Val Leu
135 140 145

tgg act ttg gtc atc ttg ggg act gtg tat ctt ctg atg gag agt cac 838
Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Met Glu Ser His
150 155 160

ctg tgt gtg cag ggg aca ctg tgg tcc tgt gag agc ttc atc atg gag 886
Leu Cys Val Gln Gly Thr Leu Ser Ser Cys Glu Ser Phe Ile Met Glu
165 170 175

tca gcc aac ggg tgg cac gat gtc atg ttc cag ctg gag ttc ttc ctg 934
Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Val Met Phe Gln Leu Glu Phe Phe Leu
180 185 190 195

ccc ctg aca atc atc ttg ttc tgc tgg gtc aac gtt gtt tgg agc ctg 982
Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Val Asn Val Val Trp Ser Leu
200 205 210

aga cgg agg cag cag ctg acc aga cag gct cgg atg agg agg gcc acc 1030
Arg Arg Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Met Arg Arg Ala Thr
215 220 225

cgg ttc atc atg gtg gtg gct tct gtg ttc atc acg tgt tac ctg ccc 1078
Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr Cys Tyr Leu Pro
230 235 240

agc gtg ctg gct agg ctc tac ttc ctc tgg acg gtg ccc act agt gcc 1126
Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro Thr Ser Ala
245 250 255

tgt gac ccc tct gtc cac aca gcc ctc cac gtc acc ctg agc ttc acc 1174
Cys Asp Pro Ser Val His Thr Ala Leu His Val Thr Leu Ser Phe Thr
260 265 270 275

tac ctg aac agt atg ctg gat ccc ctt gta tat tac ttc tca agc ccc 1222
Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro
280 285 290

tcg ctc ccc aaa ttc tac gcc aag ctc aca atc tgc agc ctg aag ccc 1270
Ser Leu Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Thr Ile Cys Ser Leu Lys Pro
295 300 305

aaa cgc cca gga cgc acg aag acg cgg agg tca gaa gag atg cca att 1318
Lys Arg Pro Gly Arg Thr Lys Thr Arg Arg Ser Glu Glu Met Pro Ile
310 315 320

tcg aac ctc tgc agt aag agc tcc atc gat ggg gca aat cgt tcc cag 1366
Ser Asn Leu Cys Ser Lys Ser Ser Ile Asp Gly Ala Asn Arg Ser Gln
325 330 335

agg cca tct gac ggg cag tgg gat ctc caa gtg tgt tgaatgccat 1412
Arg Pro Ser Asp Gly Gln Trp Asp Leu Gln Val Cys
340 345 350

taagacaaac agcccaacaa cgaggcagag aaatgggcaa tgtgagttaa atctgaaggg 1472

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

tggaggactt gaagatgtcc cctcccactc ttagctgtat cttctcactc caggtagaaa 1532
 tgggatccac cctgcttgac cttttccaga aggttccaaa ceggttggtt gtgtttaa 1592
 actctgatag caatgggtgaa ggggcagcgt gtgagtgtga aggaaccgtt ggggtgcggg 1652
 ttaggaacta cctggagccc gtgtcgtttt gcctggctga gaaaagcggg atgagcctgg 1712
 ctgggtcttg ttctagctcg gagagagtta acgactctca taaactcgtc gtatttctcg 1772
 gactgaaaaa aatagaaact gcactgagtc aatacactta tttccagctg agcgagaccc 1832
 tttactgcag gacacccgga cctagcgtt tttttaaate ttccctgggg agcctccaca 1892
 catttcaagg tttgaacatc caggtggccc agggaggcag caaaaagaat ctattctaac 1952
 cttctggcg ccacgatatt ttgctgattt taagtggttt catcctttgt tttctttttg 2012
 tttgcatttc aaagaagatg ctgagggaact tgtccacctg atatcagcta tegtttctcc 2072
 agtgggaact gagagcctgt ttacggcagc aatggtgggg ggggggtgtc tctgggtatt 2132
 tgggatgggt taattcaagc atggttggtc ttactcgtt aatgcattga tttgagctga 2192
 aatcctccct tctcaagtct ttgtttaate cacagtatgt tgtccaccc tgtccagcat 2252
 cctcgtctgt ttgtctttg gtgctgggca ttgaacttgg gaccttattc gagccaggca 2312
 agcactgacc actgaactgc actccaaaac ccttctgtcc ccttttagct gtagcgttgt 2372
 tagccaactt ttgggagaaa gcaaaagcact agaggtaggca gcaacagttt agctcaatgt 2432
 cctttcgtca gtgtctagac ttctggctag coactccgggt ctctatttg gggcctccct 2492
 caagcacata tgttctccca aatactaccc agaattctca cagctaggtg attctgtgaa 2552
 agtccaggct gccctgttcc tgggagaagg gaaatagaat cctgtttaac cttagtccca 2612
 ctttcaagcc acaaaagtgg tgacagccat tcactctctc cagtccag ggtactctcc 2672
 ccagggaagg gaccttgaca tttatgtcta aagacataaa ttatagctgc ctcaagggtg 2732
 tccctgtggc ttcccttgcc agagggtgtg aagcctaggt gcgaaaatca gtctgactgc 2792
 agggctgggt agaaggctca gtaggtaaac aggtctgcgg ccaagccacc aacctgagta 2852
 tccctgagac ccacgtggta ggagaacacc aaatcccaaa ggtggttctg tctccacct 2912
 atgttcacgc atgcgcacat gcacgcctgc gcacgcgcgc acaccaccc accaaataca 2972
 ttaatgcaat aaaaaattta ttggctacac ggtcaagttt gaatcttagt ttaaatgctt 3032
 attagacatg tgctcgtagg gaagacttta ttttaaccca ctcaagtttg atgttcagca 3092
 gggtaatac tgatgcacaa gggtttggga gcaaatcaa tgactgtaca ctcataagca 3152
 tgagaaatct gttgttccca ggtctgcccg gaagaagacc atglgcgtgt agtagttgat 3212
 aaataaatag ttgctgaaca actataatcg ctccaaaaa 3251

WO 02/083736

PCT/US02/04397

<210> 4
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Met Pro Val Leu Ser Pro Thr Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys Leu
 1 5 10 15
 Ile Glu Gly Glu Pro Ile Ser Gln Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Leu
 20 25 30
 Val Phe Val Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Ile Ala Leu Cys Gly Phe
 35 40 45
 Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe Asn
 50 55 60
 Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Phe Gly Asp Ile Ala Cys
 85 90 95
 Arg Leu Val Leu Phe Lys Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val
 100 105 110
 Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro
 115 120 125
 His His Met Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Thr Ala
 130 135 140
 Cys Val Leu Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Met
 145 150 155 160
 Glu Ser His Leu Cys Val Gln Gly Thr Leu Ser Ser Cys Glu Ser Phe
 165 170 175
 Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Val Met Phe Gln Leu Glu
 180 185 190
 Phe Phe Leu Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Val Asn Val Val
 195 200 205
 Trp Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Met Arg
 210 215 220
 Arg Ala Thr Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr Cys
 225 230 235 240
 Tyr Leu Pro Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val Pro
 245 250 255
 Thr Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val His Thr Ala Leu His Val Thr Leu
 260 265 270
 Ser Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe
 275 280 285

WO 02/083736

PCT/US02/04397

```

Ser Ser Pro Ser Leu Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Thr Ile Cys Ser
290                295                300

Leu Lys Pro Lys Arg Pro Gly Arg Thr Lys Thr Arg Arg Ser Glu Glu
305                310                315                320

Met Pro Ile Ser Asn Leu Cys Ser Lys Ser Ser Ile Asp Gly Ala Asn
325                330                335

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Asp Gly Gln Trp Asp Leu Gln Val Cys
340                345                350

<210> 5
<211> 1668
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (365)..(1417)

<400> 5
tggtacgcct gcaggtaccg gtccggaatt ccggggctga ccacgcgtc cgcaaaacta 60
gaaagcaaaa atcgtcccca ggggtggacc cagcgacaag tctgtgcgt ggtgggcatc 120
agaccccaaa gctgcagcct ggcaatgtac gcttttgaa aactgtcttc gctcagagc 180
ctgacccacc tgcaggttc acctctgtag gggacatgca gcttgtgatc caggctgagg 240
agaaaggacc tctgttcggc tttoatttcc tgactgaagt tgggtgatga gggttagggg 300
ccagctgccca aggggaacca tagtgttcag ataggcagct gtgcctttgt gtcagccacc 360
tagg atg ctc ttc ctc tct ccg agt gct atg gac aac ggg tog tgc tgt 409
Met Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys
1 5 10 15

ctc atc gag ggg gaa ccc atc acc cag gta atg cca cct tta ctc atc 457
Leu Ile Glu Gly Glu Pro Ile Thr Gln Val Met Pro Pro Leu Leu Ile
20 25 30

ctg gcc ttc ctg ctt gga gcc ctg ggc aac ggc cta gcc ctg tgt ggt 505
Leu Ala Phe Leu Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Leu Ala Leu Cys Gly
35 40 45

ttc tgc ttt cac atg aag acc tgg aag tgc agc act att tac ctt ttc 553
Phe Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe
50 55 60

aac ttg gct gta gcc gat ttt ctc ctc atg atc tgc cta ccc ctt cgg 601
Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg
65 70 75

aca gac tac tac ctc aga cgt agg cat tgg att ttg ggg gat att ccc 649
Thr Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Leu Gly Asp Ile Pro
80 85 90 95

tgc cgc ctg gtc ctc ttc atg ctg gcc atg aat agg gcc gga agc att 697
Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile

```

WO 02/083736

PCT/US02/04397

100	105	110	
gtc ttc ctc act gtg gtg gcc gtg gac agg tat ttc aaa gtg gtc cac			745
Val Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His			
115	120	125	
ccc cac cat atg gtg aac gcc atc tcc aat cgg act gca gct gcc atc			793
Pro His His Met Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Ile			
130	135	140	
gtc tgt gtc ctc tgg act ttg gtc atc ttg ggg act gtg tat ctt ctg			841
Val Cys Val Leu Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu			
145	150	155	
atg gag agt cac ctg tgt gtg cgg ggg atg gtg tca tct tgt gag agc			889
Met Glu Ser His Leu Cys Val Arg Gly Met Val Ser Ser Cys Glu Ser			
160	165	170	175
ttc atc atg gag tca gcc aac ggg tgg cac gat atc atg ttc cag ctg			937
Phe Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Ile Met Phe Gln Leu			
180	185	190	
gag ttc ttc ctg ccc ctg acc atc atc ttg ttc tgc tcc ttc aaa gtt			985
Glu Phe Phe Leu Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Phe Lys Val			
195	200	205	
gtt tgg agc ctg aga cag agg caa cag ctg acc aga cag gct cgg atg			1033
Val Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Met			
210	215	220	
agg agg gcc acc cgg ttc atc atg gtg gtg gct tcc gtg ttc atc acg			1081
Arg Arg Ala Thr Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr			
225	230	235	
tgt tac ctg ccc agc gtg ttg gcg agg ctc tac ttc ctc tgg acg gtg			1129
Cys Tyr Leu Pro Ser Val Leu Ala Arg Leu Tyr Phe Leu Trp Thr Val			
240	245	250	255
ccc tcc agt gct tgt gac ccc tct gtc cac ata gct ctc cat gtc acc			1177
Pro Ser Ser Ala Cys Asp Pro Ser Val His Ile Ala Leu His Val Thr			
260	265	270	
ctg agt ctc acc tac ctg aac agc atg ctg gac cct ctt gtg tac tac			1225
Leu Ser Leu Thr Tyr Leu Asn Ser Met Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr			
275	280	285	
ttt tca agc ccc tcg ttc ccc aaa ttc tac gcc aag ctc aaa atc cgc			1273
Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Lys Phe Tyr Ala Lys Leu Lys Ile Arg			
290	295	300	
agc ttg aaa ccc aga cgc cca gga cgc tcg cag gca cgg agg tcg gaa			1321
Ser Leu Lys Pro Arg Arg Pro Gly Arg Ser Gln Ala Arg Arg Ser Glu			
305	310	315	
gag atg cca att tcg aat ctc tgt cgt aag agt tcc acc gat gtg gta			1369
Glu Met Pro Ile Ser Asn Leu Cys Arg Lys Ser Ser Thr Asp Val Val			
320	325	330	335
aat agt tcc cag agg cgg tct gac ggg cag tgg ggt ctc caa gtg tgt			1417
Asn Ser Ser Gln Arg Pro Ser Asp Gly Gln Trp Gly Leu Gln Val Cys			
340	345	350	

WO 02/083736

PCT/US02/04397

tgaatgccat gaagacaaat ggcccagcag caaagcagag acctgggcaa ctgtgagtta 1477
aatctgaagg gtgagggaact tgaataatga cagccccccc ccccgcccca ccggcccgcc 1537
cgcccgctc tttctcagct gtgtctttct cactcaagta gaagcaaaat ctaaaaaaa 1597
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggcgggcg ctctagagga tccaagctta cgtacgcgtg 1657
catgcgacgt c 1668

<210> 6
<211> 351
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 6
Met Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Met Asp Asn Gly Ser Cys Cys Leu
1 5 10 15
Ile Glu Gly Glu Pro Ile Thr Gln Val Met Pro Pro Leu Leu Ile Leu
20 25 30
Ala Phe Leu Leu Gly Ala Leu Gly Asn Gly Leu Ala Leu Cys Gly Phe
35 40 45
Cys Phe His Met Lys Thr Trp Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Leu Phe Asn
50 55 60
Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Met Ile Cys Leu Pro Leu Arg Thr
65 70 75 80
Asp Tyr Tyr Leu Arg Arg Arg His Trp Ile Leu Gly Asp Ile Pro Cys
85 90 95
Arg Leu Val Leu Phe Met Leu Ala Met Asn Arg Ala Gly Ser Ile Val
100 105 110
Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Lys Val Val His Pro
115 120 125
His His Met Val Asn Ala Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ala Ile Val
130 135 140
Cys Val Leu Trp Thr Leu Val Ile Leu Gly Thr Val Tyr Leu Leu Met
145 150 155 160
Glu Ser His Leu Cys Val Arg Gly Met Val Ser Ser Cys Glu Ser Phe
165 170 175
Ile Met Glu Ser Ala Asn Gly Trp His Asp Ile Met Phe Gln Leu Glu
180 185 190
Phe Phe Leu Pro Leu Thr Ile Ile Leu Phe Cys Ser Phe Lys Val Val
195 200 205
Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Gln Leu Thr Arg Gln Ala Arg Met Arg
210 215 220
Arg Ala Thr Arg Phe Ile Met Val Val Ala Ser Val Phe Ile Thr Cys

11/14

WO 02/083736

PCT/US02/04397

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 10
tatcccccaa aatccaatgc ctacg 25

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: forward primer

<400> 11
cgggcagggtg ggtgatgagg ttag 24

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: reverse primer

<400> 12
gctgctgggc catttgtctt cat 23

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide probe

<400> 13
tgctgtctca tcgaggggga a 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide probe

<400> 14
gaatagggcc ggaagcattg t 21

WO 02/083736

PCT/US02/04397

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 15
cctctctcctc cgagcctgtc tgg 23

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 16
ccttttgttc agccacctag gatgc 25

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 17
ttcacgttgg ccatgaaca 19

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 18
aaatacctgt ccgcagcc 18

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide probe

<400> 19
ccgtaaggaa caogtgctc ccgg 24

WO 02/083736

PCT/US02/04397

<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 20
gtcgacggcg agccc

15

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 21
tctttgggac cttgtctgc

19

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide probe

<400> 22
tgggcgcgt ctctttgag ct

22

【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
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083736 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
15/62, 5/10, 1/21, C07K 14/705, 16/28, G01N 33/68,
33/566, A61K 38/00, 31/713, A01K 67/027(74) Agent: ZUHN, Donald; McDonnell Boehnen Hulbert &
Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606
(US).

(21) International Application Number: PCT/US02/04397

(22) International Filing Date: 14 February 2002 (14.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/269,040 14 February 2001 (14.02.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/269,040 (CON)
Filed on 14 February 2001 (14.02.2001)(71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN,
INC. [US/US]; Amgen, Inc. M/S 27-4-A, One Amgen
Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ELLIOTT, Steven,
G. [US/US]; 1040 Golden Crest Avenue, Newbury Park,
CA 91320 (US); ROGERS, Norma [US/US]; 4042 Milano
Place, Moorpark, CA 93021 (US); BUSSE, Leigh, Anne
[US/US]; 887 Yearling Court, Camarillo, CA 93010 (US).(81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
20 November 2003

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



WO 02/083736 A3

(54) Title: G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides G-Protein Coupled Receptor (GPCR) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing GPCR polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with GPCR polypeptides.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Interna		Application No	
PCT/us		u2/04397	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N5/10 C12N1/21 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/68 G01N33/566 A61K38/00 A61K31/713 A01K67/027			
According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, EMBL			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	ULLOA-AGUIRRE A ET AL: "Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors." ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH. MEXICO, vol. 30, no. 6, November 1999 (1999-11), pages 420-435, XP002237736 ISSN: 0188-4409 the whole document	1-58	
X	US 5 955 308 A (BERGSMAN DERK J ET AL) 21 September 1999 (1999-09-21) the whole document	1-58	
-/-			
☒	Further documents are listed in the continuation of box C.		
☒	Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of a further claim or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
** 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 ** 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 *S* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
10 April 2003		08/05/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Kools, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat PCT/US 02/04397	Application No
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No	
X	DATABASE EMBL 'Online! DNA, linear HTG 03-feb-2001, 3 February 2001 (2001-02-03) MUZNY D.M. ET AL.: "Homo sapiens chromosome 12 clone RP11-324E6, WORKING DRAFT SEQUENCE, 30 unordered pieces" Database accession no. AC026333 XP002237737 from nt 84554 to 85595 ----	1-7, 11	
P,X	WO 01 36471 A (ARENA PHARMACEUTICALS INC ;CHEN RUOPING (US); DANG HUONG T (US); L) 25 May 2001 (2001-05-25) Seq ID No 23 and 24 ----	1-58	
P,X	WO 01 73029 A (PE CORP NY) 4 October 2001 (2001-10-04) Figure 1 and 2 ----	1-58	
P,X	WO 01 74904 A (BAUMGARTNER JASON C ;SPADERNA STEVEN K (US); SPYTEK KIMBERLY A (US) 11 October 2001 (2001-10-11) Seq ID No 1,2 and 3 ----	1-58	
P,X	WO 01 87937 A (INCYTE GENOMICS INC ;KALLICK DEBORAH A (US); PATTERSON CHANDRA (US) 22 November 2001 (2001-11-22) Seq ID NO 3 and 11 ----	1-58	
P,X	WO 01 98330 A (DETUEUX MICHEL ;EUROSCREEN S A (BE); GOVARTS CEDRIC (BE); LANNOY V) 27 December 2001 (2001-12-27) Seq ID No 12 and 13 ----	1-58	
P,X	WO 02 02767 A (HORIKOSHI KENICHI ;MIYAJIMA NOBUYUKI (JP); SHIBATA SACHIO (JP); TA) 10 January 2002 (2002-01-10) Seq ID No 1 and 2, Figure 1 ----	1-58	
E	GB 2 365 868 A (GLAXO GROUP LTD ;SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); SMITHKLINE BEECHAM C) 27 February 2002 (2002-02-27) Seq ID No 1 and 2 -----	1-58	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/04397
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2.	☒ Claims Nos.: 18, 19, 31 and 32 all partial because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 02 04397

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 36, and 49 are interpreted as directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 33, 48, and 53 are interpreted as 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.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18, 19, 31 and 32 all partial

Present claims 18, 19, 31 and 32 are directed to an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely selectively binding to the polypeptide of the invention, or fragments or variants thereof. Moreover, claim 32 has as additional desired feature that said agent antagonizes the biological activity of the polypeptides it selectively would bind to.

The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the agents by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the agents being specific binding antibodies, or peptide of the invention.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 Interna plication No
 PCT/US 02/04397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5955308 A	21-09-1999	EP 0892051 A2 JP 11098988 A JP 2002191374 A	20-01-1999 13-04-1999 09-07-2002
WO 0136471 A	25-05-2001	AU 1769601 A CN 1391581 T EP 1242448 A2 WO 0136471 A2	30-05-2001 15-01-2003 25-09-2002 25-05-2001
WO 0173029 A	04-10-2001	AU 4776501 A EP 1278838 A2 WO 0173029 A2	08-10-2001 29-01-2003 04-10-2001
WO 0174904 A	11-10-2001	AU 5696801 A EP 1274844 A2 WO 0174904 A2	15-10-2001 15-01-2003 11-10-2001
WO 0187937 A	22-11-2001	AU 6472101 A EP 1297128 A2 WO 0187937 A2 AU 6181401 A EP 1301595 A2 WO 0190359 A2	26-11-2001 02-04-2003 22-11-2001 03-12-2001 16-04-2003 29-11-2001
WO 0198330 A	27-12-2001	AU 6571701 A WO 0198330 A2 EP 1297003 A2	02-01-2002 27-12-2001 02-04-2003
WO 0202767 A	10-01-2002	AU 6789801 A WO 0202767 A1 JP 2002330776 A	14-01-2002 10-01-2002 19-11-2002
GB 2365868 A	27-02-2002	US 2002052022 A1	02-05-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/08	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
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 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 エリオット, スティーブン ジー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューバリー パーク, ゴールデン クレスト アベニュー 1 0 4 0

(72)発明者 ロジャーズ, ノーマ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0 2 1, ムーアパーク, ミラノ プレイス 4 0 4 2

(72)発明者 バス, リー アン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0 1 0, カマリロ, イヤリング コート 8 8 7

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 AA19 BA41 BA43 BA44 BA63 CA04 CA09 DA02

DA05 DA11 EA02 EA04 GA11 GA14 HA11 HA15

4B029 AA07 BB11 CC03 FA15

4B064	AG20	AG26	AG27	CA01	CA02	CA06	CA10	CA12	CA19	CC24
	CE10	CE12	DA01	DA13						
4B065	AA01X	AA57X	AA72X	AA87X	AA90Y	AA95X	AB01	AB02	AB04	BA01
	BA02	BA03	BA08	CA24	CA44	CA46				
4C084	AA02	AA07	AA13	AA17	BA01	BA08	BA22	BA23	DC50	NA14
	ZA021	ZA151	ZA361	ZA591	ZA701	ZA751	ZA811	ZB081	ZB131	ZB261
	ZC022	ZC331	ZC351							
4C085	AA13	AA14	AA16							
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA15	ZA36	ZA59
	ZA70	ZA81	ZB08	ZB13	ZC02	ZC33	ZC35			
4H045	AA10	AA20	AA30	BA10	BA40	BA41	CA40	DA50	DA75	DA76
	EA20	EA50	FA74	GA20	GA26					

专利名称(译)	G蛋白偶联受体分子及其用途		
公开(公告)号	JP2005503124A	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2002581491	申请日	2002-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	エリオットステイブンジー ロジャーズノーマ バスリーアン		
发明人	エリオット, ステイブン ジー. ロジャーズ, ノーマ バス, リー アン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/08 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/08 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/08 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.F A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA41 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/HA11 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC03 4B029/FA15 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AB04 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA151 4C084/ZA361 4C084/ZA591 4C084/ZA701 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZB081 4C084/ZB131 4C084/ZB261 4C084/ZC022 4C084/ZC331 4C084/ZC351 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA15 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA70 4C086/ZA81 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZC02 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA20 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/269040 2001-02-14 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明提供了G蛋白偶联受体（GPCR）多肽和编码该多肽的核酸分子。本发明还提供选择性结合剂，载体，宿主细胞和产生GPCR多肽的方法。本发明进一步提供了用于诊断，治疗，改善和/或预防与GPCR多肽有关的疾病，病症和病状的药物组合物和方法。

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ヲロイシ	Leu
Leu	カロイシ, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4ジァミノ-酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ヲロイシ	Leu