

(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2005-506037

(P2005-506037A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(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	Z N A A	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	38/00	A 6 1 K	45/00		4 B O 6 3
A 6 1 K	45/00	A 6 1 P	1/00		4 B O 6 4
A 6 1 P	1/00	A 6 1 P	1/16		4 B O 6 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 237 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-546579 (P2002-546579)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成13年11月30日 (2001.11.30)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月2日 (2003.6.2)		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B C O M P A N Y
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045336		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5 4 ニューヨーク パーク アベニュー 3 4 5
(87) 国際公開番号	W02002/044210	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002.6.6)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/250,587	(74) 代理人	100076521
(32) 優先日	平成12年12月1日 (2000.12.1)		弁理士 坪井 有四郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脊髄および脳で発現される新規なヒトイオンチャンネルをコードする新規なヒト核酸分子およびポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、新規なヒト陽イオンチャンネルをコードする新規なヒト核酸分子、およびそのような核酸分子によってコードされるタンパク質およびポリペプチドに関する。さらに詳細には、本発明の核酸分子は、脊髄および脳組織で発現され陽イオンチャンネルタンパク質のバニロイドおよびTRP（トランジエントレセプターポテンシャル）ファミリーとの配列ホモロジーおよび構造的ホモロジーを示すタンパク質またはポリペプチドをコードする新規なヒト遺伝子、たとえばhVR1d.1およびhVR1d.2を包含する。この新規なヒト陽イオンチャンネルに向けられた本発明のタンパク質およびポリペプチドは、カルシウム、ナトリウム、カリウムまたは他のイオンのホメオスタシス性機能障害が関与するヒトの疾患、たとえば、中枢神経系（CNS）の障害、たとえばアルツハイマー病やパーキンソン病などの変性神経障害、または他の障害、たとえば慢性の痛み、不安および抑うつ、卒中、心臓障害、たとえば不整脈、糖尿病、高カルシウム血症、低カルシウム血症、高カルシウム尿症、低カルシウム尿症、または免疫障害、胃腸（GI）管障害または腎臓または肝臓疾患に伴うイオン障害などの治療における薬剤の送達のための治療学的に価値のある標的である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下よりなる群の成員を含む単離核酸：

(a) 図 2 A または図 2 B (配列番号 2 または 4) に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；

(b) 請求項 1 に記載の核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、天然の h V R 1 d タンパク質の活性を有する h V R 1 d ポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離核酸；

(c) 図 1 A に示す核酸配列を含む単離核酸；

(d) 図 1 B に示す核酸配列を含む単離核酸；

10

(e) A T C C 受託番号 ____ の核酸配列を有する単離ポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 1 のヌクレオチド 4 ~ 2 1 6 0 による核酸配列を有し、該ヌクレオチドが配列番号 2 から開始コドン差し引いたポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチド；

(g) 配列番号 1 のヌクレオチド 4 ~ 2 1 6 0 による核酸配列を有し、該ヌクレオチドが開始コドンを含む配列番号 2 のポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチド；

(h) 配列番号 3 のヌクレオチド 4 ~ 2 2 3 5 による核酸配列を有し、該ヌクレオチドが配列番号 4 から開始コドン差し引いたポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチド；

(i) 配列番号 3 のヌクレオチド 4 ~ 2 2 3 5 による核酸配列を有し、該ヌクレオチドが開始コドンを含む配列番号 4 のポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチド；

20

(j) (a) から (i) のいずれかの核酸配列の相補鎖；

(k) h V R 1 d タンパク質またはポリペプチドをコードする (a) から (i) のいずれかの核酸が、異種タンパク質またはペプチドをコードする核酸配列にインフレームで連結してなる単離核酸；

(l) 以下をコードする核酸配列を含む核酸：(a) h V R 1 d . 1 の欠失変異体；(b)

) h V R 1 d . 2 の欠失変異体；または (c) (a) または (b) の核酸配列の相補鎖；

(m) 以下をコードする核酸配列を含む核酸：(a) h V R 1 d . 1 の置換変異体；(b)

) h V R 1 d . 2 の置換変異体；または (c) (a) または (b) の核酸配列の相補鎖。

【請求項 2】

30

請求項 1 に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項 3】

宿主細胞中での核酸の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した請求項 1 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の核酸を含む遺伝子工学により作製した宿主細胞。

【請求項 5】

宿主細胞中での核酸の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した請求項 1 に記載の核酸を含む、遺伝子工学により作製した宿主細胞。

40

【請求項 6】

(a) 請求項 4 に記載の宿主細胞を適当な培地で培養して h V R 1 d ポリペプチドを産生させ、ついで

(b) 該 h V R 1 d ポリペプチドを単離する

工程を含む、h V R 1 d ポリペプチドの製造方法。

【請求項 7】

(a) 請求項 5 に記載の宿主細胞を適当な培地で培養して h V R 1 d ポリペプチドを産生させ、ついで

(b) 該 h V R 1 d ポリペプチドを単離する

工程を含む、h V R 1 d ポリペプチドの製造方法。

50

【請求項 8】

h V R 1 d ポリペプチドが h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2 または機能的に等価なその誘導体である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

h V R 1 d ポリペプチドのエピトープに特異的に反応する抗体調製物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の核酸を含むトランスジェニック動物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項 12】

図 2 A または図 2 B (配列番号 2 または 4) に示す実質的に純粋なヒト h V R 1 d ポリペプチド。

【請求項 13】

図 2 A または図 2 B (配列番号 2 または 4) に示すポリペプチドと少なくとも 90 % 同一である実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のポリペプチドと第二の異種ポリペプチドとを含む融合タンパク質。

【請求項 15】

請求項 11 に記載のポリペプチドの治療学的有効量および薬理学的に許容しうる担体を含む医薬製剤。

【請求項 16】

試料中の野生型または変異体 h V R 1 d 核酸分子の検出および／または定量用試験キットであって、該試料を請求項 1 に記載の核酸と接触させ、ついで野生型または変異体 h V R 1 d 核酸の存在または不在および／または量の指標として標識を検出および／または定量する、工程を含む試験キット。

【請求項 17】

h V R 1 d 活性を変調する化合物の同定方法であって、

(a) 被験化合物を h V R 1 d 遺伝子を発現する細胞と接触させ、

(b) 該細胞での h V R 1 d 遺伝子の発現レベルを測定し、ついで

(c) (b) で得られたレベルを該化合物の不在下で得られた h V R 1 d 遺伝子の発現と比較し、その際、(b) で得られたレベルが該化合物の不在下で得られたレベルと異なる場合には h V R 1 d 活性を変調する化合物が同定される

ことを含む方法。

【請求項 18】

イオンチャンネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、

(a) 被験化合物を請求項 1 に記載の核酸を発現する細胞と接触させ、ついで

(b) 該被験化合物が h V R 1 d 活性を変調するか否かを決定する

ことを含む方法。

【請求項 19】

イオンチャンネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、

(a) 被験化合物を、h V R 1 d 制御配列に作動可能に連結したりポーター遺伝子を含む細胞または細胞溶解液と接触させ、ついで

(b) リポーター遺伝子産物の発現を検出する

ことを含む方法。

【請求項 20】

イオンチャンネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、

(a) 被験化合物を h V R 1 d 転写物を含む細胞または細胞溶解液と接触させ、ついで

(b) 該 h V R 1 d 転写物の翻訳を検出する

ことを含む方法。

【請求項 21】

10

20

30

40

50

h V R 1 d ポリペプチドの治療学的有効量を患者に投与することを含む、患者においてイオンチャンネル関連障害を変調する方法。

【請求項 2 2】

h V R 1 d ポリペプチドの活性を変調することを含む、イオンチャンネル関連障害の治療方法。

【請求項 2 3】

h V R 1 d ポリペプチドの活性を増大させるかまたは該活性と拮抗する化合物の有効量を投与することを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

h V R 1 d 遺伝子の発現を低減させる化合物の有効量を投与することを含む、イオンチャンネル関連障害の治療方法。 10

【請求項 2 5】

h V R 1 d の生物学的活性を変調する化合物の同定方法であって、

(a) 候補モデュレーター化合物を配列番号 2 に示す配列を有する h V R 1 d と混合し、
ついで

(b) h V R 1 d の活性に対する該候補モデュレーター化合物の作用を測定することを含む方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法によって同定したヒト h V R 1 d の生物学的活性を変調する化合物。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なヒトイオンチャンネルをコードする新規なヒト核酸分子、およびそのような核酸分子またはその縮重変異体によってコードされるタンパク質およびポリペプチドの単離および同定に関する。さらに詳しくは、本発明の核酸分子は、脊髄および脳組織で発現され、陽イオンチャンネルタンパク質のバニロイド (vanilloid) および T R P (トランジエントレセプターポテンシャル (transient receptor potential)) ファミリーに対して配列ホモロジーおよび構造上のホモロジーを示すタンパク質またはポリペプチドをコードする、h V R 1 d と称する新規なヒト遺伝子に関する。この新規なヒト陽イオンチャンネルに向けられた本発明のタンパク質およびポリペプチドは、カルシウム、ナトリウム、カリウムまたは他のイオンのホメオスタシス性機能障害が関与するヒトの疾患、たとえば、中枢神経系 (C N S) の障害、たとえばアルツハイマー病やパーキンソン病などの変性神経障害、または他の障害、たとえば慢性の痛み、不安および抑うつ、卒中、心臓障害、たとえば不整脈、糖尿病、高カルシウム血症、低カルシウム血症、高カルシウム尿症、低カルシウム尿症、または免疫障害、胃腸 (G I) 管障害または腎臓または肝臓疾患に伴うイオン障害などの治療における薬剤の送達のための治療学的に価値のある標的である。 30

【背景技術】

【0002】

内部のイオン環境の制御は、生きている全ての細胞の極めて重要な機能である。外部環境とのイオンの交換は様々な手段によって制御されており、そのうち最も重要なのは種々の輸送体およびイオンチャンネルである。イオンチャンネルは非常に広範かつ多様なタンパク質のファミリーからなっており、細胞のホメオスタシス、ホルモンおよび神経伝達物質の放出、運動性、ニューロンの活動電位の生成および伝播および他の死活にかかわる細胞内および細胞間機能において重要な役割を果たしている。それゆえ、これらチャンネルは疾患の治療における治療的化合物の開発のための重要な標的である。 40

【0003】

バニロイドおよび T R P タンパク質ファミリーを含む多くのタンパク質が、イオンチャンネルを形成するとして記載されている。これらタンパク質は、様々な程度の選択性の陽イ 50

オンチャンネルとして、およびチャンネルの開閉 (channel gating) について異なる (幾つかの場合には未知の) 機構を有して機能することが示されている。たとえば、イオンチャンネルの TRPファミリーは、その幾つかが貯蔵-作動 (store-operated) カルシウム (Ca^{2+}) チャンネル、すなわちカルシウムの内部貯蔵が枯渇したときに細胞外の Ca^{2+} の細胞内への流入を可能とするように作動するイオンチャンネル、を形成すると思われる一群のタンパク質を含む (Zhuら、1996, Cell 85: 661-671)。TRPイオンチャンネルは、全てではないにしても殆どの動物組織で、ある形態で発現され则认为られている (Zhuら、上掲、661)。さらに、trp様またはtrp1と称する他のタンパク質が開示されており (Phillipsら、1992, Neuron 8: 631-642; Gilloら、1996, PNAS USA 93: 14146-14151)、またTRPタンパク質とTRPLタンパク質との間に協同的な相互作用が存在し、おそらくこれらタンパク質はチャンネルサブユニットとして貢献して多量体の Ca^{2+} チャンネルを形成することが示唆されている (Gilloら、上掲)。

10

20

30

40

50

【0004】

VR1またはバニロイドレセプターサブタイプ1としても知られるカプサイシン (capsaicin) レセプターはラットから単離されており、イオンチャンネルのTRPファミリーに構造的に関連する Ca^{2+} 透過性の非選択的なイオンチャンネルとして特徴付けられている (Caterinaら、1997, Nature 389: 816-824)。ラットのVR1 cDNAは、838アミノ酸のタンパク質をコードする2,514ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含んでいる。ハイドロフォビシティ研究は、VR1が6つの膜貫通ドメインを含み、膜貫通領域5と6との間に短い疎水性のストレッチが存在し、これがイオン透過経路を表していることを示している。さらに、VR1は、該タンパク質のN末端に3つのアンキリンリピートドメインを含むことが開示されている (Caterinaら、上掲、820)。VR1はtrpタンパク質およびtrp1タンパク質と、トポロジー構成、複数のN末端アンキリンリピートの存在、および6つの膜貫通ドメインの内部および近傍でのアミノ酸配列ホモロジーにおいて近似していることが認められている (Caterinaら、上掲、820-821)。しかしながら、これらホモロジーの領域の外部ではVR1とTRP関連タンパク質との間に實際上、殆ど配列ホモロジーは存在しない。さらに、VR1はTRPタンパク質の幾つかがそうであるような貯蔵-作動 Ca^{2+} チャンネルではないこと、このタンパク質の発現は感覚ニューロンに限られていることが研究により示されている (Caterinaら、上掲、821および820の図6; Mezey, E.ら、2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3655-3660)。

【0005】

ヒトVR1 (当該技術分野では「hVR1」または「OTRPC1」としても知られる) は、PCT特許出願WO99/37675およびPCT特許出願WO00/29577に開示されており、これら特許出願は他のサブタイプであるヒトVR2 (当該技術分野では「hVR2」、「VANILREP2」、「VRRP」、「VLR」または「OTRPC2」としても知られる) とともにヒトVR1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を開示している。さらに、PCT特許出願WO99/37765は、VANILREP2およびその多型変異体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を開示している。PCT出願WO99/37765に示されているVANILREP2タンパク質の配列は、PCT出願WO99/37675に示されているhVR2と本質的に同じであると思われる。同様にhVR2のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を開示する、PCT出願WO99/46377 (EP953638A1に対応)、PCT出願WO00/22121およびGB特許出願2346882Aも参照のこと。

【0006】

陽イオンチャンネルのバニロイドファミリーの別の成員も同定されている。たとえば、SICと称するVR1のホモログがラットの腎臓から単離されている。このタンパク質は膜伸展不活化チャンネル (stretch-inactivating channel (SIC)) として (すなわち、膜の伸展によって不活化される)、および腎臓および肝臓で主として発現されるものとして同定されている。SICはさらに、VR1と共通する同じ膜貫通および孔の配置を有するが

、異なる電気生理学的特性を有すると記載されている (Suzukiら、March 1999, J. Biol. Chem. 274 (No.10): 6330-6335)。しかしながら、最近の報告は、S I CがV R 1と新たに同定されたV RサブタイプであるO T R P C 4とのキメラであることを示している (たとえば、Strotmannら、October 2000, Nature Cell Biology 2: 695-702およびLiedtke W.ら、2000, Cell 103: 525-535)。さらに、バニロイドファミリーの成員間での構造的なホモロジーにも拘わらず、このファミリー内の各タンパク質は、たとえばコンダクタンスや種々のイオンに対する透過性において有意の差異を有することが当該技術分野において認められている (Suzukiら、上掲、6335)。

【0007】

バニロイドファミリーと比較的低い配列ホモロジー (<30%) を共有するものとして同定されている他の陽イオンチャンネルタンパク質はE C a C (上皮カルシウムチャンネル) である。このタンパク質は最初、ウサギの腎細胞からクローニングされ、ウサギの近位小腸、腎臓および胎盤で発現されることがわかった。このタンパク質は、予測されるトポロジー構成および複数のN H₂ 末端アンキリンリピートの存在においてV R 1およびT R Pファミリーのレセプターと近似するものとして開示された。さらに、E C a C、V R 1およびT R P関連タンパク質の間のアミノ酸配列ホモロジーが、イオン透過経路として予測される領域を含む6つの膜貫通セグメントの内部および近傍で認められた (Hoenderopら、March 1999, J. Biol. Chem. 274 (No. 13): 8375-8378)。しかしながら、これらの構造上および配列上のホモロジーにも拘わらず、6つの膜貫通セグメントの外部ではこれらのタンパク質間での配列ホモロジーは実際に低いものであり、「これらチャンネルの間での進化上の関連は遠いことを示唆している」 (Hoenderopら、上掲、8377)。

【0008】

さらに最近、E C a Cのヒトホモログであるh E C a Cが同定され、他のC a²⁺ チャンネルと<30%の配列ホモロジーを有すること、腎臓、小腸および脾臓で高頻度に発現されることが開示されている (Mullerら、2000, Genomics 67: 48-53を参照)。
さらに他のC a²⁺ 輸送タンパク質であるC a T 1がラットの十二指腸から同定されており、このタンパク質はE C a C、V R 1およびT R Pイオンチャンネルと構造的に関連している。しかしながら、C a T 1は、それぞれV R 1およびT R Pレセプターでは予測されるようなカプサイシンまたはカルシウム貯蔵の枯渇によっては刺激されず、それゆえC a T 1はV R 1またはT R Pイオンチャンネルのサブタイプではないことが示唆されている (Pengら、August 1999, J. Biol. Chem. 274 (No. 32): 22739-22746)。さらに最近、C a T 2と称するC a T 1のホモログがラットで同定されている (Pengら、September 2000, J. Biol. Chem. 275 (36): 28186-28194)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

最後に、上記に記載したタンパク質は明らかな構造上および配列上のホモロジーを有しているものの (Zhuら、上掲、668の図6 D、Caterinaら、上掲、819の図5 b、およびHoenderopら、8376の図1 Bを比較せよ)、それにもかかわらず、これらタンパク質は組織発現、電気生理学的特性および機能の異なるパターンを示すのであり (たとえば、選択性と非選択性)、これらタンパク質が進化的な観点からは遠い関連を有するものの、特性および機能の有意に異なる多様な群のタンパク質であると当該技術分野で認められていることに注意すべきである (Suzukiら、上掲、6335; Hoenderopら、上掲、8377; およびCaterinaら、上掲、822)。この複雑なファミリーのタンパク質の様々な成員の概説のためには、H arteneckら、2000, Trends Neurosci. 23: 159-166を参照のこと。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、新規なヒトイオンチャンネルをコードする新規なヒト核酸分子、およびそのような核酸分子またはその縮重変異体によってコードされるタンパク質およびポリペプチドの単離および同定に関する。さらに詳しくは、本発明の核酸分子は、新規なヒト陽イオン

チャンネルの生成または機能に関与するタンパク質またはポリペプチドをコードする、「hVR1d」と称する新規なヒト遺伝子に関する。本発明の新規なhVR1dタンパク質は、陽イオンチャンネルのTRPおよびバニロイドファミリーとある程度の配列ホモロジーおよび構造ホモロジーを示すが、異なる分布パターン、たとえば組織発現を有する別個のヒトチャンネルタンパク質を表すものである。本発明のhVR1dタンパク質は、脊髄および脳組織で高頻度に発現される。

【0011】

本発明の一つの態様に従い、新規なヒトhVR1dのcDNA配列およびそれに由来して発現されたタンパク質のアミノ酸配列が開示される。このcDNAは2つのスプライス形、hVR1d.1およびhVR1d.2にて単離されており、これらは該分子の3'末端の短いヌクレオチドセグメントの不在(hVR1d.1)または存在(hVR1d.2)において異なっている。これらhVR1d cDNAに対応するコードされたタンパク質は、イオンチャンネルのヒトバニロイドレセプターファミリーと中くらいのレベルのホモロジーを示す。

10

【0012】

本発明の構成は、核酸分子（本明細書では「核酸」とも称する）、たとえば新規なhVR1d.1およびhVR1d.2遺伝子産物をコードするhVR1d.1およびhVR1d.2核酸分子（組換えDNA分子、クローニングした遺伝子またはその縮重変異体、とりわけ天然に存在する変異体を含む）、およびそのような遺伝子産物に対する抗体またはその保存された変異体またはフラグメントを包含する。

20

【0013】

とりわけ、本発明の構成は、下記配列を含む核酸分子（本明細書において「hVR1d核酸分子または核酸」とも称する）を包含する：（a）図1Aおよび図1Bにそれぞれ示すヒトhVR1d.1およびhVR1d.2スプライス変異体、並びにそのアレル変異体およびホモログのヌクレオチド配列；（b）図2Aおよび図2Bにそれぞれ示すヒトhVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子産物のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；（c）機能的なドメインおよび個々のエクソンに対応するhVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子産物の部分をコードするヌクレオチド配列；（d）ドメインの1つまたはそれ以上の全部または一部が欠失または変化した対応遺伝子産物の変異体をコードする、本明細書に記載の新規なhVR1d.1またはhVR1d.2核酸配列またはその一部を含むヌクレオチド配列；（e）異種ポリペプチドに融合した、hVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子産物またはそのドメインの1つまたはそれ以上を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列；（f）ヒトの疾患の診断または治療のために本発明の方法の一部として利用できる、hVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子の内部のヌクレオチド配列、並びにこれら遺伝子にフランキングする染色体配列；および（g）上記配列に高度にストリンジェントな条件下または中くらいにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列。本発明の核酸は、hVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子のcDNAおよびゲノムDNA分子を包含するが、これらに限られるものではない。

30

【0014】

本発明はまた、上記に記載した核酸分子の遺伝子産物、すなわち上記に記載したhVR1d核酸分子、たとえばhVR1d.1およびhVR1d.2核酸分子によってコードされ、組換え宿主系で発現されるタンパク質および／またはポリペプチドを包含する。好ましい態様において、本発明のhVR1dタンパク質は、図2A（配列番号2）および図2B（配列番号4）においてそれぞれ示されるアミノ酸配列によってコードされるタンパク質、または機能的に等価なその断片または誘導体を包含する。これらタンパク質は、当該技術分野で知られた組換え手段により、または化学合成法により製造することができる。

40

【0015】

本明細書に開示したhVR1d遺伝子および／または遺伝子産物のアンタゴニストおよびアゴニストも本発明に含まれる。そのようなアンタゴニストおよびアゴニストとしては、たとえば、本発明のhVR1d.1またはhVR1d.2タンパク質およびポリペプチドに

50

対して向けられた小さな分子、大きな分子、および抗体が挙げられるであろう。本発明のアンタゴニストおよびアゴニストはまた、アンチセンスおよびリボザイム分子、および遺伝子または制御配列置換構築物などのヌクレオチド配列を含み、これらは開示した h V R 1 d 核酸分子の発現を抑制または促進するのに用いることができる。

【0016】

本発明はさらに、本発明の核酸分子を含み該核酸分子を宿主生物で発現させるのに用いることのできるクローニングベクター（発現ベクターを含む）を包含する。本発明はまた、本発明の核酸分子を含みおよび／または発現させるべく遺伝子工学により作製した宿主細胞にも関する。さらに、これら核酸分子で形質転換した宿主生物、たとえばトランスジェニック動物、とりわけトランスジェニック非ヒト動物、特にトランスジェニック非ヒト哺乳動物も本発明に包含される。 10

【0017】

本発明はまた、陽イオン、たとえば Ca^{2+} 、ナトリウムまたはカリウムチャンネル、他のイオンのホメオスタシスの機能不全または欠失が関与するヒトの疾患の診断方法および組成物にも関し、該疾患は、たとえば、中枢神経系（CNS）の障害、たとえばアルツハイマー病やパーキンソン病などの変性神経障害、または他の障害、たとえば慢性の痛み、不安および抑うつ、心臓障害、たとえば不整脈、または他の障害、たとえば糖尿病、高カルシウム血症、高カルシウム尿症、または免疫障害、胃腸（GI）管障害または腎臓または肝臓疾患に伴うイオン障害を含むが、これらに限られるものではない。そのような方法は、たとえば、患者試料中の h V R 1 d 遺伝子の発現を測定するか、またはイオンチャンネルの機能不全を示すと思われる哺乳動物（ヒトを含む）のゲノムでの該遺伝子の変異を検出することを含む。本発明の核酸分子はまた、診断ハイブリダイゼーションプローブとしてまたは診断PCR分析のためのプライマーとして、h V R 1 d 遺伝子変異、アレル変異、または制御欠損、たとえば該遺伝子の発現の欠陥を同定するのににも用いることができる。そのような診断PCR分析は、特定の h V R 1 d 遺伝子変異、アレル変異、または制御欠損に関連する疾患を有する個体を診断するのに用いることができる。そのような診断PCR分析はまた、イオンチャンネル障害に罹りやすい個体を同定するのににも用いることができる。 20

【0018】

イオンチャンネル障害の治療の方法および組成物（医薬組成物を含む）もまた本発明に含まれる。そのような方法および組成物は、h V R 1 d、たとえば h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2、の遺伝子発現および／または各遺伝子産物またはポリペプチドの活性レベルを変調することができる。そのような方法は、たとえば、ある種の他の遺伝子における欠損によって媒体される疾患の治療のために h V R 1 d 遺伝子の発現および／または h V R 1 d 遺伝子産物の活性を変調することを含む。 30

【0019】

そのような方法は、本発明の核酸の発現および／またはポリペプチドの活性を変調する化合物を同定するためのスクリーニング法、たとえば、h V R 1 d m R N A および／または遺伝子産物のレベルを測定するアッセイ、または h V R 1 d 活性、たとえば該遺伝子産物が細胞内への Ca^{2+} の流入を可能とする能力のレベルを測定するアッセイをも包含する。 40

【0020】

たとえば、h V R 1 d 遺伝子および／または遺伝子産物と相互作用する、たとえば該遺伝子の活性を変調するおよび／または該遺伝子産物に結合する、化合物を同定するのに用いることのできる細胞性および非細胞性のアッセイが知られている。そのような本発明の細胞ベースのアッセイでは、該遺伝子産物を発現する細胞、細胞株、または遺伝子操作した細胞または細胞株を利用する。

【0021】

一つの態様において、そのような方法は、h V R 1 d 遺伝子を発現する細胞に化合物を接触させ、遺伝子発現、遺伝子産物の発現、または遺伝子産物の活性を測定し、ついでこの 50

レベルを該化合物の不在下で該細胞により産生されたh V R 1 d 遺伝子発現、遺伝子産物の発現、または遺伝子産物の活性のレベルと比較し、もしも該化合物の存在下で得られたレベルが該化合物の不在下で得られたレベルと異なっておれば、h V R 1 d 遺伝子の発現および／または該遺伝子産物の合成または活性を変調する化合物が同定されるようにすることを含む。

【0022】

別の態様において、そのような方法は、宿主生物、たとえばh V R 1 d トランスジーンまたは変異h V R 1 d トランスジーンを発現するトランスジェニック動物に化合物を投与し、ついでh V R 1 d 遺伝子の発現、遺伝子産物の発現、または遺伝子産物の活性を測定することを含む。この測定したレベルを、該化合物に暴露されていない宿主でのh V R 1 d 10 遺伝子発現、遺伝子産物の発現、または遺伝子産物の活性のレベルと比較し、もしも宿主が該化合物に暴露されたときに得られるレベルが該宿主が該化合物に暴露されなかったときに得られるレベルと異なっておれば、h V R 1 d 遺伝子の発現および／またはh V R 1 d 遺伝子産物の合成または活性を変調する化合物が同定されることになる。

【0023】

これら方法によって同定される化合物は、イオンチャンネル障害、たとえば中枢神経系（C N S）の障害、たとえばアルツハイマー病やパーキンソン病などの変性神経障害、または他の障害、たとえば慢性の痛み、不安および抑うつ、心臓障害、たとえば不整脈、または他の障害、たとえば糖尿病、高カルシウム血症、高カルシウム尿症、または免疫障害、20 胃腸（G I）管障害または腎臓または肝臓疾患に伴うイオン障害の徴候を低減または除去する医薬化合物として用いることのできる治療用化合物を含む。

【0024】

本発明はまた、図2 A（配列番号2）または図2 B（配列番号4）に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、または該配列の核酸の相補鎖を含む単離核酸にも関する。

本発明はまた、図1 A（配列番号1）または図1 B（配列番号3）に示す核酸配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、天然のh V R 1 d タンパク質の活性を有するh V R 1 d ポリペプチドをコードする単離核酸にも関する。

【0025】

本発明はまた、図1 A（配列番号1）に示す核酸配列を含む単離核酸にも関する。 30

本発明はまた、図1 B（配列番号3）に示す核酸配列を含む単離核酸にも関する。

本発明はまた、図1 A（配列番号1）または図1 B（配列番号3）の単離核酸であって、該核酸がゲノム核酸またはc D N Aであるものにも関する。

本発明はまた、図1 A（配列番号1）または図1 B（配列番号3）の単離核酸であって、該核酸がR N Aであるものにも関する。

本発明はまた、図1 A（配列番号1）または図1 B（配列番号3）の単離核酸であって、該核酸がさらに標識を含むものにも関する。

【0026】

本発明はまた、h V R 1 d タンパク質またはポリペプチドをコードする本明細書に記載した核酸に異種タンパク質またはペプチドをコードする核酸配列がインフレームで連結して 40 なる単離核酸にも関する。

本発明はまた、（a）h V R 1 d . 1 の欠失変異体をコードする核酸配列；（b）h V R 1 d . 2 の欠失変異体をコードする核酸配列；または（c）（a）または（b）の核酸配列の相補鎖をコードする核酸配列を含む核酸にも関する。

【0027】

本発明はさらに、配列番号1および／または配列番号3の単離核酸分子であって、ヌクレオチド配列がC末端かN末端のいずれかからの連続的なヌクレオチド欠失を含むものにも関する。

本発明はさらに、配列番号2および／または配列番号4の単離ポリペプチド分子であって、ポリペプチド配列がC末端かN末端のいずれかからの連続的なアミノ酸欠失を含むもの 50

にも関する。

【0028】

本発明はさらに、(a) hVR1d.1の付加変異体をコードする核酸配列；(b) hVR1d.2の付加変異体をコードする核酸配列；または(c) (a)または(b)の核酸配列の相補鎖をコードする核酸配列を含む核酸にも関する。

本発明はさらに、(a) hVR1d.1の置換変異体をコードする核酸配列；(b) hVR1d.2の置換変異体をコードする核酸配列；または(c) (a)または(b)の核酸配列の相補鎖をコードする核酸配列を含む核酸にも関する。

【0029】

本発明はさらに、本発明の核酸を含む組換えベクターに関する。

10

本発明はさらに、宿主細胞での本発明の核酸の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した本発明の該配列を含む発現ベクターに関する。

本発明はさらに、宿主細胞での本発明の核酸の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した本発明の該配列を含む発現ベクターに関する。

【0030】

本発明はさらに、本明細書に記載の発現ベクターおよびターゲティング手段を含む送達複合体に関する。

本発明はさらに、本発明の核酸を含む遺伝子操作した宿主細胞に関する。

20

本発明はさらに、宿主細胞での本明細書に記載の核酸配列の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した本明細書に記載の該核酸を含む遺伝子操作した宿主細胞に関する。

本発明はさらに、宿主細胞での本明細書に記載の核酸配列の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した本明細書に記載の該核酸を含む遺伝子操作した宿主細胞に関する。

【0031】

本発明はさらに、工程：(a) 適当な培地で宿主細胞を培養してhVR1dポリペプチドを生成させ、ついで(b) 該hVR1dポリペプチドを単離する、ことを含むhVR1dポリペプチドの製造方法に関する。

30

本発明はさらに、工程：(a) 宿主細胞での本明細書に記載の核酸配列の発現を制御する転写および翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結した本明細書に記載の該核酸を含む遺伝子操作した宿主細胞を、適当な培地で培養してhVR1dポリペプチドを生成させ、ついで(b) 該hVR1dポリペプチドを単離する、ことを含むhVR1dポリペプチドの製造方法に関する。

【0032】

本発明はさらに、hVR1dポリペプチドの製造方法であって、hVR1dポリペプチドがhVR1d.1またはhVR1d.2または機能的に等価なその誘導体である方法に関する。

本発明はさらに、hVR1dポリペプチドのエピトープに特異的に反応する抗体の製造方法に関する。

40

本発明はさらに、本発明の核酸を含むトランスジェニック動物の製造方法に関する。

【0033】

本発明はさらに、本発明の核酸によってコードされる実質的に純粋なポリペプチドに関する。

本発明はさらに、寄託クローンによって提供される核酸配列によってコードされる実質的に純粋なポリペプチドに関する。

本発明はさらに、図2A(配列番号2)または図2B(配列番号4)に示す実質的に純粋なヒトhVR1dポリペプチドに関する。

本発明はさらに、図2A(配列番号2)または図2B(配列番号4)に示すポリペプチド

50

と少なくとも90%同一の実質的に純粋なポリペプチドに関する。

【0034】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドおよび第二の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質に関する。

本発明はさらに、治療学的有効量の本発明のポリペプチドおよび薬理的に許容しうる担体を含む医薬製剤に関する。

【0035】

本発明はさらに、試料中の野生型または変異体hVR1d核酸分子の検出および／または定量のための試験キットであって、工程：該試料を本発明の核酸と接触させ、ついで野生型または変異体hVR1d核酸の存在または不在および／または量の指標として標識を検出および／または定量することを含む試験キットに関する。 10

【0036】

本発明はさらに、試料中の野生型または変異体hVR1dポリペプチドの検出および／または定量のための試験キットであって、工程：該試料を本発明の抗体と接触させ、ついで野生型または変異体hVR1d核酸の存在または不在および／または量の指標としてポリペプチド-抗体複合体を検出および／または定量することを含む試験キットに関する。

【0037】

本発明はさらに、hVR1d活性を変調する化合物の同定方法であって、(a) hVR1d遺伝子を発現する細胞に被験化合物を接触させ；(b) 該細胞でのhVR1d遺伝子発現のレベルを測定し、ついで(c) (b)で得られたレベルを、該化合物の不在下で得られたhVR1d遺伝子発現と比較し、もしも(b)で得られたレベルが該化合物の不在下で得られたレベルと異なる場合には、hVR1d活性を変調する化合物が同定されることを含む方法に関する。 20

【0038】

本発明はさらに、hVR1d活性を変調する化合物の同定方法であって、(a) hVR1dポリペプチドを含む細胞に被験化合物を接触させ；(b) 該細胞でのhVR1dポリペプチドまたは活性のレベルを測定し、ついで(c) (b)で得られたレベルを、該化合物の不在下で得られたhVR1dポリペプチドまたは活性と比較し、もしも(b)で得られたレベルが該化合物の不在下で得られたレベルと異なる場合には、hVR1d活性を変調する化合物が同定されることを含む方法に関する。 30

【0039】

本発明はさらに、イオンチャネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、(a) 本発明の核酸を発現する細胞に被験化合物を接触させ；ついで(b) 該被験化合物がhVR1d活性を変調するか否かを決定することを含む方法に関する。

本発明はさらに、イオンチャネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、(a) 本発明の核酸に被験化合物を接触させ；ついで(b) 該被験化合物が本発明の該核酸と相互作用するか否かを決定することを含む方法に関する。

【0040】

本発明はさらに、イオンチャネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、(a) hVR1d制御配列に作動可能に連結したリポーター遺伝子を含む細胞または細胞溶解液に被験化合物を接触させ；ついで(b) 該リポーター遺伝子産物の発現を検出することを含む方法に関する。 40

本発明はさらに、イオンチャネル関連障害を制御する化合物の同定方法であって、(a) hVR1d転写物を含む細胞または細胞溶解液に被験化合物を接触させ；ついで(b) 該hVR1d転写物の翻訳を検出することを含む方法に関する。

【0041】

本発明はさらに、患者においてイオンチャネル関連障害を変調する方法であって、該患者に治療学的有効量のhVR1dポリペプチドを投与することを含む方法に関する。

本発明はさらに、患者においてイオンチャネル関連障害を変調する方法であって、該hVR1dポリペプチドがhVR1d.1またはhVR1d.2、または機能的に等価なその 50

誘導体であることを特徴とする方法に関する。

本発明はさらに、患者においてイオンチャンネル関連障害を変調する方法であって、該 h V R 1 d ポリペプチドが h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2、または機能的に等価なその誘導体であり、該患者がヒトであることを特徴とする方法に関する。

【0042】

本発明はさらに、本発明の送達複合体の有効量を患者に投与することを含む、遺伝子療法の方法に関する。

本発明はさらに、h V R 1 d ポリペプチドの活性を変調することを含む、イオンチャンネル関連障害の治療方法に関する。

本発明はさらに、h V R 1 d ポリペプチドの活性を変調することを含み、該 h V R 1 d ポリペプチドが h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2、または機能的に等価なその誘導体であることを特徴とする、イオンチャンネル関連障害の治療方法に関する。 10

【0043】

本発明はさらに、イオンチャンネル関連障害の治療方法であって、h V R 1 d ポリペプチドの活性を変調することを含み、該 h V R 1 d ポリペプチドが h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2、または機能的に等価なその誘導体であり、h V R 1 d ポリペプチドの活性を増大するかまたは該活性と拮抗する化合物の有効量を投与することを含む方法に関する。

【0044】

本発明はさらに、h V R 1 d 遺伝子の発現を低減させる化合物の有効量を投与することを含む、イオンチャンネル関連障害の治療方法に関する。 20

本発明はさらに、h V R 1 d 遺伝子の発現を低減させる化合物の有効量を投与することを含み、該化合物が、h V R 1 d 転写物をターゲティングし翻訳を抑制するアンチセンスまたはリボザイム分子をコードするオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、イオンチャンネル関連障害の治療方法に関する。

【0045】

本発明はさらに、h V R 1 d 遺伝子の発現を低減させる化合物の有効量を投与することを含み、該化合物が、h V R 1 d 転写物をターゲティングし翻訳を抑制するアンチセンスまたはリボザイム分子をコードするオリゴヌクレオチドであり、該化合物が、h V R 1 d 遺伝子のプロモーターと三重らせんを形成し転写を抑制することの特徴とする、イオンチャンネル関連障害の治療方法に関する。 30

【0046】

本発明はさらに、h V R 1 d 遺伝子の発現を増大させる化合物の有効量を投与することを含む、イオンチャンネル関連障害の治療方法に関する。

本発明はさらに、薬理的に許容しうる担体と混合した、h V R 1 d 活性を活性化または抑制する化合物を含む、イオンチャンネル関連障害の治療のための医薬調合物に関する。

【0047】

本発明はさらに、h V R 1 d の生物学的活性を変調する化合物の同定方法であって、工程：(a) 配列番号 2 または配列番号 4 の 1 つまたはそれ以上に示す配列を有する h V R 1 d と候補モデュレーター化合物とを混合し、ついで h V R 1 d の活性に対する候補モデュレーター化合物の作用を測定する、ことを含む方法に関する。 40

【0048】

本発明はさらに、イオンチャンネルの生物学的活性を変調する化合物の同定方法であって、工程：(a) 配列番号 2 または配列番号 4 に示す配列を有する h V R 1 d を発現する宿主細胞と候補モデュレーター化合物とを混合し、ついで (b) 発現された h V R 1 d の活性に対する候補モデュレーター化合物の作用を測定する、ことを含む方法に関する。

【0049】

本発明はさらに、h V R 1 d の生物学的活性を変調する化合物の同定方法であって、工程：(a) 本明細書に記載のベクターを有する宿主細胞と候補モデュレーター化合物とを混合し、その際、h V R 1 d が該細胞によって発現され、ついで (b) 発現された h V R 1 d の活性に対する候補モデュレーター化合物の作用を測定する、ことを含む方法に関する 50

。

【0050】

本発明はさらに、hVR1dの生物学的活性を変調しうる化合物のスクリーニング方法であって、工程：(a)本明細書に記載の宿主細胞を用意し、(b)モデュレーター化合物の不在下でのhVR1dの生物学的活性を測定し、(c)該細胞を該モデュレーター化合物と接触させ、ついで(d)該モデュレーター化合物の存在下でのhVR1dの生物学的活性を決定し、その際、該モデュレーター化合物の存在下および該モデュレーター化合物の不在下でのhVR1dの活性の差異が該化合物の変調作用を示す、ことを含む方法に関する。

本発明はさらに、本明細書に記載の方法によって同定したヒトhVR1dの生物学的活性を変調する化合物に関する。 10

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

本発明は、新規なイオンチャネルの形成または機能のための、新規な核酸分子並びに新規なタンパク質およびポリペプチドの単離および同定に関する。さらに詳しくは、本発明は、陽イオンチャネルの形成または機能に関与する新規なヒト遺伝子hVR1dに関し、該遺伝子は2つの異なるスプライス変異体であるhVR1d.1およびhVR1d.2を含み、それぞれ対応するhVR1d.1およびhVR1d.2タンパク質および生物学的に活性なその誘導体または断片をコードする。hVR1dへの全ての言及は、特に明示的に断らない限りhVR1d.1およびhVR1d.2をも参照するものとする。 20

【0052】

本発明のhVR1d核酸分子は、単離した天然に存在する、または組換えにより製造した、ヒトhVR1d.1およびhVR1d.2核酸分子、たとえばDNA分子、クローニングした遺伝子またはその縮重変異体を含む。本発明の構成はまた、単離した天然に存在する、または組換えにより製造した、ヒトhVR1d.1およびhVR1d.2タンパク質またはポリペプチドをも包含する。

【0053】

さらに詳細には、本明細書に開示するのは本発明のhVR1d遺伝子の2つのスプライス変異体のDNA配列である。これら変異体は本明細書においてhVR1d.1およびhVR1d.2(図1Aおよび図1Bを参照)と称する。hVR1d.2のDNA配列は、hVR1d.1のDNA配列と比べて分子の3'末端に付加的な25塩基対を含んでいる。対応するhVR1d.1およびhVR1d.2タンパク質は、アミノ酸残基715までは同じアミノ酸配列であり、アミノ酸残基715でhVR1d.1は6つのアミノ酸C末端配列を含んでいるが、これはhVR1d.2タンパク質の31のアミノ酸C末端配列と異なっている(図2Aおよび図2Bを参照)。 30

【0054】

hVR1d.1(図2A)ポリペプチドの推定分子量は約81.3kDaと決定された。hVR1d.2(図2B)ポリペプチドの推定分子量は約84.3kDaと決定された。

hVR1d.1のコード領域に対応するポリヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド1からヌクレオチド2160までである(図2A)。hVR1d.2のコード領域に対応するポリヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド1からヌクレオチド2235までである(図2B)。 40

【0055】

好ましい態様において、本発明は、hVR1dの開始コドンを除くポリヌクレオチド、それに加えてそれから得られるコードされたポリペプチドを包含する。詳細には、本発明は、配列番号1のヌクレオチド4から2160までに対応するポリヌクレオチド、および配列番号2のアミノ酸2から720までに対応するポリペプチドを包含する。該コード配列を含む組換えベクター、および該ベクターを含む宿主細胞もまた包含される。

【0056】

好ましい態様において、本発明は、hVR1d.2の開始コドンを除くポリヌクレオチド、 50

それに加えてそれから得られるコードされたポリペプチドを包含する。詳細には、本発明は、配列番号3のヌクレオチド4から2235までに対応するポリヌクレオチド、および配列番号4のアミノ酸2から745までに対応するポリペプチドを包含する。該コード配列を含む組換えベクター、および該ベクターを含む宿主細胞もまた包含される。

【0057】

図1に示すhVR1d cDNAに対応するタンパク質は、イオンチャンネルのヒトバニロイドレセプターファミリーと中くらいのレベルのホモロジーを示す、たとえば、報告されたVR1およびVR2およびOTRPC4タンパク質とは約41～47%の同一性および49～57%の類似性、および報告されたEcacおよびCat1およびCat2タンパク質とは約30～33%の同一性および41～42%の類似性を示す。

10

【0058】

本発明のhVR1d cDNA配列およびコードされたタンパク質はまた、報告されたイオンチャンネルのバニロイドファミリーとその組織発現パターンが異なっている。たとえば、本発明のhVR1dタンパク質は、脳の脳梁(CC)、尾状核(CN)、および扁桃(A)などの脊髄および脳組織において高頻度に発現される。

本発明のhVR1dタンパク質は、該タンパク質のN末端セクションに複数のコンセンサスアンキリンドメイン(hVR1dの場合、3つのアンキリンドメイン)とともに6つの膜貫通ドメインを含むことが予測され、これはチャンネルのTRP-バニロイドファミリーの構造的な特徴である(図2Aおよび図2Bを参照)。

【0059】

20

詳細には、hVR1d.1ポリペプチドは、配列番号2(図2A)のアミノ酸約395からアミノ酸約415(TM1;配列番号9);アミノ酸約439からアミノ酸約463(TM2;配列番号10);アミノ酸約479からアミノ酸約499(TM3;配列番号11);アミノ酸約502からアミノ酸約520(TM4;配列番号12);アミノ酸約545からアミノ酸約564(TM5;配列番号13);および/またはアミノ酸約607からアミノ酸約625(TM6;配列番号14)に位置する6つの膜貫通ドメイン(TM1～TM6)を含むことが予測された。この場合、「約」なる語は、上記で参照した膜貫通ドメインポリペプチドのN末端および/またはC末端を超えた1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸を意味している。

【0060】

30

好ましい態様において、以下の膜貫通ドメインポリペプチドが本発明により包含される: MFFLSFCFYFFYNITLTLVSY(配列番号9)、LLGRMFVL I W A M C I S V K E G I A I F L L(配列番号10)、FVFFIQAVLV I L S V F L Y L F A Y(配列番号11)、Y L A C L V L A M A L G W A N M L Y Y(配列番号12)、F L F V Y I A F L L G F G V A L A S L I(配列番号13)、および/またはI L F L F L L I T Y V I L T F V L L L(配列番号14)。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供される。本発明はまた、本明細書に記載するように、これらhVR1d.1膜貫通ドメインポリペプチドの免疫原エピトープおよび/または抗原エピトープとしての使用をも包含する。

【0061】

40

本発明はまた、予測されたhVR1d.1の各膜貫通ドメイン間に介在しているポリペプチド配列をも包含する。これら領域はhVR1dかまたは細胞内のいずれかで溶媒接近可能なので(solvent accessible)、これら領域は各領域に特異的な抗体をデザインするのに特に有用である。そのような抗体はhVR1d完全長ポリペプチドのアンタゴニストまたはアゴニストとして有用であり、その活性を変調することができる。

【0062】

好ましい態様において、以下の膜貫通ドメイン間ポリペプチドが本発明により包含される: Y R P R E E E A I P H P L A L T H K M G W L Q(配列番号15)、R P S D L Q S I L S D A W F H(配列番号16)、T R G F Q S M G M Y S V M I Q K V I L H D V L K F L F V Y I A F L L G F G V A L(配列番号17)、および/またはE K C P K D N

50

KDCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDLNIQQNSKYP（配列番号18）。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供される。本発明はまた、本明細書に記載するように、これらhVR1d.1膜貫通ドメイン間ポリペプチドの免疫原エпитープおよび／または抗原エпитープとしての使用をも包含する。

【0063】

詳細には、hVR1d.2ポリペプチドもまた、配列番号4（図2B）のアミノ酸約395からアミノ酸約415（TM1；配列番号9）；アミノ酸約439からアミノ酸約463（TM2；配列番号10）；アミノ酸約479からアミノ酸約499（TM3；配列番号11）；アミノ酸約502からアミノ酸約520（TM4；配列番号12）；アミノ酸約545からアミノ酸約564（TM5；配列番号13）；および／またはアミノ酸約607からアミノ酸約625（TM6；配列番号14）に位置する6つの膜貫通ドメイン（TM1～TM6）を含むことが予測された。この場合、「約」なる語は、上記で参照した膜貫通ドメインポリペプチドのN末端および／またはC末端を超えた1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸を意味している。

【0064】

本発明は、本明細書に記載するように、図2Aおよび図2Bに示したアンキリンドメインおよび孔ループ領域に対応するポリペプチドの免疫原エпитープおよび／または抗原エпитープとしての使用を包含する。

タンパク質工学および組換えDNA法の知られた方法を用い、本発明のポリペプチドの特性を改善または改変した変異体を生成することができる。たとえば、生物学的な機能的な喪失を伴うことなく該タンパク質のN末端またはC末端から1またはそれ以上のアミノ酸を欠失させることができる。Ronら、J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993)の著者は、3、8、または27のアミノ末端アミノ酸残基の欠失後でさえもヘパリン結合活性を有する変異体KGFタンパク質を報告している。同様に、インターフェロンガンマは、このタンパク質のカルボキシ末端から8～10のアミノ酸残基を欠失した後に10倍までの一層高い活性を示した（Dobeliら、J. Biotechnology 7: 199-216 (1988)）。

【0065】

さらに、変異体はしばしば天然タンパク質と同様の生物学的活性を保持していることを充分な証拠が示している。たとえば、Gayleおよび協同研究者（J. Biol. Chem. 268: 22105-22111 (1993)）は、ヒトサイトカインIL-1aの広範な変異分析を行った。彼らはランダム突然変異誘発を用いて3,500を超える個々のIL-1a変異体を生成したが、これは該分子の全長にわたって変異体当たり平均2.5アミノ酸変化に対応するものであった。複数の変異を各可能なアミノ酸位置で調べた。研究者は、「該分子の大部分は（結合活性かまたは生物学的活性の）いずれかに殆ど影響を及ぼすことなく変えることができる」ことを見出した。実際、調べた3,500を超えるヌクレオチド配列のうち23の独特のアミノ酸配列だけが活性が野生型とは有意に異なるタンパク質を生成した。

【0066】

さらに、ポリペプチドのN末端またはC末端からの1またはそれ以上のアミノ酸の欠失が1またはそれ以上の生物学的機能の修飾または喪失という結果となったとしても、他の生物学的活性は依然として保持されている。たとえば、該タンパク質を認識する抗体を誘発および／または結合する欠失変異体の能力は、N末端またはC末端から該タンパク質の大部分を超えない残基が除去されたときに保持されている可能性が高いであろう。タンパク質のN末端またはC末端残基を欠失した特定のポリペプチドがそのような免疫原活性を保持しているか否かは、本明細書に記載した常法および当該技術分野で知られた他の方法により容易に決定することができる。

【0067】

あるいは、本発明のポリペプチドのそのようなN末端またはC末端欠失は、実際、該ポリペプチドの生物学的活性の1またはそれ以上の有意の増大という結果となるかもしれない。たとえば、多くのポリペプチドの生物学的活性は、いずれかまたは両方の末端の制御ドメインの存在によって支配されている。そのような制御ドメインは、活性化事象（たとえ

ば、同族リガンドまたはレセプターへの結合、リン酸化、タンパク質加水分解的プロセッシングなど)の代わりにそのようなポリペプチドの生物学的活性を有効に抑制する。それゆえ、ポリペプチドの制御ドメインを除去することにより、該ポリペプチドは活性化事象の不在下で有効に生物学的に活性にすることができる。

【0068】

好ましい態様において、以下のN末端hVR1d.1欠失ポリペプチドが本発明により包含される：配列番号2のM1-R720、S2-R720、F3-R720、I4-R720、C5-R720、R6-R720、P7-R720、R8-R720、G9-R720、G10-R720、G11-R720、R12-R720、L13-R720、E14-R720、T15-R720、D16-R720、S17-R720、R18-R720、V19-R720、A20-R720、A21-R720、G22-R720、G23-R720、W24-R720、T25-R720、A26-R720、G27-R720、S28-R720、H29-R720、T30-R720、V31-R720、G32-R720、K33-R720、E34-R720、Q35-R720、K36-R720、A37-R720、S38-R720、D39-R720、T40-R720、S41-R720、P42-R720、M43-R720、G44-R720、H45-R720、R46-R720、E47-R720、Q48-R720、G49-R720、A50-R720、S51-R720、I52-R720、G53-R720、D54-R720、G55-R720、G56-R720、E57-R720、T58-R720、A59-R720、G60-R720、E61-R720、G62-R720、G63-R720、E64-R720、R65-R720、P66-R720、S67-R720、V68-R720、R69-R720、S70-R720、G71-R720、S72-R720、G73-R720、D74-R720、V75-R720、E76-R720、Q77-R720、G78-R720、L79-R720、G80-R720、V81-R720、C82-R720、G83-R720、C84-R720、S85-R720、N86-R720、H87-R720、T88-R720、L89-R720、W90-R720、A91-R720、G92-R720、R93-R720、A94-R720、K95-R720、G96-R720、S97-R720、R98-R720、G99-R720、P100-R720、P101-R720、V102-R720、T103-R720、P104-R720、P105-R720、M106-R720、A107-R720、L108-R720、P109-R720、A110-R720、D111-R720、F112-R720、L113-R720、M114-R720、H115-R720、K116-R720、L117-R720、T118-R720、A119-R720、S120-R720、D121-R720、T122-R720、G123-R720、K124-R720、T125-R720、C126-R720、L127-R720、M128-R720、K129-R720、A130-R720、L131-R720、L132-R720、N133-R720、I134-R720、N135-R720、P136-R720、N137-R720、T138-R720、K139-R720、E140-R720、I141-R720、V142-R720、R143-R720、I144-R720、L145-R720、L146-R720、A147-R720、F148-R720、A149-R720、E150-R720、E151-R720、N152-R720、D153-R720、I154-R720、L155-R720、G156-R720、R157-R720、F158-R720、I159-R720、N160-R720、A161-R720、E162-R720、Y163-R720、T164-R720、E165-R720、E166-R720、A167-R720、Y168-R720、E169-R720、G170-R720、Q171-R720、T172-R720、A173-R720、L174-R720、N175-R720、I176-R720、A177-R720、I178-R720、E179-R720、R180-R720、R181-R720、Q182-R720、G183-R720、D184-R720、I185-R720、A186-R720、A187-R720、L188-R720、L189-R720、I190-R720、A191-R720、A192-R720、G193-R720、A194-R720、D195-R720、V196-R720、N197-R720、A198-R720、H199-R720、A200-R720、K201-R720、G202-R720、A203-R720、F204-R720、F205-R720、N206-R720、P207-R720、K208-R720、Y209-R720、Q210-R720、H211-R720、E212-R720、G213-R720、F214-R720、Y215-R720、F216-R720、G217-R720、E218-R720、T219-R720、P220-R720、L221-R720、A222-R720、L223-R720、A224-R720、A225-R720、C226-R720、T227-R720、N228-R720、Q229-R720、P230-R720、E231-R720、I232-R720、V233-R720、Q234-R720、L235-R720、L236-R720、M237-R720、E238-R720、H239-R720、E240-R720、Q241-R720、T242-R720、D243-R720、I244-R720、T245-R720、S246-R720、R247-R720、D248-R720、S249-R720、R250-R720、G251-R720、N252-R720、N253-R720、I254-R720、L255-R720、H256-R720、A257-R720、L258-R720、V259-R720、T260-R720、V261-R720、A262-R720、E263-R720、D264-R720、F265-R720、K266-R720、T267-R720、Q268-R720、N269-R720、D270-R720、F271-R720、V272-R720、K273-R720、R274-R720、M275-R720、Y276-R720、D277-R720、M278-R720、I279-R720、L280-R720、L281-R720、R282-R720、S283-R720、G284-R720、N285-R720、W286-R720、E287-R720、L288-R720、E289-R720、T290-R720、T291-R720、R292-R720、N293-R720、N294-R720、D295-R720、G296-R720、L297-R720、T298-R720、P299-R720、L300-R720、Q301-R720、L302-R720、A303-R720、A304-R720、K305-R720、M306-R720、G307-R720、K308-R720、A309-R720、E310-R720、I311-R720、L312-R720、K313-R720、Y314-R720、I315-R720、L316-R720、S317-R720、R318-R720、E319-R720、I320-R720、K321-R720、E322-R720、K323-R720、R324-R720、L325-R720、R326-R720、S327-R720、L

328-R720、S329-R720、R330-R720、K331-R720、F332-R720、T333-R720、D334-R720、W335-R720、A336-R720、Y337-R720、G338-R720、P339-R720、V340-R720、S341-R720、S342-R720、S343-R720、L344-R720、Y345-R720、D346-R720、L347-R720、T348-R720、N349-R720、V350-R720、D351-R720、T352-R720、T353-R720、T354-R720、D355-R720、N356-R720、S357-R720、V358-R720、L359-R720、E360-R720、I361-R720、T362-R720、V363-R720、Y364-R720、N365-R720、T366-R720、N367-R720、I368-R720、D369-R720、N370-R720、R371-R720、H372-R720、E373-R720、M374-R720、L375-R720、T376-R720、L377-R720、E378-R720、P379-R720、L380-R720、H381-R720、T382-R720、L383-R720、L384-R720、H385-R720、M386-R720、K387-R720、W388-R720、K389-R720、K390-R720、F391-R720、A392-R720、K393-R720、H394-R720、M395-R720、F396-R720、F397-R720、L398-R720、S399-R720、F400-R720、C401-R720、F402-R720、Y403-R720、F404-R720、F405-R720、Y406-R720、N407-R720、I408-R720、T409-R720、L410-R720、T411-R720、L412-R720、V413-R720、S414-R720、Y415-R720、Y416-R720、R417-R720、P418-R720、R419-R720、E420-R720、E421-R720、E422-R720、A423-R720、I424-R720、P425-R720、H426-R720、P427-R720、L428-R720、A429-R720、L430-R720、T431-R720、H432-R720、K433-R720、M434-R720、G435-R720、W436-R720、L437-R720、Q438-R720、L439-R720、L440-R720、G441-R720、R442-R720、M443-R720、F444-R720、V445-R720、L446-R720、I447-R720、W448-R720、A449-R720、M450-R720、C451-R720、I452-R720、S453-R720、V454-R720、K455-R720、E456-R720、G457-R720、I458-R720、A459-R720、I460-R720、F461-R720、L462-R720、L463-R720、R464-R720、P465-R720、S466-R720、D467-R720、L468-R720、Q469-R720、S470-R720、I471-R720、L472-R720、S473-R720、D474-R720、A475-R720、W476-R720、F477-R720、H478-R720、F479-R720、V480-R720、F481-R720、F482-R720、I483-R720、Q484-R720、A485-R720、V486-R720、L487-R720、V488-R720、I489-R720、L490-R720、S491-R720、V492-R720、F493-R720、L494-R720、Y495-R720、L496-R720、F497-R720、A498-R720、Y499-R720、K500-R720、E501-R720、Y502-R720、L503-R720、A504-R720、C505-R720、L506-R720、V507-R720、L508-R720、A509-R720、M510-R720、A511-R720、L512-R720、G513-R720、W514-R720、A515-R720、N516-R720、M517-R720、L518-R720、Y519-R720、Y520-R720、T521-R720、R522-R720、G523-R720、F524-R720、Q525-R720、S526-R720、M527-R720、G528-R720、M529-R720、Y530-R720、S531-R720、V532-R720、M533-R720、I534-R720、Q535-R720、K536-R720、V537-R720、I538-R720、L539-R720、H540-R720、D541-R720、V542-R720、L543-R720、K544-R720、F545-R720、L546-R720、F547-R720、V548-R720、Y549-R720、I550-R720、A551-R720、F552-R720、L553-R720、L554-R720、G555-R720、F556-R720、G557-R720、V558-R720、A559-R720、L560-R720、A561-R720、S562-R720、L563-R720、I564-R720、E565-R720、K566-R720、C567-R720、P568-R720、K569-R720、D570-R720、N571-R720、K572-R720、D573-R720、C574-R720、S575-R720、S576-R720、Y577-R720、G578-R720、S579-R720、F580-R720、S581-R720、D582-R720、A583-R720、V584-R720、L585-R720、E586-R720、L587-R720、F588-R720、K589-R720、L590-R720、T591-R720、I592-R720、G593-R720、L594-R720、G595-R720、D596-R720、L597-R720、N598-R720、I599-R720、Q600-R720、Q601-R720、N602-R720、S603-R720、K604-R720、Y605-R720、P606-R720、I607-R720、L608-R720、F609-R720、L610-R720、F611-R720、L612-R720、L613-R720、I614-R720、T615-R720、Y616-R720、V617-R720、I618-R720、L619-R720、T620-R720、F621-R720、V622-R720、L623-R720、L624-R720、L625-R720、N626-R720、M627-R720、L628-R720、I629-R720、A630-R720、L631-R720、M632-R720、G633-R720、E634-R720、T635-R720、V636-R720、E637-R720、N638-R720、V639-R720、S640-R720、K641-R720、E642-R720、S643-R720、E644-R720、R645-R720、I646-R720、W647-R720、R648-R720、L649-R720、Q650-R720、R651-R720、A652-R720、R653-R720、T654-R720、I655-R720、L656-R720、E657-R720、F658-R720、E659-R720、K660-R720、M661-R720、L662-R720、P663-R720、E664-R720、W665-R720、L666-R720、R667-R720、S668-R720、R669-R720、F670-R720、R671-R720、M672-R720、G673-R720、E674-R720、L675-R720、C676-R720、K677-R720、V678-R720、A679-R720、E680-R720、D681-R720、D682-R720、F683-R720、R684-R720、L685-R720、C686-R720、L687-R720、R688-R720、I689-R720、N690-R720

20、E691-R720、V692-R720、K693-R720、W694-R720、T695-R720、E696-R720、W697-R720、K698-R720、T699-R720、H700-R720、V701-R720、S702-R720、F703-R720、L704-R720、N705-R720、E706-R720、D707-R720、P708-R720、G709-R720、P710-R720、V711-R720、R712-R720、R713-R720、および／またはT714-R720。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。本発明はまた、本明細書に記載するように、これらN末端hVR1d.1欠失ポリペプチドの免疫原エピトープおよび／または抗原エピトープとしての使用をも包含する。

【0069】

好ましい態様において、以下のC末端hVR1d.1欠失ポリペプチドが本発明により包
含される：配列番号2のM1-R720、M1-V719、M1-A718、M1-V717、M1-T716、M1-G715、M1-T 10
714、M1-R713、M1-R712、M1-V711、M1-P710、M1-G709、M1-P708、M1-D707、M1-E706、M1-
N705、M1-L704、M1-F703、M1-S702、M1-V701、M1-H700、M1-T699、M1-K698、M1-W697、M1-
E696、M1-T695、M1-W694、M1-K693、M1-V692、M1-E691、M1-N690、M1-I689、M1-R688、M1-
L687、M1-C686、M1-L685、M1-R684、M1-F683、M1-D682、M1-D681、M1-E680、M1-A679、
M1-V678、M1-K677、M1-C676、M1-L675、M1-E674、M1-G673、M1-M672、M1-R671、M1-F670
、M1-R669、M1-S668、M1-R667、M1-L666、M1-W665、M1-E664、M1-P663、M1-L662、M1-M66
1、M1-K660、M1-E659、M1-F658、M1-E657、M1-L656、M1-I655、M1-T654、M1-R653、M1-A6
52、M1-R651、M1-Q650、M1-L649、M1-R648、M1-W647、M1-I646、M1-R645、M1-E644、M1-S
643、M1-E642、M1-K641、M1-S640、M1-V639、M1-N638、M1-E637、M1-V636、M1-T635、M1-
E634、M1-G633、M1-M632、M1-L631、M1-A630、M1-I629、M1-L628、M1-M627、M1-N626、M1 20
-L625、M1-L624、M1-L623、M1-V622、M1-F621、M1-T620、M1-L619、M1-I618、M1-V617、M1-
Y616、M1-T615、M1-I614、M1-L613、M1-L612、M1-F611、M1-L610、M1-F609、M1-L608、
M1-I607、M1-P606、M1-Y605、M1-K604、M1-S603、M1-N602、M1-Q601、M1-Q600、M1-I599
、M1-N598、M1-L597、M1-D596、M1-G595、M1-L594、M1-G593、M1-I592、M1-T591、M1-L59
0、M1-K589、M1-F588、M1-L587、M1-E586、M1-L585、M1-V584、M1-A583、M1-D582、M1-S5
81、M1-F580、M1-S579、M1-G578、M1-Y577、M1-S576、M1-S575、M1-C574、M1-D573、M1-K
572、M1-N571、M1-D570、M1-K569、M1-P568、M1-C567、M1-K566、M1-E565、M1-I564、M1-
L563、M1-S562、M1-A561、M1-L560、M1-A559、M1-V558、M1-G557、M1-F556、M1-G555、M1-
L554、M1-L553、M1-F552、M1-A551、M1-I550、M1-Y549、M1-V548、M1-F547、M1-L546、M1-
F545、M1-K544、M1-L543、M1-V542、M1-D541、M1-H540、M1-L539、M1-I538、M1-V537、 30
M1-K536、M1-Q535、M1-I534、M1-M533、M1-V532、M1-S531、M1-Y530、M1-M529、M1-G528
、M1-M527、M1-S526、M1-Q525、M1-F524、M1-G523、M1-R522、M1-T521、M1-Y520、M1-Y51
9、M1-L518、M1-M517、M1-N516、M1-A515、M1-W514、M1-G513、M1-L512、M1-A511、M1-M5
10、M1-A509、M1-L508、M1-V507、M1-L506、M1-C505、M1-A504、M1-L503、M1-Y502、M1-E
501、M1-K500、M1-Y499、M1-A498、M1-F497、M1-L496、M1-Y495、M1-L494、M1-F493、M1-
V492、M1-S491、M1-L490、M1-I489、M1-V488、M1-L487、M1-V486、M1-A485、M1-Q484、M1-
I483、M1-F482、M1-F481、M1-V480、M1-F479、M1-H478、M1-F477、M1-W476、M1-A475、M1-
D474、M1-S473、M1-L472、M1-I471、M1-S470、M1-Q469、M1-L468、M1-D467、M1-S466、
M1-P465、M1-R464、M1-L463、M1-L462、M1-F461、M1-I460、M1-A459、M1-I458、M1-G457
、M1-E456、M1-K455、M1-V454、M1-S453、M1-I452、M1-C451、M1-M450、M1-A449、M1-W44 40
8、M1-I447、M1-L446、M1-V445、M1-F444、M1-M443、M1-R442、M1-G441、M1-L440、M1-L4
39、M1-Q438、M1-L437、M1-W436、M1-G435、M1-M434、M1-K433、M1-H432、M1-T431、M1-L
430、M1-A429、M1-L428、M1-P427、M1-H426、M1-P425、M1-I424、M1-A423、M1-E422、M1-
E421、M1-E420、M1-R419、M1-P418、M1-R417、M1-Y416、M1-Y415、M1-S414、M1-V413、M1-
L412、M1-T411、M1-L410、M1-T409、M1-I408、M1-N407、M1-Y406、M1-F405、M1-F404、M1-
Y403、M1-F402、M1-C401、M1-F400、M1-S399、M1-L398、M1-F397、M1-F396、M1-M395、
M1-H394、M1-K393、M1-A392、M1-F391、M1-K390、M1-K389、M1-W388、M1-K387、M1-M386
、M1-H385、M1-L384、M1-L383、M1-T382、M1-H381、M1-L380、M1-P379、M1-E378、M1-L37
7、M1-T376、M1-L375、M1-M374、M1-E373、M1-H372、M1-R371、M1-N370、M1-D369、M1-I3
68、M1-N367、M1-T366、M1-N365、M1-Y364、M1-V363、M1-T362、M1-I361、M1-E360、M1-L 50

359、M1-V358、M1-S357、M1-N356、M1-D355、M1-T354、M1-T353、M1-T352、M1-D351、M1-V350、M1-N349、M1-T348、M1-L347、M1-D346、M1-Y345、M1-L344、M1-S343、M1-S342、M1-S341、M1-V340、M1-P339、M1-G338、M1-Y337、M1-A336、M1-W335、M1-D334、M1-T333、M1-F332、M1-K331、M1-R330、M1-S329、M1-L328、M1-S327、M1-R326、M1-L325、M1-R324、M1-K323、M1-E322、M1-K321、M1-I320、M1-E319、M1-R318、M1-S317、M1-L316、M1-I315、M1-Y314、M1-K313、M1-L312、M1-I311、M1-E310、M1-A309、M1-K308、M1-G307、M1-M306、M1-K305、M1-A304、M1-A303、M1-L302、M1-Q301、M1-L300、M1-P299、M1-T298、M1-L297、M1-G296、M1-D295、M1-N294、M1-N293、M1-R292、M1-T291、M1-T290、M1-E289、M1-L288、M1-E287、M1-W286、M1-N285、M1-G284、M1-S283、M1-R282、M1-L281、M1-L280、M1-I279、M1-M278、M1-D277、M1-Y276、M1-M275、M1-R274、M1-K273、M1-V272、M1-F271、M1-D270、M1-N269、M1-Q268、M1-T267、M1-K266、M1-F265、M1-D264、M1-E263、M1-A262、M1-V261、M1-T260、M1-V259、M1-L258、M1-A257、M1-H256、M1-L255、M1-I254、M1-N253、M1-N252、M1-G251、M1-R250、M1-S249、M1-D248、M1-R247、M1-S246、M1-T245、M1-I244、M1-D243、M1-T242、M1-Q241、M1-E240、M1-H239、M1-E238、M1-M237、M1-L236、M1-L235、M1-Q234、M1-V233、M1-I232、M1-E231、M1-P230、M1-Q229、M1-N228、M1-T227、M1-C226、M1-A225、M1-A224、M1-L223、M1-A222、M1-L221、M1-P220、M1-T219、M1-E218、M1-G217、M1-F216、M1-Y215、M1-F214、M1-G213、M1-E212、M1-H211、M1-Q210、M1-Y209、M1-K208、M1-P207、M1-N206、M1-F205、M1-F204、M1-A203、M1-G202、M1-K201、M1-A200、M1-H199、M1-A198、M1-N197、M1-V196、M1-D195、M1-A194、M1-G193、M1-A192、M1-A191、M1-I190、M1-L189、M1-L188、M1-A187、M1-A186、M1-I185、M1-D184、M1-G183、M1-Q182、M1-R181、M1-R180、M1-E179、M1-I178、M1-A177、M1-I176、M1-N175、M1-L174、M1-A173、M1-T172、M1-Q171、M1-G170、M1-E169、M1-Y168、M1-A167、M1-E166、M1-E165、M1-T164、M1-Y163、M1-E162、M1-A161、M1-N160、M1-I159、M1-F158、M1-R157、M1-G156、M1-L155、M1-I154、M1-D153、M1-N152、M1-E151、M1-E150、M1-A149、M1-F148、M1-A147、M1-L146、M1-L145、M1-I144、M1-R143、M1-V142、M1-I141、M1-E140、M1-K139、M1-T138、M1-N137、M1-P136、M1-N135、M1-I134、M1-N133、M1-L132、M1-L131、M1-A130、M1-K129、M1-M128、M1-L127、M1-C126、M1-T125、M1-K124、M1-G123、M1-T122、M1-D121、M1-S120、M1-A119、M1-T118、M1-L117、M1-K116、M1-H115、M1-M114、M1-L113、M1-F112、M1-D111、M1-A110、M1-P109、M1-L108、M1-A107、M1-M106、M1-P105、M1-P104、M1-T103、M1-V102、M1-P101、M1-P100、M1-G99、M1-R98、M1-S97、M1-G96、M1-K95、M1-A94、M1-R93、M1-G92、M1-A91、M1-W90、M1-L89、M1-T88、M1-H87、M1-N86、M1-S85、M1-C84、M1-G83、M1-C82、M1-V81、M1-G80、M1-L79、M1-G78、M1-Q77、M1-E76、M1-V75、M1-D74、M1-G73、M1-S72、M1-G71、M1-S70、M1-R69、M1-V68、M1-S67、M1-P66、M1-R65、M1-E64、M1-G63、M1-G62、M1-E61、M1-G60、M1-A59、M1-T58、M1-E57、M1-G56、M1-G55、M1-D54、M1-G53、M1-I52、M1-S51、M1-A50、M1-G49、M1-Q48、M1-E47、M1-R46、M1-H45、M1-G44、M1-M43、M1-P42、M1-S41、M1-T40、M1-D39、M1-S38、M1-A37、M1-K36、M1-Q35、M1-E34、M1-K33、M1-G32、M1-V31、M1-T30、M1-H29、M1-S28、M1-G27、M1-A26、M1-T25、M1-W24、M1-G23、M1-G22、M1-A21、M1-A20、M1-V19、M1-R18、M1-S17、M1-D16、M1-T15、M1-E14、M1-L13、M1-R12、M1-G11、M1-G10、M1-G9、M1-R8、および／またはM1-P7。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。本発明はまた、本明細書に記載するように、これらC末端hVR1d.1欠失ポリペプチドの免疫原エピトープおよび／または抗原エピトープとしての使用をも包含する。

【0070】

好ましい態様において、以下のN末端hVR1d.2欠失ポリペプチドが本発明により包含される：配列番号4のM1-V745、S2-V745、F3-V745、I4-V745、C5-V745、R6-V745、P7-V745、R8-V745、G9-V745、G10-V745、G11-V745、R12-V745、L13-V745、E14-V745、T15-V745、D16-V745、S17-V745、R18-V745、V19-V745、A20-V745、A21-V745、G22-V745、G23-V745、W24-V745、T25-V745、A26-V745、G27-V745、S28-V745、H29-V745、T30-V745、V31-V745、G32-V745、K33-V745、E34-V745、Q35-V745、K36-V745、A37-V745、S38-V745、D39-V745、T40-V745、S41-V745、P42-V745、M43-V745、G44-V745、H45-V745、R46-V745、E47-V745

5、Q48-V745、G49-V745、A50-V745、S51-V745、I52-V745、G53-V745、D54-V745、G55-V745、G56-V745、E57-V745、T58-V745、A59-V745、G60-V745、E61-V745、G62-V745、G63-V745、E64-V745、R65-V745、P66-V745、S67-V745、V68-V745、R69-V745、S70-V745、G71-V745、S72-V745、G73-V745、D74-V745、V75-V745、E76-V745、Q77-V745、G78-V745、L79-V745、G80-V745、V81-V745、C82-V745、G83-V745、C84-V745、S85-V745、N86-V745、H87-V745、T88-V745、L89-V745、W90-V745、A91-V745、G92-V745、R93-V745、A94-V745、K95-V745、G96-V745、S97-V745、R98-V745、G99-V745、P100-V745、P101-V745、V102-V745、T103-V745、P104-V745、P105-V745、M106-V745、A107-V745、L108-V745、P109-V745、A110-V745、D111-V745、F112-V745、L113-V745、M114-V745、H115-V745、K116-V745、L117-V745、T118-V745、A119-V745、S120-V745、D121-V745、T122-V745、G123-V745、K124-V745、T125-V745、C126-V745、L127-V745、M128-V745、K129-V745、A130-V745、L131-V745、L132-V745、N133-V745、I134-V745、N135-V745、P136-V745、N137-V745、T138-V745、K139-V745、E140-V745、I141-V745、V142-V745、R143-V745、I144-V745、L145-V745、L146-V745、A147-V745、F148-V745、A149-V745、E150-V745、E151-V745、N152-V745、D153-V745、I154-V745、L155-V745、G156-V745、R157-V745、F158-V745、I159-V745、N160-V745、A161-V745、E162-V745、Y163-V745、T164-V745、E165-V745、E166-V745、A167-V745、Y168-V745、E169-V745、G170-V745、Q171-V745、T172-V745、A173-V745、L174-V745、N175-V745、I176-V745、A177-V745、I178-V745、E179-V745、R180-V745、R181-V745、Q182-V745、G183-V745、D184-V745、I185-V745、A186-V745、A187-V745、L188-V745、L189-V745、I190-V745、A191-V745、A192-V745、G193-V745、A194-V745、D195-V745、V196-V745、N197-V745、A198-V745、H199-V745、A200-V745、K201-V745、G202-V745、A203-V745、F204-V745、F205-V745、N206-V745、P207-V745、K208-V745、Y209-V745、Q210-V745、H211-V745、E212-V745、G213-V745、F214-V745、Y215-V745、F216-V745、G217-V745、E218-V745、T219-V745、P220-V745、L221-V745、A222-V745、L223-V745、A224-V745、A225-V745、C226-V745、T227-V745、N228-V745、Q229-V745、P230-V745、E231-V745、I232-V745、V233-V745、Q234-V745、L235-V745、L236-V745、M237-V745、E238-V745、H239-V745、E240-V745、Q241-V745、T242-V745、D243-V745、I244-V745、T245-V745、S246-V745、R247-V745、D248-V745、S249-V745、R250-V745、G251-V745、N252-V745、N253-V745、I254-V745、L255-V745、H256-V745、A257-V745、L258-V745、V259-V745、T260-V745、V261-V745、A262-V745、E263-V745、D264-V745、F265-V745、K266-V745、T267-V745、Q268-V745、N269-V745、D270-V745、F271-V745、V272-V745、K273-V745、R274-V745、M275-V745、Y276-V745、D277-V745、M278-V745、I279-V745、L280-V745、L281-V745、R282-V745、S283-V745、G284-V745、N285-V745、W286-V745、E287-V745、L288-V745、E289-V745、T290-V745、T291-V745、R292-V745、N293-V745、N294-V745、D295-V745、G296-V745、L297-V745、T298-V745、P299-V745、L300-V745、Q301-V745、L302-V745、A303-V745、A304-V745、K305-V745、M306-V745、G307-V745、K308-V745、A309-V745、E310-V745、I311-V745、L312-V745、K313-V745、Y314-V745、I315-V745、L316-V745、S317-V745、R318-V745、E319-V745、I320-V745、K321-V745、E322-V745、K323-V745、R324-V745、L325-V745、R326-V745、S327-V745、L328-V745、S329-V745、R330-V745、K331-V745、F332-V745、T333-V745、D334-V745、W335-V745、A336-V745、Y337-V745、G338-V745、P339-V745、V340-V745、S341-V745、S342-V745、S343-V745、L344-V745、Y345-V745、D346-V745、L347-V745、T348-V745、N349-V745、V350-V745、D351-V745、T352-V745、T353-V745、T354-V745、D355-V745、N356-V745、S357-V745、V358-V745、L359-V745、E360-V745、I361-V745、T362-V745、V363-V745、Y364-V745、N365-V745、T366-V745、N367-V745、I368-V745、D369-V745、N370-V745、R371-V745、H372-V745、E373-V745、M374-V745、L375-V745、T376-V745、L377-V745、E378-V745、P379-V745、L380-V745、H381-V745、T382-V745、L383-V745、L384-V745、H385-V745、M386-V745、K387-V745、W388-V745、K389-V745、K390-V745、F391-V745、A392-V745、K393-V745、H394-V745、M395-V745、F396-V745、F397-V745、L398-V745、S399-V745、F400-V745、C401-V745、F402-V745、Y403-V745、F404-V745、F405-V745、Y406-V745、N407-V745、I408-V745、T409-V745、L410-V745、T411-V745、L412-V745、V413-V745、S414-V745、Y

415-V745、Y416-V745、R417-V745、P418-V745、R419-V745、E420-V745、E421-V745、E422-V745、A423-V745、I424-V745、P425-V745、H426-V745、P427-V745、L428-V745、A429-V745、L430-V745、T431-V745、H432-V745、K433-V745、M434-V745、G435-V745、W436-V745、L437-V745、Q438-V745、L439-V745、L440-V745、G441-V745、R442-V745、M443-V745、F444-V745、V445-V745、L446-V745、I447-V745、W448-V745、A449-V745、M450-V745、C451-V745、I452-V745、S453-V745、V454-V745、K455-V745、E456-V745、G457-V745、I458-V745、A459-V745、I460-V745、F461-V745、L462-V745、L463-V745、R464-V745、P465-V745、S466-V745、D467-V745、L468-V745、Q469-V745、S470-V745、I471-V745、L472-V745、S473-V745、D474-V745、A475-V745、W476-V745、F477-V745、H478-V745、F479-V745、V480-V745、F481-V745、F482-V745、I483-V745、Q484-V745、A485-V745、V486-V745、L487-V745、V488-V745、I489-V745、L490-V745、S491-V745、V492-V745、F493-V745、L494-V745、Y495-V745、L496-V745、F497-V745、A498-V745、Y499-V745、K500-V745、E501-V745、Y502-V745、L503-V745、A504-V745、C505-V745、L506-V745、V507-V745、L508-V745、A509-V745、M510-V745、A511-V745、L512-V745、G513-V745、W514-V745、A515-V745、N516-V745、M517-V745、L518-V745、Y519-V745、Y520-V745、T521-V745、R522-V745、G523-V745、F524-V745、Q525-V745、S526-V745、M527-V745、G528-V745、M529-V745、Y530-V745、S531-V745、V532-V745、M533-V745、I534-V745、Q535-V745、K536-V745、V537-V745、I538-V745、L539-V745、H540-V745、D541-V745、V542-V745、L543-V745、K544-V745、F545-V745、L546-V745、F547-V745、V548-V745、Y549-V745、I550-V745、A551-V745、F552-V745、L553-V745、L554-V745、G555-V745、F556-V745、G557-V745、V558-V745、A559-V745、L560-V745、A561-V745、S562-V745、L563-V745、I564-V745、E565-V745、K566-V745、C567-V745、P568-V745、K569-V745、D570-V745、N571-V745、K572-V745、D573-V745、C574-V745、S575-V745、S576-V745、Y577-V745、G578-V745、S579-V745、F580-V745、S581-V745、D582-V745、A583-V745、V584-V745、L585-V745、E586-V745、L587-V745、F588-V745、K589-V745、L590-V745、T591-V745、I592-V745、G593-V745、L594-V745、G595-V745、D596-V745、L597-V745、N598-V745、I599-V745、Q600-V745、Q601-V745、N602-V745、S603-V745、K604-V745、Y605-V745、P606-V745、I607-V745、L608-V745、F609-V745、L610-V745、F611-V745、L612-V745、L613-V745、I614-V745、T615-V745、Y616-V745、V617-V745、I618-V745、L619-V745、T620-V745、F621-V745、V622-V745、L623-V745、L624-V745、L625-V745、N626-V745、M627-V745、L628-V745、I629-V745、A630-V745、L631-V745、M632-V745、G633-V745、E634-V745、T635-V745、V636-V745、E637-V745、N638-V745、V639-V745、S640-V745、K641-V745、E642-V745、S643-V745、E644-V745、R645-V745、I646-V745、W647-V745、R648-V745、L649-V745、Q650-V745、R651-V745、A652-V745、R653-V745、T654-V745、I655-V745、L656-V745、E657-V745、F658-V745、E659-V745、K660-V745、M661-V745、L662-V745、P663-V745、E664-V745、W665-V745、L666-V745、R667-V745、S668-V745、R669-V745、F670-V745、R671-V745、M672-V745、G673-V745、E674-V745、L675-V745、C676-V745、K677-V745、V678-V745、A679-V745、E680-V745、D681-V745、D682-V745、F683-V745、R684-V745、L685-V745、C686-V745、L687-V745、R688-V745、I689-V745、N690-V745、E691-V745、V692-V745、K693-V745、W694-V745、T695-V745、E696-V745、W697-V745、K698-V745、T699-V745、H700-V745、V701-V745、S702-V745、F703-V745、L704-V745、N705-V745、E706-V745、D707-V745、P708-V745、G709-V745、P710-V745、V711-V745、R712-V745、R713-V745、T714-V745、D715-V745、F716-V745、N717-V745、K718-V745、I719-V745、Q720-V745、D721-V745、S722-V745、S723-V745、R724-V745、N725-V745、N726-V745、S727-V745、K728-V745、T729-V745、T730-V745、L731-V745、N732-V745、A733-V745、F734-V745、E735-V745、E736-V745、V737-V745、E738-V745、および／またはE739-V745。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。本発明はまた、本明細書に記載するように、これらN末端hVR1d.2欠失ポリペプチドの免疫原エピートープおよび／または抗原エピートープとしての使用をも包含する。

【0071】

好ましい態様において、以下のC末端hVR1d.2欠失ポリペプチドが本発明により包

含まれる：配列番号4のM1-V745、M1-S744、M1-T743、M1-E742、M1-P741、M1-F740、M1-E739、M1-E738、M1-V737、M1-E736、M1-E735、M1-F734、M1-A733、M1-N732、M1-L731、M1-T730、M1-T729、M1-K728、M1-S727、M1-N726、M1-N725、M1-R724、M1-S723、M1-S722、M1-D721、M1-Q720、M1-I719、M1-K718、M1-N717、M1-F716、M1-D715、M1-T714、M1-R713、M1-R712、M1-V711、M1-P710、M1-G709、M1-P708、M1-D707、M1-E706、M1-N705、M1-L704、M1-F703、M1-S702、M1-V701、M1-H700、M1-T699、M1-K698、M1-W697、M1-E696、M1-T695、M1-W694、M1-K693、M1-V692、M1-E691、M1-N690、M1-I689、M1-R688、M1-L687、M1-C686、M1-L685、M1-R684、M1-F683、M1-D682、M1-D681、M1-E680、M1-A679、M1-V678、M1-K677、M1-C676、M1-L675、M1-E674、M1-G673、M1-M672、M1-R671、M1-F670、M1-R669、M1-S668、M1-R667、M1-L666、M1-W665、M1-E664、M1-P663、M1-L662、M1-M661、M1-K660、M1-E659、M1-F658、M1-E657、M1-L656、M1-I655、M1-T654、M1-R653、M1-A652、M1-R651、M1-Q650、M1-L649、M1-R648、M1-W647、M1-I646、M1-R645、M1-E644、M1-S643、M1-E642、M1-K641、M1-S640、M1-V639、M1-N638、M1-E637、M1-V636、M1-T635、M1-E634、M1-G633、M1-M632、M1-L631、M1-A630、M1-I629、M1-L628、M1-M627、M1-N626、M1-L625、M1-L624、M1-L623、M1-V622、M1-F621、M1-T620、M1-L619、M1-I618、M1-V617、M1-Y616、M1-T615、M1-I614、M1-L613、M1-L612、M1-F611、M1-L610、M1-F609、M1-L608、M1-I607、M1-P606、M1-Y605、M1-K604、M1-S603、M1-N602、M1-Q601、M1-Q600、M1-I599、M1-N598、M1-L597、M1-D596、M1-G595、M1-L594、M1-G593、M1-I592、M1-T591、M1-L590、M1-K589、M1-F588、M1-L587、M1-E586、M1-L585、M1-V584、M1-A583、M1-D582、M1-S581、M1-F580、M1-S579、M1-G578、M1-Y577、M1-S576、M1-S575、M1-C574、M1-D573、M1-K572、M1-N571、M1-D570、M1-K569、M1-P568、M1-C567、M1-K566、M1-E565、M1-I564、M1-L563、M1-S562、M1-A561、M1-L560、M1-A559、M1-V558、M1-G557、M1-F556、M1-G555、M1-L554、M1-L553、M1-F552、M1-A551、M1-I550、M1-Y549、M1-V548、M1-F547、M1-L546、M1-F545、M1-K544、M1-L543、M1-V542、M1-D541、M1-H540、M1-L539、M1-I538、M1-V537、M1-K536、M1-Q535、M1-I534、M1-M533、M1-V532、M1-S531、M1-Y530、M1-M529、M1-G528、M1-M527、M1-S526、M1-Q525、M1-F524、M1-G523、M1-R522、M1-T521、M1-Y520、M1-Y519、M1-L518、M1-M517、M1-N516、M1-A515、M1-W514、M1-G513、M1-L512、M1-A511、M1-M510、M1-A509、M1-L508、M1-V507、M1-L506、M1-C505、M1-A504、M1-L503、M1-Y502、M1-E501、M1-K500、M1-Y499、M1-A498、M1-F497、M1-L496、M1-Y495、M1-L494、M1-F493、M1-V492、M1-S491、M1-L490、M1-I489、M1-V488、M1-L487、M1-V486、M1-A485、M1-Q484、M1-I483、M1-F482、M1-F481、M1-V480、M1-F479、M1-H478、M1-F477、M1-W476、M1-A475、M1-D474、M1-S473、M1-L472、M1-I471、M1-S470、M1-Q469、M1-L468、M1-D467、M1-S466、M1-P465、M1-R464、M1-L463、M1-L462、M1-F461、M1-I460、M1-A459、M1-I458、M1-G457、M1-E456、M1-K455、M1-V454、M1-S453、M1-I452、M1-C451、M1-M450、M1-A449、M1-W448、M1-I447、M1-L446、M1-V445、M1-F444、M1-M443、M1-R442、M1-G441、M1-L440、M1-L439、M1-Q438、M1-L437、M1-W436、M1-G435、M1-M434、M1-K433、M1-H432、M1-T431、M1-L430、M1-A429、M1-L428、M1-P427、M1-H426、M1-P425、M1-I424、M1-A423、M1-E422、M1-E421、M1-E420、M1-R419、M1-P418、M1-R417、M1-Y416、M1-Y415、M1-S414、M1-V413、M1-L412、M1-T411、M1-L410、M1-T409、M1-I408、M1-N407、M1-Y406、M1-F405、M1-F404、M1-Y403、M1-F402、M1-C401、M1-F400、M1-S399、M1-L398、M1-F397、M1-F396、M1-M395、M1-H394、M1-K393、M1-A392、M1-F391、M1-K390、M1-K389、M1-W388、M1-K387、M1-M386、M1-H385、M1-L384、M1-L383、M1-T382、M1-H381、M1-L380、M1-P379、M1-E378、M1-L377、M1-T376、M1-L375、M1-M374、M1-E373、M1-H372、M1-R371、M1-N370、M1-D369、M1-I368、M1-N367、M1-T366、M1-N365、M1-Y364、M1-V363、M1-T362、M1-I361、M1-E360、M1-L359、M1-V358、M1-S357、M1-N356、M1-D355、M1-T354、M1-T353、M1-T352、M1-D351、M1-V350、M1-N349、M1-T348、M1-L347、M1-D346、M1-Y345、M1-L344、M1-S343、M1-S342、M1-S341、M1-V340、M1-P339、M1-G338、M1-Y337、M1-A336、M1-W335、M1-D334、M1-T333、M1-F332、M1-K331、M1-R330、M1-S329、M1-L328、M1-S327、M1-R326、M1-L325、M1-R324、M1-K323、M1-E322、M1-K321、M1-I320、M1-E319、M1-R318、M1-S317、M1-L316、M1-I315、M1-Y314、M1-K313、M1-L312、M1-I311、M1-E310、M1-A309、M1-K308、M1-G307、M1-M306、M1-K305、M1-

A304、M1-A303、M1-L302、M1-Q301、M1-L300、M1-P299、M1-T298、M1-L297、M1-G296、M1-D295、M1-N294、M1-N293、M1-R292、M1-T291、M1-T290、M1-E289、M1-L288、M1-E287、M1-W286、M1-N285、M1-G284、M1-S283、M1-R282、M1-L281、M1-L280、M1-I279、M1-M278、M1-D277、M1-Y276、M1-M275、M1-R274、M1-K273、M1-V272、M1-F271、M1-D270、M1-N269、M1-Q268、M1-T267、M1-K266、M1-F265、M1-D264、M1-E263、M1-A262、M1-V261、M1-T260、M1-V259、M1-L258、M1-A257、M1-H256、M1-L255、M1-I254、M1-N253、M1-N252、M1-G251、M1-R250、M1-S249、M1-D248、M1-R247、M1-S246、M1-T245、M1-I244、M1-D243、M1-T242、M1-Q241、M1-E240、M1-H239、M1-E238、M1-M237、M1-L236、M1-L235、M1-Q234、M1-V233、M1-I232、M1-E231、M1-P230、M1-Q229、M1-N228、M1-T227、M1-C226、M1-A225、M1-A224、M1-L223、M1-A222、M1-L221、M1-P220、M1-T219、M1-E218、M1-G217、M1-F216、M1-Y215、M1-F214、M1-G213、M1-E212、M1-H211、M1-Q210、M1-Y209、M1-K208、M1-P207、M1-N206、M1-F205、M1-F204、M1-A203、M1-G202、M1-K201、M1-A200、M1-H199、M1-A198、M1-N197、M1-V196、M1-D195、M1-A194、M1-G193、M1-A192、M1-A191、M1-I190、M1-L189、M1-L188、M1-A187、M1-A186、M1-I185、M1-D184、M1-G183、M1-Q182、M1-R181、M1-R180、M1-E179、M1-I178、M1-A177、M1-I176、M1-N175、M1-L174、M1-A173、M1-T172、M1-Q171、M1-G170、M1-E169、M1-Y168、M1-A167、M1-E166、M1-E165、M1-T164、M1-Y163、M1-E162、M1-A161、M1-N160、M1-I159、M1-F158、M1-R157、M1-G156、M1-L155、M1-I154、M1-D153、M1-N152、M1-E151、M1-E150、M1-A149、M1-F148、M1-A147、M1-L146、M1-L145、M1-I144、M1-R143、M1-V142、M1-I141、M1-E140、M1-K139、M1-T138、M1-N137、M1-P136、M1-N135、M1-I134、M1-N133、M1-L132、M1-L131、M1-A130、M1-K129、M1-M128、M1-L127、M1-C126、M1-T125、M1-K124、M1-G123、M1-T122、M1-D121、M1-S120、M1-A119、M1-T118、M1-L117、M1-K116、M1-H115、M1-M114、M1-L113、M1-F112、M1-D111、M1-A110、M1-P109、M1-L108、M1-A107、M1-M106、M1-P105、M1-P104、M1-T103、M1-V102、M1-P101、M1-P100、M1-G99、M1-R98、M1-S97、M1-G96、M1-K95、M1-A94、M1-R93、M1-G92、M1-A91、M1-W90、M1-L89、M1-T88、M1-H87、M1-N86、M1-S85、M1-C84、M1-G83、M1-C82、M1-V81、M1-G80、M1-L79、M1-G78、M1-Q77、M1-E76、M1-V75、M1-D74、M1-G73、M1-S72、M1-G71、M1-S70、M1-R69、M1-V68、M1-S67、M1-P66、M1-R65、M1-E64、M1-G63、M1-G62、M1-E61、M1-G60、M1-A59、M1-T58、M1-E57、M1-G56、M1-G55、M1-D54、M1-G53、M1-I52、M1-S51、M1-A50、M1-G49、M1-Q48、M1-E47、M1-R46、M1-H45、M1-G44、M1-M43、M1-P42、M1-S41、M1-T40、M1-D39、M1-S38、M1-A37、M1-K36、M1-Q35、M1-E34、M1-K33、M1-G32、M1-V31、M1-T30、M1-H29、M1-S28、M1-G27、M1-A26、M1-T25、M1-W24、M1-G23、M1-G22、M1-A21、M1-A20、M1-V19、M1-R18、M1-S17、M1-D16、M1-T15、M1-E14、M1-L13、M1-R12、M1-G11、M1-G10、M1-G9、M1-R8、および／またはM1-P7。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。本発明はまた、本明細書に記載するように、これらC末端hVR1d.2欠失ポリペプチドの免疫原エピトープおよび／または抗原エピトープとしての使用をも包含する。

【0072】

さらに、本発明は、ブダペスト条約の規定に従ってアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）、10801、ユニバーシティ・ブルーバール、マナサス、バージニア20110-2209に____にATCC受託番号____で寄託してある配列番号1に対応するhVR1dクローンを提供する。

本発明の他の態様は、以下に記載するように、本発明のhVR1dタンパク質およびポリペプチドに対する抗体、およびイオンチャンネルの機能不全に関連するヒト疾患の診断および治療のための方法および組成物に関する。

【0073】

5.1. 本発明のhVR1d核酸分子

本発明のhVR1d核酸、たとえばhVR1d.1およびhVR1d.2は、新規なヒトイオンチャンネルの形成および／または機能に関与するタンパク質またはポリペプチドをコードする新規なヒト核酸分子である。これら新規な核酸およびタンパク質は、陽イオンチャンネルタンパク質のTRPおよびバニロイドファミリー並びに当該技術分野で知られた

他の陽イオンチャンネルタンパク質とある種の配列上および構造上のホモロジーを示すが、そのようなホモロジーを示すタンパク質は組織発現の差異とともにコンダクタンスや透過性などの機能において有意の差異を示すことが当該技術分野において知られている。そのようなことから、これら核酸分子およびこれらホモロジーを有する該分子によってコードされるタンパク質は、それぞれ多様で別個で独特の核酸およびタンパク質を依然として表しうるということが認められる。

【0074】

本発明のhVR1d核酸分子は、以下の配列を含むものである：(a)図1Aまたは図1Bにそれぞれ示すhVR1d.1またはhVR1d.2のDNA配列；(b)図2Aまたは図2Bにそれぞれ示すhVR1d.1またはhVR1d.2のアミノ酸配列をコードする核酸配列；(c)図2Aまたは図2Bのアミノ酸配列をコードする核酸配列の相補鎖に高度にストリンジェントな条件下〔たとえば、0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中、65℃にてフィルター結合したDNAへハイブリダイゼーション、ついで0.1×SSC/0.1%SDS中、68℃にて洗浄（たとえば、Ausubel F. M.ら編、1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & sons, Inc., ニューヨーク、2.10.3頁を参照）〕でハイブリダイズする核酸配列；または(d)図2Aまたは図2Bのアミノ酸配列をコードする核酸配列の相補鎖によりストリンジェントでない条件下、たとえば中くらいにストリンジェントな条件下〔たとえば、0.2×SSC/0.1%SDS中、42℃にて洗浄（Ausubelら、1989上掲）〕でハイブリダイズし、図2Aまたは図2Bに示す配列によってコードされるhVR1d遺伝子産物と機能的に等価な遺伝子産物をコードする核酸配列。本明細書において「機能的に等価」とは、本明細書に記載のhVR1d核酸分子によってコードされるhVR1d遺伝子産物と実質的に同様のインビボまたはインビトロ活性、たとえばイオンチャンネルの形成または機能を示すことのできるタンパク質をいう。

【0075】

本明細書において「hVR1d核酸分子」または「hVR1d核酸」なる語はまた、天然に存在する変異体またはその変異体アレルも含めて、(a)～(d)の核酸配列の断片および/または縮重変異体をもいう。そのような断片としては、たとえば、該タンパク質の機能性ドメインに対応するhVR1dタンパク質の部分をコードする核酸配列が挙げられる。そのようなhVR1d核酸断片の一つの態様は、予測された孔ループを含む、hVR1dタンパク質の第五および第六膜貫通セグメントをコードするイントロンなしの連続したオープンリーディングフレームを含む核酸を含む。

【0076】

さらに、本発明のhVR1d核酸分子は、上記(a)～(d)の核酸配列の少なくとも約6、好ましくは少なくとも約12、およびさらに好ましくは少なくとも約18の連続したヌクレオチドに高度にストリンジェントな条件下または中くらいにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離核酸、好ましくはDNA分子を含む。

【0077】

本発明のhVR1d核酸分子はまた、上記(a)～(d)の核酸配列にハイブリダイズする、それゆえ相補鎖である、核酸分子、好ましくはDNA分子を含む。そのようなハイブリダイゼーション条件は、上記のように高度にストリンジェントまたは中くらいにストリンジェントであってよい。核酸分子がデオキシオリゴヌクレオチド（「オリゴ」）である場合は、高度にストリンジェントな条件は、たとえば、6×SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウム中、37℃（14塩基オリゴの場合）、48℃（17塩基オリゴの場合）、55℃（20塩基オリゴの場合）、および60℃（23塩基オリゴの場合）で洗浄することを含む。本発明の核酸分子は、たとえばhVR1d遺伝子制御において有用な、またはhVR1d核酸配列の増幅反応におけるアンチセンスプライマーとして有用な、hVR1dアンチセンス分子をコードするかまたは該分子として作用してよい。さらに、そのような配列は、同様にhVR1d遺伝子制御に有用なリボザイムおよび/または三重らせん配

列の一部として用いることができる。さらに、そのような分子は、診断方法の成分として用いることができ、それによって、たとえば、イオンチャンネルの機能不全が関与する疾患を引き起こすかまたは素因となる特定の h V R 1 d アレルまたは別の仕方ですプライスされた h V R 1 d 転写物の存在を検出することができる。

【0078】

さらに、遺伝コードの縮重のため、h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2 のアミノ酸配列を実質的にコードする他の D N A 配列を、h V R 1 d ポリペプチドのクローニングおよび発現のために本発明の実施に用いることができる。そのような D N A 配列は、本発明の h V R 1 d 核酸にストリンジェントな（高いまたは中くらいの）条件下でハイブリダイズすることのできる配列、または遺伝コードの縮重がなければストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることのできるであろう配列を含む。

10

【0079】

典型的に、本発明の h V R 1 d 核酸は、図 1 A または図 1 B の核酸配列に対してヌクレオチドレベルで少なくとも約 80 % の全配列ホモロジー、さらに好ましくは少なくとも約 85 ~ 90 % の全ホモロジー、および最も好ましくは少なくとも約 95 % の全ホモロジー（デフォルトパラメータを用いて C L U S T A L W アルゴリズムにより決定（Thompson, J. D. ら、Nucleic Acids Research, 2(22): 4673-4680, (1994)））を示すべきである。

【0080】

本発明に従って用いることのできる変化した h V R 1 d 核酸配列としては、上記と同じかまたは機能的に等価な遺伝子産物をコードする、修飾核酸分子（すなわち、変異した先端欠失した）という結果となる種々のヌクレオチド残基の欠失、付加または置換が挙げられる。遺伝子産物自体が、サイレントな変化となって機能的に等価な h V R 1 d ポリペプチドを生成するような h V R 1 d タンパク質配列内のアミノ酸残基の欠失、付加または置換を含んでいてよい。そのようなアミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解度、ハイドロフォビシティ、ハイドロフィリシティ、および／または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。たとえば、負に荷電したアミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ、正に荷電したアミノ酸としてはリジン、アルギニンおよびヒスチジンが挙げられ、類似のハイドロフィリシティ値を有する非電荷の極性頭部基を有するアミノ酸としては以下のものが挙げられる：ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン。機能的に等価な h V R 1 d ポリペプチドとしては、天然の h V R 1 d タンパク質と同じタイプの生物学的活性（たとえば、陽イオンチャンネル）を示すポリペプチドが挙げられるが、必ずしも同程度である必要はない。

20

30

【0081】

本発明の核酸分子または配列は、遺伝子産物のプロセッシングおよび発現を修飾する変更を含む（これに限られるものでない）様々な目的のために h V R 1 d コード配列を変えるべく遺伝子操作により作製することができる。たとえば、当該技術分野でよく知られた技術、たとえば部位特異的突然変異誘発を用い、新たな制限部位を挿入したり、グリコシル化のパターン、リン酸化などを変えるために変異を導入することができる。たとえば、酵母などのある種の発現系では宿主細胞は遺伝子産物を過度にグリコシル化する。そのような発現系を用いる場合には、N 結合したグリコシル化部位を排除すべく h V R 1 d コード配列を変化させるのが好ましい。

40

【0082】

他の態様では、本発明の h V R 1 d 核酸、たとえば修飾 h V R 1 d 核酸は、異種タンパク質コード配列に連結して融合タンパク質をコードするようにすることができる。好ましい態様によれば、h V R 1 d タンパク質の活性を有するポリペプチドをコードする本発明の h V R 1 d 核酸またはその断片を、停止コドンで中断されることなく、またインフレームで、異種タンパク質またはペプチドをコードするヌクレオチド配列に連結させる。融合タンパク質は、h V R 1 d 配列と異種タンパク質配列との間に開裂部位を含むようにし、それによって h V R 1 d タンパク質が異種残基から開裂できるようにすることができる。本

50

発明の融合タンパク質をコードする核酸配列は、完全長のhVR1dコード配列、先端欠失したhVR1dをコードする配列、変異したhVR1dをコードする配列またはhVR1dのペプチド断片をコードする配列を含んでいてよい。

【0083】

本発明のhVR1d核酸分子はまた、hVR1d cDNAまたはゲノムhVR1d DNAを得るためのハイブリダイゼーションプローブとしても用いることができる。さらに、本発明の核酸は、他の種からhVR1d cDNAおよびゲノムDNAを単離するためのPCR増幅法においてプライマーとして用いることができる。

本発明のhVR1d遺伝子配列はまた、変異体hVR1d遺伝子アレルを単離するのに用いることができる。そのような変異体アレルは、イオンチャンネル機能不全に関連する遺伝子型を有することが知られているかまたは有すると提唱されている個体から単離することができる。ついで、変異体アレルおよび変異体アレル遺伝子産物は、以下のセクション5.4に記載するスクリーニング、治療および診断システムに利用することができる。さらに、そのようなhVR1d遺伝子配列は、イオンチャンネル機能不全に影響を及ぼし得るhVR1d遺伝子制御（たとえば、プロモーター）欠陥を検出するのに用いることができる。

【0084】

変異hVR1d遺伝子のcDNAの単離は、たとえば、PCR（当業者によく知られた技術（たとえば、米国特許第4,683,202号を参照））を用いて行うことができる。第一のcDNA鎖は、変異hVR1dアレルを有すると推定される個体において発現されることが知られているまたは発現されると思われる組織から単離したmRNAにオリゴdTオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、ついで新たな鎖を逆転写酵素で伸長させることにより合成する。ついで、cDNAの第二の鎖を、正常な遺伝子の5'末端に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いて合成する。ついで、これら2つのプライマーを用い、生成物をPCRにより増幅し、適当なベクター中にクローニングし、ついで当該技術分野でよく知られた方法によりDNA配列分析に供する。変異hVR1dのDNA配列を正常なhVR1dアレルと比較することにより、変異hVR1d遺伝子産物の機能の喪失または変更を引き起こしている変異を確認することができる。

【0085】

別法として、変異hVR1dアレルを有していると思われるまたは有することが知られている個体から得たDNAを用いてゲノムライブラリーを構築することができ、または変異hVR1dアレルを発現することが知られているまたは発現されると思われる組織からのRNAを用いてcDNAライブラリーを構築することができる。ついで、正常なhVR1d遺伝子またはその適当な断片は、標識してそのようなライブラリー中の対応の変異hVR1dアレルを同定するプローブとして用いることができる。ついで、変異hVR1d遺伝子配列を含むクローンを精製し、当該技術分野でよく知られた方法に従って配列分析に供することができる。

【0086】

他の態様によれば、たとえば、変異hVR1dアレルを有していると思われるまたは有することが知られている個体において、そのような変異アレルを発現することが知られているまたは発現されると思われる組織から単離したRNAから合成したcDNAを用いて発現ライブラリーを構築することができる。推定の変異組織によって生成された遺伝子産物は、下記セクション5.3に記載するように、正常なhVR1d遺伝子産物に対して産生した抗体とともに標準抗体スクリーニング法を用いて発現およびスクリーニングすることができる。スクリーニング法については、たとえば、Harlow, E.およびLane編、1988, "Antibodies: A Laboratory Manual"、コールドスプリングハーバープレス、コールドスプリングハーバーを参照。

【0087】

hVR1d変異が機能の変化した発現遺伝子産物という結果となる（たとえば、ミスセンスまたはフレームシフト変異の結果）場合には、抗hVR1d遺伝子産物抗体のポリクロ

ーナルセットは、変異 h V R 1 d 遺伝子産物と交差反応しやすいであろう。そのような標識抗体との反応によって検出したライブラリークローンは、当業者によく知られた方法に従って精製し、配列分析に供することができる。

【0088】

本発明の別の態様において、h V R 1 d のコード配列は、本明細書に開示する h V R 1 d 遺伝子およびタンパク質の核酸および／またはアミノ酸配列に基づき、当該技術分野でよく知られた化学的方法を用いて全体または一部を合成することができる。たとえば、Caruthersら、1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7: 215-233; CreaおよびHorn, 1980, Nuc. Acids Res. 9(10): 2331; MatteucciおよびCaruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21: 719; およびChowおよびKempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9(12): 2807-2817を参照。本発明はまた、(a) 上記 h V R 1 d 核酸および／またはその相補鎖を含むDNAベクター；(b) コード配列の発現を指令する制御配列と作動可能に連結した上記 h V R 1 d コード配列を含むDNA発現ベクター；および(c) コード配列の宿主細胞中での発現を指令する制御配列に作動可能に連結した上記 h V R 1 d コード配列を含むべく遺伝子操作により作製した宿主細胞をも包含する。本明細書において使用する制御配列としては、誘導性および非誘導性のプロモーター、エンハンサー、オペレーターおよび発現を駆動および制御する当業者に知られた他の配列が挙げられるが、これらに限られるものではない。そのような制御配列としては、サイトメガロウイルス h C M V 前初期遺伝子、S V 4 0 アデノウイルスの初期または後期プロモーター、l a c系、t r p系、T A C系、T R C系、ファージAの主オペレーターおよびプロモーター領域、f d コーティングタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、および酵母α接合因子のプロモーターが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0089】

本発明はさらに核酸アナログを包含し、該核酸アナログとしては本明細書に記載の核酸分子に等価なペプチド核酸アナログが挙げられるが、これに限られるものではない。この場合に「等価」とは、上記に記載した核酸分子と同じ一次塩基配列を有する核酸アナログをいう。核酸アナログおよび核酸アナログの合成方法は当業者によく知られている。たとえば、Egholm, M.ら、1993, Nature 365: 566-568; およびPerry-O'Keefe, H.ら、1996, Proc. Natl. Acad. USA 93: 14670-14675を参照。

【0090】

5.2. h V R 1 d タンパク質およびポリペプチド

本発明の h V R 1 d 核酸分子は、完全長 h V R 1 d タンパク質、たとえば h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2、機能的に活性なまたは等価な h V R 1 d タンパク質およびポリペプチド、たとえば変異した、先端欠失したまたは欠失した形態の h V R 1 d、h V R 1 d のペプチド断片、または h V R 1 d 融合タンパク質を含む h V R 1 d ポリペプチドを適当な宿主細胞中で発現するのを指令する組換えDNA分子を生成するのに用いることができる。機能的に等価な h V R 1 d ポリペプチドとしては、天然の h V R 1 d タンパク質と同じタイプの生物学的活性（たとえば、陽イオンチャンネルの形成および／または機能）を示すポリペプチドが挙げられるが、必ずしも同程度の活性である必要はない。

【0091】

好ましい態様において、本発明のタンパク質およびポリペプチドは、図2Aおよび図2Bにそれぞれ示す h V R 1 d . 1 および h V R 1 d . 2 のアミノ酸配列を含む。これら配列は、6つの膜貫通ドメインおよびイオンチャンネルの T R P -バニロイドファミリーで保存されている全体ホモロジーを含む。さらに、図2Aおよび図Bのアミノ酸配列は、第一の膜貫通ドメインに先立つ該タンパク質のN末端セグメント中に3つのアンキリンドメインを含んでいる。

【0092】

本発明の h V R 1 d タンパク質およびポリペプチドは、h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2 のペプチド断片、たとえば該タンパク質の1またはそれ以上のドメインに対応するペプ

チド、変異した、先端欠失したまたは欠失した形態の該タンパク質およびポリペプチド、並びにhVR1d融合タンパク質を含み、これらhVR1dの誘導体は全て、一旦本明細書に開示のhVR1d核酸配列およびアミノ酸配列が得られたら当該技術分野でよく知られた方法により得ることができる。下記セクション5.1に記載するように、本明細書のタンパク質およびポリペプチドは、サイレントな変化となって機能的に等価なhVR1dポリペプチドを生成するようなhVR1dタンパク質配列内のアミノ酸残基の欠失、付加または置換を含んでいてよい。そのようなアミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解度、ハイドロフォビシティ、ハイドロフィリシティ、および／または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。たとえば、負に荷電したアミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ、正に荷電したアミノ酸としてはリジン、アルギニンおよびヒスチジンが挙げられ、類似のハイドロフィリシティ値を有する非電荷の極性頭部基を有するアミノ酸としては以下のものが挙げられる：ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン。

【0093】

本発明の変異したまたは変化した形態のhVR1dタンパク質およびポリペプチドは、当該技術分野でよく知られたランダム突然変異誘発法かまたは部位特異的突然変異誘発法を用い、または化学的方法により、たとえばタンパク質合成法により（下記セクション5.1を参照）得ることができる。変異hVR1dタンパク質またはポリペプチドは、可変残基はたとえばアミノ酸残基の欠失または挿入によりまたは1またはそれ以上の異なるアミノ酸残基の置換により変えながら、機能にとって重要な領域は保持するように遺伝子操作により作製することができる。たとえば、ポリペプチドの可変位置での保存的な変化を行ってhVR1dの機能を保持した変異hVR1dポリペプチドを遺伝子操作により生成することができる。可変領域での非保存的な変化は、所望なら遺伝子操作によりhVR1dの機能を変えることができる。あるいは、機能の修飾（機能を増大させるかまたは低減するか）のいずれかが望まれる場合には、ポリペプチドの保存領域の欠失または非保存的な変化を遺伝子操作により作製することができる。

【0094】

hVR1dアミノ酸配列を含む融合タンパク質もまた、遺伝子操作および化学的なタンパク質合成法を含む当該技術分野で知られた方法により得ることができる。好ましい態様によれば、本発明の融合タンパク質は、hVR1dの活性を有するポリペプチドをコードする本発明のhVR1d核酸、またはその断片が、インフレームで、また停止コドンで中断されることなく、異種タンパク質またはペプチドをコードするヌクレオチド配列に連結してなる単離核酸分子によってコードされる。

【0095】

本発明の融合タンパク質は、関係のないタンパク質またはポリペプチド配列に連結した、完全長のhVR1dアミノ酸配列、hVR1dペプチド配列、たとえば1またはそれ以上の機能性ドメインをコードする配列、変異hVR1dアミノ酸配列または先端欠失したhVR1dアミノ酸配列を含むものを包含する。そのような融合タンパク質としては、hVR1d融合タンパク質を安定化しタンパク質のインビボでの半減期を長引かせるIgFc融合物、またはマーカー機能を付与する酵素、蛍光タンパク質またはルミネセンスタンパク質への融合物が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0096】

本発明の好ましい態様によれば、本発明のhVR1dタンパク質およびポリペプチド、およびその誘導体は、遺伝子操作法を用いて製造する。それゆえ、組換え法により生物学的に活性なhVR1dポリペプチドを発現させるため、下記セクション5.1に記載するように、該ポリペプチドをコードする核酸分子またはその機能的等価物を適当な発現ベクター、すなわち挿入したコード配列の転写および翻訳に必要な配列を含むベクターに挿入する。さらに詳細には、hVR1d核酸分子を、宿主細胞中での該hVR1d核酸の発現を制御する転写および／または翻訳制御情報を含む制御ヌクレオチド配列に作動可能に連結

させる。かくして生成した h V R 1 d 遺伝子産物、並びに組換え h V R 1 d 発現ベクターでトランスフェクションまたは形質転換した宿主細胞および細胞株は様々な目的に用いることができる。これら目的としては、結合を競合的に抑制して h V R 1 d 活性を「中和」しうるものを含めて、h V R 1 d タンパク質またはポリペプチドに結合する抗体（すなわち、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）を生成すること、および h V R 1 d アナログまたはリガンドをスクリーニングおよび選択することが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0097】

当業者によく知られた方法を用い、本発明の h V R 1 d コード配列および適当な転写および翻訳制御配列および／またはシグナルを含む発現ベクターを構築する。これら方法としては、インビトロ組換え DNA 法、合成法およびインビボ組換え／遺伝子組換え法が挙げられる。たとえば、Maniatisら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク、および Ausubel F. M.ら編、1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience、ニューヨークを参照。Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバープレス、ニューヨークをも参照。

【0098】

様々な宿主-発現ベクター系を用いて本発明の h V R 1 d コード配列を発現させることができる。そのような宿主-発現系は、目的とするコード配列を産生させ、その後に精製するビヒクルを表すものであるが、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクションしたときに対応の h V R 1 d 遺伝子産物をインシトゥでおよび／または機能をインビボで示す細胞をも表す。これら宿主としては、h V R 1 d コード配列を組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA またはコスミド DNA 発現ベクターで形質転換した細菌（たとえば、大腸菌、*B. subtilis*）；h V R 1 d コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母（たとえば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；h V R 1 d コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（たとえば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；h V R 1 d コード配列を含む組換えウイルス発現ベクターを感染させた（たとえば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）または組換えプラスミド発現ベクター（たとえば、Ti プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（たとえば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（たとえば、アデノウイルス後期プロモーターまたはワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター）を含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（たとえば、COS、CHO、BHK、293、3T3）などの微生物が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0099】

これら系の発現配列の強さおよび特異性は様々であってよい。使用した宿主／ベクター系に応じて、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む多くの適当な転写および翻訳配列のいずれをも発現ベクターに用いることができる。たとえば、細菌系でクローニングする場合には、バクテリオファージλの pL、pLac、pLtrp、pLac (pLtrp-pLac ハイブリッドプロモーター) などの誘導性プロモーターを用いることができる；昆虫細胞系でクローニングする場合には、バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターなどのプロモーターを用いることができる；植物細胞系でクローニングする場合には、植物細胞のゲノムに由来するプロモーター（たとえば、熱ショックプロモーター；RUBISCO の小サブユニットのプロモーター；クロロフィル a / b 結合タンパク質のプロモーター）または植物ウイルスに由来するプロモーター（たとえば、CaMV の 35S RNA プロモーター；TMV のコートタンパク質プロモーター）を用いることができる；哺乳動物細胞系でクローニングする場合には、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（たとえば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（たとえば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター）を用いることができる；h V R 1 d DNA の複数のコピーを含む細胞株を

生成する場合には、SV40、BPVおよびEBVベースのベクターを適当な選択マーカールとともに用いることができる。

【0100】

細菌系では、発現したhVR1dポリペプチドを意図した使用に応じて多くの発現ベクターを都合よく選択することができる。たとえば、抗体の生成またはhVR1d遺伝子産物の産生のために多量のhVR1dポリペプチドを産生させたい場合は、容易に精製可能な融合タンパク質産物の高レベルの発現を指令するベクターが望ましい。そのようなベクターとしては、大腸菌発現ベクターpUR278 (Rutherら、1983, EMBO J. 2: 1791) (ハイブリッドhVR1d/lacZタンパク質が産生されるようにhVR1dコード配列を該ベクター中にlacZコード領域とインフレームでライゲートすることができる) ; pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509) などが挙げられる。pGEXベクターもまたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するのに用いることができる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、溶解した細胞からアフィニティークロマトグラフィーによって、たとえば、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させた後に遊離のグルタチオンの存在下で溶出することによって容易に精製することができる。pGEXベクターは、目的とするクローニングしたポリペプチドをGST残基から解離できるように、トロンビンまたは第Xa因子プロテアーゼ開裂部位を含むようにデザインされている。Boothら、1988, Immunol. Lett. 19: 65-70; およびGardellaら、1990, J. Biol. Chem. 265: 15854-15859; Pri tchettら、1989, Biotechniques 7: 580をも参照。

【0101】

酵母では、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含む多くのベクターを用いることができる。概説については、たとえば、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ausubel F. M.ら編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13; Grantら、1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Wu & Grossman編、Acad. Press、ニューヨーク、Vol. 153, pp.516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press、ワシントンDC、Ch. 3; およびBitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Berger & Kim mel編、Acad. Press、ニューヨーク、Vol. 152, pp. 673-684; およびThe Molecular Biol ogy of the Yeast Saccharomyces, 1982、コールドスプリングハーバープレス、Vol. Iお よびIIを参照。

【0102】

昆虫系では、Autographa californica核多角体病ウイルス (AcNPV) を外来遺伝子を発現するベクターとして用いることができる。このウイルスはSpodoptera frugiperda細胞中で増殖する。hVR1dコード配列を該ウイルスの非必須領域 (たとえば、ポリヘドリン遺伝子) 中にクローニングし、AcNPVプロモーター (たとえば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。hVR1dコード配列の挿入がうまくいくと、ポリヘドリン遺伝子の不活化および非閉塞 (non-occluded) 組換えウイルス (すなわち、ポリヘドリン遺伝子によってコードされるタンパク質コートを欠くウイルス) の産生と いう結果となるであろう。ついで、これら組換えウイルスを用いてSpodoptera frugiperda細胞に感染させることができ、挿入した遺伝子は該細胞中で発現される (たとえば、Smi thら、1983, J. Virol. 46: 584; Smith、米国特許第4,215,051号を参照)。

【0103】

哺乳動物細胞系では、多くのウイルスベースの発現系を利用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合は、hVR1dコード配列をアデノウイルスの転写／翻訳制御複合体、たとえば後期プロモーターおよび三連の (tripartite) リーダー配列にライゲートすることができる。ついで、このキメラ遺伝子をアデノウイルスゲノムにインビトロまたはインビボ組換えにより挿入する。ウイルスゲノムの非必須領域 (たとえば、領域E1またはE3) への挿入は、生存でき、感染した宿主中でhVR1dを発現す

る組換えウイルスという結果となるであろう（たとえば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 3655-3659を参照）。別法として、ワクシニア7.5 Kプロモーターを用いることもできる（たとえば、Mackettら、1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415-7419; Mackettら、1984, J. Virol. 49: 857-864; Panicaliら、1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4927-4931を参照）。

【0104】

挿入したhVR1dコード配列の有効な翻訳のためには特定の開始シグナルも必要である。これらシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。それ自身の開始コドンおよび隣接配列を含む全hVR1d遺伝子を適当な発現ベクターに挿入する場合には、追加の翻訳制御シグナルは必要ない。しかしながら、hVR1dコード配列の一部のみを挿入する場合には、ATG開始コドンを含む外来の翻訳制御シグナルを提供しなければならない。さらに、全挿入物の翻訳を確実にするために開始コドンはhVR1dコード配列の読取り枠と同じ位相でなければならない。これら外来翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両者からの様々な起源のものであってよい。発現の効率は、適当な翻訳エンハンサー配列、転写ターミネーターなどを含めることによって促進することができる（たとえば、Bittnerら、1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544）。

【0105】

さらに、挿入配列の発現を変調する、または所望の特定の仕方で遺伝子産物を修飾またはプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。そのようなタンパク質産物の修飾（たとえば、グリコシル化）およびプロセッシング（たとえば、開裂）はタンパク質の機能にとって重要である。様々な宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的かつ特異な機構を有している。発現された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすべく、適当な細胞株または宿主系を選択することができる。この目的のため、一次転写物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳動物宿主細胞としては、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、WI38などが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0106】

組換えタンパク質の長期にわたる高収率での産生のためには安定な発現が好ましい。たとえば、本発明のhVR1dポリペプチドを安定に発現する細胞株を遺伝子工学で作ることができる。それゆえ、ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを用いるよりも、適当な発現制御配列（たとえば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位など）により制御されるhVR1d核酸分子、たとえばDNAおよび選択マーカーで宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAの挿入後、遺伝子工学で作製した細胞を富培地で1～2日増殖させ、ついで選択培地に切り換える。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対して耐性を付与し、細胞が該プラスミドを染色体中に安定に組み込んで細胞増殖巣（foci）を形成するのを可能とし、この細胞増殖巣を今度はクローニングし、細胞株に拡張することができる。この方法は、hVR1dポリペプチドを細胞表面上に発現する細胞株を遺伝子工学により作製するのに都合よく用いることができる。そのように遺伝子工学により作製した細胞株は、hVR1dアナログまたはリガンドをスクリーニングするのに特に有用である。

【0107】

哺乳動物細胞がヒト細胞である場合、本発明のhVR1d核酸配列を発現できる発現系にはヒト人工染色体（HAC）系がある（たとえば、Harringtonら、1997, Nature Genetics 15: 345-355を参照）。

hVR1d遺伝子産物はまた、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ミクロブタ（micro-pigs）、ヒツジ、ヤギ、および非ヒト霊長類、たとえばヒヒ、サル、およびチンパンジーなどのトランスジェニック動物でも発現させることができる。本明細書において「トランスジェニック」とは、異なる種からのhVR1d核酸配列を発現する動物（たと

えば、ヒト h V R 1 d 核酸配列を発現するマウス)、並びに内生の(すなわち、同じ種の) h V R 1 d 核酸配列を過剰発現するように遺伝子操作した動物、または内生の h V R 1 d 核酸配列をもはや発現しないように遺伝子操作した動物(すなわち、「ノックアウト」動物)、およびその子孫をいう。

【0108】

本発明によるトランスジェニック動物は当該技術分野でよく知られた方法を用いて製造することができ、これら方法としては、前核マイクロインジェクション(Hoppe, P. C. および Wagner, T. E., 1989, 米国特許第 4,873,191 号);生殖細胞中へのレトロウイルス媒体遺伝子輸送(Van der Puttenら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152);胚性幹細胞中への遺伝子ターゲティング(Thompsonら、1989, Cell 56: 313-321)10);胚のエレクトロポレーション(Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 1803-1814);および精子媒体遺伝子輸送(Lavitranoら、1989, Cell 57: 717-723)などが挙げられるが、これらに限られるものではない。そのような技術の概説については、Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229を参照。

【0109】

さらに、h V R 1 d トランスジーンを含むトランスジェニック動物クローンを作製するために当該技術分野で知られたいかなる方法も用いることができ、たとえば、除核した卵母細胞中への静止誘発した培養胚、胎仔または成体細胞からの核の核導入(Campbellら、1996, Nature 380: 64-66; Wilmutら、1997, Nature 385: 810-813)を用いることができる20。

h V R 1 d コード配列を含み、生物学的に活性な遺伝子産物を発現する宿主細胞は、少なくとも4つの一般的な方法により同定することができる:(a) DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション;(b)「マーカー」遺伝子機能の存在または不在;(c)宿主細胞中でのh V R 1 d m R N A 転写物の発現の測定による転写レベルの評価;および(d)イムノアッセイによりまたはその生物学的活性により測定した遺伝子産物の検出。

【0110】

第一の方法において、発現ベクター中に挿入したh V R 1 d コード配列の存在は、それぞれh V R 1 d コード配列の相同なヌクレオチド配列、またはその一部または誘導体を含むプローブを用いたDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションにより検30出することができる。

第二の方法において、組換え発現ベクターおよび/または宿主系は、ある種の「マーカー」遺伝子機能の存在または不在に基づいて同定および選択することができる。たとえば、h V R 1 d コード配列がベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入されると、h V R 1 d コード配列を含む組換え体はマーカー遺伝子機能の不在によって同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子をh V R 1 d 配列と縦列して、h V R 1 d コード配列の発現の制御に用いたプロモーターと同じかまたは異なるプロモーターの制御下に置くことができる。誘発または選択に応答したマーカーの発現は、h V R 1 d コード配列の発現を示す。

【0111】

選択マーカーとしては、抗生物質耐性、メトトレキセート耐性、形質転換表現型、およびバキュロウイルス中での閉塞体(occlusion body)の形成が挙げられる。さらに、チミジンキナーゼ活性(Wiglerら、1977, Cell 11:223)遺伝子、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026)遺伝子、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、1980, Cell 22: 817)遺伝子を、それぞれt k⁻、h g p r t⁻、またはa p r t⁻細胞に用いることができる。また、d h f r (メトトレキセートに対する耐性を付与する)(Wiglerら、1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hareら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1572); g p t (ミコフェノール酸に対する耐性を付与する)(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); n e o (アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与する)(Colberre-Garapinら、1981, J. Mol. Biol 40

. 150: 1) ; および h y g r o (ハイグロマイシンに対する耐性を付与する) (Santerre ら、1984, Gene 30: 147) については代謝拮抗物質耐性を選択の基礎に用いることができる。さらに別の選択遺伝子も記載されている、すなわち、t r p B (細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする) ; h i s D (細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする) (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047) ; および O D C (オルニチンデカルボキシラーゼ) (オルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである 2- (ジフルオロメチル) - D L - オルニチン (D F M O) に対する耐性を付与する) (McConlogue, 1987, Current Communications in Molecular Biology、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー編中) 。

10

【0112】

第三の方法では、h V R 1 d コード領域の転写活性をハイブリダイゼーションアッセイにより評価することができる。たとえば、h V R 1 d コード配列またはその特定の部分に相同なプローブを用いたノーザンブロットにより R N A を単離および分析することができる。別法として、宿主細胞の全核酸を抽出し、そのようなプローブへのハイブリダイゼーションについてアッセイすることができる。

【0113】

第四の方法では、h V R 1 d タンパク質産物の発現を免疫学的に、たとえば、ウエスタンブロット、ラジオイムノ沈降、酵素結合イムノアッセイなどのイムノアッセイにより評価することができる。しかしながら、発現系の成功の最終的な試験には生物学的に活性な h V R 1 d 遺伝子産物の検出が含まれる。h V R 1 d 活性の検出には、結合アッセイおよび h V R 1 d 活性の生物学的アッセイを含む（これらに限られるものではない）多くのアッセイを用いることができる。

20

【0114】

生物学的に活性な h V R 1 d ポリペプチドを高レベルで産生するクローンが同定されたら、このクローンを拡張し、大量のポリペプチドを産生するのに用いることができ、該ポリペプチドは抗体を用いたイムノアフィニティー精製、免疫沈降またはクロマトグラフィー法（高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を含む）を含む（これらに限られるものではない）当該技術分野でよく知られた方法により精製することができる。

【0115】

h V R 1 d コード配列が開裂しうる融合タンパク質をコードするように遺伝子工学により作製されている場合には、精製はアフィニティー精製法を用いて容易に行うことができる。たとえば、コラゲナーゼ開裂認識コンセンサス配列を h V R 1 d のカルボキシ末端とプロテイン A との間に遺伝子工学により作製することができる。得られた融合タンパク質は、プロテイン A 残基に結合する I g G カラムを用いて容易に精製することができる。非融合 h V R 1 d はコラゲナーゼ処理によりカラムから容易に放出することができる。他の例は、外来ポリペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T) との融合タンパク質として発現する p G E X ベクターの使用である。融合タンパク質は、クローニングした遺伝子と G S T 残基との間にトロンピンまたは第 X a 因子開裂部位のいずれかを有するように遺伝子工学により作製することができる。融合タンパク質は、グルタチオンアガロースビーズへの吸着後にグルタチオンの存在下で溶出することによって細胞抽出物から容易に精製することができる。実際、h V R 1 d 遺伝子産物配列と、精製に使用できる結合パートナーを有する第二のペプチドまたはタンパク質（たとえば、それに対するイムノアフィニティーカラムを調製できる抗原）との間にいかなる開裂部位または酵素開裂基質をも遺伝子工学により作製することができる。

30

40

【0116】

さらに、h V R 1 d 融合タンパク質は、発現されるべき融合タンパク質に特異的な抗体を利用して容易に精製することができる。たとえば、Janknecht らによって記載された系は、ヒト細胞株で発現された非変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする (Janknecht ら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976) 。この系では、目的遺伝子の読

50

取り枠が6ヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳可能に融合されるように、該遺伝子をワクシニア組換えプラスミド中にサブクローニングする。組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞からの抽出物を Ni^{2+} ニトリロ酢酸-アガロースカラムに負荷し、ヒスチジン-タグタンパク質をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出する。

【0117】

別法として、本発明のhVR1dタンパク質およびポリペプチドは、化学的方法を用いてhVR1dアミノ酸配列の全体または一部を合成することにより製造することができる。たとえば、ペプチドを固相法により合成し、樹脂から開裂し、ついで高速液体クロマトグラフィーにより精製することができる（たとえば、Creighton, 1983, Proteins Structures And Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., ニューヨーク、pp.50-60を参照）。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシング（たとえば、エドマン分解法；Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., ニューヨーク、pp.34-49を参照）により確認することができる。

10

【0118】

hVR1dタンパク質、ポリペプチドおよびペプチド断片、変異した、先端欠失したまたは欠失した形態のhVR1dおよび／またはhVR1d融合タンパク質は、抗体の生成、診断アッセイの試薬として、イオン輸送が関与する他の細胞遺伝子産物の同定、イオンチャンネル障害の治療に使用する化合物のスクリーニングアッセイにおける試薬としてを含む（これらに限られるものではない）様々な用途のために調製することができる。

【0119】

20

5.3. hVR1dポリペプチドに対する抗体

本発明はまた、本発明のhVR1dポリペプチドに対する抗体および該抗体の製造方法をも包含し、これには1またはそれ以上のhVR1dエピトープまたはhVR1dの保存された変異体またはペプチド断片のエピトープを特異的に認識する抗体が含まれるが、これらに限られるものではない。

【0120】

そのような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメント、Fab発現ライブラリーにより産生されたフラグメント、抗イディオタイプ（抗Id）抗体、および以上のエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限られるものではない。そのような抗体は、たとえば、生物学的試料中のhVR1dタンパク質またはポリペプチドの検出に用いることができ、それゆえ診断または予後法の一部として利用することができる。それによって患者はhVR1dの異常なレベルおよび／または該タンパク質の異常な形態の存在について試験することができる。そのような抗体はまた、たとえば、hVR1dレベルおよび／または活性に対する被験化合物の作用を評価するための化合物スクリーニングプロトコールとともに利用することができる。さらに、そのような抗体は、たとえば、患者に導入する前に正常なおよび／または遺伝子工学により作製したhVR1d発現細胞を評価するために、下記のセクション5.4に記載する遺伝子療法とともに用いることができる。

30

【0121】

40

hVR1dに対する抗体を産生するには、該タンパク質またはその一部を注射することにより様々な宿主動物を免疫する。そのような宿主動物としては、ウサギ、マウス、ラット、およびヒヒが挙げられる。免疫応答を増大させるため、宿主の種に応じて様々なアジュバントを用いることができ、これにはフロイントの（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、界面活性剤、たとえばリソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント、たとえばBCG (bacille Calmette-Guerin) および *Corynebacterium parvum* が含まれるが、これらに限られるものではない。

【0122】

50

ポリクローナル抗体は、抗原、たとえばh V R 1 d ポリペプチド、またはその抗原性の機能性誘導体で免疫した動物の血清から得られる抗体分子の不均質な集団である。ポリクローナル抗体を産生するには、上記に記載したような宿主動物を上記に記載したアジュバントを添加したh V R 1 d ポリペプチドを注射して免疫する。

【0123】

特定の抗原に対する抗体の均質な集団であるモノクローナル抗体は、培養中の連続的な細胞株による抗体分子の産生を提供する方法により得ることができる。これら方法としては、KohlerおよびMilsteinのハイブリドーマ法（1975, Nature 245: 495-497; および米国特許第4,376,110号）、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kosborら、1983, Immunology Today 4: 72; Coleら、1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030）、およびE B V ハイブリドーマ法（Coleら、1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）が挙げられるが、これらに限られるものではない。そのような抗体は、I g G、I g M、I g E、I g A、I g Dを含むいかなる免疫グロブリンのクラスおよびそのサブクラスであってよい。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマはインビトロまたはインビボで培養することができる。

【0124】

適当な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子を適当な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子とともにスプライスすることによるキメラ抗体の製造用に関連された方法（Morrisonら、1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855; Neubergerら、1984, Nature 312: 604-608; Takedaら、1985, Nature 314: 452-454）を用いることができる。キメラ抗体とは、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、たとえば、マウスm A b からの可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である（たとえば、Cabill yら、米国特許第4,816,567号; Bossら、米国特許第4,816,397号を参照）。

【0125】

さらに、ヒト化抗体の製造のための方法が開発されている（たとえば、Queen、米国特許第5,585,089号を参照）。ヒト化抗体とは、非ヒト種からの1またはそれ以上のC D R およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する非ヒト種からの抗体分子である。

【0126】

別法として、一本鎖抗体の産生のために記載された方法（米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242: 423-426; Hustonら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; およびWardら、1989, Nature 334: 544-546）をh V R 1 d に対する一本鎖抗体を産生するのに用いることができる。一本鎖抗体は、F v 領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントをアミノ酸架橋により連結して一本鎖ポリペプチドとすることにより生成する。

【0127】

さらに、h V R 1 d の特定のエピトープを認識する抗体フラグメントを当該技術分野でよく知られた方法により製造することができる。たとえば、そのようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化により製造できるF (a b ')₂ フラグメント、およびF (a b ')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより製造できるF a b フラグメントが挙げられるが、これらに限られるものではない。あるいは、F a b 発現ライブラリーを構築して（Huseら、1989, Science 246: 1275-1281）所望の特異性を有するモノクローナルF a b フラグメントの迅速かつ容易な同定を可能とすることができる。

【産業上の利用可能性】

【0128】

5.4. 本発明のh V R 1 d 核酸分子、タンパク質およびポリペプチド、および抗体の用途

上記に記載したように、本発明のh V R 1 d 核酸分子は、イオンチャネル、さらに詳細には陽イオンチャネルの形成および／または機能に関与するタンパク質をコードする。

多くの細胞プロセスにおけるカルシウム、ナトリウムまたはカリウムなどの陽イオンの重要性を考慮すると、本発明の h V R 1 d 核酸分子およびタンパク質およびポリペプチドはイオンチャンネル、さらに詳細には陽イオンチャンネルの機能不全が関与する様々なヒト疾患状態の診断および治療に有用である。たとえば、カルシウムは神経伝達物質、ホルモンおよび他の循環因子の放出、多くの制御遺伝子の発現並びにアポトーシスまたは細胞死の細胞プロセスにおいて役割を果たしている。カリウムは神経保護を提供しており、インスリンの分泌にも影響を及ぼす。ナトリウムは正常なニューロン活動電位の発生および進行の制御に関与している。リドカインなどのナトリウムチャンネルブロッカーは重要な鎮痛剤である。それゆえ、陽イオンチャンネルの機能不全は、多くのヒト疾患および障害、たとえば、C N S 障害、たとえばアルツハイマー病やパーキンソン病などの変性神経障害、並びに慢性的な痛み、不安および抑うつなどの神経学的障害において役割を果たしている。イオンチャンネルの機能不全による影響を受ける他の疾患および障害としては、心臓障害、たとえば、不整脈、糖尿病、高カルシウム血症、高カルシウム尿症、または免疫学的障害、胃腸管障害または肝疾患に関連するイオンチャンネル機能不全が挙げられる。そのようなことから、これらイオンチャンネルの形成または機能に関与するタンパク質（およびこれらタンパク質をコードする核酸）は多くのヒト疾患の診断および治療に有用である。

【0129】

本発明の核酸分子、タンパク質およびポリペプチドの用途には、以下に記載するように、イオン／陽イオンチャンネル機能不全が関与するヒト疾患の予後のおよび診断的評価、およびそのような疾患への罹りやすさの個体の同定がある。他の用途としては、そのようなイオン／陽イオンチャンネル機能不全疾患の治療方法、h V R 1 d 遺伝子媒体活性の変調方法、および h V R 1 d 媒体エフェクター機能の変調方法が挙げられる。

【0130】

さらに、本発明の核酸分子およびタンパク質およびポリペプチドは、本発明の h V R 1 d 遺伝子の発現および／または h V R 1 d 遺伝子産物の活性を変調する化合物の同定のためのアッセイに用いることができる。そのような化合物としては、たとえば、陽イオンホメオスタシスまたは活性に関与する他の細胞産物または小さな分子が挙げられる。

【0131】

5.4.1. イオン関連障害の診断および予後

イオン、たとえば陽イオンの機能不全が関与するヒト疾患の診断および予後のための本発明の方法は、上記セクション 5.1 に記載の h V R 1 d 核酸分子および配列などの試薬、および上記セクション 5.3 に記載の h V R 1 d タンパク質またはポリペプチド（そのペプチド断片を含む）に対する抗体を利用する。詳細には、そのような試薬は、たとえば、（１）h V R 1 d 遺伝子変異の存在の検出、または非陽イオン機能不全状態と比べて h V R 1 d 遺伝子 m R N A の過剰または過少発現、または別のスプライスされた形態の h V R 1 d 転写物（ある種のイオンホメオスタシス障害またはそのような障害への罹りやすさと相関関係がある）の定性的または定量的検出；および（２）非陽イオン機能不全状態と比較して h V R 1 d 遺伝子産物の過剰な存在量または過少な存在量のいずれかの検出、または修飾した（たとえば、完全長未満）h V R 1 d 遺伝子産物の存在（陽イオン機能不全状態またはそのような状態への進行と相関関係がある）の検出、のために用いることができる。

【0132】

本明細書に記載の方法は、たとえば、本明細書に記載の少なくとも１つの特定の h V R 1 d 遺伝子核酸または抗 h V R 1 d 遺伝子抗体試薬を含む前もってパッケージングした試験キットを用いて行うことができ、この試験キットは、たとえば臨床場面において、イオン／陽イオンチャンネル／ホメオスタシスの異常を示す患者をスクリーニングおよび診断するため、およびそのような異常への素因を示す個体をスクリーニングおよび同定するために都合よく用いることができる。

【0133】

10

20

30

40

50

h V R 1 d 変異の検出のためには、あらゆる有核細胞をゲノム核酸の採取のための出発物質として用いることができる。h V R 1 d 転写物またはh V R 1 d 遺伝子産物の検出のためには、h V R 1 d 遺伝子が発現されるあらゆる細胞型または組織を用いることができる。

核酸ベースの検出法は下記 5.4.1.1 に記載してあり、一方、ペプチドベースの検出法は下記 5.4.1.2 に記載してある。

【0134】

5.4.1.1. h V R 1 d 遺伝子核酸分子の検出

h V R 1 d 遺伝子内の変異または多型は多くの方法を用いて検出することができる。あらゆる有核細胞からの核酸をそのようなアッセイ法の出発物質として用いることができ、当業者によく知られた標準的な核酸調製法に従って単離することができる。

【0135】

ゲノム DNA を生物学的試料のハイブリダイゼーションアッセイまたは増幅アッセイに用い、点変異、挿入、欠失および染色体再配置を含む h V R 1 d 遺伝子構造が関与する異常を検出することができる。そのようなアッセイとしては、直接シーケンシング (Wong, C.ら、1987, Nature 330: 384-386)、一本鎖立体配座多型分析 (SSCP; Orita, M.ら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766-2770)、ヘテロ二本鎖分析 (Keen, T.J.ら、1991, Genomics 11: 199-205; Perry, D. J. & Carrell, R.W., 1992)、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE; Myers, R.M.ら、1985, Nucl. Acids Res. 13: 3131-3145)、化学的ミスマッチ開裂 (Cotton, R. G.ら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397-4401)、およびオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (Wallace, R. B.ら、1981, Nucl. Acids Res. 9: 879-894; Lipshutz, R. J.ら、1995, Biotechniques 19: 442-447) が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0136】

患者試料または他の適当な細胞採取源中の h V R 1 d 遺伝子特異的な核酸分子の検出のための診断法は、たとえば PCR による特定遺伝子配列の増幅、およびそれに続いてたとえば上記に列記したような当業者によく知られた方法を用いた増幅分子の分析を含む。これら方法のような分析方法を用い、h V R 1 d 遺伝子変異が存在するか否かを決定するために増幅した配列を増幅すべき核酸が h V R 1 d 遺伝子の正常なコピーのみを含むときに予期される配列と比較することができる。

【0137】

さらに、よく知られた遺伝子型決定法を用い、h V R 1 d 遺伝子自体に存在する変異に極めて近接した多型の型分けを行うことができる。これら多型は、変異を有しやすいファミリー中の個体を識別するのに用いることができる。多型が h V R 1 d 遺伝子中の変異に関して連鎖不平衡を示す場合には、そのような多型は変異を有しやすい一般集団中の個体を識別するのに用いることができる。このような仕方で行うことができる多型としては、制限断片長多型 (RFLP) (制限酵素標的配列中の配列の変異が関わる)、単一塩基多型および単純配列長多型 (SSLP) が挙げられる。

【0138】

たとえば、Weber (米国特許第 5,075,217 号) は、 $(dC-dA)_n - (dG-dT)_n$ ショートタンデムリピートのブロックでの長さ多型に基づく DNA マーカーを記載している。 $(dC-dA)_n - (dG-dT)_n$ ブロックの平均距離は 30,000-60,000 bp であると推定される。そのような近接して位置するマーカーは高頻度の同時遺伝を示し、遺伝子変異、たとえば h V R 1 d 遺伝子内の変異の同定、および h V R 1 d 変異に関連する疾患および障害の診断に有用である。

【0139】

さらに、Caskey ら (米国特許第 5,364,759 号) は、短いトリまたはテトラヌクレオチドの繰り返し配列を検出するための DNA プロファイリングアッセイを記載している。このプロセスは、目的とする DNA、たとえば h V R 1 d 遺伝子を抽出し、抽出した遺伝子を増幅し、ついで繰り返し配列を標識して個体 DNA の遺伝子マップを作成することを

含む。

h V R 1 d プローブもまた R F L P を直接同定するのに用いることができるであろう。さらに、本発明の h V R 1 d 配列に由来する h V R 1 d プローブまたはプライマーは、Y A C、B A C、P A C、コスミド、ファージまたはプラスミドなどのゲノムクローンを単離するのに用いることができるであろう。これらクローンに含まれる D N A は、標準的なハイブリダイゼーション法またはシーケンシング法を用いて単一塩基多型または単純配列長多型 (S S L P) についてスクリーニングするのに用いることができる。

【0140】

h V R 1 d 遺伝子に特異的な変異または多型の検出のための他の診断法としては、たとえば、試料、たとえば患者または他の適当な細胞採取源から得た組換え D N A 分子、クロー
10 ニングした遺伝子またはその縮重変異体を含む核酸を、上記セクション 5.1 に記載の組換え D N A 分子、クローニングした遺伝子またはその縮重変異体を含む本発明の h V R 1 d 核酸分子を含む 1 またはそれ以上の標識核酸試薬と、これら試薬が h V R 1 d 遺伝子内の相補的配列に特異的にアニーリングするのに有利な条件下で接触およびインキュベートすることを含むハイブリダイゼーション法が挙げられる。好ましくは、これら核酸試薬の長さは少なくとも 15 ~ 30 ヌクレオチドである。インキュベーション後、全てのアニー
20 リングしていない核酸を核酸：h V R 1 d 分子ハイブリッドから取り除く。ついでハイブリダイズした核酸の存在を、もしもそのような分子が存在するなら検出する。そのような検出スキームを用い、目的とする細胞型または組織からの核酸を、たとえば、膜、または
25 プラスチック表面（マイクロタイタープレートやポリスチレンビーズ上の表面など）などの固相支持体に固定化することができる。この場合、インキュベーション後にセクション 5.1 に記載の本発明のアニーリングしていない標識核酸分子は容易に除去される。残留するアニーリングした標識 h V R 1 d 核酸試薬の検出は、当該技術分野でよく知られた標準法を用いて行う。本発明の核酸分子がアニーリングした h V R 1 d 遺伝子配列は、h V R 1 d 遺伝子変異が存在するか否かを決定するために正常な h V R 1 d 遺伝子配列から予
30 期されるアニーリングパターンと比較することができる。

【0141】

h V R 1 d 遺伝子発現の定量的および定性的な側面もまたアッセイすることができる。たとえば、h V R 1 d 遺伝子を発現することが知られている、または発現と思われる細胞型または組織からの R N A を単離し、上記で記載したハイブリダイゼーション法または
35 P C R 法を用いて試験することができる。単離した細胞は細胞培養液または患者に由来するものであってよい。培養液から採取した細胞の分析は、細胞ベースの遺伝子療法の一部として使用するために、または h V R 1 d 遺伝子の発現に対する化合物の影響を試験するために細胞を評価するうえで必要なステップである。そのような分析は、h V R 1 d 遺伝子発現の活性化または不活化および別の仕方でスプライスされた h V R 1 d 転写物の存在を含む、h V R 1 d 遺伝子の発現パターンの定量的および定性的側面の両者を明らかに
40 することができる。

【0142】

そのような検出スキームの一つの態様において、目的とする R N A 分子から c D N A 分子を合成する（たとえば、R N A 分子の c D N A への逆転写により）。ついで、得られた c
45 D N A の全部または一部を P C R 増幅反応などの核酸増幅反応の鋳型として用いる。この方法の逆転写工程および核酸増幅工程において合成開始試薬（たとえば、プライマー）として用いる核酸試薬は、上記セクション 5.1 に記載の本発明の h V R 1 d 核酸分子から選択する。そのような核酸試薬の好ましい長さは少なくとも 9 ~ 30 ヌクレオチドである。

【0143】

増幅産物の検出のため、放射性標識または非放射性標識したヌクレオチドを用いて核酸増幅を行う。別法として、増幅産物が標準臭化エチジウム染色によりまたは他の適当な核酸染色プロトコル、たとえば定量的 P C R を用いることにより視覚化されるように、充分な増幅産物を生成させる。

10

20

30

40

50

【0144】

そのようなRT-PCR法を用いてhVR1d転写物のサイズの差異（正常なまたは異常な別のスプライシングによる）を検出することができる。あるいは、そのような方法は、イオン機能不全障害を示すまたはそのような障害への素因を示す個体と比較した、正常な個体で検出される完全長および／または別の仕方ですプライスされたhVR1d転写物のレベルの定量的な差異を検出するのに用いることができる。

【0145】

特定の別の仕方ですプライスされた分子種の検出が望まれる場合には、そのような配列が存在しないと増幅が起こらないように適当なプライマーおよび／またはハイブリダイゼーションプローブを用いることができる。あるいは、図1Aおよび図1Bに示す配列を用い、利用すべきhVR1d転写物に特定のエクソンが存在するか不在であるかに応じて異なるサイズの断片を生成するプライマーを選択すべくプライマーペアを選択することができる。

【0146】

増幅法に代わる方法として、もしも十分な量の適当な細胞を得ることができるのであれば標準ノーザン分析を行うことができる。そのような方法を用い、hVR1d転写物の定量的な並びにサイズに関連した差異を検出することもできる。

さらに、hVR1d遺伝子発現アッセイをインシトゥで、すなわち、核酸の精製が必要ないように生検または切除から得た患者組織の組織切片（固定化したおよび／または凍結乾燥した）で直接、行うことができる。セクション5.1に記載の本発明の核酸分子をそのようなインシトゥ法のプローブおよび／またはプライマーとして用いることができる（たとえば、Nuovo, G. J., 1992, "PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications", ラベンプレス、ニューヨークを参照）。

【0147】

5.4.1.2. hVR1d遺伝子産物の検出

上記で記載した野生型または変異体hVR1d遺伝子産物または保存されたその変化物またはペプチドに対する抗体もまた、イオンまたは陽イオン関連障害の診断および予後に用いることができる。そのような診断法は、hVR1d遺伝子発現レベルの異常の検出またはhVR1d遺伝子産物の構造および／または一時的な組織、細胞または細胞下の分布の異常の検出に用いることができる。抗体または抗体のフラグメントは、治療に有用な可能性のある化合物をスクリーニングしてhVR1d遺伝子発現およびhVR1dペプチド産生に対するその作用をインビトロで決定することができる。イオンおよび陽イオン関連障害に対して有用な作用を有する化合物を同定し、治療学的に有効な投与量を決定することができる。

【0148】

インビトロイムノアッセイを用いて、たとえばイオンまたは陽イオン関連障害に対する細胞ベースの遺伝子療法の効力を評価することができる。たとえば、hVR1dペプチドに対する抗体を用い、hVR1dペプチドを産生するように遺伝子工学により作製した細胞で達成されたhVR1d遺伝子発現レベルをインビトロで決定することができる。そのような分析は、治療的な効力をインビボで達成するのに必要な形質転換細胞の数の決定並びに遺伝子置換プロトコルの最適化を可能にするであろう。

【0149】

分析すべき組織または細胞型は、一般にhVR1d遺伝子を発現することが知られているかまたは発現すると思われるものを含む。使用するタンパク質単離法は、たとえば、Harlow, E.およびLane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨークに記載されているものであってよい。単離細胞は細胞培養液または患者から得ることができる。培養液から採取した細胞の分析は、細胞ベースの遺伝子療法の一部として用いるため、あるいはhVR1d遺伝子の発現に対する化合物の影響を試験するため、細胞の評価に必要な工程である。

10

20

30

40

50

【0150】

h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物またはペプチド断片の検出のための好ましい診断法は、たとえば、h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物（別の仕方ですプライスした転写物の結果である遺伝子産物を含む）またはペプチド断片を抗 h V R 1 d 遺伝子産物特異的抗体との反応性により検出するイムノアッセイを含む。たとえば、上記セクション 5.3 に記載のもののような抗体または抗体のフラグメントを用いて h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物またはそのペプチド断片の存在を定量的または定性的に検出することができる。抗体（またはそのフラグメント）はさらに、h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物またはそのペプチド断片のインシトゥ検出のため、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡法として組織学的に用いることができる。インシトゥ検出は、患者から組織標本を採取し、ついで該組織標本に本発明の標識 h V R 1 d 抗体を加えることにより行う。抗体（またはフラグメント）は、生物学的試料の上に標識抗体（またはフラグメント）を重ねることにより加えるのが好ましい。そのような手順の使用により、h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物またはペプチド断片の存在のみならず、調べた組織でのその分布をも決定することが可能になる。本発明を用い、そのようなインシトゥ検出を達成するために広範な組織学的方法（染色法など）のいずれをも改変することができることを当業者は容易に認識するであろう。

【0151】

h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物またはペプチド断片のイムノアッセイは、典型的に試料、たとえば生物学的流体、組織抽出物、新たに採取した細胞、または細胞培養液でインキュベートした細胞の溶解液を、h V R 1 d 遺伝子産物またはその保存された変化物またはペプチド断片を同定しうる検出可能に標識した抗体の存在下でインキュベートし、ついで結合した抗体を当該技術分野でよく知られた多くの方法のいずれかにより検出することを含む。

【0152】

生物学的試料を、固相支持体または担体、たとえばニトロセルロース、または細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定化できる他の固相支持体と接触させ、固定化させる。ついで支持体を適当な緩衝液で洗浄し、ついで検出可能に標識した h V R 1 d 遺伝子特異的抗体で処理する。ついで固相支持体を緩衝液で 2 度目の洗浄を行って未結合の抗体を除去する。ついで、固相支持体上の結合した標識の量を通常的手段により検出する。

【0153】

「固相支持体または担体」とは、抗原または抗体を結合することのできるあらゆる支持体を意図している。よく知られた支持体または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、はんれい岩（gabbros）、および磁鉄鉱が挙げられる。担体の性質は、ある程度可溶性であるかまたは不溶性であってよい。支持体の材料は、結合した分子が抗原または抗体と結合することができる限り、実質的にあらゆる可能な構造的立体配置をとることができる。それゆえ、支持体の立体配置は、ビーズの場合のように球状であってもよいし、あるいは試験管の内部または棒の外部表面のように円筒状であってもよい。あるいは、支持体表面はシート、試験片などのように平面であってもよい。好ましい支持体としてはポリスチレンビーズが挙げられる。当業者であれば抗体または抗原を結合させるのに適した他の多くの担体を知っているであろうし、または日常的な実験によってそのような担体を確認することができるであろう。

【0154】

所定のロットの抗 h V R 1 d 遺伝子産物抗体の結合活性は、よく知られた方法に従って決定することができる。当業者であれば日常的な実験を用いることにより、各決定のための操作できるまたは最適のアッセイ条件を決定することができるであろう。

【0155】

h V R 1 d 遺伝子産物特異的抗体を検出可能に標識できる方法の一つは、エンザイムイムノアッセイ（E I A）において抗体を酵素に結合させることである（Voller, A., "The E

nzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2: 1-7、マイクロバイオリジカル・アソシエーツ・クォータリー・パブリケーション、ウォーカースビル、メリーランド; Voller, A.ら、1978, J. Clin. Pathol. 31: 507-520; Butler, J. E. 1981, Meth. Enzymol. 73: 482-523; Maggio, E. (編), 1980, Enzyme Immunoassay、CRCプレス、ボカレイトン、フロリダ; Ishikawa, E.ら (編), 1981, Enzyme Immunoassay、科学書院、東京)。抗体に結合した酵素は、適当な基質、好ましくは発色原性基質と、たとえば分光分析、蛍光測定または可視的手段によって検出可能な化学的残基を生成するような仕方で反応するであろう。抗体を検出可能に標識するのに用いることのできる酵素としては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌のスクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ、アルファグリセリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、リボスクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、これらに限られるものではない。検出は酵素に対する発色原性基質を用いる比色法により行うことができる。検出はまた、基質の酵素反応の程度を同様に調製した標準との視覚的な比較によっても行うことができる。

10

【0156】

検出また、他のイムノアッセイのいずれを用いても行うことができる。たとえば、抗体または抗体フラグメントを放射性標識することにより、ラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて hVR1d 遺伝子ペプチドを検出することができる (たとえば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照)。放射性同位体は、ガンマカウンターやシンチレーションカウンターの使用などの手段によって、またはオートラジオグラフィによって検出することができる。

20

【0157】

抗体を蛍光化合物で標識することもできる。蛍光標識した抗体を適当な波長の光に暴露すると、その存在を蛍光によって検出することができる。最も一般的に用いられる蛍光標識化合物は、フルオレセインイソシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドおよびフルオレスカミンである。

30

抗体はまた、 ^{152}Eu や他のランタニド系列などの蛍光放出金属を用いても検出可能に標識することができる。これら金属は、ジエチレントリアミン四酢酸 (DTPA) やエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの金属キレート形成基を用いて抗体に結合させることができる。

【0158】

抗体はまた、化学ルミネセンス化合物に結合させることによって検出可能に標識することができる。ついで、化学ルミネセンス標識抗体の存在を、化学反応の際に生成するルミネセンスの存在を検出することによって決定する。特に有用な化学ルミネセンス標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティック (theromatic) アクリジンエステル、イミダゾール、アクリジン塩およびシュウ酸エステルである。

40

【0159】

同様に生物発光化合物を本発明の抗体を標識するのに用いることができる。生物発光は生物系で見出される化学ルミネセンスのタイプであり、触媒タンパク質が化学ルミネセンス反応の効率を増大させるものである。生物発光タンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することにより決定する。標識の目的のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【0160】

5.4.2. hVR1d 活性を変調する化合物のスクリーニングアッセイ

スクリーニングアッセイを用いて hVR1d 活性を変調する化合物を同定することができる。これら化合物としては、ペプチド、小さな有機または無機分子または巨大分子、たと

50

例えば核酸分子またはタンパク質などが挙げられ（これらに限られるものではない）、たとえばイオンまたは陽イオン関連障害の制御、神経伝達物質や他の細胞制御因子の放出などの細胞プロセスの変調、細胞の活性化または制御、細胞死および細胞膜特性の変化に利用することができる。これら化合物はまた、たとえば、h V R 1 d 遺伝子産物、すなわち h V R 1 d タンパク質およびポリペプチドの生物学的機能の解明、これら生物学的機能の変調、およびイオンまたは陽イオン関連障害の症状の改善にも有用である。

【0161】

本発明の組成物は、これら化合物を1またはそれ以上含む医薬組成物を包含する。そのような医薬組成物は、下記セクション5.5で検討するようにして調合することができる。さらに詳細には、これら化合物は、h V R 1 d 遺伝子産物に結合する化合物、h V R 1 d 10 遺伝子産物と相互作用する他のタンパク質に結合するおよび／または他のタンパク質との h V R 1 d 遺伝子産物の相互作用を妨害する化合物、および h V R 1 d 遺伝子の活性を変調する、すなわち h V R 1 d 遺伝子発現のレベルを変調するおよび／または h V R 1 d 遺伝子産物またはタンパク質活性のレベルを変調する化合物を包含する。

【0162】

たとえば、アッセイを利用して h V R 1 d 遺伝子の制御配列、たとえばプロモーター配列に結合する化合物を同定することができ（たとえば、Platt, K. A., 1994, J. Biol. Chem. 269: 28558-28562を参照）、そのような化合物は h V R 1 d 遺伝子発現のレベルを変調することができる。さらに、機能的なアッセイを用いて h V R 1 d 遺伝子産物活性を変調する化合物をスクリーニングすることができる。そのようなアッセイでは、h V R 1 d 20 タンパク質またはポリペプチドの生物学的活性または機能に関するアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性について、たとえばイオンまたは陽イオンの細胞内レベルの変化、制御因子放出の変化、または本発明の h V R 1 d タンパク質およびポリペプチドの他の活性または機能について、化合物をスクリーニングする。

【0163】

好ましい態様に従い、 Ca^{2+} 流入 (flux) アッセイを用いて h V R 1 d 発現宿主細胞におけるカルシウムの取り込みをモニターすることができる。宿主細胞に Ca^{2+} 感受性の蛍光標識染料（たとえば、Fluo-4、Fluo-3、Indo-1またはFura-2）で前もって負荷する、すなわち、細胞内カルシウムを染料で蛍光標識し、たとえば標識カルシウムの細胞内レベルに対する化合物の影響を決定し、対照細胞、たとえば目的とする化合物への暴露を欠く 30 細胞の細胞内レベルと比較する。アゴニスト活性、すなわち h V R 1 d 活性に対して刺激性の変調効果を有する化合物は、h V R 1 d 発現細胞と接触させたときに対照細胞と比較して細胞内カルシウムの増大をもたらす化合物であり、一方、h V R 1 d 活性に対してアンタゴニスト変調効果を有する化合物は、細胞内カルシウムの低減をもたらす化合物であろう。

【0164】

他のイオンのレベルまたは流入に対する化合物の効果をモニターする機能性のアッセイも同様に行うことができる；たとえば、カリウムのレベルはルビジウムの流入を用いてモニターすることができる。

スクリーニングアッセイはまた、本発明 h V R 1 d 遺伝子産物に結合しうる化合物を同定 40 すべくデザインすることもできる。そのような化合物は、たとえば、野生型および／または変異体の h V R 1 d 遺伝子産物の活性の変調、h V R 1 d 遺伝子産物の生物学的機能の解明、および正常な h V R 1 d 遺伝子産物の相互作用を妨害する化合物の同定のためのスクリーニングに有用であり、あるいはそれ自体でそのような相互作用を妨害することができる。

【0165】

h V R 1 d 遺伝子産物に結合する化合物を同定するそのようなスクリーニングアッセイの原理は、h V R 1 d 遺伝子産物と被験化合物との反応混合物を、これら2つの成分が相互作用して（すなわち結合して）複合体を形成するのに十分な条件下および時間で調製することを含み、該複合体は一過性の複合体を表してよく、反応混合物中で除去および／また 50

は検出することができる。たとえば、一つのアッセイは、h V R 1 d 遺伝子産物または被験物質を固相に固定させ、ついで反応の終点で固相上に固定されたh V R 1 d 遺伝子産物／被験化合物複合体を検出することを含む。そのような方法の一つの態様では、h V R 1 d 遺伝子産物を固相表面に固定させ、被験化合物（固定していない）を直接または間接に標識する。

【0166】

固相表面上に固定された複合体の検出は、多くの仕方で行うことができる。前もって固定化していない成分を前もって標識してある場合は、固相表面上に固定化された標識の検出は複合体が形成されたことを示す。前もって固定化していない成分を前もって標識していない場合は、たとえば、前もって固定化されていない成分に特異的な標識抗体（該抗体は、今度は直接標識するかまたは標識抗 I g 抗体で間接的に標識することができる）を用いて固相表面上に固定された複合体を検出することができる。

10

【0167】

別法として、反応は液相で行うことができ、反応生成物を未反応の成分から分離し、ついで、たとえば、溶液中に生成した複合体を固定させるh V R 1 d 遺伝子産物または被験化合物に特異的な固定化抗体、および固定された複合体を検出する可能な複合体の他の成分に特異的な標識抗体を用い、複合体を検出することができる。

【0168】

h V R 1 d 遺伝子産物活性を変調する化合物にはまた、h V R 1 d 遺伝子産物と相互作用するタンパク質に結合する化合物も含まれる。これら変調化合物は、まずh V R 1 d 遺伝子産物と相互作用するタンパク質を、たとえばタンパク質－タンパク質相互作用を検出するために当該技術分野で知られた標準法、たとえば同時免疫沈降、架橋および勾配またはクロマトグラフィーカラムによる同時精製により同定することによって同定することができる。これらのような方法を用いることにより、上記に記載した本発明のh V R 1 d 遺伝子産物またはポリペプチドと相互作用するタンパク質を単離することができる。

20

【0169】

単離されたら、そのようなタンパク質は同定することができ、今度は標準法と組み合わせて用いて該タンパク質が相互作用するさらなるタンパク質を同定するのに用いることができる。たとえば、h V R 1 d 遺伝子産物と相互作用するタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部を当業者によく知られた方法、たとえばエドマン分解法（たとえば、Creighton, 1983, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W. H. Freeman & Co., ニューヨーク, pp. 34-49を参照）を用いて確認することができる。かくして得られたアミノ酸配列は、そのようなタンパク質をコードする遺伝子配列をスクリーニングするのに用いることのできるオリゴヌクレオチド混合物の作製のガイドとして用いることができる。スクリーニングは、たとえば、標準ハイブリダイゼーション法またはPCR法によって行うことができる。オリゴヌクレオチド混合物の作製およびスクリーニングの方法はよく知られている（たとえば、Ausubel、上掲、およびPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Innis, M.ら編、アカデミックプレス、ニューヨークを参照）。

30

【0170】

さらに、h V R 1 d 遺伝子産物またはポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードする遺伝子の同時同定という結果となる方法を用いることができる。これら方法は、たとえば、λ g t 11 ライブラリーの抗体プロービングのよく知られた方法と同様の仕方では V R 1 d タンパク質またはポリペプチドを用い、発現ライブラリーを標識h V R 1 d タンパク質またはポリペプチドでプロービングすることを含む。タンパク質相互作用をインビボで検出する方法の一つの方法は、2 ハイブリッド系である。この系の一つの版がChienら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582に記載されており、Clontech（パロアルト、カリフォルニア）から市販されている。

40

【0171】

さらに、h V R 1 d とその相互作用または結合パートナーとの相互作用を妨害する化合物（上記で決定したもの）は、h V R 1 d 遺伝子産物（変異体h V R 1 d タンパク質および

50

ポリペプチドを含む)の活性を制御するのに有用である。そのような化合物としては、上記遺伝子産物に結合する分子、たとえばペプチドなどが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0172】

hVR1d 遺伝子産物とその相互作用パートナーとの相互作用を妨害する化合物の同定に用いるアッセイ系の基本原理には、hVR1d 遺伝子産物と相互作用パートナーとを含む反応混合物を、これら2つが相互作用および結合して複合体を形成するのに十分な条件下および時間で調製することが含まれる。抑制活性を有する化合物を試験するには、反応混合物を被験化合物の存在下および不在下で調製する。被験化合物は最初から反応混合物に含まれていてもよいし、あるいはhVR1d 遺伝子産物およびその相互作用パートナーを加えた後の時点で加えてもよい。対照の反応混合物は被験化合物なしでまたはプラシーボとともにインキュベートする。ついで、hVR1d 遺伝子産物と相互作用パートナーとの複合体の形成を検出する。複合体が対照反応液では形成されるが被験化合物を含む反応混合物では形成されないことは、該化合物がhVR1d 遺伝子産物と相互作用パートナーとの相互作用を妨害することを示している。さらに、被験化合物と正常なhVR1d 遺伝子産物とを含む反応混合物中での複合体の形成を、被験化合物と変異体hVR1d 遺伝子産物とを含む反応混合物中での複合体形成と比較することもできる。この比較は、変異体のhVR1d タンパク質の相互作用は妨害するが正常なhVR1d タンパク質の相互作用は妨害しない化合物を同定するのが望まれる場合に重要である。

10

【0173】

hVR1d 遺伝子産物と相互作用パートナーとの相互作用を妨害する化合物のアッセイは、不均一または均一形態で行うことができる。不均一アッセイは、hVR1d 遺伝子産物かまたは結合パートナーのいずれかを固相上に固定させ、反応の終了時点で固相上に固定された複合体を検出することを含む。均一アッセイでは、全反応を液相で行う。いずれの方法においても、反応物の添加の順序は試験すべき化合物に関する様々な情報を得るために変えることができる。たとえば、hVR1d 遺伝子産物と相互作用パートナーとの相互作用をたとえば競合反応により妨害する被験化合物は、反応を該被験物質の存在下で行うことによって、すなわち、被験物質をhVR1d 遺伝子産物および相互作用パートナーよりも先にまたは同時に添加することによって同定することができる。あるいは、前もって生成した複合体を破壊する被験化合物、たとえば、一層高い結合定数によって複合体から成分の一つを置換する化合物は、複合体が生成した後に反応混合物に被験化合物を加えることによって試験することができる。様々な形態を以下に簡単に記載する。

20

30

【0174】

不均一アッセイ系では、hVR1d 遺伝子産物かまたは相互作用パートナーのいずれかを固相表面に固定し、一方、固定されていない分子種は直接かまたは間接に標識する。実際にはマイクロタイタープレートを都合よく利用できる。固定した分子種は、非共有結合的な付着または共有結合的な付着により固定化できる。非共有結合的な付着は、固相表面をhVR1d 遺伝子産物または相互作用パートナーの溶液でコーティングし、ついで乾燥することにより簡単に行うことができる。あるいは、固定させるべき分子種に特異的な固定化抗体を用いて該分子種を固相表面に固定することができる。固相表面は前もって調製し、貯蔵しておくことができる。

40

【0175】

アッセイを行うには、固定化した分子種のパートナーを被験化合物とともにまたは被験化合物なしでコーティング表面に暴露させる。反応完了後、未反応の成分を除去すると(たとえば洗浄により)、生成した複合体は固相表面に固定化されて残るであろう。固相表面上に固定された複合体の検出は、多くの仕方で行うことができる。固定していない分子種を前もって標識してある場合には、固相表面上に固定化された標識の検出は複合体が形成されたことを示している。固定していない分子種を前もって標識していない場合には、たとえば、最初に固定化していない分子種に特異的な標識抗体(該抗体は、今度は直接標識するかまたは標識抗Ig抗体で間接的に標識することができる)を用い、間接標識を用い

50

てて固相表面上に固定された複合体を検出することができる。反応成分の添加の順序に応じて、複合体形成を抑制する化合物あるいは前もって生成した複合体を破壊する化合物を検出することができる。

【0176】

別法として、反応は被験化合物の存在下または不在下で液相にて行うことができ、反応生成物を未反応成分から分離し、ついで、たとえば溶液中に生成した複合体を固定する相互作用成分の一つに特異的な固定化抗体、および固定した複合体を検出する他のパートナーに特異的な標識抗体を用いて複合体を検出する。この場合も、反応物の添加の順序に応じて、複合体形成を抑制する化合物あるいは前もって生成した複合体を破壊する化合物を検出することができる。

10

【0177】

別の態様において、hVR1d遺伝子タンパク質と相互作用パートナーとの前もって生成した複合体であって、hVR1d遺伝子産物かまたはその相互作用パートナーのいずれかが標識されているが該標識によって生成されるシグナルは複合体の形成によって停止されるものを調製する（たとえば、Rubensteinによる米国特許第4109496号（この方法をイムノアッセイに利用している）を参照）。前もって生成した複合体から分子種の一方と競合し置換する被験物質の添加は、バックグラウンドを超えるシグナルの生成という結果となるであろう。このようにしてhVR1d遺伝子タンパク質／相互作用パートナーの相互作用を妨害する被験物質を同定することができる。

【0178】

本発明の別の態様において、これら同じ方法を、完全長のタンパク質の一方または両者に代えてhVR1dタンパク質および／または相互作用パートナーの結合ドメインに対応するペプチド断片を用いて行うことができる。当該技術分野で日常的に行われている多くの方法のいずれをも用いて結合部位を同定および単離することができる。これら方法としては、これらタンパク質の一つをコードする遺伝子の突然変異誘発および同時免疫沈降アッセイにおける結合の破壊のスクリーニングが挙げられるが、これに限られるものではない。ついで、複合体中の第二の分子種をコードする遺伝子における補償変異を選択することができる。各タンパク質をコードする遺伝子の配列分析は、相互作用、すなわち結合に関与しているタンパク質の領域に対応する変異を明らかにするであろう。あるいは、このセクションの上記で記載した方法を用いて一方のタンパク質を固相表面に固定させ、その標識した相互作用パートナーであってトリプシンなどのタンパク質分解酵素で処理しておいたものと相互させる（たとえば、結合させる）ことができる。洗浄後、相互作用する（たとえば、結合する）ドメインを含む短い標識ペプチドは固相物質に結合して残り、これを単離し、アミノ酸シーケンシングにより同定することができる。また、細胞内結合パートナーをコードする遺伝子が得られたら、タンパク質のペプチド断片を発現するように短い遺伝子セグメントを遺伝子工学により作製し、ついで該遺伝子セグメントを結合活性について試験し、精製または合成することができる。

20

30

【0179】

本発明のヒトHVR1dポリペプチドおよび／またはペプチドまたはその免疫学的断片またはオリゴペプチドは、様々な医薬スクリーニング法において治療用医薬または化合物をスクリーニングするのに用いることができる。そのようなスクリーニングアッセイに用いる断片は、溶液中に遊離状態であるか、固相支持体に付着されているか、細胞表面に保持されているか、または細胞内に位置しているか。イオンチャンネルタンパク質と試験すべき試薬との間での結合複合体の形成の活性の低減または消滅を測定することができる。それゆえ、本発明は、本発明のHVR1dポリペプチドまたはその結合性の断片への特異的結合親和性について複数の化合物をスクリーニングまたは評価する方法であって、複数の化合物を用意し、複数の化合物のそれぞれをHVR1dポリペプチドまたはその結合性のペプチド断片と適当な条件下、結合させるに十分な時間にて混合し、ついで該複数の被験化合物のそれぞれへのHVR1dポリペプチドまたはペプチドの結合を検出し、それによってHVR1dポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合する化合物を同定すること

40

50

を含む方法を提供する。

【0180】

新規なHVR1dポリペプチドおよび／またはペプチドの活性を変調する化合物の同定方法が本発明によって提供され、該方法は、潜在的なまたは候補化合物またはカルパインの生物学的活性の医薬モデュレーターを、HVR1dポリペプチドまたはペプチド、たとえば配列番号2に示すHVR1dアミノ酸配列と混合し、HVR1dポリペプチドまたはペプチドの生物学的活性に対する候補化合物または医薬モデュレーターの作用を測定することを含む。そのような測定しうる作用としては、たとえば、物理的な結合相互作用；適当なカルパイン基質を開裂する能力；天然のおよびクローニングしたHVR1d発現細胞株に対する作用；および他のカルパイン媒体された生理学的測定に対するモデュレーターの作用が挙げられる。

10

【0181】

本発明の新規なHVR1dポリペプチドの生物学的活性を変調する化合物の他の同定方法は、潜在的なまたは候補化合物またはカルパインの生物学的活性の医薬モデュレーターを、HVR1dポリペプチドを発現する宿主細胞と混合し、HVR1dポリペプチドの生物学的活性に対する該候補化合物または医薬モデュレーターの作用を測定することを含む。宿主細胞はまた、たとえば誘導性の発現によりHVR1dポリペプチドを発現するように誘導させることもできる。HVR1dポリペプチドに対する所定のモデュレーター候補の生理的作用を測定することもできる。それゆえ、特定のカルパインモデュレーターのための細胞アッセイは、HVR1dポリペプチドの身体的（physical）な生物学的活性の直接的な測定または定量であってもよいし、または生理的作用の測定または定量であってもよい。そのような方法では、本明細書に記載のHVR1dポリペプチドを用いるか、または本明細書に記載の発現ベクターを含む適当な宿主細胞中で過剰発現された組換えHVR1dポリペプチドを用いるのが好ましく、その際、該HVR1dポリペプチドは発現され、過剰発現され、または制御されない発現を受ける。

20

【0182】

本発明の他の側面は、HVR1dポリペプチドの生物学的活性を変調しうる化合物のスクリーニング方法であって、HVR1dポリペプチドまたはその機能性のペプチドまたは一部（たとえば、配列番号2）をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞を用意し、モデュレーター化合物の不在下で発現されたHVR1dポリペプチドの生物学的活性を決定し、該細胞をモデュレーター化合物と接触させ、ついで該モデュレーター化合物の存在下で発現されたHVR1dポリペプチドの生物学的活性を決定することを含む方法を含む。そのような方法において、モデュレーター化合物の存在下およびモデュレーター化合物の不在下でのHVR1dポリペプチドの活性の差異は該化合物の変調作用を示している。

30

【0183】

本発明によるアッセイにおいて、本質的にいかなる化合物をも潜在的なモデュレーターまたはリガンドとして用いることができる。カルパインモデュレーターとして試験される化合物は、いかなる小さな化合物、または生物学的存在（たとえば、タンパク質、糖、核酸、脂質）であってもよい。被験化合物は、一般に小さな化学的分子またはペプチドであろう。一般に、潜在的なモデュレーターとして用いる化合物は水溶液または有機（たとえば、DMSOベース）溶液に溶解させることができる。アッセイ工程を自動化し、あらゆる都合のよい入手原から化合物を提供することによって、大きな化学ライブラリーをスクリーニングすべくアッセイをデザインできる。アッセイは典型的に平行して、たとえば、ロボットアッセイにおいてマイクロタイタープレート上でマイクロタイター形態で行う。化合物の供給者としては、たとえば、Sigma（セントルイス、ミズーリ）、Aldrich（セントルイス、ミズーリ）、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ）、Fluka Chemika-Biochemica Analytika（ブーフス、スイス）を含む多くの供給者がある。また、化合物を当該技術分野で知られた方法により合成してもよい。

40

【0184】

50

本明細書に記載した新規なHVR1dポリヌクレオチドおよびポリペプチドのモジュレーターの検出には、とりわけ高処理量スクリーニング法を想定することができる。そのような高処理量スクリーニング法は、典型的に多数の潜在的な治療用化合物（たとえば、リガンドまたはモジュレーター化合物）を含むコンビナトリアル化学またはペプチドライブラリーを用意することを含む。ついで、そのようなコンビナトリアル化学ライブラリーまたはリガンドライブラリーを1またはそれ以上のアッセイでスクリーニングして、所望の特徴的な活性を示すライブラリーの成員（たとえば、特定の化学種またはサブクラス）を同定する。かくして同定した化合物は、通常のリード化合物として用いるか、またはそれ自体、潜在的なまたは実際の治療剤として用いることができる。

【0185】

コンビナトリアル化学ライブラリーは、多数の化学構築ブロック（たとえば、アミノ酸などの試薬）を組み合わせることにより、化学的合成かまたは生物学的合成のいずれかにより生成した多様な化合物の集合である。一例として、一次コンビナトリアルライブラリー、たとえばポリペプチドまたはペプチドライブラリーは、所定の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチドまたはペプチド化合物におけるアミノ酸数）についてあらゆる可能な仕方

10

【0186】

コンビナトリアル化学ライブラリーの調製およびスクリーニングは、関連技術分野の当業者によく知られている。コンビナトリアルライブラリーとしては、ペプチドライブラリー（たとえば、米国特許第5,010,175号；Furka, 1991, Int. J. Pept. Prot. Res., 37: 487-493; およびHoughtonら、1991, Nature, 354: 84-88）が挙げられるが、これに限られるものではない。化学的な多様なライブラリーを作製するための他の化学も用いることができる。化学的な多様なライブラリー化学の制限されない例としては、ペプトイド（peptoids）（PCT公開WO91/019735）、コードしたペプチド（PCT公開WO93/20242）、ランダムバイオオリゴマー（PCT公開WO/00091）、ベンゾジアゼピン（米国特許第5,288,514号）、ダイバーソマー（diversomers）、たとえばヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド（Hobbsら、1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6909-6913）、ビニル様（vinylogous）ポリペプチド（Hagiharaら、1992, J. Amer. Chem. Soc., 114: 6568）、グルコースの足場（scaffolding）を有する非ペプチド性のペプチドミメチック（Hirschmannら、1992, J. Amer. Chem. Soc., 114: 9217-9218）、小化合物ライブラリーの同族有機合成（analogous organic synthesis of small compound libraries）（Chenら、1994, J. Amer. Chem. Soc., 116: 2661）、オリゴカルバメート（Choら、1993, Science, 261: 1303）、および／またはペプチド性ホスホネート（Campbellら、1994, J. Org. Chem., 59: 658）、核酸ライブラリー（Ausbel, BergerおよびSambrook、全て上記を参照）、ペプチド核酸ライブラリー（米国特許第5,539,083号）、抗体ライブラリー（たとえば、Vaughnら、1996, Nature Biotechnology, 14(3): 309-314およびPCT/US96/10287）、炭水化物ライブラリー（たとえば、Liangら、1996, Science, 274: 1520-1522および米国特許第5,593,853号）、小有機分子ライブラリー（たとえば、ベンゾジアゼピン、Baum C & EN, Jan. 18, 1993, 33頁；および米国特許第5,288,514号；イソプレノイド、米国特許第5,569,588号；チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号；ピロリジン、米国特許第5,525,735号および同第5,519,134号；モルホリノ化合物、米国特許第5,506,337号；など）が挙げられる。

20

30

40

【0187】

コンビナトリアルライブラリーの調製用のデバイスは市販されている（たとえば、357 MP S, 390 MPS, Advanced Chem Tech、ルイスビル、ケンタッキー；Symphony, Rainin、ウォバーン、マサチューセッツ；433A Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア；9050 Plus, Millipore、ベッドフォード、マサチューセッツ）。さらに、非常に

50

多くのコンビナトリアルライブラリーが市販されている（たとえば、ComGenex、プリンストン、ニュージャージー；Asinex、モスクワ、ロシア；Tripos, Inc.、セントルイス、ミズーリ；ChemStar, Ltd.、モスクワ、ロシア；3D Pharmaceuticals、エクストン、ペンシルベニア；Martek Biosciences、コロンビア、メリーランドなど）。

【0188】

一つの態様において、本発明は、イオンチャンネルを発現する細胞または組織を固相物質に結合させた高処理量形態の固相ベースのインビトロアッセイを提供する。そのような高処理量アッセイでは、数千までの異なるモデュレーターまたはリガンドを1日でスクリーニングすることが可能である。とりわけ、選択した潜在的なモデュレーターに対してマイクロタイタープレートの各ウェルを用いて別々のアッセイを行うことができるし、または濃度もしくはインキュベーション時間の影響が観察される場合には各5～10のウェルを単一のモデュレーターを試験するのに用いることができる。それゆえ、単一のマイクロタイタープレートは約96のモデュレーターをアッセイすることができる。1536ウェルのプレートを用いる場合には、単一のプレートは約100～約1500の異なる化合物を容易にアッセイすることができる。1日に幾つかの異なるプレートをアッセイすることが可能である；それゆえ、たとえば、記載した一体系を用いて約6,000～20,000までの異なる化合物のアッセイスクリーニングが可能である。

10

【0189】

本発明の他の側面において、本発明はスクリーニングおよび小分子（たとえば、医薬）検出アッセイを包含し、該アッセイは所定のタンパク質、たとえばHVR1dポリペプチドまたはペプチドに結合することのできる小分子の検出および同定を含む。特に好ましいのは高処理量スクリーニング法に適したアッセイである。

20

そのような結合ベースの検出、同定、またはスクリーニングアッセイでは、機能性のアッセイは一般に必要とされない。必要なのは、標的タンパク質（好ましくは実質的に精製したもの）、および化合物（たとえば、リガンド、医薬、小分子）のライブラリーまたはパネルまたは該タンパク質標的への結合についてスクリーニングまたはアッセイすべき生物学的材料だけである。好ましくは、標的タンパク質に結合する大抵の小分子は、該タンパク質の機能性の領域または部位への優先的な一層高い親和性結合のために何らかの仕方で活性を変調するであろう。

【0190】

そのようなアッセイの例は、Pantolianoらの米国特許第6,020,141号および同第6,036,920号に記載されている蛍光ベースのサーマルシフトアッセイ（3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc.、3DP、エクストン、ペンシルベニア）である（J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20(8)をも参照）。このアッセイは、タンパク質－医薬またはリガンド複合体の熱変性曲線を分析することにより、結合の親和性決定に基づいて発現された（好ましくは精製した）イオンチャンネルポリペプチドに結合する小分子（たとえば、医薬、リガンド）の検出を可能にする。この方法により決定した医薬または結合分子は、所望なら本明細書に記載したもののような方法によりさらにアッセイして該分子が標的タンパク質の機能または活性に影響を及ぼしたり変調するか否かを決定することができる。

30

40

【0191】

HVR1dポリペプチドまたはペプチドを精製して生物学的結合またはリガンド結合活性を測定するため、採取源は全細胞溶解液であってよく、これは標準プロテアーゼインヒビターの存在下で連続的に凍結－解凍サイクル（たとえば、1～3サイクル）を行うことによって調製することができる。HVR1dポリペプチドは、標準的なタンパク質精製法、たとえば以下に記載する特異的な抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、またはこれも本明細書に記載した組換えHVR1dポリペプチド分子中に遺伝子工学により組み込んだエピトープタグに特異的なリガンドにより、部分的または完全に精製することができる。ついで、結合活性を本明細書に記載のようにして測定することができる。

【0192】

50

本発明によって提供される方法によって同定され、本発明によるHVR1dポリペプチドの生物学的活性または生理機能を変調または制御する化合物は、本発明の好ましい態様である。そのような変調化合物は、本明細書に記載の方法によって同定した化合物の治療学的有効量を新規なHVR1dポリペプチドによって媒体される状態の治療を必要とする個体に投与することにより、そのような状態を処置するための治療法に用いることができることが想定される。

さらに、本発明は、本発明のHVR1dポリペプチドによって媒体される疾患、障害、または状態の治療を必要とする個体の治療方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の方法によって同定したHVR1d変調化合物の治療学的有効量を個体に投与することを含む。

【0193】

10

5.4.3. イオンチャンネル関連障害の治療方法および組成物

本発明はまた、hVR1d遺伝子産物発現または機能によって媒体または制御される障害または細胞プロセス、たとえば、hVR1dによって媒体される細胞活性化、シグナル伝達、細胞制御因子の放出などの治療または変調のための方法および組成物にも関する。さらに、hVR1dエフェクター機能はそのような方法および組成物により変調することができる。

【0194】

本発明の方法は、hVR1d遺伝子および遺伝子産物活性を変調する方法を包含する。ある場合には治療はhVR1d活性の増大、アップレギュレーションまたは活性化を必要とするであろうし、また他の場合には治療はhVR1d活性の低減、ダウンレギュレーションまたは抑制を必要とするであろう。「増大」および「低減」とは、変調処理の不在下での目的とする細胞型でのhVR1d活性と比較したhVR1d活性の差異レベルをいう。hVR1d活性の低減のための方法は以下のセクション5.4.3.1で検討する。hVR1d活性の増大のための方法は以下のセクション5.4.3.2で検討する。実施した特定の仕方に応じてhVR1d活性を増大または低減させうる方法は、以下のセクション5.4.3.3で検討する。

20

【0195】

5.4.3.1. hVR1d活性を低減する方法

イオンチャンネル／イオンホメオスタシス障害、たとえば、CNS障害、心臓障害または高カルシウム血症の好結果の治療は、hVR1d活性を低減させる方法によってもたすことができる。活性の低減は、たとえば、hVR1d遺伝子産物（すなわち、タンパク質）の活性を直接低減させるか、および／またはhVR1d遺伝子発現のレベルを低減させることによって達成することができる。

30

【0196】

たとえば、上記セクション5.4.2に記載のアッセイにより同定したものなどのhVR1d遺伝子産物の活性を低減させる化合物を本発明に従って用い、イオンチャンネル／イオンホメオスタシス障害に伴う症状を改善することができる。上記で検討したように、そのような化合物としては、ペプチド（可溶性のペプチドを含む）、および小さな有機または無機分子が挙げられ（これらに限られるものではない）、hVR1dアンタゴニストと称する。そのような化合物の有効量および投与方法の決定法は、以下のセクション5.5に

40

【0197】

さらに、hVR1d遺伝子発現を抑制するアンチセンスおよびリボザイム分子もまたhVR1d遺伝子発現のレベルを低減させるのに用いることができ、それゆえ存在するhVR1d遺伝子産物のレベルを有効に低減させ、それによってhVR1dタンパク質活性のレベルを低減させることができる。さらに、三重らせん分子をhVR1d遺伝子発現レベルの低減に用いることができる。そのような分子は、野生型か、または適当な場合は変異体の標的遺伝子活性のいずれかを低減または抑制すべくデザインすることができる。そのような分子の産生および使用法は当業者によく知られている。

【0198】

50

アンチセンス法は、h V R 1 d 遺伝子の m R N A に相補的なオリゴヌクレオチド (D N A かまたは R N A のいずれか) のデザインを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的な h V R 1 d 遺伝子の m R N A 転写物に結合し、翻訳を妨害するであろう。絶対的な相補性は好ましいが必要ではない。本明細書において R N A の一部に「相補的な」配列とは、該 R N A にハイブリダイズして安定な複合体を形成するに十分な相補性を有する配列を意味する；二本鎖アンチセンス核酸の場合には、該二本鎖の一本鎖を試験するか、または三本鎖の形成をアッセイすることができる。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両者に依存するであろう。一般に、ハイブリダイズさせる核酸が長くなればなるほど、R N A とミスマッチする一層多くの塩基が含まれていてよく、依然として安定な二本鎖 (または場合によっては三本鎖) を形成する。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定する標準法の使用により、容認できるミスマッチの程度を確認することができる。

10

【 0 1 9 9 】

メッセージの 5 ' 末端、たとえば A U G 開始コドンまでおよび該コドンを含む 5 ' 非翻訳配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳の抑制において最も有効に作用するに違いない。しかしながら、最近、m R N A の 3 ' 非翻訳配列に相補的な配列も同様に m R N A の翻訳の抑制において有効であることが示されている。一般に、Wagner, R., 1994, Nature 372: 333-335を参照。それゆえ、たとえば、図 1 に示す h V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2 の核酸の 5 ' かまたは 3 ' のいずれかの非翻訳非コード領域に相補的なオリゴヌクレオチドを、内生 h V R 1 d 遺伝子の m R N A の翻訳を抑制するためのアンチセンス法に用いることができるであろう。

20

【 0 2 0 0 】

m R N A の 5 ' 非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、A U G 開始コドンの相補鎖を含んでいるべきである。m R N A のコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それほど有効でない翻訳のインヒビターであるが、本発明に従って用いることができるであろう。標的または経路遺伝子の m R N A の 5 '、3 ' またはコード領域のいずれかにハイブリダイズすべくデザインされているかに拘わらず、アンチセンス核酸は長さが少なくとも 6 ヌクレオチドでなければならず、好ましくはオリゴヌクレオチドは長さが 6 ~ 約 5 0 ヌクレオチドの範囲である。特別の側面において、オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 0 ヌクレオチド、少なくとも 1 7 ヌクレオチド、少なくとも 2 5 ヌクレオチドまたは少なくとも 5 0 ヌクレオチドである。

30

【 0 2 0 1 】

標的配列の選択の如何に拘わらず、まずインビトロでの研究を行ってアンチセンスオリゴヌクレオチドが遺伝子発現を抑制する能力を定量するのが好ましい。これらの研究は、アンチセンスによる遺伝子抑制とオリゴヌクレオチドの非特異的な生物学的作用とを識別する対照を用いるのが好ましい。また、これらの研究では標的 R N A またはタンパク質のレベルを内部対照 R N A またはタンパク質のレベルと比較するのが好ましい。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られた結果を対照のオリゴヌクレオチドを用いて得られた結果と比較するのが好ましい。対照オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであること、および対照オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は標的配列への特異的なハイブリダイゼーションを妨げるに必要なもの以上にはアンチセンス配列と異なっていないのが好ましい。

40

【 0 2 0 2 】

オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の、D N A または R N A またはそのキメラな混合物または誘導体または修飾形であってよい。オリゴヌクレオチドは、たとえば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションなどを向上させるため、塩基残基、糖残基、またはリン酸骨格を修飾することができる。

オリゴヌクレオチドはまた、ペプチド (たとえば、宿主細胞レセプターをインビボでターゲティングするため) や細胞膜 (たとえば、Letsingerら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6533-6556; Lemaitreら、1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; P

50

C T出願WO 88 / 0 9 8 1 0を参照) または血液脳関門 (たとえば、P C T出願WO 89 / 1 0 1 3 4) を通した輸送を容易にする試薬、またはハイブリダイゼーションにより駆動される (hybridization-triggered) 開裂試薬 (たとえば、Krolら、1988, BioTechniques 6: 958-976を参照) またはインターカレート剤 (たとえば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549を参照) などの他の追加基を含んでいてよい。たとえば、オリゴヌクレオチドは他の分子、たとえば、ペプチド、ハイブリダイゼーションにより駆動される架橋剤、輸送試薬、ハイブリダイゼーションにより駆動される開裂試薬などにコンジュゲートすることができる。

【0203】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で知られた標準法により、たとえば自動DNA合成機 (Biosearch, Applied Biosystemsなどから市販されているものなど) の使用により合成することができる。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドをSteinら (1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209) の方法により合成することができ、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドを制御孔ガラスポリマー支持体の使用 (Sarinら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7448-7451) などにより調製することができる。

【0204】

アンチセンス分子はh V R 1 d遺伝子を発現する細胞にインビボで送達しなければならない。アンチセンスDNAまたはRNAを細胞に送達するために多くの方法が開発されている; たとえば、アンチセンス分子を組織部位に直接注入することができるし、または所望の細胞をターゲティングすべくデザインした修飾アンチセンス分子 (たとえば、標的細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体に結合させたアンチセンス) を全身的に投与することができる。

【0205】

しかしながら、内生のmRNAの翻訳を抑制するに十分なアンチセンスの細胞内濃度を達成することはしばしば困難である。それゆえ、好ましい方法はアンチセンスオリゴヌクレオチドを強力なp o l IIIまたはp o l IIプロモーターの制御下に置いた組換えDNA構築物を利用する。そのような構築物を用いて患者で標的細胞をトランスフェクションさせると、内生のh V R 1 d遺伝子転写物と相補的な塩基対を形成するであろう一本鎖RNAの十分な量の転写という結果となり、それによってh V R 1 d遺伝子のmRNAの翻訳を妨害するであろう。たとえば、細胞によって取り込まれ、アンチセンスRNAの転写を指令するようにベクターをインビボで導入することができる。

【0206】

リボザイムは、RNAの特異的な開裂を触媒することのできる酵素的なRNA分子である (概説としては、たとえば、Rossi, J., 1994, Current Biology 4: 469-471を参照)。リボザイム作用のメカニズムは、相補的な標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的なハイブリダイゼーション、およびそれに続くエンドヌクレアーゼ開裂を含む。リボザイム分子の構成は、標的遺伝子のmRNAに相補的な1またはそれ以上の配列を含んでいなければならない、mRNA開裂を担うよく知られた触媒配列を含んでいなければならない。この配列については、米国特許第5,093,246号 (その全体を参照のため引用する) を参照。そのようなものとして、本発明の範囲には標的遺伝子タンパク質をコードするRNA配列のエンドヌクレアーゼ開裂を特異的かつ有効に触媒する遺伝子工学により作製したハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が含まれる。h V R 1 d遺伝子のmRNA転写物を触媒的に開裂すべくデザインしたリボザイム分子もまた、h V R 1 d遺伝子のmRNAの翻訳および標的または経路遺伝子の発現を妨害するのに用いることができる (たとえば、P C T出願WO 90 / 1 1 3 6 4 ; Sarverら、1990, Science 247: 1222-1225を参照)。

【0207】

本発明のリボザイムはまた、Tetrahymena Thermophilaに天然に存在するもの (I V S、またはL-19 I V S RNAとして知られる) やThomas Cechおよび彼の協同研究者によって広範に記載されているもの (Zaugら、1984, Science, 224: 547-578; ZaugおよびCec

10

20

30

40

50

h, 1986, Science, 231: 470-475; Zaugら、1986, Nature, 324: 429-433; P C T 特許出願 W O 8 8 / 0 4 3 0 0 ; Beenおよび Cech, 1986, Cell, 47: 207-216) などの R N A エンドリボヌクレアーゼ (以下、「Cech型リボザイム」という) をも包含する。Cech型リボザイムは標的 R N A 配列にハイブリダイズする 8 塩基対の活性部位を有し、その後に標的 R N A の開裂が起こる。本発明は、h V R 1 d 遺伝子中に存在する 8 塩基対の活性部位配列をターゲティングする Cech型リボザイムを包含する。

【0208】

アンチセンス法の場合のように、リボザイムは修飾オリゴヌクレオチドから構成することができ (たとえば、安定性、ターゲティングなどを改善するため)、h V R 1 d 遺伝子を発現する細胞にインビボで送達させなければならない。好ましい送達法は、トランスフェクションした細胞が十分な量のリボザイムを産生して内生の h V R 1 d 遺伝子メッセージを破壊し翻訳を抑制できるように、リボザイムを「コードする」D N A 構築物を強力な構成的 p o l III または p o l II プロモーターの制御下で使用するを含む。リボザイムはアンチセンス分子とは違って触媒であるので、有効であるには一層低い細胞内濃度が必要とされる。

【0209】

内生の h V R 1 d 遺伝子発現はまた、ターゲティングした相同的組換えを用いて標的および／または経路遺伝子またはそのプロモーターを不活化または「ノックアウト」することによっても低減することができる (たとえば、Smithiesら、1985, Nature 317: 230-234; Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51: 503-512; Thompsonら、1989 Cell 5: 313-321を参照)。たとえば、内生の h V R 1 d 遺伝子に相同な D N A (h V R 1 d 遺伝子のコード領域かまたは制御領域のいずれか) によってフランキングされた変異体の非機能性の h V R 1 d 遺伝子 (または完全に関連のない D N A 配列) を選択マーカーおよび／または負の選択マーカーとともにまたはなしで用い、h V R 1 d 遺伝子を発現する細胞をインビボでトランスフェクションすることができる。ターゲティングされた相同的組換えによる D N A 構築物の挿入は、h V R 1 d 遺伝子の不活化という結果となる。そのような方法はまた、イオン／陽イオン障害動物モデルを作製するのに用いることもできる。この方法は、適当なウイルスベクター、たとえばヘルペスウイルスベクターを用いて組換え D N A 構築物を必要とされる部位にインビボで直接投与またはターゲティングできる場合に、ヒトにも適用できることに注意すべきである。

【0210】

別法として、内生の h V R 1 d 遺伝子発現は、h V R 1 d 遺伝子の制御領域 (すなわち、h V R 1 d 遺伝子のプロモーターおよび／またはエンハンサー) に相補的なデオキシヌクレオチド配列をターゲティングして三重らせん構造を形成させることによって低減することができ、該三重らせん構造は生体内の標的細胞中の h V R 1 d 遺伝子の転写を妨害する (一般に、たとえば、Helene, C., 1991, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C.ら、1992, Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; および Maher, L. J., 1992, Bioassays 14(12): 807-15を参照)。

【0211】

転写の抑制のための三重らせん形成に用いる核酸分子は一本鎖でなければならない、デオキシヌクレオチドから構成されていなければならない。これらオリゴヌクレオチドの塩基組成は、フーグスティーン型塩基対則により三重らせん形成を促進するようにデザインしなければならない、これには一般に二本鎖の一方の鎖上にプリンまたはピリミジンのいずれかの相当の大きさの連なりを必要とする。ヌクレオチド配列はピリミジンベースであってよく、生成する三重らせんの 3 つの関連する鎖で T A T および C G C + トリプレットという結果となるであろう。ピリミジンに富んだ分子は、二本鎖中の一本鎖のプリンに富んだ領域に対して該鎖と平行した方向で塩基相補性を提供する。さらに、たとえば、G 残基の連なりを含むプリンに富んだ核酸分子を選択することができる。これら分子は G C 対に富む D N A 二本鎖と三重らせんを形成し、その際、プリン残基の大部分は標的二本鎖中の一本鎖に位置しており、三本鎖の 3 つの鎖で G G C トリプレットという結果となるであろう

10

20

30

40

50

。

【0212】

別法として、三重らせん形成についてターゲティングできる潜在的な配列は、「スイッチバック」核酸分子を作製することにより増大させることができる。スイッチバック分子は、最初に二本鎖のうちの一方の鎖と塩基対を形成し、ついで他方の鎖と塩基対を形成できるように5'-3'、3'-5'交互に合成し、二本鎖の一方の鎖にプリンかまたはピリミジンのいずれかの相当の大きさの連なりが存在する必要がある。

【0213】

変異体のhVR1d遺伝子発現を抑制するために本明細書に記載のアンチセンス、リボザイムおよび／または三重らせん分子を用いる場合には、正常な標的遺伝子アレルによって10
産生されるmRNAの転写（三重らせん）および／または翻訳（アンチセンス、リボザイム）を極めて有効に低減または抑制できるので、存在する正常な標的遺伝子産物の濃度は正常な表現型に必要なものより低くてよい。そのような場合、実質的に正常なレベルのhVR1d遺伝子活性が保持されていることを確実にするため、正常な標的遺伝子活性を示すhVR1dポリペプチドをコードおよび発現する核酸分子を、使用したアンチセンス、リボザイム、または三重らせん処置のいずれに対しても感受性の配列を含まない細胞に遺伝子療法の方法により導入することができる。標的遺伝子が細胞外タンパク質をコードする場合には、標的遺伝子活性の必要なレベルを保持するために正常な標的遺伝子タンパク質を同時に投与するのが好ましい。

【0214】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、および三重らせん分子は、当該20
技術分野で知られた方法により、たとえば、固相ホスホルアミダイト化学合成などの当該技術分野でよく知られたオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する方法により調製することができる。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビトロおよびインビボ転写により調製することができる。そのようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適当なRNAポリメラーゼプロモーターを導入した広範なベクターに導入することができる。あるいは、使用したプロモーターに応じて構成的かまたは誘導的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築物を細胞株に安定に導入することができる

。

【0215】

さらに、細胞内安定性および半減期を増大する手段として、DNA分子へのよく知られた修飾を本発明のhVR1d核酸分子に導入することができる。可能な修飾としては、該分子の5'末端および／または3'末端へのリボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドの30
フランキング配列の付加またはオリゴデオキシリボヌクレオチド骨格内のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0216】

5.4.3.2. hVR1d活性を増大する方法

イオン／陽イオン障害の好結果の治療は、hVR1d活性のレベルを増大させる方法によ40
ってもたらしめることができる。活性の増大は、たとえば、hVR1d遺伝子産物の活性を直接増大させるか、および／またはhVR1d遺伝子発現のレベルを増大させることによって達成することができる。

【0217】

たとえば、上記セクション5.4.2に記載のアッセイにより同定したものなどのhVR1d活性を増大させる化合物は、イオン／陽イオン関連障害を治療するのに用いることができる。そのような分子としては、ペプチド（可溶性のペプチドを含む）、および小さな有機または無機分子が挙げられ（これらに限られるものではない）、hVR1dアゴニストと称する。

たとえば、化合物をイオン／陽イオン関連障害および徴候を治療するのに十分なレベルで50

そのような徴候を有する患者に投与することができる。当業者は、以下のセクション 5.5 に記載のような方法を用い、該化合物の有効で非毒性の投与量の濃度を決定する方法を容易に知るであろう。

【0218】

あるいは、投与すべき化合物がペプチド化合物である場合は、該ペプチド化合物をコードする DNA 配列をイオン／陽イオン関連障害または徴候を示す患者に直接、該障害の徴候を改善するのに十分なペプチド化合物のレベルを生成するのに十分な濃度にて投与することができる。たとえばリポソーム投与などのような以下で検討する化合物の細胞内投与を達成するいずれの方法も、そのような DNA 分子の投与に用いることができる。細胞外で作用するペプチド化合物の場合は、イオン／陽イオン障害徴候の低減を引き起こすのに十分な循環濃度のペプチドとなる限り、そのようなペプチドをコードする DNA 分子をいかなる細胞型によっても取り込ませ発現させることができる。

【0219】

イオン／陽イオン障害を生体の特定の部分または領域に局在化できる場合には、そのような変調ペプチドをコードする DNA 分子を送達複合体の一部として投与することができる。そのような送達複合体は、適当な核酸分子およびターゲティング手段を含んでよい。そのようなターゲティング手段としては、たとえば、ステロール脂質、ウイルスまたは標的細胞特異的結合試薬が挙げられる。ウイルスベクターとしては、DNA を細胞に導入する他の粒子（たとえば、リポソーム）に加えて、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、およびレトロウイルスが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0220】

さらに、イオン／陽イオン関連障害に異所性の hVR1d 遺伝子が関与している場合には、患者を遺伝子置換療法により処置することができる。正常な hVR1d タンパク質機能を有する正常な hVR1d タンパク質の産生を指令する正常な hVR1d 遺伝子または該遺伝子の一部の 1 またはそれ以上のコピーを、たとえば上記で記載した送達複合体により細胞に挿入することができる。

そのような遺伝子置換法は、インビボかまたはインビトロのいずれかで行うことができる。目的とする細胞型内での発現を選択する方法が好ましい。インビボでの適用のためには、そのような方法は、たとえば hVR1d 遺伝子配列の適当な局所投与を含む。

【0221】

hVR1d 活性の全体のレベルを増大させるのに用いる他の方法は、適当な hVR1d 遺伝子発現細胞、好ましくは自己細胞を、イオン／陽イオン関連障害の徴候を改善するのに十分な位置および数にて患者に導入することを含む。そのような細胞は、組換え細胞かまたは非組換え細胞のいずれであってもよい。患者において hVR1d 遺伝子発現の全体のレベルを増大させるために投与することのできる細胞には、hVR1d 遺伝子を発現する正常な細胞が含まれる。これら細胞を、発現の解剖学的部位に投与するか、または生体の異なる部位の位置にて組織移植片の一部として投与することができる。そのような細胞レベルの遺伝子療法は当業者によく知られている（たとえば、Andersonら、米国特許第 5,399,349 号；Mulligan および Wilson、米国特許第 5,460,959 号を参照）。

hVR1d 遺伝子配列はまた、自己の細胞にインビトロで導入することもできる。ついで、hVR1d 遺伝子配列を発現するこれら細胞を、障害が治療され該障害の徴候が改善されるまで、好ましくは静脈内投与により患者に再導入することができる。

【0222】

5.4.3.3. 他の変調法

本発明はまた、使用した特定の応用に応じて hVR1d 活性レベルの増大かまたは低減のいずれかをもたらし、上記に記載したようなイオン／陽イオン関連障害の改善に導く変調法をも包含する。

変調能を示す抗体を本発明の方法に従ってイオン／陽イオン関連障害を治療するのに用いることができる。特定の抗体に応じて、変調作用は hVR1d 活性の増大または低減であってよい。そのような抗体は、上記セクション 5.3 に記載の標準法を用い、完全長の野

10

20

30

40

50

生型または変異体 h V R 1 d タンパク質に対して、または該タンパク質の一部に対応するペプチドに対して産生させることができる。抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、F a b フラグメント、一本鎖抗体、キメラ抗体などが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0223】

h V R 1 d 遺伝子産物エピトープに結合する抗体または F a b フラグメントの領域を該遺伝子産物を発現する細胞に送達するため、リポフェクチンまたはリポソームを用いることができる。抗体のフラグメントを用いる場合には、h V R 1 d タンパク質の結合ドメインに結合する最小の抑制フラグメントが好ましい。たとえば、h V R 1 d タンパク質に結合する抗体の可変領域のドメインに対応するアミノ酸配列を有するペプチドを用いることができる。そのようなペプチドは、当該技術分野でよく知られた方法を用い、化学的に合成するかまたは組換え D N A 法により製造することができる（たとえば、Creighton, 1983、上掲および Sambrook ら、1989、上掲を参照）。別法として、細胞内エピトープに結合する中和抗体などの一本鎖抗体をも投与することができる。そのような一本鎖抗体は、たとえば Marasco ら、1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 に記載の方法を用い、一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を標的細胞集団で発現させることにより投与することができる。

10

【0224】

5.5. 医薬製剤および投与方法

上記に記載した化合物、たとえば核酸配列、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、および組換え細胞は、治療学的に有効な投与量にて患者に投与してイオン／陽イオン関連障害を治療または改善することができる。治療学的に有効な投与量とは、障害徴候の改善という結果となるに十分な量の化合物または細胞集団、あるいは障害徴候の改善となるに十分な濃度の h V R 1 d 遺伝子産物を発現する核酸配列の量をいう。

20

【0225】

化合物の毒性および治療学的効能は、細胞培養または実験動物における標準的な医薬手順、たとえば L D₅₀（集団の 50% にとって致死的な投与量）および E D₅₀（集団の 50% において治療学的に有効な投与量）の決定により決定することができる。毒性作用と治療効果との投与量比は治療指数であり、L D₅₀ / E D₅₀ の比として表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いることもできるが、感染していない細胞への潜在的な障害を最小にし、それによって副作用を低減するため、そのような化合物を罹患組織の部位へターゲティングする送達系をデザインすべく注意が必要である。

30

【0226】

細胞培養アッセイおよび動物研究で得られたデータを、ヒトで使用する投与量の範囲を処方するのに用いることができる。そのような化合物の投与量は、毒性が全くないかまたは殆どなしで、E D₅₀ を含む循環濃度の範囲であるのが好ましい。投与量は、使用した剤型および使用した投与経路に応じてこの範囲で変えることができる。本発明の方法に用いる化合物については、治療的に有効な量はまず細胞培養アッセイから評価することができる。細胞培養において決定されるように、I C₅₀（すなわち、徴候の最大抑制の半分を達成する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成すべく動物モデルで投与量を処方することができる。そのような情報を用い、ヒトにおいて有用な投与量を一層正確に決定することができる。血漿中のレベルは、たとえば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

40

【0227】

本発明に従って用いる医薬組成物は、1 またはそれ以上の生理学的に許容しうる担体または賦形剤を用い、常法で調合することができる。

それゆえ、化合物および生理学的に許容しうるその塩および溶媒を、吸入（口または鼻のいずれかにより）または経口、口腔内、非経口または直腸投与による投与用に調合することができる。

50

【0228】

経口投与のためには、医薬組成物は、薬理学的に許容しうる賦形剤、たとえば結合剤（たとえば、前もってゼラチン化した（pregelatinized）トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（たとえば、乳糖、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（たとえば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（たとえば、ジャガイモデンプンまたはナトリウムデンプングリコレート（sodium starch glycolate））；または湿潤剤（たとえば、ラウリル硫酸ナトリウム）を用いて通常的手段により調製した、たとえば、錠剤またはカプセル剤の形態をとることができる。錠剤は当該技術分野でよく知られた方法によりコーティングすることができる。経口投与用の液体製剤は、たとえば、液剤、シロップ剤または懸濁剤の形態をとることができ、あるいは使用前に水または他の適当なビヒクルで構成する乾燥製剤として調製することもできる。そのような液体製剤は、通常的手段により、薬理学的に許容しうる添加剤、たとえば、懸濁化剤（たとえば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂質）；乳化剤（たとえば、レシチンまたはアラビアゴム）；非水性ビヒクル（たとえば、扁桃油、油状エステル、エチルアルコールまたは分留（fractionated）植物油）；および保存剤（たとえば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはプロピルまたはソルビン酸）を用いて調製することができる。製剤はまた、適宜、緩衝塩、芳香剤、着色剤および甘味剤を含んでいてよい。

10

【0229】

経口投与用製剤は、活性化合物の制御放出をもたらすように適当に調合することができる。

20

口腔投与のためには、組成物は通常の方法で調合した錠剤またはトローチの形態をとることができる。

吸入による投与のためには、本発明に従って使用する化合物をエアゾルスプレー提示の形態で、適当な噴射剤、たとえばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当な気体を用いて圧縮パック（pressurized pack）またはネブライザーから都合よく送達する。圧縮エアゾル剤の場合は、計量した量を送達するバルブを提供することにより投与量単位を決定することができる。吸入器に使用するのためのたとえばゼラチンのカプセルまたはカートリッジは、本発明の化合物と適当な基剤（たとえば、乳糖またはデンプン）との粉末混合物を含むように調合

30

【0230】

注射、たとえば巨丸（bolus）注射または連続注入による非経口投与（すなわち、静脈内または筋肉内）のために本発明の化合物を調合することができる。注射用製剤は、単位剤型、たとえばアンプルまたは多回投与容器（multi-dose containers）中にて、保存剤を添加して調製することができる。組成物は、たとえば油状ビヒクルまたは水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤または乳剤などの剤型をとることができ、懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤などの調合用剤を含んでいてよい。あるいは、活性成分は、適当なビヒクル、たとえば滅菌した発熱性物質不含の水を用いて使用前に構成するための粉末の形態であってよい。h V R 1 d 発現細胞は静脈内投与により患者に導入するのが好ましい。

本発明の化合物はまた、たとえばカカオ油脂や他のグリセリドなどの通常の坐剤基剤を含む坐剤や保持（retention）浣腸などの直腸用組成物に調合することができる。

40

【0231】

上記に記載した製剤の他に、本発明の化合物はまたデポ製剤として調合することもできる。そのような長期間作用する製剤は、植込み（たとえば、皮下または筋肉内）によりまたは筋肉内注射により投与することができる。それゆえ、たとえば、本発明の化合物は、適当なポリマー性または疎水性の物質（たとえば、許容しうる油中の乳剤として）またはイオン交換樹脂を用いて、またはわずかに（sparingly）可溶性誘導体として、たとえばわずかに可溶性塩として調合することができる。

本発明の化合物は、所望なら、活性成分を含む1またはそれ以上の単位剤型を入れること

50

のできるパックまたはディスペンサーデバイスにて調製することができる。パックは、プリスターパックなどのように金属またはプラスチック箔を含んでいてよい。パックまたはディスペンサーデバイスは、投与の指示書を添付することができる。

【0232】

6. 実施例：新規な hVR1d 遺伝子およびそれがコードするタンパク質の同定

以下のセクションは、新規なヒトイオンチャンネルをコードする新規なヒト遺伝子配列の同定を記載する。

6.1. 新規な hVR1d DNA 配列のクローニング

一般に、全ての日常的な分子生物学的手順は、標準プロトコルに従うかまたは広範に市販されているキットおよび試薬によった。シーケンシングはすべて、市販のダイターミネーター (dye-terminator) を用いて ABI 373 自動シーケンサーで行った。 10

【0233】

hVR1a、hVR1b、hVR1c および hVR2 の公知の配列データを用い、EST およびゲノムパブリックデータベースをスクリーニングした。使用した配列サーチプログラムは、ギャップト (gapped) BLAST であった (S. F. Altschul ら、1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402)。サーチは、質問 (query) 配列と有意の類似性を有するが同一ではないセグメントを含む 3 つの細菌人工染色体 (BAC) 配列をパブリックドメイン高処理量ゲノムデータベース中に同定した。これら BAC のアクセッション番号は、AC025125、AC027040 および AC027796 であった。レセプターのバニロイドファミリーと類似性を有するセグメントを非縮重タンパク質および核酸データベースに対して探索したところ、これらセグメントは潜在的な新規なバニロイドレセプターをコードすることがわかった。しかしながら、この時点で得られた配列情報は完全なコード配列を同定するには充分でなかった。ついで、3' および 5' の両者の RACE 法を用い (M. A. Frohman ら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998)、ヒト脳ライブラリーから単離した cDNA クローンをシーケンシングすることにより、以下のようにして完全な配列データを得た。 20

【0234】

上記で最初にバニロイドレセプターに相同であるとして同定されたゲノム DNA 配列、すなわち BAC 配列からデザインした PCR プライマーペアを用い、潜在的な cDNA クローンについてヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。さらに詳細には、以下の Frag3 プライマーペア、すなわち、フォアワードプライマー「Frag3-s」CGCAGTGCTGGAACTCTTCA (配列番号 19) およびリバースプライマー「Frag3-a」CATCAGAGCAATGAGCATGTTGA (配列番号 20) (リバースプライマーは 5' 末端にビオチンが結合していた) を用い、ゲノム DNA から hVR1d 配列のビオチン化断片を増幅した。この DNA 断片をゲル精製し、変性し、ついで標準プロトコルに従って f1 ヘルパーファージを用いて構築した環状一本鎖ヒト脳 cDNA ライブラリーにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、50% ホルムアミド、1.5M NaCl、40mM Na_xH_yPO₄ (pH 7.2)、5mM EDTA および 0.2% SDS 中、42°C で行った。 30

【0235】

ビオチン化 DNA 断片と環状 DNA とのハイブリッドをストレプトアビジンマグネチックビーズ上に捕獲した。ビーズから熱放出した後、cDNA クローニングベクター中の T7 プロモーター配列に相補的なプライマーを用いて二本鎖に変換した。ついで、二本鎖 cDNA を大腸菌宿主細胞中にエレクトロポレーションにより導入し、得られたコロニーを最初のプライマーペアを用いた PCR によりスクリーニングして所望の cDNA を同定した。約 20 の PCR 陽性クローンを得た。全てのクローンについて挿入サイズを決定し、最大の挿入を有する 2 つのクローンを DNA シーケンシング用に選択した。 40

【0236】

上記 RACE 法を用いてさらなる配列情報を得た。さらに詳細には、CLONTECH Laboratories, Inc. により調製したヒト胎仔脳 Marathon cDNA ライブラリーを鋳型として用いた 50

。ネステッドPCR反応を用いて5'配列データを得た。ゲノム配列データから2つの遺伝子特異的プライマーは、増幅の第一ラウンドでは「1D5R2」(GCCCAAGGATGTCGTTCTCTTTCAGC(配列番号21))であり、その後のラウンドでは「1D5R3」(GATCCGCACTATCTCTCTTGGTGTGG(配列番号22))であった。3'配列データを得るには、遺伝子特異的プライマー「1D3R2」(ACTGAATGGAAGACGCACTCTCTTTC(配列番号23))を用いて1ラウンドの増幅を用いた。5'および3'の両RACE増幅において、CLONTECHのプライマー「AP1」を第二のプライマーとして用いた。RACE生成物のクローニングは、Invitrogen CorporationのTOPO TA Cloning Kitを製造業社の指示に従って用いて行った。挿入サイズを制限消化により評価し、ついで最大の挿入を有するクローンをシーケンシングした。

10

【0237】

これら手順により得られた核酸配列を図1Aおよび図1Bに示す。図1Aおよび図1Bは、それぞれ新規なcDNAクローンhVR1dのコード配列の2つのスプライス変異体、すなわちhVR1d.1およびhVR1d.2を同定する。これから得られるタンパク質、すなわちhVR1d.1およびhVR1d.2スプライス変異体によってコードされるアミノ酸配列を図2Aおよび図2Bにそれぞれ示してある。

【0238】

実施例2—新規なヒトhVR1d.1およびhVR1d.2ポリペプチドの発現プロファイリング

20

上記に記載のhVR1d核酸を用いた発現プロファイリング研究を以下のようにして行った：上記で同定したBAC配列からPCRプライマーをデザインし、Applied BiosystemsのGeneAmp 5700を用いた定量的PCRによりhVR1d mRNAの組織レベルを測定した。フォアワードプライマーはTGACCTGAACATCCAGCAGAA(配列番号24)であり、リバープライマーはAGCATGTTGAGGAGGAGAACAA(配列番号25)であった。これらプライマーはhVR1d.1とhVR1d.2とを識別しなかった。PCR手順において、第一鎖cDNAを種々の組織採取源から単離した市販のmRNA(CLONTECH)から作製した。さらに、各アッセイに用いたcDNAの相対量を、全ての組織で等しい量で発現される遺伝子であるシクロフィリンに対するプライマーペアを用いた平行実験を行って決定した。シクロフィリンプライマーペアは各試料中のcDNA量に小さな変動を検出し、これらデータをhVR1dプライマーペアで得られたデータを正規化するのに用いた。PCRデータを、試験した組織での転写物の存在量の差異の相対評価に変換し、このデータを図4に示す。

30

【0239】

図4に示すように、hVR1dは種々の脳組織並びに脊髄組織で高頻度に発現される。脳組織に関しては、hVR1dは脳の脳梁(CC)、尾状核(CN)、および扁桃(A)で最も高頻度に発現される。

さらに、hVR1dのスプライス変異体(hVR1d.2)核酸の脳のサブ領域を含む種々の組織での相対的な発現を同定するため、さらなる発現プロファイリング実験を行った。実験は、以下のプライマーペアを用いて上記のようにして行った。フォアワードプライマーはCGGAACCTTCGGTGTAAGAG(配列番号26)であり、リバープライマーはTCATCCCTCAAGCCCTCTCT(配列番号27)であった。

40

【0240】

図5に示すように、hVR1d.2ポリペプチドはhVR1d.1ポリペプチドと極めて類似の発現プロファイルを有していた。しかしながら、図6に示すように、hVR1d.2ポリペプチドは脳のサブ領域では若干異なる発現を示した。とりわけ、hVR1d.2ポリペプチドはhVR1d.1ポリペプチドと比較して、視床および黒質で有意に一層高く発現され、扁桃ではより低い発現であった。この観察された差別的な発現は、hVR1d.1ポリペプチドとhVR1d.2ポリペプチドとの潜在的に関連しているがそれでも多様な役割を強調しており、これらポリペプチドのいずれか一方が種々の神経疾患および/ま

50

たは障害の治療のための医薬となりうる（druggable）標的として有用であることを示唆している。

【0241】

実施例 3—本発明の H V R 1 d . 1 ポリペプチドおよび h V R 1 d . 2 ポリペプチドに対応する N 末端および C 末端欠失変異体の製造方法

本明細書に記載するように、本発明は、本発明の H V R 1 d . 1 ポリペプチドおよび h V R 1 d . 2 ポリペプチドに対応する N 末端および C 末端欠失の組み合わせに加えて、該 N 末端および C 末端欠失変異体の製造方法を包含する。そのような変異体を製造するために多くの方法が当業者に利用できる。そのような方法は、P C R 増幅と遺伝子クローニング法との組み合わせを含む。分子生物学の当業者であれば本明細書において提供または参照した教示および／または当該技術分野で知られた他の標準法を用い、本発明の各欠失変異体を容易に作製できるであろうが、以下に例示的な方法を記載する。 10

【0242】

簡単に説明すると、完全長の H V R 1 d . 1 または h V R 1 d . 2 ポリペプチド配列をコードする単離 c D N A クローンを用い、意図する N 末端および／または C 末端欠失変異体を P C R 増幅し、その後にクローニングすべく、配列番号 1 または配列番号 3 の所望の 5 ' 位および 3 ' 位から得られた約 1 5 ～ 2 5 ヌクレオチドの適当なプライマーをデザインすることができる。そのようなプライマーは、たとえば、5 ' プライマーおよび 3 ' プライマーについてそれぞれ開始コドンおよび停止コドンを含んでいてよい。そのようなプライマーはまた、欠失変異後増幅のクローニングを容易にするために制限部位を含んでいてよい。さらに、プライマーは、たとえば f l a g タグ配列、コザック配列、または本明細書で検討および／または参照する他の配列などのさらなる配列を含んでいてよい。 20

【0243】

たとえば、H 3 9 4 から R 7 2 0 までの N 末端欠失変異体の場合は、この欠失変異体に対応する c D N A 断片を増幅するのに以下のプライマーを用いることができる。

【表 1】

5' プライマー	5'-GCAGCA <u>GCGGCCGC</u> CACATGTTCTTTCTGTCCTTCTGC-3' (配列番号 2 8) NotI
3' プライマー	5'-GCAGCA <u>GTCGAC</u> CCTCACAGCGACAGTACCTGTTTCG-3' (配列番号 2 9) SalI

30

【0244】

たとえば、M 1 から N 6 2 6 までの C 末端欠失変異体の場合は、この欠失変異体に対応する c D N A 断片を増幅するのに以下のプライマーを用いることができる。

【表 2】

5' プライマー	5'-GCAGCA <u>GCGGCCGC</u> ATGAGCTTTATTTGCAGGCCACGAG-3' (配列番号 3 0) NotI
3' プライマー	5'-GCAGCA <u>GTCGAC</u> GTTGAGGAGGAGAACAAAGGTGAGG-3' (配列番号 3 1) SalI

40

【0245】

代表的な P C R 増幅の条件を以下に記載するが、当業者であれば効率的な増幅のために他の条件が必要となることを評価するであろう。1 0 n g の鋳型 D N A (H V R 1 d . 1 および h V R 1 d . 2 の c D N A クローン)、2 0 0 μ M の 4 d N T P、1 μ M のプライマー、0 . 2 5 U の T a q D N A ポリメラーゼ (P E)、および標準 T a q D N A ポリメラーゼ緩衝液を用い、1 0 0 μ l の P C R 反応混合液を調製する。典型的な P C R サイク 50

ル条件は以下のとおりである：

20～25サイクル：45秒、93度

2分、50度

2分、72度

1サイクル：10分、72度

【0246】

PCRの最終的な伸長工程の後、5Uのクレノー断片を加え、30度で15分インキュベートする。

断片をNot IおよびSal I制限酵素で消化した後、同様に消化した適当な発現および／またはクローニングベクター（とりわけ、pSport1）中にクローニングする。当業者であれば、他のプラスミドを同様に置換でき、ある環境では望ましいことを評価するであろう。ついで、消化した断片およびベクターをDNAリガーゼを用いてライゲートし、本明細書に記載する方法および／または当該技術分野で知られた他の方法を用いてコンピテントな大腸菌細胞を形質転換する。

【0247】

さらなるN末端欠失変異体を増幅するための5'プライマー配列は、下記式：

$(S + (X * 3))$ から $((S + (X * 3)) + 25)$

（式中、「S」はHVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子（配列番号1または配列番号3）の最初の開始コドンのヌクレオチド位置に等しく、「X」は意図するN末端欠失変異体の最もN末端側のアミノ酸に等しい）を参照して決定することができる。最初の項は、配列番号1または配列番号3のセンス鎖に対応して、5'プライマーの始めの5'ヌクレオチド位置を提供し、一方、第二の項は5'プライマーの終わりの3'ヌクレオチド位置を提供するであろう。プライマーの対応ヌクレオチド位置が決定されたら、たとえば該配列の5'末端に適用可能な制限部位配列を付加することにより最終的なヌクレオチド配列を作製することができる。本明細書で参照したように、ある環境では5'プライマーに他の配列（たとえば、コザック配列など）を付加することが望ましい。

【0248】

さらなるN末端欠失変異体を増幅するための3'プライマー配列は、下記式：

$(S + (X * 3))$ から $((S + (X * 3)) - 25)$

（式中、「S」はHVR1d.1またはhVR1d.2遺伝子（配列番号1または配列番号3）の最初の開始コドンのヌクレオチド位置に等しく、「X」は意図するN末端欠失変異体の最もC末端側のアミノ酸に等しい）を参照して決定することができる。最初の項は、配列番号1または配列番号3のアンチセンス鎖に対応して、3'プライマーの始めの5'ヌクレオチド位置を提供し、一方、第二の項は3'プライマーの終わりの3'ヌクレオチド位置を提供するであろう。プライマーの対応ヌクレオチド位置が決定されたら、たとえば該配列の5'末端に適用可能な制限部位配列を付加することにより最終的なヌクレオチド配列を作製することができる。本明細書で参照したように、ある環境では3'プライマーに他の配列（たとえば、停止コドン配列など）を付加することが望ましい。当業者であれば、PCR増幅を最適化するために上記ヌクレオチド位置の改変が必要であることを評価するであろう。

【0249】

上記と同じ一般式を用い、本発明のC末端欠失変異体を増幅するための5'および3'プライマー配列を同定することができる。さらに、上記と同じ一般式を用い、本発明のN末端およびC末端欠失変異体の組み合わせを増幅するための5'プライマーおよび3'プライマー配列を同定することができる。当業者であれば、PCR増幅を最適化するために上記ヌクレオチド位置の改変が必要であることを評価するであろう。

【0250】

実施例4—分子進化的手法による本発明の生物学的活性／機能的特性を促進する方法

10

20

30

40

50

知られている最も生物学的に活性なタンパク質の多くは生物における特定の機能に対して極めて有効であるが、このようなタンパク質はしばしばトランスジェニック用、治療的、医薬的、および／または工業的な応用には望ましくない特性を有している。これら特性のうちでも短い生理的半減期は最も顕著な問題であり、タンパク質レベルおよびタンパク質のmRNAレベルのいずれでも存在する。半減期を延ばす能力は、たとえば、タンパク質を遺伝子療法、トランスジェニック動物の作製、タンパク質の生物プロセスによる産生および精製における使用、およびとりわけ化学的モデュレーターとしてのタンパク質の使用のためには特に重要である。それゆえ、一般的な工業的および医薬的応用へのタンパク質の適用性に加えて動物起源の疾患の治療のための治療剤としての応用を促進するような特性を有する単離タンパク質の新規な変異体を同定する必要性が存在する。

10

【0251】

それゆえ、本発明の一つの側面は、方向付けられた(directed)分子進化により本発明の特定の特性を促進する能力に関する。そのような促進は、これらに限られないが、キットの必須成分としての本発明の有用性、本発明の生理的な貢献、たとえばその溶解性、構造またはコドンの最適化、本発明の特定の生物学的活性(関連する酵素活性を含む)、タンパク質の酵素動力学、タンパク質の K_i 、 K_{cat} 、 K_m 、 V_{max} 、 K_d 、タンパク質-タンパク質活性、タンパク質-DNA結合活性、アンタゴニスト/抑制活性(直接または間接相互作用を含む)、アゴニスト活性(直接または間接相互作用を含む)、タンパク質の抗原性(たとえば、タンパク質の抗原性を増大させるかまたは低減させることが望ましい場合)、タンパク質の免疫原性、タンパク質がそれ自体または他のタンパク質と二量体、三量体、またはマルチマーを形成する能力、本発明の抗原的効力(疾患または疾患状態の予防的治療として、または病的遺伝子をターゲティングするためのエフェクターとしてのその後の使用を含む)に有用である。さらに、タンパク質の特定の特性を促進する能力はまた、酵素の特徴付けられた活性をその最初に特徴付けられた活性とは全く関連のない活性に変化させることにも応用できる。本発明の他の所望の促進は、それぞれの個々のタンパク質に特定のものであり、それゆえ当該技術分野でよく知られており、本発明により包含される。

20

【0252】

たとえば、遺伝子工学により作製したイオンチャンネルは、その同族リガンドへの結合後に構成的に活性であってよい。あるいは、遺伝子工学により作製したイオンチャンネルは、リガンド結合の不在下で構成的に活性であってよい。さらに他の例として、遺伝子工学により作製したイオンチャンネルは、イオンチャンネルの活性化に典型的に必要とされる制御因子および／または条件(たとえば、リガンドの結合、リン酸化、立体配座の変化、カルシウムの流入など)の全てよりも少ないもので活性化されることができる。そのようなイオンチャンネルは、上記に記載した用途のなかでもイオンチャンネルモデュレーターを同定するためのスクリーニングにおいて有用であろう。

30

【0253】

方向付けられた進化は幾つかの工程からなる。第一の工程は、目的とする遺伝子またはタンパク質の変異体のライブラリーを確立することである。最も重要な工程は、ついで同定しようとする活性を必然的に伴う変異体を選択することである。スクリーニングのデザインは必須である、なぜならスクリーニングは有用でない変異体を排除するのに充分選択的でなければならないが、全ての変異体を排除するほど厳格であってはならないからである。ついで、最後の工程は、前のスクリーニングからの最良の変異体を用いて上記工程を繰り返すことである。ついで、各連続サイクルを、たとえばスクリーニングの厳格さを増大させるなど、必要に応じて改変することができる。

40

【0254】

何年にもわたって巨大分子中に変異を導入するための多くの方法が開発されてきている。これらの方法の幾つかとしては、ランダム突然変異誘発、「誤りがちの(error-prone)」PCR、化学的突然変異誘発、部位特異的突然誘発、および当該技術分野でよく知られた他の方法(現在行われている突然変異誘発法の包括的な列举のためには、Maniatis, Mo

50

lecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバープレス、コールドスプリング、ニューヨーク（1982）を参照）が挙げられる。一般に、そのような方法は、たとえば、タンパク質のコア機能的領域またはタンパク質の特定のドメインの（マルチドメインタンパク質の場合）機能を同定するための手段として用いられている。しかしながら、そのような方法は、近年、特別のまたは促進された特性を有する巨大分子変異体の同定に応用されている。

【0255】

ランダム突然変異誘発は、今日で最も広く認識されている方法である。典型的に、この方法は、「誤りがちの」PCRを用いるか（Moore, J.ら、Nature Biotechnology 14: 458 (1996)に記載されているように）または目的とする特定の領域に対応するランダムに合成したオリゴヌクレオチドの適用により（Derbyshire, K. M.ら、Gene, 46: 145-152 (1986)およびHill, DEら、Methods Enzymol., 55: 559-568 (1987)に記載されているように）行われている。両アプローチとも得ることのできる突然変異誘発のレベルに限界がある。しかしながら、いずれのアプローチも研究者が突然変異誘発の割合を有効に制御することができる。このことは、酵素の活性にとって有利な変異が極めて稀であることを考えると特に重要である。実際、あまりにも高い突然変異誘発レベルを使用すると有用な変異の所望の利点が相殺あるいは抑制されることがある。

10

【0256】

上記方法は両者とも巨大分子変異体のランダム化プールを作製するのに有効であるが、「DNAシャフリング」または「セクシュアル（sexual）PCR」と称する第三の方法が近年解明されている（WPC, Stemmer, PNAS, 91: 10747 (1994)）。DNAシャフリングはまた、「方向付けられた分子進化」、「エクソンシャフリング」、「方向付けられた酵素進化」、「インビトロ進化」、および「人工進化」とも称される。そのような術語は当該技術分野で知られており、本発明により包含される。この新しく好ましい方法は、その結果得られる子孫においてプラスの特性を増進させるのみならず、同時にマイナスの特性を排除するという点で、これまでの方法の限界を明らかに克服するものである。

20

【0257】

DNAシャフリングは、このことをインビトロ組換えの原理を「誤りがちの」PCR法と組み合わせることによって達成する。実際にはDNアーゼIによって作製した遺伝子の小さな断片のランダムに消化したプールから開始し、ついで該ランダムな断片を「誤りがちの」PCRアセンブリー反応に導入する。PCR反応の間、ランダムなサイズのDNA断片はその同族鎖にハイブリダイズするのみならず、目的とするポリヌクレオチドの異なる領域（全体のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションでは一般に見つからない領域）に対応する他のDNA断片にもハイブリダイズする。さらに、PCRアセンブリー反応は「誤りがちの」PCR反応条件を利用するので、全DNA断片に対してPCR反応のDNA合成工程でランダムな変異が導入され、反応のアニーリング工程の際に潜在的なハイブリダイゼーション部位をさらに多様なものにする。

30

【0258】

DNAシャフリング反応を行うには様々な反応条件を用いることができる。しかしながら、DNAシャフリングの特定の反応条件が、たとえばPNAS, 91: 10747 (1994)に記載されている。簡単には以下のとおりである：

40

DNAシャフリング反応に供すべきDNA基質を調製する。調製は、混入する細胞物質、化学物質、緩衝液、オリゴヌクレオチドプライマー、デオキシヌクレオチド、RNAなどから該DNAを単に単離する形態であってもよいし、たとえばQiagen, Inc.によって、またはPromega, Corp.によって提供されるもののようなDNA精製キットの使用を包含してもよい。

【0259】

DNA基質が精製されたら、これをDNアーゼI消化に供する。約2～4 μgのDNA基質を、50 mM トリス-HCl (pH 7.4) / 1 mM MgCl₂ の100 μl 当たり0.0015単位のDNアーゼI (Sigma) で10～20分間消化する。ついで、得られた1

50

0～50bpの断片をDE81イオン交換紙(Whatman)まで電気泳動により2%低融点アガロースゲルを泳動させることにより精製するか、適当な分子量カットオフ値のMicrocon濃縮機(Amicon)で精製するか、または当該技術分野で知られた他の方法に加えてオリゴヌクレオチド精製カラム(Qiagen)を用いることができる。DE81イオン交換紙を用いるなら、10～50bpの断片が1M NaClを用いて該紙から溶出され、ついでエタノール沈殿させる。

【0260】

次に、得られた精製断片を、2mMの各dNTP、2.2mM MgCl₂、50mM KCl、10mMトリス塩酸(pH9.0)および0.1%トリトンX-100を含むPCR混合物を10～30ng/μlの最終濃度で再懸濁することにより、PCRアセンブリー反応にかける。この時点ではプライマーを加えない。Taq DNAポリメラーゼ(Promega)は反応混合物100μlあたり2.5単位の割合で使用する。PCRプログラムは94℃で60秒; 94℃で30秒、50～55℃で30秒、および72℃で30秒を30～45サイクル; 続いて72℃で5分間。MJ Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)PTC-150サーモサイクラーを使用。アセンブリー反応が完了した後、得られたプライマーレス産物の1:40希釈液を、0.8μmの各プライマーを含むPCR混合物(アセンブリー反応に使用したものと同一緩衝液混合物を使用)に導入し、この混合物を15サイクルのPCR(94℃で30秒、50℃で30秒、および72℃で30秒)にかける。ここにいうプライマーは、シャフリング反応に利用するポリヌクレオチドの核酸配列に対応するプライマーである。このプライマーは、当該技術分野で知られており本明細書でも言及する方法を使って修飾核酸塩基対からなってもよいし、追加の配列を(例えば制限部位、突然変異特異塩基対などを付加するために)含んでもよいだろう。

【0261】

結果として得られる、シャッフルされ、アセンブルされ、増幅された産物は、当該技術分野で周知の方法(例えばQiagen PCR精製キット)を使って精製した後、適当な制限酵素を使ってクローニングすることができる。

DNAシャフリングの変法は今までに数多く公表されているが、そのような変法は当業者には明らかであり、本発明に包含される。DNAシャフリング法は、Zhaoらが記載した方法(Nucl Acid Res., 25(6): 1307-1308 (1997))を使って、所望の突然変異誘発レベルに合わせることもできる。

【0262】

上述のように、ランダム化されたプールを作製したら、それを、所望の特徴を持つ変異体を同定するための特異的スクリーニングにかけることができる。変異体が同定されたら、その変異体に対応するDNAをDNA基質として使用して、新たなDNAシャフリングを開始することができるだろう。このシャフリング、最適化された興味ある変異体の選択、次いで再シャフリングというサイクルを、最終的な変異体が得られるまで繰り返すことができる。DNAシャフリング技術を使って作製された変異体を同定するために応用されるモデルスクリーニングの例は、次の刊行物に記載されている: J. C., Mooreら、J. Mol. Biol., 272: 336-347 (1997); F. R., Crossら、Mol. Cell. Biol., 18: 2923-2931 (1998)およびA. Cramerら、Nat. Biotech., 15: 436-438 (1997)。

【0263】

DNAシャフリングにはいくつかの利点がある。第1に、これは有益な突然変異を利用する。スクリーニングと組み合わせると、DNAシャフリングは、最適な突然変異の組み合わせの発見を可能にし、最適な組み合わせが母集団中の全ての突然変異を含むことを想定していない。第2に、組換えは点突然変異と同時に起こる。DNAポリメラーゼに小さい断片DNAプールから完全長遺伝子を合成させる効果は、バックグラウンド突然変異生成率である。ストリンジェントな選択方法との組み合わせで、酵素活性が野生型酵素の16000倍まで進化している。要するに、バックグラウンド突然変異生成が遺伝子の可変性をもたらし、そこに組換えが作用して、活性を向上させたのである。

【0264】

組換えの第3の特徴は、それを使って有害な突然変異を除去できることである。上述のように、ランダム化の過程では、1つの有益な突然変異ごとに、少なくとも1つ以上の中立的または阻害的突然変異がありうる。そのような突然変異は、先の選択で選択された突然変異体のランダムサイズ断片に加えて、アセンブリー反応に過剰の野生型ランダムサイズ断片を含めることによって、除去することができる。次の選択中に、ポリヌクレオチド/ポリペプチド/酵素の最も活性な変異体の一部は、阻害的突然変異を失っているはずである。

【0265】

最後に、組換えは並列処理を可能にする。これは重大な利点である。というのも、タンパク質をより望ましくする特徴（例えば溶解度、活性など）はおそらく複数あるからである。2以上の望ましい特質を一度にスクリーニングすると、ますます困難になるので、分子進化の他の方法は阻害的になりがちである。しかし組換えを使用することにより、種々の特質について最適な代表的変異体のランダム化された断片を組み合わせて、複数の性質について一度に選択することが可能だろう。

【0266】

DNAシャフリングを本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに応用して、所定の宿主におけるそれらの免疫原性を低下させることもできる。例えば、本発明の特定の変異体をDNAシャフリング技術を用いて作製および単離することができる。そのような変異体は所望する特徴の全てを持ちうるが、その新規な固有の構造ゆえに宿主中で高い免疫原性を示すかもしれない。具体的に述べると、所望する特徴は、もやは「自己」分子として認識されず「異物」として認識される非天然構造を、そのポリペプチドに持たせることになり、したがってその新規変異体に対する宿主の免疫応答を活性化するかもしれない。そのような制約は、例えば、天然タンパク質の生体異物オルソログの遺伝子配列のコピーを、新規変異体遺伝子の遺伝子配列と共に、DNAシャフリングの1以上のサイクルに含めることなどによって克服することができる。オルソログと新規変異体DNAのモル比は相応に変化させることができるだろう。理想的には、結果として得られる同定されたハイブリッド変異体は、その生体異物タンパク質が宿主免疫系を回避することを可能にしたコード配列の少なくとも一部を含み、さらに望ましい特徴を与える元の新規変異体のコード配列の少なくとも一部を含むだろう。

【0267】

また本発明は、DNAシャフリングの1以上のサイクルが、遺伝子鋳型DNAに加えて、既知のアレル配列をコードするオリゴヌクレオチド、最適化されたコドン配列、既知の変異体配列、既知のポリヌクレオチド多型配列、既知のオルソログ配列、既知のホモログ配列、新たなホモログ配列、新たな非ホモログ配列、別の種に由来する配列、ならびに上記のいくつかおよびその任意の組合わせを含むDNAシャフリング技術の、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの進化への応用を包含する。

【0268】

場合によって応用できる、または望ましい、関連方法は、上記の方法の他にも数多くある。それらの代表例には、参考文献として本明細書の一部を構成するPCT出願WO98/31700およびWO98/32845に論じられている方法がある。さらに、発明を発展させて、PCT出願WO98/13485、WO98/13487、WO98/27230、WO98/31837およびCramer, A.ら、Nat. Biotech., 15: 436-438 (1997)にそれぞれ記載されているように、遺伝子治療、タンパク質工学、変異体を含む全細胞の進化、または本発明のポリヌクレオチドを含む全酵素経路の進化に理想的な変異体を作製するために、関連方法を本発明のポリヌクレオチドに応用することもできる。

【0269】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに「DNAシャフリング」技術を応用する他の方法は、それらの応用案を含めて、例えば米国特許第5,605,793号；PCT出願WO95/22625；PCT出願WO97/20078；PCT出願WO97/35966；およびPCT出願WO98/42832；PCT出願に記載されている。上記の

刊行物はその全目的のためにその全体が参照のため本明細書中に引用される。

【0270】

実施例 5—hVR1d ポリペプチドの推定イオンチャネル活性を評価する方法

hVR1d ポリペプチドの潜在的なイオンチャネル活性を評価するために多くの方法を用いることができる。

hVR1d コードポリヌクレオチド配列を含む適当な哺乳動物発現ベクターでトランスフェクションしたCHO-K1細胞を、当該技術分野で知られた方法を用いて調製する。トランスフェクションの12時間後にトランスフェクションした細胞をカバースリップに移し、トランスフェクションの24時間後に電気生理学的測定を行う(22±2℃)。hVR1d 発現CHO-K1細胞をGFP蛍光により検出する。膜電流を10または20kHzでデジタル化し、1kHzにてオフラインでデジタルにて濾過する。500msec持続する電圧刺激を5-秒間隔で送り、100~+100mVの電圧勾配または電圧段階とする。肉眼および単チャンネル電流のための内部ピペット溶液は、145mMのCs-メタンスルホネート、8mMのNaCl、5mMのATP、1mMのMgCl₂、10mMのEGTA、4.1mMのCaCl₂、および10mMのHepesを含んでいてよく、ATP添加後にCsOHでpHを7.2に調節する。標準細胞外溶液は、140mMのNaCl、5mMのCsCl、2.8mMのKCl、2mMのCaCl₂、1mMのMgCl₂、10mMのHepes、および10mMのグルコースを含んでいてよく、NaOHでpHを7.4に調節する。相対的なイオン透過性は、145mMのCs-メタンスルホネート、10mMのCsCl、5mMのATP、10mMのEGTA、および10mMのHepesを含むピペット溶液(pH7.2)、および110mMのNMDG⁺、30mMのX⁺(Na⁺、Ca²⁺、K⁺、またはCs⁺)、10mMのHepes、および10mMのグルコース(pH7.4)を含む外部溶液を用いて測定する。1価イオンの相対的な透過性は、式： $PX/PCs = ([Cs^+]_o / [X^+]_o) \exp [F(E_{X} - E_{Cs}) / RT]$ に従って計算することができる。PCa/PCs透過性比は、式： $PCa/PCs = \{ [Cs^+]_o \exp (F E_{Cs} / RT) \exp (F E_{Ca} / RT) [\exp (F E_{Ca} / RT) + 1] \} / (4 [Ca^{2+}]_o)$ に従って計算する。ここで、R、T、およびFは、それぞれ気体定数、絶対温度、およびファラデー定数である。統計的な比較は、分散の2方向(two-way)分析(ANOVA)および両側t検定をBonferroni補正で行う；P<0.05は統計的な有意を示す。

【0271】

実施例 6—ポリペプチドの細菌発現

DNA配列の5'および3'末端に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使って本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを増幅することにより、挿入断片を合成する。cDNAインサートの増幅に使用するプライマーは、好ましくは、増幅産物を発現ベクターにクローニングするために、BamHIおよびXbaIなどの制限部位をプライマーの5'末端に含むべきである。例えばBamHIおよびXbaIは、細菌発現ベクターpQE-9(Qiagen, Inc.、カリフォルニア州チャッツワース)上の制限酵素部位と一致する。このプラスミドベクターは抗生物質耐性(Amp^r)、細菌複製起点(ori)、IPTG調節性プロモーター/オペレーター(P/O)、リボソーム結合部位(RBS)、6-ヒスチジンタグ(6-His)、および制限酵素クローニング部位をコードしている。

【0272】

pQE-9ベクターをBamHIおよびXbaIで消化し、細菌RBSから始まる読み枠を保ちつつ、増幅断片をpQE-9ベクターにライゲートする。次に、そのライゲーション混合物を使って大腸菌M15/rep4株(Qiagen, Inc.)を形質転換する。大腸菌M15/rep4株はlacIリプレッサーを発現させ、かつ、カナマイシン耐性(Kan^r)を付与する複数コピーのプラスミドpREP4を含有する。LB平板上で成長するそれらの能力によって形質転換体を同定し、アンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、制限分析によって確認する。

10

20

30

40

50

【0273】

所望の構築物を含有するクローンを、Amp ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) と Kan ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) を両方とも添加した LB 液体培地で終夜 (O/N) 液体培養する。その O/N 培養物を使って、1:100~1:250 の比率で大きい培養に接種する。光学密度 600 (O.D.600) が 0.4~0.6 になるまで細胞を生育させる。次に IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) を最終濃度が 1 mM になるように加える。IPTG は lacI リプレッサーを不活化し、P/O をきれいにして、遺伝子発現量の増加をもたらす。

【0274】

細胞をさらに 3~4 時間生育する。次に、遠心分離 ($6000 \times g$ で 20 分) によって細胞を収集する。細胞ペレットを、カオトロピック試薬 6 M 塩酸グアニジンに、4℃で 3~4 時間攪拌することによって、可溶化する。遠心分離によって細胞破片を除去し、ポリペプチドを含む上清を、ニッケル-ニトリロー三酢酸 (「Ni-NTA」) アフィニティー樹脂カラム (上掲の QIAGEN, Inc. から入手可能) に負荷する。6×His タグを持つタンパク質は高い親和性で Ni-NTA 樹脂に結合し、簡単な一段階操作で精製することができる (詳細は「The QIAexpressionist」(1995, QIAGEN, Inc., 上掲) を参照)。

【0275】

簡単に述べると、6 M 塩酸グアニジン (pH 8) 中のカラムに上清を負荷し、そのカラムをまず 10 容量の 6 M 塩酸グアニジン (pH 8) で洗浄し、次に 10 容量の 6 M 塩酸グアニジン (pH 6) で洗浄し、最後に 6 M 塩酸グアニジン (pH 5) でポリペプチドを溶出させる。

次に、精製されたタンパク質を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) または 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 6) 緩衝液 + 200 mM NaCl に対して透析することによって再生する。あるいは、Ni-NTA カラム上に固定化している間にタンパク質をうまく再フォーミングさせることもできる。推奨する条件は次の通りである: プロテアーゼ阻害剤を含む 500 mM NaCl、20% グリセロール、20 mM トリス塩酸 (pH 7.4) 中の直線的な 6 M-1 M 尿素勾配を用いる再生。再生は 1.5 時間以上かけて行なうべきである。再生後に、250 mM イミダゾールを加えることによって、タンパク質を溶出させる。イミダゾールは、PBS または 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 6) 緩衝液 + 200 mM NaCl に対する最終透析ステップによって除去される。精製されたタンパク質は 4℃で保存するか、または -80℃で凍結する。

【0276】

実施例 7—封入体からのポリペプチドの精製

大腸菌中で発現させたポリペプチドが封入体の形で存在する場合は、以下の代替方法を使って、そのポリペプチドを精製することができる。別段の指定がない限り、以下の工程は全て 4~10℃で行う。

大腸菌発酵の生産相が完了したら、細胞培養を 4~10℃に冷却し、15,000 rpm での連続的遠心分離 (Heraeus Sepatech) によって細胞を収集する。細胞ペースト単位重量あたりの予想タンパク質収量と、必要な精製タンパク質量に基づいて、適当な量 (重量) の細胞ペーストを、100 mM トリス、50 mM EDTA を含む緩衝液 (pH 7.4) に懸濁する。高剪断攪拌器を使って均一な懸濁液になるように細胞を分散させる。

【0277】

次に、その溶液をマイクロフルイダイザー (Microfluidics, Corp. または APV Gaulin, Inc.) に 4000~6000 psi で 2 回通すことによって、細胞を溶解する。次に、ホモジネートを NaCl 溶液と混合して 0.5 M NaCl の最終濃度にした後、7000×g で 15 分間遠心分離する。得られたペレットを 0.5 M NaCl、100 mM トリス、50 mM EDTA、pH 7.4 で再び洗浄する。

得られた洗浄済封入体を 1.5 M グアニジン塩酸塩 (GuHCl) で 2~4 時間可溶化する。7000×g で 15 分間の遠心分離の後、ペレットを捨て、ポリペプチド含有上清を 4℃で終夜インキュベートして、さらに GuHCl 抽出させる。

【0278】

高速遠心分離（30,000×g）で不溶性粒子を除去した後、GuHCl抽出物を、激しい攪拌によって50mMナトリウム、pH4.5、150mM NaCl、2mM EDTAを含む20容量の緩衝液とすばやく混合することにより、GuHCl可溶化タンパク質を再フォールディングさせる。再フォールディングした希釈タンパク質溶液を混合せずに4℃に12時間保った後、さらなる精製段階を行なう。

【0279】

再フォールディングしたポリペプチド溶液を清澄化するには、40mM酢酸ナトリウム（pH6.0）と平衡させた適当な表面積の0.16mm膜フィルター（例えばFiltron）を装着した接線濾過ユニットを前もって用意しておき、それを使用する。濾過した試料を陽イオン交換樹脂（例えばPoros HS-50, Perceptive Biosystems）にのせる。そのカラムを40mM酢酸ナトリウム（pH6.0）で洗浄し、同じ緩衝液中の250mM、500mM、1000mMおよび1500mM NaClで段階的に溶出する。溶出液の280nmでの吸光度を連続的にモニターする。画分を集め、SDS-PAGEでさらに分析する。

【0280】

次に、ポリペプチドを含有する画分をプールし、4容量の水と混合する。次に希釈した試料を、先に調製しておいた強陰イオン交換樹脂（Poros HQ-50, Perceptive Biosystems）と弱陰イオン交換樹脂（Poros CM-20, Perceptive Biosystems）との直列カラムのセットに負荷する。それらのカラムを40mM酢酸ナトリウム（pH6.0）と平衡させる。両カラムを40mM酢酸ナトリウム（pH6.0）、200mM NaClで洗浄する。次に、CM-20カラムを0.2M NaCl、50mM酢酸ナトリウム（pH6.0）から1.0M NaCl、50mM酢酸ナトリウム（pH6.5）までの範囲の10カラム容量の直線的勾配を使って溶出させる。流出液のA280を常にモニターしながら画分を集める。次に、ポリペプチドを含有する画分（例えば16% SDS-PAGEで決定）をプールする。

【0281】

得られたポリペプチドは、上記の再フォールディングステップおよび精製ステップ後に、95%を超える純度を示すべきである。5μgの精製タンパク質を負荷した場合、クーマシーブルー染色した16% SDS-PAGEゲルによって大きな汚染物質バンドが観察されてはならない。精製タンパク質はエンドトキシン/LPS汚染についても試験することができ、通例、LPS含量はLAL試験法で0.1ng/ml未満である。

【0282】

実施例 8—バキュロウイルス発現系におけるポリペプチドのクローニングおよび発現
この実施例では、ポリペプチドを発現させるために、プラスミドシャトルベクターpAc373を使って、ポリヌクレオチドをバキュロウイルスに挿入する。典型的バキュロウイルス発現ベクターは、オートグラファ・カリフォルニカ（*Autographa californica*）核多核体病ウイルス（AcMNPV）の強力なポリヘドリンプロモーターを含み、その後ろに例えばBamHI、XbaIおよびAsp718などといった便利な制限酵素部位が続いている。ポリアデニル化が効率よく起こるように、シミアンウイルス40（「SV40」）のポリアデニル化部位がしばしば使用される。組換えウイルスの選択が容易なように、このプラスミドは、大腸菌由来のベクターガラクトシダーゼ遺伝子を、弱いショウジョウバエプロモーターの制御下に、同じ向きで含んでおり、その後ろにポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルが続いている。挿入される遺伝子の両側には、クローン化ポリヌクレオチドを発現させる生存可能なウイルスが、野生型ウイルスDNAとの細胞媒介相同組換えによって生成するように、ウイルス配列が隣接している。

【0283】

当業者にはよくわかるだろうが、その構築物が転写、翻訳、分泌などのシグナルを、例えばシグナルペプチドや、必要に応じてインフレームAUGを含めて、適切な位置に持つ限り、上記のベクターの代わりに、pVL941およびpACIM1など、数多くの他のバキュロウイルスベクターを使用することができる。そのようなベクターは、例えばLuckow

ら、Virology 170: 31-39 (1989)に記載されている。

【0284】

DNA配列の5'および3'末端に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使って、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを増幅することにより、挿入断片を合成する。cDNAインサートの増幅に使用するプライマーは、好ましくは、増幅産物を発現ベクターにクローニングするために、プライマーの5'末端に制限部位を含むべきである。具体的には、寄託されたクローンに含まれているcDNA配列を、AUG開始コードと、本明細書で同定する天然のリーダー配列（当てはまる場合）を含めて、PCRプロトコルを使って増幅する。天然のシグナル配列をタンパク質の製造に使用する場合、使用するベクターは第2のシグナルペプチドを必要としない。もう一つの選択肢として、Summersら「A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures」Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No.1555 (1987)に記載されている標準的方法を使って、バキュロウイルスリーダー配列を含むようにベクターを改変することができる。

10

【0285】

市販のキット（「Geneclean」BIO 101 Inc.、カリフォルニア州ラホーヤ）を使って1%アガロースゲルから増幅断片を単離する。次に、その断片を適当な制限酵素で消化し、再び1%アガロースゲルで精製する。

プラスミドに対応する制限酵素で消化する。プラスミドは、所望により、ウシ腸ホスファターゼを使って、当該技術分野で知られる常法により、脱リン酸化することができる。次に、市販のキット（「Geneclean」BIO 101 Inc.、カリフォルニア州ラホーヤ）を使って1%アガロースゲルからDNAを単離する。

20

【0286】

断片と脱リン酸化したプラスミドとをT4 DNAリガーゼで一つにライゲートする。大腸菌HB101または他の適切な大腸菌宿主、例えばXL-1 Blue細胞（Stratagene Cloning Systems、カリフォルニア州ラホーヤ）などを、ライゲーション混合物で形質転換し、培養プレートに広げる。個々のコロニーから得たDNAを消化し、消化産物をゲル電気泳動で解析することによって、上記プラスミドを含む細菌を同定する。クローン化された断片の配列は、DNA配列決定によって確認する。

【0287】

Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84: 7413-7417 (1987)に記載のリポフェクション法を使って、上記ポリヌクレオチドを含むプラスミド5 µgを、市販の線状バキュロウイルスDNA（「BaculoGold（商標）バキュロウイルスDNA」、Pharmingen、カリフォルニア州サンディエゴ）1.0 µgと同時にトランスフェクトする。1 µgのBaculoGold（商標）ウイルスDNAと5 µgのプラスミドとを、50 µlの無血清グレース培地（Life Technologies Inc.、メリーランド州ゲーサースバーグ）が入っているマイクロタイタープレートの滅菌ウェル中で混合する。その後、リポフェクチン10 µlとグレース培地90 µlを加え、混合し、室温で15分間インキュベートする。次に、血清を含まないグレース培地1 mlが入っている35 mm組織培養プレートに接種したSf9昆虫細胞（ATCC CRL 1711）に、上記トランスフェクション混合物を滴下する。次に、そのプレートを27℃で5時間インキュベートする。次に、トランスフェクション溶液をプレートから取り除き、10%ウシ胎児血清を添加したグレース昆虫培地1 mlを加える。次に、培養を27℃で4日間続ける。

30

40

【0288】

4日後に上清を集め、SummersおよびSmith（上掲）に記載されているように、ブランクアッセイを行なう。青色のブランクを生じるgal発現クローンの同定と単離が容易になるように「Blue Gal」（Life Technologies Inc.、ゲーサースバーグ）を含むアガロースゲルを使用する（このタイプの「ブランクアッセイ」に関する詳細な説明は、Life Technologies Inc.（ゲーサースバーグ）が配布している昆虫細胞培養とバキュロウイルス学に関するユーザーズガイドの9～10頁に記載されている）。適当なインキュベシ

50

ョン後に青色プラークをマイクロピペッター（例えばエッペンドルフ）の先端で拾う。次に、組換えウイルスを含有するその寒天を、200 μ lのグレース培地が入っているマイクロ遠心管で再懸濁し、組換えバキュロウイルスを含有するその懸濁液を使って、35 mmディッシュに接種したSf9細胞を感染させる。4日後に、これら培養皿の上清を収集し、4℃で保存する。

【0289】

ポリペプチドの発現を確認するために、10%熱不活化FBSを添加したグレース培地でSf9細胞を生育する。その細胞を、上記ポリヌクレオチドを含む組換えバキュロウイルスに約2の感染多重度（「MOI」）で感染させる。6時間後に培地を除去し、メチオニンおよびシステインを欠くSF900II培地（Life Technologies Inc.、メリーランド州ロックビルから入手可能）に置換する。42時間後に5 μ Ciの³⁵S-メチオニンおよび5 μ Ciの³⁵S-システイン（Amershamから入手可能）を加える。細胞をさらに16時間培養した後、遠心分離によって収集する。上清中のタンパク質および細胞内タンパク質をSDS-PAGEと、それに続くオートラジオグラフィ（放射性標識した場合）によって解析する。

精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列のマイクロシーケンシングを使って、産生されたタンパク質のアミノ末端配列を決定してもよい。

【0290】

実施例9—哺乳類細胞におけるポリペプチドの発現

本発明のポリペプチドは哺乳類細胞中で発現させることができる。典型的な哺乳類発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介するプロモーター配列、タンパク質コード配列、ならびに転写の終結および転写物のポリアダニル化に必要なシグナルを含有する。他の配列には、エンハンサー、コザック配列、およびRNAスプライシングの供与部位と受容部位とに挟まれた介在配列などがある。効率の高い転写は、SV40の初期および後期プロモーター、レトロウイルス、例えばRSV、HTLV I、HIV Iなどのロングターミナルリピート（LTR）、およびサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーターを使って達成される。しかし細胞の配列（例えばヒトアクチンプロモーター）を使用することもできる。

【0291】

本発明の実施に使用する適切な発現ベクターとしては、例えばpSVLおよびpMSG（Pharmacia、スウェーデン・ウプサラ）、pRSVcat（ATCC37152）、pSV2dhfr（ATCC37146）、pBC12MI（ATCC67109）、pCMVSPORT2.0およびpCMVSPORT3.0などのベクターが挙げられる。使用することができるであろう哺乳類宿主細胞には、例えばヒトのHeLa、293、H9およびJarkat細胞、マウスのNIH3T3およびC127細胞、Cos1、Cos7およびCV1、ウズラQC1-3細胞、マウスL細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などがある。

あるいは、本ポリヌクレオチドが染色体に組み込まれている安定細胞株中で、本ポリペプチドを発現させることもできる。dhfr、gpt、ネオマイシン、ハイグロマイシンなどの選択可能マーカーとの同時トランスフェクションにより、トランスフェクトされた細胞の同定および単離が可能になる。

【0292】

コードされているタンパク質を大量に発現させるために、導入された遺伝子を増幅することもできる。DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）マーカーは、数百コピー、さらには数千コピーもの目的遺伝子を保持する細胞株を開発するのに役立つ（例えばAlt, F. W.ら、J. Biol. Chem., 253: 1357-1370 (1978); Hamlin, J. L.およびMa, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097: 107-143 (1990); Page, M. J.およびSydenham, M. A., Biotechnology 9: 64-68 (1991)を参照）。もう一つの有用な選択マーカーは酵素グルタミンシンターゼ（GS）である（Murphyら、Biochem J. 227: 277-279 (1991); Bebbingtonら、Bio/Technology 10: 169-175 (1992)）。これらのマーカーを使用して、哺乳類細胞を選択培

地中で生育し、最も高い耐性を持つ細胞を選択する。それらの細胞株には増幅された遺伝子が染色体に組み込まれている。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞とNSO細胞は、しばしばタンパク質の生産に使用される。

【0293】

本明細書に概説するプロトコールに従って、本発明のポリヌクレオチドを増幅する。タンパク質の生産に天然のシグナル配列を使用する場合、ベクターは第2のシグナルペプチドを必要としない。もう一つの選択肢として、天然のシグナル配列を使用しない場合は、異種シグナル配列を含むようにベクターを改変することができる（例えばWO96/34891を参照）。市販のキット（「Geneclean」 BIO 101 Inc.、カリフォルニア州ラホーヤ）を使って、1%アガロースゲルから増幅断片を単離する。次に、断片を適当な制限酵素で消化し、再び1%アガロースゲルで精製する。

次に、増幅断片を同じ制限酵素で消化し、1%アガロースゲルで精製する。次に、単離した断片と、脱リン酸化したベクターとを、T4 DNAリガーゼで一つにライゲートする。次に、大腸菌HB101またはXL-1 Blue細胞を形質転換し、プラスミドpC6に挿入された断片を含む細菌を、例えば制限酵素解析を用いて同定する。

【0294】

活性なDHFR遺伝子を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞を形質転換に使用する。5 μ gの発現プラスミドを、リポフェクチン（Filgnerら、上掲）を使って、0.5 μ gのプラスミドpSVneoと同時トランスフェクトする。プラスミドpSV2-neoは優性選択可能マーカー、G418を含む抗生物質群に対する耐性を付与する酵素をコードするTn5由来のneo遺伝子を含む。1mg/mlのG418を添加したアルファーマEMに細胞を接種する。2日後に、細胞をトリプシン処理し、10、25または50ng/mlのメトトレキセートと1mg/mlのG418とを添加したハイブリドーマクロニングプレート（Greiner、ドイツ）中のアルファーマEMに接種する。約10～14日後に、単クローンをトリプシン処理し、次に様々な濃度のメトトレキセート（50nM、100nM、200nM、400nM、800nM）を使用して、6ウェルペトリ皿または10mlフラスコに接種する。次に、最も高いメトトレキセート濃度で生育するクローンを、さらに高濃度のメトトレキセート（1 μ M、2 μ M、5 μ M、10mM、20mM）を含む新しい6ウェルプレートに移す。同じ操作を100～200 μ Mの濃度で生育するクローンが得られるまで繰返す。所望の遺伝子産物の発現を、例えばSDS-PAGEとウェスタンブロットとによって、または逆相HPLC分析によって分析する。

【0295】

実施例10—タンパク質融合物

本発明のポリペプチドは、好ましくは、他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は様々な用途に使用することができる。例えば、Hisタグ、HAタグ、プロテインA、IgGドメイン、およびマルトース結合タンパク質への本ポリペプチドの融合は、精製を容易にする（本明細書の実施例参照：EPA 394,827；Trauneckerら、Nature 331: 84-86 (1988)も参照）。また、IgG-1、IgG-3およびアルブミンへの融合は生体内半減期を増加させる。本発明のポリペプチドに融合された核局在化シグナルは、そのタンパク質を特定の細胞内位置に誘導することができ、共有結合したヘテロ二量体またはホモ二量体は、融合タンパク質の活性を増加または減少させることができる。融合タンパク質は、2以上の機能を持つキメラ分子を作り出すこともできる。最後に、融合タンパク質は、融合タンパク質の溶解度および／または安定性を、非融合タンパク質と比べて増加させることができる。上述したタイプの融合タンパク質はいずれも、IgG分子へのポリペプチドの融合を概説する以下のプロトコールに変更を加えることによって製造することができる。

【0296】

簡単に述べると、IgG分子のヒトFc部分は、下記の配列の5'および3'末端をまたぐプライマーを使って、PCR増幅することができる。これらのプライマーは、発現ベクター（好ましくは哺乳類発現ベクター）へのクローニングを容易にする便利な制限酵素部位

10

20

30

40

50

【 0 2 9 7 】

G G G A T C C G G A G C C C A A A T C T T C T G A C A A A A C T C A C A C A T G	10
C C C A C C G T G C C C A G C A C C T G A A T T C G A G G G T G C A C C G T C A	
G T C T T C C T C T T C C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A	
T C T C C C G G A C T C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T G G T G G A C G T	
A A G C C A C G A A G A C C C T G A G G T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G	
G A C G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G C G G G	
A G G A G C A G T A C A A C A G C A C G T A C C G T G T G G T C A G C G T C C T	
C A C C G T C C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A A G G A G T A C	
A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G C C C T C C C A A C C C C C A T C G	
A G A A A A C C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C A G C C C C G A G A A C C	
A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A T G A G C T G A C C	20
A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T	
A T C C A A G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A T G G G C A	
G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C G C C T C C C G T G C T G G A C	
T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T G G	
A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C	
C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G	
A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T A A A T G A G T G C G A C G G C C G C	
G A C T C T A G A G G A T (配列番号32)。	

【 0 2 9 8 】

本発明の抗体は様々な方法で製造することができる（「Current Protocols」第2章参照 30）。そのような方法の一例として、本発明のポリペプチドを発現させる細胞を動物に投与して、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導する。好ましい一方法では、タンパク質の調製物を調製し、それを精製して、天然の夾雑物を実質的に含まないようにする。次に、より比活性の高いポリクローナル抗血清を産生させるために、そのような調製物を動物に導入する。

【 0 2 9 9 】

最も好ましい方法では、本発明の抗体はモノクローナル抗体（またはそのタンパク質結合性断片）である。そのようなモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使って製造することができる（Koehlerら、Nature 256: 495 (1975); Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerlingら「Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas」(Elsevier、ニューヨーク、1981)の563～681頁)。一般に、このような手法では、ポリペプチドによる、より好ましくはポリペプチド発現細胞による、動物（好ましくはマウス）の免疫が行なわれる。そのような細胞は任意の適当な組織培養培地で培養してよいが、細胞は、10%ウシ胎仔血清（約56℃で不活化したもの）ならびに約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリンおよび約100μg/mlのストレプトマイシンを添加したアール変法イーグル培地で培養することが好ましい。

【 0 3 0 0 】

上記マウスの脾細胞を摘出し、適当な骨髓腫細胞株と融合する。本発明では任意の適切な骨髓腫細胞株を使用することができるが、ATCCから入手できる親骨髓腫細胞株（SP 50

2 O) を使用することが好ましい。融合後、得られたハイブリドーマ細胞をH A T培地中に選択的に維持し、次に、Wandsらが記載しているように(Gastroenterology 80: 225-232 (1981))、限界希釈法によってクローン化する。次に、そのような選択によって得られたハイブリドーマ細胞をアッセイして、本ポリペプチドを結合する能力を持つ抗体を分泌するクローンを同定する。

【0301】

別法として、本ポリペプチドに結合することができる抗体は、抗イディオタイプ抗体を用いる二段階法で製造することもできる。そのような方法では、抗体自体が抗原であり、それゆえに第二の抗体に結合する抗体を得ることができるという事実を利用する。この方法では、タンパク質特異抗体を使って、動物、好ましくはマウスを免疫する。次に、そのよう
10
な動物の脾細胞を使ってハイブリドーマ細胞を作製し、そのハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、上記タンパク質特異抗体に結合するというその能力を本ポリペプチドによって遮断することができる抗体を産生するクローンを同定する。そのような抗体は、上記タンパク質特異抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、動物を免疫してさらなるタンパク質特異抗体の形成を誘導するために使用することができる。

【0302】

本発明の抗体のF a bおよびF (a b ')₂断片ならびに他の断片を本明細書に開示する方法に従って使用できることは理解されるだろう。そのような断片は通例、パパイン(F a b断片を製造する場合)やペプシン(F (a b ')₂断片を製造する場合)などの酵素
20
を使って、タンパク質分解的開裂によって製造される。別法として、タンパク質結合性断片は、組換えDNA技術の応用によって、または合成化学によって製造することもできる。

【0303】

ヒトでの抗体の生体内使用には「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好ましいかもしれない。そのような抗体は、上述のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝子構築物を使って製造することができる。キメラ抗体の製造方法は当該技術分野では知られている(概観するには、Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oiら、BioTechniques 4: 214 (1986); Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、E P 1 7 1 4 9 6; Morrisonら、E P 1 7 3 4 9 4; Neubergerら、W O 8 6 0 1 5 3 3; Robinsonら、W O 8 7 0 2 6 7 1; Boulianneら、Nature 312: 643 (1984)
30
) ; Neubergerら、Nature 314: 268 (1985)を参照)。

【0304】

さらに、もう一つの好ましい方法として、本発明のポリペプチドに対する抗体を植物内で産生させてもよい。具体的方法は、米国特許第5,959,177号および第6,080,560号に開示されており、これらの特許は参照のためその全体が本明細書に引用される。これらの方法は、抗体を発現させる方法を記載しているだけでなく、外来の多量体型タンパク質(すなわち抗体など)を植物内で組み立てて、植物からそのような抗体を分泌させる手段も記載している。

【0305】

本発明は上記の具体的な態様によって範囲が限定されるものではなく、これらは本発明の
40
個々の側面の単なる例示的な説明に過ぎないものであって、機能的に等価な方法および成分は本発明の範囲に含まれる。実際、本明細書に示し記載したものに加えて本発明の種々の改変は、上記の記載および添付の図面から当業者には明らであろう。そのような改変は添付の特許請求の範囲に包含されることを意図している。

発明の背景、詳細な説明、および実施例に挙げた各文献(特許、特許出願、雑誌記事、抄録、実験マニュアル、書籍、または他の公表物を含む)の全内容は、参照のため本明細書中に引用される。さらに、本願と共に提出される配列表のハードコピー、および対応するコンピュータで読み取り可能な形態は、ともに参照のため本明細書中に引用される。

【図面の簡単な説明】

【0306】

【図 1 A】ヒト hVR1 d.1 の核酸配列である。推定の開始コドンは太字で示してあり、停止コドンは下線を付してある。

【図 1 B】ヒト hVR1 d.2 の核酸配列である。推定の開始コドンは太字で示してあり、停止コドンは下線を付してある。

【図 2 A】ヒト hVR1 d.1 のアミノ酸配列であり、6つの膜貫通ドメインは太字で示してあり、アンキリンドメインには下線を付してあり、孔ループ領域は囲んである。

【図 2 B】ヒト hVR1 d.2 のアミノ酸配列であり、6つの膜貫通ドメインは太字で示してあり、アンキリンドメインには下線を付してあり、孔ループ領域は囲んである。

【0307】

【図 3】報告されたバニロイドレセプター hVR1、hVR2、OTRPC4、および hECaC との hVR1 d.2 のアミノ酸配列のアラインメント (GCG パイルアッププログラムを使用)。

【図 4】hVR1 d の組織発現プロフィール。

【図 5】hVR1 d スプライス変異体である hVR1 d の組織発現プロフィール。

【図 6】hVR1 d スプライス変異体である hVR1 d.2 の脳のサブ領域での組織発現プロフィール。

【図 4】

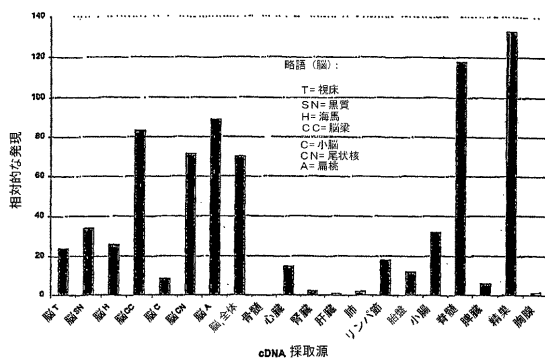


Fig. 4

【図 6】

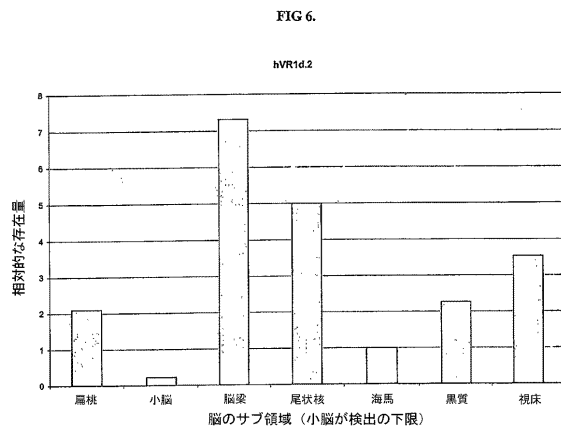


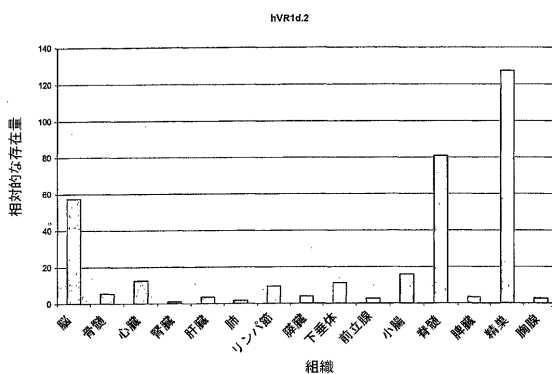
FIG 6.

hVR1d.2

脳のサブ領域 (小脳が検出下限)

【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
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/44210 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/705

(74) Agents: D'AMICO, Stephen et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/45336

(22) International Filing Date:
30 November 2001 (30.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/250,587 1 December 2000 (01.12.2000) US(71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
[US/US], P.O. Box 4000, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, 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, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NI, SD, TG).

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

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

(72) Inventors: GAUGHAN, Glen; 30 Mansfield Drive #1503, Northford, CT 06472 (US). FEDER, John; 277 Dutchtown Zion Road, Belle Mead, NJ 08502 (US). NELSON, Thomas; 12 Azzales Court, Lawrenceville, NJ 08648 (US). MINTIER, Gabe; 318 Morrison Ave., Hightstown, NJ 08520 (US). RAMANATHAN, Chandra; 41 Alison Avenue, Wallingford, CT 06492 (US).

(54) Title: NOVEL HUMAN NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES ENCODING A NOVEL HUMAN ION CHANNEL EXPRESSED IN SPINAL CORD AND BRAIN

(57) Abstract: The present invention relates to novel human nucleic acid molecules encoding novel human cation channels, and proteins and polypeptides encoded by such nucleic acid molecules. More specifically, the nucleic acid molecules of the invention include novel human genes, e.g., hVR1d.1 and hVR1d.2, that encode proteins or polypeptides that are expressed in spinal cord and brain tissues and display sequence homology and structural homology to the vanilloid and TRP (transient receptor potential) families of cation channel proteins. The proteins and polypeptides of the invention directed to this novel human cation channel may be therapeutically valuable targets for drug delivery in the treatment of human diseases that involve calcium, sodium, potassium or other ionic homeostatic dysfunction, such as central nervous system (CNS) disorders, e.g., degenerative neurological disorders such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, or other disorders such as chronic pain, anxiety and depression, stroke, cardiac disorders, e.g., arrhythmia, diabetes, hypercalcemia, hypocalcemia, hypercalciuria, hypocalciuria, or ion disorders associated with immunological disorders, gastro-intestinal (GI) tract disorders or renal or liver disease.

WO 02/44210 A2

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 **NOVEL HUMAN NUCLEIC ACID MOLECULES
AND POLYPEPTIDES ENCODING A NOVEL
HUMAN ION CHANNEL EXPRESSED IN
SPINAL CORD AND BRAIN**

10 This application claims benefit to provisional application U.S. Serial No.
60/250,587, filed December 1, 2000.

1. INTRODUCTION

15 The present invention relates to the isolation and identification of novel human
nucleic acid molecules and proteins and polypeptides encoded by such nucleic acid
molecules, or degenerate variants thereof, encoding novel human ion channels. More
specifically, the nucleic acid molecules of the invention relate to a novel human gene,
termed hVR1d, that encodes proteins or polypeptides that are expressed in spinal cord
and brain tissues and display sequence homology and structural homology to the
20 vanilloid and TRP (transient receptor potential) families of cation channel proteins.
The proteins and polypeptides of the invention directed to this novel human cation
channel may be therapeutically valuable targets for drug delivery in the treatment of
human diseases that involve calcium, sodium, potassium or other ionic homeostatic
dysfunction, such as central nervous system (CNS) disorders, e.g., degenerative
25 neurological disorders such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, or other
disorders such as chronic pain, anxiety and depression, stroke, cardiac disorders, e.g.,
arrhythmia, diabetes, hypercalcemia, hypocalcemia, hypercalciuria, hypocalciuria, or
ion disorders associated with immunological disorders, gastro-intestinal (GI) tract
disorders or renal or liver disease.

30

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

 Control of the internal ionic environment is an extremely important function of
all living cells. Ion exchange with the external medium is regulated by a variety of
means, the most important of which are various transporters and ion channels. Ion
35 channels comprise a very large and diverse family of proteins which play an important
role in cell homeostasis, hormone and neurotransmitter release, motility, neuronal
action potential generation and propagation and other vital intra- and inter-cellular

WO 02/44210

PCT/US01/45336

functions. Thus, these channels are important targets for the development of
5 therapeutic compounds in the treatment of disease. A number of proteins have been
described as forming ion channels, including the vanilloid and TRP protein families.
These proteins have been shown to function as cation channels of varying degrees of
selectivity and with different, and in some cases unknown, mechanisms for channel
gating. For example, the TRP family of ion channels comprises a group of proteins
10 some of which are believed to form store-operated calcium (Ca^{2+}) channels, i.e., ion
channels that operate to allow the influx of extracellular Ca^{2+} into cells when the
intracellular stores of calcium are depleted (Zhu et al., 1996, Cell 85: 661-671). It is
believed that TRP ion channels are expressed, in some form, in most, if not all, animal
tissues (Zhu et al., *supra* at 661). In addition, another protein, termed trp-like or trpl,
15 has been disclosed (Phillips et al., 1992, Neuron 8: 631-642; Gillo et al., 1996, PNAS
USA 93: 14146-14151) and it has been suggested that there may be a cooperative
interaction between TRP and TRPL proteins, perhaps these proteins contributing
channel subunits to form a multimeric Ca^{2+} channel (Gillo et al., *supra*).

The capsaicin receptor, also known as VR1 or vanilloid receptor subtype 1,
20 has been isolated from rats and characterized as a Ca^{2+} -permeable non-selective ion
channel that is structurally related to the TRP family of ion channels (Caterina et al.,
1997, Nature 389: 816-824). The rat VR1 cDNA contains an open reading frame of
2,514 nucleotides encoding a 838-amino acid protein. Hydrophilicity studies have
indicated that VR1 contains six transmembrane domains with a short hydrophobic
25 stretch between transmembrane regions 5 and 6 which may represent the ion
permeation path. In addition, VR1 is disclosed as containing three ankyrin repeat
domains at the N-terminal end of the protein (Caterina et al., *supra* at 820). It has
been noted that VR1 resembles the trp and trpl proteins in topological organization,
the presence of multiple N-terminal ankyrin repeats and in amino acid sequence
30 homology within and adjacent to the sixth transmembrane domain (Caterina et al.,
supra at 820-821). However, outside of these regions of homology, there is actually
very little sequence homology between VR1 and the TRP-related proteins. Moreover,
studies have indicated that VR1 is not a store-operated Ca^{2+} channel as are some of
the TRP proteins and the expression of this protein is restricted to sensory neurons
35 (Caterina et al., *supra* at 821 and Figure 6 at 820; Mezey, E. et al., 2000, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 97: 3655-3660).

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Human VR1 (also known in the art as "hVR1" or "OTRPC1") has been disclosed in PCT Patent Application WO 99/37675 and PCT Patent Application WO 00/29577, which disclose nucleotide and amino acid sequences for human VR1 as well as another subtype, human VR2 (also known in the art as "hVR2", "VANILREP2", "VRRP", "VLR" or "OTRPC2"). In addition, PCT Patent Application WO 99/37765 discloses nucleotide and amino acid sequences for VANILREP2 and polymorphic variants thereof. The VANILREP2 protein sequence set forth in PCT application WO 99/37765 appears to be essentially the same as hVR2 disclosed in PCT application WO 99/37675. See also PCT Application WO 99/46377, which corresponds to EP 953638 A1, PCT application WO 00/22121, and GB patent application 2346882 A, which also disclose the nucleotide and amino acid sequences for hVR2.

Additional members of the vanilloid family of cation channels have also been identified. For example, a homologue of VR1, termed SIC, was cloned from the rat kidney. This protein was identified as a stretch-inactivating channel (SIC), i.e., it is inactivated by membrane stretch, and as being expressed mainly in the kidney and liver. SIC was further described as sharing the same transmembrane and pore alignments with VR1 but having different electrophysiological properties (Suzuki et al., March 1999, J. Biol. Chem. 274 (No. 10): 6330-6335). Recent reports, however, indicate that SIC may be a chimera of VR1 and a newly-identified VR subtype, OTRPC4 (see, e.g., Strotmann et al., October 2000, Nature Cell Biology 2: 695-702 and Liedtke W. et al., 2000, Cell 103: 525-535). Moreover, it has been noted in the art that, despite structural homologies between members of the vanilloid family, respective proteins within the family may possess significant differences, e.g., in conductance or permeability to various ions (Suzuki et al., *supra* at 6335).

Another cation channel protein that has been identified as sharing a relatively low sequence homology (<30%) with the vanilloid family is ECaC (epithelial calcium channel). This protein was initially cloned from rabbit kidney cells and found to be expressed in the proximal small intestine, the kidney and the placenta of the rabbit. This protein was disclosed as resembling the VR1 and TRP family of receptors in predicted topological organization and the presence of multiple NH₂-terminal ankyrin repeats. In addition, amino acid sequence homologies between ECaC, VR1 and the TRP-related proteins were noted within and adjacent to the sixth transmembrane segment, including the predicted region for the ion permeation path (Hoenderop et al.,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

March 1999, J. Biol. Chem. 274 (No. 13): 8375-8378). However, it was also noted
5 that, despite these structural and sequence homologies, there is actually a low
sequence homology between these proteins outside of the sixth transmembrane
segment, "suggesting a distant evolutionary relationship among these channels."
(Hoenderop et al., supra at 8377).

More recently, the human homologue of ECaC, hECaC, has been identified
10 and disclosed as having a <30% sequence homology with other Ca^{2+} channels and as
being highly expressed in kidney, small intestine, and pancreas (see Muller, et al.,
2000, Genomics 67: 48-53).

Yet another Ca^{2+} transport protein, CaT1, has been identified from rat
duodenum, which protein is structurally related to the ECaC, VR1, and TRP ion
15 channels. However, CaT1 is not stimulated by capsaicin or calcium store depletion,
as would be expected with VR1 and the TRP receptors, respectively, thus suggesting
that CaT1 is not a subtype of the VR1 or TRP ion channels (Peng et al., August 1999,
J. Biol. Chem. 274 (No. 32): 22739-22746). More recently, a homologue of CaT1,
termed CaT2, has been identified in the rat (Peng et al., September 2000, J. Biol.
20 Chem. 275 (36): 28186-28194).

Finally, it should be noted that, while the proteins described above have clear
structural and sequence homologies (compare Zhu et al., supra, Fig. 6D at 668,
Caterina et al., supra, Fig. 5b at 819, and Hoenderop et al., Fig. 1B at 8376), they
nevertheless display varying patterns of tissue expression, electrophysiological
25 properties and functions (e.g., selective vs. non-selective), such that it is
acknowledged in the art that these molecules, while distantly related from an
evolutionary standpoint, are a diverse group of proteins with significantly different
and distinct properties and functions (Suzuki et al., supra at 6335; Hoenderop et al.,
supra at 8377; and Caterina et al., supra at 822). For a review of the various members
30 of this complex family of proteins, see Harteneck et al., 2000, Trends Neurosci. 23:
159-166.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to the isolation and identification of novel
35 nucleic acid molecules and proteins and polypeptides encoded by such nucleic acid
molecules, or degenerate variants thereof, that participate in the formation or function
of novel human ion channels. More specifically, the nucleic acid molecules of the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

invention are directed to a novel human gene, termed "hVR1d", that encodes proteins
 5 or polypeptides involved in the formation or function of a novel human cation
 channel. The novel hVR1d proteins of the invention display some sequence
 homology and structural homology to the TRP and vanilloid family of cation channels
 but represent distinct human channel proteins with distinct distribution patterns, e.g.,
 tissue expression. The hVR1d proteins of the invention are highly expressed in spinal
 10 cord and brain tissues.

According to one embodiment of the invention, a novel human hVR1d cDNA
 and the amino acid sequence of its derived expressed protein is disclosed. This cDNA
 has been isolated in two splice forms, hVR1d.1 and hVR1d.2, which differ in the
 absence (hVR1d.1) or presence (hVR1d.2) of a short nucleotide segment at the 3' end
 15 of the molecule. The encoded proteins corresponding to these hVR1d cDNAs show a
 modest level of homology to the human vanilloid receptor family of ion channels.

The compositions of this invention include nucleic acid molecules (also
 termed herein as "nucleic acids"), e.g., the hVR1d.1 and hVR1d.2 nucleic acid
 molecules, including recombinant DNA molecules, cloned genes or degenerate
 20 variants thereof, especially naturally occurring variants, that encode novel hVR1d.1
 and hVR1d.2 gene products, and antibodies directed against such gene products or
 conserved variants or fragments thereof.

In particular, the compositions of the present invention include nucleic acid
 molecules (also referred to herein as "hVR1d nucleic acid molecules or nucleic
 25 acids") that comprise the following sequences: (a) the nucleotide sequences of the
 human hVR1d.1 and hVR1d.2 splice variants as depicted in FIGS. 1A and 1B,
 respectively, as well as allelic variants and homologs thereof; (b) nucleotide
 sequences that encode the hVR1d.1 or hVR1d.2 gene product amino acid sequences
 as depicted in FIGS. 2A and 2B, respectively; (c) nucleotide sequences that encode
 30 portions of the hVR1d.1 or hVR1d.2 gene products corresponding to functional
 domains and individual exons; (d) nucleotide sequences comprising the novel
 hVR1d.1 or hVR1d.2 nucleic acid sequences disclosed herein, or portions thereof, that
 encode mutants of the corresponding gene product in which all or a part of one or
 more of the domains is deleted or altered; (e) nucleotide sequences that encode fusion
 35 proteins comprising the hVR1d.1 or hVR1d.2 gene product, or one or more of its
 domains, fused to a heterologous polypeptide; (f) nucleotide sequences within the
 hVR1d.1 or hVR1d.2 gene, as well as chromosome sequences flanking those genes,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

that can be utilized as part of the methods of the present invention for the diagnosis or
5 treatment of human disease; and (g) nucleotide sequences that hybridize to the above-
described sequences under highly or moderately stringent conditions. The nucleic
acids of the invention include, but are not limited to, cDNA and genomic DNA
molecules of the hVR1d.1 or hVR1d.2 genes.

The present invention also encompasses gene products of the nucleic acid
10 molecules listed above; i.e., proteins and/or polypeptides that are encoded by the
above-disclosed hVR1d nucleic acid molecules, e.g., the hVR1d.1 and hVR1d.2
nucleic acid molecules, and are expressed in recombinant host systems. In a preferred
embodiment, the hVR1 proteins of the invention include the proteins encoded by the
amino acid sequences of hVR1d.1 and hVR1d.2 as depicted in FIGS. 2A (SEQ ID
15 NO:2) and 2B (SEQ ID NO:4), respectively, or functionally equivalent fragments or
derivatives thereof. These proteins can be produced by recombinant means or by
chemical synthesis methods known in the art.

Antagonists and agonists of the hVR1d genes and/or gene products disclosed
herein are also included in the present invention. Such antagonists and agonists will
20 include, for example, small molecules, large molecules, and antibodies directed
against the hVR1d.1 or hVR1d.2 proteins and polypeptides of the invention.
Antagonists and agonists of the invention also include nucleotide sequences, such as
antisense and ribozyme molecules, and gene or regulatory sequence replacement
constructs, that can be used to inhibit or enhance expression of the disclosed hVR1d
25 nucleic acid molecules.

The present invention further encompasses cloning vectors, including
expression vectors, that contain the nucleic acid molecules of the invention and can be
used to express those nucleic acid molecules in host organisms. The present invention
also relates to host cells engineered to contain and/or express the nucleic acid
30 molecules of the invention. Further, host organisms that have been transformed with
these nucleic acid molecules are also encompassed in the present invention, e.g.,
transgenic animals, particularly transgenic non-human animals, and particularly
transgenic non-human mammals.

The present invention also relates to methods and compositions for the
35 diagnosis of human disease involving cation, e.g., Ca^{2+} , sodium or potassium channel,
dysfunction or lack of other ionic homeostasis including but not limited to CNS
disorders, e.g., degenerative neurological diseases such as Alzheimer's or Parkinson's

WO 02/44210

PCT/US01/45336

disease, or other disorders such as chronic pain, anxiety and depression, cardiac disorders, e.g., arrhythmia, or other disorders such as diabetes, hypercalcemia, hypercalciuria, or ion disorders associated with immunological disorders, GI tract disorders or renal or liver disease. Such methods comprise, for example, measuring expression of the hVR1d gene in a patient sample, or detecting a mutation in the gene in the genome of a mammal, including a human, suspected of exhibiting ion channel dysfunction. The nucleic acid molecules of the invention can also be used as diagnostic hybridization probes or as primers for diagnostic PCR analysis to identify hVR1d gene mutations, allelic variations, or regulatory defects, such as defects in the expression of the gene. Such diagnostic PCR analyses can be used to diagnose individuals with disorders associated with a particular hVR1d gene mutation, allelic variation, or regulatory defect. Such diagnostic PCR analyses can also be used to identify individuals susceptible to ion channel disorders.

Methods and compositions, including pharmaceutical compositions, for the treatment of ion channel disorders are also included in the invention. Such methods and compositions are capable of modulating the level of hVR1d, e.g., hVR1d1.1 or hVR1d.2, gene expression and/or the level of activity of the respective gene product or polypeptide. Such methods include, for example, modulating the expression of the hVR1d gene and/or the activity of the hVR1d gene product for the treatment of a disorder that is mediated by a defect in some other gene.

Such methods also include screening methods for the identification of compounds that modulate the expression of the nucleic acids and/or the activity of the polypeptides of the invention, e.g., assays that measure hVR1d mRNA and/or gene product levels, or assays that measure levels of hVR1d activity, such as the ability of the gene products to allow Ca^{2+} influx into cells.

For example, cellular and non-cellular assays are known that can be used to identify compounds that interact with the hVR1d gene and/or gene product, e.g., modulate the activity of the gene and/or bind to the gene product. Such cell-based assays of the invention utilize cells, cell lines, or engineered cells or cell lines that express the gene product.

In one embodiment, such methods comprise contacting a compound to a cell that expresses a hVR1d gene, measuring the level of gene expression, gene product expression, or gene product activity, and comparing this level to the level of the hVR1d gene expression, gene product expression, or gene product activity produced

WO 02/44210

PCT/US01/45336

by the cell in the absence of the compound, such that if the level obtained in the presence of the compound differs from that obtained in its absence, a compound that modulates the expression of the hVR1d gene and/or the synthesis or activity of the gene product has been identified.

In an alternative embodiment, such methods comprise administering a compound to a host organism, e.g., a transgenic animal that expresses a hVR1d transgene or a mutant hVR1d transgene, and measuring the level of hVR1d gene expression, gene product expression, or gene product activity. The measured level is compared to the level of hVR1d gene expression, gene product expression, or gene product activity in a host that is not exposed to the compound, such that if the level obtained when the host is exposed to the compound differs from that obtained when the host is not exposed to the compound, a compound that modulates the expression of the hVR1d gene and/or the synthesis or activity of hVR1d gene products has been identified.

The compounds identified by these methods include therapeutic compounds that can be used as pharmaceutical compositions to reduce or eliminate the symptoms of ion channel disorders such as CNS disorders, e.g., degenerative neurological diseases such as Alzheimer's or Parkinson's disease, or other disorders such as chronic pain, anxiety and depression, cardiac disorders, e.g., arrhythmia, or other disorders such as diabetes, hypercalcemia, hypercalciuria, or ion disorders associated with immunological disorders, GI tract disorders or renal or liver disease.

The present invention also relates to an isolated nucleic acid comprising a nucleic acid sequence that encodes a polypeptide having the amino acid sequence of FIG. 2A (SEQ ID NO:2) or FIG. 2B (SEQ ID NO:4), or the complement of the nucleic acid of said sequence(s).

The present invention also relates to an isolated nucleic acid comprising a nucleic acid sequence capable of hybridizing under stringent conditions to a nucleic acid molecule of FIG. 1A (SEQ ID NO:1) or FIG. 1B (SEQ ID NO:3) and encoding a hVR1d polypeptide having an activity of a naturally-occurring hVR1d protein.

The present invention also relates to an isolated nucleic acid comprising the nucleic acid sequence of FIG. 1A (SEQ ID NO:1).

The present invention also relates to an isolated nucleic acid comprising the nucleic acid sequence of FIG. 1B (SEQ ID NO:3).

WO 02/44210

PCT/US01/45336

The present invention also relates to an isolated nucleic acid of FIG 1A (SEQ ID NO:1) or FIG 1B (SEQ ID NO:3), wherein the nucleic acid is genomic or cDNA.

The present invention also relates to an isolated nucleic acid of FIG 1A (SEQ ID NO:1) or FIG 1B (SEQ ID NO:3), which is RNA.

The present invention also relates to an isolated nucleic acid of FIG 1A (SEQ ID NO:1) or FIG 1B (SEQ ID NO:3), further comprising a label.

The present invention also relates to an isolated nucleic acid wherein to any nucleic acid described herein that encodes an hVR1d protein or polypeptide is linked in frame to a nucleic acid sequence that encodes a heterologous protein or peptide.

The present invention also relates to a nucleic acid comprising a nucleic acid sequence encoding (a) a deletion mutant of hVR1d.1; (b) a deletion mutant of hVR1d.2; or (c) the complement of the nucleic acid sequences of (a) or (b).

The invention further relates to an isolated nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, and/or 3, wherein the nucleotide sequence comprises sequential nucleotide deletions from either the C-terminus or the N-terminus.

The invention further relates to an isolated polypeptide molecule of SEQ ID NO:2, and/or 4, wherein the polypeptide sequence comprises sequential amino acid deletions from either the C-terminus or the N-terminus.

The invention further relates to a nucleic acid comprising a nucleic acid sequence encoding (a) an addition mutant of hVR1d.1; (b) an addition mutant of hVR1d.2; or (c) the complement of the nucleotide sequences of (a) or (b).

The invention further relates to a nucleic acid comprising a nucleic acid sequence encoding (a) a substitution mutant of hVR1d.1; (b) a substitution mutant of hVR1d.2; or (c) the complement of the nucleic acid sequences of (a) or (b).

The invention further relates to a recombinant vector comprising a nucleic acid of the present invention.

The invention further relates to an expression vector comprising a nucleic acid of the present invention operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that controls expression of the nucleic acid in a host cell.

The invention further relates to an expression vector comprising a nucleic acid of the present invention operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that controls expression of the nucleic acid in a host cell.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 The invention further relates to a delivery complex comprising an expression vector described herein and a targeting means.

The invention further relates to a genetically engineered host cell containing a nucleic acid of the present invention

10 The invention further relates to an genetically engineered host cell containing a nucleic acid described herein operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that controls expression of the nucleic acid sequence in a host cell.

The invention further relates to an genetically engineered host cell containing a nucleic acid described herein operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that
15 controls expression of the nucleic acid sequence in a host cell.

The invention further relates to a method of making an hVR1d polypeptide comprising the steps of (a) culturing a host cell in an appropriate culture medium to produce an hVR1d polypeptide; and (b) isolating the hVR1d polypeptide.

20 The invention further relates to a method of making an hVR1d polypeptide comprising the steps of: (a) culturing a genetically engineered host cell containing a nucleic acid described herein operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that controls expression of the nucleic acid sequence in a host cell in an appropriate culture medium to produce an hVR1d polypeptide; and (b) isolating the hVR1d polypeptide.

25 The invention further relates to a method of making an hVR1d polypeptide, wherein the hVR1d polypeptide is hVR1d1.1 or hVR1d.2 or a functionally equivalent derivative thereof.

The invention further relates to a method of antibody preparation which is specifically reactive with an epitope of an hVR1d polypeptide.

30 The invention further relates to a method of making a transgenic animal comprising a nucleic acid of the present invention.

The invention further relates to a substantially pure polypeptide encoded by a nucleic acid of the present invention.

35 The invention further relates to a substantially pure polypeptide encoded by the nucleic acid sequence provided in the deposited clone.

The invention further relates to a substantially pure human hVR1d polypeptide as depicted in FIGS. 2A (SEQ ID NO: 2) or 2B (SEQ ID NO: 4).

WO 02/44210

PCT/US01/45336

The invention further relates to a substantially pure polypeptide which is at least 90% identical to the polypeptide as set forth in FIGS. 2A (SEQ ID NO: 2) or 2B (SEQ ID NO: 4).

The invention further relates to a fusion protein comprising a polypeptide of the present invention and a second heterologous polypeptide.

The invention further relates to a pharmaceutical preparation comprising a therapeutically effective amount of the polypeptide of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

The invention further relates to a test kit for detecting and/or quantitating a wild type or mutant hVR1d nucleic acid molecule in a sample, comprising the steps of contacting the sample with a nucleic acid of the present invention; and detecting and/or quantitating the label as an indication of the presence or absence and/or amount of a wild type or mutant hVR1d nucleic acid.

The invention further relates to a test kit for detecting and/or quantitating a wild type or mutant hVR1d polypeptide in a sample, comprising the steps of contacting the sample with an antibody of the present invention; and detecting and/or quantitating a polypeptide-antibody complex as an indication of the presence or absence and/or amount of a wild type or mutant hVR1d nucleic acid.

The invention further relates to a method for identifying compounds that modulate hVR1d activity comprising: (a) contacting a test compound to a cell that expresses a hVR1d gene; (b) measuring the level of hVR1d gene expression in the cell; and (c) comparing the level obtained in (b) with the hVR1d gene expression obtained in the absence of the compound; such that if the level obtained in (b) differs from that obtained in the absence of the compound, a compound that modulates hVR1d activity is identified.

The invention further relates to a method for identifying compounds that modulate hVR1d activity comprising: (a) contacting a test compound to a cell that contains a hVR1d polypeptide; (b) measuring the level of hVR1d polypeptide or activity in the cell; and (c) comparing the level obtained in (b) with the level of hVR1d polypeptide or activity obtained in the absence of the compound; such that if the level obtained in (b) differs from that obtained in the absence of the compound, a compound that modulates hVR1d activity is identified.

The invention further relates to a method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders, comprising: (a) contacting a test

WO 02/44210

PCT/US01/45336

compound with a cell which expresses a nucleic acid of the present invention and (b)
5 determining whether the test compound modulates hVR1d activity.

The invention further relates to a method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders comprising: (a) contacting a test compound with a nucleic acid of the present invention; and (b) determining whether the test compound interacts with the nucleic acid of the present invention.

10 The invention further relates to a method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders, comprising: (a) contacting a test compound with a cell or cell lysate containing a reporter gene operatively associated with a hVR1d regulatory element; and (b) detecting expression of the reporter gene product.

15 The invention further relates to a method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders comprising: (a) contacting a test compound with a cell or cell lysate containing hVR1d transcripts; and (b) detecting the translation of the hVR1d transcript.

The invention further relates to a method for modulating ion channel-related disorders in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a hVR1d polypeptide.

The invention further relates to a method for modulating ion channel-related disorders in a subject, wherein the hVR1d polypeptide is hVR1d.1 or hVR1d.2, or a functionally equivalent derivative thereof.

25 The invention further relates to a method for modulating ion channel-related disorders in a subject, wherein the hVR1d polypeptide is hVR1d.1 or hVR1d.2, or a functionally equivalent derivative thereof wherein the subject is a human.

The invention further relates to a method of gene therapy, comprising administering to a subject an effective amount of a delivery complex of the present
30 invention.

The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising modulating the activity of a hVR1d polypeptide.

The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising modulating the activity of a hVR1d polypeptide,
35 wherein the hVR1d polypeptide is hVR1d.1 or hVR1d.2, or a functionally equivalent derivative thereof.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising modulating the activity of a hVR1d polypeptide, wherein the hVR1d polypeptide is hVR1d.1 or hVR1d.2, or a functionally equivalent derivative thereof, wherein the method comprises administering an effective amount of a compound that agonizes or antagonizes the activity of the hVR1d polypeptide.

10 The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising administering an effective amount of a compound that decreases expression of a hVR1d gene.

The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising administering an effective amount of a compound that decreases expression of a hVR1d gene in which the compound is an oligonucleotide encoding an antisense or ribozyme molecule that targets hVR1d transcripts and inhibits translation.

15 The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising administering an effective amount of a compound that decreases expression of a hVR1d gene in which the compound is an oligonucleotide encoding an antisense or ribozyme molecule that targets hVR1d transcripts and inhibits translation, in which the compound is an oligonucleotide that forms a triple helix with the promoter of the hVR1d gene and inhibits transcription.

20 The invention further relates to a method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising administering an effective amount of a compound that increases expression of a hVR1d gene.

The invention further relates to a pharmaceutical formulation for the treatment of ion channel-related disorders, comprising a compound that activates or inhibits hVR1d activity, mixed with a pharmaceutically acceptable carrier.

25 The invention further relates to a method of identifying a compound that modulates the biological activity of hVR1d, comprising the steps of, (a) combining a candidate modulator compound with hVR1d having the sequence set forth in one or more of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4; and measuring an effect of the candidate modulator compound on the activity of hVR1d.

30 The invention further relates to a method of identifying a compound that modulates the biological activity of an ion channel, comprising the steps of, (a) combining a candidate modulator compound with a host cell expressing hVR1d having the sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4; and, (b) measuring an effect

WO 02/44210

PCT/US01/45336

of the candidate modulator compound on the activity of the expressed hVR1d.

5 The invention further relates to a method of identifying a compound that modulates the biological activity of hVR1d, comprising the steps of, (a) combining a candidate modulator compound with a host cell containing a vector described herein, wherein hVR1d is expressed by the cell; and, (b) measuring an effect of the candidate modulator compound on the activity of the expressed hVR1d.

10 The invention further relates to a method of screening for a compound that is capable of modulating the biological activity of hVR1d, comprising the steps of: (a) providing a host cell described herein; (b) determining the biological activity of hVR1d in the absence of a modulator compound; (c) contacting the cell with the modulator compound; and (d) determining the biological activity of hVR1d in the presence of the modulator compound; wherein a difference between the activity of hVR1d in the presence of the modulator compound and in the absence of the modulator compound indicates a modulating effect of the compound.

15 The invention further relates to a compound that modulates the biological activity of human hVR1d as identified by the methods described herein.

4. DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGS. 1A and 1B. Human hVR1d.1 and hVR1d.2 nucleic acid sequences, respectively. The putative start codon is bolded and the stop codon is underlined.

25 FIGS. 2A and 2B. Human hVR1d.1 and hVR1d.2 amino acid sequences, respectively, with the six transmembrane domains in boldface, the ankyrin domains underscored and the pore loop region boxed.

FIG. 3. Alignment of amino acid sequences for hVR1d.2 with the reported vanilloid receptors hVR1, hVR2, OTRPC4, and hECaC (using GCG pileup program).

FIG. 4. Tissue expression profile of hVR1d.

FIG. 5. Tissue expression profile of the hVR1d splice variant, hVR1d.

FIG. 6. Tissue expression profile of the hVR1d splice variant, hVR1d.2, in brain subregions.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

35 The present invention relates to the isolation and identification of novel nucleic acid molecules, as well as novel proteins and polypeptides, for the formation

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- or function of novel human ion channels. More specifically, the invention relates to a novel human gene, hVR1d, that includes two different splice variants, hVR1d.1 and hVR1d.2, that encode corresponding hVR1d.1 and hVR1d.2 proteins or biologically active derivatives or fragments thereof, involved in the formation or function of cation channels. All references to hVR1d shall also be construed to apply to hVR1d.1 and hVR1d.2 unless explicitly stated otherwise herein.
- The hVR1d nucleic acid molecules of the present invention include isolated naturally-occurring or recombinantly-produced human hVR1d.1 and hVR1d.2 nucleic acid molecules, e.g., DNA molecules, cloned genes or degenerate variants thereof. The compositions of the invention also include isolated, naturally-occurring or recombinantly-produced human hVR1d.1 and hVR1d.2 proteins or polypeptides.
- More specifically, disclosed herein are the DNA sequences of two splice variants of the hVR1d gene of the invention. These variants are referred to herein as hVR1d.1 and hVR1d.2 (see FIGS. 1A and 1B). The hVR1d.2 DNA sequence contains an additional 25 base pairs at the 3' end of the molecule as compared to the hVR1d.1 DNA sequence. The corresponding hVR1d.1 and hVR1d.2 proteins are identical in amino acid sequence until amino acid residue 715, at which point hVR1d.1 contains a six amino acid C terminal sequence that differs from the 31 amino acid C terminal sequence of the hVR1d.2 protein (see FIGS. 2A and 2B).
- The predicted molecular weight of the hVR1d.1 (Figure 2A) polypeptide was determined to be about 81.3kDa. The predicted molecular weight of the hVR1d.2 (Figure 2B) polypeptide was determined to be about 84.3kDa.
- Polynucleotides corresponding to the encoding region of the hVR1d.1 are from nucleotide 1 to nucleotide 2160 of SEQ ID NO:1 (Figure 2A). Polynucleotides corresponding to the encoding region of the hVR1d.2 are from nucleotide 1 to nucleotide 2235 of SEQ ID NO:1 (Figure 2B).
- In preferred embodiments, the present invention encompasses a polynucleotide lacking the initiating start codon, in addition to, the resulting encoded polypeptide of hVR1d.1. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide corresponding to nucleotides 4 thru 2160 of SEQ ID NO:1, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 thru 720 of SEQ ID NO:2. Also encompassed are recombinant vectors comprising said encoding sequence, and host cells comprising said vector.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

In preferred embodiments, the present invention encompasses a polynucleotide
 5 lacking the initiating start codon, in addition to, the resulting encoded polypeptide of
 hVR1d.2. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide
 corresponding to nucleotides 4 thru 2235 of SEQ ID NO:3, and the polypeptide
 corresponding to amino acids 2 thru 745 of SEQ ID NO:4. Also encompassed are
 10 recombinant vectors comprising said encoding sequence, and host cells comprising
 said vector.

The proteins corresponding to the hVR1d cDNAs of FIG. 1 show a modest
 level of homology to the human vanilloid receptor family of ion channels, e.g., an
 approximately 41-47% identity and 49-57% similarity to the reported VR1, VR2 and
 15 OTRPC4 proteins and an approximately 30-33% identity and 41-42% similarity to the
 reported EcaC and CaT1 and CaT2 proteins.

The hVR1d DNA sequences and encoded proteins of this invention also differ
 from the reported vanilloid family of ion channels in their patterns of tissue
 expression. For example, the hVR1d proteins of the invention are highly expressed in
 20 the spinal cord and brain tissues, such as the corpus callosum (CC), caudate nucleus
 (CN), and amygdala (A) of the brain (see FIG. 4).

The hVR1d proteins of the invention are predicted to contain six
 transmembrane domains as well as multiple consensus ankyrin domains (in the case of
 hVR1d, three ankyrin domains) in the N-terminal section of the protein, characteristic
 25 structural features of the TRP-vanilloid family of channels (see FIGS. 2A and 2B).

Specifically, the hVR1d.1 polypeptide was predicted to comprise six transmembrane
 domains (TM1 to TM6) located from about amino acid 395 to about amino acid 415
 (TM1; SEQ ID NO:9); from about amino acid 439 to about amino acid 463 (TM2; SEQ
 ID NO:10); from about amino acid 479 to about amino acid 499 (TM3; SEQ ID NO:11);
 30 from about amino acid 502 to about amino acid 520 (TM4; SEQ ID NO:12); from about
 amino acid 545 to about amino acid 564 (TM5; SEQ ID NO:13); and/or from about
 amino acid 607 to about amino acid 625 (TM6; SEQ ID NO:14) of SEQ ID NO:2 (Figure
 2A). In this context, the term "about" may be construed to mean 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
 35 or 10 amino acids beyond the N-Terminus and/or C-terminus of the above referenced
 transmembrane domain polypeptides.

In preferred embodiments, the following transmembrane domain polypeptides are
 encompassed by the present invention: MFFLSFCFYHFNITLTVSY (SEQ ID NO:9),

WO 02/44210

PCT/US01/45336

LLGRMFVLIWAMCISVKEGIAIFLL (SEQ ID NO:10), FVFFIQA VLVLSVFLYLFAY
 5 (SEQ ID NO:11), YLACLVLAMALGWANMLYY (SEQ ID NO:12),
 FLFVYIAFLLGFGVALASLI (SEQ ID NO:13), and/or ILFLLLITYVILTFVLLL (SEQ
 ID NO:14). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided. The present
 invention also encompasses the use of these hVR1d.1 transmembrane domain
 polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

10 The present invention also encompasses the polypeptide sequences that intervene
 between each of the predicted hVR1d.1 transmembrane domains. Since these regions are
 solvent accessible either hVR1d.1 or intracellularly, they are particularly useful for
 designing antibodies specific to each region. Such antibodies may be useful as
 15 antagonists or agonists of the hVR1d.1 full-length polypeptide and may modulate its
 activity.

In preferred embodiments, the following inter-transmembrane domain
 polypeptides are encompassed by the present invention:
 YRPREEEAIPHPLALTHKMGWLQ (SEQ ID NO:15), RPSDLQSILSDAWFH (SEQ
 20 ID NO:16), TRGFQSMGMYSVMQKVLHDVLKFLFVYIAFLLGFGVAL (SEQ ID
 NO:17), and/or EKCPKDNKDCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLDLNIQQNSKYP (SEQ
 ID NO:18). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided. The present
 invention also encompasses the use of these hVR1d.1 intertransmembrane domain
 25 polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

Specifically, the hVR1d.2 polypeptide was also predicted to comprise six
 transmembrane domains (TM1 to TM6) located from about amino acid 395 to about
 amino acid 415 (TM1; SEQ ID NO:9); from about amino acid 439 to about amino acid
 463 (TM2; SEQ ID NO:10); from about amino acid 479 to about amino acid 499 (TM3;
 30 SEQ ID NO:11); from about amino acid 502 to about amino acid 520 (TM4; SEQ ID
 NO:12); from about amino acid 545 to about amino acid 564 (TM5; SEQ ID NO:13);
 and/or from about amino acid 607 to about amino acid 625 (TM6; SEQ ID NO:14) of
 SEQ ID NO:4 (Figure 2B). In this context, the term "about" may be construed to mean
 35 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 amino acids beyond the N-Terminus and/or C-terminus of
 the above referenced transmembrane domain polypeptides.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 The present invention encompasses the use of the polypeptide corresponding to the ankyrin domain and the pore loop region delineated in Figures 2A and 2B as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

Using known methods of protein engineering and recombinant DNA technology, variants may be generated to improve or alter the characteristics of the polypeptides of the present invention. For instance, one or more amino acids can be deleted from the N-terminus or C-terminus of the protein without substantial loss of biological function. The authors of Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), reported variant KGF proteins having heparin binding activity even after deleting 3, 8, or 27 amino-terminal amino acid residues. Similarly, Interferon gamma exhibited up to ten times higher activity after deleting 8-10 amino acid residues from the carboxy terminus of this protein (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988)).

Moreover, ample evidence demonstrates that variants often retain a biological activity similar to that of the naturally occurring protein. For example, Gayle and coworkers (J. Biol. Chem 268:22105-22111 (1993)) conducted extensive mutational analysis of human cytokine IL-1a. They used random mutagenesis to generate over 3,500 individual IL-1a mutants that averaged 2.5 amino acid changes per variant over the entire length of the molecule. Multiple mutations were examined at every possible amino acid position. The investigators found that "[m]ost of the molecule could be altered with little effect on either [binding or biological activity]." In fact, only 23 unique amino acid sequences, out of more than 3,500 nucleotide sequences examined, produced a protein that significantly differed in activity from wild-type. Furthermore, even if deleting one or more amino acids from the N-terminus or C-terminus of a polypeptide results in modification or loss of one or more biological functions, other biological activities may still be retained. For example, the ability of a deletion variant to induce and/or to bind antibodies which recognize the protein will likely be retained when less than the majority of the residues of the protein are removed from the N-terminus or C-terminus. Whether a particular polypeptide lacking N- or C-terminal residues of a protein retains such immunogenic activities can readily be determined by routine methods described herein and otherwise known in the art.

Alternatively, such N-terminus or C-terminus deletions of a polypeptide of the present invention may, in fact, result in a significant increase in one or more of the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

biological activities of the polypeptide(s). For example, biological activity of many polypeptides are governed by the presence of regulatory domains at either one or both termini. Such regulatory domains effectively inhibit the biological activity of such polypeptides in lieu of an activation event (e.g., binding to a cognate ligand or receptor, phosphorylation, proteolytic processing, etc.). Thus, by eliminating the regulatory domain of a polypeptide, the polypeptide may effectively be rendered biologically active in the absence of an activation event.

In preferred embodiments, the following N-terminal hVR1d.1 deletion polypeptides are encompassed by the present invention: M1-R720, S2-R720, F3-R720, I4-R720, C5-R720, R6-R720, P7-R720, R8-R720, G9-R720, G10-R720, G11-R720, R12-R720, L13-R720, E14-R720, T15-R720, D16-R720, S17-R720, R18-R720, V19-R720, A20-R720, A21-R720, G22-R720, G23-R720, W24-R720, T25-R720, A26-R720, G27-R720, S28-R720, H29-R720, T30-R720, V31-R720, G32-R720, K33-R720, E34-R720, Q35-R720, K36-R720, A37-R720, S38-R720, D39-R720, T40-R720, S41-R720, P42-R720, M43-R720, G44-R720, H45-R720, R46-R720, E47-R720, Q48-R720, G49-R720, A50-R720, S51-R720, I52-R720, G53-R720, D54-R720, G55-R720, G56-R720, E57-R720, T58-R720, A59-R720, G60-R720, E61-R720, G62-R720, G63-R720, E64-R720, R65-R720, P66-R720, S67-R720, V68-R720, R69-R720, S70-R720, G71-R720, S72-R720, G73-R720, D74-R720, V75-R720, E76-R720, Q77-R720, G78-R720, L79-R720, G80-R720, V81-R720, C82-R720, G83-R720, C84-R720, S85-R720, N86-R720, H87-R720, T88-R720, L89-R720, W90-R720, A91-R720, G92-R720, R93-R720, A94-R720, K95-R720, G96-R720, S97-R720, R98-R720, G99-R720, P100-R720, P101-R720, V102-R720, T103-R720, P104-R720, P105-R720, M106-R720, A107-R720, L108-R720, P109-R720, A110-R720, D111-R720, F112-R720, L113-R720, M114-R720, H115-R720, K116-R720, L117-R720, T118-R720, A119-R720, S120-R720, D121-R720, T122-R720, G123-R720, K124-R720, T125-R720, C126-R720, L127-R720, M128-R720, K129-R720, A130-R720, L131-R720, L132-R720, N133-R720, I134-R720, N135-R720, P136-R720, N137-R720, T138-R720, K139-R720, E140-R720, I141-R720, V142-R720, R143-R720, I144-R720, L145-R720, L146-R720, A147-R720, F148-R720, A149-R720, E150-R720, E151-R720, N152-R720, D153-R720, I154-R720, L155-R720, G156-R720, R157-R720, F158-R720, I159-R720, N160-R720, A161-R720, E162-R720, Y163-R720, T164-R720, E165-R720, E166-R720, A167-R720, Y168-R720, E169-R720, G170-R720, Q171-R720, T172-R720, A173-R720,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

L174-R720, N175-R720, I176-R720, A177-R720, I178-R720, E179-R720, R180-
5 R720, R181-R720, Q182-R720, G183-R720, D184-R720, I185-R720, A186-R720,
A187-R720, L188-R720, L189-R720, I190-R720, A191-R720, A192-R720, G193-
R720, A194-R720, D195-R720, V196-R720, N197-R720, A198-R720, H199-R720,
A200-R720, K201-R720, G202-R720, A203-R720, F204-R720, F205-R720, N206-
R720, P207-R720, K208-R720, Y209-R720, Q210-R720, H211-R720, E212-R720,
10 G213-R720, F214-R720, Y215-R720, F216-R720, G217-R720, E218-R720, T219-
R720, P220-R720, L221-R720, A222-R720, L223-R720, A224-R720, A225-R720,
C226-R720, T227-R720, N228-R720, Q229-R720, P230-R720, E231-R720, I232-
R720, V233-R720, Q234-R720, L235-R720, L236-R720, M237-R720, E238-R720,
H239-R720, E240-R720, Q241-R720, T242-R720, D243-R720, I244-R720, T245-
15 R720, S246-R720, R247-R720, D248-R720, S249-R720, R250-R720, G251-R720,
N252-R720, N253-R720, I254-R720, L255-R720, H256-R720, A257-R720, L258-
R720, V259-R720, T260-R720, V261-R720, A262-R720, E263-R720, D264-R720,
F265-R720, K266-R720, T267-R720, Q268-R720, N269-R720, D270-R720, F271-
R720, V272-R720, K273-R720, R274-R720, M275-R720, Y276-R720, D277-R720,
20 M278-R720, I279-R720, L280-R720, L281-R720, R282-R720, S283-R720, G284-
R720, N285-R720, W286-R720, E287-R720, L288-R720, E289-R720, T290-R720,
T291-R720, R292-R720, N293-R720, N294-R720, D295-R720, G296-R720, L297-
R720, T298-R720, P299-R720, L300-R720, Q301-R720, L302-R720, A303-R720,
A304-R720, K305-R720, M306-R720, G307-R720, K308-R720, A309-R720, E310-
25 R720, I311-R720, L312-R720, K313-R720, Y314-R720, I315-R720, L316-R720,
S317-R720, R318-R720, E319-R720, I320-R720, K321-R720, E322-R720, K323-
R720, R324-R720, L325-R720, R326-R720, S327-R720, L328-R720, S329-R720,
R330-R720, K331-R720, F332-R720, T333-R720, D334-R720, W335-R720, A336-
R720, Y337-R720, G338-R720, P339-R720, V340-R720, S341-R720, S342-R720,
30 S343-R720, L344-R720, Y345-R720, D346-R720, L347-R720, T348-R720, N349-
R720, V350-R720, D351-R720, T352-R720, T353-R720, T354-R720, D355-R720,
N356-R720, S357-R720, V358-R720, L359-R720, E360-R720, I361-R720, T362-
R720, V363-R720, Y364-R720, N365-R720, T366-R720, N367-R720, I368-R720,
D369-R720, N370-R720, R371-R720, H372-R720, E373-R720, M374-R720, L375-
35 R720, T376-R720, L377-R720, E378-R720, P379-R720, L380-R720, H381-R720,
T382-R720, L383-R720, L384-R720, H385-R720, M386-R720, K387-R720, W388-
R720, K389-R720, K390-R720, F391-R720, A392-R720, K393-R720, H394-R720,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

M395-R720, F396-R720, F397-R720, L398-R720, S399-R720, F400-R720, C401-R720, F402-R720, Y403-R720, F404-R720, F405-R720, Y406-R720, N407-R720, I408-R720, T409-R720, L410-R720, T411-R720, L412-R720, V413-R720, S414-R720, Y415-R720, Y416-R720, R417-R720, P418-R720, R419-R720, E420-R720, E421-R720, E422-R720, A423-R720, I424-R720, P425-R720, H426-R720, P427-R720, L428-R720, A429-R720, L430-R720, T431-R720, H432-R720, K433-R720, 10 M434-R720, G435-R720, W436-R720, L437-R720, Q438-R720, L439-R720, L440-R720, G441-R720, R442-R720, M443-R720, F444-R720, V445-R720, L446-R720, I447-R720, W448-R720, A449-R720, M450-R720, C451-R720, I452-R720, S453-R720, V454-R720, K455-R720, E456-R720, G457-R720, I458-R720, A459-R720, I460-R720, F461-R720, L462-R720, L463-R720, R464-R720, P465-R720, S466-R720, D467-R720, L468-R720, Q469-R720, S470-R720, I471-R720, L472-R720, 15 S473-R720, D474-R720, A475-R720, W476-R720, F477-R720, H478-R720, F479-R720, V480-R720, F481-R720, F482-R720, I483-R720, Q484-R720, A485-R720, V486-R720, L487-R720, V488-R720, I489-R720, L490-R720, S491-R720, V492-R720, F493-R720, L494-R720, Y495-R720, L496-R720, F497-R720, A498-R720, 20 Y499-R720, K500-R720, E501-R720, Y502-R720, L503-R720, A504-R720, C505-R720, L506-R720, V507-R720, L508-R720, A509-R720, M510-R720, A511-R720, L512-R720, G513-R720, W514-R720, A515-R720, N516-R720, M517-R720, L518-R720, Y519-R720, Y520-R720, T521-R720, R522-R720, G523-R720, F524-R720, Q525-R720, S526-R720, M527-R720, G528-R720, M529-R720, Y530-R720, S531-R720, V532-R720, M533-R720, I534-R720, Q535-R720, K536-R720, V537-R720, 25 I538-R720, L539-R720, H540-R720, D541-R720, V542-R720, L543-R720, K544-R720, F545-R720, L546-R720, F547-R720, V548-R720, Y549-R720, I550-R720, A551-R720, F552-R720, L553-R720, L554-R720, G555-R720, F556-R720, G557-R720, V558-R720, A559-R720, L560-R720, A561-R720, S562-R720, L563-R720, 30 I564-R720, E565-R720, K566-R720, C567-R720, P568-R720, K569-R720, D570-R720, N571-R720, K572-R720, D573-R720, C574-R720, S575-R720, S576-R720, Y577-R720, G578-R720, S579-R720, F580-R720, S581-R720, D582-R720, A583-R720, V584-R720, L585-R720, E586-R720, L587-R720, F588-R720, K589-R720, L590-R720, T591-R720, I592-R720, G593-R720, L594-R720, G595-R720, D596-R720, L597-R720, N598-R720, I599-R720, Q600-R720, Q601-R720, N602-R720, 35 S603-R720, K604-R720, Y605-R720, P606-R720, I607-R720, L608-R720, F609-R720, L610-R720, F611-R720, L612-R720, L613-R720, I614-R720, T615-R720,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Y616-R720, V617-R720, I618-R720, L619-R720, T620-R720, F621-R720, V622-
 5 R720, L623-R720, L624-R720, L625-R720, N626-R720, M627-R720, L628-R720,
 I629-R720, A630-R720, L631-R720, M632-R720, G633-R720, E634-R720, T635-
 R720, V636-R720, E637-R720, N638-R720, V639-R720, S640-R720, K641-R720,
 E642-R720, S643-R720, E644-R720, R645-R720, I646-R720, W647-R720, R648-
 R720, L649-R720, Q650-R720, R651-R720, A652-R720, R653-R720, T654-R720,
 10 I655-R720, L656-R720, E657-R720, F658-R720, E659-R720, K660-R720, M661-
 R720, L662-R720, P663-R720, E664-R720, W665-R720, L666-R720, R667-R720,
 S668-R720, R669-R720, F670-R720, R671-R720, M672-R720, G673-R720, E674-
 R720, L675-R720, C676-R720, K677-R720, V678-R720, A679-R720, E680-R720,
 D681-R720, D682-R720, F683-R720, R684-R720, L685-R720, C686-R720, L687-
 15 R720, R688-R720, I689-R720, N690-R720, E691-R720, V692-R720, K693-R720,
 W694-R720, T695-R720, E696-R720, W697-R720, K698-R720, T699-R720, H700-
 R720, V701-R720, S702-R720, F703-R720, L704-R720, N705-R720, E706-R720,
 D707-R720, P708-R720, G709-R720, P710-R720, V711-R720, R712-R720, R713-
 R720, and/or T714-R720 of SEQ ID NO:2. Polynucleotide sequences encoding these
 20 polypeptides are also provided. The present invention also encompasses the use of
 these N-terminal hVR1d.1 deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic
 epitopes as described elsewhere herein.

In preferred embodiments, the following C-terminal hVR1d.1 deletion
 polypeptides are encompassed by the present invention: M1-R720, M1-V719, M1-
 25 A718, M1-V717, M1-T716, M1-G715, M1-T714, M1-R713, M1-R712, M1-V711,
 M1-P710, M1-G709, M1-P708, M1-D707, M1-E706, M1-N705, M1-L704, M1-F703,
 M1-S702, M1-V701, M1-H700, M1-T699, M1-K698, M1-W697, M1-E696, M1-
 T695, M1-W694, M1-K693, M1-V692, M1-E691, M1-N690, M1-I689, M1-R688,
 M1-L687, M1-C686, M1-L685, M1-R684, M1-F683, M1-D682, M1-D681, M1-
 30 E680, M1-A679, M1-V678, M1-K677, M1-C676, M1-L675, M1-E674, M1-G673,
 M1-M672, M1-R671, M1-F670, M1-R669, M1-S668, M1-R667, M1-L666, M1-
 W665, M1-E664, M1-P663, M1-L662, M1-M661, M1-K660, M1-E659, M1-F658,
 M1-E657, M1-L656, M1-I655, M1-T654, M1-R653, M1-A652, M1-R651, M1-Q650,
 M1-L649, M1-R648, M1-W647, M1-I646, M1-R645, M1-E644, M1-S643, M1-E642,
 35 M1-K641, M1-S640, M1-V639, M1-N638, M1-E637, M1-V636, M1-T635, M1-
 E634, M1-G633, M1-M632, M1-L631, M1-A630, M1-I629, M1-L628, M1-M627,
 M1-N626, M1-L625, M1-L624, M1-L623, M1-V622, M1-F621, M1-T620, M1-L619,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- M1-I618, M1-V617, M1-Y616, M1-T615, M1-I614, M1-L613, M1-L612, M1-F611,
5 M1-L610, M1-F609, M1-L608, M1-I607, M1-P606, M1-Y605, M1-K604, M1-S603,
M1-N602, M1-Q601, M1-Q600, M1-I599, M1-N598, M1-L597, M1-D596, M1-
G595, M1-L594, M1-G593, M1-I592, M1-T591, M1-L590, M1-K589, M1-F588, M1-
L587, M1-E586, M1-L585, M1-V584, M1-A583, M1-D582, M1-S581, M1-F580,
M1-S579, M1-G578, M1-Y577, M1-S576, M1-S575, M1-C574, M1-D573, M1-
10 K572, M1-N571, M1-D570, M1-K569, M1-P568, M1-C567, M1-K566, M1-E565,
M1-I564, M1-L563, M1-S562, M1-A561, M1-L560, M1-A559, M1-V558, M1-G557,
M1-F556, M1-G555, M1-L554, M1-L553, M1-F552, M1-A551, M1-I550, M1-Y549,
M1-V548, M1-F547, M1-L546, M1-F545, M1-K544, M1-L543, M1-V542, M1-
D541, M1-H540, M1-L539, M1-I538, M1-V537, M1-K536, M1-Q535, M1-I534, M1-
15 M533, M1-V532, M1-S531, M1-Y530, M1-M529, M1-G528, M1-M527, M1-S526,
M1-Q525, M1-F524, M1-G523, M1-R522, M1-T521, M1-Y520, M1-Y519, M1-
L518, M1-M517, M1-N516, M1-A515, M1-W514, M1-G513, M1-L512, M1-A511,
M1-M510, M1-A509, M1-L508, M1-V507, M1-L506, M1-C505, M1-A504, M1-
L503, M1-Y502, M1-E501, M1-K500, M1-Y499, M1-A498, M1-F497, M1-L496,
20 M1-Y495, M1-L494, M1-F493, M1-V492, M1-S491, M1-L490, M1-I489, M1-V488,
M1-L487, M1-V486, M1-A485, M1-Q484, M1-I483, M1-F482, M1-F481, M1-V480,
M1-F479, M1-H478, M1-F477, M1-W476, M1-A475, M1-D474, M1-S473, M1-
L472, M1-I471, M1-S470, M1-Q469, M1-L468, M1-D467, M1-S466, M1-P465, M1-
R464, M1-L463, M1-L462, M1-F461, M1-I460, M1-A459, M1-I458, M1-G457, M1-
25 E456, M1-K455, M1-V454, M1-S453, M1-I452, M1-C451, M1-M450, M1-A449,
M1-W448, M1-I447, M1-L446, M1-V445, M1-F444, M1-M443, M1-R442, M1-
G441, M1-L440, M1-L439, M1-Q438, M1-L437, M1-W436, M1-G435, M1-M434,
M1-K433, M1-H432, M1-T431, M1-L430, M1-A429, M1-L428, M1-P427, M1-
H426, M1-P425, M1-I424, M1-A423, M1-E422, M1-E421, M1-E420, M1-R419, M1-
30 P418, M1-R417, M1-Y416, M1-Y415, M1-S414, M1-V413, M1-L412, M1-T411,
M1-L410, M1-T409, M1-I408, M1-N407, M1-Y406, M1-F405, M1-F404, M1-Y403,
M1-F402, M1-C401, M1-F400, M1-S399, M1-L398, M1-F397, M1-F396, M1-M395,
M1-H394, M1-K393, M1-A392, M1-F391, M1-K390, M1-K389, M1-W388, M1-
K387, M1-M386, M1-H385, M1-L384, M1-L383, M1-T382, M1-H381, M1-L380,
35 M1-P379, M1-E378, M1-L377, M1-T376, M1-L375, M1-M374, M1-E373, M1-
H372, M1-R371, M1-N370, M1-D369, M1-I368, M1-N367, M1-T366, M1-N365,
M1-Y364, M1-V363, M1-T362, M1-I361, M1-E360, M1-L359, M1-V358, M1-S357,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- M1-N356, M1-D355, M1-T354, M1-T353, M1-T352, M1-D351, M1-V350, M1-
 5 N349, M1-T348, M1-L347, M1-D346, M1-Y345, M1-L344, M1-S343, M1-S342,
 M1-S341, M1-V340, M1-P339, M1-G338, M1-Y337, M1-A336, M1-W335, M1-
 D334, M1-T333, M1-F332, M1-K331, M1-R330, M1-S329, M1-L328, M1-S327,
 M1-R326, M1-L325, M1-R324, M1-K323, M1-E322, M1-K321, M1-I320, M1-E319,
 M1-R318, M1-S317, M1-L316, M1-I315, M1-Y314, M1-K313, M1-L312, M1-I311,
 10 M1-E310, M1-A309, M1-K308, M1-G307, M1-M306, M1-K305, M1-A304, M1-
 A303, M1-L302, M1-Q301, M1-L300, M1-P299, M1-T298, M1-L297, M1-G296,
 M1-D295, M1-N294, M1-N293, M1-R292, M1-T291, M1-T290, M1-E289, M1-
 L288, M1-E287, M1-W286, M1-N285, M1-G284, M1-S283, M1-R282, M1-L281,
 M1-L280, M1-I279, M1-M278, M1-D277, M1-Y276, M1-M275, M1-R274, M1-
 15 K273, M1-V272, M1-F271, M1-D270, M1-N269, M1-Q268, M1-T267, M1-K266,
 M1-F265, M1-D264, M1-E263, M1-A262, M1-V261, M1-T260, M1-V259, M1-
 L258, M1-A257, M1-H256, M1-L255, M1-I254, M1-N253, M1-N252, M1-G251,
 M1-R250, M1-S249, M1-D248, M1-R247, M1-S246, M1-T245, M1-I244, M1-D243,
 M1-T242, M1-Q241, M1-E240, M1-H239, M1-E238, M1-M237, M1-L236, M1-
 20 L235, M1-Q234, M1-V233, M1-I232, M1-E231, M1-P230, M1-Q229, M1-N228,
 M1-T227, M1-C226, M1-A225, M1-A224, M1-L223, M1-A222, M1-L221, M1-
 P220, M1-T219, M1-E218, M1-G217, M1-F216, M1-Y215, M1-F214, M1-G213,
 M1-E212, M1-H211, M1-Q210, M1-Y209, M1-K208, M1-P207, M1-N206, M1-
 F205, M1-F204, M1-A203, M1-G202, M1-K201, M1-A200, M1-H199, M1-A198,
 25 M1-N197, M1-V196, M1-D195, M1-A194, M1-G193, M1-A192, M1-A191, M1-
 I190, M1-L189, M1-L188, M1-A187, M1-A186, M1-I185, M1-D184, M1-G183, M1-
 Q182, M1-R181, M1-R180, M1-E179, M1-I178, M1-A177, M1-I176, M1-N175, M1-
 L174, M1-A173, M1-T172, M1-Q171, M1-G170, M1-E169, M1-Y168, M1-A167,
 M1-E166, M1-E165, M1-T164, M1-Y163, M1-E162, M1-A161, M1-N160, M1-I159,
 30 M1-F158, M1-R157, M1-G156, M1-L155, M1-I154, M1-D153, M1-N152, M1-E151,
 M1-E150, M1-A149, M1-F148, M1-A147, M1-L146, M1-L145, M1-I144, M1-R143,
 M1-V142, M1-I141, M1-E140, M1-K139, M1-T138, M1-N137, M1-P136, M1-N135,
 M1-I134, M1-N133, M1-L132, M1-L131, M1-A130, M1-K129, M1-M128, M1-
 L127, M1-C126, M1-T125, M1-K124, M1-G123, M1-T122, M1-D121, M1-S120,
 35 M1-A119, M1-T118, M1-L117, M1-K116, M1-H115, M1-M114, M1-L113, M1-
 F112, M1-D111, M1-A110, M1-P109, M1-L108, M1-A107, M1-M106, M1-P105,
 M1-P104, M1-T103, M1-V102, M1-P101, M1-P100, M1-G99, M1-R98, M1-S97,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

M1-G96, M1-K95, M1-A94, M1-R93, M1-G92, M1-A91, M1-W90, M1-L89, M1-
 5 T88, M1-H87, M1-N86, M1-S85, M1-C84, M1-G83, M1-C82, M1-V81, M1-G80,
 M1-L79, M1-G78, M1-Q77, M1-E76, M1-V75, M1-D74, M1-G73, M1-S72, M1-
 G71, M1-S70, M1-R69, M1-V68, M1-S67, M1-P66, M1-R65, M1-E64, M1-G63,
 M1-G62, M1-E61, M1-G60, M1-A59, M1-T58, M1-E57, M1-G56, M1-G55, M1-
 D54, M1-G53, M1-I52, M1-S51, M1-A50, M1-G49, M1-Q48, M1-E47, M1-R46,
 10 M1-H45, M1-G44, M1-M43, M1-P42, M1-S41, M1-T40, M1-D39, M1-S38, M1-
 A37, M1-K36, M1-Q35, M1-E34, M1-K33, M1-G32, M1-V31, M1-T30, M1-H29,
 M1-S28, M1-G27, M1-A26, M1-T25, M1-W24, M1-G23, M1-G22, M1-A21, M1-
 A20, M1-V19, M1-R18, M1-S17, M1-D16, M1-T15, M1-E14, M1-L13, M1-R12,
 M1-G11, M1-G10, M1-G9, M1-R8, and/or M1-P7 of SEQ ID NO:2. Polynucleotide
 15 sequences encoding these polypeptides are also provided. The present invention also
 encompasses the use of these C-terminal hVR1d.1 deletion polypeptides as
 immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

In preferred embodiments, the following N-terminal hVR1d.2 deletion
 polypeptides are encompassed by the present invention: M1-V745, S2-V745, F3-
 20 V745, I4-V745, C5-V745, R6-V745, P7-V745, R8-V745, G9-V745, G10-V745, G11-
 V745, R12-V745, L13-V745, E14-V745, T15-V745, D16-V745, S17-V745, R18-
 V745, V19-V745, A20-V745, A21-V745, G22-V745, G23-V745, W24-V745, T25-
 V745, A26-V745, G27-V745, S28-V745, H29-V745, T30-V745, V31-V745, G32-
 V745, K33-V745, E34-V745, Q35-V745, K36-V745, A37-V745, S38-V745, D39-
 25 V745, T40-V745, S41-V745, P42-V745, M43-V745, G44-V745, H45-V745, R46-
 V745, E47-V745, Q48-V745, G49-V745, A50-V745, S51-V745, I52-V745, G53-
 V745, D54-V745, G55-V745, G56-V745, E57-V745, T58-V745, A59-V745, G60-
 V745, E61-V745, G62-V745, G63-V745, E64-V745, R65-V745, P66-V745, S67-
 V745, V68-V745, R69-V745, S70-V745, G71-V745, S72-V745, G73-V745, D74-
 30 V745, V75-V745, E76-V745, Q77-V745, G78-V745, L79-V745, G80-V745, V81-
 V745, C82-V745, G83-V745, C84-V745, S85-V745, N86-V745, H87-V745, T88-
 V745, L89-V745, W90-V745, A91-V745, G92-V745, R93-V745, A94-V745, K95-
 V745, G96-V745, S97-V745, R98-V745, G99-V745, P100-V745, P101-V745, V102-
 V745, T103-V745, P104-V745, P105-V745, M106-V745, A107-V745, L108-V745,
 35 P109-V745, A110-V745, D111-V745, F112-V745, L113-V745, M114-V745, H115-
 V745, K116-V745, L117-V745, T118-V745, A119-V745, S120-V745, D121-V745,
 T122-V745, G123-V745, K124-V745, T125-V745, C126-V745, L127-V745, M128-

WO 02/44210

PCT/US01/45336

V745, K129-V745, A130-V745, L131-V745, L132-V745, N133-V745, I134-V745,
5 N135-V745, P136-V745, N137-V745, T138-V745, K139-V745, E140-V745, I141-
V745, V142-V745, R143-V745, I144-V745, L145-V745, L146-V745, A147-V745,
F148-V745, A149-V745, E150-V745, E151-V745, N152-V745, D153-V745, I154-
V745, L155-V745, G156-V745, R157-V745, F158-V745, I159-V745, N160-V745,
A161-V745, E162-V745, Y163-V745, T164-V745, E165-V745, E166-V745, A167-
10 V745, Y168-V745, E169-V745, G170-V745, Q171-V745, T172-V745, A173-V745,
L174-V745, N175-V745, I176-V745, A177-V745, I178-V745, E179-V745, R180-
V745, R181-V745, Q182-V745, G183-V745, D184-V745, I185-V745, A186-V745,
A187-V745, L188-V745, L189-V745, I190-V745, A191-V745, A192-V745, G193-
V745, A194-V745, D195-V745, V196-V745, N197-V745, A198-V745, H199-V745,
15 A200-V745, K201-V745, G202-V745, A203-V745, F204-V745, F205-V745, N206-
V745, P207-V745, K208-V745, Y209-V745, Q210-V745, H211-V745, E212-V745,
G213-V745, F214-V745, Y215-V745, F216-V745, G217-V745, E218-V745, T219-
V745, P220-V745, L221-V745, A222-V745, L223-V745, A224-V745, A225-V745,
C226-V745, T227-V745, N228-V745, Q229-V745, P230-V745, E231-V745, I232-
20 V745, V233-V745, Q234-V745, L235-V745, L236-V745, M237-V745, E238-V745,
H239-V745, E240-V745, Q241-V745, T242-V745, D243-V745, I244-V745, T245-
V745, S246-V745, R247-V745, D248-V745, S249-V745, R250-V745, G251-V745,
N252-V745, N253-V745, I254-V745, L255-V745, H256-V745, A257-V745, L258-
V745, V259-V745, T260-V745, V261-V745, A262-V745, E263-V745, D264-V745,
25 F265-V745, K266-V745, T267-V745, Q268-V745, N269-V745, D270-V745, F271-
V745, V272-V745, K273-V745, R274-V745, M275-V745, Y276-V745, D277-V745,
M278-V745, I279-V745, L280-V745, L281-V745, R282-V745, S283-V745, G284-
V745, N285-V745, W286-V745, E287-V745, L288-V745, E289-V745, T290-V745,
T291-V745, R292-V745, N293-V745, N294-V745, D295-V745, G296-V745, L297-
30 V745, T298-V745, P299-V745, L300-V745, Q301-V745, L302-V745, A303-V745,
A304-V745, K305-V745, M306-V745, G307-V745, K308-V745, A309-V745, E310-
V745, I311-V745, L312-V745, K313-V745, Y314-V745, I315-V745, L316-V745,
S317-V745, R318-V745, E319-V745, I320-V745, K321-V745, E322-V745, K323-
V745, R324-V745, L325-V745, R326-V745, S327-V745, L328-V745, S329-V745,
35 R330-V745, K331-V745, F332-V745, T333-V745, D334-V745, W335-V745, A336-
V745, Y337-V745, G338-V745, P339-V745, V340-V745, S341-V745, S342-V745,
S343-V745, L344-V745, Y345-V745, D346-V745, L347-V745, T348-V745, N349-

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- V745, V350-V745, D351-V745, T352-V745, T353-V745, T354-V745, D355-V745,
5 N356-V745, S357-V745, V358-V745, L359-V745, E360-V745, I361-V745, T362-
V745, V363-V745, Y364-V745, N365-V745, T366-V745, N367-V745, I368-V745,
D369-V745, N370-V745, R371-V745, H372-V745, E373-V745, M374-V745, L375-
V745, T376-V745, L377-V745, E378-V745, P379-V745, L380-V745, H381-V745,
T382-V745, L383-V745, L384-V745, H385-V745, M386-V745, K387-V745, W388-
10 V745, K389-V745, K390-V745, F391-V745, A392-V745, K393-V745, H394-V745,
M395-V745, F396-V745, F397-V745, L398-V745, S399-V745, F400-V745, C401-
V745, F402-V745, Y403-V745, F404-V745, F405-V745, Y406-V745, N407-V745,
I408-V745, T409-V745, L410-V745, T411-V745, L412-V745, V413-V745, S414-
V745, Y415-V745, Y416-V745, R417-V745, P418-V745, R419-V745, E420-V745,
15 E421-V745, E422-V745, A423-V745, I424-V745, P425-V745, H426-V745, P427-
V745, L428-V745, A429-V745, L430-V745, T431-V745, H432-V745, K433-V745,
M434-V745, G435-V745, W436-V745, L437-V745, Q438-V745, L439-V745, L440-
V745, G441-V745, R442-V745, M443-V745, F444-V745, V445-V745, L446-V745,
I447-V745, W448-V745, A449-V745, M450-V745, C451-V745, I452-V745, S453-
20 V745, V454-V745, K455-V745, E456-V745, G457-V745, I458-V745, A459-V745,
I460-V745, F461-V745, L462-V745, L463-V745, R464-V745, P465-V745, S466-
V745, D467-V745, L468-V745, Q469-V745, S470-V745, I471-V745, L472-V745,
S473-V745, D474-V745, A475-V745, W476-V745, F477-V745, H478-V745, F479-
V745, V480-V745, F481-V745, F482-V745, I483-V745, Q484-V745, A485-V745,
25 V486-V745, L487-V745, V488-V745, I489-V745, L490-V745, S491-V745, V492-
V745, F493-V745, L494-V745, Y495-V745, L496-V745, F497-V745, A498-V745,
Y499-V745, K500-V745, E501-V745, Y502-V745, L503-V745, A504-V745, C505-
V745, L506-V745, V507-V745, L508-V745, A509-V745, M510-V745, A511-V745,
L512-V745, G513-V745, W514-V745, A515-V745, N516-V745, M517-V745, L518-
30 V745, Y519-V745, Y520-V745, T521-V745, R522-V745, G523-V745, F524-V745,
Q525-V745, S526-V745, M527-V745, G528-V745, M529-V745, Y530-V745, S531-
V745, V532-V745, M533-V745, I534-V745, Q535-V745, K536-V745, V537-V745,
I538-V745, L539-V745, H540-V745, D541-V745, V542-V745, L543-V745, K544-
V745, F545-V745, L546-V745, F547-V745, V548-V745, Y549-V745, I550-V745,
35 A551-V745, F552-V745, L553-V745, L554-V745, G555-V745, F556-V745, G557-
V745, V558-V745, A559-V745, L560-V745, A561-V745, S562-V745, L563-V745,
I564-V745, E565-V745, K566-V745, C567-V745, P568-V745, K569-V745, D570-

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- V745, N571-V745, K572-V745, D573-V745, C574-V745, S575-V745, S576-V745,
 5 Y577-V745, G578-V745, S579-V745, F580-V745, S581-V745, D582-V745, A583-V745, V584-V745, L585-V745, E586-V745, L587-V745, F588-V745, K589-V745, L590-V745, T591-V745, I592-V745, G593-V745, L594-V745, G595-V745, D596-V745, L597-V745, N598-V745, I599-V745, Q600-V745, Q601-V745, N602-V745, S603-V745, K604-V745, Y605-V745, P606-V745, I607-V745, L608-V745, F609-
 10 V745, L610-V745, F611-V745, L612-V745, L613-V745, I614-V745, T615-V745, Y616-V745, V617-V745, I618-V745, L619-V745, T620-V745, F621-V745, V622-V745, L623-V745, L624-V745, L625-V745, N626-V745, M627-V745, L628-V745, I629-V745, A630-V745, L631-V745, M632-V745, G633-V745, E634-V745, T635-V745, V636-V745, E637-V745, N638-V745, V639-V745, S640-V745, K641-V745,
 15 E642-V745, S643-V745, E644-V745, R645-V745, I646-V745, W647-V745, R648-V745, L649-V745, Q650-V745, R651-V745, A652-V745, R653-V745, T654-V745, I655-V745, L656-V745, E657-V745, F658-V745, E659-V745, K660-V745, M661-V745, L662-V745, P663-V745, E664-V745, W665-V745, L666-V745, R667-V745, S668-V745, R669-V745, F670-V745, R671-V745, M672-V745, G673-V745, E674-
 20 V745, L675-V745, C676-V745, K677-V745, V678-V745, A679-V745, E680-V745, D681-V745, D682-V745, F683-V745, R684-V745, L685-V745, C686-V745, L687-V745, R688-V745, I689-V745, N690-V745, E691-V745, V692-V745, K693-V745, W694-V745, T695-V745, E696-V745, W697-V745, K698-V745, T699-V745, H700-V745, V701-V745, S702-V745, F703-V745, L704-V745, N705-V745, E706-V745,
 25 D707-V745, P708-V745, G709-V745, P710-V745, V711-V745, R712-V745, R713-V745, T714-V745, D715-V745, F716-V745, N717-V745, K718-V745, I719-V745, Q720-V745, D721-V745, S722-V745, S723-V745, R724-V745, N725-V745, N726-V745, S727-V745, K728-V745, T729-V745, T730-V745, L731-V745, N732-V745, A733-V745, F734-V745, E735-V745, E736-V745, V737-V745, E738-V745, and/or
 30 E739-V745 of SEQ ID NO:4. Polynucleotide sequences encoding these polypeptides are also provided. The present invention also encompasses the use of these N-terminal hVR1d.2 deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

In preferred embodiments, the following C-terminal hVR1d.2 deletion

- 35 polypeptides are encompassed by the present invention: M1-V745, M1-S744, M1-T743, M1-E742, M1-P741, M1-F740, M1-E739, M1-E738, M1-V737, M1-E736, M1-E735, M1-F734, M1-A733, M1-N732, M1-L731, M1-T730, M1-T729, M1-

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- K728, M1-S727, M1-N726, M1-N725, M1-R724, M1-S723, M1-S722, M1-D721,
- 5 M1-Q720, M1-I719, M1-K718, M1-N717, M1-F716, M1-D715, M1-T714, M1-R713,
M1-R712, M1-V711, M1-P710, M1-G709, M1-P708, M1-D707, M1-E706, M1-
N705, M1-L704, M1-F703, M1-S702, M1-V701, M1-H700, M1-T699, M1-K698,
M1-W697, M1-E696, M1-T695, M1-W694, M1-K693, M1-V692, M1-E691, M1-
N690, M1-I689, M1-R688, M1-L687, M1-C686, M1-L685, M1-R684, M1-F683, M1-
10 D682, M1-D681, M1-E680, M1-A679, M1-V678, M1-K677, M1-C676, M1-L675,
M1-E674, M1-G673, M1-M672, M1-R671, M1-F670, M1-R669, M1-S668, M1-
R667, M1-L666, M1-W665, M1-E664, M1-P663, M1-L662, M1-M661, M1-K660,
M1-E659, M1-F658, M1-E657, M1-L656, M1-I655, M1-T654, M1-R653, M1-A652,
M1-R651, M1-Q650, M1-L649, M1-R648, M1-W647, M1-I646, M1-R645, M1-
15 E644, M1-S643, M1-E642, M1-K641, M1-S640, M1-V639, M1-N638, M1-E637,
M1-V636, M1-T635, M1-E634, M1-G633, M1-M632, M1-L631, M1-A630, M1-
I629, M1-L628, M1-M627, M1-N626, M1-L625, M1-L624, M1-L623, M1-V622,
M1-F621, M1-T620, M1-L619, M1-I618, M1-V617, M1-Y616, M1-T615, M1-I614,
M1-L613, M1-L612, M1-F611, M1-L610, M1-F609, M1-L608, M1-I607, M1-P606,
20 M1-Y605, M1-K604, M1-S603, M1-N602, M1-Q601, M1-Q600, M1-I599, M1-
N598, M1-L597, M1-D596, M1-G595, M1-L594, M1-G593, M1-I592, M1-T591,
M1-L590, M1-K589, M1-F588, M1-L587, M1-E586, M1-L585, M1-V584, M1-A583,
M1-D582, M1-S581, M1-F580, M1-S579, M1-G578, M1-Y577, M1-S576, M1-S575,
M1-C574, M1-D573, M1-K572, M1-N571, M1-D570, M1-K569, M1-P568, M1-
25 C567, M1-K566, M1-E565, M1-I564, M1-L563, M1-S562, M1-A561, M1-L560, M1-
A559, M1-V558, M1-G557, M1-F556, M1-G555, M1-L554, M1-L553, M1-F552,
M1-A551, M1-I550, M1-Y549, M1-V548, M1-F547, M1-L546, M1-F545, M1-K544,
M1-L543, M1-V542, M1-D541, M1-H540, M1-L539, M1-I538, M1-V537, M1-K536,
M1-Q535, M1-I534, M1-M533, M1-V532, M1-S531, M1-Y530, M1-M529, M1-
30 G528, M1-M527, M1-S526, M1-Q525, M1-F524, M1-G523, M1-R522, M1-T521,
M1-Y520, M1-Y519, M1-L518, M1-M517, M1-N516, M1-A515, M1-W514, M1-
G513, M1-L512, M1-A511, M1-M510, M1-A509, M1-L508, M1-V507, M1-L506,
M1-C505, M1-A504, M1-L503, M1-Y502, M1-E501, M1-K500, M1-Y499, M1-
A498, M1-F497, M1-L496, M1-Y495, M1-L494, M1-F493, M1-V492, M1-S491,
35 M1-L490, M1-I489, M1-V488, M1-L487, M1-V486, M1-A485, M1-Q484, M1-I483,
M1-F482, M1-F481, M1-V480, M1-F479, M1-H478, M1-F477, M1-W476, M1-
A475, M1-D474, M1-S473, M1-L472, M1-I471, M1-S470, M1-Q469, M1-L468, M1-

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- D467, M1-S466, M1-P465, M1-R464, M1-L463, M1-L462, M1-F461, M1-I460, M1-
5 A459, M1-I458, M1-G457, M1-E456, M1-K455, M1-V454, M1-S453, M1-I452, M1-
C451, M1-M450, M1-A449, M1-W448, M1-I447, M1-L446, M1-V445, M1-F444,
M1-M443, M1-R442, M1-G441, M1-L440, M1-L439, M1-Q438, M1-L437, M1-
W436, M1-G435, M1-M434, M1-K433, M1-H432, M1-T431, M1-L430, M1-A429,
M1-L428, M1-P427, M1-H426, M1-P425, M1-I424, M1-A423, M1-E422, M1-E421,
10 M1-E420, M1-R419, M1-P418, M1-R417, M1-Y416, M1-Y415, M1-S414, M1-
V413, M1-L412, M1-T411, M1-L410, M1-T409, M1-I408, M1-N407, M1-Y406,
M1-F405, M1-F404, M1-Y403, M1-F402, M1-C401, M1-F400, M1-S399, M1-L398,
M1-F397, M1-F396, M1-M395, M1-H394, M1-K393, M1-A392, M1-F391, M1-
K390, M1-K389, M1-W388, M1-K387, M1-M386, M1-H385, M1-L384, M1-L383,
15 M1-T382, M1-H381, M1-L380, M1-P379, M1-E378, M1-L377, M1-T376, M1-L375,
M1-M374, M1-E373, M1-H372, M1-R371, M1-N370, M1-D369, M1-I368, M1-
N367, M1-T366, M1-N365, M1-Y364, M1-V363, M1-T362, M1-I361, M1-E360,
M1-L359, M1-V358, M1-S357, M1-N356, M1-D355, M1-T354, M1-T353, M1-
T352, M1-D351, M1-V350, M1-N349, M1-T348, M1-L347, M1-D346, M1-Y345,
20 M1-L344, M1-S343, M1-S342, M1-S341, M1-V340, M1-P339, M1-G338, M1-Y337,
M1-A336, M1-W335, M1-D334, M1-T333, M1-F332, M1-K331, M1-R330, M1-
S329, M1-L328, M1-S327, M1-R326, M1-L325, M1-R324, M1-K323, M1-E322,
M1-K321, M1-I320, M1-E319, M1-R318, M1-S317, M1-L316, M1-I315, M1-Y314,
M1-K313, M1-L312, M1-I311, M1-E310, M1-A309, M1-K308, M1-G307, M1-
25 M306, M1-K305, M1-A304, M1-A303, M1-L302, M1-Q301, M1-L300, M1-P299,
M1-T298, M1-L297, M1-G296, M1-D295, M1-N294, M1-N293, M1-R292, M1-
T291, M1-T290, M1-E289, M1-L288, M1-E287, M1-W286, M1-N285, M1-G284,
M1-S283, M1-R282, M1-L281, M1-L280, M1-I279, M1-M278, M1-D277, M1-Y276,
M1-M275, M1-R274, M1-K273, M1-V272, M1-F271, M1-D270, M1-N269, M1-
30 Q268, M1-T267, M1-K266, M1-F265, M1-D264, M1-E263, M1-A262, M1-V261,
M1-T260, M1-V259, M1-L258, M1-A257, M1-H256, M1-L255, M1-I254, M1-N253,
M1-N252, M1-G251, M1-R250, M1-S249, M1-D248, M1-R247, M1-S246, M1-
T245, M1-I244, M1-D243, M1-T242, M1-Q241, M1-E240, M1-H239, M1-E238,
M1-M237, M1-L236, M1-L235, M1-Q234, M1-V233, M1-I232, M1-E231, M1-P230,
35 M1-Q229, M1-N228, M1-T227, M1-C226, M1-A225, M1-A224, M1-L223, M1-
A222, M1-L221, M1-P220, M1-T219, M1-E218, M1-G217, M1-F216, M1-Y215,
M1-F214, M1-G213, M1-E212, M1-H211, M1-Q210, M1-Y209, M1-K208, M1-

WO 02/44210

PCT/US01/45336

P207, M1-N206, M1-F205, M1-F204, M1-A203, M1-G202, M1-K201, M1-A200,
 5 M1-H199, M1-A198, M1-N197, M1-V196, M1-D195, M1-A194, M1-G193, M1-
 A192, M1-A191, M1-I190, M1-L189, M1-L188, M1-A187, M1-A186, M1-I185, M1-
 D184, M1-G183, M1-Q182, M1-R181, M1-R180, M1-E179, M1-I178, M1-A177,
 M1-I176, M1-N175, M1-L174, M1-A173, M1-T172, M1-Q171, M1-G170, M1-E169,
 M1-Y168, M1-A167, M1-E166, M1-E165, M1-T164, M1-Y163, M1-E162, M1-
 10 A161, M1-N160, M1-I159, M1-F158, M1-R157, M1-G156, M1-L155, M1-I154, M1-
 D153, M1-N152, M1-E151, M1-E150, M1-A149, M1-F148, M1-A147, M1-L146,
 M1-L145, M1-I144, M1-R143, M1-V142, M1-I141, M1-E140, M1-K139, M1-T138,
 M1-N137, M1-P136, M1-N135, M1-I134, M1-N133, M1-L132, M1-L131, M1-A130,
 M1-K129, M1-M128, M1-L127, M1-C126, M1-T125, M1-K124, M1-G123, M1-
 15 T122, M1-D121, M1-S120, M1-A119, M1-T118, M1-L117, M1-K116, M1-H115,
 M1-M114, M1-L113, M1-F112, M1-D111, M1-A110, M1-P109, M1-L108, M1-
 A107, M1-M106, M1-P105, M1-P104, M1-T103, M1-V102, M1-P101, M1-P100,
 M1-G99, M1-R98, M1-S97, M1-G96, M1-K95, M1-A94, M1-R93, M1-G92, M1-
 A91, M1-W90, M1-L89, M1-T88, M1-H87, M1-N86, M1-S85, M1-C84, M1-G83,
 20 M1-C82, M1-V81, M1-G80, M1-L79, M1-G78, M1-Q77, M1-E76, M1-V75, M1-
 D74, M1-G73, M1-S72, M1-G71, M1-S70, M1-R69, M1-V68, M1-S67, M1-P66,
 M1-R65, M1-E64, M1-G63, M1-G62, M1-E61, M1-G60, M1-A59, M1-T58, M1-
 E57, M1-G56, M1-G55, M1-D54, M1-G53, M1-I52, M1-S51, M1-A50, M1-G49,
 M1-Q48, M1-E47, M1-R46, M1-H45, M1-G44, M1-M43, M1-P42, M1-S41, M1-
 25 T40, M1-D39, M1-S38, M1-A37, M1-K36, M1-Q35, M1-E34, M1-K33, M1-G32,
 M1-V31, M1-T30, M1-H29, M1-S28, M1-G27, M1-A26, M1-T25, M1-W24, M1-
 G23, M1-G22, M1-A21, M1-A20, M1-V19, M1-R18, M1-S17, M1-D16, M1-T15,
 M1-E14, M1-L13, M1-R12, M1-G11, M1-G10, M1-G9, M1-R8, and/or M1-P7 of
 SEQ ID NO:4. Polynucleotide sequences encoding these polypeptides are also
 30 provided. The present invention also encompasses the use of these C-terminal
 hVR1d.2 deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes as
 described elsewhere herein.

In addition, the present invention provides the hVR1d clone corresponding to
 SEQ ID NO:1, deposited at the American Type Culture Collection (ATCC), 10801
 35 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on _____ and under
 ATCC Accession No. _____ according to the terms of the Budapest Treaty.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Other embodiments of the invention include antibodies directed to the hVR1d proteins and polypeptides of the invention, and methods and compositions for the diagnosis and treatment of human diseases related to ion channel dysfunction as described below.

5.1. THE hVR1d NUCLEIC ACID MOLECULES OF THE INVENTION

The hVR1d nucleic acids of the invention, e.g., hVR1d.1 and hVR1d.2, are novel human nucleic acid molecules that encode proteins or polypeptides involved in the formation and/or function of novel human ion channels. Although these novel nucleic acids and proteins display some sequence and structural homology to the TRP and vanilloid families of cation channel proteins as well as other cation channel proteins known in the art, it is also known in the art that proteins displaying such homologies have significant differences in function, such as conductance and permeability, as well as differences in tissue expression. As such, it is acknowledged in the art that nucleic acid molecules and the proteins encoded by those molecules sharing these homologies can still represent diverse, distinct and unique nucleic acids and proteins, respectively.

The hVR1d nucleic acid molecules of the invention are those that comprise the following sequences: (a) the DNA sequence of hVR1d.1 or hVR1d.2 as shown in FIGS. 1A or 1B, respectively; (b) any nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of hVR1d.1 or hVR1d.2 as shown in FIGS. 2A or 2B, respectively; (c) any nucleic acid sequence that hybridizes to the complement of nucleic acid sequences that encode the amino acid sequences of FIGS. 2A or 2B under highly stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (see, e.g., Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York, at p. 2.10.3) or (d) any nucleic acid sequence that hybridizes to the complement of nucleic acid sequences that encode the amino acid sequences of FIGS. 2A or 2B under less stringent conditions, such as moderately stringent conditions, e.g., washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C (Ausubel et al., 1989, *supra*), and which encodes a gene product functionally equivalent to a hVR1d gene product encoded by the sequences depicted in FIGS. 2A or 2B. "Functionally equivalent" as used herein refers to any protein capable of exhibiting a substantially similar *in vivo* or *in vitro*

WO 02/44210

PCT/US01/45336

activity as the hVR1d gene products encoded by the hVR1d nucleic acid molecules described herein, e.g., ion channel formation or function.

As used herein, the term "hVR1d nucleic acid molecule" or "hVR1d nucleic acid" may also refer to fragments and/or degenerate variants of nucleic acid sequences (a) through (d), including naturally occurring variants or mutant alleles thereof. Such fragments include, for example, nucleic acid sequences that encode portions of the hVR1d protein that correspond to functional domains of the protein. One embodiment of such a hVR1d nucleic acid fragment comprises a nucleic acid containing a contiguous open reading frame, without introns, that encodes the fifth and sixth transmembrane segments of the hVR1d protein, including the predicted pore loop.

Additionally, the hVR1d nucleic acid molecules of the invention include isolated nucleic acids, preferably DNA molecules, that hybridize under highly stringent or moderately stringent hybridization conditions to at least about 6, preferably at least about 12, and more preferably at least about 18, consecutive nucleotides of the nucleic acid sequences of (a) through (d), identified *supra*.

The hVR1d nucleic acid molecules of the invention also include nucleic acids, preferably DNA molecules, that hybridize to, and are therefore complements of, the nucleic acid sequences of (a) through (d), *supra*. Such hybridization conditions may be highly stringent or moderately stringent, as described above. In those instances in which the nucleic acid molecules are deoxyoligonucleotides ("oligos"), highly stringent conditions may include, e.g., washing in 6xSSC/0.05% sodium pyrophosphate at 37°C (for 14-base oligos), 48°C (for 17-base oligos), 55°C (for 20-base oligos), and 60°C (for 23-base oligos). The nucleic acid molecules of the invention may encode or act as hVR1d antisense molecules useful, for example, in hVR1d gene regulation or as antisense primers in amplification reactions of hVR1d nucleic acid sequences. Further, such sequences may be used as part of ribozyme and/or triple helix sequences, also useful for hVR1d gene regulation. Still further, such molecules may be used as components of diagnostic methods whereby, for example, the presence of a particular hVR1d allele or alternatively-spliced hVR1d transcript responsible for causing or predisposing one to a disorder involving ion channel dysfunction may be detected.

Moreover, due to the degeneracy of the genetic code, other DNA sequences that encode substantially the amino acid sequences of hVR1d1.1 or hVR1d.2 may be

WO 02/44210

PCT/US01/45336

used in the practice of the present invention for the cloning and expression of hVR1d polypeptides. Such DNA sequences include those that are capable of hybridizing to the hVR1d nucleic acids of this invention under stringent (high or moderate) conditions, or that would be capable of hybridizing under stringent conditions but for the degeneracy of the genetic code.

Typically, the hVR1d nucleic acids of the invention should exhibit at least about 80% overall sequence homology at the nucleotide level, more preferably at least about 85-90% overall homology and most preferably at least about 95% overall homology to the nucleic acid sequences of FIGS. 1A or 1B (as determined by the CLUSTAL W algorithm using default parameters (Thompson, J.D., et al., Nucleic Acids Research, 2(22):4673-4680, (1994)).

Altered hVR1d nucleic acid sequences that may be used in accordance with the invention include deletions, additions or substitutions of different nucleotide residues resulting in a modified nucleic acid molecule, i.e., mutated or truncated, that encodes the same or a functionally equivalent gene product as those described supra. The gene product itself may contain deletions, additions or substitutions of amino acid residues within the hVR1d protein sequence, which result in a silent change, thus producing a functionally equivalent hVR1d polypeptide. Such amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipatic nature of the residues involved. For example, negatively-charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively-charged amino acids include lysine, arginine and histidine; amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include the following: leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, tyrosine. A functionally equivalent hVR1d polypeptide can include a polypeptide which displays the same type of biological activity (e.g., cation channel) as the native hVR1d protein, but not necessarily to the same extent.

The nucleic acid molecules or sequences of the invention may be engineered in order to alter the hVR1d coding sequence for a variety of ends including but not limited to alterations that modify processing and expression of the gene product. For example, mutations may be introduced using techniques which are well known in the art, e.g., site-directed mutagenesis, to insert new restriction sites, to alter glycosylation patterns, phosphorylation, etc. For example, in certain expression systems such as yeast, host cells may over-glycosylate the gene product. When using such expression

WO 02/44210

PCT/US01/45336

systems, it may be preferable to alter the hVR1d coding sequence to eliminate any
 5 N-linked glycosylation sites.

In another embodiment, a hVR1d nucleic acid of the invention, e.g., a
 modified hVR1d nucleic acid, may be ligated to a heterologous protein-encoding
 sequence to encode a fusion protein. According to a preferred embodiment, a hVR1d
 nucleic acid of the invention that encodes a polypeptide with an activity of a hVR1d
 10 protein, or a fragment thereof, is linked, uninterrupted by stop codons and in frame, to
 a nucleotide sequence that encodes a heterologous protein or peptide. The fusion
 protein may be engineered to contain a cleavage site located between the hVR1d
 sequence and the heterologous protein sequence, so that the hVR1d protein can be
 cleaved away from the heterologous moiety. Nucleic acid sequences encoding fusion
 15 proteins of the invention may include full length hVR1d coding sequences, sequences
 encoding truncated hVR1d, sequences encoding mutated hVR1d or sequences
 encoding peptide fragments of hVR1d.

The hVR1d nucleic acid molecules of the invention can also be used as
 hybridization probes for obtaining hVR1d cDNAs or genomic hVR1d DNA. In
 20 addition, the nucleic acids of the invention can be used as primers in PCR
 amplification methods to isolate hVR1d cDNAs and genomic DNA, e.g., from other
 species.

The hVR1d gene sequences of the invention may also used to isolate mutant
 hVR1d gene alleles. Such mutant alleles may be isolated from individuals either
 25 known or proposed to have a genotype related to ion channel dysfunction. Mutant
 alleles and mutant allele gene products may then be utilized in the screening,
 therapeutic and diagnostic systems described in Section 5.4., *infra*. Additionally, such
 hVR1d gene sequences can be used to detect hVR1d gene regulatory (e.g., promoter)
 defects which can affect ion channel function.

A cDNA of a mutant hVR1d gene may be isolated, for example, by using
 30 PCR, a technique which is well known to those of skill in the art (see, e.g., U.S. Patent
 No. 4,683,202). The first cDNA strand may be synthesized by hybridizing an oligo-
 dT oligonucleotide to mRNA isolated from tissue known or suspected to be expressed
 in an individual putatively carrying the mutant hVR1d allele, and by extending the
 35 new strand with reverse transcriptase. The second strand of the cDNA is then
 synthesized using an oligonucleotide that hybridizes specifically to the 5' end of the
 normal gene. Using these two primers, the product is then amplified via PCR, cloned

WO 02/44210

PCT/US01/45336

into a suitable vector, and subjected to DNA sequence analysis through methods well known in the art. By comparing the DNA sequence of the mutant hVR1d allele to that of the normal hVR1d allele, the mutation(s) responsible for the loss or alteration of function of the mutant hVR1d gene product can be ascertained.

Alternatively, a genomic library can be constructed using DNA obtained from an individual suspected of or known to carry the mutant hVR1d allele, or a cDNA library can be constructed using RNA from a tissue known, or suspected, to express the mutant hVR1d allele. The normal hVR1d gene or any suitable fragment thereof may then be labeled and used as a probe to identify the corresponding mutant hVR1d allele in such libraries. Clones containing the mutant hVR1d gene sequences may then be purified and subjected to sequence analysis according to methods well known in the art.

According to another embodiment, an expression library can be constructed utilizing cDNA synthesized from, for example, RNA isolated from a tissue known, or suspected, to express a mutant hVR1d allele in an individual suspected of or known to carry such a mutant allele. Gene products made by the putatively mutant tissue may be expressed and screened using standard antibody screening techniques in conjunction with antibodies raised against the normal hVR1d gene product, as described in Section 5.3, *supra*. For screening techniques, see, for example, Harlow, E. and Lane, eds., 1988, "Anti-bodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.

In cases where a hVR1d mutation results in an expressed gene product with altered function (e.g., as a result of a missense or a frameshift mutation), a polyclonal set of anti-hVR1d gene product antibodies are likely to cross-react with the mutant hVR1d gene product. Library clones detected via their reaction with such labeled antibodies can be purified and subjected to sequence analysis according to methods well known to those of skill in the art.

In an alternate embodiment of the invention, the coding sequence of hVR1d can be synthesized in whole or in part, using chemical methods well known in the art, based on the nucleic acid and/or amino acid sequences of the hVR1d genes and proteins disclosed herein. See, for example, Caruthers et al., 1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7: 215-233; Crea and Horn, 1980, Nuc. Acids Res. 9(10): 2331; Matteucci and Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21: 719; and Chow and Kempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9(12): 2807-2817. The invention also encompasses (a) DNA vectors that

WO 02/44210

PCT/US01/45336

contain any of the foregoing hVR1d nucleic acids and/or their complements; (b) DNA
 5 expression vectors that contain any of the foregoing hVR1d coding sequences
 operatively associated with a regulatory element that directs the expression of the
 coding sequences; and (c) genetically engineered host cells that contain any of the
 foregoing hVR1d coding sequences operatively associated with a regulatory element
 that directs the expression of the coding sequences in the host cell. As used herein,
 10 regulatory elements include, but are not limited to inducible and non-inducible
 promoters, enhancers, operators and other elements known to those skilled in the art
 that drive and regulate expression. Such regulatory elements include but are not
 limited to the cytomegalovirus hCMV immediate early gene, the early or late
 promoters of SV40 adenovirus, the lac system, the trp system, the TAC system, the
 15 TRC system, the major operator and promoter regions of phage A, the control regions
 of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of acid
 phosphatase, and the promoters of the yeast α -mating factors.

The invention still further includes nucleic acid analogs, including but not
 limited to, peptide nucleic acid analogues, equivalent to the nucleic acid molecules
 20 described herein. "Equivalent" as used in this context refers to nucleic acid analogs
 that have the same primary base sequence as the nucleic acid molecules described
 above. Nucleic acid analogs and methods for the synthesis of nucleic acid analogs are
 well known to those of skill in the art. See, e.g., Egholm, M. et al., 1993, Nature
 365:566-568; and Perry-O'Keefe, H. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. USA 93:14670-
 25 14675.

5.2. hVR1d PROTEINS AND POLYPEPTIDES

The hVR1d nucleic acid molecules of the invention may be used to generate
 recombinant DNA molecules that direct the expression in appropriate host cells of
 30 hVR1d polypeptides, including the full-length hVR1d proteins, e.g., hVR1d.1 or
 hVR1d.2, functionally active or equivalent hVR1d proteins and polypeptides, e.g.,
 mutated, truncated or deleted forms of hVR1d, peptide fragments of hVR1d, or
 hVR1d fusion proteins. A functionally equivalent hVR1d polypeptide can include a
 polypeptide which displays the same type of biological activity (e.g., cation channel
 35 formation and/or function) as the native hVR1d protein, but not necessarily to the
 same extent.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

In a preferred embodiment, the proteins and polypeptides of the invention include the hVR1d.1 and hVR1d.2 amino acid sequences depicted in FIGS. 2A and 2B, respectively. These sequences include six transmembrane domains and an overall topology that is conserved in the TRP-vanilloid family of ion channels. In addition, the amino acid sequences of FIGS. 2A and 2B contain three ankyrin domains in the N-terminal segment of the protein preceding the first transmembrane domain.

10 The hVR1 proteins and polypeptides of the invention include peptide fragments of hVR1d.1 or hVR1d.2, e.g., peptides corresponding to one or more domains of the protein, mutated, truncated or deleted forms of the proteins and polypeptides, as well as hVR1d fusion proteins, all of which derivatives of hVR1d can be obtained by techniques well known in the art, given the hVR1d nucleic acid and amino acid sequences disclosed herein. As noted in Section 5.1, *supra*, the proteins and polypeptides of the invention may contain deletions, additions or substitutions of amino acid residues within the hVR1d protein sequence, which result in a silent change, thus producing a functionally equivalent hVR1d polypeptide. Such amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. For example, negatively-charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively-charged amino acids include lysine, arginine and histidine; amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include the following: leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, tyrosine.

15 Mutated or altered forms of the hVR1d proteins and polypeptides of the invention can be obtained using either random mutagenesis techniques or site-directed mutagenesis techniques well known in the art or by chemical methods, e.g., protein synthesis techniques (see Section 5.1, *supra*). Mutant hVR1d proteins or polypeptides can be engineered so that regions important for function are maintained, while variable residues are altered, e.g., by deletion or insertion of an amino acid residue(s) or by the substitution of one or more different amino acid residues. For example, conservative alterations at the variable positions of a polypeptide can be engineered to produce a mutant hVR1d polypeptide that retains the function of hVR1d. Non-conservative alterations of variable regions can be engineered to alter hVR1d function, if desired. Alternatively, in those cases where modification of function

WO 02/44210

PCT/US01/45336

(either to increase or decrease function) is desired, deletion or non-conservative alterations of conserved regions of the polypeptide may be engineered.

Fusion proteins containing hVR1d amino acid sequences can also be obtained by techniques known in the art, including genetic engineering and chemical protein synthesis techniques. According to a preferred embodiment, the fusion proteins of the invention are encoded by an isolated nucleic acid molecule comprising an hVR1d nucleic acid of the invention that encodes a polypeptide with an activity of a hVR1d protein, or a fragment thereof, linked in frame and uninterrupted by stop codons to a nucleotide sequence that encodes a heterologous protein or peptide.

The fusion proteins of the invention include those that contain the full length hVR1d amino acid sequence, an hVR1d peptide sequence, e.g., encoding one or more functional domains, a mutant hVR1d amino acid sequence or a truncated hVR1d amino acid sequence linked to an unrelated protein or polypeptide sequence. Such fusion proteins include but are not limited to IgFc fusions which stabilize the hVR1d protein and may prolong half-life of the protein *in vivo* or fusions to an enzyme, fluorescent protein or luminescent protein that provides a marker function.

According to a preferred embodiment of the invention, the hVR1d proteins and polypeptides, and derivatives thereof, of the invention are produced using genetic engineering techniques. Thus, in order to express a biologically active hVR1d polypeptide by recombinant technology, a nucleic acid molecule coding for the polypeptide, or a functional equivalent thereof as described in Section 5.1, *supra*, is inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. More specifically, the hVR1d nucleic acid is operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and/or translational regulatory information that controls expression of the hVR1d nucleic acid in the host cell. The hVR1d gene products so produced, as well as host cells or cell lines transfected or transformed with recombinant hVR1d expression vectors, can be used for a variety of purposes. These include but are not limited to generating antibodies (i.e., monoclonal or polyclonal) that bind to the hVR1d protein or polypeptide, including those that competitively inhibit binding and thus can "neutralize" hVR1d activity, and the screening and selection of hVR1d analogs or ligands.

Methods that are well known to those skilled in the art are used to construct expression vectors containing the hVR1d coding sequences of the invention and

WO 02/44210

PCT/US01/45336

appropriate transcriptional and translational control elements and/or signals. These methods include in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques and in vivo recombination/genetic recombination. See, for example, the techniques described in Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. See also Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.

A variety of host-expression vector systems may be used to express the hVR1d coding sequences of this invention. Such host-expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, exhibit the corresponding hVR1d gene products in situ and/or function in vivo. These hosts include but are not limited to microorganisms such as bacteria (e.g., E.coli, B. subtilis) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing the hVR1d coding sequences; yeast (e.g., Saccharomyces, Pichia) transformed with recombinant yeast expression vectors containing the hVR1d coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing the hVR1d coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing the hVR1d coding sequences; or mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, BHK, 293, 3T3) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., the metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late promoter or vaccinia virus 7.5K promoter).

The expression elements of these systems can vary in their strength and specificities. Depending on the host/vector system utilized, any of a number of suitable transcriptional and translational elements, including constitutive and inducible promoters, may be used in the expression vector. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as pL of bacteriophage λ , plac, ptrp, ptac (ptrp-lac hybrid promoter) and the like may be used; when cloning in insect cell systems, promoters such as the baculovirus polyhedrin promoter may be used; when

WO 02/44210

PCT/US01/45336

cloning in plant cell systems, promoters derived from the genome of plant cells (e.g.,
 5 heat shock promoters; the promoter for the small subunit of RUBISCO; the promoter
 for the chlorophyll a/b binding protein) or from plant viruses (e.g., the 35S RNA
 promoter of CaMV; the coat protein promoter of TMV) may be used; when cloning in
 mammalian cell systems, promoters derived from the genome of mammalian cells
 (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late
 10 promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter) may be used; when generating cell lines
 that contain multiple copies of the hVR1d DNA, SV40-, BPV- and EBV-based
 vectors may be used with an appropriate selectable marker.

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously
 selected depending upon the use intended for the hVR1d polypeptide expressed. For
 15 example, when large quantities of an hVR1d polypeptide are to be produced, e.g., for
 the generation of antibodies or the production of the hVR1d gene product, vectors
 which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily
 purified may be desirable. Such vectors include but are not limited to the *E. coli*
 expression vector pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2: 1791), in which the
 20 hVR1d coding sequence may be ligated into the vector in frame with the lacZ coding
 region so that a hybrid hVR1d/lacZ protein is produced; pIN vectors (Inouye &
 Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J.
 Biol. Chem. 264: 5503-5509); and the like. pGEX vectors may also be used to
 express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST).
 25 In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells
 by affinity chromatography, e.g., adsorption to glutathione-agarose beads followed by
 elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include
 thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest
 can be released from the GST moiety. See also Booth et al., 1988, Immunol. Lett. 19:
 30 65-70; and Gardella et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 15854-15859; Pritchett et al.,
 1989, Biotechniques 7: 580.

In yeast, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters
 may be used. For a review, see Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988,
 Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13; Grant et al.,
 35 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Eds.
 Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986,
 DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; and Bitter, 1987, Heterologous

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684; and The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, 1982, Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II.

In an insect system, Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) can be used as a vector to express foreign genes. The virus grows in Spodoptera frugiperda cells. The hVR1d coding sequence may be cloned into non-essential regions (for example, the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example, the polyhedrin promoter). Successful insertion of the hVR1d coding sequence will result in inactivation of the polyhedrin gene and production of non-occluded recombinant virus (i.e., virus lacking the proteinaceous coat coded for by the polyhedrin gene). These recombinant viruses can then be used to infect Spodoptera frugiperda cells in which the inserted gene is expressed (see e.g., Smith et al., 1983, J. Virol. 46: 584; Smith, U.S. Patent No. 4,215,051).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the hVR1d coding sequence may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by in vitro or in vivo recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (e.g., region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing hVR1d in infected hosts (see, e.g., Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 3655-3659). Alternatively, the vaccinia 7.5K promoter may be used (see, e.g., Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415-7419; Mackett et al., 1984, J. Virol. 49: 857-864; Panicali et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 4927-4931).

Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted hVR1d coding sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where the entire hVR1d gene, including its own initiation codon and adjacent sequences, is inserted into the appropriate expression vector, no additional translational control signals may be needed. However, in cases where only a portion of the hVR1d coding sequence is inserted, exogenous translational control signals, including the ATG initiation codon, must be provided. Furthermore, the initiation codon must be in phase with the reading frame of the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

hVR1d coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous
5 translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both
natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion
of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see,
e.g., Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression
10 of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific
fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing (e.g.,
cleavage) of protein products may be important for the function of the protein.
Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-transla-
tional processing and modification of proteins. Appropriate cells lines or host systems
15 can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein
expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for
proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the
gene product may be used. Such mammalian host cells include but are not limited to
CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, WI38, etc.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable
20 expression is preferred. For example, cell lines which stably express the hVR1d
polypeptides of this invention may be engineered. Thus, rather than using expression
vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with
hVR1d nucleic acid molecules, e.g., DNA, controlled by appropriate expression
25 control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators,
polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of
foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched
media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the
recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably
30 integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can
be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to
engineer cell lines which express hVR1d polypeptides on the cell surface. Such
engineered cell lines are particularly useful in screening for hVR1d analogs or ligands.

In instances where the mammalian cell is a human cell, among the expression
35 systems by which the hVR1d nucleic acid sequences of the invention can be expressed
are human artificial chromosome (HAC) systems (see, e.g., Harrington et al., 1997,
Nature Genetics 15: 345-355).

WO 02/44210

PCT/US01/45336

hVR1d gene products can also be expressed in transgenic animals such as
 5 mice, rats, rabbits, guinea pigs, pigs, micro-pigs, sheep, goats, and non-human
 primates, e.g., baboons, monkeys, and chimpanzees. The term "transgenic" as used
 herein refers to animals expressing hVR1d nucleic acid sequences from a different
 species (e.g., mice expressing human hVR1d nucleic acid sequences), as well as
 animals that have been genetically engineered to overexpress endogenous (i.e., same
 10 species) hVR1d nucleic acid sequences or animals that have been genetically
 engineered to no longer express endogenous hVR1d nucleic acid sequences (i.e.,
 "knock-out" animals), and their progeny.

Transgenic animals according to this invention may be produced using
 techniques well known in the art, including but not limited to pronuclear
 15 microinjection (Hoppe, P.C. and Wagner, T.E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191);
 retrovirus mediated gene transfer into germ lines (Van der Putten et al., 1985, Proc.
 Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152); gene targeting in embryonic stem cells
 (Thompson et al., 1989, Cell 56: 313-321); electroporation of embryos (Lo, 1983, Mol
 Cell. Biol. 3: 1803-1814); and sperm-mediated gene transfer (Lavitrano et al., 1989,
 20 Cell 57: 717-723); etc. For a review of such techniques, see Gordon, 1989,
 Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229.

In addition, any technique known in the art may be used to produce transgenic
 animal clones containing a hVR1d transgene, for example, nuclear transfer into
 enucleated oocytes of nuclei from cultured embryonic, fetal or adult cells induced to
 25 quiescence (Campbell et al., 1996, Nature 380: 64-66; Wilmut et al., 1997, Nature
 385: 810-813).

Host cells which contain the hVR1d coding sequence and which express a
 biologically active gene product may be identified by at least four general approaches;
 (a) DNA-DNA or DNA-RNA hybridization; (b) the presence or absence of "marker"
 30 gene functions; (c) assessing the level of transcription as measured by the expression
 of hVR1d mRNA transcripts in the host cell; and (d) detection of the gene product as
 measured by immunoassay or by its biological activity.

In the first approach, the presence of the hVR1d coding sequence inserted in
 the expression vector can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization
 35 using probes comprising nucleotide sequences that are homologous to the hVR1d
 coding sequence, respectively, or portions or derivatives thereof.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

In the second approach, the recombinant expression vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "marker" gene functions. For example, if the hVR1d coding sequence is inserted within a marker gene sequence of the vector, recombinants containing the hVR1d coding sequence can be identified by the absence of the marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with the hVR1d sequence under the control of the same or different promoter used to control the expression of the hVR1d coding sequence. Expression of the marker in response to induction or selection indicates expression of the hVR1d coding sequence.

Selectable markers include resistance to antibiotics, resistance to methotrexate, transformation phenotype, and occlusion body formation in baculovirus. In addition, thymidine kinase activity (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223) hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817) genes can be employed in tk⁻, hprt⁻ or apt⁻ cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); and hyg^r, which confers resistance to hygromycin (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Additional selectable genes have been described, namely trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan; hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047); and ODC (ornithine decarboxylase) which confers resistance to the ornithine decarboxylase inhibitor, 2-(difluoromethyl)-DL-ornithine, DFMO (McConlogue, 1987, in Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

In the third approach, transcriptional activity for the hVR1d coding region can be assessed by hybridization assays. For example, RNA can be isolated and analyzed by Northern blot using a probe homologous to the hVR1d coding sequence or particular portions thereof. Alternatively, total nucleic acids of the host cell may be extracted and assayed for hybridization to such probes.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

In the fourth approach, the expression of the hVR1d protein product can be assessed immunologically, for example by Western blots, immunoassays such as radioimmuno-precipitation, enzyme-linked immunoassays and the like. The ultimate test of the success of the expression system, however, involves the detection of biologically active hVR1d gene product. A number of assays can be used to detect hVR1d activity including but not limited to binding assays and biological assays for hVR1d activity.

Once a clone that produces high levels of a biologically active hVR1d polypeptide is identified, the clone may be expanded and used to produce large amounts of the polypeptide which may be purified using techniques well known in the art, including but not limited to, immunoaffinity purification using antibodies, immunoprecipitation or chromatographic methods including high performance liquid chromatography (HPLC).

Where the hVR1d coding sequence is engineered to encode a cleavable fusion protein, purification may be readily accomplished using affinity purification techniques. For example, a collagenase cleavage recognition consensus sequence may be engineered between the carboxy terminus of hVR1d and protein A. The resulting fusion protein may be readily purified using an IgG column that binds the protein A moiety. Unfused hVR1d may be readily released from the column by treatment with collagenase. Another example would be the use of pGEX vectors that express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). The fusion protein may be engineered with either thrombin or factor Xa cleavage sites between the cloned gene and the GST moiety. The fusion protein may be easily purified from cell extracts by adsorption to glutathione agarose beads followed by elution in the presence of glutathione. In fact, any cleavage site or enzyme cleavage substrate may be engineered between the hVR1d gene product sequence and a second peptide or protein that has a binding partner which could be used for purification, e.g., an antigen for which an immunoaffinity column can be prepared.

In addition, hVR1d fusion proteins may be readily purified by utilizing an antibody specific for the fusion protein being expressed. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (Janknecht, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the gene's open reading frame is translationally fused

WO 02/44210

PCT/US01/45336

to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. Extracts from cells
5 infected with recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni^{2+} -nitriloacetic acid-
agarose columns and histidine-tagged proteins are selectively eluted with imidazole-
containing buffers.

Alternatively, the hVR1d proteins and polypeptides of the invention can be
produced using chemical methods to synthesize the hVR1d amino acid sequences in
10 whole or in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques,
cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid
chromatography (see, e.g., Creighton, 1983, Proteins Structures And Molecular
Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y., pp. 50-60). The composition of the
synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the
15 Edman degradation procedure; see Creighton, 1983, Proteins, Structures and
Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y., pp. 34-49).

The hVR1d proteins, polypeptides and peptide fragments, mutated, truncated
or deleted forms of hVR1d and/or hVR1d fusion proteins can be prepared for various
uses, including but not limited to, the generation of antibodies, as reagents in
20 diagnostic assays, the identification of other cellular gene products involved in ion
transport, as reagents in assays for screening for compounds for use in the treatment of
ion channel disorders.

5.3. ANTIBODIES TO hVR1d POLYPEPTIDES

25 The present invention also includes antibodies directed to the hVR1d
polypeptides of this invention and methods for the production of those antibodies,
including antibodies that specifically recognize one or more hVR1d epitopes or
epitopes of conserved variants or peptide fragments of hVR1d.

Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal antibodies,
30 monoclonal antibodies (mAbs), humanized or chimeric antibodies, single chain
antibodies, Fab fragments, F(ab')_2 fragments, fragments produced by a Fab expression
library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the
above. Such antibodies may be used, for example, in the detection of a hVR1d
protein or polypeptide in a biological sample and may, therefore, be utilized as part of
35 a diagnostic or prognostic technique whereby patients may be tested for abnormal
levels of hVR1d and/or for the presence of abnormal forms of the protein. Such
antibodies may also be utilized in conjunction with, for example, compound screening

WO 02/44210

PCT/US01/45336

protocols for the evaluation of the effect of test compounds on hVR1d levels and/or activity. Additionally, such antibodies can be used in conjunction with the gene therapy techniques described in Section 5.4, *infra*, to, for example, evaluate normal and/or genetically-engineered hVR1d-expressing cells prior to their introduction into the patient.

For the production of antibodies against hVR1d, various host animals may be immunized by injection with the protein or a portion thereof. Such host animals include rabbits, mice, rats, and baboons. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum.

Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of animals immunized with an antigen, such as a hVR1d polypeptide, or an antigenic functional derivative thereof. For the production of polyclonal antibodies, host animals such as those described above, may be immunized by injection with the hVR1d polypeptide supplemented with adjuvants as also described above.

Monoclonal antibodies, which are homogeneous populations of antibodies to a particular antigen, may be obtained by any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique of Kohler and Milstein (1975, Nature 256: 495-497; and U.S. Patent No. 4,376,110), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof. The hybridomas producing the monoclonal antibodies of this invention may be cultivated *in vitro* or *in vivo*.

In addition, techniques developed for the production of chimeric antibodies (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454) by splicing the genes

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes
- 5 from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human immunoglobulin constant region (see, e.g., Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; and Boss et al., U.S. Patent No. 4,816,397.)
- 10 In addition, techniques have been developed for the production of humanized antibodies (see, e.g., Queen, U.S. Patent No. 5,585,089). Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species having one or more CDRs from the non-human species and a framework region from a human immunoglobulin molecule.
- Alternatively, techniques described for the production of single chain
- 15 antibodies (U.S. Patent 4,946,778; Bird, 1988, Science 242: 423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334: 544-546) can be used in the production of single chain antibodies against hVR1d. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide.
- 20 Furthermore, antibody fragments which recognize specific epitopes of hVR1d may be produced by techniques well known in the art. For example, such fragments include but are not limited to, F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression
- 25 libraries may be constructed (Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity.

5.4. USES OF THE hVR1d NUCLEIC ACID MOLECULES, PROTEINS AND POLYPEPTIDES, AND ANTIBODIES OF THE INVENTION

- 30 As discussed *supra*, the hVR1d nucleic acid molecules of this invention encode proteins that are involved in the formation and/or function of ion channels, more particularly, cation channels. Given the importance of cations such as calcium, sodium or potassium in many cellular processes, the hVR1d nucleic acid molecules
- 35 and proteins and polypeptides of this invention are useful for the diagnosis and treatment of a variety of human disease conditions which involve ion, more particularly, cation, channel dysfunction. For example, calcium plays a role in the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

release of neurotransmitters, hormones and other circulating factors, the expression of numerous regulatory genes as well as the cellular process of apoptosis or cell death. Potassium provides for neuroprotection and also affects insulin secretion. Sodium is involved in the regulation of normal neuronal action potential generation and propagation. Sodium channel blockers such as lidocaine are important analgesics. Therefore, cation channel dysfunction may play a role in many human diseases and disorders such as CNS disorders, e.g., degenerative neurological disorders such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, as well as other neurological disorders such chronic pain, anxiety and depression. Other diseases and disorders that can be affected by ion channel dysfunction include cardiac disorders, e.g., arrhythmia, diabetes, hypercalcemia, hypercalciuria, or ion channel dysfunction that is associated with immunological disorders, GI tract disorders or renal or liver disease. As such, proteins that are involved in either the formation or function of these ion channels (and the nucleic acids that encode those proteins) are useful for the diagnosis and treatment of many human diseases.

Among the uses for the nucleic acid molecules, proteins and polypeptides of the invention are the prognostic and diagnostic evaluation of human disorders involving ion/cation channel dysfunction, and the identification of subjects with a predisposition to such disorders, as described below. Other uses include methods for the treatment of such ion/cation channel dysfunction disorders, for the modulation of hVR1d gene-mediated activity, and for the modulation of hVR1d-mediated effector functions.

In addition, the nucleic acid molecules and proteins and polypeptides of the invention can be used in assays for the identification of compounds which modulate the expression of the hVR1d genes of the invention and/or the activity of the hVR1d gene products. Such compounds can include, for example, other cellular products or small molecule compounds that are involved in cation homeostasis or activity.

5.4.1. DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF ION-RELATED DISORDERS

Methods of the invention for the diagnosis and prognosis of human diseases involving ion, e.g., cation, dysfunction may utilize reagents such as the hVR1d nucleic acid molecules and sequences described in Sections 5.1, *supra*, or antibodies directed against hVR1d proteins or polypeptides, including peptide fragments thereof, as described in Section 5.3., *supra*. Specifically, such reagents may be used, for

WO 02/44210

PCT/US01/45336

example, for: (1) the detection of the presence of hVR1d gene mutations, or the
5 detection of either over- or under-expression of hVR1d gene mRNA relative to the
non-cation dysfunctional state or the qualitative or quantitative detection of
alternatively-spliced forms of hVR1d transcripts which may correlate with certain ion
homeostasis disorders or susceptibility toward such disorders; and (2) the detection of
10 either an over- or an under-abundance of hVR1d gene product relative to the non-
cation dysfunctional state or the presence of a modified (e.g., less than full length)
hVR1d gene product which correlates with a cation dysfunctional state or a
progression toward such a state.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing
pre-packaged diagnostic test kits comprising at least one specific hVR1d gene nucleic
15 acid or anti-hVR1d gene antibody reagent described herein, which may be
conveniently used, e.g., in clinical settings, to screen and diagnose patients exhibiting
ion/cation channel/homeostasis abnormalities and to screen and identify those
individuals exhibiting a predisposition to such abnormalities.

For the detection of hVR1d mutations, any nucleated cell can be used as a
20 starting source for genomic nucleic acid. For the detection of hVR1d transcripts or
hVR1d gene products, any cell type or tissue in which the hVR1d gene is expressed
may be utilized.

Nucleic acid-based detection techniques are described in Section 5.4.1.1.,
infra, whereas peptide-based detection techniques are described in Section 5.4.1.2.,
25 infra.

5.4.1.1. DETECTION OF hVR1d GENE NUCLEIC ACID MOLECULES

Mutations or polymorphisms within the hVR1d gene can be detected by
utilizing a number of techniques. Nucleic acid from any nucleated cell can be used as
30 the starting point for such assay techniques, and may be isolated according to standard
nucleic acid preparation procedures which are well known to those of skill in the art.

Genomic DNA may be used in hybridization or amplification assays of
biological samples to detect abnormalities involving hVR1d gene structure, including
point mutations, insertions, deletions and chromosomal rearrangements. Such assays
35 may include, but are not limited to, direct sequencing (Wong, C. et al., 1987, Nature
330:384-386), single stranded conformational polymorphism analyses (SSCP; Orita,
M. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766-2770), heteroduplex analysis

WO 02/44210

PCT/US01/45336

(Keen, T.J. et al., 1991, *Genomics* 11:199-205; Perry, D.J. & Carrell, R.W., 1992),
 5 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE; Myers, R.M. et al., 1985, *Nucl. Acids Res.* 13:3131-3145), chemical mismatch cleavage (Cotton, R.G. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401) and oligonucleotide hybridization (Wallace, R.B. et al., 1981, *Nucl. Acids Res.* 9:879-894; Lipshutz, R.J. et al., 1995, *Biotechniques* 19:442-447).

10 Diagnostic methods for the detection of hVR1d gene-specific nucleic acid molecules, in patient samples or other appropriate cell sources, may involve the amplification of specific gene sequences, e.g., by PCR, followed by the analysis of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, those listed above. Utilizing analysis techniques such as these, the
 15 amplified sequences can be compared to those which would be expected if the nucleic acid being amplified contained only normal copies of the hVR1d gene in order to determine whether a hVR1d gene mutation exists.

Further, well-known genotyping techniques can be performed to type polymorphisms that are in close proximity to mutations in the hVR1d gene itself.
 20 These polymorphisms can be used to identify individuals in families likely to carry mutations. If a polymorphism exhibits linkage disequilibrium with mutations in the hVR1d gene, it can also be used to identify individuals in the general population likely to carry mutations. Polymorphisms that can be used in this way include restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), which involve sequence variations in
 25 restriction enzyme target sequences, single-base polymorphisms and simple sequence repeat polymorphisms (SSLPs).

For example, Weber (U.S. Pat. No. 5,075,217) describes a DNA marker based on length polymorphisms in blocks of (dC-dA)_n-(dG-dT)_n short tandem repeats. The average separation of (dC-dA)_n-(dG-dT)_n blocks is estimated to be 30,000-60,000 bp.
 30 Markers which are so closely spaced exhibit a high frequency co-inheritance, and are extremely useful in the identification of genetic mutations, such as, for example, mutations within the hVR1d gene, and the diagnosis of diseases and disorders related to hVR1d mutations.

Also, Caskey et al. (U.S. Pat.No. 5,364,759) describe a DNA profiling assay
 35 for detecting short tri- and tetra- nucleotide repeat sequences. The process includes extracting the DNA of interest, such as the hVR1d gene, amplifying the extracted

WO 02/44210

PCT/US01/45336

DNA, and labelling the repeat sequences to form a genotypic map of the individual's
5 DNA.

A hVR1d probe could additionally be used to directly identify RFLPs.

Additionally, a hVR1d probe or primers derived from the hVR1d sequences of the
invention could be used to isolate genomic clones such as YACs, BACs, PACs,
cosmids, phage or plasmids. The DNA contained in these clones can be screened for
10 single-base polymorphisms or simple sequence length polymorphisms (SSLPs) using
standard hybridization or sequencing procedures.

Alternative diagnostic methods for the detection of hVR1d gene-specific
mutations or polymorphisms can include hybridization techniques which involve for
example, contacting and incubating nucleic acids including recombinant DNA
15 molecules, cloned genes or degenerate variants thereof, obtained from a sample, e.g.,
derived from a patient sample or other appropriate cellular source, with one or more
labeled nucleic acid reagents including the hVR1d nucleic acid molecules of the
invention including recombinant DNA molecules, cloned genes or degenerate variants
thereof, as described in Section 5.1 *supra*, under conditions favorable for the specific
20 annealing of these reagents to their complementary sequences within the hVR1d gene.
Preferably, the lengths of these nucleic acid reagents are at least 15 to 30 nucleotides.
After incubation, all non-annealed nucleic acids are removed from the nucleic
acid:hVR1d molecule hybrid. The presence of nucleic acids which have hybridized, if
any such molecules exist, is then detected. Using such a detection scheme, the nucleic
25 acid from the cell type or tissue of interest can be immobilized, for example, to a solid
support such as a membrane, or a plastic surface such as that on a microtiter plate or
polystyrene beads. In this case, after incubation, non-annealed, labeled nucleic acid
molecules of the invention as described in Section 5.1 are easily removed. Detection
of the remaining, annealed, labeled hVR1d nucleic acid reagents is accomplished
30 using standard techniques well-known to those in the art. The hVR1d gene sequences
to which the nucleic acid molecules of the invention have annealed can be compared
to the annealing pattern expected from a normal hVR1d gene sequence in order to
determine whether a hVR1d gene mutation is present.

Quantitative and qualitative aspects of hVR1d gene expression can also be
35 assayed. For example, RNA from a cell type or tissue known, or suspected, to express
the hVR1d gene may be isolated and tested utilizing hybridization or PCR techniques
as described *supra*. The isolated cells can be derived from cell culture or from a

WO 02/44210

PCT/US01/45336

patient. The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the
5 assessment of cells to be used as part of a cell-based gene therapy technique or,
alternatively, to test the effect of compounds on the expression of the hVR1d gene.
Such analyses may reveal both quantitative and qualitative aspects of the expression
pattern of the hVR1d gene, including activation or inactivation of hVR1d gene
expression and presence of alternatively spliced hVR1d transcripts.

10 In one embodiment of such a detection scheme, a cDNA molecule is
synthesized from an RNA molecule of interest (e.g., by reverse transcription of the
RNA molecule into cDNA). All or part of the resulting cDNA is then used as the
template for a nucleic acid amplification reaction, such as a PCR amplification
reaction, or the like. The nucleic acid reagents used as synthesis initiation reagents
15 (e.g., primers) in the reverse transcription and nucleic acid amplification steps of this
method are chosen from among the hVR1d nucleic acid molecules of the invention as
described in Section 5.1, supra. The preferred lengths of such nucleic acid reagents
are at least 9-30 nucleotides.

For detection of the amplified product, the nucleic acid amplification may be
20 performed using radioactively or non-radioactively labeled nucleotides. Alternatively,
enough amplified product may be made such that the product may be visualized by
standard ethidium bromide staining or by utilizing any other suitable nucleic acid
staining protocol or e.g., quantitative PCR.

Such RT-PCR techniques can be utilized to detect differences in hVR1d
25 transcript size which may be due to normal or abnormal alternative splicing.
Additionally, such techniques can be utilized to detect quantitative differences
between levels of full length and/or alternatively-spliced hVR1d transcripts detected
in normal individuals relative to those individuals exhibiting ion dysfunction disorders
or exhibiting a predisposition to toward such disorders.

30 In the case where detection of specific alternatively-spliced species is desired,
appropriate primers and/or hybridization probes can be used, such that, in the absence
of such sequence, no amplification would occur. Alternatively, primer pairs may be
chosen utilizing the sequences depicted in FIGS. 1A or 1B to choose primers which
will yield fragments of differing size depending on whether a particular exon is
35 present or absent from the hVR1d transcript being utilized.

As an alternative to amplification techniques, standard Northern analyses can
be performed if a sufficient quantity of the appropriate cells can be obtained.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Utilizing such techniques, quantitative as well as size-related differences between
5 hVR1d transcripts can also be detected.

Additionally, it is possible to perform hVR1d gene expression assays *in situ*,
i.e., directly upon tissue sections (fixed and/or frozen) of patient tissue obtained from
biopsies or resections, such that no nucleic acid purification is necessary. The nucleic
acid molecules of the invention as described in Section 5.1 may be used as probes
10 and/or primers for such *in situ* procedures (see, for example, Nuovo, G.J., 1992, "PCR
In Situ Hybridization: Protocols And Applications", Raven Press, NY).

5.4.1.2. DETECTION OF hVR1d GENE PRODUCTS

Antibodies directed against wild type or mutant hVR1d gene products or
15 conserved variants or peptide fragments thereof as described *supra* may also be used
for the diagnosis and prognosis of ion or cation-related disorders. Such diagnostic
methods may be used to detect abnormalities in the level of hVR1d gene expression or
abnormalities in the structure and/or temporal, tissue, cellular, or subcellular location
of hVR1d gene products. Antibodies, or fragments of antibodies, may be used to
20 screen potentially therapeutic compounds *in vitro* to determine their effects on hVR1d
gene expression and hVR1d peptide production. The compounds which have
beneficial effects on ion and cation-related disorders can be identified and a
therapeutically effective dose determined.

In vitro immunoassays may be used, for example, to assess the efficacy of cell-
25 based gene therapy for ion or cation-related disorders. For example, antibodies
directed against hVR1d peptides may be used *in vitro* to determine the level of hVR1d
gene expression achieved in cells genetically engineered to produce hVR1d peptides.
Such analysis will allow for a determination of the number of transformed cells
necessary to achieve therapeutic efficacy *in vivo*, as well as optimization of the gene
30 replacement protocol.

The tissue or cell type to be analyzed will generally include those which are
known, or suspected, to express the hVR1d gene. The protein isolation methods
employed may, for example, be such as those described in Harlow, E. and Lane, D.,
1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press,
35 Cold Spring Harbor, New York. The isolated cells can be derived from cell culture or
from a patient. The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

assessment of cells to be used as part of a cell-based gene therapy technique or,
5 alternatively, to test the effect of compounds on the expression of the hVR1d gene.

Preferred diagnostic methods for the detection of hVR1d gene products or conserved variants or peptide fragments thereof, may involve, for example, immunoassays wherein the hVR1d gene products or conserved variants, including gene products which are the result of alternatively-spliced transcripts, or peptide
10 fragments are detected by their interaction with an anti-hVR1d gene product-specific antibody. For example, antibodies, or fragments of antibodies, such as those described in Section 5.3 supra, may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence of hVR1d gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. The antibodies (or fragments thereof) may, additionally, be employed
15 histologically, as in immunofluorescence or immunoelectron microscopy, for in situ detection of hVR1d gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. In situ detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient, and applying thereto a labeled hVR1d antibody of the present invention. The antibody (or fragment) is preferably applied by overlaying the labeled antibody (or
20 fragment) onto a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of the hVR1d gene product, or conserved variants or peptide fragments, but also its distribution in the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily perceive that any of a wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order
25 to achieve such in situ detection.

Immunoassays for hVR1d gene products or conserved variants or peptide fragments thereof will typically comprise incubating a sample, such as a biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells, or lysates of cells which have been incubated in cell culture, in the presence of a detectably labeled antibody capable of
30 identifying hVR1d gene products or conserved variants or peptide fragments thereof, and detecting the bound antibody by any of a number of techniques well-known in the art.

The biological sample may be brought in contact with and immobilized onto a solid phase support or carrier such as nitrocellulose, or other solid support which is
35 capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support may then be washed with suitable buffers followed by treatment with the detectably labeled hVR1d gene specific antibody. The solid phase support may then be washed with the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

buffer a second time to remove unbound antibody. The amount of bound label on
 5 solid support may then be detected by conventional means.

By "solid phase support or carrier" is intended any support capable of binding
 an antigen or an antibody. Well-known supports or carriers include glass, polystyrene,
 polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified
 celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be
 10 either soluble to some extent or insoluble. The support material may have virtually
 any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of
 binding to an antigen or antibody. Thus, the support configuration may be spherical,
 as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external
 surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc.
 15 Preferred supports include polystyrene beads. Those skilled in the art will know many
 other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the
 same by use of routine experimentation.

The binding activity of a given lot of anti-hVR1d gene product antibody may
 be determined according to well known methods. Those skilled in the art will be able
 20 to determine operative and optimal assay conditions for each determination by
 employing routine experimentation.

One of the ways in which the hVR1d gene peptide-specific antibody can be
 detectably labeled is by linking the antibody to an enzyme in an enzyme immunoassay
 (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978,
 25 Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication,
 Walkersville, MD); Voller, A. et al., 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, J.E.,
 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay,
 CRC Press, Boca Raton, FL.; Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay,
 Kigaku Shoin, Tokyo). The enzyme which is bound to the antibody will react with an
 30 appropriate substrate, preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to
 produce a chemical moiety which can be detected, for example, by
 spectrophotometric, fluorometric or by visual means. Enzymes which can be used to
 detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase,
 staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase,
 35 alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish
 peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase,
 ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and

WO 02/44210

PCT/US01/45336

acetylcholinesterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods
 5 which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be
 accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate
 in comparison with similarly prepared standards.

Detection may also be accomplished using any of a variety of other
 immunoassays. For example, by radioactively labeling the antibodies or antibody
 10 fragments, it is possible to detect hVR1d gene peptides through the use of a
 radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., Principles of
 Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,
 The Endocrine Society, March, 1986. The radioactive isotope can be detected by such
 means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography.

15 It is also possible to label the antibody with a fluorescent compound. When
 the fluorescently labeled antibody is exposed to light of the proper wave length, its
 presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used
 fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine,
 phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde and fluorescamine.

20 The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals
 such as ^{152}Eu , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the
 antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentacetic acid
 (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

The antibody also can be detectably labeled by coupling it to a
 25 chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody
 is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the
 course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent
 labeling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole,
 acridinium salt and oxalate ester.

30 Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the
 present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in
 biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the
 chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined
 by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for
 35 purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

5.4.2. SCREENING ASSAYS FOR COMPOUNDS THAT MODULATE hVR1d ACTIVITY

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 Screening assays can be used to identify compounds that modulate hVR1d activity. These compounds can include, but are not limited to, peptides, small organic or inorganic molecules or macromolecules such as nucleic acid molecules or proteins, and may be utilized, e.g., in the control of ion and cation-related disorders, in the modulation of cellular processes such as the release of neurotransmitters or other
10 cellular regulatory factors, cell activation or regulation, cell death and changes in cell membrane properties. These compounds may also be useful, e.g., in elaborating the biological functions of hVR1d gene products, i.e., hVR1 proteins and polypeptides, modulating those biological functions and for ameliorating symptoms of ion or cation-related disorders.

15 The compositions of the invention include pharmaceutical compositions comprising one or more of these compounds. Such pharmaceutical compositions can be formulated as discussed in Section 5.5, *infra*.

More specifically, these compounds can include compounds that bind to hVR1d gene products, compounds that bind to other proteins that interact with a
20 hVR1d gene product and/or interfere with the interaction of the hVR1d gene product with other proteins, and compounds that modulate the activity of the hVR1d gene, i.e., modulate the level of hVR1d gene expression and/or modulate the level of hVR1d gene product or protein activity.

For example, assays may be utilized that identify compounds that bind to hVR1d gene regulatory sequences, e.g., promoter sequences (see e.g., Platt, K.A.,
25 1994, J. Biol. Chem. 269:28558-28562), which compounds may modulate the level of hVR1d gene expression. In addition, functional assays can be used to screen for compounds that modulate hVR1d gene product activity. In such assays, compounds are screened for agonistic or antagonistic activity with respect to a biological activity or function of the hVR1d protein or polypeptide, such as changes in the intracellular
30 levels of an ion or cation, changes in regulatory factor release, or other activities or functions of the hVR1d proteins and polypeptides of the invention.

According to a preferred embodiment, a Ca^{2+} flux assay can be utilized to monitor calcium uptake in hVR1d-expressing host cells. The host cells are pre-loaded
35 with a Ca^{2+} -sensitive fluorescently-labeled dye (e.g., Fluo-4, Fluo-3, Indo-1 or Fura-2), i.e., the intracellular calcium is fluorescently labelled with the dye, and the effect of the compound, e.g., on the intracellular levels of the labeled-calcium determined and compared to the intracellular levels of control cells, e.g., lacking exposure to the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

compound of interest. Compounds that have an agonistic, i.e., stimulatory, modulatory effect on hVR1d activity are those that, when contacted with the hVR1d-expressing cells, produce an increase in intracellular calcium relative to the control cells, whereas those compounds having an antagonistic modulatory effect on hVR1d activity will be those that produce a decrease in intracellular calcium.

Functional assays for monitoring the effects of compounds on the levels or flux of other ions can be similarly performed; for example, the levels of potassium can be monitored using rubidium influx.

Screening assays may also be designed to identify compounds capable of binding to the hVR1d gene product of the invention. Such compounds may be useful, e.g., in modulating the activity of wild type and/or mutant hVR1d gene products, in elaborating the biological function of the hVR1d gene product, and in screens for identifying compounds that disrupt normal hVR1d gene product interactions, or may in themselves disrupt such interactions.

The principle of such screening assays to identify compounds that bind to the hVR1d gene product involves preparing a reaction mixture of the hVR1d gene product and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact with, i.e., bind to, and thus form a complex, which can represent a transient complex, which can be removed and/or detected in the reaction mixture. For example, one assay involves anchoring a hVR1d gene product or the test substance onto a solid phase and detecting hVR1d gene product/test compound

complexes anchored on the solid phase at the end of the reaction. In one embodiment of such a method, the hVR1d gene product may be anchored onto a solid surface, and the test compound, which is not anchored, may be labeled, either directly or indirectly.

The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously non-immobilized component is pre-

labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the previously non-immobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; e.g., using a labeled antibody specific for the previously non-immobilized component (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody).

Alternatively, a reaction can be conducted in a liquid phase, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; e.g., using

WO 02/44210

PCT/US01/45336

an immobilized antibody specific for hVR1d gene product or the test compound to
5 anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other
component of the possible complex to detect anchored complexes.

Compounds that modulate hVR1d gene product activity can also include
compounds that bind to proteins that interact with the hVR1d gene product. These
modulatory compounds can be identified by first identifying those proteins that
10 interact with the hVR1d gene product, e.g., by standard techniques known in the art
for detecting protein-protein interactions, such as co-immunoprecipitation,
crosslinking and co-purification through gradients or chromatographic columns.
Utilizing procedures such as these allows for the isolation of proteins that interact
with hVR1d gene products or polypeptides of the invention as described supra.

15 Once isolated, such a protein can be identified and can, in turn, be used, in
conjunction with standard techniques, to identify additional proteins with which it
interacts. For example, at least a portion of the amino acid sequence of the protein
that interacts with the hVR1d gene product can be ascertained using techniques well
known to those of skill in the art, such as via the Edman degradation technique (see,
20 e.g., Creighton, 1983, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W.H. Freeman
& Co., N.Y., pp.34-49). The amino acid sequence thus obtained may be used as a
guide for the generation of oligonucleotide mixtures that can be used to screen for
gene sequences encoding such proteins. Screening may be accomplished, for
example, by standard hybridization or PCR techniques. Techniques for the generation
25 of oligonucleotide mixtures and screening are well-known (see, e.g., Ausubel, supra,
and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Innis, M. et al., eds.
Academic Press, Inc., New York).

Additionally, methods may be employed that result in the simultaneous
identification of genes which encode proteins interacting with hVR1d gene products
30 or polypeptides. These methods include, for example, probing expression libraries
with labeled hVR1d protein or polypeptide, using hVR1d protein or polypeptide in a
manner similar to the well known technique of antibody probing of λ gt11 libraries.
One method that detects protein interactions in vivo is the two-hybrid system. A
version of this system is described by Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
35 88:9578-9582 and is commercially available from Clontech (Palo Alto, CA).

In addition, compounds that disrupt hVR1d interactions with its interacting or
binding partners, as determined immediately above, may be useful in regulating the

WO 02/44210

PCT/US01/45336

activity of the hVR1d gene product, including mutant hVR1d proteins and
5 polypeptide. Such compounds may include, but are not limited to, molecules such as
peptides, and the like, which may bind to the hVR1d gene product as described above.

The basic principle of the assay systems used to identify compounds that
interfere with the interaction between the hVR1d gene product and its interacting
partner or partners involves preparing a reaction mixture containing the hVR1d gene
10 product, and the interacting partner under conditions and for a time sufficient to allow
the two to interact and bind, thus forming a complex. In order to test a compound for
inhibitory activity, the reaction mixture is prepared in the presence and absence of the
test compound. The test compound may be initially included in the reaction mixture,
or may be added at a time subsequent to the addition of hVR1d gene product and its
15 interacting partner. Control reaction mixtures are incubated without the test
compound or with a placebo. The formation of any complexes between the hVR1d
gene product and the interacting partner is then detected. The formation of a complex
in the control reaction, but not in the reaction mixture containing the test compound,
indicates that the compound interferes with the interaction of the hVR1d gene product
20 and the interacting partner. Additionally, complex formation within reaction mixtures
containing the test compound and a normal hVR1d gene product may also be
compared to complex formation within reaction mixtures containing the test
compound and a mutant hVR1d gene product. This comparison may be important in
those cases wherein it is desirable to identify compounds that disrupt interactions of
25 mutant but not normal hVR1d proteins.

The assay for compounds that interfere with the interaction of hVR1d gene
products and interacting partners can be conducted in a heterogeneous or
homogeneous format. Heterogeneous assays involve anchoring either the hVR1d
gene product or the binding partner onto a solid phase and detecting complexes
30 anchored on the solid phase at the end of the reaction. In homogeneous assays, the
entire reaction is carried out in a liquid phase. In either approach, the order of
addition of reactants can be varied to obtain different information about the
compounds being tested. For example, test compounds that interfere with the
interaction between the hVR1d gene products and the interacting partners, e.g., by
35 competition, can be identified by conducting the reaction in the presence of the test
substance; i.e., by adding the test substance to the reaction mixture prior to or
simultaneously with the hVR1d gene product and interacting partner. Alternatively,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

test compounds that disrupt preformed complexes, e.g., compounds with higher
5 binding constants that displace one of the components from the complex, can be
tested by adding the test compound to the reaction mixture after complexes have been
formed. The various formats are described briefly below.

In a heterogeneous assay system, either the hVR1d gene product or the
interacting partner, is anchored onto a solid surface, while the non-anchored species is
10 labeled, either directly or indirectly. In practice, microtiter plates are conveniently
utilized. The anchored species may be immobilized by non-covalent or covalent
attachments. Non-covalent attachment may be accomplished simply by coating the
solid surface with a solution of the hVR1d gene product or interacting partner and
drying. Alternatively, an immobilized antibody specific for the species to be anchored
15 may be used to anchor the species to the solid surface. The surfaces may be prepared
in advance and stored.

In order to conduct the assay, the partner of the immobilized species is
exposed to the coated surface with or without the test compound. After the reaction is
complete, unreacted components are removed (e.g., by washing) and any complexes
20 formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes
anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the
non-immobilized species is pre-labeled, the detection of label immobilized on the
surface indicates that complexes were formed. Where the non-immobilized species is
not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the
25 surface; e.g., using a labeled antibody specific for the initially non-immobilized
species (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a
labeled anti-Ig antibody). Depending upon the order of addition of reaction
components, test compounds which inhibit complex formation or which disrupt
preformed complexes can be detected.

30 Alternatively, the reaction can be conducted in a liquid phase in the presence
or absence of the test compound, the reaction products separated from unreacted
components, and complexes detected; e.g., using an immobilized antibody specific for
one of the interacting components to anchor any complexes formed in solution, and a
labeled antibody specific for the other partner to detect anchored complexes. Again,
35 depending upon the order of addition of reactants to the liquid phase, test compounds
that inhibit complex formation or that disrupt preformed complexes can be identified.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 In an alternate embodiment, a preformed complex of the hVR1d gene protein
and the interacting partner is prepared in which either the hVR1d gene product or its
interacting partners is labeled, but the signal generated by the label is quenched due to
complex formation (see, e.g., U.S. Patent No. 4,109,496 by Rubenstein which utilizes
this approach for immunoassays). The addition of a test substance that competes with
and displaces one of the species from the preformed complex will result in the
10 generation of a signal above background. In this way, test substances that disrupt
hVR1d gene protein/interacting partner interaction can be identified.

In another embodiment of the invention, these same techniques can be
employed using peptide fragments that correspond to the binding domains of the
hVR1d protein and/or the interacting partner, in place of one or both of the full length
15 proteins. Any number of methods routinely practiced in the art can be used to identify
and isolate the binding sites. These methods include, but are not limited to,
mutagenesis of the gene encoding one of the proteins and screening for disruption of
binding in a co-immunoprecipitation assay. Compensating mutations in the gene
encoding the second species in the complex can then be selected. Sequence analysis
20 of the genes encoding the respective proteins will reveal the mutations that correspond
to the region of the protein involved in interacting, e.g., binding. Alternatively, one
protein can be anchored to a solid surface using methods described in this Section
above, and allowed to interact with, e.g., bind, to its labeled interacting partner, which
has been treated with a proteolytic enzyme, such as trypsin. After washing, a short,
25 labeled peptide comprising the interacting, e.g., binding, domain may remain
associated with the solid material, which can be isolated and identified by amino acid
sequencing. Also, once the gene coding for the intracellular binding partner is
obtained, short gene segments can be engineered to express peptide fragments of the
protein, which can then be tested for binding activity and purified or synthesized.

30 The human HVR1d polypeptides and/or peptides of the present invention, or
immunogenic fragments or oligopeptides thereof, can be used for screening therapeutic
drugs or compounds in a variety of drug screening techniques. The fragment employed
in such a screening assay may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a
cell surface, or located intracellularly. The reduction or abolition of activity of the
35 formation of binding complexes between the ion channel protein and the agent being
tested can be measured. Thus, the present invention provides a method for screening or
assessing a plurality of compounds for their specific binding affinity with a HVR1d

WO 02/44210

PCT/US01/45336

polypeptide, or a bindable peptide fragment, of this invention, comprising providing a plurality of compounds, combining the HVR1d polypeptide, or a bindable peptide fragment, with each of a plurality of compounds for a time sufficient to allow binding under suitable conditions and detecting binding of the HVR1d polypeptide or peptide to each of the plurality of test compounds, thereby identifying the compounds that specifically bind to the HVR1d polypeptide or peptide.

Methods of identifying compounds that modulate the activity of the novel human HVR1d polypeptides and/or peptides are provided by the present invention and comprise combining a potential or candidate compound or drug modulator of calpain biological activity with an HVR1d polypeptide or peptide, for example, the HVR1d amino acid sequence as set forth in SEQ ID NOS:2, and measuring an effect of the candidate compound or drug modulator on the biological activity of the HVR1d polypeptide or peptide. Such measurable effects include, for example, physical binding interaction; the ability to cleave a suitable calpain substrate; effects on native and cloned HVR1d-expressing cell line; and effects of modulators or other calpain-mediated physiological measures.

Another method of identifying compounds that modulate the biological activity of the novel HVR1d polypeptides of the present invention comprises combining a potential or candidate compound or drug modulator of a calpain biological activity with a host cell that expresses the HVR1d polypeptide and measuring an effect of the candidate compound or drug modulator on the biological activity of the HVR1d polypeptide. The host cell can also be capable of being induced to express the HVR1d polypeptide, e.g., via inducible expression. Physiological effects of a given modulator candidate on the HVR1d polypeptide can also be measured. Thus, cellular assays for particular calpain modulators may be either direct measurement or quantification of the physical biological activity of the HVR1d polypeptide, or they may be measurement or quantification of a physiological effect. Such methods preferably employ a HVR1d polypeptide as described herein, or an overexpressed recombinant HVR1d polypeptide in suitable host cells containing an expression vector as described herein, wherein the HVR1d polypeptide is expressed, overexpressed, or undergoes upregulated expression.

Another aspect of the present invention embraces a method of screening for a compound that is capable of modulating the biological activity of a HVR1d polypeptide,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

comprising providing a host cell containing an expression vector harboring a nucleic acid
5 sequence encoding a HVR1d polypeptide, or a functional peptide or portion thereof (e.g.,
SEQ ID NOS:2); determining the biological activity of the expressed HVR1d polypeptide
in the absence of a modulator compound; contacting the cell with the modulator
compound and determining the biological activity of the expressed HVR1d polypeptide
10 in the presence of the modulator compound. In such a method, a difference between the
activity of the HVR1d polypeptide in the presence of the modulator compound and in the
absence of the modulator compound indicates a modulating effect of the compound.

Essentially any chemical compound can be employed as a potential modulator or
ligand in the assays according to the present invention. Compounds tested as calpain
15 modulators can be any small chemical compound, or biological entity (e.g., protein,
sugar, nucleic acid, lipid). Test compounds will typically be small chemical molecules
and peptides. Generally, the compounds used as potential modulators can be dissolved
in aqueous or organic (e.g., DMSO-based) solutions. The assays are designed to screen
large chemical libraries by automating the assay steps and providing compounds from any
20 convenient source. Assays are typically run in parallel, for example, in microtiter formats
on microtiter plates in robotic assays. There are many suppliers of chemical compounds,
including Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis,
MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland), for example. Also,
25 compounds may be synthesized by methods known in the art.

High throughput screening methodologies are particularly envisioned for the
detection of modulators of the novel HVR1d polynucleotides and polypeptides described
herein. Such high throughput screening methods typically involve providing a
combinatorial chemical or peptide library containing a large number of potential
30 therapeutic compounds (e.g., ligand or modulator compounds). Such combinatorial
chemical libraries or ligand libraries are then screened in one or more assays to identify
those library members (e.g., particular chemical species or subclasses) that display a
desired characteristic activity. The compounds so identified can serve as conventional
lead compounds, or can themselves be used as potential or actual therapeutics.

35 A combinatorial chemical library is a collection of diverse chemical compounds
generated either by chemical synthesis or biological synthesis, by combining a number
of chemical building blocks (i.e., reagents such as amino acids). As an example, a linear

WO 02/44210

PCT/US01/45336

combinatorial library, e.g., a polypeptide or peptide library, is formed by combining a set
5 of chemical building blocks in every possible way for a given compound length (i.e., the
number of amino acids in a polypeptide or peptide compound). Millions of chemical
compounds can be synthesized through such combinatorial mixing of chemical building
blocks.

The preparation and screening of combinatorial chemical libraries is well known
10 to those having skill in the pertinent art. Combinatorial libraries include, without
limitation, peptide libraries (e.g. U.S. Patent No. 5,010,175; Furka, 1991, *Int. J. Pept.
Prot. Res.*, 37:487-493; and Houghton et al., 1991, *Nature*, 354:84-88). Other
chemistries for generating chemical diversity libraries can also be used. Nonlimiting
15 examples of chemical diversity library chemistries include, peptoids (PCT Publication
No. WO 91/019735), encoded peptides (PCT Publication No. WO 93/20242), random
bio-oligomers (PCT Publication No. WO 92/00091), benzodiazepines (U.S. Patent No.
5,288,514), diversomers such as hydantoins, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs et
al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909-6913), vinyllogous polypeptides (Hagihara
20 et al., 1992, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568), nonpeptidic peptidomimetics with glucose
scaffolding (Hirschmann et al., 1992, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218), analogous
organic synthesis of small compound libraries (Chen et al., 1994, *J. Amer. Chem. Soc.*,
116:2661), oligocarbamates (Cho et al., 1993, *Science*, 261:1303), and/or peptidyl
25 phosphonates (Campbell et al., 1994, *J. Org. Chem.*, 59:658), nucleic acid libraries (see
Ausubel, Berger and Sambrook, all supra), peptide nucleic acid libraries (U.S. Patent No.
5,539,083), antibody libraries (e.g., Vaughn et al., 1996, *Nature Biotechnology*,
14(3):309-314) and PCT/US96/10287), carbohydrate libraries (e.g., Liang et al., 1996,
Science, 274:1520-1522) and U.S. Patent No. 5,593,853), small organic molecule
30 libraries (e.g., benzodiazepines, Baum C&EN, Jan. 18, 1993, page 33; and U.S. Patent
No. 5,288,514; isoprenoids, U.S. Patent No. 5,569,588; thiazolidinones and
metathiazanones, U.S. Patent No. 5,549,974; pyrrolidines, U.S. Patent Nos. 5,525,735
and 5,519,134; morpholino compounds, U.S. Patent No. 5,506,337; and the like).

Devices for the preparation of combinatorial libraries are commercially available
35 (e.g., 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin,
Woburn, MA; 433A Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050 Plus, Millipore,
Bedford, MA). In addition, a large number of combinatorial libraries are commercially

WO 02/44210

PCT/US01/45336

available (e.g., ComGenex, Princeton, NJ; Asinex, Moscow, Russia; Tripos, Inc., St.
5 Louis, MO; ChemStar, Ltd., Moscow, Russia; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek
Biosciences, Columbia, MD, and the like).

In one embodiment, the invention provides solid phase based *in vitro* assays in
a high throughput format, where the cell or tissue expressing an ion channel is attached
10 to a solid phase substrate. In such high throughput assays, it is possible to screen up to
several thousand different modulators or ligands in a single day. In particular, each well
of a microtiter plate can be used to perform a separate assay against a selected potential
modulator, or, if concentration or incubation time effects are to be observed, every 5-10
wells can test a single modulator. Thus, a single standard microtiter plate can assay about
15 96 modulators. If 1536 well plates are used, then a single plate can easily assay from
about 100 to about 1500 different compounds. It is possible to assay several different
plates per day; thus, for example, assay screens for up to about 6,000-20,000 different
compounds are possible using the described integrated systems.

In another of its aspects, the present invention encompasses screening and small
20 molecule (e.g., drug) detection assays which involve the detection or identification of
small molecules that can bind to a given protein, i.e., a HVR1d polypeptide or peptide.
Particularly preferred are assays suitable for high throughput screening methodologies.

In such binding-based detection, identification, or screening assays, a functional
25 assay is not typically required. All that is needed is a target protein, preferably
substantially purified, and a library or panel of compounds (e.g., ligands, drugs, small
molecules) or biological entities to be screened or assayed for binding to the protein
target. Preferably, most small molecules that bind to the target protein will modulate
activity in some manner, due to preferential, higher affinity binding to functional areas
30 or sites on the protein.

An example of such an assay is the fluorescence based thermal shift assay (3-
Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, PA) as described in U.S. Patent Nos.
6,020,141 and 6,036,920 to Pantoliano et al.; see also, J. Zimmerman, 2000, *Gen. Eng.*
35 *News*, 20(8)). The assay allows the detection of small molecules (e.g., drugs, ligands)
that bind to expressed, and preferably purified, ion channel polypeptide based on affinity
of binding determinations by analyzing thermal unfolding curves of protein-drug or
ligand complexes. The drugs or binding molecules determined by this technique can be

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 further assayed, if desired, by methods, such as those described herein, to determine if the molecules affect or modulate function or activity of the target protein.

To purify a HVR1d polypeptide or peptide to measure a biological binding or ligand binding activity, the source may be a whole cell lysate that can be prepared by successive freeze-thaw cycles (e.g., one to three) in the presence of standard protease inhibitors. The HVR1d polypeptide may be partially or completely purified by standard
10 protein purification methods, e.g., affinity chromatography using specific antibody described *infra*, or by ligands specific for an epitope tag engineered into the recombinant HVR1d polypeptide molecule, also as described herein. Binding activity can then be measured as described.

15 Compounds which are identified according to the methods provided herein, and which modulate or regulate the biological activity or physiology of the HVR1d polypeptides according to the present invention are a preferred embodiment of this invention. It is contemplated that such modulatory compounds may be employed in treatment and therapeutic methods for treating a condition that is mediated by the novel
20 HVR1d polypeptides by administering to an individual in need of such treatment a therapeutically effective amount of the compound identified by the methods described herein.

In addition, the present invention provides methods for treating an individual in
25 need of such treatment for a disease, disorder, or condition that is mediated by the HVR1d polypeptides of the invention, comprising administering to the individual a therapeutically effective amount of the HVR1d-modulating compound identified by a method provided herein.

30

5.4.3. METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF ION CHANNEL-RELATED DISORDERS

The present invention also relates to methods and compositions for the treatment or modulation of any disorder or cellular process that is mediated or
35 regulated by hVR1d gene product expression or function, e.g., hVR1d-mediated cell activation, signal transduction, cellular regulatory factor release, etc. Further, hVR1d effector functions can be modulated via such methods and compositions.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

The methods of the invention include methods that modulate hVR1d gene and gene product activity. In certain instances, the treatment will require an increase, upregulation or activation of hVR1d activity, while in other instances, the treatment will require a decrease, downregulation or suppression of hVR1d activity. "Increase" and "decrease" refer to the differential level of hVR1d activity relative to hVR1d activity in the cell type of interest in the absence of modulatory treatment. Methods for the decrease of hVR1d activity are discussed in Section 5.4.3.1, *infra*. Methods for the increase of hVR1d activity are discussed in Section 5.4.3.2, *infra*. Methods which can either increase or decrease hVR1d activity depending on the particular manner in which the method is practiced are discussed in Section 5.4.3.3, *infra*.

5.4.3.1 METHODS FOR DECREASING hVR1d ACTIVITY

Successful treatment of ion channel/ionic homeostasis disorders, e.g., CNS disorders, cardiac disorders or hypercalcemia, can be brought about by methods which serve to decrease hVR1d activity. Activity can be decreased by, e.g., directly decreasing hVR1d gene product, i.e., protein, activity and/or by decreasing the level of hVR1d gene expression.

For example, compounds such as those identified through assays described in Section 5.4.2., *supra*, that decrease hVR1d gene product activity can be used in accordance with the invention to ameliorate symptoms associated with ion channel/ionic homeostasis disorders. As discussed *supra*, such molecules can include, but are not limited to peptides, including soluble peptides, and small organic or inorganic molecules, and can be referred to as hVR1d antagonists. Techniques for the determination of effective doses and administration of such compounds are described in Section 5.5., *infra*.

In addition, antisense and ribozyme molecules that inhibit hVR1d gene expression can also be used to reduce the level of hVR1d gene expression, thus effectively reducing the level of hVR1d gene product present, thereby decreasing the level of hVR1d protein activity. Still further, triple helix molecules can be utilized in reducing the level of hVR1d gene expression. Such molecules can be designed to reduce or inhibit either wild type, or if appropriate, mutant target gene activity. Techniques for the production and use of such molecules are well known to those of skill in the art.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Antisense approaches involve the design of oligonucleotides (either DNA or
 5 RNA) that are complementary to hVR1d gene mRNA. The antisense oligonucleotides
 will bind to the complementary hVR1d gene mRNA transcripts and prevent
 translation. Absolute complementarity, although preferred, is not required. A
 sequence "complementary" to a portion of an RNA, as referred to herein, means a
 sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize with the RNA,
 10 forming a stable duplex; in the case of double-stranded antisense nucleic acids, a
 single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be
 assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity
 and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing
 nucleic acid, the more base mismatches with an RNA it may contain and still form a
 15 stable duplex (or triplex, as the case may be). One skilled in the art can ascertain a
 tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting
 point of the hybridized complex.

Oligonucleotides that are complementary to the 5' end of the message, e.g., the
 5' untranslated sequence up to and including the AUG initiation codon, should work
 20 most efficiently at inhibiting translation. However, sequences complementary to the
 3' untranslated sequences of mRNAs have recently been shown to be effective at
 inhibiting translation of mRNAs as well. See generally, Wagner, R., 1994, Nature
 372:333-335. Thus, oligonucleotides complementary to either the 5' or 3' non-
 translated, non-coding regions of, e.g., the hVR1d.1 or hVR1d.2 nucleic acids
 25 depicted in FIG. 1 could be used in an antisense approach to inhibit translation of
 endogenous hVR1d gene mRNA.

Oligonucleotides complementary to the 5' untranslated region of the mRNA
 should include the complement of the AUG start codon. Antisense oligonucleotides
 complementary to mRNA coding regions are less efficient inhibitors of translation but
 30 could be used in accordance with the invention. Whether designed to hybridize to the
 5', 3' or coding region of target or pathway gene mRNA, antisense nucleic acids
 should be at least six nucleotides in length, and are preferably oligonucleotides
 ranging from 6 to about 50 nucleotides in length. In specific aspects, the
 oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 17 nucleotides, at least 25
 35 nucleotides or at least 50 nucleotides.

Regardless of the choice of target sequence, it is preferred that *in vitro* studies
 are first performed to quantitate the ability of the antisense oligonucleotide to inhibit

WO 02/44210

PCT/US01/45336

gene expression. It is preferred that these studies utilize controls that distinguish
5 between antisense gene inhibition and non-specific biological effects of
oligonucleotides. It is also preferred that these studies compare levels of the target
RNA or protein with that of an internal control RNA or protein. Additionally, results
obtained using the antisense oligonucleotide are preferably compared with those
obtained using a control oligonucleotide. It is preferred that the control
10 oligonucleotide is of approximately the same length as the antisense oligonucleotide
and that the nucleotide sequence of the control oligonucleotide differs from the
antisense sequence no more than is necessary to prevent specific hybridization to the
target sequence.

The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives
15 or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide
can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for
example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc.

The oligonucleotide may also include other appended groups such as peptides
(e.g., for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across
20 the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT
Application No.

WO 88/09810) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Application No. WO
89/10134), or hybridization-triggered cleavage agents (see, e.g., Krol et al., 1988,
25 BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents (see, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res.
5:539-549). For example, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule,
e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent,
hybridization-triggered cleavage agent, etc.

Oligonucleotides of the invention may be synthesized by standard methods
30 known in the art, e.g., by use of an automated DNA synthesizer (such as are
commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples,
phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein et al.
(1988, Nucl. Acids Res. 16:3209) and methylphosphonate oligonucleotides can be
prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin et al., 1988, Proc.
35 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.

The antisense molecules should be delivered to cells which express the hVR1d
gene *in vivo*. A number of methods have been developed for delivering antisense

WO 02/44210

PCT/US01/45336

DNA or RNA to cells; e.g., antisense molecules can be injected directly into the tissue
 5 site or modified antisense molecules designed to target the desired cells (e.g.,
 antisense linked to peptides or antibodies that specifically bind receptors or antigens
 expressed on the target cell surface) can be administered systemically.

However, it is often difficult to achieve intracellular concentrations of the
 antisense sufficient to suppress translation of endogenous mRNAs. Thus, a preferred
 10 approach utilizes a recombinant DNA construct in which the antisense
 oligonucleotide is placed under the control of a strong pol III or pol II promoter. The
 use of such a construct to transfect target cells in the patient will result in the
 transcription of sufficient amounts of single stranded RNAs that will form
 complementary base pairs with the endogenous hVR1d gene transcripts and thereby
 15 prevent translation of the hVR1d gene mRNA. For example, a vector can be
 introduced in vivo such that it is taken up by a cell and directs the transcription of an
 antisense RNA.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific
 cleavage of RNA (For a review, see, e.g., Rossi, J., 1994, Current Biology 4:469-471).
 20 The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the
 ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by an endonucleolytic
 cleavage. The composition of ribozyme molecules must include one or more
 sequences complementary to the target gene mRNA, and must include the well known
 catalytic sequence responsible for mRNA cleavage. For this sequence, see United
 25 States Patent No. 5,093,246, which is incorporated by reference herein in its entirety.
 As such, within the scope of the invention are engineered hammerhead motif
 ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage
 of RNA sequences encoding target gene proteins. Ribozyme molecules designed to
 catalytically cleave hVR1d gene mRNA transcripts can also be used to prevent
 30 translation of hVR1d gene mRNA and expression of target or pathway genes. (See,
 e.g., PCT Application No. WO 90/11364; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-
 1225).

The ribozymes of the present invention also include RNA endoribonucleases
 (hereinafter referred to as "Cech-type ribozymes") such as the one which occurs
 35 naturally in *Tetrahymena Thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and
 which has been extensively described by Thomas Cech and collaborators (Zaug, et al.,
 1984, Science, 224:574-578; Zaug and Cech, 1986, Science, 231:470-475; Zaug, et

WO 02/44210

PCT/US01/45336

al., 1986, Nature, 324:429-433; PCT Patent Application No. WO 88/04300; Been and
 5 Cech, 1986, Cell, 47:207-216). The Cech-type ribozymes have an eight base pair
 active site which hybridizes to a target RNA sequence, after which cleavage of the
 target RNA takes place. The invention encompasses those Cech-type ribozymes
 which target eight base-pair active site sequences that are present in an hVR1d gene.

As in the antisense approach, the ribozymes can be composed of modified
 10 oligonucleotides (e.g. for improved stability, targeting, etc.) and should be delivered
 to cells which express the hVR1d gene in vivo. A preferred method of delivery
 involves using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong
 constitutive pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient
 quantities of the ribozyme to destroy endogenous hVR1d gene messages and inhibit
 15 translation. Because ribozymes, unlike antisense molecules, are catalytic, a lower
 intracellular concentration is required for efficiency.

Endogenous hVR1d gene expression can also be reduced by inactivating or
 "knocking out" the target and/or pathway gene or its promoter using targeted
 homologous recombination (see, e.g., Smithies et al., 1985, Nature 317:230-234;
 20 Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson et al., 1989 Cell 5:313-321).
 For example, a mutant, non-functional hVR1d gene (or a completely unrelated DNA
 sequence) flanked by DNA homologous to the endogenous hVR1d gene (either the
 coding regions or regulatory regions of the hVR1d gene) can be used, with or without
 a selectable marker and/or a negative selectable marker, to transfect cells that express
 25 the hVR1d gene in vivo. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous
 recombination, results in inactivation of the hVR1d gene. Such techniques can also
 be utilized to generate ion/cation disorder animal models. It should be noted that this
 approach can be adapted for use in humans provided the recombinant DNA constructs
 are directly administered or targeted to the required site in vivo using appropriate viral
 30 vectors, e.g., herpes virus vectors.

Alternatively, endogenous hVR1d gene expression can be reduced by targeting
 deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the hVR1d
 gene (i.e., the hVR1d gene promoter and/or enhancers) to form triple helical structures
 that prevent transcription of the hVR1d gene in target cells in the body (see generally,
 35 Helene, C., 1991, Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene, C., et al., 1992, Ann.
 N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; and Maher, L.J., 1992, Bioassays 14(12):807-15).

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Nucleic acid molecules to be used in triple helix formation for the inhibition of transcription should be single stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides should be designed to promote triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizeable stretches of either purines or pyrimidines to be present on one strand of the duplex. Nucleotide sequences may be pyrimidine-based, which will result in TAT and CGC+ triplets across the three associated strands of the resulting triple helix. The pyrimidine-rich molecules provide base complementarity to a purine-rich region of a single strand of the duplex in a parallel orientation to that strand. In addition, nucleic acid molecules may be chosen that are purine-rich, for example, containing a stretch of G residues. These molecules will form a triple helix with a DNA duplex that is rich in GC pairs, in which the majority of the purine residues are located on a single strand of the targeted duplex, resulting in GGC triplets across the three strands of the triplex.

Alternatively, the potential sequences that can be targeted for triple helix formation may be increased by creating a "switchback" nucleic acid molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner, such that they base pair with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizeable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of the duplex.

In instances wherein the antisense, ribozyme, and/or triple helix molecules described herein are utilized to inhibit mutant hVR1d gene expression, it is possible that the technique may so efficiently reduce or inhibit the transcription (triple helix) and/or translation (antisense, ribozyme) of mRNA produced by normal target gene alleles that the concentration of normal target gene product present may be lower than is necessary for a normal phenotype. In such cases, to ensure that substantially normal levels of hVR1d gene activity are maintained, nucleic acid molecules that encode and express hVR1d polypeptides exhibiting normal target gene activity can be introduced into cells via gene therapy methods that do not contain sequences susceptible to whatever antisense, ribozyme, or triple helix treatments are being utilized. In instances where the target gene encodes an extracellular protein, it can be preferable to coadminister normal target gene protein in order to maintain the requisite level of target gene activity.

Antisense RNA and DNA, ribozyme, and triple helix molecules of the invention can be prepared by any method known in the art, e.g., methods for

WO 02/44210

PCT/US01/45336

chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides well known in the art such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules can be generated by in vitro and in vivo transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences can be incorporated into a wide variety of vectors which incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

In addition, well-known modifications to DNA molecules can be introduced into the hVR1d nucleic acid molecules of the invention as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences of ribo- or deoxy- nucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the oligodeoxyribonucleotide backbone.

5.4.3.2. METHODS FOR INCREASING hVR1d ACTIVITY

Successful treatment of ion/cation disorders can also be brought about by techniques which serve to increase the level of hVR1d activity. Activity can be increased by, for example, directly increasing hVR1d gene product activity and/or by increasing the level of hVR1d gene expression.

For example, compounds such as those identified through the assays described in Section 5.4.2., supra, that increase hVR1d activity can be used to treat ion/cation-related disorders. Such molecules can include, but are not limited to peptides, including soluble peptides, and small organic or inorganic molecules, and can be referred to as hVR1d agonists.

For example, a compound can, at a level sufficient to treat ion/cation-related disorders and symptoms, be administered to a patient exhibiting such symptoms. One of skill in the art will readily know how to determine the concentration of effective, non-toxic doses of the compound, utilizing techniques such as those described in Section 5.5, infra.

Alternatively, in instances wherein the compound to be administered is a peptide compound, DNA sequences encoding the peptide compound can be directly administered to a patient exhibiting an ion/cation-related disorder or symptoms, at a concentration sufficient to produce a level of peptide compound sufficient to

WO 02/44210

PCT/US01/45336

ameliorate the symptoms of the disorder. Any of the techniques discussed infra,
5 which achieve intracellular administration of compounds, such as, for example,
liposome administration, can be utilized for the administration of such DNA
molecules. In the case of peptide compounds which act extracellularly, the DNA
molecules encoding such peptides can be taken up and expressed by any cell type, so
long as a sufficient circulating concentration of peptide results for the elicitation of a
10 reduction in the ion/cation disorder symptoms.

In cases where the ion/cation disorder can be localized to a particular portion
or region of the body, the DNA molecules encoding such modulatory peptides may be
administered as part of a delivery complex. Such a delivery complex can comprise an
appropriate nucleic acid molecule and a targeting means. Such targeting means can
15 comprise, for example, sterols lipids, viruses or target cell specific binding agents.
Viral vectors can include, but are not limited to adenovirus, adeno-associated virus,
and retrovirus vectors, in addition to other particles that introduce DNA into cells,
such as liposomes.

Further, in instances wherein the ion/cation-related disorder involves an
20 aberrant hVR1d gene, patients can be treated by gene replacement therapy. One or
more copies of a normal hVR1d gene or a portion of the gene that directs the
production of a normal hVR1d protein with normal hVR1d protein function, can be
inserted into cells, via, for example a delivery complex as described supra.

Such gene replacement techniques can be accomplished either in vivo or in
25 vitro. Techniques which select for expression within the cell type of interest are
preferred. For in vivo applications, such techniques can, for example, include
appropriate local administration of hVR1d gene sequences.

Additional methods which may be utilized to increase the overall level of
hVR1d activity include the introduction of appropriate hVR1d gene-expressing cells,
30 preferably autologous cells, into a patient at positions and in numbers which are
sufficient to ameliorate the symptoms of the ion/cation-related disorder. Such cells
may be either recombinant or non-recombinant. Among the cells which can be
administered to increase the overall level of hVR1d gene expression in a patient are
normal cells, which express the hVR1d gene. The cells can be administered at the
35 anatomical site of expression, or as part of a tissue graft located at a different site in
the body. Such cell-based gene therapy techniques are well known to those skilled in

WO 02/44210

PCT/US01/45336

the art (see, e.g., Anderson, et al., United States Patent No. 5,399,349; Mulligan and
5 Wilson, United States Patent No. 5,460,959).

hVR1d gene sequences can also be introduced into autologous cells in vitro.
These cells expressing the hVR1d gene sequence can then be reintroduced, preferably
by intravenous administration, into the patient until the disorder is treated and
symptoms of the disorder are ameliorated.

10

5.4.3.3. ADDITIONAL MODULATORY TECHNIQUES

The present invention also includes modulatory techniques which, depending
on the specific application for which they are utilized, can yield either an increase or a
decrease in hVR1d activity levels leading to the amelioration of ion/cation-related
15 disorders such as those described above.

Antibodies exhibiting modulatory capability can be utilized according to the
methods of this invention to treat the ion/cation-related disorders. Depending on the
specific antibody, the modulatory effect can be an increase or decrease in hVR1d
activity. Such antibodies can be generated using standard techniques described in
20 Section 5.3, supra, against full length wild type or mutant hVR1d proteins, or against
peptides corresponding to portions of the proteins. The antibodies include but are not
limited to polyclonal, monoclonal, Fab fragments, single chain antibodies, chimeric
antibodies, etc.

Lipofectin or liposomes can be used to deliver the antibody or a fragment of
25 the Fab region which binds to the hVR1d gene product epitope to cells expressing the
gene product. Where fragments of the antibody are used, the smallest inhibitory
fragment which binds to the hVR1d protein's binding domain is preferred. For
example, peptides having an amino acid sequence corresponding to the domain of the
variable region of the antibody that binds to the hVR1d protein can be used. Such
30 peptides can be synthesized chemically or produced via recombinant DNA technology
using methods well known in the art (e.g., see Creighton, 1983, supra and Sambrook
et al., 1989, supra). Alternatively, single chain antibodies, such as neutralizing
antibodies, which bind to intracellular epitopes can also be administered. Such single
chain antibodies can be administered, for example, by expressing nucleotide
35 sequences encoding single-chain antibodies within the target cell population by
utilizing, for example, techniques such as those described in Marasco et al., 1993,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 5.5. PHARMACEUTICAL PREPARATIONS
AND METHODS OF ADMINISTRATION

The compounds, e.g., nucleic acid sequences, proteins, polypeptides, peptides, and recombinant cells, described supra can be administered to a patient at therapeutically effective doses to treat or ameliorate ion/cation-related disorders. A therapeutically effective dose refers to that amount of a compound or cell population sufficient to result in amelioration of the disorder symptoms, or alternatively, to that amount of a nucleic acid sequence sufficient to express a concentration of hVR1d gene product which results in the amelioration of the disorder symptoms.

Toxicity and therapeutic efficacy of compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds which exhibit large therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects can be used, care should be taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the methods of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention can be formulated in conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers or excipients.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Thus, the compounds and their physiologically acceptable salts and solvents
5 can be formulated for administration by inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral or rectal administration.

For oral administration, the pharmaceutical compositions can take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised
10 maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets can be coated by methods well known in the art. Liquid preparations for oral administration can
15 take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they can be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations can be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or
20 acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations can also contain buffer salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate.

Preparations for oral administration can be suitably formulated to give
25 controlled release of the active compound.

For buccal administration the compositions can take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray
30 presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit can be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of e.g. gelatin for use in an inhaler or
35 insufflator can be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

The compounds can be formulated for parenteral administration (i.e.,
5 intravenous or intramuscular) by injection, via, for example, bolus injection or
continuous infusion. Formulations for injection can be presented in unit dosage form,
e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The
compositions can take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or
aqueous vehicles, and can contain formulatory agents such as suspending, stabilizing
10 and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form
for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use. It
is preferred that hVR1d-expressing cells be introduced into patients via intravenous
administration.

The compounds can also be formulated in rectal compositions such as
15 suppositories or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases
such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds can also
be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations can be
administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by
20 intramuscular injection. Thus, for example, the compounds can be formulated with
suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an
acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for
example, as a sparingly soluble salt.

The compositions can, if desired, be presented in a pack or dispenser device
25 which can contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient.
The pack can for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The
pack or dispenser device can be accompanied by instructions for administration.

30 6. EXAMPLE: IDENTIFICATION OF A NOVEL hVR1d
GENE AND ITS ENCODED PROTEINS

The section below describes the identification of novel human gene sequences
encoding novel human ion channels.

35 6.1. CLONING OF NOVEL hVR1d DNA SEQUENCES

In general all routine molecular biology procedures followed standard
protocols or relied on widely available commercial kits and reagents. All sequencing

WO 02/44210

PCT/US01/45336

was done with an ABI 373 automated sequencer using commercial dye-terminator chemistry.

Known sequence data for hVR1a, hVR1b, hVR1c, and hVR2 were used to screen the EST and genomic public databases. The sequence search program used was gapped BLAST (S.F. Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). The searches identified three Bacterial Artificial Chromosome (BAC) sequences in the public domain high throughput genomic database which contained segments having a significant similarity to but not identical with the query sequences. The accession numbers for these BACs are; AC025125, AC027040, and AC027796. The segments having similarity to the vanilloid family of receptors were searched against the non-redundant protein and nucleic acid databases and these segments were found to encode a potential novel vanilloid receptor. However, the sequence information obtained at this point was not sufficient to identify a complete coding sequence. Complete sequence data was then obtained using both 3' and 5' RACE procedures (M.A. Frohman et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998) and by sequencing cDNA clones isolated from a human brain library as follows:

A PCR primer pair designed from the genomic DNA sequences initially identified above as being homologous to vanilloid receptors, i.e., the BAC sequences, was used to screen a human brain cDNA library for potential cDNA clones. More specifically, a Frag3 primer pair, as follows, forward primer "Frag3-s" CGCAGTGCTGGAACCTCTTCA (SEQ ID NO:19) and reverse primer "Frag3-a" CATCAGAGCAATGAGCATGTTGA (SEQ ID NO:20), in which the reverse primer contained biotin coupled to its 5' end, was used to amplify a biotinylated fragment of hVR1d sequences from the genomic DNA. This DNA fragment was gel purified, denatured and then hybridized to a circular, single-stranded human brain cDNA library constructed using f1 helper phage following standard protocols. Hybridization was carried out at 42°C in 50% formamide, 1.5 M NaCl, 40 mM Na₂H₂PO₄ (pH 7.2), 5 mM EDTA, and 0.2% SDS.

Hybrids between the biotinylated DNA fragment and the circular DNA were captured on streptavidin magnetic beads. After thermal release from the beads, the single-stranded cDNA was converted to double-stranded form using a primer complementary to a T7 promoter sequence in the cDNA cloning vector. The double-stranded cDNA was then introduced into *E. coli* host cells by electroporation and the resulting colonies were screened by PCR, using the original primer pair, to identify

WO 02/44210

PCT/US01/45336

the desired cDNA. Approximately 20 PCR positive clones were obtained. The insert
 5 size was determined for all of the clones and two clones with the largest inserts were
 selected for DNA sequencing.

Additional sequence information was obtained using the RACE method as
 cited above. More specifically, a human fetal brain Marathon[®] cDNA library
 prepared by CLONTECH Laboratories, Inc. was used as a template. A nested PCR
 10 reaction was used to obtain 5' sequence data. The two gene-specific primers, derived
 from the genomic sequence data, were "1D5R2"
 (GCCCAGGATGTCGTTCTCTTCAGC (SEQ ID NO:21)) in the first round of
 amplification and "1D5R3" (GATCCGCACTATCTCCTTGGTGTGG (SEQ ID
 NO:22)) in the subsequent round. A single round of amplification was used to obtain
 15 3' sequence data using the gene-specific primer "1D3R2"
 (ACTGAATGGAAGACGCACGTCTCTTC (SEQ ID NO:23)). For both the 5' and
 3' RACE amplifications, CLONTECH'S primer "AP1" was used as the second
 primer. RACE products were cloned using Invitrogen Corporation's TOPO TA
 Cloning[®] Kit following manufacturer's instructions. Insert size was assessed by
 20 restriction digest and clones having the largest inserts were then sequenced.

The nucleic acid sequences derived by these procedures are depicted in FIGS.
 1A and 1B which identify, respectively, two splice variants of the coding sequence for
 novel cDNA clone hVR1d, i.e., hVR1d.1 and hVR1d.2. The derived protein, i.e.,
 amino acid, sequences encoded by the hVR1d.1 and hVR1d.2 splice variants are
 25 depicted in FIGS. 2A and 2B, respectively.

Example 2 - Expression Profiling Of The Novel Human hVR1d.1 and hVR1d.2 Polypeptides.

Expression profiling studies utilizing the hVR1d nucleic acid sequences
 30 described above were carried out as follows: PCR primers were designed from the
 BAC sequences identified supra was used to measure tissue levels of hVR1d mRNA
 by quantitative PCR using Applied Biosystems' GeneAmp 5700. The forward primer
 was TGACCTGAACATCCAGCAGA (SEQ ID NO:24) and the reverse primer was
 AGCATGTTGAGGAGGAGAACA (SEQ ID NO:25). The primers did not
 35 distinguish between hVR1d.1 and hVR1d.2. In the PCR procedure, first strand cDNA
 was made from commercially available mRNA isolated from various tissue sources
 (CLONTECH). In addition, the relative amount of cDNA used in each assay was

WO 02/44210

PCT/US01/45336

determined by performing a parallel experiment using a primer pair for cyclophilin, a gene expressed in equal amounts in all tissues. The cyclophilin primer pair detected small variations in the amount of cDNA in each sample and these data were used for normalization of the data obtained with the hVR1d primer pair. The PCR data was converted into a relative assessment of the difference in transcript abundance amongst the tissues tested and the data is presented in FIG. 4.

As depicted in FIG. 4, hVR1d is highly expressed in various brain tissues as well as spinal cord tissue. With regard to the brain tissues, hVR1d is most highly expressed in the corpus callosum (CC), caudate nucleus (CN), and amygdala (A) of the brain.

Moreover, additional expression profiling experiments were performed to identify the relative expression of the hVR1d splice variant, hVR1d.2, nucleic acid in various tissues, including brain subregions. The experiments were performed as described above using the primer pair that follows. The forward primer was CGGAAACCTCGGTGTAGAAG (SEQ ID NO:26) and the reverse primer was TCATCCCTCAAAGCCTCTCT (SEQ ID NO:27).

As shown in Figure 5, the hVR1d.2 polypeptide had a very similar expression profile as the hVR1d.1 polypeptide. However, the hVR1d.2 polypeptide did show some differential expression in the brain subregions, as shown in Figure 6. Specifically, the hVR1d.2 polypeptide was significantly more expressed in thalamus and substantia nigra, with a lower level of expression in amygdala, as compared to the hVR1d.1 polypeptide. The observed differential expression emphasizes the potentially related, yet diverse, roles of the hVR1d.1 and hVR1d.2 polypeptides, and may suggest that either one of the polypeptides may have utility as a druggable target for the treatment of different neural diseases and/or disorders.

Example 3 - Method of Creating N- and C-terminal Deletion Mutants Corresponding to the HVR1d.1 and hVR1d.2 polypeptides of the Present Invention.

As described elsewhere herein, the present invention encompasses the creation of N- and C-terminal deletion mutants, in addition to any combination of N- and C-terminal deletions thereof, corresponding to the HVR1d.1 and hVR1d.2 polypeptides of the present invention. A number of methods are available to one skilled in the art for creating such mutants. Such methods may include a combination of PCR amplification and gene cloning methodology. Although one of skill in the art of molecular biology,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

through the use of the teachings provided or referenced herein, and/or otherwise known
 5 in the art as standard methods, could readily create each deletion mutant of the present
 invention, exemplary methods are described below.

Briefly, using the isolated cDNA clone encoding the full-length HVR1d.1 or
 hVR1d.2 polypeptide sequence, appropriate primers of about 15-25 nucleotides derived
 10 from the desired 5' and 3' positions of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 may be designed
 to PCR amplify, and subsequently clone, the intended N- and/or C-terminal deletion
 mutant. Such primers could comprise, for example, an initiation and stop codon for the
 5' and 3' primer, respectively. Such primers may also comprise restriction sites to
 facilitate cloning of the deletion mutant post amplification. Moreover, the primers may
 15 comprise additional sequences, such as, for example, flag-tag sequences, kozac
 sequences, or other sequences discussed and/or referenced herein.

For example, in the case of the H394 to R720 N-terminal deletion mutant, the
 following primers could be used to amplify a cDNA fragment corresponding to this
 deletion mutant:

20

5' Primer	5'-GCAGCA <u>GCGGCCGC</u> CACATGTTCTTTCTGTCCTTCTGC -3' (SEQ ID NO:28) <i>NotI</i>
25 3' Primer	5'-GCAGCA <u>GTCGAC</u> CCTCACAGCGACAGTACCTGTTCG -3' (SEQ ID NO:29) <i>SalI</i>

30 For example, in the case of the M1 to N626 C-terminal deletion mutant, the
 following primers could be used to amplify a cDNA fragment corresponding to this
 deletion mutant:

35 5' Primer	5'-GCAGCA <u>GCGGCCGC</u> ATGAGCTTTATTTGCAGGCCACGAG -3' (SEQ ID NO:30) <i>NotI</i>
--------------------	--

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 3' Primer	5'- GCAGCA <u>GTCGAC</u> GTTGAGGAGGAGAACAAGGTGAGG -3' (SEQ ID NO:31) <i>Sall</i>
-------------------	--

Representative PCR amplification conditions are provided below, although the skilled artisan would appreciate that other conditions may be required for efficient amplification. A 100 μ l PCR reaction mixture may be prepared using 10ng of the template DNA (cDNA clone of HVR1d.1 and hVR1d.2), 200 μ M 4dNTPs, 1 μ M primers, 0.25U Taq DNA polymerase (PE), and standard Taq DNA polymerase buffer. Typical PCR cycling condition are as follows:

20-25 cycles: 45 sec, 93 degrees
2 min, 50 degrees
2 min, 72 degrees
1 cycle: 10 min, 72 degrees

After the final extension step of PCR, 5U Klenow Fragment may be added and incubated for 15 min at 30 degrees.

Upon digestion of the fragment with the NotI and Sall restriction enzymes, the fragment could be cloned into an appropriate expression and/or cloning vector which has been similarly digested (e.g., pSport1, among others). The skilled artisan would appreciate that other plasmids could be equally substituted, and may be desirable in certain circumstances. The digested fragment and vector are then ligated using a DNA ligase, and then used to transform competent E.coli cells using methods provided herein and/or otherwise known in the art.

The 5' primer sequence for amplifying any additional N-terminal deletion mutants may be determined by reference to the following formula:

$(S+(X * 3))$ to $((S+(X * 3))+25)$, wherein 'S' is equal to the nucleotide position of the initiating start codon of the HVR1d.1 or hVR1d.2 gene (SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3), and 'X' is equal to the most N-terminal amino acid of the intended N-terminal deletion mutant. The first term will provide the start 5' nucleotide position of the 5' primer, while the second term will provide the end 3' nucleotide position of the 5' primer

WO 02/44210

PCT/US01/45336

corresponding to sense strand of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. Once the
 5 corresponding nucleotide positions of the primer are determined, the final nucleotide
 sequence may be created by the addition of applicable restriction site sequences to the 5'
 end of the sequence, for example. As referenced herein, the addition of other sequences
 to the 5' primer may be desired in certain circumstances (e.g., kozac sequences, etc.).

The 3' primer sequence for amplifying any additional N-terminal deletion
 10 mutants may be determined by reference to the following formula:

$(S+(X * 3))$ to $((S+(X * 3))-25)$, wherein 'S' is equal to the nucleotide position
 of the initiating start codon of the HVR1d.1 or hVR1d.2 gene (SEQ ID NO:1 or SEQ ID
 NO:3), and 'X' is equal to the most C-terminal amino acid of the intended N-terminal
 15 deletion mutant. The first term will provide the start 5' nucleotide position of the 3'
 primer, while the second term will provide the end 3' nucleotide position of the 3' primer
 corresponding to the anti-sense strand of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. Once the
 corresponding nucleotide positions of the primer are determined, the final nucleotide
 sequence may be created by the addition of applicable restriction site sequences to the 5'
 20 end of the sequence, for example. As referenced herein, the addition of other sequences
 to the 3' primer may be desired in certain circumstances (e.g., stop codon sequences,
 etc.). The skilled artisan would appreciate that modifications of the above nucleotide
 positions may be necessary for optimizing PCR amplification.

The same general formulas provided above may be used in identifying the 5' and
 25 3' primer sequences for amplifying any C-terminal deletion mutant of the present
 invention. Moreover, the same general formulas provided above may be used in
 identifying the 5' and 3' primer sequences for amplifying any combination of N-terminal
 and C-terminal deletion mutant of the present invention. The skilled artisan would
 30 appreciate that modifications of the above nucleotide positions may be necessary for
 optimizing PCR amplification.

Example 4 - Method Of Enhancing The Biological Activity/Functional Characteristics Of Invention Through Molecular Evolution.

35 Although many of the most biologically active proteins known are highly
 effective for their specified function in an organism, they often possess characteristics
 that make them undesirable for transgenic, therapeutic, pharmaceutical, and/or industrial

WO 02/44210

PCT/US01/45336

applications. Among these traits, a short physiological half-life is the most prominent
5 problem, and is present either at the level of the protein, or the level of the proteins
mRNA. The ability to extend the half-life, for example, would be particularly important
for a proteins use in gene therapy, transgenic animal production, the bioprocess
production and purification of the protein, and use of the protein as a chemical modulator
10 among others. Therefore, there is a need to identify novel variants of isolated proteins
possessing characteristics which enhance their application as a therapeutic for treating
diseases of animal origin, in addition to the proteins applicability to common industrial
and pharmaceutical applications.

Thus, one aspect of the present invention relates to the ability to enhance specific
15 characteristics of invention through directed molecular evolution. Such an enhancement
may, in a non-limiting example, benefit the inventions utility as an essential component
in a kit, the inventions physical attributes such as its solubility, structure, or codon
optimization, the inventions specific biological activity, including any associated
enzymatic activity, the proteins enzyme kinetics, the proteins K_i , K_{cat} , K_m , V_{max} , K_d ,
20 protein-protein activity, protein-DNA binding activity, antagonist/inhibitory activity
(including direct or indirect interaction), agonist activity (including direct or indirect
interaction), the proteins antigenicity (e.g., where it would be desirable to either increase
or decrease the antigenic potential of the protein), the immunogenicity of the protein, the
25 ability of the protein to form dimers, trimers, or multimers with either itself or other
proteins, the antigenic efficacy of the invention, including its subsequent use a
preventative treatment for disease or disease states, or as an effector for targeting diseased
genes. Moreover, the ability to enhance specific characteristics of a protein may also be
applicable to changing the characterized activity of an enzyme to an activity completely
30 unrelated to its initially characterized activity. Other desirable enhancements of the
invention would be specific to each individual protein, and would thus be well known in
the art and contemplated by the present invention.

For example, an engineered ion channel may be constitutively active upon
binding of its cognate ligand. Alternatively, an engineered ion channel may be
35 constitutively active in the absence of ligand binding. In yet another example, an
engineered ion channel may be capable of being activated with less than all of the
regulatory factors and/or conditions typically required for ion channel activation (e.g.,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

ligand binding, phosphorylation, conformational changes, calcium flux, etc.). Such ion
5 channel would be useful in screens to identify ion channel modulators, among other uses
described herein.

Directed evolution is comprised of several steps. The first step is to establish a
library of variants for the gene or protein of interest. The most important step is to then
10 select for those variants that entail the activity you wish to identify. The design of the
screen is essential since your screen should be selective enough to eliminate non-useful
variants, but not so stringent as to eliminate all variants. The last step is then to repeat
the above steps using the best variant from the previous screen. Each successive cycle,
can then be tailored as necessary, such as increasing the stringency of the screen, for
15 example.

Over the years, there have been a number of methods developed to introduce
mutations into macromolecules. Some of these methods include, random mutagenesis,
“error-prone” PCR, chemical mutagenesis, site-directed mutagenesis, and other methods
well known in the art (for a comprehensive listing of current mutagenesis methods, see
20 Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold
Spring, NY (1982)). Typically, such methods have been used, for example, as tools for
identifying the core functional region(s) of a protein or the function of specific domains
of a protein (if a multi-domain protein). However, such methods have more recently been
25 applied to the identification of macromolecule variants with specific or enhanced
characteristics.

Random mutagenesis has been the most widely recognized method to date.
Typically, this has been carried out either through the use of “error-prone” PCR (as
described in Moore, J., et al, *Nature Biotechnology* 14:458, (1996), or through the
30 application of randomized synthetic oligonucleotides corresponding to specific regions
of interest (as described by Derbyshire, K.M. et al, *Gene*, 46:145-152, (1986), and Hill,
DE, et al, *Methods Enzymol.*, 55:559-568, (1987). Both approaches have limits to the
level of mutagenesis that can be obtained. However, either approach enables the
investigator to effectively control the rate of mutagenesis. This is particularly important
35 considering the fact that mutations beneficial to the activity of the enzyme are fairly rare.
In fact, using too high a level of mutagenesis may counter or inhibit the desired benefit
of a useful mutation.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

While both of the aforementioned methods are effective for creating randomized pools of macromolecule variants, a third method, termed "DNA Shuffling", or "sexual PCR" (WPC, Stemmer, PNAS, 91:10747, (1994)) has recently been elucidated. DNA shuffling has also been referred to as "directed molecular evolution", "exon-shuffling", "directed enzyme evolution", "in vitro evolution", and "artificial evolution". Such reference terms are known in the art and are encompassed by the invention. This new, preferred, method apparently overcomes the limitations of the previous methods in that it not only propagates positive traits, but simultaneously eliminates negative traits in the resulting progeny.

DNA shuffling accomplishes this task by combining the principal of in vitro recombination, along with the method of "error-prone" PCR. In effect, you begin with a randomly digested pool of small fragments of your gene, created by Dnase I digestion, and then introduce said random fragments into an "error-prone" PCR assembly reaction. During the PCR reaction, the randomly sized DNA fragments not only hybridize to their cognate strand, but also may hybridize to other DNA fragments corresponding to different regions of the polynucleotide of interest - regions not typically accessible via hybridization of the entire polynucleotide. Moreover, since the PCR assembly reaction utilizes "error-prone" PCR reaction conditions, random mutations are introduced during the DNA synthesis step of the PCR reaction for all of the fragments -further diversifying the potential hybridization sites during the annealing step of the reaction.

A variety of reaction conditions could be utilized to carry-out the DNA shuffling reaction. However, specific reaction conditions for DNA shuffling are provided, for example, in PNAS, 91:10747, (1994). Briefly:

Prepare the DNA substrate to be subjected to the DNA shuffling reaction. Preparation may be in the form of simply purifying the DNA from contaminating cellular material, chemicals, buffers, oligonucleotide primers, deoxynucleotides, RNAs, etc., and may entail the use of DNA purification kits as those provided by Qiagen, Inc., or by the Promega, Corp., for example.

Once the DNA substrate has been purified, it would be subjected to Dnase I digestion. About 2-4ug of the DNA substrate(s) would be digested with .0015 units of Dnase I (Sigma) per ul in 100ul of 50mM Tris-HCL, pH 7.4/1mM MgCl2 for 10-20 min. at room temperature. The resulting fragments of 10-50bp could then be purified by

WO 02/44210

PCT/US01/45336

running them through a 2% low-melting point agarose gel by electrophoresis onto DE81
5 ion-exchange paper (Whatman) or could be purified using Microcon concentrators
(Amicon) of the appropriate molecular weight cutoff, or could use oligonucleotide
purification columns (Qiagen), in addition to other methods known in the art. If using
DE81 ion-exchange paper, the 10-50bp fragments could be eluted from said paper using
10 1M NaCl, followed by ethanol precipitation.

The resulting purified fragments would then be subjected to a PCR assembly
reaction by re-suspension in a PCR mixture containing: 2mM of each dNTP, 2.2mM
MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM Tris•HCl, pH 9.0, and 0.1% Triton X-100, at a final
fragment concentration of 10-30ng/ul. No primers are added at this point. *Taq* DNA
15 polymerase (Promega) would be used at 2.5 units per 100ul of reaction mixture. A PCR
program of 94 C for 60s; 94 C for 30s, 50-55 C for 30s, and 72 C for 30s using 30-45
cycles, followed by 72 C for 5min using an MJ Research (Cambridge, MA) PTC-150
thermocycler. After the assembly reaction is completed, a 1:40 dilution of the resulting
primerless product would then be introduced into a PCR mixture (using the same buffer
20 mixture used for the assembly reaction) containing 0.8um of each primer and subjecting
this mixture to 15 cycles of PCR (using 94 C for 30s, 50 C for 30s, and 72 C for 30s).
The referred primers would be primers corresponding to the nucleic acid sequences of
the polynucleotide(s) utilized in the shuffling reaction. Said primers could consist of
25 modified nucleic acid base pairs using methods known in the art and referred to else
where herein, or could contain additional sequences (i.e., for adding restriction sites,
mutating specific base-pairs, etc.).

The resulting shuffled, assembled, and amplified product can be purified using
methods well known in the art (e.g., Qiagen PCR purification kits) and then subsequently
30 cloned using appropriate restriction enzymes.

Although a number of variations of DNA shuffling have been published to date,
such variations would be obvious to the skilled artisan and are encompassed by the
invention. The DNA shuffling method can also be tailored to the desired level of
mutagenesis using the methods described by Zhao, et al. (Nucl Acid Res., 25(6):1307-
35 1308, (1997).

As described above, once the randomized pool has been created, it can then be
subjected to a specific screen to identify the variant possessing the desired

WO 02/44210

PCT/US01/45336

characteristic(s). Once the variant has been identified, DNA corresponding to the variant
5 could then be used as the DNA substrate for initiating another round of DNA shuffling.
This cycle of shuffling, selecting the optimized variant of interest, and then re-shuffling,
can be repeated until the ultimate variant is obtained. Examples of model screens applied
to identify variants created using DNA shuffling technology may be found in the
10 following publications: J. C., Moore, et al., J. Mol. Biol., 272:336-347, (1997), F.R.,
Cross, et al., Mol. Cell. Biol., 18:2923-2931, (1998), and A. Cramer, et al., Nat.
Biotech., 15:436-438, (1997).

DNA shuffling has several advantages. First, it makes use of beneficial
mutations. When combined with screening, DNA shuffling allows the discovery of the
15 best mutational combinations and does not assume that the best combination contains all
the mutations in a population. Secondly, recombination occurs simultaneously with point
mutagenesis. An effect of forcing DNA polymerase to synthesize full-length genes from
the small fragment DNA pool is a background mutagenesis rate. In combination with a
stringent selection method, enzymatic activity has been evolved up to 16000 fold increase
20 over the wild-type form of the enzyme. In essence, the background mutagenesis yielded
the genetic variability on which recombination acted to enhance the activity.

A third feature of recombination is that it can be used to remove deleterious
mutations. As discussed above, during the process of the randomization, for every one
25 beneficial mutation, there may be at least one or more neutral or inhibitory mutations.
Such mutations can be removed by including in the assembly reaction an excess of the
wild-type random-size fragments, in addition to the random-size fragments of the
selected mutant from the previous selection. During the next selection, some of the most
active variants of the polynucleotide/polypeptide/enzyme, should have lost the inhibitory
30 mutations.

Finally, recombination enables parallel processing. This represents a significant
advantage since there are likely multiple characteristics that would make a protein more
desirable (e.g. solubility, activity, etc.). Since it is increasingly difficult to screen for
more than one desirable trait at a time, other methods of molecular evolution tend to be
35 inhibitory. However, using recombination, it would be possible to combine the
randomized fragments of the best representative variants for the various traits, and then
select for multiple properties at once.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

DNA shuffling can also be applied to the polynucleotides and polypeptides of the present invention to decrease their immunogenicity in a specified host, particularly if the polynucleotides and polypeptides provide a therapeutic use. For example, a particular variant of the present invention may be created and isolated using DNA shuffling technology. Such a variant may have all of the desired characteristics, though may be highly immunogenic in a host due to its novel intrinsic structure. Specifically, the desired characteristic may cause the polypeptide to have a non-native structure which could no longer be recognized as a "self" molecule, but rather as a "foreign", and thus activate a host immune response directed against the novel variant. Such a limitation can be overcome, for example, by including a copy of the gene sequence for a xenobiotic ortholog of the native protein in with the gene sequence of the novel variant gene in one or more cycles of DNA shuffling. The molar ratio of the ortholog and novel variant DNAs could be varied accordingly. Ideally, the resulting hybrid variant identified would contain at least some of the coding sequence which enabled the xenobiotic protein to evade the host immune system, and additionally, the coding sequence of the original novel variant that provided the desired characteristics.

Likewise, the invention encompasses the application of DNA shuffling technology to the evolution of polynucleotides and polypeptides of the invention, wherein one or more cycles of DNA shuffling include, in addition to the gene template DNA, oligonucleotides coding for known allelic sequences, optimized codon sequences, known variant sequences, known polynucleotide polymorphism sequences, known ortholog sequences, known homolog sequences, additional homologous sequences, additional non-homologous sequences, sequences from another species, and any number and combination of the above.

In addition to the described methods above, there are a number of related methods that may also be applicable, or desirable in certain cases. Representative among these are the methods discussed in PCT applications WO 98/31700, and WO 98/32845, which are hereby incorporated by reference. Furthermore, related methods can also be applied to the polynucleotide sequences of the present invention in order to evolve invention for creating ideal variants for use in gene therapy, protein engineering, evolution of whole cells containing the variant, or in the evolution of entire enzyme pathways containing polynucleotides of the invention as described in PCT applications WO 98/13485, WO

WO 02/44210

PCT/US01/45336

98/13487, WO 98/27230, WO 98/31837, and Cramer, A., et al., Nat. Biotech., 15:436-438, (1997), respectively.

Additional methods of applying "DNA Shuffling" technology to the polynucleotides and polypeptides of the present invention, including their proposed applications, may be found in US Patent No. 5,605,793; PCT Application No. WO 95/22625; PCT Application No. WO 97/20078; PCT Application No. WO 97/35966; and PCT Application No. WO 98/42832; PCT Application No. The forgoing are hereby incorporated in their entirety herein for all purposes.

Example 5 - Method of Assessing the Putative Ion Channel Activity of the hVR1d

Polypeptides.

A number of methods may be employed to assess the potential ion channel activity of the hVR1d polypeptides. One preferred method is described below

CHO-K1 cells transfected with a suitable mammalian expression vector comprising the hVR1d encoding polynucleotide sequence is prepared using methods known in the art. The transfected cells are transferred to cover slips 12 hours after transfection, and electrophysiological measurements are made 24 hours after transfection ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). The hVR1d-expressing CHO-K1 cells are detected by GFP fluorescence. Membrane currents are digitized at 10 or 20 kHz and digitally filtered off line at 1 kHz. Voltage stimuli lasting 500 ms are delivered at 5-s intervals, with either voltage ramps or voltage steps from 100 to +100 mV. The internal pipette solution for macroscopic and single-channel currents may contain 145 mM Cs-methanesulfonate, 8 mM NaCl, 5 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 4.1 mM CaCl₂, and 10 mM Hepes, with pH adjusted to 7.2 with CsOH after addition of ATP. The standard extracellular solution may contain 140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2.8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, and 10 mM glucose, with pH adjusted to 7.4 with NaOH. Relative ion permeabilities may be measured with the pipette solution containing 145 mM Cs-methanesulfonate, 10 mM CsCl, 5 mM ATP, 10 mM EGTA, and 10 mM Hepes (pH 7.2) and the external solution containing 110 mM NMDG+, 30 mM X+ (Na+, Ca²⁺, K+, or Cs+), 10 mM Hepes, and 10 mM glucose (pH 7.4). The relative permeability for monovalent ions may be calculated according to the equation $PX/PCs = ([Cs+]_o/[X+]_o) \exp[F(EX - ECs)/RT]$. The PCa/PCs permeability ratio is calculated according to the equation $PCa/PCs =$

WO 02/44210

PCT/US01/45336

$$\{[Cs+]Joexp(FECs/RT)exp(FECa/RT)[exp(FECa/RT)+1]\}/(4[Ca^{2+}]o)$$
, where R, T, and
 5 F are the gas constant, absolute temperature, and Faraday's constant, respectively.
 Statistical comparisons are made with the two-way analysis of variance (ANOVA) and
 two-tailed t test with Bonferroni correction; $P < 0.05$ indicated statistical significance.

10 Example 6 - Bacterial Expression Of A Polypeptide.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention is amplified
 using PCR oligonucleotide primers corresponding to the 5' and 3' ends of the DNA
 sequence, to synthesize insertion fragments. The primers used to amplify the cDNA
 insert should preferably contain restriction sites, such as BamHI and XbaI, at the 5' end
 15 of the primers in order to clone the amplified product into the expression vector. For
 example, BamHI and XbaI correspond to the restriction enzyme sites on the bacterial
 expression vector pQE-9. (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). This plasmid vector encodes
 antibiotic resistance (Amp^r), a bacterial origin of replication (ori), an IPTG-regulatable
 promoter/operator (P/O), a ribosome binding site (RBS), a 6-histidine tag (6-His), and
 20 restriction enzyme cloning sites.

The pQE-9 vector is digested with BamHI and XbaI and the amplified fragment
 is ligated into the pQE-9 vector maintaining the reading frame initiated at the bacterial
 RBS. The ligation mixture is then used to transform the E. coli strain M15/rep4 (Qiagen,
 25 Inc.) which contains multiple copies of the plasmid pREP4, that expresses the lacI
 repressor and also confers kanamycin resistance (Kan^r). Transformants are identified by
 their ability to grow on LB plates and ampicillin/kanamycin resistant colonies are
 selected. Plasmid DNA is isolated and confirmed by restriction analysis.

Clones containing the desired constructs are grown overnight (O/N) in liquid
 30 culture in LB media supplemented with both Amp (100 ug/ml) and Kan (25 ug/ml). The
 O/N culture is used to inoculate a large culture at a ratio of 1:100 to 1:250. The cells are
 grown to an optical density 600 (O.D.600) of between 0.4 and 0.6. IPTG (Isopropyl-B-
 D-thiogalactopyranoside) is then added to a final concentration of 1 mM. IPTG induces
 by inactivating the lacI repressor, clearing the P/O leading to increased gene expression.
 35

Cells are grown for an extra 3 to 4 hours. Cells are then harvested by
 centrifugation (20 mins at 6000Xg). The cell pellet is solubilized in the chaotropic agent
 6 Molar Guanidine HCl by stirring for 3-4 hours at 4 degree C. The cell debris is

WO 02/44210

PCT/US01/45336

removed by centrifugation, and the supernatant containing the polypeptide is loaded onto
5 a nickel-nitrilo-tri-acetic acid ("Ni-NTA") affinity resin column (available from
QIAGEN, Inc., supra). Proteins with a 6 x His tag bind to the Ni-NTA resin with high
affinity and can be purified in a simple one-step procedure (for details see: The
QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., supra).

10 Briefly, the supernatant is loaded onto the column in 6 M guanidine-HCl, pH 8,
the column is first washed with 10 volumes of 6 M guanidine-HCl, pH 8, then washed
with 10 volumes of 6 M guanidine-HCl pH 6, and finally the polypeptide is eluted with
6 M guanidine-HCl, pH 5.

The purified protein is then renatured by dialyzing it against phosphate-buffered
15 saline (PBS) or 50 mM Na-acetate, pH 6 buffer plus 200 mM NaCl. Alternatively, the
protein can be successfully refolded while immobilized on the Ni-NTA column. The
recommended conditions are as follows: renature using a linear 6M-1M urea gradient in
500 mM NaCl, 20% glycerol, 20 mM Tris/HCl pH 7.4, containing protease inhibitors.

The renaturation should be performed over a period of 1.5 hours or more. After
20 renaturation the proteins are eluted by the addition of 250 mM imidazole. Imidazole
is removed by a final dialyzing step against PBS or 50 mM sodium acetate pH 6 buffer
plus 200 mM NaCl. The purified protein is stored at 4 degree C or frozen at -80 degree
C.

25 **Example 7 - Purification Of A Polypeptide From An Inclusion Body.**

The following alternative method can be used to purify a polypeptide expressed
in E coli when it is present in the form of inclusion bodies. Unless otherwise specified,
all of the following steps are conducted at 4-10 degree C.

30 Upon completion of the production phase of the E. coli fermentation, the cell
culture is cooled to 4-10 degree C and the cells harvested by continuous centrifugation
at 15,000 rpm (Heraeus Sepatech). On the basis of the expected yield of protein per unit
weight of cell paste and the amount of purified protein required, an appropriate amount
of cell paste, by weight, is suspended in a buffer solution containing 100 mM Tris, 50
35 mM EDTA, pH 7.4. The cells are dispersed to a homogeneous suspension using a high
shear mixer.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

The cells are then lysed by passing the solution through a microfluidizer
5 (Microfluidics, Corp. or APV Gaulin, Inc.) twice at 4000-6000 psi. The homogenate is
then mixed with NaCl solution to a final concentration of 0.5 M NaCl, followed by
centrifugation at 7000 xg for 15 min. The resultant pellet is washed again using 0.5M
NaCl, 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.4.

10 The resulting washed inclusion bodies are solubilized with 1.5 M guanidine
hydrochloride (GuHCl) for 2-4 hours. After 7000 xg centrifugation for 15 min., the pellet
is discarded and the polypeptide containing supernatant is incubated at 4 degree C
overnight to allow further GuHCl extraction.

Following high speed centrifugation (30,000 xg) to remove insoluble particles,
15 the GuHCl solubilized protein is refolded by quickly mixing the GuHCl extract with 20
volumes of buffer containing 50 mM sodium, pH 4.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA by
vigorous stirring. The refolded diluted protein solution is kept at 4 degree C without
mixing for 12 hours prior to further purification steps.

To clarify the refolded polypeptide solution, a previously prepared tangential
20 filtration unit equipped with 0.16 um membrane filter with appropriate surface area (e.g.,
Filtron), equilibrated with 40 mM sodium acetate, pH 6.0 is employed. The filtered
sample is loaded onto a cation exchange resin (e.g., Poros HS-50, Perseptive
Biosystems). The column is washed with 40 mM sodium acetate, pH 6.0 and eluted with
25 250 mM, 500 mM, 1000 mM, and 1500 mM NaCl in the same buffer, in a stepwise
manner. The absorbance at 280 nm of the effluent is continuously monitored. Fractions
are collected and further analyzed by SDS-PAGE.

Fractions containing the polypeptide are then pooled and mixed with 4 volumes
of water. The diluted sample is then loaded onto a previously prepared set of tandem
30 columns of strong anion (Poros HQ-50, Perseptive Biosystems) and weak anion (Poros
CM-20, Perseptive Biosystems) exchange resins. The columns are equilibrated with 40
mM sodium acetate, pH 6.0. Both columns are washed with 40 mM sodium acetate, pH
6.0, 200 mM NaCl. The CM-20 column is then eluted using a 10 column volume linear
gradient ranging from 0.2 M NaCl, 50 mM sodium acetate, pH 6.0 to 1.0 M NaCl, 50
35 mM sodium acetate, pH 6.5. Fractions are collected under constant A280 monitoring of
the effluent. Fractions containing the polypeptide (determined, for instance, by 16%
SDS-PAGE) are then pooled.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5 The resultant polypeptide should exhibit greater than 95% purity after the above refolding and purification steps. No major contaminant bands should be observed from Commassie blue stained 16% SDS-PAGE gel when 5 ug of purified protein is loaded. The purified protein can also be tested for endotoxin/LPS contamination, and typically the LPS content is less than 0.1 ng/ml according to LAL assays.

10 **Example 8 - Cloning And Expression Of A Polypeptide In A Baculovirus Expression System.**

In this example, the plasmid shuttle vector pAc373 is used to insert a polynucleotide into a baculovirus to express a polypeptide. A typical baculovirus
15 expression vector contains the strong polyhedrin promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) followed by convenient restriction sites, which may include, for example BamHI, Xba I and Asp718. The polyadenylation site of the simian virus 40 ("SV40") is often used for efficient polyadenylation. For easy selection of recombinant virus, the plasmid contains the beta-galactosidase gene from E. coli under
20 control of a weak Drosophila promoter in the same orientation, followed by the polyadenylation signal of the polyhedrin gene. The inserted genes are flanked on both sides by viral sequences for cell-mediated homologous recombination with wild-type viral DNA to generate a viable virus that express the cloned polynucleotide.

25 Many other baculovirus vectors can be used in place of the vector above, such as pVL941 and pAcDM1, as one skilled in the art would readily appreciate, as long as the construct provides appropriately located signals for transcription, translation, secretion and the like, including a signal peptide and an in-frame AUG as required. Such vectors are described, for instance, in Luckow et al., Virology 170:31-39 (1989).

30 A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention is amplified using PCR oligonucleotide primers corresponding to the 5' and 3' ends of the DNA sequence, to synthesize insertion fragments. The primers used to amplify the cDNA insert should preferably contain restriction sites at the 5' end of the primers in order to
35 clone the amplified product into the expression vector. Specifically, the cDNA sequence contained in the deposited clone, including the AUG initiation codon and the naturally associated leader sequence identified elsewhere herein (if applicable), is amplified using PCR protocol. If the naturally occurring signal sequence is used to produce the protein,

WO 02/44210

PCT/US01/45336

the vector used does not need a second signal peptide. Alternatively, the vector can be
 5 modified to include a baculovirus leader sequence, using the standard methods described
 in Summers et al., "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell
 Culture Procedures" Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987).

10 The amplified fragment is isolated from a 1% agarose gel using a commercially
 available kit ("GeneClean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). The fragment then is digested
 with appropriate restriction enzymes and again purified on a 1% agarose gel.

The plasmid is digested with the corresponding restriction enzymes and
 optionally, can be dephosphorylated using calf intestinal phosphatase, using routine
 15 procedures known in the art. The DNA is then isolated from a 1% agarose gel using a
 commercially available kit ("GeneClean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.).

The fragment and the dephosphorylated plasmid are ligated together with T4
 DNA ligase. E. coli HB101 or other suitable E. coli hosts such as XL-1 Blue (Stratagene
 Cloning Systems, La Jolla, CA) cells are transformed with the ligation mixture and
 20 spread on culture plates. Bacteria containing the plasmid are identified by digesting DNA
 from individual colonies and analyzing the digestion product by gel electrophoresis. The
 sequence of the cloned fragment is confirmed by DNA sequencing.

Five ug of a plasmid containing the polynucleotide is co-transformed with 1.0 ug
 25 of a commercially available linearized baculovirus DNA ("BaculoGoldtm baculovirus
 DNA", Pharmingen, San Diego, CA), using the lipofection method described by Felgner
 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987). One ug of BaculoGoldtm virus
 DNA and 5ug of the plasmid are mixed in a sterile well of a microtiter plate containing
 50ul of serum-free Grace's medium (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD).

30 Afterwards, 10 ul Lipofectin plus 90 ul Grace's medium are added, mixed and incubated
 for 15 minutes at room temperature. Then the transfection mixture is added drop-wise
 to Sf9 insect cells (ATCC CRL 1711) seeded in a 35 mm tissue culture plate with 1 ml
 Grace's medium without serum. The plate is then incubated for 5 hours at 27 degrees C.

35 The transfection solution is then removed from the plate and 1 ml of Grace's insect
 medium supplemented with 10% fetal calf serum is added. Cultivation is then continued
 at 27 degrees C for four days.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

After four days the supernatant is collected and a plaque assay is performed, as described by Summers and Smith, *supra*. An agarose gel with "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) is used to allow easy identification and isolation of gal-expressing clones, which produce blue-stained plaques. (A detailed description of a "plaque assay" of this type can also be found in the user's guide for insect cell culture and baculovirology distributed by Life Technologies Inc., Gaithersburg, page 9-10.) After appropriate incubation, blue stained plaques are picked with the tip of a micropipettor (e.g., Eppendorf). The agar containing the recombinant viruses is then resuspended in a microcentrifuge tube containing 200 μ l of Grace's medium and the suspension containing the recombinant baculovirus is used to infect SF9 cells seeded in 35 mm dishes. Four days later the supernatants of these culture dishes are harvested and then they are stored at 4 degree C.

To verify the expression of the polypeptide, SF9 cells are grown in Grace's medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. The cells are infected with the recombinant baculovirus containing the polynucleotide at a multiplicity of infection ("MOI") of about 2. If radiolabeled proteins are desired, 6 hours later the medium is removed and is replaced with SF900 II medium minus methionine and cysteine (available from Life Technologies Inc., Rockville, MD). After 42 hours, 5 μ Ci of 35S-methionine and 5 μ Ci 35S-cysteine (available from Amersham) are added. The cells are further incubated for 16 hours and then are harvested by centrifugation. The proteins in the supernatant as well as the intracellular proteins are analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography (if radiolabeled).

Microsequencing of the amino acid sequence of the amino terminus of purified protein may be used to determine the amino terminal sequence of the produced protein.

Example 9 - Expression Of A Polypeptide In Mammalian Cells.

The polypeptide of the present invention can be expressed in a mammalian cell. A typical mammalian expression vector contains a promoter element, which mediates the initiation of transcription of mRNA, a protein coding sequence, and signals required for the termination of transcription and polyadenylation of the transcript. Additional elements include enhancers, Kozak sequences and intervening sequences flanked by donor and acceptor sites for RNA splicing. Highly efficient transcription is achieved with

WO 02/44210

PCT/US01/45336

the early and late promoters from SV40, the long terminal repeats (LTRs) from
5 Retroviruses, e.g., RSV, HTLV, HIV and the early promoter of the cytomegalovirus
(CMV). However, cellular elements can also be used (e.g., the human actin promoter).

Suitable expression vectors for use in practicing the present invention include, for
example, vectors such as pSVL and pMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat
(ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146), pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0,
10 and pCMVSPORT 3.0. Mammalian host cells that could be used include, human Hela,
293, H9 and Jurkat cells, mouse NIH3T3 and C127 cells, Cos 1, Cos 7 and CV1, quail
QC1-3 cells, mouse L cells and Chinese hamster ovary (CHO) cells.

Alternatively, the polypeptide can be expressed in stable cell lines containing the
15 polynucleotide integrated into a chromosome. The co-transformation with a selectable
marker such as dhfr, gpt, neomycin, hygromycin allows the identification and isolation
of the transformed cells.

The transformed gene can also be amplified to express large amounts of the
encoded protein. The DHFR (dihydrofolate reductase) marker is useful in developing
20 cell lines that carry several hundred or even several thousand copies of the gene of
interest. (See, e.g., Alt, F. W., et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); Hamlin, J. L.
and Ma, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143 (1990); Page, M. J. and
Sydenham, M. A., Biotechnology 9:64-68 (1991).) Another useful selection marker is
25 the enzyme glutamine synthase (GS) (Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991);
Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992). Using these markers, the
mammalian cells are grown in selective medium and the cells with the highest resistance
are selected. These cell lines contain the amplified gene(s) integrated into a chromosome.
Chinese hamster ovary (CHO) and NSO cells are often used for the production of
30 proteins.

A polynucleotide of the present invention is amplified according to the protocol
outlined in herein. If the naturally occurring signal sequence is used to produce the
protein, the vector does not need a second signal peptide. Alternatively, if the naturally
occurring signal sequence is not used, the vector can be modified to include a
35 heterologous signal sequence. (See, e.g., WO 96/34891.) The amplified fragment is
isolated from a 1% agarose gel using a commercially available kit ("GeneClean" BIO 101

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Inc., La Jolla, Ca.). The fragment then is digested with appropriate restriction enzymes
 5 and again purified on a 1% agarose gel.

The amplified fragment is then digested with the same restriction enzyme and
 purified on a 1% agarose gel. The isolated fragment and the dephosphorylated vector are
 then ligated with T4 DNA ligase. E. coli HB101 or XL-1 Blue cells are then transformed
 10 and bacteria are identified that contain the fragment inserted into plasmid pC6 using, for
 instance, restriction enzyme analysis.

Chinese hamster ovary cells lacking an active DHFR gene is used for
 transformation. Five μ g of an expression plasmid is cotransformed with 0.5 μ g of the
 plasmid pSVneo using lipofectin (Felgner et al., supra). The plasmid pSV2-neo contains
 15 a dominant selectable marker, the neo gene from Tn5 encoding an enzyme that confers
 resistance to a group of antibiotics including G418. The cells are seeded in alpha minus
 MEM supplemented with 1 mg/ml G418. After 2 days, the cells are trypsinized and
 seeded in hybridoma cloning plates (Greiner, Germany) in alpha minus MEM
 supplemented with 10, 25, or 50 ng/ml of methotrexate plus 1 mg/ml G418. After about
 20 10-14 days single clones are trypsinized and then seeded in 6-well petri dishes or 10 ml
 flasks using different concentrations of methotrexate (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM,
 800 nM). Clones growing at the highest concentrations of methotrexate are then
 transferred to new 6-well plates containing even higher concentrations of methotrexate
 25 (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M). The same procedure is repeated until clones are
 obtained which grow at a concentration of 100 - 200 μ M. Expression of the desired gene
 product is analyzed, for instance, by SDS-PAGE and Western blot or by reversed phase
 HPLC analysis.

30 Example 10 - Protein Fusions.

The polypeptides of the present invention are preferably fused to other proteins.
 These fusion proteins can be used for a variety of applications. For example, fusion of
 the present polypeptides to His-tag, HA-tag, protein A, IgG domains, and maltose binding
 protein facilitates purification. (See Example described herein; see also EP A 394,827;
 35 Traunecker, et al., Nature 331:84-86 (1988).) Similarly, fusion to IgG-1, IgG-3, and
 albumin increases the half-life time in vivo. Nuclear localization signals fused to the
 polypeptides of the present invention can target the protein to a specific subcellular

WO 02/44210

PCT/US01/45336

localization, while covalent heterodimer or homodimers can increase or decrease the activity of a fusion protein. Fusion proteins can also create chimeric molecules having more than one function. Finally, fusion proteins can increase solubility and/or stability of the fused protein compared to the non-fused protein. All of the types of fusion proteins described above can be made by modifying the following protocol, which outlines the fusion of a polypeptide to an IgG molecule.

Briefly, the human Fc portion of the IgG molecule can be PCR amplified, using primers that span the 5' and 3' ends of the sequence described below. These primers also should have convenient restriction enzyme sites that will facilitate cloning into an expression vector, preferably a mammalian expression vector. Note that the polynucleotide is cloned without a stop codon, otherwise a fusion protein will not be produced.

The naturally occurring signal sequence may be used to produce the protein (if applicable). Alternatively, if the naturally occurring signal sequence is not used, the vector can be modified to include a heterologous signal sequence. (See, e.g., WO 96/34891 and/or US Patent No. 6,066,781, supra.)

Human IgG Fc region:

```

GGGATCCGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACACACATGCCACCGT
GCCAGCACCTGAATTCGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG
TGGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGTTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

ACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGCGAC

5 TCTAGAGGAT (SEQ ID NO:32)

Example 11 - Production Of An Antibody From A Polypeptide.

The antibodies of the present invention can be prepared by a variety of methods. (See, Current Protocols, Chapter 2.) As one example of such methods, cells expressing a polypeptide of the present invention are administered to an animal to induce the production of sera containing polyclonal antibodies. In a preferred method, a preparation of the protein is prepared and purified to render it substantially free of natural contaminants. Such a preparation is then introduced into an animal in order to produce polyclonal antisera of greater specific activity.

In the most preferred method, the antibodies of the present invention are monoclonal antibodies (or protein binding fragments thereof). Such monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma technology. (Köhler et al., Nature 256:495 (1975); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981).) In general, such procedures involve immunizing an animal (preferably a mouse) with polypeptide or, more preferably, with a polypeptide-expressing cell. Such cells may be cultured in any suitable tissue culture medium; however, it is preferable to culture cells in Earle's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (inactivated at about 56 degrees C), and supplemented with about 10 g/l of nonessential amino acids, about 1,000 U/ml of penicillin, and about 100 ug/ml of streptomycin.

The splenocytes of such mice are extracted and fused with a suitable myeloma cell line. Any suitable myeloma cell line may be employed in accordance with the present invention; however, it is preferable to employ the parent myeloma cell line (SP2O), available from the ATCC. After fusion, the resulting hybridoma cells are selectively maintained in HAT medium, and then cloned by limiting dilution as described by Wands et al. (Gastroenterology 80:225-232 (1981).) The hybridoma cells obtained through such a selection are then assayed to identify clones which secrete antibodies capable of binding the polypeptide.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Alternatively, additional antibodies capable of binding to the polypeptide can be produced in a two-step procedure using anti-idiotypic antibodies. Such a method makes use of the fact that antibodies are themselves antigens, and therefore, it is possible to obtain an antibody that binds to a second antibody. In accordance with this method, protein specific antibodies are used to immunize an animal, preferably a mouse. The splenocytes of such an animal are then used to produce hybridoma cells, and the hybridoma cells are screened to identify clones that produce an antibody whose ability to bind to the protein-specific antibody can be blocked by the polypeptide. Such antibodies comprise anti-idiotypic antibodies to the protein-specific antibody and can be used to immunize an animal to induce formation of further protein-specific antibodies.

It will be appreciated that Fab and F(ab')₂ and other fragments of the antibodies of the present invention may be used according to the methods disclosed herein. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')₂ fragments). Alternatively, protein-binding fragments can be produced through the application of recombinant DNA technology or through synthetic chemistry.

For in vivo use of antibodies in humans, it may be preferable to use "humanized" chimeric monoclonal antibodies. Such antibodies can be produced using genetic constructs derived from hybridoma cells producing the monoclonal antibodies described above. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art. (See, for review, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985).)

Moreover, in another preferred method, the antibodies directed against the polypeptides of the present invention may be produced in plants. Specific methods are disclosed in US Patent Nos. 5,959,177, and 6,080,560, which are hereby incorporated in their entirety herein. The methods not only describe methods of expressing antibodies, but also the means of assembling foreign multimeric proteins in plants (i.e., antibodies, etc.), and the subsequent secretion of such antibodies from the plant.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein, which are intended as single illustrations of individual

WO 02/44210

PCT/US01/45336

aspects of the invention, and functionally equivalent methods and components are
5 within the scope of the invention. Indeed, various modifications of the invention, in
addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in
the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such
modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

The entire disclosure of each document cited (including patents, patent
10 applications, journal articles, abstracts, laboratory manuals, books, or other
disclosures) in the Background of the Invention, Detailed Description, and Examples
is hereby incorporated herein by reference. Further, the hard copy of the sequence
listing submitted herewith and the corresponding computer readable form are both
incorporated herein by reference in their entireties.

15

20

25

30

35

WO 02/44210

PCT/US01/45336

We claim:

5

1. An isolated nucleic acid comprising a member of the group consisting of:

10

(a) a nucleic acid sequence that encodes a polypeptide having the amino acid sequence of FIG. 2A or FIG. 2B (SEQ ID NO. 2 or 4);

15

(b) An isolated nucleic acid comprising a nucleic acid sequence capable of hybridizing under stringent conditions to a nucleic acid molecule of claim 1 and encoding a hVR1d polypeptide having an activity of a naturally-occurring hVR1d protein;

20

(c) An isolated nucleic acid comprising the nucleic acid sequence of FIG. 1A;

(d) An isolated nucleic acid comprising the nucleic acid sequence of FIG. 1B;

(e) An isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence of ATCC Accession No. _____;

25

(f) An isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence according to nucleotides 4 to 2160 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide of SEQ ID NO:2 minus the start codon;

(g) An isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence according to nucleotides 1 to 2160 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide of SEQ ID NO:2 including the start codon;

30

(h) An isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence according to nucleotides 4 to 2235 of SEQ ID NO:3, wherein said nucleotides encode a polypeptide of SEQ ID NO:4 minus the start codon;

35

(i) An isolated polynucleotide having the nucleic acid sequence according to nucleotides 1 to 2235 of SEQ ID NO:3, wherein said nucleotides encode a polypeptide of SEQ ID NO:4 including the start codon;

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- 5 (j) the complement of the nucleic acid sequence of any one of (a) thru (i);
- (k) An isolated nucleic acid wherein a nucleic acid of any one of (a) thru (j) that encodes an hVR1d protein or polypeptide is linked in frame to a nucleic acid sequence that encodes a heterologous protein or peptide;
- 10 (l) A nucleic acid comprising a nucleic acid sequence encoding (a) a deletion mutant of hVR1d.1; (b) a deletion mutant of hVR1d.2; or (c) the complement of the nucleic acid sequences of (a) or (b);
- 15 (m) A nucleic acid comprising a nucleic acid sequence encoding (a) a substitution mutant of hVR1d.1; (b) a substitution mutant of hVR1d.2; or (c) the complement of the nucleic acid sequences of (a) or (b);
- 2 A recombinant vector comprising a nucleic acid of claim 1.
- 20 3. An expression vector comprising a nucleic acid of claim 1 operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that controls expression of the nucleic acid in a host cell.
- 25 4. A genetically engineered host cell containing a nucleic acid of claim 1.
5. A genetically engineered host cell containing a nucleic acid of claim 1 operatively associated with a regulatory nucleotide sequence containing transcriptional and translational regulatory information that controls expression of the
- 30 nucleic acid sequence in a host cell.
6. A method of making an hVR1d polypeptide comprising the steps of:
- (a) culturing the host cell of claim 4 in an appropriate culture medium to produce an hVR1d polypeptide; and
- 35 (b) isolating the hVR1d polypeptide.
7. A method of making an hVR1d polypeptide comprising the steps of:

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- 5 (a) culturing the host cell of claim 5 in an appropriate
culture medium to produce an hVR1d polypeptide; and
(b) isolating the hVR1d polypeptide.
8. The method of claim 6 or 7, wherein the hVR1d polypeptide is
hVR1d1.1 or hVR1d.2 or a functionally equivalent derivative thereof.
- 10 9. An antibody preparation which is specifically reactive with an epitope
of an hVR1d polypeptide.
- 15 10. A transgenic animal comprising a nucleic acid of claim 1.
11. A substantially pure polypeptide encoded by a nucleic acid of claim 1.
12. A substantially pure human hVR1d polypeptide as depicted in FIGS.
2A or 2B (SEQ ID NO: 2 or 4).
- 20 13. A substantially pure polypeptide which is at least 90% identical to the
polypeptide as set forth in FIGS. 2A or 2B (SEQ ID NO: 2 or 4).
14. A fusion protein comprising a polypeptide of claim 13 and a second
25 heterologous polypeptide.
15. A pharmaceutical preparation comprising a therapeutically effective
amount of the polypeptide of claim 11 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 30 16. A test kit for detecting and/or quantitating a wild type or mutant
hVR1d nucleic acid molecule in a sample, comprising the steps of contacting the
sample with a nucleic acid of claim 1; and detecting and/or quantitating the label as an
indication of the presence or absence and/or amount of a wild type or mutant hVR1d
nucleic acid.
- 35 17. A method for identifying compounds that modulate hVR1d activity
comprising:

WO 02/44210

PCT/US01/45336

5. (a) contacting a test compound to a cell that expresses a hVR1d gene;
- (b) measuring the level of hVR1d gene expression in the cell; and
- (c) comparing the level obtained in (b) with the hVR1d gene expression obtained in the absence of the compound;

such that if the level obtained in (b) differs from that obtained in the absence of the compound, a compound that modulates hVR1d activity is identified.

18. A method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders, comprising:

- 15 (a) contacting a test compound with a cell which expresses a nucleic acid of claim 1 and
- (b) determining whether the test compound modulates hVR1d activity.

19. A method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders, comprising:

- 20 (a) contacting a test compound with a cell or cell lysate containing a reporter gene operatively associated with a hVR1d regulatory element; and
- (b) detecting expression of the reporter gene product.

20. A method for identifying compounds that regulate ion channel-related disorders comprising:

- (a) contacting a test compound with a cell or cell lysate containing hVR1d transcripts; and
- 30 (b) detecting the translation of the hVR1d transcript.

21. A method for modulating ion channel-related disorders in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a hVR1d polypeptide.

35

22. A method for the treatment of ion channel-related disorders, comprising modulating the activity of a hVR1d polypeptide.

WO 02/44210

PCT/US01/45336

- 5 23. The method of claim 22, wherein the method comprises administering
an effective amount of a compound that agonizes or antagonizes the activity of the
hVR1d polypeptide.
24. A method for the treatment of ion channel-related disorders,
10 comprising administering an effective amount of a compound that decreases
expression of a hVR1d gene.
- 25) A method of identifying a compound that modulates the biological
activity of hVR1d, comprising:
15 (a) combining a candidate modulator compound with hVR1d
 having the sequence set forth in SEQ ID NO:2; and
 (b) measuring an effect of the candidate modulator compound on
 the activity of hVR1d.
- 20 26) A compound that modulates the biological activity of human hVR1d as
identified by the method according to claim 25.

25

30

35

WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG. 1A

```
1  ATGAGCTTTATTTTCAGGCCACGAGGAGGGGGCAGGCTGGAGACAGATTCCAGGGTGGCA  60
1  M S F I C R P R G G G R L E T D S R V A  20

61  GCAGGGGGTGGACAGCGGGAAGCCCTACAGTGGGCAAGAGCRAAAGGCCTCAGATACG  120
21  A G G W T A G S N T V G K R Q K A S D T  40

121  TCACCCATGGGCCACAGAGAGCAAGGAGCCAGCATAGGAGACGGAGGAGAAACAGCTGGA  180
41  S P M G H R E Q G A S I G D G G E T A G  60

181  GAGGGAGGAGAGCGGCCAAGTGTAAAGTCTGGGAGTGGAGATGTGGAGCAGGGGCTTGGG  240
61  E G G E R P S V R S G S G D V E Q G L G  80

241  GTCTGGCGCTGCAGCAACCAACCCCTCTGGGCTGGGAGGCCAAGGCGAGCCGGGGCCCT  300
81  V C G C S N H T L W A G R A K G S R G P  100

301  CCTGTAACTCCACCCATGGCCCTGCGCTGCAGACTTCTCTATGCACAAGCTGACGGCCTCC  360
101  P V T P P M A L P A D F L M H K L T A S  120

361  GACACGGGGAGAGACCTGCTGATGAAGGCTTGTAAACATCAACCCCAACACCAAGGAG  420
121  D T G K T C L M K A L L N I N P N T K E  140

421  ATAGTGGGATCCTGCTTGCCTTTGCTGAGAGAGAACGACATCCTGGGAGGTTCATCAAC  480
141  I V R I L L A F A E E N D I L G R F I N  160

481  GCCGACTACACAGAGAGGCTTATGAAGGCGAGACGGCGCTGAACATCCCCATCGAGCGG  540
161  A E Y T E E A Y E G Q T A L N I A I E R  180

541  CGGACGGGGACATCGCAGCCCTGCTCATGCGCGCGCGCCGACGTCAACGCGCACGCC  600
181  R Q G D I A A L L I A A G A D V N A H A  200

601  AAGGGGGCTTCTTCAACCCCAAGTACCAACACGAGGCTTCTACTTCGGTGAGAGCGCC  660
201  K G A F F N P K Y Q H E G F Y F G E T P  220

661  CTGGCCCTGGCAGCATGCACCAACGAGCCGAGATTGTGAGCTGCTGATGGAGCAGAG  720
221  L A L A A C T N Q P E I V Q L L M E H E  240

721  CAGACGGACATCACTCGCGGAGCTCACGAGGCAACACATCCTTCAACGCCCTGGTGACC  780
241  Q T D I T S R D S R G N N I L H A L V T  260

781  GTGGCCGAGGACTTCAAGACGCGAATGACTTTGTGAAGCGCATGTACGACATGATCCTA  840
261  V A E D F K T Q N D F V K R M Y D M I L  280

841  CTGCGGAGTGGCAACTGGGAGCTGGAGACCACTCCCAACACGATGGGCTCACGCGCGCTG  900
281  L R S G N W E L E T T R N N D G L T P L  300
```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG. 1A (cont'd)

```
901 CAGCTGCGCGCCAGATGGGCAAGCGGAGATCCCTGAGTACATCCTCAGTCGTGAGATC 960
301 Q L A A K M G K A E I L K Y I L S R E I 320

961 AAGGAGAGCGGCTCCGAGCCTGTCCAGGAAGTTCCACCGACTGGGCGTACGGAGCCGCTG 1020
321 K E K R L R S L S R K F T D W A Y G P V 340

1021 TCATCCTCCCTCTACGACCTCACCAACGTGGACACCAACGACCACTCAGTGTGGAA 1080
341 S S S L Y D L T N V D T T T D N S V L E 360

1081 ATCACTGTCTACAAACCAACATCGACAAACCGCATGAGATGCTGACCTGGAGCGCTG 1140
361 I T V Y N T N I D N R H E M L T L E P L 380

1141 CACACGCTGCTGATATGAGTGGAGAAGTTTGCCAGCACATGTTCTTCTGTCCTTC 1200
381 H T L L H M K W K K F A K H M F F L S F 400

1201 TGCCTTTATTTCTTCTACAAATCACCCCTGACCCCTGCTCTGCTACTACCGCCCCGGGAG 1260
401 C F Y F F Y N I T L T L V S Y Y R P R E 420

1261 GAGGAGGCCATCCCGCACCCCTTGGCCCTGACGCAACAGATGGGGTGGCTGCAGCTCCTA 1320
421 E E A I P H P L A L T H K M G W L Q L L 440

1321 GGGAGGATGTTTGTGCTCATCTGGGCCATGTGCATCTCTGTGAAAGAGCGCATGCGCATC 1380
441 G R M F V L I W A M C I S V K E G I A I 460

1381 TTCCTGCTGAGACCCCTCGAATCTGCACTCCATCCTCTCGATGCGCTGCTTCCACTTTGTC 1440
461 F L L R P S D L Q S I L S D A W F H F V 480

1441 TTTTATCCAAAGCTGTGCTGTGATACGTCTGTCTCTGTGACTTGTGCTTACAAA 1500
481 F F I Q A V L V I L S V F L Y L F A Y K 500

1501 GAGTACCTCGCCTGCTCTGCTGCGCCATGCGCCCTGGGCTGGGCGAACATGCTCTACTAT 1560
501 E Y L A C L V L A M A L G W A N M L Y Y 520

1561 ACCCGGGGTTTCCAGTCCATGGGCACTGTACAGCGTCATGATCCAGAAGTCAATTTGCAAT 1620
521 T R G F Q S M G M Y S V M I Q K V I L H 540

1621 GATGTTCTGAAGTCTTGTGTTGTATATATCGCGTTTGTGCTTGGATTGGAGTAGCCTTG 1680
541 D V L K F L F V Y I A F L L G F G V A L 560

1681 GCCTCGTGATCGAGAAGTGTCCCAAGACAACAAGGACTGCAGCTCCTACGGCAGCTTC 1740
561 A S L I E K C P K D N K D C S S Y G S F 580

1741 AGCGACGCAGTGCTGGAACCTCTCAAGCTCACCATAGGCTGGGTGAYCTGAACATCCAG 1800
581 S D A V L E L F K L T I G L G D L N I Q 600
```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG. 1A (cont'd)

```
1801 CAGAACTCCAAGTATCCCATTTCTCTTTCTGTTCCCTGCTCATCACCTATGTCATCCTCACC 1860
601 Q N S K Y P I L F L F L L I T Y V I L T 620

1861 TTTGTTCTCCTCCTCAACATGCTCATGCTGATGGGCGAGACTGTGGAGAACGTCCTCC 1920
621 F V L L L N M L I A L M G E T V E N V S 640

1921 AAGGAGAGCGAACGCATCTGGCGCCTGCAGAGAGCCAGGACCATCTTGGAGTTTGAGAAA 1980
641 K E S E R I W R L Q R A R T I L E F E K 660

1981 ATGTTACCAGANTGGCTGAGGAGCAGATTCCGGATGGGAGAGCTGTGCAAGTGGCCGAG 2040
661 M L P E W L R S R F R M G E L C K V A E 680

2041 GATGATTTCCGACTGTGTTTGGGGATCAATGAGGTGAAGTGGACTGAATGGAAGACGCAC 2100
681 D D F R L C L R I N E V K W T E W K T H 700

2101 GTCTCCTTCTTAACGAAGACCCGGGCGCTGTAAAGCAACAGGTACTGTGCTGTGTGAGG 2160
701 V S F L N E D P G P V R R T G T V A V R 720

2161 TGA 2163
```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG. 1B

```
1  ATGAGCTTTATTTCAGGCCACGAGGAGGGGGCAGGCTGGAGACAGATTCCAGGGTGGCA  60
1  M S F I C R P R G G G R L E T D S R V A  20
61  GCAGGGGGGTGGACAGCGGGAAGCCATACAGTGGGCLAAAGAGCAAAGGCCTCAGATACG  120
21  A G G W T A G S H T V G K E Q K A S D T  40
121  TCACCCATGGGCCACAGAGAGCAAGGAGCCAGCATAGGAGACGGAGGAGAAACAGCTGGA  180
41  S P M G H R E B Q G A S I G D G G E T A G  60
181  GAGGAGGAGAGCGGGCCAAAGTGTAAAGTCTGGGAGTGGAGATGTGGAGCAGGGGCTTGGG  240
61  E G G E R P S V R S G S G D V E Q G L G  80
241  GTCTGCGGCTGCAAGCAACACACCTCTCTGGGCTGGGAGGGCCAAAGGCGAGCGGGGCCCT  300
81  V C G C S N H T L W A G R A K G S R G P  100
301  CCTGTAACTCCACCCATGGCCCTGCCTGCAGACTTCTCATGCACAAGCTGACGGCCTCC  360
101  P V T P P M A L P A D F L M H K L T A S  120
361  GACACGGGGAAGACCTGCTGATGAAGGCTTGTTTAAACATCAACCCCAACCAAGGAG  420
121  D T G K T C L M K A L L N I N P N T K E  140
421  ATAGTGGGATCCTGCTTGTCTTTGTCTGAAGAGAACGACATCCTGGGCGAGTTTCAAC  480
141  I V R I L L A F A E E N D I L G R F I N  160
481  GCGAGGTACACAGAGGAGGCTATGAAGGCGAGCGGCTGAACATCGCCATCGAGCGG  540
161  A E Y T E E A Y E G Q T A L N I A I E R  180
541  CGGACGGGGACATCGCAGCCCTGCTCATCGCGCGGCGCGAGCTCAACGCGCAAGCC  600
181  R Q G D I A A L L I A A G A D V N A H A  200
601  AAGGGGGCTTCTTCAACCCCAAGTACCAACACGAAGGCTTCTACTTCGGTGAAGACGCC  660
201  K G A P F F N P K Y Q H E G F Y F G E T P  220
661  CTGGCCCTGGCAGCATGCACCAACGAGGAGATTTGTGAGTGTCTGATGGAGCAGAG  720
221  L A L A A C T N Q P E I V Q L L M E H E  240
721  CAGACGGACATCACCTGCGGGACTCACGAGGCAACACATCCTTACGCCCCGTGTGACC  780
241  Q T D I T S R D S R G N N I L H A L V T  260
781  GTGGCCGAGGACTTCAAGACGCGAGATGACTTTGTGAAGCGCATGTACGACATGATCTTA  840
261  V A E D F K T Q N D F V K R M Y D M I L  280
841  CTGGGAGTGGCAACTGGGAGCTGGAGACCACTCGCAACAAAGATGGCTCAGCGCGCTG  900
281  L R S G N W E L E T T R N N D G L T F L  300
```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG. 1B (cont'd)

```

901 CAGCTGSCCGCCAGATGGGCAAGGCGGAGATCCTGAGTACATCCTCNGTTCGTGAGATC 960
301 Q L A A K M G K A E I L K Y I L S R R I 320

961 AAGGAGAGGCGGCTCCGGAGCTTGTCCAGGAAGTTCAACGACTGGGCGTACGGACCCGTG 1020
321 K E K R L R S L S R K F T D W A Y G P V 340

1021 TCATCCTCCCTCTACGACCTCACCAACGTGSAACCAACCAACGSAACACTCACTGCTGGAA 1080
341 S S S L Y D L T N V D T T T D N S V L E 360

1081 ATCACTGTCTACAACAACCAATCGAACAACCGGCATGAGATGCTGACCCCTGGAGCCGCTG 1140
361 I T V Y N T N I D N R H E M L T L E P L 380

1141 CACACGCTGCTGCAATGAAATGGAGAAGTTTGCAGGACATGTTCTTTCTGTCCCTTC 1200
381 H T L L L H M K N K K F A K H N F P L S F 400

1201 TGCCTTTTATTTCTTTCTACACATCACCCCTGACCCCTGCTCTGTAATAACGACCCCGGAG 1260
401 C F Y F F Y N I T L T L V S Y Y R P R E 420

1261 GAGGAGGCCATCCCGCACCCCTTGGCCCTGACGACACAGATGGGGTGGCTGCAGCTCCTA 1320
421 E E A I P H P L A L T H K M G W L Q L L 440

1321 GGGAGGATGTTTGTGCTCATCTGAGCCATGTGCATCTCTGTGAAAGAGGGCAATTGCCATC 1380
441 G R M F V L I W A M C I S V K E G I A I 460

1381 TTCTGCTGAGACCCCTCGGATCTGCACTCCATCCTCTCGGATGCTGCTTCCATTGTTC 1440
461 F L L R P S D L Q S I L S D A W F H F V 480

1441 TTTTATCCAGCTGTGCTTGTGATACGTCTGTCTTCTTGTACTTGTGCTTGTACAAA 1500
481 F F I Q A V L V I L S V F L Y L F A Y K 500

1501 GAGTACCTCGCCTGCTCTGCTGSCCATGSCCCTGGGCTGGGCGAACAATGCTCTACTAT 1560
501 E Y L A C L V L A M A L G W A N M L Y Y 520

1561 ACGCGGGGTTTCCAGTCCATGGGCATGTACAGCGTCATGATCCAGAAGTCAATTTTGCAT 1620
521 T R G F Q S M G M Y S V M I Q K V I L H 540

1621 GATGTTCTGAAGTTCTTGTGTTGTAATATGCGGTTTGTGCTTGGATTGGAGTAGCCTTG 1680
541 D V L K F L F V Y I A F L L G F G V A L 560

1681 GCCTCGCTGATCGAGAAGTGTCCCAAGAACAACAGGACTGCACTCTTACGGCAGCTTC 1740
561 A S L I E K C P K D N K D C S S Y G S F 580

1741 AGCGACGCTGTGCTGGAACCTCTCAAGCTCACCATAGGCCTGGGTGAYCTGAACATCCAG 1800
581 S D A V L E L F K L T I G L G D L N I Q 600

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG. 1B (cont'd)

```
1801 CAGAATCTCCAAGTATCCCATTTCTCTTTCTGTTCTGCTCATCACCTATGTCATCCTCACC 1860
601 Q N S K Y P I L F L F L L I T Y V I L T 620

1861 TTTGTTCTCTCCTCAACATGCTCATTTGCTCTGATGGGCGAGACTGTGGAGAACGTCTCC 1920
621 F V L L L N M L I A L M G E T V E N V S 640

1921 AAGGAGAGCGAACGCATCTGGCGCCTGCAGAGAGCCAGGACCATCTTGGAGTTTGAGAAA 1980
641 K E S E R I W R L Q R A R T I L E F E K 660

1981 ATGTTACCAGAATGGCTGAGGAGCAGATTCCGGATGGGAGAGCTGTGCAAAGTGGCCGAG 2040
661 M L P E W L R S R F R M G E L C K V A E 680

2041 GATGATTTCCGACTGTGTTTGGCGATCAATGAGGTGAAGTGGACTGAATGGAAGACGCAC 2100
681 D D F R L C L R I N E V K W T E W K T H 700

2101 GTCTCCTTCCTTAACGAAGACCCGGGGCCTGTAAGACGAACAGATTTCAACAAATCCAA 2160
701 V S F L N E D P G P V R R T D F N K I Q 720

2161 GATTCTTCCAGGAACAACAGCAAAACCACTCTCAATGCATTTGAAGAAGTCGAGGAATTC 2220
721 D S S R N N S K T T L N A F E E V E E F 740

2221 CCGGAAACCTCGGTGTAG 2238
741 P E T S V 745
```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

1 MSFICRPRGG GRLETDSEVA AGGWTAGSHT VGKEQKASDT SEMGHREQGA
51 SIGDGGGETAG EGGERPSVES GSGDVEQGLG VCGCSNHTLW AGRAKGSRGP
101 PVTFFMALPA DFLMEKLTAS DTGKTCLMKA LLNINPNTKE IVRILLAFAE
151 ENDILGRFIN AEYTEAEVGG QTALNIAIER RQGDIAALLI AAGADVNAHA
201 KGAFNPKYQ HEGFYFGETP LALAACTNQP HIVOLLMEHE QTDITSRDSR
251 GNNILHALVT VAEDFKTQND FVKRMYDMIL LRSGNWELET TENNDGLTPL
301 QLAAKMGKAE ILKYILSRRI KEKRLRSLSR KFTDWAYGPV SSSLYDLTNV
351 DTTTDSNVLE ITVYNTNIDN RHEMLTLEPL HTLLBMKWKK FAKHMPFLSP
401 CFYFFYNITL TLVSYRPRE EEAIPHPLAL THMGWLQLL GRMPVLIWAM
451 CISVKBGIAI FLRPSDLQS ILSDAMPHFV FFIQAVLVIL SVFLYLFAVK
501 EYLACHVLAM ALGWANMLTY TRGFQSMGMY SVMIQKVILH DVLFPLFVYI
551 APLLGFGVAL ASLIEKCPKD NKDCSSYGSF SDAVLELFLK TIGLQDLNIQ
601 QNSKYPILFL FLITTYVILT FVLLINMLIA LMGETVENVS KESERIWRLO
651 RARTILEFEK MLPENLRSRF RMSELCKVAE DDFRLCLRIN EVKWEWKTH
701 VSFLNEDGGP VERTGTVAVR

FIG. 2A

WO 02/44210

PCT/US01/45336

1 MSFICRPRGG GRLETSRVA AGGWTAGSHT VGKEQKASDT SPMGHRQQA
51 SIGDGGETAG EGGERPSVRS GSGDVEQGLG VCGCSNHTLW AGRKGSRGF
101 PVTFFMALPA DFLMHKLTA DTGKTCLMKA LLNINPNTKE IVRILLAFAB
151 ENDILGRFIN AEYTEAYEG QTALNIAIER ROGDIAALLI AAGADVNAHA
201 KGAFFNPKYQ HEGFYFGETE LALAACTNQP EIVQLLMEHE QTDITSRDSR
251 GNNILHALVT VAEDFKTQND FVKRMYDMIL LRSGNWELET TRNDGLTPL
301 QLAAKMGKAE ILKYILSREI KEKRLRLSLR KFTOWAYGPV SSSLYDLTNV
351 DTTTNSVLE ITVYNTNIDN RHEMLTLEPL HTLLHMKWKK FAKHMFPLSF
401 CFYFFYNITL TLVSYYRPRE EEAIPHPLAL THKMGLQLL GRMFVLWAM
451 CTSVKEGIAL FLLRPSDLQS ILSDAWFHFV FFIQAVLVIL SVFLYLPAYK
501 EYLACLVLAM ALGWANMLYY TRGFQSMGY SVMIQKVILH DVLKFLFVYI
551 AFLLGFGVAL ASLIEKCPKD NKICSSYGSF SDAVLELFKL TIGLGLDNIQ
601 QNSKYPILFL FLLITYVILT FVLLLNMLTA LMGETVENVS KESERIWRLO
651 RARTILEFEK MLPWLRSRF RMGELCKVAE DDFRLCLRIN EVKWTWKTH
701 VSFLNEDPGF VVRTDFNKIQ DSSRRNSKTT LNAFEEVEEF PETS

Fig. 2B

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Fig. 3

		1	50
hVR1d	(1)	-----	-----
hVR1d.2	(1)	-----	-----
hVR1	(1)	-----	-----
hVR2	(1)	-----	-----
ORTPC4	(1)	MADSSGPRAGPGGEVALLPQDESQTPGGEAFPLSSIANLFEQEDGSLSPS	
hECaC	(1)	-----	-----
		51	100
hVR1d	(1)	---MSPLEPT-----RGGSELETDSEFANGSTGGSH---G	
hVR1d.2	(1)	---MSPLEPT-----RGGSELETDSEFANGSTGGSH---G	
hVR1	(24)	PLDGPVNERPPPAKP-----QLSTPESRLFGKIDDEAPFVCS	
hVR2	(1)	---MTSPSSG-----VFLEPLDGGGIDSEADRG---DF	
ORTPC4	(51)	PADARFPGGIDGRPNLRMKFGQAFKGVH---IDLPTLPEGVVSGH	
hECaC	(1)	-----	-----
		101	150
hVR1d	(34)	QKASDSSPCHRRQGSTGGGETGSESERPVSRCQDMLQGGGCG	
hVR1d.2	(34)	QKASDSSPCHRRQGSTGGGETGSESERPVSRCQDMLQGGGCG	
hVR1	(66)	EEELDCCITTVPVITQGP-GIPPTGRLSCSVLSSEKTRD	
hVR2	(33)	GS-----PFMSQFGEER-KFPQIRVNLVYRQCA-PDPNRD	
ORTPC4	(101)	APMDLFDYCTVHHSGDNWRKKIIEKQCPSPFPPPTIRK/N	
hECaC	(8)	ERK---LI---CLWKKFRWFES-----SEINICDEQN---Q	
		151	200
hVR1d	(84)	CSNHTLMSEKKA---GPPVAPFPLPSLM---VITASSTGKTCMLKALI	
hVR1d.2	(84)	CSNHTLMSEKKA---GPPVAPFPLPSLM---VITASSTGKTCMLKALI	
hVR1	(115)	ERSFPAVAKNSDLESILIRSSRLDNEFPHFTGKTCMLKALI	
hVR2	(76)	QDRFPAVAKVPSDLAGPESSTETPAWTSSENYGSTGKTCMLKALI	
ORTPC4	(151)	SPIDFIVKSSADLAGLHEDMLHEERITLPERKRPSTGKTCMLKALI	
hECaC	(41)	KRSPPLLLA---GN---QALNELLRCKRV---GAMSTALHIA	
		201	250
hVR1d	(133)	YKSPFTHIRRLNABEMLI---SSNRVETESA---ESCQALHIAIRV	
hVR1d.2	(133)	YKSPFTHIRRLNABEMLI---SSNRVETESA---ESCQALHIAIRV	
hVR1	(165)	NILPCATPPELPHATSESSGEMNSYKESVESCQALHIAIRV	
hVR2	(126)	NILPCATPPELPHATSESSGEMNSYKESVESCQALHIAIRV	
ORTPC4	(201)	NILPCATPPELPHATSESSGEMNSYKESVESCQALHIAIRV	
hECaC	(89)	YDL-----PQAMVLM---AAPF---FEPNISEL---EQQALHIAIRV	
		251	300
hVR1d	(183)	GDVALLERAGADVYVHAKSAFTNRYQHEGFPYGETPLMLAACNNQPE	
hVR1d.2	(183)	GDVALLERAGADVYVHAKSAFTNRYQHEGFPYGETPLMLAACNNQPE	
hVR1	(215)	AAVYTLVESCADVYVHAKSAFTNRYQHEGFPYGETPLMLAACNNQPE	
hVR2	(176)	AAVYTLVESCADVYVHAKSAFTNRYQHEGFPYGETPLMLAACNNQPE	
ORTPC4	(251)	KHYVTLVESCADVYVHAKSAFTNRYQHEGFPYGETPLMLAACNNQPE	
hECaC	(130)	AAVYTLVESCADVYVHAKSAFTNRYQHEGFPYGETPLMLAACNNQPE	
		301	350
hVR1d	(233)	VELLEP---EQDIPRDSEGNLHALVVAH---FTINDVIMYTH	
hVR1d.2	(233)	VELLEP---EQDIPRDSEGNLHALVVAH---FTINDVIMYTH	
hVR1	(265)	VELLEP---EQDIPRDSEGNLHALVVAH---FTINDVIMYTH	
hVR2	(225)	VELLEP---EQDIPRDSEGNLHALVVAH---FTINDVIMYTH	
ORTPC4	(301)	VELLEP---EQDIPRDSEGNLHALVVAH---FTINDVIMYTH	
hECaC	(179)	VELLEP---EQDIPRDSEGNLHALVVAH---FTINDVIMYTH	

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Fig. 3 (cont'd)

```

351                                400
hVR1d (281)  L-----SGNWELDGRNNDGLTPPLAARMRABLSLISRETRKRLP
hVR1d.2 (281) L-----SGNWELDGRNNDGLTPPLAARMRABLSLISRETRKRLP
hVR1 (315)  LGGRLHETLKEBETNNGSTPPLAAGTKIKGASLLOESTIOPECK
hVR2 (275)  QAGRLHETVQLDGRNLDGLTPPLAARMRABLSLISRETRKRLP
ORTPC4 (351) LGGRLHETVQLDGRNLDGLTPPLAARMRABLSLISRETRKRLP
hECaC (221)  SYDRGGHQLDGLTPPLAARMRABLSLISRETRKRLP

401                                450
hVR1d (327)  SLNRKFDWAYGCVSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hVR1d.2 (327) SLNRKFDWAYGCVSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hVR1 (365)  SLNRKFDWAYGCVSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hVR2 (323)  SLNRKFDWAYGCVSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
ORTPC4 (401) SLNRKFDWAYGCVSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hECaC (262)  -K-RNRKFDWAYGCVSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH

451                                500
hVR1d (375)  LLEPLRLTQDKWKKRFFLECPYVYNNRITLVYRFRRE---
hVR1d.2 (375) LLEPLRLTQDKWKKRFFLECPYVYNNRITLVYRFRRE---
hVR1 (414)  LLEPLRLTQDKWKKRFFLECPYVYNNRITLVYRFRRE---
hVR2 (371)  LLEPLRLTQDKWKKRFFLECPYVYNNRITLVYRFRRE---
ORTPC4 (450) LLEPLRLTQDKWKKRFFLECPYVYNNRITLVYRFRRE---
hECaC (308)  LLEPLRLTQDKWKKRFFLECPYVYNNRITLVYRFRRE---

501                                550
hVR1d (422)  -----EATPBLAETHKQWLQILRMVLA-MCHSRKREAI
hVR1d.2 (422) -----EATPBLAETHKQWLQILRMVLA-MCHSRKREAI
hVR1 (458)  -----VDGLSPKMEKGLYVYNNRITLVYRFRRE---
hVR2 (416)  -----KKQAPPKKAKKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
ORTPC4 (494) -----LQGTLPYPRVYNNRITLVYRFRRE---
hECaC (358)  NRTSPRNTLLQKLLQAYMPPKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH

551                                600
hVR1d (462)  LLEPSD-----SSKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hVR1d.2 (462) LLEPSD-----SSKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hVR1 (497)  LLEPSD-----SSKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hVR2 (455)  LLEPSD-----SSKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
ORTPC4 (533) LLEPSD-----SSKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH
hECaC (408)  LLEPSD-----SSKSSSLYDLINVDITDNGS-VLEITAVYN-ILNRHEH

601                                650
hVR1d (510)  LELGNNMLYTRGFCVSGSYVMIOKVILDLRLFLVFLGFVA
hVR1d.2 (510) LELGNNMLYTRGFCVSGSYVMIOKVILDLRLFLVFLGFVA
hVR1 (545)  LELGNNMLYTRGFCVSGSYVMIOKVILDLRLFLVFLGFVA
hVR2 (503)  LELGNNMLYTRGFCVSGSYVMIOKVILDLRLFLVFLGFVA
ORTPC4 (582) LELGNNMLYTRGFCVSGSYVMIOKVILDLRLFLVFLGFVA
hECaC (458) LELGNNMLYTRGFCVSGSYVMIOKVILDLRLFLVFLGFVA

651                                700
hVR1d (560)  LSLTERPPLNKDC-----SSYGSFSAHLELFF
hVR1d.2 (560) LSLTERPPLNKDC-----SSYGSFSAHLELFF
hVR1 (595)  LSLTERPPLNKDC-----SSYGSFSAHLELFF
hVR2 (553)  LSLTERPPLNKDC-----SSYGSFSAHLELFF
ORTPC4 (632) LSLTERPPLNKDC-----SSYGSFSAHLELFF
hECaC (508)  LSLTERPPLNKDC-----SSYGSFSAHLELFF

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Fig. 3 (cont'd)

```

701                                     750
hVR1d (590) LPTGSGDINQONKYPSPFILLQVILTFVILLNMLIALNGETVEV
hVR1d.2 (590) LPTGSGDINQONKYPSPFILLQVILTFVILLNMLIALNGETVEV
hVR1 (641) LPTGSGDINQONKYPSPFILLQVILTFVILLNMLIALNGETVEV
hVR2 (603) LPTGSGDINQONKYPSPFILLQVILTFVILLNMLIALNGETVEV
ORTPC4 (676) LPTGSGDINQONKYPSPFILLQVILTFVILLNMLIALNGETVEV
hECaC (536) LPTGSGDINQONKYPSPFILLQVILTFVILLNMLIALNGETVEV

751                                     800
hVR1d (640) SKESRIWNLQARITLSEEMLEEMERSE--KMGELCKV-----EDL
hVR1d.2 (640) SKESRIWNLQARITLSEEMLEEMERSE--KMGELCKV-----EDL
hVR1 (691) SKESRIWNLQARITLSEEMLEEMERSE--KMGELCKV-----EDL
hVR2 (653) SKESRIWNLQARITLSEEMLEEMERSE--KMGELCKV-----EDL
ORTPC4 (726) SKESRIWNLQARITLSEEMLEEMERSE--KMGELCKV-----EDL
hECaC (586) SKESRIWNLQARITLSEEMLEEMERSE--KMGELCKV-----EDL

801                                     850
hVR1d (683) RLKLRVSEVNWVEMVTHVSALNEDF--SP-VKRTGVV--R-----
hVR1d.2 (683) RLKLRVSEVNWVEMVTHVSALNEDF--SP-VKRTGVV--R-----
hVR1 (739) RLKLRVSEVNWVEMVTHVSALNEDF--SP-VKRTGVV--R-----
hVR2 (700) RLKLRVSEVNWVEMVTHVSALNEDF--SP-VKRTGVV--R-----
ORTPC4 (774) RLKLRVSEVNWVEMVTHVSALNEDF--SP-VKRTGVV--R-----
hECaC (627) RLKLRVSEVNWVEMVTHVSALNEDF--SP-VKRTGVV--R-----

851                                     900
hVR1d (721) -----SNNKSKTLAFEE--SFPETSV-----
hVR1d.2 (723) -----SNNKSKTLAFEE--SFPETSV-----
hVR1 (789) KNFALVPLLEASARPRRSACB--VILRQFSGSLKPDAEVPR--PAASGE
hVR2 (742) -----PPRDEGAEENYV--LLQSN-----
ORTPC4 (823) SSVVPRVLELNKSMLEVVV--SMGWPRCDGHQGYPRKWR--EDAPL-
hECaC (677) LSLPMPS--STSR--AWERLFGTLRRDLGGINRGLEDGE--WEYQI-

901
hVR1d (721) -
hVR1d.2 (746) -
hVR1 (839) K
hVR2 (765) -
ORTPC4 (872) -
hECaC (726) -

```

PCT/US01/45336

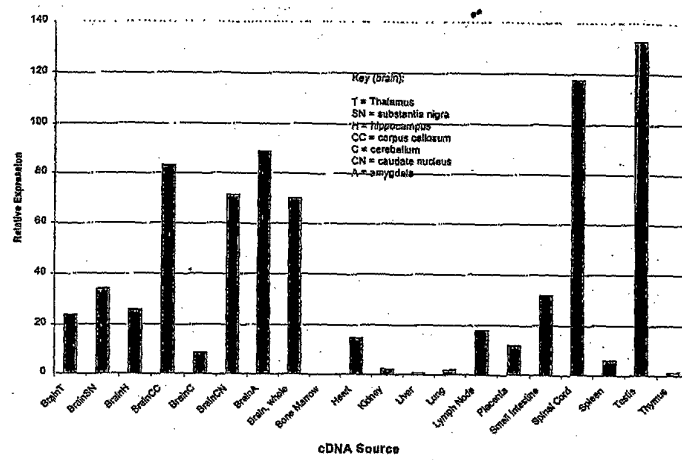
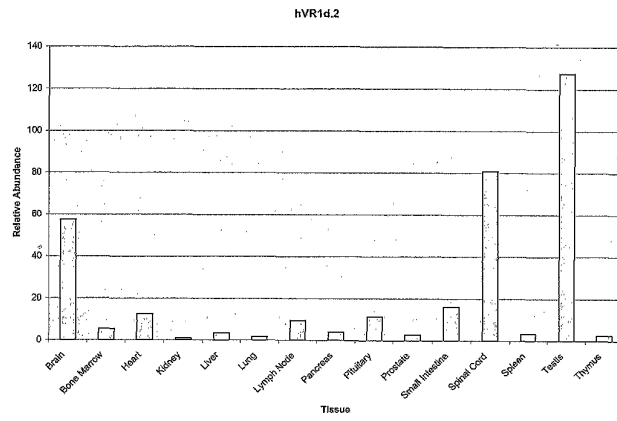


FIG. 4

WO 02/44210

PCT/US01/45336

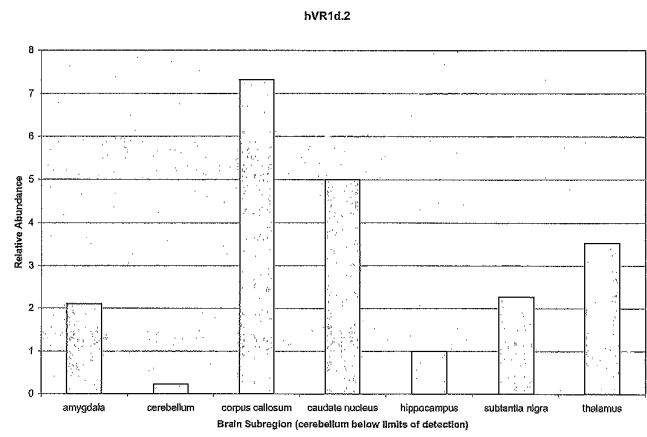
FIG 5.



WO 02/44210

PCT/US01/45336

FIG 6.



WO 02/44210

PCT/US01/45336

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> NOVEL HUMAN NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES ENCODING A NOVE
HUMAN ION CHANNEL EXPRESSED IN SPINAL CORD AND BRAIN

<130> D0109PCT

<150> 60/250,587

<151> 2000-12-01

<160> 31

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 2163

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2160)

<400> 1

atg agc ttt att tgc agg cca cga gga ggg ggc agg ctg gag aca gat	48
Met Ser Phe Ile Cys Arg Pro Arg Gly Gly Gly Arg Leu Glu Thr Asp	
1 5 10 15	
tcc agg gtg gca gca ggg ggg tgg aca gcg gga agc cat aca gtg ggc	96
Ser Arg Val Ala Ala Gly Gly Trp Thr Ala Gly Ser His Thr Val Gly	
20 25 30	
aaa gag caa aag gcc tca gat acg tca ccc atg ggc cac aga gag caa	144
Lys Glu Gln Lys Ala Ser Asp Thr Ser Pro Met Gly His Arg Glu Gln	
35 40 45	
gga gcc agc ata gga gac gga gga gaa aca gct gga gag gga gga gag	192
Gly Ala Ser Ile Gly Asp Gly Gly Glu Thr Ala Gly Glu Gly Gly Glu	
50 55 60	
cgg cca agt gta agg tct ggg agt gga gat gtg gag cag ggg ctt ggg	240
Arg Pro Ser Val Arg Ser Gly Ser Gly Asp Val Glu Gln Gly Leu Gly	
65 70 75 80	
gtc tgc ggc tgc agc aac cac acc ctc tgg gct ggg agg gcc aag ggc	288
Val Cys Gly Cys Ser Asn His Thr Leu Trp Ala Gly Arg Ala Lys Gly	
85 90 95	
agc cgg ggc cct cct gta act cca ccc atg gcc ctg cct gca gac ttc	336
Ser Arg Gly Pro Pro Val Thr Pro Pro Met Ala Leu Pro Ala Asp Phe	
100 105 110	
ctc atg cac aag ctg acg gcc tcc gac acg ggg aag acc tgc ctg atg	384
Leu Met His Lys Leu Thr Ala Ser Asp Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met	
115 120 125	

WO 02/44210

PCT/US01/45336

aag gcc ttg tta aac atc aac ccc aac acc aag gag ata gtg cgg atc Lys Ala Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Thr Lys Glu Ile Val Arg Ile 130 135 140	432
ctg ctt gcc ttt gct gaa gag aac gac atc ctg ggc agg ttc atc aac Leu Leu Ala Phe Ala Glu Glu Asn Asp Ile Leu Gly Arg Phe Ile Asn 145 150 155 160	480
gcc gag tac aca gag gag gcc tat gaa ggg cag acg gcg ctg aac atc Ala Glu Tyr Thr Glu Glu Ala Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu Asn Ile 165 170 175	528
gcc atc gag cgg cgg cag ggg gac atc gca gcc ctg ctc atc gcc gcc Ala Ile Glu Arg Arg Gln Gly Asp Ile Ala Ala Leu Leu Ile Ala Ala 180 185 190	576
ggc gcc gac gtc aac gcg cac gcc aag ggg gcc ttc ttc aac ccc aag Gly Ala Asp Val Asn Ala His Lys Gly Ala Phe Phe Asn Pro Lys 195 200 205	624
tac caa cac gaa ggc ttc tac ttc ggt gag acg ccc ctg gcc ctg gca Tyr Gln His Glu Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Thr Pro Leu Ala Leu Ala 210 215 220	672
gca tgc acc aac cag ccc gag att gtg cag ctg ctg atg gag cac gag Ala Cys Thr Asn Gln Pro Glu Ile Val Gln Leu Leu Met Glu His Glu 225 230 235 240	720
cag acg gac atc acc tcg cgg gac tca cga ggc aac aac atc ctt cac Gln Thr Asp Ile Thr Ser Arg Asp Ser Arg Gly Asn Asn Ile Leu His 245 250 255	768
gcc ctg gtg acc gtg gcc gag gac ttc aag acg cag aat gac ttt gtg Ala Leu Val Thr Val Ala Glu Asp Phe Lys Thr Gln Asn Asp Phe Val 260 265 270	816
aag cgc atg tac gac atg atc cta ctg cgg agt ggc aac tgg gag ctg Lys Arg Met Tyr Asp Met Ile Leu Leu Arg Ser Gly Asn Trp Glu Leu 275 280 285	864
gag acc act cgc aac aac gat ggc ctc acg ccg ctg cag ctg gcc gcc Glu Thr Thr Arg Asn Asn Asp Gly Leu Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala 290 295 300	912
aag atg ggc aag gcg gag atc ctg aag tac atc ctc agt cgt gag atc Lys Met Gly Lys Ala Glu Ile Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Arg Glu Ile 305 310 315 320	960
aag gag aag cgg ctc cgg agc ctg tcc agg aag ttc acc gac tgg gcg Lys Glu Lys Arg Leu Arg Ser Leu Ser Arg Lys Phe Thr Asp Trp Ala 325 330 335	1008
tac gga ccc gtg tca tcc tcc ctc tac gac ctc acc aac gtg gac acc Tyr Gly Pro Val Ser Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Asn Val Asp Thr 340 345 350	1056

WO 02/44210

PCT/US01/45336

acc acg gac aac tca gtg ctg gaa atc act gtc tac aac acc aac atc Thr Thr Asp Asn Ser Val Leu Glu Ile Thr Val Tyr Asn Thr Asn Ile 355 360 365	1104
gac aac cgg cat gag atg ctg acc ctg gag ccg ctg cac acg ctg ctg Asp Asn Arg His Glu Met Leu Thr Leu Glu Pro Leu His Thr Leu Leu 370 375 380	1152
cat atg aag tgg aag aag ttt gcc aag cac atg ttc ttt ctg tcc ttc His Met Lys Trp Lys Lys Phe Ala Lys His Met Phe Phe Leu Ser Phe 385 390 395 400	1200
tgc ttt tat ttc ttc tac aac atc acc ctg acc ctc gtc tgc tac tac Cys Phe Tyr Phe Phe Tyr Asn Ile Thr Leu Thr Leu Val Ser Tyr Tyr 405 410 415	1248
cgc ccc cgg gag gag gcc atc ccg cac ccc ttg gcc ctg acg cac Arg Pro Arg Glu Glu Glu Ala Ile Pro His Pro Leu Ala Leu Thr His 420 425 430	1296
aag atg ggg tgg ctg cag ctc cta ggg agg atg ttt gtg ctc atc tgg Lys Met Gly Trp Leu Gln Leu Leu Gly Arg Met Phe Val Leu Ile Trp 435 440 445	1344
gcc atg tgc atc tct gtg aaa gag gcc att gcc atc ttc ctg ctg aga Ala Met Cys Ile Ser Val Lys Glu Gly Ile Ala Ile Phe Leu Leu Arg 450 455 460	1392
ccc tcg gat ctg cag tcc atc ctc tcg gat gcc tgg ttc cac ttt gtc Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ile Leu Ser Asp Ala Trp Phe His Phe Val 465 470 475 480	1440
ttt ttt atc caa gct gtg ctt gtg ata ctg tct gtc ttc ttg tac ttg Phe Phe Ile Gln Ala Val Leu Val Ile Leu Ser Val Phe Leu Tyr Leu 485 490 495	1488
ttt gcc tac aaa gag tac ctc gcc tgc ctc gtg ctg gcc atg gcc ctg Phe Ala Tyr Lys Glu Tyr Leu Ala Cys Leu Val Leu Ala Met Ala Leu 500 505 510	1536
ggc tgg gcg aac atg ctc tac tat acg cgg ggt ttc cag tcc atg ggc Gly Trp Ala Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln Ser Met Gly 515 520 525	1584
atg tac agc gtc atg atc cag aag gtc att ttg cat gat gtt ctg aag Met Tyr Ser Val Met Ile Gln Lys Val Ile Leu His Asp Val Leu Lys 530 535 540	1632
ttc ttg ttt gta tat atc gcg ttt ttg ctt gga ttt gga gta gcc ttg Phe Leu Phe Val Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu 545 550 555 560	1680
gcc tcg ctg atc gag aag tgt ccc aaa gac aac aag gac tgc agc tcc Ala Ser Leu Ile Glu Lys Cys Pro Lys Asp Asn Lys Asp Cys Ser Ser 565 570 575	1728
tac gcc agc ttc agc gac gca gtg ctg gaa ctc ttc aag ctc acc ata	1776

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

Tyr Gly Ser Phe Ser Asp Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Leu Thr Ile
580                    585                    590

ggc ctg ggt gay ctg aac atc cag cag aac tcc aag tat ccc att ctc 1824
Gly Leu Gly Asp Leu Asn Ile Gln Gln Asn Ser Lys Tyr Pro Ile Leu
595                    600                    605

ttt ctg ttc ctg ctc atc acc tat gtc atc ctc acc ttt gtt ctc ctc 1872
Phe Leu Phe Leu Leu Ile Thr Tyr Val Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu
610                    615                    620

ctc aac atg ctc att gct ctg atg ggc gag act gtg gag aac gtc tcc 1920
Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Glu Asn Val Ser
625                    630                    635                    640

aag gag agc gaa cgc atc tgg cgc ctg cag aga gcc agg acc atc ttg 1968
Lys Glu Ser Glu Arg Ile Trp Arg Leu Gln Arg Ala Arg Thr Ile Leu
645                    650                    655

gag ttt gag aaa atg tta cca gaa tgg ctg agg agc aga ttc cgg atg 2016
Glu Phe Glu Lys Met Leu Pro Glu Trp Leu Arg Ser Arg Phe Arg Met
660                    665                    670

gga gag ctg tgc aaa gtg gcc gag gat gat ttc cga ctg tgt ttg cgg 2064
Gly Glu Leu Cys Lys Val Ala Glu Asp Asp Phe Arg Leu Cys Leu Arg
675                    680                    685

atc aat gag gtg aag tgg act gaa tgg aag acg cac gtc tcc ttc ctt 2112
Ile Asn Glu Val Lys Trp Thr Glu Trp Lys Thr His Val Ser Phe Leu
690                    695                    700

aac gaa gac cgg ggg cct gta aga cga aca ggt act gtc gct gtg agg 2160
Asn Glu Asp Pro Gly Pro Val Arg Arg Thr Gly Thr Val Ala Val Arg
705                    710                    715                    720

tga 2163

<210> 2
<211> 720
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ser Phe Ile Cys Arg Pro Arg Gly Gly Gly Arg Leu Glu Thr Asp
1 5 10 15

Ser Arg Val Ala Ala Gly Gly Trp Thr Ala Gly Ser His Thr Val Gly
20 25 30

Lys Glu Gln Lys Ala Ser Asp Thr Ser Pro Met Gly His Arg Glu Gln
35 40 45

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336
PCT/US01/45336

Gly Ala Ser Ile Gly Asp Gly Gly Glu Thr Ala Gly Glu Gly Gly Glu
50 55 60

Arg Pro Ser Val Arg Ser Gly Ser Gly Asp Val Glu Gln Gly Leu Gly
65 70 75 80

Val Cys Gly Cys Ser Asn His Thr Leu Trp Ala Gly Arg Ala Lys Gly
85 90 95

Ser Arg Gly Pro Pro Val Thr Pro Pro Met Ala Leu Pro Ala Asp Phe
100 105 110

Leu Met His Lys Leu Thr Ala Ser Asp Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met
115 120 125

Lys Ala Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Thr Lys Glu Ile Val Arg Ile
130 135 140

Leu Leu Ala Phe Ala Glu Glu Asn Asp Ile Leu Gly Arg Phe Ile Asn
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Thr Glu Glu Ala Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu Asn Ile
165 170 175

Ala Ile Glu Arg Arg Gln Gly Asp Ile Ala Ala Leu Leu Ile Ala Ala
180 185 190

Gly Ala Asp Val Asn Ala His Ala Lys Gly Ala Phe Phe Asn Pro Lys
195 200 205

Tyr Gln His Glu Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Thr Pro Leu Ala Leu Ala
210 215 220

Ala Cys Thr Asn Gln Pro Glu Ile Val Gln Leu Leu Met Glu His Glu
225 230 235 240

Gln Thr Asp Ile Thr Ser Arg Asp Ser Arg Gly Asn Asn Ile Leu His
245 250 255

Ala Leu Val Thr Val Ala Glu Asp Phe Lys Thr Gln Asn Asp Phe Val
260 265 270

Lys Arg Met Tyr Asp Met Ile Leu Leu Arg Ser Gly Asn Trp Glu Leu

WO 02/44210

PCT/US01/45336

275 280 285
 Glu Thr Thr Arg Asn Asn Asp Gly Leu Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala
 290 295 300
 Lys Met Gly Lys Ala Glu Ile Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Arg Glu Ile
 305 310 315 320
 Lys Glu Lys Arg Leu Arg Ser Leu Ser Arg Lys Phe Thr Asp Trp Ala
 325 330 335
 Tyr Gly Pro Val Ser Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Asn Val Asp Thr
 340 345 350
 Thr Thr Asp Asn Ser Val Leu Glu Ile Thr Val Tyr Asn Thr Asn Ile
 355 360 365
 Asp Asn Arg His Glu Met Leu Thr Leu Glu Pro Leu His Thr Leu Leu
 370 375 380
 His Met Lys Trp Lys Lys Phe Ala Lys His Met Phe Phe Leu Ser Phe
 385 390 395 400
 Cys Phe Tyr Phe Phe Tyr Asn Ile Thr Leu Thr Leu Val Ser Tyr Tyr
 405 410 415
 Arg Pro Arg Glu Glu Glu Ala Ile Pro His Pro Leu Ala Leu Thr His
 420 425 430
 Lys Met Gly Trp Leu Gln Leu Leu Gly Arg Met Phe Val Leu Ile Trp
 435 440 445
 Ala Met Cys Ile Ser Val Lys Glu Gly Ile Ala Ile Phe Leu Leu Arg
 450 455 460
 Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ile Leu Ser Asp Ala Trp Phe His Phe Val
 465 470 475 480
 Phe Phe Ile Gln Ala Val Leu Val Ile Leu Ser Val Phe Leu Tyr Leu
 485 490 495
 Phe Ala Tyr Lys Glu Tyr Leu Ala Cys Leu Val Leu Ala Met Ala Leu
 500 505 510

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Gly Trp Ala Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln Ser Met Gly
515 520 525

Met Tyr Ser Val Met Ile Gln Lys Val Ile Leu His Asp Val Leu Lys
530 535 540

Phe Leu Phe Val Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu
545 550 555 560

Ala Ser Leu Ile Glu Lys Cys Pro Lys Asp Asn Lys Asp Cys Ser Ser
565 570 575

Tyr Gly Ser Phe Ser Asp Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Leu Thr Ile
580 585 590

Gly Leu Gly Asp Leu Asn Ile Gln Gln Asn Ser Lys Tyr Pro Ile Leu
595 600 605

Phe Leu Phe Leu Leu Ile Thr Tyr Val Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu
610 615 620

Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Glu Asn Val Ser
625 630 635 640

Lys Glu Ser Glu Arg Ile Trp Arg Leu Gln Arg Ala Arg Thr Ile Leu
645 650 655

Glu Phe Glu Lys Met Leu Pro Glu Trp Leu Arg Ser Arg Phe Arg Met
660 665 670

Gly Glu Leu Cys Lys Val Ala Glu Asp Asp Phe Arg Leu Cys Leu Arg
675 680 685

Ile Asn Glu Val Lys Trp Thr Glu Trp Lys Thr His Val Ser Phe Leu
690 695 700

Asn Glu Asp Pro Gly Pro Val Arg Arg Thr Gly Thr Val Ala Val Arg
705 710 715 720

<210> 3
<211> 2238
<212> DNA

WO 02/44210

PCT/US01/45336

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2235)

<400> 3

```

atg agc ttt att tgc agg cca cga gga ggg ggc agg ctg gag aca gat      48
Met Ser Phe Ile Cys Arg Pro Arg Gly Gly Arg Leu Glu Thr Asp
1      5      10      15

tcc agg gtg gca gca ggg ggg tgg aca gcg gga agc cat aca gtg ggc      96
Ser Arg Val Ala Ala Gly Gly Trp Thr Ala Gly Ser His Thr Val Gly
20     25     30

aaa gag caa aag gcc tca gat acg tca ccc atg ggc cac aga gag caa     144
Lys Glu Gln Lys Ala Ser Asp Thr Ser Pro Met Gly His Arg Glu Gln
35     40     45

gga gcc agc ata gga gac gga gga gaa aca gct gga gag gga gga gag     192
Gly Ala Ser Ile Gly Asp Gly Gly Glu Thr Ala Gly Glu Gly Gly Glu
50     55     60

cgg cca agt gta agg tct ggg agt gga gat gtg gag cag ggg ctt ggg     240
Arg Pro Ser Val Arg Ser Gly Ser Gly Asp Val Glu Gln Gly Leu Gly
65     70     75     80

gtc tgc ggc tgc agc aac cac acc ctc tgg gct ggg agg gcc aag ggc     288
Val Cys Gly Cys Ser Asn His Thr Leu Trp Ala Gly Arg Ala Lys Gly
85     90     95

agc cgg ggc cct cct gta act cca ccc atg gcc ctg cct gca gac ttc     336
Ser Arg Gly Pro Pro Val Thr Pro Pro Met Ala Leu Pro Ala Asp Phe
100    105    110

ctc atg cac aag ctg acg gcc tcc gac acg ggg aag acc tgc ctg atg     384
Leu Met His Lys Leu Thr Ala Ser Asp Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met
115    120    125

aag gcc ttg tta aac atc aac ccc aac acc aag gag ata gtg cgg atc     432
Lys Ala Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Thr Lys Glu Ile Val Arg Ile
130    135    140

ctg ctt gcc ttt gct gaa gag aac gac atc ctg ggc agg ttc atc aac     480
Leu Leu Ala Phe Ala Glu Glu Asn Asp Ile Leu Gly Arg Phe Ile Asn
145    150    155    160

gcc gag tac aca gag gag gcc tat gaa ggg cag acg gcg ctg aac atc     528
Ala Glu Tyr Thr Glu Glu Ala Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu Asn Ile
165    170    175

gcc atc gag cgg cgg cag ggg gac atc gca gcc ctg ctc atc gcc gcc     576
Ala Ile Glu Arg Arg Gln Gly Asp Ile Ala Ala Leu Leu Ile Ala Ala
180    185    190

ggc gcc gac gtc aac gcg cac gcc aag ggg gcc ttc ttc aac ccc aag     624
Gly Ala Asp Val Asn Ala His Ala Lys Gly Ala Phe Phe Asn Pro Lys

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

195	200	205	
tac caa cac gaa ggc ttc tac ttc ggt gag acg ccc ctg gcc ctg gca Tyr Gln His Glu Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Thr Pro Leu Ala Leu Ala 210 215 220			672
gca tgc acc aac cag ccc gag att gtg cag ctg ctg atg gag cac gag Ala Cys Thr Asn Gln Pro Glu Ile Val Gln Leu Leu Met Glu His Glu 225 230 235 240			720
cag acg gac atc acc tcg cgg gac tca cga ggc aac aac atc ctt cac Gln Thr Asp Ile Thr Ser Arg Asp Ser Arg Gly Asn Asn Ile Leu His 245 250 255			768
gcc ctg gtg acc gtg gcc gag gac ttc aag acg cag aat gac ttt gtg Ala Leu Val Thr Val Ala Glu Asp Phe Lys Thr Gln Asn Asp Phe Val 260 265 270			816
aag cgc atg tac gac atg atc cta ctg cgg agt ggc aac tgg gag ctg Lys Arg Met Tyr Asp Met Ile Leu Leu Arg Ser Gly Asn Trp Glu Leu 275 280 285			864
gag acc act cgc aac aac gat ggc ctc acg cgg ctg cag ctg gcc gcc Glu Thr Thr Arg Asn Asn Asp Gly Leu Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala 290 295 300			912
aag atg ggc aag gcg gag atc ctg aag tac atc ctc agt cgt gag atc Lys Met Gly Lys Ala Glu Ile Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Arg Glu Ile 305 310 315 320			960
aag gag aag cgg ctc cgg agc ctg tcc agg aag ttc acc gac tgg cgg Lys Glu Lys Arg Leu Arg Ser Leu Ser Arg Lys Phe Thr Asp Trp Ala 325 330 335			1008
tac gga ccc gtg tca tcc tcc ctc tac gac ctc acc aac gtg gac acc Tyr Gly Pro Val Ser Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Asn Val Asp Thr 340 345 350			1056
acc acg gac aac tca gtg ctg gaa atc act gtc tac aac acc aac atc Thr Thr Asp Asn Ser Val Leu Glu Ile Thr Val Tyr Asn Thr Asn Ile 355 360 365			1104
gac aac cgg cat gag atg ctg acc ctg gag cgg ctg cac acg ctg ctg Asp Asn Arg His Glu Met Leu Thr Leu Glu Pro Leu His Thr Leu Leu 370 375 380			1152
cat atg aag tgg aag aag ttt gcc aag cac atg ttc ttt ctg tcc ttc His Met Lys Trp Lys Lys Phe Ala Lys His Met Phe Phe Leu Ser Phe 385 390 395 400			1200
tgc ttt tat ttc ttc tac aac atc acc ctg acc ctc gtc tcg tac tac Cys Phe Tyr Phe Phe Tyr Asn Ile Thr Leu Thr Leu Val Ser Tyr Tyr 405 410 415			1248
cga ccc cgg gag gag gag gcc atc ccg cac ccc ttg gcc ctg acg cac Arg Pro Arg Glu Glu Glu Ala Ile Pro His Pro Leu Ala Leu Thr His 420 425 430			1296

WO 02/44210

PCT/US01/45336

aag atg ggg tgg ctg cag ctc cta ggg agg atg ttt gtg ctc atc tgg Lys Met Gly Trp Leu Gln Leu Leu Gly Arg Met Phe Val Leu Ile Trp 435 440 445	1344
gcc atg tgc atc tct gtg aaa gag ggc att gcc atc ttc ctg ctg aga Ala Met Cys Ile Ser Val Lys Glu Gly Ile Ala Ile Phe Leu Leu Arg 450 455 460	1392
ccc tgg gat ctg cag tcc atc ctc tgg gat gcc tgg ttc cac ttt gtc Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ile Leu Ser Asp Ala Trp Phe His Phe Val 465 470 475 480	1440
ttt ttt atc caa gct gtg ctt gtg ata ctg tct gtc ttc ttg tac ttg Phe Phe Ile Gln Ala Val Leu Val Ile Leu Ser Val Phe Leu Tyr Leu 485 490 495	1488
ttt gcc tac aaa gag tac ctc gcc tgc ctc gtg ctg gcc atg gcc ctg Phe Ala Tyr Lys Glu Tyr Leu Ala Cys Leu Val Leu Ala Met Ala Leu 500 505 510	1536
ggc tgg gcg aac atg ctc tac tat acg cgg ggt ttc cag tcc atg ggc Gly Trp Ala Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln Ser Met Gly 515 520 525	1584
atg tac agc gtc atg atc cag aag gtc att ttg cat gat gtt ctg aag Met Tyr Ser Val Met Ile Gln Lys Val Ile Leu His Asp Val Leu Lys 530 535 540	1632
ttc ttg ttt gta tat atc gcg ttt ttg ctt gga ttt gga gta gcc ttg Phe Leu Phe Val Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu 545 550 555 560	1680
gcc tgg ctg atc gag aag tgt ccc aaa gac aac aag gac tgc agc tcc Ala Ser Leu Ile Glu Lys Cys Pro Lys Asp Asn Lys Asp Cys Ser Ser 565 570 575	1728
tac gcc agc ttc agc gac gca gtg ctg gaa ctc ttc aag ctc acc ata Tyr Gly Ser Phe Ser Asp Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Leu Thr Ile 580 585 590	1776
ggc ctg ggt gay ctg aac atc cag cag aac tcc aag tat ccc att ctc Gly Leu Gly Asp Leu Asn Ile Gln Gln Asn Ser Lys Tyr Pro Ile Leu 595 600 605	1824
ttt ctg ttc ctg ctc atc acc tat gtc atc ctc acc ttt gtt ctc ctc Phe Leu Phe Leu Leu Ile Thr Tyr Val Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu 610 615 620	1872
ctc aac atg ctc att gct ctg atg ggc gag act gtg gag aac gtc tcc Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Glu Asn Val Ser 625 630 635 640	1920
aag gag agc gaa cgc atc tgg cgc ctg cag aga gcc agg acc atc ttg Lys Glu Ser Glu Arg Ile Trp Arg Leu Gln Arg Ala Arg Thr Ile Leu 645 650 655	1968

WO 02/44210

PCT/US01/45336

gag ttt gag aaa atg tta cca gaa tgg ctg agg agc aga ttc cgg atg 2016
 Glu Phe Glu Lys Met Leu Pro Glu Trp Leu Arg Ser Arg Phe Arg Met
 660 665 670
 gga gag ctg tgc aaa gtg gcc gag gat gat ttc cga ctg tgt ttg cgg 2064
 Gly Glu Leu Cys Lys Val Ala Glu Asp Asp Phe Arg Leu Cys Leu Arg
 675 680 685
 atc aat gag gtg aag tgg act gaa tgg aag acg cac gtc tcc ttc ctt 2112
 Ile Asn Glu Val Lys Trp Thr Glu Trp Lys Thr His Val Ser Phe Leu
 690 695 700
 aac gaa gac ccg ggg cct gta aga cga aca gat ttc aac aaa atc caa 2160
 Asn Glu Asp Pro Gly Pro Val Arg Arg Thr Asp Phe Asn Lys Ile Gln
 705 710 715 720
 gat tct tcc agg aac aac agc aaa acc act ctc aat gca ttt gaa gaa 2208
 Asp Ser Ser Arg Asn Asn Ser Lys Thr Thr Leu Asn Ala Phe Glu Glu
 725 730 735
 gtc gag gaa ttc ccg gaa acc tcg gtg tag 2238
 Val Glu Glu Phe Pro Glu Thr Ser Val
 740 745

<210> 4
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Phe Ile Cys Arg Pro Arg Gly Gly Gly Arg Leu Glu Thr Asp
 1 5 10 15
 Ser Arg Val Ala Ala Gly Gly Trp Thr Ala Gly Ser His Thr Val Gly
 20 25 30
 Lys Glu Gln Lys Ala Ser Asp Thr Ser Pro Met Gly His Arg Glu Gln
 35 40 45
 Gly Ala Ser Ile Gly Asp Gly Gly Glu Thr Ala Gly Glu Gly Gly Glu
 50 55 60
 Arg Pro Ser Val Arg Ser Gly Ser Gly Asp Val Glu Gln Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Val Cys Gly Cys Ser Asn His Thr Leu Trp Ala Gly Arg Ala Lys Gly
 85 90 95
 Ser Arg Gly Pro Pro Val Thr Pro Pro Met Ala Leu Pro Ala Asp Phe

WO 02/44210

PCT/US01/45336

100 105 110
 Leu Met His Lys Leu Thr Ala Ser Asp Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met
 115 120 125
 Lys Ala Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Thr Lys Glu Ile Val Arg Ile
 130 135 140
 Leu Leu Ala Phe Ala Glu Glu Asn Asp Ile Leu Gly Arg Phe Ile Asn
 145 150 155 160
 Ala Glu Tyr Thr Glu Glu Ala Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu Asn Ile
 165 170 175
 Ala Ile Glu Arg Arg Gln Gly Asp Ile Ala Ala Leu Leu Ile Ala Ala
 180 185 190
 Gly Ala Asp Val Asn Ala His Ala Lys Gly Ala Phe Phe Asn Pro Lys
 195 200 205
 Tyr Gln His Glu Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Thr Pro Leu Ala Leu Ala
 210 215 220
 Ala Cys Thr Asn Gln Pro Glu Ile Val Gln Leu Leu Met Glu His Glu
 225 230 235 240
 Gln Thr Asp Ile Thr Ser Arg Asp Ser Arg Gly Asn Asn Ile Leu His
 245 250 255
 Ala Leu Val Thr Val Ala Glu Asp Phe Lys Thr Gln Asn Asp Phe Val
 260 265 270
 Lys Arg Met Tyr Asp Met Ile Leu Leu Arg Ser Gly Asn Trp Glu Leu
 275 280 285
 Glu Thr Thr Arg Asn Asn Asp Gly Leu Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala
 290 295 300
 Lys Met Gly Lys Ala Glu Ile Leu Lys Tyr Ile Leu Ser Arg Glu Ile
 305 310 315 320
 Lys Glu Lys Arg Leu Arg Ser Leu Ser Arg Lys Phe Thr Asp Trp Ala
 325 330 335

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Tyr Gly Pro Val Ser Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Asn Val Asp Thr
 340 345 350
 Thr Thr Asp Asn Ser Val Leu Glu Ile Thr Val Tyr Asn Thr Asn Ile
 355 360 365
 Asp Asn Arg His Glu Met Leu Thr Leu Glu Pro Leu His Thr Leu Leu
 370 375 380
 His Met Lys Trp Lys Lys Phe Ala Lys His Met Phe Phe Leu Ser Phe
 385 390 395 400
 Cys Phe Tyr Phe Phe Tyr Asn Ile Thr Leu Thr Leu Val Ser Tyr Tyr
 405 410 415
 Arg Pro Arg Glu Glu Glu Ala Ile Pro His Pro Leu Ala Leu Thr His
 420 425 430
 Lys Met Gly Trp Leu Gln Leu Leu Gly Arg Met Phe Val Leu Ile Trp
 435 440 445
 Ala Met Cys Ile Ser Val Lys Glu Gly Ile Ala Ile Phe Leu Leu Arg
 450 455 460
 Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ile Leu Ser Asp Ala Trp Phe His Phe Val
 465 470 475 480
 Phe Phe Ile Gln Ala Val Leu Val Ile Leu Ser Val Phe Leu Tyr Leu
 485 490 495
 Phe Ala Tyr Lys Glu Tyr Leu Ala Cys Leu Val Leu Ala Met Ala Leu
 500 505 510
 Gly Trp Ala Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln Ser Met Gly
 515 520 525
 Met Tyr Ser Val Met Ile Gln Lys Val Ile Leu His Asp Val Leu Lys
 530 535 540
 Phe Leu Phe Val Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu
 545 550 555 560

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Ala Ser Leu Ile Glu Lys Cys Pro Lys Asp Asn Lys Asp Cys Ser Ser
565 570 575

Tyr Gly Ser Phe Ser Asp Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Leu Thr Ile
580 585 590

Gly Leu Gly Asp Leu Asn Ile Gln Gln Asn Ser Lys Tyr Pro Ile Leu
595 600 605

Phe Leu Phe Leu Leu Ile Thr Tyr Val Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu
610 615 620

Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Glu Asn Val Ser
625 630 635 640

Lys Glu Ser Glu Arg Ile Trp Arg Leu Gln Arg Ala Arg Thr Ile Leu
645 650 655

Glu Phe Glu Lys Met Leu Pro Glu Trp Leu Arg Ser Arg Phe Arg Met
660 665 670

Gly Glu Leu Cys Lys Val Ala Glu Asp Asp Phe Arg Leu Cys Leu Arg
675 680 685

Ile Asn Glu Val Lys Trp Thr Glu Trp Lys Thr His Val Ser Phe Leu
690 695 700

Asn Glu Asp Pro Gly Pro Val Arg Arg Thr Asp Phe Asn Lys Ile Gln
705 710 715 720

Asp Ser Ser Arg Asn Asn Ser Lys Thr Thr Leu Asn Ala Phe Glu Glu
725 730 735

Val Glu Glu Phe Pro Glu Thr Ser Val
740 745

<210> 5
<211> 839
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

1           5           10           15
Gln Lys Asp Thr Cys Pro Asp Pro Leu Asp Gly Asp Pro Asn Ser Arg
    20           25           30
Pro Pro Pro Ala Lys Pro Gln Leu Ser Thr Ala Lys Ser Arg Thr Arg
    35           40           45
Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe Pro Val Asp Cys Pro
    50           55           60
His Glu Glu Gly Glu Leu Asp Ser Cys Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro
    65           70           75           80
Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu
    85           90           95
Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg Leu
    100          105          110
Tyr Asp Arg Arg Ser Ile Phe Glu Ala Val Ala Gln Asn Asn Cys Gln
    115          120          125
Asp Leu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Gln Lys Ser Lys Lys His Leu
    130          135          140
Thr Asp Asn Glu Phe Lys Asp Pro Glu Thr Gly Lys Thr Cys Leu Leu
    145          150          155          160
Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu
    165          170          175
Leu Leu Glu Ile Ala Arg Gln Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Val Asn
    180          185          190
Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln Thr Ala Leu His Ile
    195          200          205
Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Ala Leu Val Thr Leu Leu Val Glu Asn
    210          215          220
Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe Phe Lys Lys Thr
    225          230          235          240
Lys Gly Arg Pro Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala
    245          250          255
Ala Cys Thr Asn Gln Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Leu Gln Asn Ser
    260          265          270
Trp Gln Thr Ala Asp Ile Ser Ala Arg Asp Ser Val Gly Asn Thr Val
    275          280          285
Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys
    290          295          300
Phe Val Thr Ser Met Tyr Asn Glu Ile Leu Ile Leu Gly Ala Lys Leu

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

305          310          315          320
His Pro Thr Leu Lys Leu Glu Glu Leu Thr Asn Lys Lys Gly Met Thr
          325          330          335
Pro Leu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Lys Ile Gly Val Leu Ala Tyr
          340          345          350
Ile Leu Gln Arg Glu Ile Gln Glu Pro Glu Cys Arg His Leu Ser Arg
          355          360          365
Lys Phe Thr Glu Trp Ala Tyr Gly Pro Val His Ser Ser Leu Tyr Asp
          370          375          380
Leu Ser Cys Ile Asp Thr Cys Glu Lys Asn Ser Val Leu Glu Val Ile
385          390          395          400
Ala Tyr Ser Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His Asp Met Leu Leu Val
          405          410          415
Glu Pro Leu Asn Arg Leu Leu Gln Asp Lys Trp Asp Arg Phe Val Lys
          420          425          430
Arg Ile Phe Tyr Phe Asn Phe Leu Val Tyr Cys Leu Tyr Met Ile Ile
          435          440          445
Phe Thr Met Ala Ala Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gly Leu Pro Pro Phe
          450          455          460
Lys Met Glu Lys Thr Gly Asp Tyr Phe Arg Val Thr Gly Glu Ile Leu
465          470          475          480
Ser Val Leu Gly Gly Val Tyr Phe Phe Phe Arg Gly Ile Gln Tyr Phe
          485          490          495
Leu Gln Arg Arg Pro Ser Met Lys Thr Leu Phe Val Asp Ser Tyr Ser
          500          505          510
Glu Met Leu Phe Phe Leu Gln Ser Leu Phe Met Leu Ala Thr Val Val
          515          520          525
Leu Tyr Phe Ser His Leu Lys Glu Tyr Val Ala Ser Met Val Phe Ser
          530          535          540
Leu Ala Leu Gly Trp Thr Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln
545          550          555          560
Gln Met Gly Ile Tyr Ala Val Met Ile Glu Lys Met Ile Leu Arg Asp
          565          570          575
Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr Val Val Phe Leu Phe Gly Phe Ser
          580          585          590
Thr Ala Val Val Thr Leu Ile Glu Asp Gly Lys Asn Asp Ser Leu Pro
          595          600          605
Ser Glu Ser Thr Ser His Arg Trp Arg Gly Pro Ala Cys Arg Pro Pro

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

610          615          620
Asp Ser Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Glu Leu Phe Lys
625          630          635          640
Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu Asn Tyr Asp Phe
645          650          655
Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val Ile Leu Thr Tyr
660          665          670
Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Asn
675          680          685
Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu Gln Arg Ala Ile
690          695          700
Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys Met Arg Lys Ala
705          710          715          720
Phe Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Tyr Thr Pro Asp Gly Lys
725          730          735
Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn Trp Thr Thr
740          745          750
Trp Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu
755          760          765
Gly Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser Ser Arg Val Ser
770          775          780
Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu Ala
785          790          795          800
Ser Ala Arg Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg
805          810          815
Gln Phe Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser
820          825          830
Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys
835
<210> 6
<211> 764
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Thr Ser Pro Ser Ser Ser Pro Val Phe Arg Leu Glu Thr Leu Asp
1      5      10      15
Gly Gly Gln Glu Asp Gly Ser Glu Ala Asp Arg Gly Lys Leu Asp Phe
20     25     30

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Gly Ser Gly Leu Pro Pro Met Glu Ser Gln Phe Gln Gly Glu Asp Arg
 35 40 45
 Lys Phe Ala Pro Gln Ile Arg Val Asn Leu Asn Tyr Arg Lys Gly Thr
 50 55 60
 Gly Ala Ser Gln Pro Asp Pro Asn Arg Phe Asp Arg Asp Arg Leu Phe
 65 70 75 80
 Asn Ala Val Ser Arg Gly Val Pro Glu Asp Leu Ala Gly Leu Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Lys Thr Ser Lys Tyr Leu Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Glu
 100 105 110
 Gly Ser Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Val Leu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Leu Pro Leu Leu Gln Ile Asp Arg Asp
 130 135 140
 Ser Gly Asn Pro Gln Pro Leu Val Asn Ala Gln Cys Thr Asp Asp Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Gly His Ser Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Lys Arg Ser Leu
 165 170 175
 Gln Cys Val Lys Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala Asn Val His Ala Arg
 180 185 190
 Ala Cys Gly Arg Phe Phe Gln Lys Gly Gln Gly Thr Cys Phe Tyr Phe
 195 200 205
 Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Lys Gln Trp Asp Val
 210 215 220
 Val Ser Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro Ala Ser Leu Gln Ala
 225 230 235 240
 Thr Asp Ser Gln Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Met Ile Ser
 245 250 255
 Asp Asn Ser Ala Glu Asn Ile Ala Leu Val Thr Ser Met Tyr Asp Gly
 260 265 270
 Leu Leu Gln Ala Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr Val Gln Leu Glu Asp
 275 280 285
 Ile Arg Asn Leu Gln Asp Leu Thr Pro Leu Lys Leu Ala Ala Lys Glu
 290 295 300
 Gly Lys Ile Glu Ile Phe Arg His Ile Leu Gln Arg Glu Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Ser His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Cys Tyr Gly Pro Val
 325 330 335

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Arg Val Ser Leu Tyr Asp Leu Ala Ser Val Asp Ser Cys Glu Glu Asn
 340 345 350
 Ser Val Leu Glu Ile Ile Ala Phe His Cys Lys Ser Pro His Arg His
 355 360 365
 Arg Met Val Val Leu Glu Pro Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ala Lys Trp
 370 375 380
 Asp Leu Leu Ile Pro Lys Phe Phe Leu Asn Phe Leu Cys Asn Leu Ile
 385 390 395 400
 Tyr Met Phe Ile Phe Thr Ala Val Ala Tyr His Gln Pro Thr Leu Lys
 405 410 415
 Lys Gln Ala Ala Pro His Leu Lys Ala Glu Val Gly Asn Ser Met Leu
 420 425 430
 Leu Thr Gly His Ile Leu Ile Leu Leu Gly Gly Ile Tyr Leu Leu Val
 435 440 445
 Gly Gln Leu Trp Tyr Phe Trp Arg Arg His Val Phe Ile Trp Ile Ser
 450 455 460
 Phe Ile Asp Ser Tyr Phe Glu Ile Leu Phe Leu Phe Gln Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Thr Val Val Ser Gln Val Leu Cys Phe Leu Ala Ile Glu Trp Tyr Leu
 485 490 495
 Pro Leu Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Gly Trp Leu Asn Leu Leu Tyr
 500 505 510
 Tyr Thr Arg Gly Phe Gln His Thr Gly Ile Tyr Ser Val Met Ile Gln
 515 520 525
 Lys Val Ile Leu Arg Asp Leu Leu Arg Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Val
 530 535 540
 Phe Leu Phe Gly Phe Ala Val Ala Leu Val Ser Leu Ser Gln Glu Ala
 545 550 555 560
 Trp Arg Pro Glu Ala Pro Thr Gly Pro Asn Ala Thr Glu Ser Val Gln
 565 570 575
 Pro Met Glu Gly Gln Glu Asp Glu Gly Asn Gly Ala Gln Tyr Arg Gly
 580 585 590
 Ile Leu Glu Ala Ser Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly
 595 600 605
 Glu Leu Ala Phe Gln Glu Gln Leu His Phe Arg Gly Met Val Leu Leu
 610 615 620
 Leu Leu Leu Ala Tyr Val Leu Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met
 625 630 635 640

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Leu Ile Ala Leu Met Ser Glu Thr Val Asn Ser Val Ala Thr Asp Ser
 645 650 655
 Trp Ser Ile Trp Lys Leu Gln Lys Ala Ile Ser Val Leu Glu Met Glu
 660 665 670
 Asn Gly Tyr Trp Trp Cys Arg Lys Lys Gln Arg Ala Gly Val Met Leu
 675 680 685
 Thr Val Gly Thr Lys Pro Asp Gly Ser Pro Asp Glu Arg Trp Cys Phe
 690 695 700
 Arg Val Glu Glu Val Asn Trp Ala Ser Trp Glu Gln Thr Leu Pro Thr
 705 710 715 720
 Leu Cys Glu Asp Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Arg Thr Leu Glu Asn
 725 730 735
 Pro Val Leu Ala Ser Pro Pro Lys Glu Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu
 740 745 750
 Glu Asn Tyr Val Pro Val Gln Leu Leu Gln Ser Asn
 755 760
 <210> 7
 <211> 871
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala
 1 5 10 15
 Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser
 35 40 45
 Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg
 50 55 60
 Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val
 85 90 95
 Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr
 100 105 110
 Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile
 115 120 125
 Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro
 130 135 140

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg
145              150              155              160
Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His
165              170              175
Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys
180              185              190
Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp
195              200              205
Thr Ile Pro Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg
210              215              220
Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr
225              230              235              240
Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu
245              250              255
Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe
260              265              270
Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro
275              280              285
Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu
290              295              300
Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg
305              310              315              320
Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg
325              330              335
Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Lys
340              345              350
Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn
355              360              365
Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly
370              375              380
Ile Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg
385              390              395              400
His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser
405              410              415
Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Ala Ser
420              425              430
Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu
435              440              445

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg
450                      455                      460

Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys
465                      470                      475                      480

Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly
485                      490                      495

Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala
500                      505                      510

Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Phe Thr Asn
515                      520                      525

Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe
530                      535                      540

Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val
545                      550                      555                      560

Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala
565                      570                      575

Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe
580                      585                      590

Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys
595                      600                      605

Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe
610                      615                      620

Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asn Pro Cys Ala
625                      630                      635                      640

Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys Thr Val Pro Thr
645                      650                      655

Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr Phe Leu Leu Asp
660                      665                      670

Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser
675                      680                      685

Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val Thr Tyr Ile Ile
690                      695                      700

Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu
705                      710                      715                      720

Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile Trp Lys Leu Gln
725                      730                      735

Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe Pro Val Phe Leu
740                      745                      750

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val Gly Lys Ser Ser
 755 760 765
 Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn
 770 775 780
 Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly
 785 790 795 800
 Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His Thr Val Gly Arg
 805 810 815
 Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg Val Val Glu Leu
 820 825 830
 Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val Pro Leu Asp Ser Met
 835 840 845
 Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr Pro Arg Lys Trp
 850 855 860
 Arg Thr Glu Asp Ala Pro Leu
 865 870
 <210> 8
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Met Gly Leu Ser Leu Pro Lys Glu Lys Gly Leu Ile Leu Cys Leu Trp
 1 5 10 15
 Ser Lys Phe Cys Arg Trp Phe Gln Arg Arg Glu Ser Trp Ala Gln Ser
 20 25 30
 Arg Asp Glu Gln Asn Leu Leu Gln Gln Lys Arg Ile Trp Glu Ser Pro
 35 40 45
 Leu Leu Leu Ala Ala Lys Asp Asn Asp Val Gln Ala Leu Asn Lys Leu
 50 55 60
 Leu Lys Tyr Glu Asp Cys Lys Val His Gln Arg Gly Ala Met Gly Glu
 65 70 75 80
 Thr Ala Leu His Ile Ala Ala Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Ala Ala Met
 85 90 95
 Val Leu Met Glu Ala Ala Pro Glu Leu Val Phe Glu Pro Met Thr Ser
 100 105 110
 Glu Leu Tyr Glu Gly Gln Thr Ala Leu His Ile Ala Val Val Asn Gln
 115 120 125
 Asn Met Asn Leu Val Arg Ala Leu Leu Ala Arg Arg Ala Ser Val Ser

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

130          135          140
Ala Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Arg Arg Ser Pro Cys Asn Leu Ile
145          150          155          160
Tyr Phe Gly Glu His Pro Leu Ser Phe Ala Ala Cys Val Asn Ser Glu
165          170          175
Glu Ile Val Arg Leu Leu Ile Glu His Gly Ala Asp Ile Arg Ala Gln
180          185          190
Asp Ser Leu Gly Asn Thr Val Leu His Ile Leu Ile Leu Gln Pro Asn
195          200          205
Lys Thr Phe Ala Cys Gln Met Tyr Asn Leu Leu Ser Tyr Asp Arg
210          215          220
His Gly Asp His Leu Gln Pro Leu Asp Leu Val Pro Asn His Gln Gly
225          230          235          240
Leu Thr Pro Phe Lys Leu Ala Gly Val Glu Gly Asn Thr Val Met Phe
245          250          255
Gln His Leu Met Gln Lys Arg Lys His Thr Gln Trp Thr Tyr Gly Pro
260          265          270
Leu Thr Ser Thr Leu Tyr Asp Leu Thr Glu Ile Asp Ser Ser Gly Asp
275          280          285
Glu Gln Ser Leu Leu Glu Leu Ile Ile Thr Thr Lys Lys Arg Glu Ala
290          295          300
Arg Gln Ile Leu Asp Gln Thr Pro Val Lys Glu Leu Val Ser Leu Lys
305          310          315          320
Trp Lys Arg Tyr Gly Arg Pro Tyr Phe Cys Met Leu Gly Ala Ile Tyr
325          330          335
Leu Leu Tyr Ile Ile Cys Phe Thr Met Cys Cys Ile Tyr Arg Pro Leu
340          345          350
Lys Pro Arg Thr Asn Asn Arg Thr Ser Pro Arg Asp Asn Thr Leu Leu
355          360          365
Gln Gln Lys Leu Leu Gln Glu Ala Tyr Met Thr Pro Lys Asp Asp Ile
370          375          380
Arg Leu Val Gly Glu Leu Val Thr Val Ile Gly Ala Ile Ile Leu
385          390          395          400
Leu Val Glu Val Pro Asp Ile Phe Arg Met Gly Val Thr Arg Phe Phe
405          410          415
Gly Gln Thr Ile Leu Gly Gly Pro Phe His Val Leu Ile Ile Thr Tyr
420          425          430
Ala Phe Met Val Leu Val Thr Met Val Met Arg Leu Ile Ser Ala Ser

```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

      435              440              445
Gly Glu Val Val Pro Met Ser Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Cys Asn
450              455              460
Val Met Tyr Phe Ala Arg Gly Phe Gln Met Leu Gly Pro Phe Thr Ile
465              470              475              480
Met Ile Gln Lys Met Ile Phe Gly Asp Leu Met Arg Phe Cys Trp Leu
485              490              495
Met Ala Val Val Ile Leu Gly Phe Ala Ser Ala Phe Tyr Ile Ile Phe
500              505              510
Gln Thr Glu Asp Pro Glu Glu Leu Gly His Phe Tyr Asp Tyr Pro Met
515              520              525
Ala Leu Phe Ser Thr Phe Glu Leu Phe Leu Thr Ile Ile Asp Gly Pro
530              535              540
Ala Asn Tyr Asn Val Asp Leu Pro Phe Met Tyr Ser Ile Thr Tyr Ala
545              550              555              560
Ala Phe Ala Ile Ile Ala Thr Leu Leu Met Leu Asn Leu Leu Ile Ala
565              570              575
Met Met Gly Asp Thr His Trp Arg Val Ala His Glu Arg Asp Glu Leu
580              585              590
Trp Arg Ala Gln Ile Val Ala Thr Thr Val Met Leu Arg Lys Leu
595              600              605
Pro Arg Cys Leu Trp Pro Arg Ser Gly Ile Cys Gly Arg Glu Tyr Gly
610              615              620
Leu Gly Asp Arg Trp Phe Leu Arg Val Glu Asp Arg Gln Asp Leu Asn
625              630              635              640
Arg Gln Arg Ile Gln Arg Tyr Ala Gln Ala Phe His Thr Arg Gly Ser
645              650              655
Glu Asp Leu Asp Lys Asp Ser Val Glu Lys Leu Glu Leu Gly Cys Pro
660              665              670
Phe Ser Pro His Leu Ser Leu Pro Met Pro Ser Val Ser Arg Ser Thr
675              680              685
Ser Arg Ser Ser Ala Asn Trp Glu Arg Leu Arg Gln Gly Thr Leu Arg
690              695              700
Arg Asp Leu Arg Gly Ile Ile Asn Arg Gly Leu Glu Asp Gly Glu Ser
705              710              715              720
Trp Glu Tyr Gln Ile
725

```

<210> 9

WO 02/44210

PCT/US01/45336

<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Phe Phe Leu Ser Phe Cys Phe Tyr Phe Phe Tyr Asn Ile Thr Leu
1 5 10 15

Thr Leu Val Ser Tyr
20

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Leu Gly Arg Met Phe Val Leu Ile Trp Ala Met Cys Ile Ser Val
1 5 10 15

Lys Glu Gly Ile Ala Ile Phe Leu Leu
20 25

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Val Phe Phe Ile Gln Ala Val Leu Val Ile Leu Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Tyr Leu Phe Ala Tyr
20

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Tyr Leu Ala Cys Leu Val Leu Ala Met Ala Leu Gly Trp Ala Asn Met
1 5 10 15

Leu Tyr Tyr

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

WO 02/44210

PCT/US01/45336

Phe Leu Phe Val Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Ile
 20
 <210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Ile Leu Phe Leu Phe Leu Leu Ile Thr Tyr Val Ile Leu Thr Phe Val
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu
 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Tyr Arg Pro Arg Glu Glu Ala Ile Pro His Pro Leu Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 His Lys Met Gly Trp Leu Gln
 20
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Arg Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ile Leu Ser Asp Ala Trp Phe His
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Thr Arg Gly Phe Gln Ser Met Gly Met Tyr Ser Val Met Ile Gln Lys
 1 5 10 15
 Val Ile Leu His Asp Val Leu Lys Phe Leu Phe Val Tyr Ile Ala Phe
 20 25 30
 Leu Leu Gly Phe Gly Val Ala Leu

WO 02/44210

PCT/US01/45336

```

35          40
<210> 18
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Glu Lys Cys Pro Lys Asp Asn Lys Asp Cys Ser Ser Tyr Gly Ser Phe
1          5          10          15
Ser Asp Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Leu Gly Asp
20          25          30
Leu Asn Ile Gln Gln Asn Ser Lys Tyr Pro
35          40
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 19
cgcagtgctg gaactcttca                20
<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 20
catcagagca atgagcatgt tga                23
<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 21
gccagagatg tcgttctctt cagc                24
<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 22
gatccgcact atctccttgg tgttgg                26
<210> 23
<211> 27
<212> DNA
```

WO 02/44210

PCT/US01/45336

<213> Homo sapiens
<400> 23
actgaatgga agacgcacgt ctccttc 27

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24
tgacctgaac atccagcaga 20

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
agcatgttga ggaggagaac a 21

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 26
cggaacctc ggtgtagaag 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
tcctccctca aagcctctct 20

<210> 28
<211> 38
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28
gcagcagcgg ccgcacatg ttctttctgt ccttctgc 38

<210> 29
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29

WO 02/44210

PCT/US01/45336

gcagcagtcg accctcacag cgacagtacc tgttcg

36

<210> 30
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

gcagcagcgg ccgcatgagc ttattttgca ggccacgag

39

<210> 31
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens

gcagcagtcg acgttgagga ggagacaaa ggtgagg

37

【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
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/044210 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, 15/62, 15/63, 1/21, 5/10, C07K 14/705, 16/28, A01K 67/027, A61K 38/17, C12Q 1/68, G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/45336
- (22) International Filing Date: 30 November 2001 (30.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/250,587 1 December 2000 (01.12.2000) US
- (71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. Box 4000, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).
- (72) Inventors: GAUGHAN, Glen; 30 Mansfield Drive #1503, Northford, CT 06472 (US). FEDER, John; 277 Dutchtown Zion Road, Belle Mead, NJ 08502 (US). NELSON, Thomas; 12 Azalea Court, Lawrenceville, NJ 08648 (US). MINTIER, Gabe; 318 Morrison Ave., Hightstown, NJ 08530 (US). RAMANATHAN, Chandra; 41 Alison Avenue, Wallingford, CT 06492 (US).
- (74) Agents: D'AMICO, Stephen et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).
- (81) Designated States (national): AI, 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, 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, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, 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, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 6 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 02/044210 A3
- (54) Title: NOVEL HUMAN NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES ENCODING A NOVEL HUMAN ION CHANNEL EXPRESSED IN SPINAL CORD AND BRAIN
- (57) Abstract: The present invention relates to novel human nucleic acid molecules encoding novel human cation channels, and proteins and polypeptides encoded by such nucleic acid molecules. More specifically, the nucleic acid molecules of the invention include novel human genes, e.g., hVR1d.1 and hVR1d.2, that encode proteins or polypeptides that are expressed in spinal cord and brain tissues and display sequence homology and structural homology to the vanilloid and TRP (transient receptor potential) families of cation channel proteins. The proteins and polypeptides of the invention directed to this novel human cation channel may be therapeutically valuable targets for drug delivery in the treatment of human diseases that involve calcium, sodium, potassium or other ionic homeostatic dysfunction, such as central nervous system (CNS) disorders, e.g., degenerative neurological disorders such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, or other disorders such as chronic pain, anxiety and depression, stroke, cardiac disorders, e.g., arrhythmia, diabetes, hypercalcemia, hypocalcemia, hypercalciuria, hypocalciuria, or ion disorders associated with immunological disorders, gastro-intestinal (GI) tract disorders or renal or liver disease.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No. PCT/US 01/45336
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/705 C07K16/28 A01K67/027 A61K38/17 C12Q1/68 G01N33/68		
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 C12N		
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, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 09140 A (BRAKE ANTHONY ; JULIUS DAVID J (US); UNIV CALIFORNIA (US); CATERINA) 25 February 1999 (1999-02-25) Chicken VRI capsaicin receptor shows 48% identity with SEQ ID N ^o 4 in 615 aa overlap; see also pages 11-15	1-25
Y	WO 99 00115 A (DAVIS JOHN ; PARSONS ANDREW (GB); BENHAM CHRISTOPHER DAVID (GB); SM) 7 January 1999 (1999-01-07) claims 1-10 and pages 1-6	17-25
Y	WO 99 37765 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 29 July 1999 (1999-07-29) see pages 6-12 --- -/-	1-25
☒ 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 doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **I* 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 *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 May 2003		Date of making of the international search report 02/09/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-0940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer V1X, 0

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/US	01/45336

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIEDTKE W ET AL: "Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 103, October 2000 (2000-10), pages 525-535, XP002182926 ISSN: 0092-8674 cited in the application See Fig 1-2, page 527 and experimental procedures	1-25
A	HARTENECK C ET AL: "FROM WORM TO MAN: THREE SUBFAMILIES OF TRP CHANNELS" TRENDS IN NEUROSCIENCE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 23, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 159-166, XP001012870 ISSN: 0166-2236 cited in the application the whole document	1-25
A	STERNER O ET AL: "Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development." TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ENGLAND NOV 1999, vol. 20, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 459-465, XP002242584 ISSN: 0165-6147 the whole document	17-25
E	GB 2 372 993 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC ; SMITHKLINE BEECHAM CORP (US)) 11 September 2002 (2002-09-11) The vanilloid receptor 6 protein shows 99.8% identity with SEQ ID N°2 and 4 over a 604 amino acids overlap	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1986)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/45336
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)(e) for the following reasons:	
1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. ☒ Claims Nos.: 26 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01 /5336

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 26

Present claim 26 relates to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the modulation of the hVR1d biological activity. The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides disclosure for none such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

A meaningful search could not be carried out because it is not possible to determine if any of the presently known composition/substances is falling under the terms of said claim 26. Besides it is noted, that the inhibitory compounds of claim 26 are not rendered novel just because of the fact that they have been identified by the method of claim 25, e.g. such compounds can already exist. (Apart from this, it is also not possible to establish the scope of this claim without testing all known substances, clearly an undue burden).

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

Intern	Application No
PCT/US	01/45336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9909140	A	25-02-1999	AU 742391 B2
			03-01-2002
			AU 9115698 A
			08-03-1999
			EP 1009804 A1
			21-06-2000
			JP 2001514879 T
			18-09-2001
			WO 9909140 A1
			25-02-1999
			US 6335180 B1
			01-01-2002
WO 9900115	A	07-01-1999	AU 2466799 A
			09-08-1999
			CA 2309903 A1
			29-07-1999
			EP 1047711 A1
			02-11-2000
			JP 2002503451 T
			05-02-2002
			WO 9937675 A1
			29-07-1999
			WO 9900115 A1
			07-01-1999
WO 9937765	A	29-07-1999	EP 1003491 A1
			31-05-2000
			JP 2002511866 T
			16-04-2002
			WO 9937765 A1
			29-07-1999
			EP 1066381 A1
			10-01-2001
			JP 2002500885 T
			15-01-2002
			GB 2372993
			11-09-2002
GB 2372993	A	11-09-2002	US 2003027232 A1
			06-02-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/12	A 6 1 P 3/14	
A 6 1 P 3/14	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/06	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
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 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00 A	
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 グレン・ゴーガン

アメリカ合衆国06472コネチカット州ノースフォード、マンスフィールド・ドライブ・ナンバー1503、30番

(72)発明者 ジョン・フェダー

アメリカ合衆国08502ニュージャージー州ベル・ミード、ダッチタウン・ザイオン・ロード277番

(72)発明者 トーマス・ネルソン

アメリカ合衆国08648ニュージャージー州ローレンスビル、アザレア・コート12番

(72)発明者 ゲイブ・ミンティアー

アメリカ合衆国08520ニュージャージー州ハイツタウン、モリソン・アベニュー318番

(72)発明者 チャンドラ・ラマナサン

アメリカ合衆国06492コネチカット州ウォリングフォード、アリソン・アベニュー41番

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA09 CA12 CA20 DA02 DA06 EA02
EA04 FA01 GA11 GA13 GA18 GA19 GA27 HA03 HA11 HA13
HA14
4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79 QQ89
QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR57 QR62
QR77 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02
4B064 AG20 CA02 CA10 CA19 CC01 CC24 CE02 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02
BA05 BA24 CA24 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA01 BA02 BA22 BA44 CA53 NA14
ZA022 ZA052 ZA082 ZA122 ZA162 ZA182 ZA362 ZA382 ZA662 ZA752
ZA812 ZB072 ZC012 ZC212 ZC352 ZC422
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20
EA50 FA71 FA74 GA01 GA26

专利名称(译)	新的人核酸分子和编码在脊髓和脑中表达的新型人离子通道的多肽		
公开(公告)号	JP2005506037A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002546579	申请日	2001-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	グレンゴーガン ジョンフェダー トーマスネルソン ゲイブミンティアー チャンドララマナサン		
发明人	グレン・ゴーガン ジョン・フェダー トーマス・ネルソン ゲイブ・ミンティアー チャンドラ・ラマナサン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P3/12 A61P3/14 A61P9/00 A61P9/06 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P3/12 A61P3/14 A61P9/00 A61P9/06 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P3/12 A61P3/14 A61P9/00 A61P9/06 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P37/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/GA13 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA082 4C084/ZA122 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZA382 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZB072 4C084/ZC012 4C084/ZC212 4C084/ZC352 4C084/ZC422 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA26		

代理人(译)	田中，三夫 品川EiSatoshi
优先权	60/250587 2000-12-01 US
其他公开文献	JP2005506037A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明涉及编码新型人阳离子通道的新型人核酸分子，以及由此类核酸分子编码的蛋白质和多肽。 更具体地，本发明的核酸分子包括新的人类基因，例如hVR1d.1和hVR1d.2，其编码在脊髓和脑组织中表达的蛋白质或多肽，并显示出与类香草素的序列同源性和结构同源性。 阳离子通道蛋白的TRP（瞬态受体电位）家族。 针对该新的人类阳离子通道的本发明的蛋白质和多肽可以是药物递送的治疗上有价值的靶标，用于治疗涉及钙，钠，钾或其他离子稳态功能障碍例如中枢神经系统（CNS）疾病的人类疾病 例如，退化性神经系统疾病，例如阿尔茨海默氏病或帕金森氏病，或其他疾病，例如慢性疼痛，焦虑和抑郁，中风，心脏疾病，例如心律失常，糖尿病，高钙血症，低血钙，高钙尿症，低钙尿症或与离子相关的疾病 免疫性疾病，胃肠道疾病或肾脏或肝脏疾病。

