

(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2005-500053  
(P2005-500053A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N 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 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 175 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-519412 (P2003-519412)	(71) 出願人	502156641 ユーロスクリーン・ソシエテ・アノニム Euroscreen S. A. ベルギー国、ベール1070 ブリュッセル、ルート・ドゥ・レニック 802
(86) (22) 出願日	平成14年8月6日 (2002.8.6)	(74) 代理人	100109793 弁理士 神谷 恵理子
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月4日 (2004.2.4)	(72) 発明者	コミュニ, ディディエ ベルギー国、ベール1700ティルピーク、バロン ド ビロンラン34
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/008761	(72) 発明者	スアレツ, ナタリー ベルギー国、ベール1070ブリュッセル、リュ マーチン バン リエ8
(87) 国際公開番号	W02003/014731		
(87) 国際公開日	平成15年2月20日 (2003.2.20)		
(31) 優先権主張番号	09/924, 125		
(32) 優先日	平成13年8月7日 (2001.8.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , CA, JP		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オーファンGタンパク質共役型レセプターGPR86の天然リガンドと使用方法

(57) 【要約】

本発明は、Gタンパク質共役型レセプターGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) 及びその相同配列、該レセプターをコードするヌクレオチド配列を含む組換え細胞、及び天然リガンドADPの同定、並びに新薬の開発と種々の疾病診断の改良に有用なアゴニスト、逆アゴニスト又はアンタゴニスト化合物の同定のためのスクリーニングアッセイに用いられる等価分子に関する。本発明は、さらにGPR86活性のモジュレーターとしてATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP S, Ap3A, RB-2, スラミン及びPPADSに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サンプル中の G P R 8 6 活性を検出する方法であって、

a) G P R 8 6 と A D P が結合することを許容する条件下で、G P R 8 6 と A D P を含むサンプルを培養する工程；及び

b) セカンドメッセンジャーを検出する工程

を含む検出方法。

## 【請求項 2】

さらに、a) G P R 8 6 と A D P が結合することを許容する条件下で、A D P の不在下で、G P R 8 6 を含む第 2 のサンプルを培養する工程；及び

b) セカンドメッセンジャーを検出する工程

を含む請求項 1 に記載の検出方法。

## 【請求項 3】

前記サンプルが G P R 8 6 を発現する細胞を含んでいる請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 4】

前記サンプルが G P R 8 6 を有している細胞膜を含んでいる請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 5】

ウイルス誘導により出芽している G P R 8 6 ポリペプチドを含む膜内又は膜上で、前記培養工程が行われる請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 6】

a) 工程は、更に G 6 ポリペプチドの存在下で行われる請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

G P R 8 6 を発現する細胞を用いて、G P R 8 6 活性の候補モジュレーターをスクリーニングする方法であって、

a) 候補モジュレーターが存在する前記細胞の第 1 のサンプルと、候補モジュレーターが不在の前記細胞の第 2 のサンプルとの双方のサンプルを、G P R 8 6 と A D P が結合することを許容する条件下で培養する工程；

b) 前記第 1 のサンプルと第 2 のサンプルにおいて、G P R 8 6 ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程；及び

c) 前記第 1 のサンプルと第 2 のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャーの結果を比較する工程

を含むスクリーニング方法。

## 【請求項 8】

G P R 8 6 を有する細胞膜を用いて G P R 8 6 活性の候補モジュレーターをスクリーニングする方法であって、

a) 前記候補モジュレーターが存在する前記細胞膜の第 1 のサンプルと、候補モジュレーターが不在の前記細胞膜の第 2 のサンプルとの双方のサンプルを、G P R 8 6 と A D P が結合することを許容する条件下で培養する工程；

b) 前記第 1 のサンプルと第 2 のサンプルにおいて、G P R 8 6 ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程；及び

c) 前記第 1 のサンプルと第 2 のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャーの結果を比較する工程

を含むスクリーニング方法。

## 【請求項 9】

G P R 8 6 を発現する細胞を用いて、候補モジュレーターが G P R 8 6 活性を増大又は低減させているかを決定する方法であって、

a) 前記候補モジュレーターが存在する前記細胞の第 1 のサンプルと、候補モジュレータ

10

20

30

40

50

ーが不在の前記細胞の第2のサンプルとの双方のサンプルを、GPR86とADPが結合することを許容する条件下で培養する工程；

b) 前記第1のサンプルと第2のサンプルにおいて、GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程；及び

c) 前記第1のサンプルと第2のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャーの結果を比較する工程を含む決定方法。

【請求項10】

GPR86を有する細胞膜を用いて、候補モジュレーターがGPR86活性を増大又は低減させているかを決定する方法であって、

a) 前記候補モジュレーターが存在する前記細胞膜の第1のサンプルと、候補モジュレーターが不在の前記細胞膜の第2のサンプルとの双方のサンプルを、GPR86とADPが結合することを許容する条件下で培養する工程；

b) 前記第1のサンプルと第2のサンプルにおいて、GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程；及び

c) 前記第1のサンプルと第2のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャーの結果を比較する工程を含む決定方法。

【請求項11】

サンプル内の、GPR86の機能をモジュレートする物質の存在を検出する方法であって、

a) GPR86ポリペプチドと前記サンプルを接触させる工程；

b) 前記サンプルの存在下で前記GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を測定する工程；

c) 前記サンプルの存在下で測定されたシグナリング活性と、EC<sub>50</sub>で存在するADPと前記GPR86ポリペプチドが接触させている反応系で測定されたシグナリング活性とを比較し、GPR86の機能をモジュレートする物質が、前記サンプルの存在下で測定される前記活性の量がEC<sub>50</sub>で存在する前記ADPによって誘導される量の少なくとも50%であるかどうかを検出する工程

を含む検出方法。

【請求項12】

GPR86の機能をモジュレートする物質の同定方法であって、

a) 候補モジュレーターの存在及び不在下で、前記GPR86ポリペプチドと前記ADPが結合することを許容する条件下で、前記GPR86ポリペプチドを前記ADPと接触させる工程；及び

b) 前記GPR86ポリペプチドと前記候補モジュレーターとの結合を、前記候補モジュレーターの不在下での結合に対して測定し、GPR86の機能をモジュレートする物質として前記候補モジュレーターを同定する工程

を含む同定方法。

【請求項13】

前記GPR86は細胞によって発現される請求項11又は12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記GPR86が細胞膜に存在する請求項11又は12のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

前記GPR86は、ウィルス誘導された出芽している膜内又は膜上に存在している請求項11又は12のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

前記細胞は、COS7細胞、CHO細胞、LM(TK)細胞、NIH-3T3細胞、HEK-293細胞、K-562細胞、及び1321N1アストロサイトーマ細胞及び他の細胞系列からなる群から選ばれる請求項1, 2, 3, 6, 7, 9, 又は13のいずれかに記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 17】

G 16 ポリペプチドの存在下でさらに実行される請求項 7 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記測定工程又は前記検出工程は、ラベル変位、表面プラズモン共鳴、蛍光共鳴エネルギートランスファー、蛍光消光、及び蛍光分極から選ばれる方法を用いて行われる請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記物質は又は前記候補モジュレーターは、天然又は合成ペプチド、ポリペプチド、抗体又はその抗原結合断片、脂質、炭水化物、核酸及び有機低分子からなる群より選ばれる請求項 7 ~ 18 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 20】

前記検出又は前記 G P R 8 6 ポリペプチドのシグナリング活性の測定工程は、セカンドメッセンジャーのレベルにおける変化を検出する請求項 7 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

シグナリング活性の検出工程又はシグナリング活性の測定工程は、グアニンヌクレオチド結合又は変化、アデニレートシクラーゼ活性、c A M P、プロテインキナーゼ C 活性、フォスファチジルイノシトール分解、ジアシルグリセロール、イノシトール 3 リン酸、細胞内カルシウム、アラキドン酸濃度、M A P キナーゼ活性、チロシンキナーゼ活性、レポータ遺伝子発現の測定を含む請求項 7 ~ 20 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 22】

前記シグナリング活性の測定工程は、エクオリンベースアッセイを用いる工程を含む請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

細胞内のポリペプチドの G P R 8 6 活性をモジュレートする方法であって、G P R 8 6 活性がモジュレートされるように、ポリペプチドの G P R 8 6 活性をモジュレートする物質を、前記細胞に配送する ( d e l i v e r ) 工程を含む方法。

【請求項 24】

前記ポリヌクレオチドの相同組換えノックアウトを含む非ヒトほ乳類又は前記ポリヌクレオチドの天然レベルを超えて過剰に発現するトランスジェニック非ヒトほ乳類のような、ヒトポリヌクレオチドのオルソログ配列 ( 配列 I D N O . 1 ) の部分的又は全体の欠失を含む非ヒトほ乳類。 30

【請求項 25】

G P R 8 6 ポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項 26】

G P R 8 6 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法であって、

- a ) G P R 8 6 ポリペプチドに特異的な抗体と組織サンプルを接触させる工程 ;
- b ) 前記組織サンプルと前記抗体の結合を検出する工程 ; 及び 40
- c ) 工程 ( b ) で検出された結合と標準を比較し、前記標準に対して結合に差異があれば、G P R 8 6 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の徴候であるとする工程

を含む診断方法。

【請求項 27】

G P R 8 6 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法であって、

- a ) G P R 8 6 特異的リガンドに特異的な抗体と組織サンプルを接触させる工程 ;
- b ) 前記組織サンプルと前記抗体の結合を検出する工程 ; 及び
- c ) 工程 ( b ) で検出された結合と標準を比較し、前記標準に対して当該結合に差異があ 50

れば、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病であるとする工程

を含む診断方法。

【請求項28】

GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法であって、

a) GPR86ポリペプチドに特異的抗体及びGPR86特異的リガンドに特異的な抗体と、組織サンプルを接触させる工程；

b) 前記組織サンプルと前記抗体の結合を検出する工程；及び

c) 工程(b)で検出された結合と標準を比較し、前記標準に対して抗体のいずれか一方又は双方の結合に差異があれば、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の徴候であるとする工程

を含む診断方法。

【請求項29】

GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法であって、

a) 組織サンプルから核酸を単離する工程

b) 鋳型として前記核酸を用いてGPR86ポリヌクレオチドを増幅する工程；及び

c) 工程(b)で製造された増幅されたGPR86ポリヌクレオチドの量と標準とを比較し、前記標準に対して増幅されたGPR86ポリヌクレオチド量に差異があれば、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の徴候であるとする工程

を含む診断方法。

【請求項30】

GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法であって、

a) 組織サンプルから核酸を単離する工程

b) 鋳型として前記核酸を用いてGPR86特異的リガンドポリヌクレオチドを増幅する工程；及び

c) 工程(b)で製造された増幅されたGPR86特異的リガンドポリヌクレオチドの配列と標準とを比較し、前記標準に対して配列に差異があれば、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の徴候であるとする工程

を含む診断方法。

【請求項31】

前記標準は、配列ID NO: 1である請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記比較工程は、マイクロアレイ上で行われる請求項26～31に記載の方法。

【請求項33】

GPR86又はGPR86モジュレーターに結合する検出キットであって、

GPR86及びADP、及びそれらのためのパッケージング材料を含み、前記GPR86とADPが別々にパッケージされているキット。

【請求項34】

GPR86は細胞内に存在する請求項33のキット。

【請求項35】

前記細胞は、COS7細胞、CHO細胞、LM(TK)細胞、NIH-3T3細胞、HEK-293細胞、K-562細胞及び1321N1アストロサイトーマ細胞及びその他の細胞系列からなる群より選ばれる請求項34のキット。

【請求項36】

GPR86が細胞膜に会合(associate)している請求項33のキット。

【請求項37】

さらに、前記キットはセカンドメッセンジャー解析の構成要素を含む、請求項 33 ~ 36 のいずれかに記載のキット。

【請求項 38】

前記モジュレーターは、GPR86 特異的抗体又は GPR86 特異的核酸プローブを用いて検出される請求項 33 ~ 37 のいずれかに記載のキット。

【請求項 39】

さらに G16 ポリペプチドを含む請求項 33 ~ 38 のいずれかに記載のキット。

【請求項 40】

GPR86 のシグナリング活性をモジュレートする物質のスクリーニングキットであって、

GPR86 ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド及び GPR86 シグナリング検出手段及びこれらのパッケージング材料を含むキット。

【請求項 41】

さらに ADP のようなリガンドを含む請求項 40 に記載のキット。

【請求項 42】

GPR86 のシグナリング活性をモジュレートする物質のスクリーニングキットであって、

GPR86 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフォームされた細胞、及び GPR86 シグナリング検出手段、及びこれらのパッケージング材料を含むキット。

【請求項 43】

前記物質が、GPR86 に特異的な抗体又は GPR86 特異的核酸プローブを用いて検出される請求項 40 ~ 42 のいずれかに記載のキット。

【請求項 44】

GPR86 シグナリング活性の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断キットであって、

単離された GPR86 ポリペプチド、及び GPR86 シグナリング検出手段、及びこれらのパッケージング材料を含むキット。

【請求項 45】

前記疾患又は疾病は、GPR86 に特異的な抗体又は GPR86 特異的核酸プローブを用いて検出される請求項 44 に記載のキット。

【請求項 46】

ADP 不在で GPR86 を発現する細胞系列において測定される GPR86 活性の標準をさらに含む請求項 33 ~ 45 のいずれか記載のキット。

【請求項 47】

請求項 7 ~ 15 のいずれかの方法を用いて得られる GPR86 活性の候補モジュレーター。

【請求項 48】

前記候補モジュレーターが、ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP-S, Ap<sub>3</sub>A, RB-2, スラミン又は PADS である請求項 47 に記載の GPR86 活性の候補モジュレーター。

【請求項 49】

請求項 47 若しくは 48 の GPR86 活性の候補モジュレーター；又は GPR86 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患若しくは疾病の予防、治療及び / 若しくは軽減するための薬剤組成物としての使用のための請求項 25 の抗体の候補モジュレーター。

【請求項 50】

請求項 47 若しくは 48 の GPR86 活性の候補モジュレーター；又は GPR86 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患若しくは疾病の予防、治療及び / 若しくは軽減するための薬剤組成物の製造のための請求項 25 の抗体の候補モジュレーターの使用。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5 1】

請求項 5 0 の G P R 8 6 活性の候補モジュレーター、又は G P R 8 6 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患若しくは疾病の予防、治療及び/若しくは軽減するための薬剤組成物の製造のため請求項 2 5 の抗体の候補モジュレーターの使用であって、前記疾患又は疾病は、例えば、前立腺肥大；片頭痛；嘔吐；恐怖、鬱病、精神分裂症、激しいうつ病、譫妄、痴呆、およびいくつかの精神的遅滞を含む精神的及び神経的疾患；アルツハイマー病、パーキンソン病のような神経消耗性疾患；ハンチントン病、ギルトドラットレット症候群及びトロンボシス及び他の心血管作動病を含む他の関連する疾患のようなジスキネシア ( *dyskinesias* ) ；自己免疫疾患；炎症性疾患；生殖能力機能不良；胎児成長不良、；バクテリア、カビ、原生動物の感染、及び H I V 1 及び H I V 2 によって引き起こされる感染等のウィルス感染；痛み；癌；食欲不振；大食症；喘息；急性心不全；高血圧；尿閉；骨粗しょう症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；喘息；アレルギー；前立腺肥大、及び脳卒中からなる群より選ばれる使用。

10

## 【請求項 5 2】

請求項 4 7 乃至 4 9 のいずれかに記載の候補モジュレーター、又は請求項 2 5 に記載の抗体を、薬剤のキャリアに添加混合する工程を含む薬剤組成物の製造方法。

## 【請求項 5 3】

請求項 4 7 乃至 4 9 のいずれかに記載の候補モジュレーター、又は請求項 2 5 に記載の抗体を含む薬剤組成物。

## 【請求項 5 4】

A D P が、A T P , 2 M e S A T P , 2 M e S A D P , A D P S、又は A p 3 A と置き換えられる請求項 1 ~ 2 3 , 3 3 ~ 3 9 , 4 1 又は 4 6 のいずれかに記載の方法又はキット

20

## 【請求項 5 5】

A D P が R B - 2 , スラミン又は P P A D S によって置き換えられる請求項 7 ~ 2 3 , 3 3 ~ 3 9 , 4 1 又は 4 6 のいずれかに記載の方法又はキット。

## 【請求項 5 6】

候補モジュレーターが G P R 8 6 の活性を増大又は低減するかどうかを決定する方法であって、

a ) 候補モジュレーターの存在又は不在下で、G P R 8 6 と A D P が結合することを許容する条件下で、G P R 8 6 を発現する細胞をその表面で培養する工程；

30

b ) セカンドメッセンジャー解析によって前記 G P R 8 6 ポリペプチドのシグナリング活性を検出し、前記候補モジュレーターの不在下でのセカンドメッセンジャー製造に対して、前記候補モジュレーターの存在下でのセカンドメッセンジャー生産に変化があれば、G P R 8 6 の活性の増大又は減少として前記モジュレーターを同定する工程

を含む決定方法。

## 【請求項 5 7】

候補モジュレーターが G P R 8 6 の活性を増大又は低減するかどうかを決定する方法であって、

a ) 候補モジュレーターの存在又は不在下で、G P R 8 6 を有している細胞膜を、G P R 8 6 と A D P が結合することを許容する条件下で、培養する工程；

40

b ) セカンドメッセンジャー解析によって前記 G P R 8 6 ポリペプチドのシグナリング活性を検出し、前記候補モジュレーターの不在下でのセカンドメッセンジャーに対して、前記候補モジュレーターの存在下でのセカンドメッセンジャー生産に変化があれば、G P R 8 6 の活性の増大又は減少として前記モジュレーターを同定する工程

を含む決定方法。

## 【請求項 5 8】

G P R 8 6 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、

a ) 候補モジュレーターの存在又は不在下で、G P R 8 6 ポリペプチドと A D P が結合することを許容する条件下で、G P R 8 6 ポリペプチドと A D P を接触させる工程；及び

50

b) 前記候補モジュレーターが存在下でGPR86ポリペプチドとADPの結合を測定し、前記候補モジュレーターの不在下でのその結合に対して、前記候補モジュレーターの存在下での結合が減少していれば、GPR86ポリペプチドに結合する化合物を前記候補モジュレーターとして同定する工程を含む同定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オーファンGタンパク質共役型レセプターGPR86の天然リガンドと使用方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

アデニンヌクレオチドとウリジンヌクレオチドは、いくつかのGタンパク質共役型レセプター(P2Y)とリガンドゲート型カチオンチャンネル(P2X)(非特許文献1,2)を通して薬学的及び生理学的応答を誘導する。P2Yファミリーは、2つの選択的プリンレセプター(purinoreceptor)であるヒトP2Y<sub>1</sub>とP2Y<sub>11</sub>レセプターに拡大する:ヒトP2Y<sub>1</sub>とP2Y<sub>11</sub>レセプターは、ADP及びATPによってそれぞれ優先的に活性化される(非特許文献3-5)。アデニンヌクレオチド及びウラシルヌクレオチド双方に反応するヌクレオチドレセプターは、P2Y<sub>2</sub>レセプターで、ATP及びUTPによって等位に活性化され(非特許文献6,7)、またXenopusP2Y<sub>8</sub>レセプター(非特許文献8)と七面鳥tp2yレセプター(非特許文献9)がすべてのヌクレオチド3リン酸によって等しく活性化される。また、ピリミジンレセプター(pyrimidinoceptor)もある:トリP2Y<sub>3</sub>レセプター(非特許文献10)とヒトP2Y<sub>6</sub>レセプター(非特許文献11-13)はUDPによって優先的に活性化され、ヒトP2Y<sub>4</sub>レセプター(非特許文献13-15)はUTPによって優先的に活性化される。これらP2Yサブタイプの全てはホスホイノシトールリン酸(phosphoinositide)経路と共役する。P2Y<sub>11</sub>レセプター及びtp2yレセプターはそれぞれ付加的に共役され、アデニルシクラーゼの刺激及び阻害となる。他のレセプター(P2Y<sub>5</sub>(非特許文献16),P2Y<sub>7</sub>(非特許文献17),P2Y<sub>9</sub>及びP2Y<sub>10</sub>)は、P2Yファミリーに間違っ包含された(非特許文献18-20)。最近、P2Y<sub>12</sub>サブタイプがクローン化され、これは以前はP<sub>2T</sub>と呼ばれていた血小板レセプターに該当する(非特許文献21,22)。P<sub>2T</sub>はアデニルシクラーゼの阻害に共役され、血小板と脳内で、特異的に発現される。その一次構造は他のP2Yレセプターに関係しないが、UDP-グルコースレセプターの一次構造に関係する(非特許文献23)。

20

30

【0003】

300以上のGタンパク質共役型レセプター(GPCRs)が、今までにクローン化され、このようなレセプターは、1000以上存在すると一般に考えられている。機構上、臨床的に関連する全薬剤の約30-50%は、種々のGPCRsの機能をモジュレートすることによって作用する(非特許文献34)。

【0004】

既知の及び未知のGPCRは、今や薬物作用の主なターゲットとなり、開発されている。GPR86は、ロドプシン様レセプターファミリーのメンバーであり、1997年にクローン化されたGPR86(非特許文献24)は、最近同定された血小板ADPレセプターであるP2Tと49%ホモロジーを示す。

40

【0005】

GPR86の1002bpの同定されたORFは、18bp上流の停止コドンによって先行され、推定上のポリAシグナルAATAAAが、コード配列の1672bp下流に存在する。hGPR86は、染色体3q24上のhGPR87と同じゲノム位置を有しているが、hGPR87とは反対に、そのコード配列にはイントロンがない。hGPR86の推論された333アミノ酸残基配列は、GPCRの典型的な7回膜貫通(7TM)構造を示

50

し、シグナルペプチドを有しない。GPR87とKIAA0001で説明されたようなモチーフと同じモチーフを本質的に示すことから、ファミリー1GPCRsのメンバーでもある。DRYモチーフの代わりに、プリン作動性(purinergic)レセプター、C5Aレセプター、Bonzoleレセプター、トロンピンレセプター前駆体の配列にもみられるDRFモチーフが存在する。

## 【0006】

## 【非特許文献1】

Abbarachio, M. P. and Burnstock, G. (1994年) *Pharmacol. Ther.* 64, 445 - 475頁

## 【非特許文献2】

Fredholm, B. B. (1997年) *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 79 - 82頁

## 【非特許文献3】

Webb, T. E. (1993年) *FEBS Lett.* 324, 219 - 225頁

## 【非特許文献4】

Leon, C. (1997年) *FEBS Lett.* 403, 26 - 30頁

## 【非特許文献5】

Communi, D. (1997年) *J. Biol. Chem.* 272, 31969 - 31973頁

## 【非特許文献6】

Lustig, K. D. (1993年) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5113 - 5117頁

## 【非特許文献7】

Parr, C. E. (1994年) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3275 - 3279頁

## 【非特許文献8】

Bogdanov, Y. (1997年) *J. Biol. Chem.* 272, 12583 - 12590頁

## 【非特許文献9】

Boyer, J. L. (2000年) *Mol. Pharmacol.* 57, 805 - 810頁

## 【非特許文献10】

Webb, T. E. (1996年) *Mol. Pharmacol.* 50, 258 - 265頁

## 【非特許文献11】

Chang, K. (1995年) *J. Biol. Chem.* 270, 26152 - 26158頁

## 【非特許文献12】

Communi, D. (1996年) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 303 - 308頁

## 【非特許文献13】

Nicholas, R. A. (1996年) *Mol. Pharmacol.* 50, 224 - 229頁

## 【非特許文献14】

Communi, D. (1995年) *J. Biol. Chem.* 270, 30849 - 30852頁

## 【非特許文献15】

Nguyen, T. (1995年) *J. Biol. Chem.* 270, 30845 - 30848頁

## 【非特許文献16】

10

20

30

40

50

- Webb, T. E. (1996年) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 105 - 110 頁  
 【非特許文献17】
- Akbar, G. K. M. (1996年) *J. Biol. Chem.* 271, 18363 - 18367 頁  
 【非特許文献18】
- Yokomizo, T. (1997年) *Nature* 387, 620 - 624 頁  
 【非特許文献19】
- Li, Q. (1997年) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 455 - 460 頁 10  
 【非特許文献20】
- Janssens, R. (1997年) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 106 - 112 頁  
 【非特許文献21】
- Zhang, F. L. (2001年) *J. Biol. Chem.* 276 (11), 8608 - 8615 頁  
 【非特許文献22】
- Hollopeter, G. (2001年) *Nature* 409, 202 - 207 頁  
 【非特許文献23】
- Chambers, J. K. (2000年) *J. Biol. Chem.* 275 (15) 20  
 , 10767 - 10771 頁  
 【非特許文献24】
- Wittenberger, T. (2001年) *J. Mol. Biol.* 307, 799 - 813 頁  
 【非特許文献25】
- Commui, D. (1995年) *Circ. Res.*, 76, 191 - 198 頁  
 【非特許文献26】
- Brooker, G. (1979年) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10, 1 - 33 頁  
 【非特許文献27】 30
- Minamide, L. S. and Bamburg, J. R. (1990年) *Anal. Biochem.* 190, 66 - 70 頁  
 【非特許文献28】
- Erb, L. (1995年) *J. Biol. Chem.* 270, 4185 - 4188 頁  
 【非特許文献29】
- Baltensperger, K. and Porzig, H. (1997年) *J. Biol. Chem.* 272, 10151 - 10159 頁  
 【非特許文献30】
- Eason, M. G. (1992年) *J. Biol. Chem.* 267 (22), 15795 - 15801 頁 40  
 【非特許文献31】
- Chabre, O. (1994年) *J. Biol. Chem.* 269 (8), 5730 - 5734 頁  
 【非特許文献32】
- Boyer, J. L. (1993年) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 1140 - 1146 頁  
 【非特許文献33】
- Simon, J. (2001年) *Br. J. Pharmacol.* 132, 173 - 182 頁  
 【非特許文献34】 50

G u d e r m a n n ら ( 1 9 9 5 年 ) J . M o l . M e d . 7 3 , 5 1 - 6 3 頁

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

本発明は、G P R 8 6 ( P 2 Y <sub>1 3</sub> ) レセプター (ここでは配列 I D N O 1 で同定されている) (又はいずれかの相同配列) と、当該レセプターをコードするヌクレオチド配列を含む組換え細胞 (好適なベクターによってトランスフォームされた) に関し、また、本発明は新たな薬剤の開発や種々の病気診断の改良に有用なアゴニスト、逆アゴニスト又はアンタゴニスト化合物の同定のためのスクリーニングアッセイの中で用いられている天然リガンド ( A D P や、米国特許 5 7 0 0 7 8 6 に公開されているいずれの A D P 類似物も含む A D P S , 2 M e S A D P のような等価分子) にも関する。

10

【0008】

相同配列 (他の哺乳類又はヒト集団の特異的グループに存在しえる) は、相同性が配列アイデンティティを示しているところでは、完全なヒトヌクレオチドまたはここで述べられているアミノ酸配列を有する高い配列アイデンティティ ( 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 以上又は 9 8 % 配列アイデンティティ) を示す配列を意味する。また好ましくは同じ薬理学によって特徴付けられ、特に好ましくは A D P > > I D P > U D P で結合する ( G P R 8 6 に対する A D P の親和性は、 I D P や U D P の親和性よりも約 1 0 0 0 倍大きい ( A D P > > I D P > U D P ) ) 。

【0009】

本発明の組換え細胞は、プラスミド又はバキュロウィルスやアデノウィルスやセムリキ ( semliki ) フォレストウィルスのようなウィルスベクターによってトランスフォームされた組換え細胞で、その細胞は、バクテリア細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞からなる群より選択してもよい。

20

【0010】

本発明の他の態様によれば、C O S - 7 細胞、C H O 細胞、L M ( T K ) 細胞、N I H - 3 T 3 細胞、H E K - 2 9 3 細胞、K - 5 6 2 細胞、又は 1 3 2 1 N 1 アストロサイトーマ細胞からなる群より選ばれるが、他のトランスフェクト可能な細胞系列からも選ばれる。そのベクターは、本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチド配列が発現するのに実施可能に連結される全ての調節要素を含み得る。

30

本発明の他の実施態様によれば、当業者に明らかなように、G P R 8 6 は、細胞膜内に存在しえる。

【0011】

本発明の他の見地では、その配列の特異的活性部分の使用に関する。ここで用いられるように、「活性部分」はノーマル又はノーマルに近い薬理学を示すのに (例えば、レセプター活性 (ここで述べられている)、活性化剤若しくは阻害剤に対する応答、又はリガンド結合は、野生型レセプターによって示される活性、応答又は結合の少なくとも 9 0 % である。) 十分な長さの配列部分をいう。レセプターをコードする配列をいうように、「部分」は、その配列の 1 0 0 % 未満をいう (すなわち、9 9 、 9 0 、 8 0 、 7 0 、 6 0 、 5 0 % など)。その活性部分は、その完全なヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の部分的除去を含み、活性部位と、A D P のような特異的リガンドとの結合及び相互作用に必要なタンパク質ドメインとを尚も保持している。

40

【0012】

ここで述べられているいずれかの方法の他の態様において、接触工程は合成リポソーム中若しくは合成リポソーム上で (Tajib Mirzabekov, Harry Kontos, Michael Farzan, Wayne Marasco, Joseph Sodroski (2000年) 「純粋で天然の 7 回膜貫通を指向しているセグメントタンパク質 C C R 5 を含む常磁性プロテオリゾーム」、Nature Biotechnology 18, 649 - 654 頁参照、これは参考として本明細書に組み入れられる)、あるいは G P R 8 6 ポリペプチドを含み、ウィルス誘導された出芽している膜内若しくは膜上で達成される (国際公開 0 1 0 2 5 5 1 の特許出願、「好ましくは薬剤スクリーニング及び機能的ゲノミ

50

クスにおけるウィルス用粒子、その調製及びその使用（2001年）参照、これは参考として本明細書に組み入れられる）。

【0013】

従って、本発明の他の見地によれば、GPR86は上記細胞のような細胞内に存在していてもよいし、会合していてもよく、また細胞膜内に存在又は細胞膜と会合していてもよく、あるいはウィルス誘導された出芽膜内若しくは出芽膜上に存在してもよい。

【0014】

ここで用いられている「リガンド」は、レセプターに会合または結合できる部分（moiety）をいう。本発明の方法によれば、リガンドとレセプターは、レセプターに結合するリガンドの検出に好適な解析方法によってその結合を検出するのに十分強い結合定数を有している（例えば、レセプターに結合しているリガンドに対する応答におけるセカンドメッセンジャーの産生の増加又は減少を検出するセカンドメッセンジャーアッセイ、タンパク質-リガンド結合を測定する結合アッセイ、又は抗原-抗体相互作用を測定するイムノアッセイ）。本発明によれば、リガンドは、レセプターに結合する実際の分子を含み（例えば、ADPはGPR86のリガンドである）、あるいはリガンドはレセプターに結合できるヌクレオチド、抗体、抗原、酵素、ペプチド、ポリペプチド、又は核酸でありえる。リガンドは、ヌクレオチドであって、ポリペプチド、ペプチド、又は核酸配列も含んでもよい。本発明の方法によれば、リガンドとレセプターは、互いに特異的に結合する（例えば、共有結合又は水素結合を介して、あるいは例えばタンパク質とリガンド間の相互作用、あるいは抗体と抗原又はタンパク質サブユニット間の相互作用を介して）。

【0015】

ここで用いられる「ADP」とは、ATPのリン酸末端の加水分解によって生成されるヌクレオチドをいい、アデニン、リボース及び2リン酸を含んだ構造である（図7）。ADPアナログ（analog）はADP等価物と考えられるであろうことが意図される。本発明のADPアナログとしては、2MeSADP、ADP-Sが挙げられるが、これらに限定されない。本発明によれば、ADPアナログは上記で説明され、図7で表されるようなADPと同じ塩基構造を示すだけでなく、1つ以上の異なる置換基の構造であってもよく、米国特許5700786に表示されているADP類似物のいずれかを含むが、これらに限定されない。本発明によればADPアナログは、ADPと同程度にGPR86への結合を示すだろう。

【0016】

ここで用いられている「GPR活性」は、図1に表されている配列を含むレセプター、又は図1に示す配列と少なくとも70%（例えば70%、75%、80%、90%、95%など）アイデンティティを示す配列を含むレセプターの活性をいう。「GPR活性」を有するレセプターは、IDPやUDPの親和性よりも少なくとも100倍、500倍、さらには1000倍大きい親和性でADPに結合する（ADP > IDP > UDP）。

【0017】

本発明によれば、ある配列の相同的（homologous）配列は、他の哺乳類、例えば他の動物種（ラット、マウス、猫、犬など）又は特異的なヒト集団に存在するが、同じ生化学経路にかかわっている類似レセプターをコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を含みえる。同様に、本発明は、オルソログ（ortholog）を意図する。ここでオルソログとは、古代の共通する祖先における1つの単一遺伝子から進化した2つの異なる種において画定する遺伝子である。オルソログは、その2つの異なる種の双方において同じ機能を有しているらしい。

【0018】

そのような相同的配列は、1つ以上のアミノ酸又はヌクレオチドの付加、欠失、又は置換を含み、そのレセプターへのリガンド結合のような、本発明にしたがったレセプターの機能的特徴を実質的には変更しない。

【0019】

そのような相同的配列は、ストリンジェントなハイブリダイズ条件下（SAMBROOK

10

20

30

40

50

ら、1989年、「分子クローニング実験マニュアル」、コールドスプリング、ハーバークラボラトリープレス社、ニューヨークによって説明されたもののように)で、完全なヒト配列にハイブリダイズできる400、600、800又は1000以上のヌクレオチドでもあることができる。

【0020】

本発明の他の見地では、本発明のレセプターの候補モジュレーターのスクリーニング方法、検出方法及び可能な取り出し(recovery)方法に関し、その方法は、候補モジュレーターの存在下で、ADPがGPR86に結合するのを許容する条件下でGPR86を発現する細胞をADPと接触させる工程；セカンドメッセンジャー解析を行う工程；及び候補モジュレーターの存在下で得られるセカンドメッセンジャーの解析結果を、候補モジュレーターの不在下で得られる解析結果と比較する工程を含む。

10

【0021】

本発明の別の見地は、本発明のレセプターの候補モジュレーターのスクリーニング方法、検出方法、及び可能な取り出し方法に関し、その方法は、セカンドメッセンジャー解析を行っているGPR86へADPが結合するのを許容する条件下で、GPR86を発現している細胞膜をADPと接触させる工程、及び候補モジュレーターの存在下で得られたセカンドメッセンジャー解析の結果を、候補モジュレーターの不在下で得られた解析結果と比較する工程を含む。

【0022】

本発明の別の見地では、GPR86の機能をモジュレートする物質を同定する方法に関し、その同定方法は、a)ADPをGPR86ポリペプチドに結合するのを許容する条件下で候補モジュレーターの存在及び不在下でGPR86ポリペプチドをADPと接触させる工程；及びb)候補モジュレーターの不在下での結合に対して候補モジュレーターへのGPR86の結合を測定し、その候補モジュレーターをGPR86の機能をモジュレートする物質として同定する工程を含む。

20

【0023】

他の態様において、候補モジュレーター、候補物質、候補化合物は、天然又は合成のペプチド、ポリペプチド、抗体若しくはその抗原結合フラグメント、脂質、炭水化物、核酸、及び有機低分子からなる群より選ばれる。

【0024】

他の態様において、GPR86ポリペプチドのシグナル活性の検出工程又は測定工程は、セカンドメッセンジャーのレベル変化を検出する工程を含む。

30

【0025】

本発明のさらなる見地は、GPR86活性の候補モジュレーター、本発明の方法によって同定及び/又は取り出された取得可能な未知のアゴニスト及び/又はアンタゴニスト化合物に関する。また、適切な薬剤のキャリア及び十分量の前記(未知)化合物を含む前記(未知)化合物又は薬剤組成物(ワクチンを含む)を含む診断キットに関する。

【0026】

GPR86の候補モジュレーターは、ATP、2MeSADP、ADP S、2MeSATP、Ap3A、RB-2、スラミン(Suramine)又はPPADSを含むが、これらに限定されないことがわかるだろう。

40

【0027】

本発明によれば、アンタゴニスト化合物は、本発明のレセプターに結合できる分子若しくは分子グループ、ADP、又は等価分子、例えば2MeSADP、ADP S、ATP、2MeSATP、又はAp3Aのような天然化合物の結合をブロック又は低減できる分子若しくは分子グループを意味し、米国特許5700786に表示されたいずれのADPアナログも含むが、これらに限定されない。本発明のアンタゴニスト化合物は、RB-2、スラミン、又はPPADSを含むが、これらに限定されない。

【0028】

さらに本発明は、サンプル中の、GPR86の機能をモジュレートする物質の存在を検出

50

する方法に拡張される。その方法とは、a) サンプルとGPR86ポリペプチドを接触させる工程；b) 該サンプルの存在下においてGPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程；及びc) 当該サンプルの存在下で測定された活性と、EC<sub>50</sub>におけるGPR86ポリペプチドとADPとの反応において測定された活性とを比較し、当該サンプル存在下で測定されたGPR86特異的活性の量が少なくともそのEC<sub>50</sub>でADPによって誘導された量の活性の10%、20%、30%、40%、50%又はそれ以上であれば、GPR86の機能をモジュレートする物質が検出されたとする工程を含む。

**【0029】**

本発明は、さらに、GPR86シグナリングの調節不能によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法に拡張される。その方法は、a) GPR86ポリペプチドに特異的な抗体と組織サンプルを接触させる工程；b) その組織サンプルと該抗体との結合を検出する工程；及びc) 工程(b)で検出された前記結合を標準と比較し、該標準に対して結合に差異があればGPR86の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の兆候であるとする工程を含む。

10

**【0030】**

さらに本発明は、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられた疾患又は疾病の診断方法に拡張される。その方法とは、a) GPR86リガンドに特異的な抗体と組織サンプルを接触させる工程；b) その組織サンプルと当該抗体の結合を検出する工程；及びc) 工程(b)で検出された結合と標準とを比較し、該標準に対して結合に差異があれば、GPR86の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の兆候とする工程を含む。

20

**【0031】**

本発明は、さらにGPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられた疾患又は疾病の診断方法に拡張される。その方法とは、a) GPR86ポリペプチドに特異的な抗体及びGPR86リガンドに特異的な抗体と組織サンプルを接触させる工程；b) その組織サンプルと前記抗体の結合を検出する工程；及びc) 工程(b)で検出された結合と標準とを比較し、該標準に対していずれか一方の抗体又は双方の抗体の結合に差異があれば、GPR86の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の兆候とする工程を含む。

**【0032】**

本発明は、さらに、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられた疾患又は疾病の診断方法に拡張される。その方法とは、a) 組織サンプルから核酸を単離する方法；b) 鋳型として当該核酸を用いて、GPR86ポリヌクレオチドを増幅する工程；及びc) 工程(b)で製造された増幅されたGPR86ポリヌクレオチドの量又は配列と標準を比較し、標準に対して増幅されたGPR86ポリヌクレオチドの量又は配列に差異があれば、GPR86の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の兆候であるとする工程を含む。

30

**【0033】**

本発明は、さらに、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断方法に拡張される。その方法は、a) 組織サンプルから核酸を単離する方法；b) 鋳型として当該核酸を用いて、GPR86特異的ポリペプチドリガンドをコードするポリヌクレオチドを増幅する工程；及びc) 工程(b)で製造された増幅されたGPR86特異的リガンドポリヌクレオチドの量又は配列と標準を比較し、該標準に対して増幅されたGPR86特異的リガンドポリヌクレオチドの量又は配列に差異があれば、GPR86の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の兆候であるとする工程を含む。

40

**【0034】**

他の態様において、増幅工程は、RT/PCRを含む。他の態様において、標準は配列INDNO:1である。他の態様において、その配列の比較工程は、ミニ配列決定(minisequencing)を含む。他の態様において、配列又は量の比較工程は、マイクロアレイ上で達成される。

**【0035】**

50

本発明のさらなる見地は、トランスジェニック非ヒト哺乳類に関し、本発明のGPR86 (P2Y<sub>13</sub>)レセプターをコードするポリヌクレオチドの相同的組換え(ノックアウト)又は発現の天然レベルを超えてポリペプチドを過剰に発現するトランスジェニック非ヒト哺乳類に関する。ここで用いられている「発現の天然レベルを超える」とは、内在性レセプターの発現レベルと比べて、少なくとも2倍、5倍、又は10倍、又はほぼ100倍以上のレベル(すなわち、150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10000倍など)をいう。トランスジェニック非ヒト哺乳類は、当業者によく知られた方法によって得られる。例えば、ES細胞のトランスフェクションに基づく古典的方法を用いてWO98/20112で説明されているように、好ましくはCarmelietらによって説明されている方法によって得られる(Nature, Vol.380, p435-439, 1996年)。

10

**【0036】**

「ジーンターゲティング」は、ゲノムDNAのフラグメントが哺乳類細胞の中へ導入され、そのフラグメントが位置し、米国特許No.5464764および米国特許No.5777195(これらの内容全てが本明細書に参考として組み入れられる)に例示されているような内在性相同的配列で組替えるときに起こる相同的組換えの1つのタイプである。ここで用いられている用語「トランスジェニック動物」は、動物細胞の1つ以上、実質的に全てが、当該分野で知られているトランスジェニック技術によってのような、ヒトの仲介を通じて導入されたトランスジーンを含む非ヒト動物をいう。トランスジーンは、細胞の前駆体の中への導入によってマイクロインジェクションによってのような意図的な遺伝的巧みな操作を通じて、又は組換えウイルスでの感染によって、直接又は非直接的に、細胞の中に導入されることができる。

20

**【0037】**

本発明によれば、GPR86(P2Y<sub>13</sub>)レセプターをコードするポリヌクレオチドを過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物は、レセプターの過剰発現を許す導入可能なプロモータでDNA構築に組み入れられるポリヌクレオチド、並びに組織及び細胞特異的調節(regulatory)要素も含むかもしれない。

**【0038】**

従って、本発明の他の見地は、ヒトポリヌクレオチド(配列ID NO1)の相同組替えてノックアウト又は当該ポリヌクレオチドの天然レベルを超えて過剰発現をするトランスジェニックの非ヒト哺乳類のように、前記ヒトポリヌクレオチド(配列ID NO1)のオルソログ配列の部分的又は全削除を含む非ヒト哺乳類に関する。

30

**【0039】**

本発明の他の見地は、GPR86ポリペプチドに特異的な抗体及びその種々の使用に関し、また、GPR86活性のモジュレータに特異的な抗体及びその使用についても同様に関する。

**【0040】**

本発明の診断キットは、少なくともGPR86レセプターと、別々にパッケージされたADPを含み、また、本発明のGPR86レセプターへの特異的結合(例えばADP)の検出を達成し、本明細書で説明されている疾患の1つ以上の兆候のモニタ方法に特異的結合の検出に関係するかもしれない手段及び媒体で必要らしいものはすべて含むだろう。さらに、本発明のキットは、セカンドメッセンジャー解析の要素を含む。

40

**【0041】**

多分、そのキットは、特異的診断又は当業者によく知られた(特にWO00/02045に開示されたもの)ハイスループットスクリーニング技術を通じてそのように結合された化合物の投薬のための要素を含む。このハイスループットスクリーニング診断投与及びモニタリングは、当業者によって選択されたマイクロタイタプレート又はバイオチップのような種々の固体支持体を用いて達成されることができる。

**【0042】**

他の見地では、本発明は、本明細書で説明されるように、GPR86活性の候補モジュレータに関し、あるいはGPR86シグナリングの調節不良によって特徴付けられた疾患

50

または疾病を阻止、治療及び/又は軽減のための薬剤組成物又は薬剤としての使用のために本明細書で説明されているような抗体に関する。また本発明は、ここで説明されているように、G P R 8 6 活性の候補モジュレーターの使用に関する、又はG P R 8 6 シグナリングの調節不良によって特徴付けられた疾患または疾病を阻止、治療及び/又は軽減のための薬剤組成物又は薬剤の製造のために、本明細書で説明されているような抗体に関する。

【0043】

本発明の薬剤組成物において、適切な薬剤キャリアは、固体、液体又は気体状をしていて、本発明の化合物の考えられる部位効果及び投与のタイプに従って、当業者によって選択され得る。薬剤キャリアと特異的化合物との間の比率は、治療される患者、投与量、化合物の潜在的部位効果に従って当業者によって選択されることができ、治療又は特異的阻止を甘受させられる疾患又は疾病のタイプもまた同様に、当業者によって選択されることができ、

10

【0044】

1. 薬剤組成物は、治療及び/又は種々の疾患又は疾病の予防分野で、有用な応用を見出す。前記疾患又は疾病は、前立腺肥大；片頭痛；嘔吐；恐怖、精神分裂症、激しいうつ病、うつ病、譫妄、痴呆、およびいくつかの精神的遅滞を含む精神的及び神経的疾患；消耗性疾患；アルツハイマー病、パーキンソン病のような神経消耗性疾患；ハンチントン病、ギルトドラトレット症候群のようなジスキネシア；及びトロンボシス及び他の心血管作動病を含む他の関連疾患；自己免疫疾患及び炎症性疾患からなる群より選ばれる。

20

【0045】

2. 上記疾病のうち、薬への応用は、例えば、機能不全又は疾病の予防、改善又は治療について機能を果たすことができる7回膜貫通型レセプターをターゲットとする治療剤に関する。対象となる機能不全又は疾病には、生殖能力不全；胎児成長不全；バクテリア、カビ、原生動物及び、H I V 1 及びH I V 2 によって引き起こされるウィルス感染を含む感染；痛み、癌、食欲不振；大食症；喘息；パーキンソン病；急性心不全；高血圧；尿閉；骨粗しょう症；狭心症；心筋梗塞；潰瘍；喘息；アレルギー；前立腺肥大；恐怖、うつ病、片頭痛、嘔吐、脳卒中；精神分裂症、狂乱うつ病、譫妄、痴呆、いくつかの精神的遅滞及び、ハンチントン病又はトロンボシス及び他の心血管病等のギルトドラトレット症候群のようなジスキネシアを含む精神的疾患；自己免疫疾患；炎症性疾患が含まれるが、これらに限定しない。

30

【0046】

本発明の他の見地では、本発明の候補化合物又は本発明の抗体を薬剤キャリアに添加する工程を含む薬剤組成物の製造方法に関する。

【0047】

従って、本発明は、本明細書で述べられているような候補モジュレーター例えばA T P、2 M e S A T P、2 M e S A D P、A D P S、A p 3 A、R B - 2、スラミン、又は本明細書で説明されているような抗体を含む組成物に関する。

【0048】

本明細書で用いられている「アンタゴニスト」は、アゴニストと同じ部位でレセプターに競合的に結合するが、レセプターの活性型によって開始される細胞内応答を活性化せずに、これにより、アゴニスト例えばA D P によって誘導される細胞内応答を、アゴニストの存在下及びアンタゴニストの不在下での細胞内応答に比べて、少なくとも10%、又は15~25%、又は25~50%、又は50~100%阻害する。

40

【0049】

本明細書で用いられている「アゴニスト」は、それが細胞内応答を誘導するA D P 濃度と等しい濃度又は低い濃度で、レセプターに結合するとき、細胞内応答を活性化するリガンドをいう。本発明によれば、アゴニストは、レセプターによって仲介される細胞内応答が、アゴニストの不在下での細胞内応答と比べて少なくとも2倍、5倍、10倍、又は100倍以上（すなわち150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10000

50

倍など)だけ増大し得る。本発明によれば、アゴニストはレセプターの細胞表面発現がアゴニスト不在下で細胞表面に存在する細胞表面レセプターの数と比べて、少なくとも2倍、5倍、10倍、又は100倍以上(すなわち150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10000倍など)増大させられるように、細胞表面のレセプターの内在化を減少させることができる。本発明の他の態様において、アゴニストは、細胞表面レセプターを安定化させ、レセプターの細胞表面発現を、アゴニストの不在下での細胞表面に存在する細胞表面レセプターの数と比べて、少なくとも2倍、5倍、10倍、又は100倍以上(すなわち150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10000倍など)増大する。

**【0050】**

ここで用いられている「逆アゴニスト」は、それがレセプターに結合する細胞表面レセプターの構成(constitutive)の活性を減少させるリガンドに関する。本発明の逆アゴニストは、レセプターによって仲介された構造的細胞内応答を、逆アゴニストの不在下での細胞内応答と比べて少なくとも2倍、5倍、10倍、又は100倍以上(すなわち150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10000倍など)減少させることができる。

**【0051】**

本発明によれば、「阻害剤」化合物とは、ADP存在下で且つ阻害剤の不在下でのレセプターとリガンドの結合と比べて、ADP存在下で少なくとも10%又はほぼ15~25%又はほぼ25~50%及びほぼ50~100%減少させるレセプター又はレセプターのための天然リガンドに対して向けられる分子である。本発明の「阻害剤」は、本発明の阻害剤化合物をコードするヌクレオチド配列をもいう。

**【0052】**

本明細書に用いられている「天然リガンド」とは、天然に生じていて、自然界で見出され、ADPと等価であるという方式(すなわち、リガンドに対する親和性がIDPやUDPよりも大きい状態( $ADP > IDP >> UDP$ ))でレセプターに結合するリガンドをいう。もはや天然に生じることがない「非天然」で、天然に生じている分子から誘導されるように設計されたものとは量又は種類のいずれかにおいて異なるように、ある方式においてリガンドがかつてはレセプターに結合しなかった場合には、「天然リガンド」は、レセプターに結合するように設計され、天然に見出されないように設計されたりガンドをい

**【0053】**

本明細書で用いられている「モジュレーター」及び「モジュレートする物質」は、本明細書で互いに交換できるように用いられる用語で、「モジュレートする」、すなわち本発明のレセプターの細胞表面発現を増大又は減少するいずれかの化合物、あるいはアゴニストの存在又は不在下のいずれかで、及びレセプターのリガンドの存在下で、本発明のレセプターの活性型によって開始される細胞内応答を増大又は減少させるいずれかの化合物、例えばADPをいう。モジュレーターは、本明細書で定義されるように、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、または逆アゴニストを含む。モジュレーターは、タンパク質、核酸、抗体、又はこれらの断片で例えば、抗原結合断片、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、脂質、炭水化物、無機低分子、有機低分子などであり得る。候補モジュレーターは、天然又は合成化合物で、例えば、低分子化合物、そのような細胞からのならし培地と同様に、動物、植物、バクテリア細胞又はカビ細胞の抽出物に含まれる化合物を含み得る。

**【0054】**

ここで用いられている用語「低分子」とは、3000ダルトン以下、又はほぼ2000又は1500又は1000以下及び600ダルトン以下の分子量を有する化合物をいう。「有機低分子」は、炭素を含む低分子をいう。

**【0055】**

ここで用いられている用語「結合における変化」又は「活性における変化」及びその等価的用語「結合の相違」又は「活性の相違」または「増幅された」PCR産物の量における

10

20

30

40

50

相違は、結合において標準に対して少なくとも10%増大又は減少すること、あるいは与えられた解析において標準に対してシグナリング活性又はmRNAレベルにおいて10%増大又は減少することをいう。

【0056】

本明細書で用いられている用語「調節不良」は、サンプル内でのGPR86のシグナリング活性をいう。ここで、

a) GPR86の量、又はGPR86ポリペプチドリガンドmRNA若しくはポリペプチドレベルにおける10%の増加又は減少は、本明細書で定義されたように与えられた解析の標準に対して測定される、あるいは

b) GPR86又はGPR86ポリペプチドリガンドをコードする配列における少なくとも単一の塩基対変化は、本明細書で定義されるように、与えられた解析及び結果の標準に対して検出され、パラグラフa)、c)、またはd)において定義されるようにGPRシグナリング活性の変更となる、あるいは；

c) GPR86リガンド結合活性の量における10%の増加又は減少は、本明細書で定義されるような、与えられた解析の標準に対して測定される、あるいは；

d) セカンドメッセンジャー解析における10%の増加又は減少は、ここで定義されるように、与えられた解析において、ここで述べられているように、標準に対して測定される。

【0057】

本明細書で用いられている用語「ADPのGPR86への結合を許容する条件」とは、例えば、温度、塩濃度、pH及びADPがGPR86に結合するタンパク質条件をいう。抽出結合条件は、解析の特性、例えば、その解析が生きている細胞又は細胞の膜フラクシオンだけを用いるかどうかによって依存して変わる。しかしながら、GPR86は細胞表面タンパク質なので、好適な条件は、一般に生理学的塩(90mM)及びpH(約7.0から8.0まで)を含む。結合のための温度は15~37で変化し、一般に室温と約30の間である。結合反応におけるADP及びGPR86ポリペプチドの濃度も変わるが、好ましくは約0.1nM(例えば放射性物質でラベルされたトレーサーADPとの反応において、濃度は一般にKd未満)から1μM(例えば競合者としてのADPであり得る)だろう。

【0058】

本明細書で用いられている用語「サンプル」は、GPR86ポリペプチドのシグナル活性又はGPR86ポリペプチドへの結合をモジュレートする物質又はモジュレーター化合物の存在についてテストされる分子源をいう。サンプルは、環境サンプル；動物、植物、酵母、又はバクテリア細胞又は組織からの天然抽出物；臨床サンプル；合成サンプル；又は組換え細胞又は発酵プロセス由来のならし培地であってもよい。用語「組織サンプル」は、GPR86ポリペプチドの存在、多数(abundance)、量若しくは活性；GPR86ポリペプチドをコードする核酸；又はGPR86ポリペプチドの活性若しくはGPR86ポリペプチドへのリガンドの結合をモディファイ若しくはモジュレートする物質若しくは化合物のためにテストされる組織をいう。

【0059】

本明細書で用いられている「組織」は、生体内で特定機能を果たす細胞の塊をいう。本明細書で用いられている用語「組織」は、特定の生理学上の領域からの細胞材料をいう。特定組織の細胞は、いくつかの異なる細胞タイプを含むことが出来る。この限定のない例は、脳組織であり、さらにニューロン、グリア細胞を含み、また毛細管内皮(endothelial)細胞、血球も同様に含み、与えられた組織切片又はサンプル内に含まれるあらゆるものを含む。固体組織に加えて、用語「組織」は、また血液のような非固体組織にまで拡張されることを意図する。

【0060】

本明細書で用いられている用語「膜フラクシオン」及び「細胞膜」は、GPR86ポリペプチドを含む細胞脂質膜の調製物をいう。この言葉はここで用いられているように、「膜

10

20

30

40

50

フラクション」又は「細胞膜」は、膜関連でない細胞の構成要素の少なくとも一部（すなわち少なくとも10%以上）が除去される場所において、細胞ホモゲネートから区別される。「膜が有している（bearing）」及び「細胞膜に存在」のような類似の用語と同様の用語「膜結合した」は、脂質膜の中へ集積される、あるいは脂質膜内へ集積される成分と物理的に結合されている、いずれかである細胞構成要素の用語をいう。

【0061】

本明細書で使用されているように、シグナリング活性の検出又は測定は、「セカンドメッセンジャー解析」を通じて行われることができる。前記セカンドメッセンジャー解析には、グアニンヌクレオチド結合又は交換の測定、アデニレートシクラーゼ活性、細胞内cAMP、細胞内イノシトールリン酸、細胞内ジアシルグリセロール濃度、アラキドン酸濃度、MAPキナーゼ活性又はチロシンキナーゼ活性、プロテインキナーゼC活性、細胞内カルシウム、ジアシルグリセロール、ホスファチジルイノシトール分解、又は当該分野で知られ且つ本明細書で定義された方法のレポータ遺伝子発現又はエオクオリンベース解析が含まれる。

10

【0062】

本明細書で用いられている用語「セカンドメッセンジャー」は、Gタンパク質共役型レセプター（GPCR）の活性化によって濃度が変化するように生成され又は濃度を变化させる分子をいい、そのGPCRからのシグナル伝達に参加する。セカンドメッセンジャーの限定ない例としては、cAMP、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アラキドン酸解離（release）、イノシトール三リン酸、及び細胞内カルシウムが挙げられる。用語「セカンドメッセンジャーにおけるレベル変化」とは、与えられたセカンドメッセンジャーの検出レベルにおいて、候補モジュレーター不在下で行われる解析で検出された量に対して、少なくとも10%の増加又は減少をいう。

20

【0063】

本明細書で用いられる用語「エオクオリンベース解析」は、活性化されたGPCRによって誘導される細胞内カルシウムフラックスを測定するGPCR活性のための解析をいい、カルシウムフラックスは、細胞内で発現されたエオクオリン発光によって測定される。本発明は、このレセプターの発現の結果生じるエオクオリン発光のアゴニスト又はアンタゴニストを同定するスクリーニングツールとしての、ヒトGタンパク共役型レセプターであるGPR86（P2Y<sub>13</sub>）の使用に関する。

30

【0064】

本明細書で用いられている用語「結合」は、レセプター（例えばGPR86）とリガンド（例えばADP又は抗体）との物理的結合をいう。ここで用いられている用語として、もし、結合がEC<sub>50</sub>でおこれば、あるいはK<sub>d</sub>が100nM以下（一般的には100nM乃至10pM）でおこれば、その結合は特異的である。例えば、もし、EC<sub>50</sub>又はK<sub>d</sub>が100nM、50nM、10nM、1nM、950pM、900pM、850pM、800pM、750pM、700pM、650pM、600pM、550pM、500pM、450pM、400pM、350pM、300pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM、25pM、又は10pM以下であれば、特異的である。

40

【0065】

本明細書で用いられるように、用語「EC<sub>50</sub>」は、ADP又は他のリガンドの結合及びGPR86ポリペプチドの機能的活性を包含する与えられた活性での化合物の濃度が、化合物不在下で同じ解析法を用いて測定できるGPR86活性について最大の50%という。換言すると、「EC<sub>50</sub>」は、100%活性がさらなるアゴニストの添加に伴って増加しない活性量でセットされるときに50%活性を与える化合物の濃度である。「ADPのEC<sub>50</sub>」は、解析で用いられたADPアナログの同定により変化するだろう。例えば、ADPアナログは、ADPよりも高い、又は低い又は同じEC<sub>50</sub>を有することができる。従って、ADPアナログはADPと異なり、当業者が従来方法によりそのアナログに対するEC<sub>50</sub>を決めることができる。与えられたADPのEC<sub>50</sub>は、少なくと

50

も G P R 8 6 応答が飽和又は最大となるまで増加する A D P 投与量の存在下で、G P R 8 6 ポリペプチドの固定量の活性に対する解析を行い、次いで A D P 濃度に対する G P R 8 6 活性の測定値をプロットすることによって測定される。

【0066】

本明細書で用いられている「飽和」は、リガンド濃度の更なる増大が A D P リガンドの結合又は G P R 8 6 特異的シグナル活性の増大を損なう、A D P 又は他のリガンドの濃度をいう。

【0067】

本明細書で用いられている用語「 $IC_{50}$ 」は、G P R 8 6 レセプターの最大活性が 5 0 % 減じるアンタゴニスト又は逆アゴニストの濃度をいう。

10

【0068】

本明細書で用いられている用語「結合における減少」は、既知又は疑いあるモジュレーターが不足する解析で検出される結合に対して、既知又は疑いある G P R 8 6 モジュレーターを伴って解析で検出される結合量の少なくとも 1 0 % の減少をいう。

【0069】

本明細書で用いられている用語「配送 (delivering)」は、薬物 (drug) 又は薬剤 (agent) に関連して用いられるとき、培地中の解析混合物又は細胞へ、薬物 (drug) 又は薬剤 (agent) を投与することを意味する。この用語は、また動物への薬物又は薬剤の投与をいう。このような投与としては、例えば、注射 (好ましいキャリアは例えば滅菌生理食塩水又は滅菌水)、インハレーション、経口、経皮、直腸、膣、又は薬剤投与の他の共通ルートがあり得る。

20

【0070】

本明細書で用いられている用語「標準」は、G P R 8 6 の調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病によって影響されない個体から入手したサンプルをいう。そのサンプルは、G P R 8 6 m R N A レベル及び質 (すなわち突然変異体 vs 野生型) の比較のための参照として用いられる。G P R 8 6 活性の比較についても参照として用いられる。例えば「標準」は、配列 I D N O 1 によって特徴づけられる配列である。

【0071】

本明細書で用いられている「増幅」は、核酸配列に適用されるとき、核酸配列の 1 つ以上のコピーは、鋳型核酸から生成されるようなプロセスをいう。「増幅」の好適な方法は、P C R 又は R T / P C R である。

30

【0072】

本明細書で用いられている用語「G タンパク質共役型レセプター」すなわち「G P C R」は、7 個のアルファヘリカルの膜貫通型ドメインと、膜結合型ポリペプチドをいう。機能的 G P C R は、リガンド又はアゴニストと結合し、また活性 G タンパク質と結合する。G P R 8 6 は G P C R である。

【0073】

本明細書で用いられている用語「抗体」は、従来の免疫グロブリン分子のほか、免疫グロブリン分子の断片で、支配下にあるポリペプチド又はモジュレーターの一つとも特異的に反応するものも含む。抗体は、従来の技術を用いてフラグメント化されることができ、本明細書で下記に抗体全体に対して説明されていると同様の方法で、実用のためにスクリーニングされる断片であってもよい。例えば、 $F(a b)_2$  フラグメントは、ペプシンで抗体を処理することによって生成されることができる。結果として生じる  $F(a b)_2$  フラグメントはジスルフィド結合を減じさせるように処理して、 $F a b$  フラグメントを製造した。本発明の抗体は、さらに、二重特異的、単一鎖、及びキメラ、及び抗体の少なくとも 1 つの C D R 領域によって授けられたポリペプチドに対する親和性を有するヒト化した分子を包含することが意図される。他の態様において、抗体は、その抗体に付けられ且つ検出され得るラベルをさらに含む (例えば、ラベルには、放射性アイソトープ、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、又は酵素コファクターであり得る)。抗体、モノクローナル、又はポリクローナル、及びその過度の可変 (hypervariable) 部分 (F A B、F A B

40

50

”など)は、抗体を産生するハイブリドーマ細胞と同様に、特異的疾患を診断又はモニターする分野の特異的産業上応用、好ましくは後述するものは、本発明のさらなる見地である。

【0074】

本発明によれば、阻害剤は、標識されたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、又は抗体の過度の可変(hypervariable)部分を含むが、これらに限定されない。

【0075】

ここで用いられている用語「トランスジェニック動物」は、1つ以上の細胞が、当該分野でよく知られているトランスジェニック技術によってのようなヒトの仲介によって誘導される異種の核酸を含んでいる非ヒト哺乳類、鳥類、魚類、両生類のような動物をいう。その核酸は、細胞の前駆体の中への直接的又は間接的導入によって、マイクロインジェクションまたは組換えウイルスを用いた感染などの意図的な遺伝的操作によって、細胞内に導入される。用語の遺伝的操作は、古典的異種交配又はインビトロの受精を含むが、むしろ組換えDNA分子の導入を指向する。この分子は、染色体内に集積されてもよいし、染色体外でのDNA複製であってもよい。ここで述べられている典型的なトランスジェニック動物において、トランスジーンは、支配下にあるポリペプチドの一つの組換え型、例えばアゴニスト型又はアンタゴニスト型を、細胞に発現させる。しかしながら、組換え遺伝子がサイレントであるトランスジェニック動物は、例えば、下記に述べられている構成要素依存性のFLP又はCREリコンビナーゼとして予期される。さらに、「トランスジェニック動物」は、また、1つ以上の遺伝子のうちの遺伝子崩壊が、組換え又はアンチセンス技術双方を含むヒト仲介によってもたらされるこれらの組換え動物も含む。

【図面の簡単な説明】

【0076】

図1は、本発明のヒトGPR86(P2Y<sub>13</sub>)レセプターのヌクレオチド及び推定されるアミノ酸配列を示す。

【0077】

図2は、他のP2YサブタイプとGPR86(P2Y<sub>13</sub>)レセプターの構造的関係を示す樹状図である。

【0078】

図3は、GPR86(P2Y<sub>13</sub>)レセプターの組織分布を示す。

【0079】

図4A~図4Cは、夫々次のものを示す：

GPR86(P2Y<sub>13</sub>)ヒトレセプターを発現する1321N1-G<sub>16</sub>細胞内でのIP<sub>3</sub>の蓄積に対するADP、2MeSADP及びADP/Sの濃度作動曲線；

GPR86(P2Y<sub>13</sub>)ヒトレセプターを発現する1321N1細胞におけるG<sub>16</sub>とともにIP<sub>3</sub>の蓄積に対するADP、ATP及び2MeSADPのアゴニストの効果；及び

GPR86(P2Y<sub>13</sub>)ヒトレセプターを発現する1321N1細胞に対して、G<sub>16</sub>とともに、ADPによって誘導されるIP<sub>3</sub>の蓄積に対する百日咳毒素の影響。

【0080】

図5Aは、GPR86(P2Y<sub>13</sub>)ヒトレセプターを発現するCHO-K1細胞におけるcAMP蓄積に対するADPの濃度作動曲線を示し、図5Bは、本発明のGPR86(P2Y<sub>13</sub>)ヒトレセプターを発現するCHO-K1細胞においてADPによって誘導されるcAMP蓄積に対する百日咳毒素の影響を示す。

【0081】

図6は、本発明のGPR86(P2Y<sub>13</sub>)ヒトレセプターを発現するCHO-K1細胞において、リン酸化されたErk1及びErk2タンパク質のウエスタンブロット解析を示す。

【0082】

図7は、ADPの構造を示す。

10

20

30

40

50

## 【0083】

図8は、ATP及び2MeSATPによるGPR86の濃度応答曲線を示す。

## 【0084】

図9は、異なるジアデノシンポリリン酸によるGPR86の活性化を示す。

## 【0085】

図10は、ポリ〔A〕とポリ〔A〕・〔G〕によってGPR86活性化の濃度応答曲線を示す。

## 【0086】

図11は、レセプターアンタゴニストRB-2、スラミン、PPADS、MRS-2179の存在下でのADPによるGPR86の活性化の濃度応答曲線を示す。

10

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0087】

発明の詳細な説明

本発明は、ADPオーファンGタンパク質共役型レセプターGPR86に対する天然リガンドであるという発見に関し、また薬剤スクリーニング方法におけるレセプターに対するこのリガンドの結合の使用方法に関する。この既知のリガンド及びレセプターGPR86との相互作用は、調節不良となったレセプター活性を含む条件の診断方法を提供する。本発明は、またGPR86(P2Y<sub>13</sub>)と相同配列、該配列に相当するポリヌクレオチド、及び/又はそのポリヌクレオチドを発現する組換え細胞を含むキットに関し、レセプター及び/又はその相当するポリヌクレオチドのアゴニスト化合物、アンタゴニスト化合物及び逆アゴニスト化合物を同定する。このようなキットは、種々の疾患又は疾病の診断、

20

予防、及び/又は治療に有用である。

## 【0088】

本発明は、また、レセプターポリペプチドの新規なアゴニスト化合物、アンタゴニスト化合物、逆アゴニスト化合物、及びその相当するポリヌクレオチドで、本発明の方法によって同定されたものに関する。

## 【0089】

下記及び上記に参照された全ての参考文献は、全体的に参考として、本明細書に組み入れられる。

## 【0090】

配列

本発明は、GPR86をコードするヌクレオチド及びアミノ酸配列に関する(図1に示す)。本発明は、またGPR86をコードするヌクレオチド及びアミノ酸配列に相同であるオルソログ(ortholog)及び配列に関する。

30

## 【0091】

配列相同性の計算

本明細書で示されている配列のいずれかに関する配列同定は、他の配列とのいずれか1つ以上の配列の単純な「眼球」による比較(すなわち厳密な比較)をして、他の配列が例えばその配列の少なくとも70%アイデンティティを有するかどうかをみることによって決めることができる。

40

## 【0092】

相対配列の同定は、同定決定に最適なアルゴリズムを用いて、例えばデフォルトパラメータを用いて、2つ以上の配列の間でのアイデンティティ%を算出できる商業上入手できるコンピュータプログラムによって決めることもできる。このようなコンピュータプログラムの典型例は、CLUSTALである。2つの配列間のアイデンティティ及び類似性を決める他コンピュータプログラム方法は、GCGプログラムパッケージ(Deveruexら、1984年、Nucleic Acids Research 12:387)及びFASTA(Altschulら、1990年、J Molec Biol 403-410頁)である。

## 【0093】

ホモロジー%は、隣接配列を超えて計算され得る、すなわち1つの配列は他の配列と並ん

50

でいて、1つの配列における各アミノ酸が他の配列の該当アミノ酸あるときは1残基と直接比べられる。これは、「アンギャップド (ungapped)」アライメントとよばれる。典型的には、そのようなアライメントは、比較的短い数の残基を超えてだけ行われる。

#### 【0094】

これはとても簡単で両立する方法であるけれども、例えば、他の点では全く同一の配列ペアにおいて、1つの挿入又は欠失が続くアミノ酸残基をアラインメントから外に置かれる原因となることを考慮することを欠いていて、その結果、全体的なアラインメントが行われるときに、潜在的にホモロジー%の大きな減少となる。結果的に、ほとんどの配列比較方法は、デザインされて、ホモロジースコア全体を過度に不利にすることなく、起こりえる挿入と欠失を考慮している好適なアラインメントを作り出す。これは、特定の相同性を最大化しようとする配列アラインメント中に、「ギャップ」を挿入することによって達成される。

10

#### 【0095】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、そのアラインメント中でおこる各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当てて、同数の一致するアミノ酸にとって、出来る限り少ないギャップを伴う配列アラインメントは、2つの比較される配列間のより高い関係を反映して、たくさんのギャップを伴う配列よりも高いスコアを達成するだろう。「密接な関係にあるギャップコスト」は、ギャップの存在のための比較的高いコストと、ギャップ内で各々続いている残基にとって小さいほうの不利益を課すことに、典型的に用いられる。これは、最も共通に用いられるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、わずかのギャップを伴う好適化されたアラインメントを、もちろん生産するだろう。殆どのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティがモデファイされるのを許容する。しかしながら、配列比較のためにそのようなソフトウェアを用いるときデフォルト値を用いることが好ましい。例えば、GCG ウィスコンシンベストフィットパッケージを用いるとき、アミノ酸配列のためのデフォルトギャップペナルティは、ギャップに対する - 12 と各伸長に対する - 4 である。

20

#### 【0096】

従ってホモロジー%の最大値の計算は、ギャップペナルティを考慮すると、最初に、最適アラインメントの製造を要求する。そのようなアラインメントを実行するための好適なコンピュータプログラムは、GCG ウィスコンシンベストフィットパッケージ (ウィスコンシン大学、米国; Deveruexら、1984年、Nucleic Acids Research 12: 387) である。配列比較できる他のソフトウェアの例としては、BLASTパッケージ (Ausubelら、1995年、Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sons)、FASTA (Altschulら、1990年、J. Mol. Biol. 403-410頁) 及びひと揃いの比較ツールである GENWORKS を含むが、これらに限定されない。BLAST 及び FASTA は双方とも、オフライン及びオンラインサーチングに有効である (Ausubelら、1999年、上記、7-58乃至7-60頁)。

30

#### 【0097】

最終的ホモロジー%は、アイデンティティに関して測定されることが出来るけれども、そのアラインメントプロセス自体が、典型的には、全か無かのペア比較に基づいている。そのかわりに、スケール化された類似性のスコアマトリックスは、化学的類似性と進化の距離に基づく各ペアの分別ある比較にスコアをわりあてるように、一般に、用いられる。共通に用いられているそのようなマトリックスの例としては、BLOSUM62 マトリックス - BLAST ひと揃いプログラムに対するデフォルトマトリックス。GCG ウィスコンシンプログラムは、もし供給されるならば、公共のデフォルト値又は慣習的シンボル比較表のいずれかを、一般に用いる。GCG パッケージのために、公共のデフォルト値を用いることは好ましく、他のソフトウェアの場合には、BLOSUM62 のようなデフォルトマトリックスを用いることが好ましい。

40

#### 【0098】

有利には、デフォルト値をセットするパラメータとともに、BLAST アルゴリズムが

50

採用される。BLASTアルゴリズムは、[http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html)で詳細に説明されていて、これは、参考として本明細書に組み入れられる。このサーチパラメータは、下記のように定義され、定義されたデフォルトパラメータに有利にセットされることができる。

【0099】

有利には、BLASTによって評価されるとき「実質的アイデンティティ」は、EXPECT値が少なくとも7、好ましくは少なくとも9、最も好ましくは10以上に合う配列に相等しいとみなす。BLASTサーチにおけるEXPECTに対するデフォルト閾値は、通常10である。

【0100】

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) は、プログラム `blastp`、`blastn`、`tblastn`、及び `tblastx` によって採用される発見に役立つサーチアルゴリズムである；これらのプログラムは、Karlin及びAltschulの統計学的方法 (KarlinとAltschul、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA87: 2264 - 68; KarlinとAltschul、1993年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 5873 - 7; [http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html)) をいくつかの強化を伴って用いた彼らの発見に基づいている。BLASTプログラムは、配列類似性のサーチ用に適合させられ、照会配列との相同性を同定する実施例用に適合させられる。配列データベースの類似サーチにおける基礎的な問題点についての議論は、Altschulら (1994年) Nature Genetics 6: 119 - 129頁参照。

10

20

【0101】

<http://www.ncbi.nih.gov>で入手可能な5つのBLASTプログラムは、以下のタスクを実行している：`blastp` - タンパク質配列のデータベースに対してアミノ酸の問題配列を比較；`blastn` - ヌクレオチド配列データベースに対して問題のヌクレオチド配列を比較；`blastx` - タンパク質配列のデータベースに対して問題のヌクレオチド (双方のストランド) 配列の6つのフレームの概念の翻訳産物を比較；`tblastn` - 6つのリーディングフレーム (双方のストランド) すべてにおいて、動的に翻訳されたヌクレオチド配列データベースに対する問題のタンパク質配列を比較；`tblastx` - ヌクレオチド配列データベースの6つのフレーム翻訳に対する問題ヌクレオチド配列の6つのフレームの翻訳の比較。

30

【0102】

BLASTは下記サーチパラメータを使用する：

HISTOGRAM - 各サーチのためのスコアのヒストグラムの表示；デフォルトはyes (BLASTマニュアルでのパラメータH)。

【0103】

DESCRIPTIONS - 特異化された番号に報告されたマッチング配列の短い銘柄の番号の制限；デフォルトリミットは100の銘柄 (description) (マニュアルページのパラメータV参照)。

【0104】

EXPECT - データベース配列にマッチする報告のための統計学的に重大な閾値；Karlin及びAltschul (1990年)の確率的モデルによれば、10マッチが単なるチャンスによって見出されると期待されるように、デフォルト値が10である。もし、マッチにありとされる統計学上の重大性が、EXPECT閾値よりも大きいならば、そのマッチは、報告されないだろう。EXPECT閾値が低いほど、よりストリンジェントになり、より少ないチャンスマッチが報告されるように導く。分数値は受け入れられる (BLASTマニュアルにおけるパラメータEを参照)。

40

【0105】

CUTOFF - 高いスコアリングのセグメントペアの報告に対するカットオフスコア。デフォルト値はEXPECT値から算出される (上記参照)。HSPsは、これらのせいにする統計学的重要性が、CUTOFF値に等価のスコアを有するたった一つのHSPに

50

ありとするほど少なくとも高いかどうかだけを、データベース配列のために報告される。CUTOFF値が高い程、よりストリンジェントになり、報告されるチャンスマッチがより少なくなるように導く(BLASTマニュアルにおけるパラメータSを参照)。典型的には、重要な閾値は、EXPECTを用いてより直感的に支配されることができる。

**【0106】**

ALIGNMENTS - ハイスコアリングセグメントペア(HSPs)が報告されることに対して特異的な数へのデータベース配列の制限; デフォルトリミットは50である。もし、これよりも大きいデータベースが、報告のための統計学的に重要な閾値をたまたま満足させるならば(下記EXPECT及びCUTOFF参照)、もっとも大きい統計学的重要性がありとするマッチだけが報告される(BLASTマニュアルにおけるパラメータBを参照)。

10

**【0107】**

MATRIX - BLASTP, BLASTX, TBLASTN及びTBLASTXの代替のスコアリングマトリックスを特異化する。デフォルトマトリックスはBLOSUM62である(Henikoff&Henikoff, 1992年)。価値ある代替可能な選択としては、PAM40, PAM120, PAM250及びIDENTITYがある。BLASTNの代替のスコアリングマトリックスは入手可能でない。BLASTNにおいて指示的なMATRIXの特異化は、エラー応答のリターンを要求する。

**【0108】**

STRAND - TBLASTNサーチはデータベース配列のちょうどトップ又はボトムของストランドに制限する; あるいはBLASTN, BLASTX又はTBLASTXサーチを、問題配列のトップ又はボトムのストランド上のちょうどリーディングフレームに限定する。

20

**【0109】**

FILTER - Wooton&Federhen(1993年) Computers and Chemistry 17:149-163のSEGプログラムによって決定されるように、低い文法的複雑さを有する問題配列のセグメントのおおいをはがす、あるいはClaverie&States(1993年) Computers and Chemistry 17:191-201のXNUプログラムによって決定されるように、あるいはBLASTNにかえて、TatusovとLipmanのDUSTプログラム(<http://www.ncbi.nih.gov>を参照)によって決定されるように、短周期の内部繰り返しからなるセグメントのおおいをはがす。フィルタリングは、blast出力から、統計学的に重要であるが生物学的には興味がない報告(例えば共通の酸性領域、塩基性領域またはプロリンリッチ領域についてのヒット)を除去することができ、データベース配列に対して特異的マッチングに入手可能な問題配列のより生物学的に興味ある領域を残しておく。

30

**【0110】**

フィルタプログラムによって見出される複雑性の低い配列は、ヌクレオチド配列において文字「N」を用いて置換される(例えば、「NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN」とタンパク質配列では文字「X」で置換される(例えば「XXXXXXXXXXXXX」)。

**【0111】**

フィルタリングは、問題配列(又はその翻訳産物)に適用されるだけで、データベース配列には適用されない。デフォルトフィルタリングには、BLASTNのためのDUST、他のプログラムのためのSEGがある。

40

**【0112】**

SWISS-PROTにおける配列に適用されるとき、SEG, XNU又は双方によって全く何もマスクされないことは異常ではない。フィルタリングが常に効果を生み出すことを期待すべきでない。

**【0113】**

さらに、いくつかのケースでは、配列はその全体でマスクされ、フィルタリングされていない問題の配列に対して報告されたどのマッチも統計学的重要性が疑われていることを示す。

50

## 【0114】

NCBI - gi NCBI gi 同定物 ( i d e n t i f i e r ) を、アクセス及び / 又は座の名前に加えて、出力として示されるようにする。

## 【0115】

最も好ましくは、配列比較は、<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>で提供されている単純な BLAST サーチアルゴリズムを用いて実行される。本発明のいくつかの態様では、配列アイデンティティを決定するときにギャップペナルティは用いられない。

## 【0116】

ハイブリダイゼーション

本発明は、本明細書で示されている配列にハイブリダイズできるヌクレオチド配列、または配列の断片又は誘導体、又は上記いずれかの相補体 ( c o m p l e m e n t ) にも拡張する。 10

## 【0117】

ハイブリダイゼーションは、D i e f f e n b a c h C W と G S D v e k s l e r ( 1995年、PCRプライマー、実験マニュアル、コールドスプリングハーバース社、ニューヨーク州プレインビュー) で説明されているポリメラーゼ鎖反応技術において実行されるような増幅プロセスと同様に、「塩基ペアを通じて、核酸の鎖が相補鎖と結合することによるプロセス」を意味する ( Coombs J (1994年)、バイオテクノロジー事典、Stockton Press社、ニューヨーク州ニューヨーク)。

## 【0118】

ハイブリダイゼーション条件は、B e r g e r と K i m m e l ( 1987年、分子クロニング技術のガイド、Methods in Enzymology, Vol. 152, アカデミックプレス社、カリフォルニア州サンディエゴ) に教示されているように、核酸結合複合体の融解温度 ( T m ) に基づき、下記に説明するように、定義された「ストリンジェンシー」を受ける。 20

## 【0119】

本明細書で表されているヌクレオチド配列又はそれらの相補鎖 ( c o m p l e m e n t ) に選択的にハイブリダイズできる本発明のヌクレオチド配列は、少なくとも20又は少なくとも25又は30、例えば40、60又は100以上の隣接しているヌクレオチド領域を超えて、本明細書で表示されている該当ヌクレオチド配列に、一般に少なくとも70%、又は75%、又は少なくとも85%又は90%およびほぼ少なくとも95%又は98%相同であるだろう。 30

## 【0120】

用語「選択的にハイブリダイズできる」は、本発明の標的ヌクレオチド配列は、上記バックグラウンドに重要なレベルでそのプローブにハイブリダイズすることを見出される条件下で、プローブが用いられるように、使用されるヌクレオチド配列をいう。そのバックグラウンドハイブリダイゼーションは、例えば、スクリーニングされるゲノムDNAライブラリー又はcDNAにおいて存在する他のヌクレオチド配列のために起こりえる。この場合、バックグラウンドは、10倍又はほぼ100倍激しく標的DNAとともに観察される特異的相互作用よりも10倍以下又はほぼ100倍以下であるライブラリーの非特異的DNAメンバーとプローブの間での相互作用によって生み出されたシグナルレベルを暗示する。相互作用の激しさは、例えば、プローブを放射性ラベル、例えば<sup>32</sup>Pを用いて測定されることができる。 40

## 【0121】

最大ストリンジェンシー - に対する中間的条件下、本明細書に表示されたヌクレオチド配列にハイブリダイズできるヌクレオチド配列も、本発明の範囲内に含まれる。B e r g e r 及び K i m m e l ( 1987年、分子クロニング技術へのガイド、Methods in Enzymology, Vol. 52, アカデミックプレス社、カリフォルニア州サンディエゴ) で教示されたように、ハイブリダイゼーション条件は、複合体に結合する核酸の融解温度 ( T m ) に基づき、下記で説明されるように定義された「ストリンジェンシー」を受ける。

## 【0122】

最大のストリンジェンシ - は、典型的には、約  $T_m - 5$  で起こる (プローブの  $T_m$  未満 5 ) ; 約 5 ~  $T_m$  未満である 10 でのハイストリンジェンシ ; 約 10 ~  $T_m$  未満である 20 での中間ストリンジェンシ ; そして  $T_m$  未満である約 20 ~ 25 での低いハイストリンジェンシ。当業者によって理解されるように、最大のストリンジェンシハイブリダイゼーションは、中間の (又は低い) ストリンジェンシハイブリダイゼーションは、類似の又は関係するヌクレオチド配列を同定又は検出に用いられることができる間に、ヌクレオチド配列の同定又は検出に用いられることができる。

#### 【 0 1 2 3 】

他の態様では、本発明はストリンジェントな条件下で本発明の GPCR ヌクレオチド配列の 1 つ以上にハイブリダイズできるヌクレオチド配列をカバーできる (例えば、65 及び  $0.1 \times \text{SSC} \{1 \times \text{SSC} = 0.15 \text{ M NaCl}, 0.015 \text{ M クエン酸ナトリウム pH } 7.0\}$ )。本発明のヌクレオチド配列が二本鎖のところでは、双方の鎖が二重で、各々独立的に又は組合せのいずれかは、本発明によって拡張される。ヌクレオチド配列が単一鎖のところでは、そのヌクレオチド配列の相補配列は、また本発明の範囲内に含まれる。

10

#### 【 0 1 2 4 】

本発明は、本明細書で表示されている配列に相補的である配列又はその断片のいずれか又は誘導体にハイブリダイズできるヌクレオチド配列にも拡張する。さらに、本発明は、本発明の配列にハイブリダイズできる配列に相補的であるヌクレオチド配列にも拡張する。これらのタイプのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の変形例である。この点において、用語「変形 (variant)」は、本明細書で表示されているヌクレオチド配列にハイブリダイズできる配列に相補的な配列に拡張する。しかしながら、用語「変形」は、ストリンジェントな条件下で本明細書に表示されているヌクレオチド配列にハイブリダイズできる配列に相補的である配列にも拡張する (例えば、65 で  $0.1 \times \text{SSC} \{1 \times \text{SSC} = 0.15 \text{ M NaCl}, 0.015 \text{ M クエン酸ナトリウム pH } 7.0\}$ )。

20

#### 【 0 1 2 5 】

細胞

本発明によれば有用な細胞は、バクテリア細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳類細胞からなる群より選択されることができる。

#### 【 0 1 2 6 】

本発明によれば有用な細胞は、本発明によればレセプターをコードする核酸配列が誘導されることができる、又は本明細書で定義されるように、レセプターが天然のレベル又は天然のレベル以上で表現されるように存在している中へのいずれかの細胞であることができる。細胞内で発現される本発明のレセプターは、本明細書で定義される正常又はほぼ正常な薬理学を示しえる。細胞内で発現される本発明のレセプターは、図 1 に表示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列あるいは図 1 に表示されたアミノ酸配列に少なくとも 70% 一致するヌクレオチド又はアミノ酸配列を含み得る。細胞内で発現される本発明のレセプターは、IDP 及び UDP に対する親和性よりも少なくとも 100 倍、500 倍、又はほぼ 1000 倍の親和性をもって ADP に結合できる。

30

#### 【 0 1 2 7 】

本発明の他の態様によれば、細胞は、COS7 細胞、CHO 細胞、LM (TK) 細胞、NIH-3T3 細胞、HEK-293 細胞、K562 細胞又は 1321N1 アストロサイト-マ細胞からなる群より選択されるが、他のトランスフェクトできる細胞系列も選ばれる。本発明の細胞膜がこれらの細胞由来であり得ることは明らかである。

40

#### 【 0 1 2 8 】

I GPR86 の活性をモジュレートする物質の同定のための解析

GPR86 の活性をモジュレートする物質は、ADP 又は他のリガンドとレセプターの相互作用を利用するたくさんの方式で同定されることができる。例えば、培養された細胞におけるインピトロ又はインピボで、GPR86 / ADP 結合を再構築する可能性は、その結合を引き裂く物質の同定のための標的を提供する。結合の開裂に基づく解析は、そのよ

50

うな分子のライブラリ又はコレクションからの有機低分子のような物質を同定できる。その代わりに、そのような解析は、天然源、例えば植物、カビ又はバクテリアの抽出物またはヒト組織サンプル（例えば腫瘍組織）からの抽出物又はサンプルにおいて物質を同定することができる。ある見地では、その抽出物は、核酸変形、ペプチド、又はポリペプチドのライブラリを発現する細胞から作られることができる。そして、GPR86 / ADP結合のモジュレーターは、結合解析又はレセプターを通じての下流のシグナリングを測定する機能的解析を用いてスクリーニングされることができる。

#### 【0129】

GPR86機能をモジュレートする物質をもっと直接的に同定するGPR86 / ADP相互作用を用いる他のアプローチは、候補物質又は候補モジュレーターによって誘導されるGPR86の下流シグナリングにおける変化を測定する。これらの機能解析は、単離された細胞膜フラクション内、又は細胞表面のレセプターを発現する細胞上で行われることができる。

10

#### 【0130】

ADPが、GPR86レセプターのリガンドであることが発見されて、スクリーニング解析によりアゴニスト、アンタゴニスト、及びレセプター活性の逆アゴニストを同定できるようにする。このスクリーニング解析には、2つの一般的なアプローチがあるであろう。

#### 【0131】

##### 1) リガンド結合解析

GPR86を発現する細胞、そのような細胞からの膜抽出物、GPR86ポリペプチドを含むウィルス誘導された出芽膜、又はGPR86を含む固定化した脂質膜が標識されたADP及び候補化合物に曝されるところで行われる。培養に続いて、反応混合物は、GPR86レセプターに対する標識ADPの特異的結合のために測定される。結合を阻止又は標識ADPにとってかわる化合物は、GPR86活性のアゴニスト、アンタゴニスト、又は逆アゴニストであることができる。そして、次の機能的解析は、これらのカテゴリーのうちのいずれかに、これらが属するのかを決定する陽性化合物上で行われることができる。

20

#### 【0132】

2) 機能解析は、GPR86のシグナリング活性が測定される。

a) アゴニストスクリーニングにとって、GPR86発現細胞又はこれらから調製された膜が、候補化合物とともに培養され、GPR86のシグナリング活性が測定される。レセプター活性をモジュレートする化合物によって誘導される活性は、ADPによって誘導される活性と比較される。アゴニスト又は部分的アゴニストは、アゴニスト又は部分的アゴニストが10 nM以下で存在するとき、ADPの最大活性の少なくとも10%に該当する最大の生物活性を有するだろう、また、少なくともADPと同じ程度の強さの効能を有するだろう。

30

#### 【0133】

b) アンタゴニスト又は逆アゴニストスクリーニングのために、GPR86発現細胞又はこれらから単離された膜が、候補化合物とともに又は伴わずに、ADP存在下でのシグナリング活性について解析される。アンタゴニストは、ADP存在下で、アンタゴニストを不足する反応に対して、少なくとも10% ADP刺激されたレセプター活性のレベルを減じるだろう。逆アゴニストは、逆アゴニストを不足している反応に対して、少なくとも10%そのレセプターの構成要素活性を減じるだろう。

40

#### 【0134】

c) 逆アゴニストスクリーニングのために、構成要素GPR86活性を発現する細胞又はこれらから単離された膜は、候補化合物の存在下でのレセプター活性を測定する機能的解析の中で用いられる。逆アゴニストは、少なくとも10%レセプターの構成要素活性を減少させるこれらの化合物である。GPR86は、強い構成要素プロモータ、例えばCMV初期(early)プロモータのコントロール下に、それを配置することによって、過剰発現されることができる。あるいは、保存されたGPCRアミノ酸又はアミノ酸ドメインのある突然変異は、構成要素活性を導く傾向がある。例えば、Kjelsbergら, 1992年, J.

50

Biol. Chem. 267: 1430; McWhinneyら, 2000年, J. Biol. Chem. 275: 2087; Renら, 1993年, J. Biol. Chem. 268: 16483; Samamaら, 1993年, J. Biol. Chem. 268: 4625; Parmaら, 1993年, Nature 365: 649; Parmaら, 1998年, J. Pharmacol. Exp. Ther. 286: 85; 及びParentら, 1996年, J. Biol. Chem. 271: 7949参照。

#### 【0135】

##### リガンド結合と変位解析

ある者は、細胞上、又はレセプターポリペプチドを含む単離された膜上で発現されるGPR86ポリペプチドを、ADPがGPR86へ結合するのを阻害する化合物のスクリーニングのために、ADPとともに、使用することができる。結合又はADP変位だけを測定する解析の中で同定されるとき、化合物は、それらがアゴニスト、アンタゴニスト、又は逆アゴニストとして作用するかどうかを決定する機能的テストを受けさせなければならないだろう。

10

#### 【0136】

変位実験にとって、GPR86ポリペプチドを発現する細胞（一般に解析あたり $2.5 \times 10^3$ 細胞又は1乃至100 $\mu$ gの膜抽出物）は、候補モジュレーターの増大濃度の存在又は不在下で標識されたADPで結合したバッファ内で培養される。その解析を有効にし、修正するために、非標識ADPの濃度を増大させながら、コントロール競合反応が行われることができる。培養後、細胞は、広範囲に洗浄され、結合した標識ADPは与えられた標識にふさわしいように測定される（例えば、シンチレーションカウント、蛍光など）。候補モジュレーターの存在下で結合された標識ADPの量における少なくとも10%の減少は、候補モジュレーターによって結合の変位を示す。10nM以下の濃度で標識ADP（サブ飽和しているADP投与量）の50%変位すれば、本明細書で説明されているこの又は他の解析において、候補モジュレーターは特異的に結合すると考えられる。

20

#### 【0137】

あるいは、結合又は結合の変位は、表面プラズモン共鳴（SPR）によってモニタされることができる。表面プラズモン共鳴解析は、定量的方法として用いられることができ、水相からセンサ上の膜内に固定化されたGPR86ポリペプチドまでADPが結合又は結合を喪失することによって引き起こされる固定化したセンサ付近での質量変化によって2つの分子間結合を測定する。質量におけるこの変化は、ADP又は候補モジュレーターの注入又は除去後の時間に対する共鳴ユニットとして測定される、Biacore Biosensor（パイアコアAB）を用いて測定される。GPR86は、Salamonらによって説明された方法によれば薄層脂質膜において、センサチップ上に固定化される（例えばリサーチグレードCM5チップ；パイアコアAB）（Salamonら, 1996年, Biophys J. 71: 283 - 294; Salamonら, 2001年, Biophys. J. 80: 1557 - 1567; Salamonら, 1999年, Trends Biochem. Sci. 24: 213 - 219、これらはそれぞれ参考として本明細書に組み入れられる）。Sarrionら、SPRがチップ上での脂質層内に固定化されたGPCRA(1)アデノシンレセプターに結合しているリガンドを検出するのに用いられることができる（Sarrionら, 2000年, Mol. Cell. Biol. 20: 5164 - 5174、参考として本明細書に組み入れられる）。SPR解析において、GPR86にADPが結合するための条件は、開始点として、Sarrionらによって報告された条件を用いて、当業者によって微調整されることができる。

30

40

#### 【0138】

SPRは、少なくとも2つの方法で結合のモジュレーターについて解析できる。第1の方法は、固定化されたGPR86ポリペプチドにADPをプレ結合し、続いて0.1nMから1 $\mu$ Mまでの領域の濃度で候補モジュレーターをインジェクションすることができる。結合されたADPの変位を定量して、モジュレーター結合を検出する。あるいは膜結合されたGPR86ポリペプチドを、候補モジュレーターとともにプレインキュベートして、ADPとともにチャレンジされることができる。モジュレーターに予めさらされていないチップ上でのADP結合に対して、モジュレーターにさらされたGPR86とADPの結合に差異があれば、モジュレーターが存在するときのADPの結合又は変位を立証するだ

50

ろう。いずれかの解析において、候補モジュレーター不在下でのADP結合量に対して、候補モジュレーター存在下でADP結合の量が10%以上減少していると、候補モジュレーターがGPR86とADPの相互作用を阻害することを示している。

#### 【0139】

ADPのGPR86への結合阻止を検出する方法は、蛍光共鳴エネルギー転スファ（FRET）を使用する。FRETは、蛍光ドナー（D）の放射スペクトルが蛍光アクセプター（A）の励起スペクトルとオーバーラップしているならば、蛍光ドナー（D）と蛍光アクセプター（A）の間で互いに接近しているとき（通常、分離の $< 100$ ）に起こる量子機構的現象である。テストされる分子、例えばADPとGPR86ポリペプチドは、ドナーとアクセプター蛍光団の相補的ペアで標識される。GPR86：ADP相互作用によって両者が密接に結合される一方、ADPとGPR86ポリペプチドが結合されていないとき、ドナー蛍光団の励起で放射される蛍光は励起波長に回答して放射される波長と異なる波長を有し、各波長での放射強度の測定によって、結合されていない分子vs結合された分子を定量するだろう。GPR86ポリペプチドを標識するドナー蛍光団は、当該分野でよく知られている。CyanFP（CFP、ドナー（D））とイエローFP（YFP、アクセプター（A））として知られているA.victoriaGFPの変異体は、興味あるものである。実施例として、YFP変異体は、GPR86との融合タンパク質として作られることができる。蛍光団で標識したADP化合物（モレキュラープローブス社）と同様に融合としてのGFP変異体の発現のためのベクター（クローンテック社）が当該分野で知られている。標識されたADPとYFP-GPR86タンパク質の混合物への候補モジュレーターの添加は、例えば、候補モジュレーターを伴わないサンプルに対して、YFP蛍光の減少によって、実証されたエネルギー転スファの阻害をもたらす。GPR86：ADPの検出のためにFRETを用いる解析において、候補モジュレーターを含まないサンプルに対して、候補モジュレーターを含むサンプルにおけるアクセプター波長で蛍光放射強度が10%以上減少すると、候補モジュレーターはGPR86：ADP相互作用を阻止することを示す。

10

20

#### 【0140】

FRETにおけるバリエーションは、蛍光消光を用いて、分子の相互作用をモニターする。相互作用しているペアにおける一方の分子は蛍光団で標識され、他方は、それを伴う密接な並列をもたらすとき、蛍光団の蛍光を消光する分子で標識される。励起に基づく蛍光の変化は、蛍光団：消光剤ペアでタグ付けされた分子の会合における変化の指標である。一般に、標識GPR86ポリペプチドの蛍光の増加は、消光剤を有するADP分子が置き換えられた指標となる。消光解析にとって、候補モジュレーターなしのサンプルに対して、候補モジュレーターを含むサンプルにおける蛍光放出の強度における10%以上の増大は、候補モジュレーターがGPR86：ADP相互作用を阻害することを示す。

30

#### 【0141】

表面プラズモン共鳴とFRET方法に加えて、蛍光分極測定は、結合の定量に有用である。蛍光的にタグづけされた分子に対する蛍光分極値は、回転の相互関係時または宙返り速度に依存している。蛍光標識ADPと会合するGPR86によって形成される複合体のような複合体は、複合化されていない、標識ADPよりも高い分極値を有する。候補阻害剤が解離、又はGPR86とADPの相互作用を阻止するならば、GPR86：ADP相互作用の候補阻害剤の包含は、候補阻害剤なしの混合物に対して、蛍光分極の減少を結果としてもたらす。蛍光分極は、レセプター：リガンド複合体の形成を解離する低分子の同定によく適している。候補モジュレーターが不足しているサンプルにおける蛍光分極に対して、候補モジュレーターを含むサンプルにおける蛍光分極の10%以上の減少は、候補モジュレーターはGPR86：ADP相互作用を阻止することを示す。

40

#### 【0142】

GPR86：ADP相互作用をモニタする他の代用は、バイオセンサ解析を使用する。ICSバイオセンサは、当該分野で説明された（オーストラリアのメンブレンバイオテクノロジーリサーチインスティテュート；<http://www.ambri.com.au/>；Cornell・B, Braach-

50

Maksvytis・V, King・L, Osman・P, Raguse・B, Wieczorek・L及びPace・R. 「イオンチャンネルスイッチを用いたバイオセンサ」Nature, 1997年, 387, 580)。この技術は、GPR86とそのリガンドの会合が、疑いある2層膜の中のグラマシジン-促進 (gramacid in-facilitated) イオンチャンネルの接近と共役し、このようにしてバイオセンサのアドミッタンス (インピーダンスと類似) が測定可能に変化する。このアプローチは、アドミッタンス変化の大きさが6オーダーを超える線形で、小さな分子の組換えライブラリーの大規模なハイスループットスクリーニングに理想的に適している。候補モジュレーターに不足しているサンプルのアドミッタンスに対して、候補モジュレーターを含むサンプルにおけるアドミッタンスの10%以上の変化 (増加又は減少) は、候補モジュレーターがGPR86とADPの相互作用を阻害していることを示す。GPR86とADPの相互作用をテストする解析において、相互作用のモジュレーターが必ずしも、ADPと物理的に相互作用するタンパク質のドメインと直接相互作用する必要がないであろうことに留意することが重要である。モジュレーターが相互作用の部位から除去された位置で相互作用するであろうこと、そして例えばGPR86ポリペプチド内での構造的変化を引き起こすであろうこともあり得る。この方式で作動するモジュレーター (阻害剤又はアゴニスト) は、それにもかかわらず、GPR86活性をモジュレートする物質として興味深い。

10

## 【0143】

従って、GPR86発現細胞を用いるGPR86活性の候補モジュレーターのスクリーニング方法は、a) 候補モジュレーター存在下での細胞の第1のサンプル及び候補モジュレーターの不在下での細胞の第2のサンプルを、これらの双方サンプルがADPがGPR86に結合するのを許容する条件下で培養する工程; b) これらの第1及び第2のサンプルの中で、GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程、及び; c) 第1と第2のサンプルについてのセカンドメッセンジャーの解析結果を比較する工程を含む。また、GPR86を有する細胞膜を用いるGPR86活性の候補モジュレーターのためのスクリーニング方法は、a) 前記候補モジュレーターの存在下での前記細胞膜の第1のサンプルと、候補モジュレーターの不在下での前記細胞膜の第2のサンプルとを、双方のサンプルがGPR86とADPが結合することを許容する条件下で培養する工程; b) これらの第1のサンプルと第2のサンプルにおいて、GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程; 及びc) 前記第1のサンプルと第2のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャー解析の結果を比較する工程を含む。さらにGPR86を発現する細胞を用いて候補モジュレーターがGPR86活性を増大又は低減させているかを決定する方法は、a) 前記候補モジュレーターの存在下で前記細胞の第1のサンプルと、候補モジュレーターの不在下で前記細胞の第2のサンプルとを、双方のサンプルがGPR86とADPが結合することを許容する条件下で培養する工程; b) 前記第1のサンプルと第2のサンプルにおいて、GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程; 及びc) 前記第1のサンプルと第2のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャーの結果を比較する工程を含む。次に、GPR86を有する細胞膜を用いて、候補モジュレーターがGPR86活性を増大又は低減させているかを決定する方法は、a) 前記候補モジュレーターの存在下で前記細胞膜の第1のサンプルと、候補モジュレーターの不在下で前記細胞膜の第2のサンプルとの双方のサンプルを、GPR86とADPが結合することを許容する条件下で培養する工程; b) 前記第1のサンプルと第2のサンプルにおいて、GPR86ポリペプチドのシグナリング活性を検出する工程; 及びc) 前記第1のサンプルと第2のサンプルについて、前記セカンドメッセンジャーの結果を比較する工程を含む。

20

30

40

## 【0144】

他のリガンド

ここで説明されている方法又は結合解析のいずれも、GPR86の非ADPリガンド (例えばアゴニスト、アンタゴニストなど) を用いて実行されることができると理解されるべきである。例えば、ここで説明されているように同定された小さな分子又はADPアナログ類似物は、米国特許No. 5700786に表示されるADPアナログ、天然又は合成ペプチド、ポリペプチド、抗体又はその抗原結合部位、脂質、炭水化物、及び小さな

50

有機分子のいずれも含むが、これらに限定されない。

【0145】

説明された方法又は結合解析のいずれも、GPR86レセプター分子に結合する又はGPR86レセプターへのADPの結合に影響を与えるサンプル、例えば組織サンプル中での物質の存在を決定するのに用いられることができる。そうすると、GPR86ポリペプチドは、ADPと又はサンプルの存在又は不在下での他のリガンドと反応し、ADP又はリガンド結合が、使用される結合解析にふさわしいとして測定される。ADP又は他のリガンドの結合における10%以上の減少は、当該サンプルがレセプターポリペプチドへのADP又はリガンドの結合をモジュレートする物質を含むことを示す。

【0146】

さらに、本発明は、本明細書で説明されているような方法に関する。その方法とは、ADPが、ここで述べられているようなモジュレーター、例えばATP、2MeSATP、2MeSADP、ADP<sub>S</sub>、Ap<sub>3</sub>A、RB-2、スラミン又はPPADSのようなモジュレーターに置き換えられる方法である。

【0147】

さらに、本発明によって同定又は特徴付けられた物質又はモジュレーターは、細胞の中のポリペプチドのGPR86活性をモジュレートする方法であって、GPR86活性がモジュレートするように、ポリペプチドのGPR86活性をモジュレートする物質を前記細胞に配送する工程を含む方法の中で用いられることができる。

【0148】

レセプター活性の機能的解析

i. GTPアーゼ/GTP結合解析

GPR86のようなGPCRにとって、レセプター活性の測定は、レセプターを含む細胞膜によるGTPの結合として測定される。TraynorとNahorskiによって、1995年、Mol. Pharmacol. 47: 848-854頁（これは参考として本明細書に組み入れられる）で説明された方法において、標識GTPの結合を検出することによって膜に共役するGタンパク質を本質的に測定する。GTP結合解析にとって、レセプターを発現する細胞から単離された膜は、HEPESを20mM、pH7.4、NaCl 100mM、MgCl<sub>2</sub>を10mM、<sup>35</sup>S-GTP<sub>S</sub>を80pM及びGDPを3μM含むバッファーの中で培養される。この解析混合物は、結合されていない標識GTPがGF/Bフィルター上での濾過によって除去される後、30で60分間培養される。結合した、標識GTPは、液体シンチレーションカウンターによって測定される。ADP誘導GPR86活性のモジュレーションの解析のために、GPR86ポリペプチド発現細胞から調製された膜が、ADPと混合され、GTP結合解析は、GPR86活性の候補モジュレーターの存在及び不在下で実行される。候補モジュレーターを含むこの種の解析においてシンチレーションカウントされることによって測定されるように、候補モジュレーターなしでの解析に対して標識GTP結合が10%以上減少すると、候補モジュレーターがGPR86活性を阻害することを示す。類似のGTP結合解析は、ADPを用いることなく実行されて、アゴニストとして作動する化合物を同定することができる。この場合、ADP刺激GTP結合は、標準として用いられる。もしその化合物が1μM以下で存在するときADPによって誘導されるGTP結合を少なくとも50%のレベルで誘導すれば、またはADPによって誘導されるレベルと同じ若しくはそれよりも高いレベルで誘導すれば、その化合物はアゴニストと考えられる。GTPアーゼ活性は、GPR86を含む膜を、<sup>32</sup>P-GTPとともに培養することによって、測定される。活性GTPアーゼが無機リン酸としてラベルを解離するであろう。そして、無機リン酸は、20mMのH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>中の活性炭の5%懸濁液の中のフリー無機リン酸の分離によって検出され、続いてシンチレーションカウントされる。コントロールは、候補化合物の潜在的な非特異的影響を排除するために、GPR86を発現しない細胞(mock-トランスフェクト)から単離された膜を用いる解析を含む。

【0149】

10

20

30

40

50

GPR86調節されたGTPアーゼ活性上での候補モジュレーターの影響について解析するために、膜サンプルは、ADPとともに、モジュレーターを伴い又は伴わずに培養され、続いてGTPアーゼ解析を行う。モジュレーターなしのサンプルに対して、GTP結合又はGTP活性のレベルの10%以上の変化(増加又は減少)は、候補モジュレーターによるGPR86モジュレーションの指標となる。

【0150】

ii. ダウンストリーム経路活性化解析:

a. カルシウムフラックス - エクオリンベース解析:

エクオリン解析は、GPCRの活性化によって誘導される細胞内カルシウムの放出に対するミトコンドリアのアポエクオリンの応答を利用する (Stableら, 1997年, *Anal. Biochem.* 252: 115 - 126; Detheuxら, 2000年, *J. Exp. Med.*, 192: 1501 - 1508; これらは双方とも本明細書に参考として組み入れられる)。要するに、GPR86発現クローンは、トランスフェクトされて、ミトコンドリアのアポエクオリンとG16を共発現する。細胞は、5  $\mu$ MのCoelenterazine H (モレキュラーブローブス社) とともに室温で4時間培養され、DMEM-F12培養培地内で洗浄され、再び $0.5 \times 10^6$  cell/mlの濃度で再懸濁される。そして、細胞はテストアゴニスト分子と混合され、エクオリンによる発光がルミノメータを用いて30秒間記録される。結果は、Relative Light Units (RLU) として発現される。コントロールは、候補化合物の潜在的な非特異的効果を排除するために、GPR86を発現しない細胞 (mockトランスフェクトされた) から単離された膜を用いた解析を含む。

【0151】

もし、光強度が、候補モジュレーターで処理されたGPR86ポリペプチドを発現する細胞のサンプル内で、GPR86ポリペプチドを発現するが候補モジュレーターで処理されない細胞のサンプルに対して、又はGPR86ポリペプチドを発現しないが (mockトランスフェクトされた) 候補モジュレーターで処理された細胞に対して、10%以上の増加又は減少していれば、エクオリン活性又は細胞内カルシウムレベルは、「変化した」とする。

【0152】

ADPの不在下で行うとき、その解析は、GPR86活性のアゴニストを同定するのに用いられることができる。その解析がADPの存在下で行われるならば、それはアンタゴニストについての解析に用いられることができる。

【0153】

b. アデニレートシクラーゼ解析:

アデニレートシクラーゼ活性の解析は、Kenimer & Nirenbergによって、1981年, *Mol. Pharmacol.* 20: 585 - 591 (これは参考として本明細書に組み入れられる) で説明されている。この解析は、Solomonらによって、1974年, *Anal. Biochem.* 58: 541 - 548によって教示される解析のモディフィケーションである (これは参考として本明細書に組み入れられる)。要するに、100  $\mu$ lの反応系には、50 mMのTris塩酸 (pH 7.5), 5 mMのMgCl<sub>2</sub>, 20 mMのクレアチンリン酸 (ナトリウム塩), 10 ユニット (71  $\mu$ gのタンパク質) のクレアチンホスホキナーゼ, 1 mMの<sup>32</sup>P-ATP (テトラナトリウム塩, 2  $\mu$ Ci), 0.5 mMのサイクリックAMP, G<sup>3</sup>H-標識サイクリックAMP (約10000 cpm) 0.5 mMのRo20-1724, 0.25% エタノール, 及び50 - 200  $\mu$ gのタンパク質ホモゲネートを含んでテストされる (すなわち、GPR86ポリペプチドを発現する細胞又は発現せず、候補モジュレーターとともに又は伴わずにADPで処理又は処理されない細胞からのホモゲネート)。反応混合物は、一般に、37°Cで6分間培養される。培養につづいて、反応混合物は、コールドの6%トリクロロ酢酸0.9 mlの追加によって脱タンパクされる。試験管は、1800 x gで20分間遠心分離され、各上澄み液は、Dowex AG50W-X4カラムに添加される。このカラムからのcAMPフラクションは、0.1 mMイミダゾール塩酸 (pH 7.5) 4 mlでカウンティ

ングバイアルに溶出される。解析は3回行われるべきである。コントロール反応は、また、GPR86ポリペプチドを発現しない細胞からのホモゲネートタンパク質を用いて行われるべきである。

【0154】

本発明によれば、GPR86活性の候補モジュレーターで処理された細胞からのサンプルにおいて、候補モジュレーターで処理されない細胞の同様のサンプルに対して又は候補モジュレーターで処理されたがGPR86を発現しない細胞のサンプル(mockトランスフェクト細胞)に対して、アデニレートシクラーゼ活性が10%増加又は減少すれば、アデニレートシクラーゼ活性が「変化した」とする。

【0155】

10

cAMP解析:

細胞内又は細胞外cAMPは、当該分野で広範に知られている方法によれば、cAMPラジオイムノアッセイ(RIA)又はcAMP結合タンパク質を用いて測定される。例えば、Horton&Baxendale, 1995年, Methods Mol. Biol. 41: 91-105(これは参考として本明細書に組み入れられる)に、cAMP用のRIAを説明している。

【0156】

LJL Biosystems及びNENライフサイエンスプロダクツ社によって上市されている高効率蛍光分極ベースホモジナスアッセイのように、たくさんのcAMPの測定キットが商業上入手できる。コントロール反応は、mockトランスフェクト細胞の抽出物を用いていくつかの候補モジュレーターの潜在的な非特異的影響を排除するために行われるべきである。

20

【0157】

GPR86活性(又はそのような細胞の抽出物内)の候補モジュレーターで処理され、GPR86ポリペプチドを発現する細胞内で検出されるcAMPのレベルが、上記のHorton&Baxendale, 1995年に開示されたRIAベースアッセイを用いて、候補モジュレーターで処理されない類似の細胞のcAMPレベルに対して、少なくとも10%以上増加又は減少していれば、cAMPレベルは「変化した」とする。

【0158】

d. リン脂質分解、DAG産生とイノシトール3リン酸のレベル

リン脂質の分解を活性化するレセプターは、リン脂質をモニタすることによって、既知の又は疑いあるGPR86のモジュレーターの活性のために、変化としてモニタされることができ、その結果産物はセカンドメッセンジャーDAG及び/又はイノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)である。これらの各検出方法は、Ian M. Bird Totowa, ニュージャージー州、Humanaプレス社, 1998年に編集された「リン脂質シグナリングプロトコル」(これは参考として本明細書に組み入れられる)に説明されている。Rudolphら, 1999年, J. Biol. Chem. 274: 11824-11831も参照(これは参考として本明細書に組み入れられる)。これには、ホスファチジルイノシトール分解についての解析も説明されている。解析は、ADPで処理された又は処理されないで候補モジュレーターを伴って又は伴わずに、GPR86を発現する細胞又は細胞抽出物を用いて行われるべきである。コントロール反応は、候補モジュレーターの潜在的な非特異的効果を排除するために、mockトランスフェクトされた細胞又はこれらからの抽出物を用いて、行われるべきである。

30

40

【0159】

本発明によればもし、候補モジュレーターで処理されたGPR86ポリペプチドを発現する細胞からのサンプル内でのホスファチジルイノシトール分解、及びジアシルグリセロール及び/又はイノシトール3リン酸レベルが、候補モジュレーターで処理されないGPR86ポリペプチドを発現する細胞のサンプル内で観察されるレベルに対して、少なくとも10%の増加又は減少していれば、ホスファチジルイノシトール分解、及びジアシルグリセロール及び/又はイノシトール3リン酸レベルが「変化した」とする。

【0160】

50

## e . P K C 活性解析 :

成長因子レセプターチロシンキナーゼは、プロテインキナーゼC ( P K C ) の活性を含む経路を經由してシグナルをだす。プロテインキナーゼCは、リン脂質活性化及びカルシウム活性化されたプロテインキナーゼのファミリーである。P K C 活性化は、最終的に、c - f o s , c - m y c , 及びc - j u n を含むガン原遺伝子転写因子コード遺伝子 ; プロテアーゼ ; コラゲナーゼI やプラスミノゲン活性化阻害剤を含む細胞内接着分子I ( C A M I ) を含む接着分子のアレイの転写をもたらす。P K C によって誘導される遺伝子産物における増加を検出するように設計されたアッセイは、P K C 活性化及びこれによるレセプター活性化をモニタするのに用いられることができる。さらにP K C 経路でシグナルを出すレセプターの活性化は、P K C 活性化によって活性される遺伝子のコントロール配列により駆動されるレポータ遺伝子構成要素は、レポータ遺伝子の使用を通じてモニタされることができる。このタイプのレポータ遺伝子ベース解析は、以下に詳細に述べられる。

## 【 0 1 6 1 】

P K C 活性のより直接的な測定にとって、K i k k a w a らの方法、1 9 8 2 年 , J . B i o l . C h e m . 2 5 7 : 1 3 3 4 1 ( これは参考として本明細書に組み入れられる ) が用いられることができる。この解析は、ホスホセルロース紙に結合することによって実質的に分離されるP K C 基質ペプチドのリン酸化を測定する。このP K C アッセイシステムは、精製されたキナーゼの活性又は粗細胞抽出物における活性を測定するのに用いられることができる。プロテインキナーゼC サンプルは、解析に先だって迅速に、2 0 m M の H E P E S / 2 m M の D D T 内で希釈されることができる。

## 【 0 1 6 2 】

この解析の基質は、ミリストイル化アラニンリッチのプロテインキナーゼC 基質タンパク質 ( M A R C K S ) 由来のペプチド A c - F K K S F K L - N H <sub>2</sub> である。このペプチドの酵素のK m は、約 5 0 μ M である。当該分野で知られている他の基本的なプロテインキナーゼC 選択的ペプチドも、これらのK m の少なくとも2 ~ 3 倍の濃度で用いられることができる。この解析に要求されるコファクターとしては、カルシウム、マグネシウム、A T P 、ホスファチジルセリン及びジアシルグリセロールなどがある。ユーザの意図に依存して、このアッセイは、P K C 存在量 ( 活性化条件 ) 又は活性化P K C の存在量 ( 非活性化条件 ) を決定するのに用いられることができる。本発明のほとんどの目的のためには、活性化されることができるP K C を測定するよりも、むしろこれが単離されるときサンプルの中で活性であるP K C が測定されるように、非活性化状態が用いられるだろう。非活性化状態にとって、カルシウムは、E G T A のための解析から省かれる。

## 【 0 1 6 3 】

この解析は、2 0 m M の H E P E S ( p H 7 . 4 ) , 1 - 2 m M の D D T , 5 m M の M g C l <sub>2</sub> , 1 μ C i の <sup>- 3 2</sup> P - A T P , 1 0 0 μ g / m l のペプチド基質 ( ~ 1 0 0 μ M ) , 1 4 0 μ M / 3 . 8 μ M のホスファチジルセリン / ジアシルグリセロール膜 , 及び 1 0 0 μ M カルシウム ( 又は 5 0 0 μ M の E D T A ) を含む混合物内で行われる。2 0 m M の H E P E S ( p H 7 . 4 ) 、 2 m M の D D T で希釈したサンプル 4 8 μ l が、8 0 μ l の最終反応容器の中で用いられる。反応は、3 0 分で5 - 1 0 分間行われ、続いて2 5 μ l の 1 0 0 m M の A T P , 1 0 0 m M の E D T A , p H 8 . 0 を添加して反応を停止した。

## 【 0 1 6 4 】

反応終了後、各反応部分 ( 8 5 μ l ) が、ワッツマン p 8 1 セルロースホスフェートフィルター上にスポットされ、続いて、0 . 4 % リン酸 5 0 0 m l で4 回 ( 1 回洗浄あたり5 ~ 1 0 分 ) 洗浄し、最後の洗浄は9 5 % エタノール 5 0 0 m l で2 ~ 5 分行った。結合された放射活性は、シンチレーションカウントによって測定される。標識 A T P の特異活性 ( c p m / n m o l ) は、p 8 1 紙上に反応のサンプルをスポットし、洗浄せずにカウントすることによって決められる。P K C 活性ユニットは、分あたりにトランスファーされた n m o l フォスフェートで定義され、下式で計算される。

10

20

30

40

50

【0165】

【数1】

ユニット (nmol/分) あたりの活性

(濾紙上のcpm) × (トータル105 μl / スポット85 μl)

=

(解析時間、分) (ATPの特異的活性cpm/nmol)

10

【0166】

代替アッセイは、Pan Vera (Cat. # P2747) によって販売されているプロテインキナーゼC解析キットを用いて行われる。

【0167】

候補モジュレーターと共に又は伴わずにADPで処理又は処理せずに、GPR86ポリペプチドを発現する細胞からの抽出物上で解析は行われる。コントロール反応は、mockトランスフェクト細胞又はこれらからの抽出物を用いて、いくつかの候補モジュレーターの可能性ある非特異的影響を排除するために行われるべきである。

【0168】

本発明によれば、上記アッセイのいずれかによって測定されるPKCのユニットが、候補モジュレーターで処理されない細胞からの類似サンプル上で行われた反応に対して、候補モジュレーターで処理されたGPR86発現細胞からの抽出物内で、少なくとも10%増加又は減少するとき、PKC活性は、候補モジュレーターによって「変化」させられる。

20

【0169】

f. キナーゼ解析

MAPキナーゼ活性は、商業上入手可能ないくつかのキットのいずれを用いても解析することができる。当該キットとしては、例えば、ニューイングランドバイオラボ社 (Cat # 9820) から販売されているp38MAPキナーゼ解析キット又はパーキン-エルマーライフサイエンス社から販売されているFlashPlate (登録商標) MAPキナーゼ解析が挙げられる。

30

【0170】

候補モジュレーターで処理され、GPR86ポリペプチドを発現する細胞からのサンプルにおいて、候補モジュレーターで処理されていない同様の細胞からのサンプルにおけるMAPキナーゼ活性に対して、活性レベルが10%以上増加又は減少していれば、MAPキナーゼ活性は「変化した」という。

【0171】

既知の合成又は天然チロシンキナーゼ基質及び標識リン酸塩を用いたチロシンキナーゼ活性の直接的解析が、他のタイプのキナーゼについての類似の解析のように (例えばSer/Thrキナーゼ)、よく知られている。キナーゼ活性解析は、ADPを用いて又は用いることなく処理され、候補モジュレーターと共に又は伴わずに、GPR86ポリペプチドを発現する細胞から調製される粗抽出物と精製されたキナーゼとの双方で、行われることができる。いくつかの候補モジュレーターの可能な非特異的効果を排除するために、mock-トランスフェクト細胞又はこれらからの抽出物を用いて、コントロール反応が行われるべきである。基質は、全長タンパク質又は基質となる合成ペプチドのいずれでもよい。Pinnna & Ruzzenne (1996年, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225、これは参考として本明細書に組み入れられる)、キナーゼ活性を検出するのに有用なたくさんのリン酸化基質部位をリストに挙げている。たくさんのキナーゼ基質ペプチドが商業上入手可能である。特に有用なものは、「Scr-関連ペプチド」RRLEDAEYAAARG (シグマ社から# A7433として入手可能) であり、これは、たくさんのレセプター及びノンレセプターチロシンキナーゼに対する基質である。以下に述べる解析は、ペプ

40

50

チド基質のフィルターへの結合を要求し、ペプチド基質は正味陽性に荷電して結合を引きつける。一般に、ペプチド基質は、少なくとも2塩基残基とフリーのアミノ末端を有するべきである。反応は一般に0.7 - 1.5 mMのペプチド濃度を使用する。

#### 【0172】

一般に、5  $\mu$ lの5Xキナーゼバッファー(BSAが5 mg/ml, Tris塩酸150 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub>が100 mM; 解析された正確なキナーゼに依存する、MnCl<sub>2</sub>がMgCl<sub>2</sub>に加えて又は代えて用いられる), 1.0 mMのATPを5  $\mu$ l (最終濃度0.2 mM), <sup>32</sup>P-ATP (100 - 500 cpm/pmol), 10 mMペプチド基質を3  $\mu$ l (最終濃度1.2 mM)、テストされるキナーゼを含む細胞抽出物(キナーゼ解析に用いられる細胞抽出物がホスファターゼ酸阻害剤(例えば0.1 - 1 mMのオルトパナジン酸ナトリウム)を含むべきである)と、H<sub>2</sub>Oを含んで容量25  $\mu$ lとしたものの中で解析が行われる。

10

#### 【0173】

キナーゼ反応が、30秒間から約30分間行われる、続いて氷冷10%トリクロロ酢酸(TCA)を45  $\mu$ l添加した。サンプルは、マイクロ遠心の中で2分間回転させられ、上清35  $\mu$ lがワッツマンp81セルロースリン酸塩フィルターサークル上にスポットされた。このフィルターを500 mlのコールド0.5%リン酸を用いて3回洗浄し、5分間、室温で200 mlのアセトンを用いて1回洗浄した。フィルターが乾燥され、取り込まれた<sup>32</sup>Pがシンチレーションカウントによって測定される。キナーゼ反応の特異的ATP活性(例えばcpm/pmol)が、p81フィルターサークル上での反応の小さなサンプル(2 - 5  $\mu$ l)をスポットすることによって、洗浄することなしに直接カウントされる。キナーゼ反応(マイナスブランク)で得られた分あたりのカウントは、そして、特異的活性によって分割され、反応中にトランスファーされたリン酸塩のモル数を決定する。

20

#### 【0174】

候補モジュレーターで処理されていない同様の細胞からのサンプルにおけるキナーゼ活性に対して、候補モジュレーターで処理され、GPR86ポリペプチドを発現する細胞からのサンプルにおいて、キナーゼ活性のレベルが10%以上増加又は減少したとき、チロシンキナーゼ活性は「変化した」とする。

#### 【0175】

g. ダウンストリーム経路活性化についての転写レポーター  
レセプター、例えばGPR86にアゴニストを結合することによって開始された細胞内シグナルは、細胞内イベントのカスケード運動に向かい、その究極の結果は、1つ以上の遺伝子の転写又は翻訳における迅速で検出可能な変化となる。従ってレセプターの活性は、GPR86活性化に反応するコントロール配列によって駆動されるレポーター遺伝子の発現を検出することによってモニタされることができる。

30

#### 【0176】

ここで用いられている「プロモータ」は、遺伝子発現のレセプター仲介調節に必要な転写コントロール要素をいい、基礎プロモータだけでなく、レセプター調節発現に必要な転写因子結合部位又はいずれかの促進剤も含まれる。アゴニスト結合から生じる細胞内シグナルに反応するプロモータを選択し、転写、翻訳又は最終段階の活性がたやすく検出可能で測定可能なレポーター遺伝子に選択されたプロモータを実施可能に連結することによって、レポーター解析に基づく転写は、与えられたレセプターが活性化されたかどうかの迅速な指標を提供する。

40

#### 【0177】

ルシフェラーゼ、CAT、GFP、 $\beta$ -ラクタマーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼのようなレポーター遺伝子は、これらの産物の検出用解析として、当該分野でよく知られている。

#### 【0178】

レセプター活性のモニタに特に好適な遺伝子は、「早急(immediate early)」遺伝子である。これは、レセプターとエフェクタータンパク質又はリガンドとの間で接触する一般

50

的には分内で迅速に誘導される遺伝子である。早急遺伝子転写の誘導は、新しい調節タンパク質の合成を要求しない。リガンド結合の迅速な応答に加えて、レポータ構成要素をつくるのに有用な好ましい遺伝子の特徴は、次のものを含む：静止の細胞における低い又は検出できない発現；一過的で、新規タンパク質合成に独立している誘導；転写の実質的シャットオフは、新規タンパク質合成を要求する；そしてこれらの遺伝子から翻訳された mRNA は、短い半減期を有している。転写コントロール要素がそれにとって有用であるこれらの全ての特性を有することは好ましいが、必要ではない。

#### 【0179】

たくさんの異なる刺激に応答する遺伝子の例は、c - f o s プロトオンコジーンである。c - f o s 遺伝子は、成長因子、ホルモン、分化特異剤、ストレス、及び細胞表面タンパク質の既知の誘導剤によってタンパク合成独立方式で活性化される。c - f o s 発現の誘導は、特に迅速で、しばしば、レセプター刺激から数分内で起る。この特徴は、レセプター活性化のレセプターとしての使用について特に引きつけられる c - f o s 調節領域を作る。

10

#### 【0180】

c - f o s 調節要素は、転写開始に要求される T A T A ボックス；基礎的転写に必要な 2 つの上流要素と、2 個一組でシメトリーとなっている (dyad symmetry) 要素を含み且つ T P A , 血清, E G F , 及び P M A による誘導のために要求される促進剤を含む (Verma ら, 1987年, Cell 51: 513-514)。

#### 【0181】

c - f o s mRNA キャップ部位から上流の - 3 1 7 b p と - 2 9 8 b p との間に位置する 2 0 b p の c - f o s 転写促進要素が、血清飢餓 N I H 3 T 3 細胞内で血清誘導に本質的である。2 つの上流要素のうち 1 つは、- 6 3 乃至 - 5 7 に位置し、c A M P 制御のための一致配列に似ている。

20

#### 【0182】

転写因子 C R E B (サイクリック A M P 応答要素結合タンパク質) は、名前が意味するように、細胞内 c A M P のレベルに応答する。従って、c A M P レベルのモジュレーション経路でシグナルを送るレセプターの活性化は、転写因子の結合又は C R E B 結合要素 (c A M P 応答要素のことで C R E と記載される) のいずれかを検出することによってモニタされることができる。C R E の D N A 配列は、T G A C G T C A である。C R E B 結合活性に応答するレポータ構成要素は、米国特許 N o . 5 9 1 9 6 4 9 に説明されている。

30

#### 【0183】

他のプロモータと転写コントロール要素は、c - f o s 要素と C R E B 応答構成要素に加えて、血管作動性腸管ペプチド (V I P) 遺伝子プロモータ (c A M P 応答; Fink ら, 1988年, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6662 - 6666); ソマトスタチン遺伝子プロモータ (c A M P 応答; Montminy ら, 1986年, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6682 - 6686); プロエンケファリンプロモータ (c A M P 応答, ニコチンアゴニスト, 及びホルボールエステル; Comb ら, 1986年, Nature, 323: 353 - 356); ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (P E P C K) 遺伝子プロモータ (c A M P 応答; Short ら, 1986年, J. Biol. Chem. 261: 9721 - 9726) を含む。

40

#### 【0184】

G P C R 活性における変化に応答する転写コントロール配列の付加的例えば m A P - 1 転写因子および N F - B 活性に応答するものを含むが、これらに限定されない。共通 A P - 1 結合部位は、パリンδροーム T G A ( C / G ) T C A である (Lee ら, 1987年, Nature 325: 368-372; Lee ら, 1987年, Cell 49: 741 - 752)。A P - 1 部位は、また、ホルボールエステル 1 2 - O - テトラデカノイルボニルホルボール - アセテート (T P A) のような腫瘍プロモータの誘導を仲介に対して応答し、したがって時々、T P A 応答要素については T R E ということもある。A P - 1 は、成長刺激に対する細胞の初期の応答に関係するたくさんの遺伝子を活性化する。A P - 1 応答遺伝子の例は、F o s と J u n (これらはタンパク質自身が A P - 1 活性をつくりあげる), F o s 関連抗原 (F r a ) 1

50

と2, I B, アルニチンデカルボキシラーゼ及びアネキンスI及びIIを含むが、これらに限定されない。

【0185】

NF- $\kappa$ B結合要素は、共通配列GGGGACTTTCをもっている。膨大な数の遺伝子は、NF- $\kappa$ B応答として同定されることができ、これらのコントロール要素は、レポータ遺伝子に連結されて、GPCR活性をモニタすることができる。NF- $\kappa$ Bの応答遺伝子の小さなサンプルは、IL-1をコードするもの(Hiscottら, 1993年, Mol. Cell. Biol. 13: 6231-6240), TNF- $\alpha$  (Shakhovら, 1990年, J. Exp. Med. 171: 35-47), CCR5 (Liuら, 1998年, AIDS Res. Hum. Retroviruses. 14: 1509-1519), P-selectin (Pan&McEver, 1995年, J. Biol. Chem. 270: 23077-23083), Fasリガンド (Matsuiら, 1998年, J. Immunol. 161: 3469-3473), GM-CSF (Schreck&Baeuerle, 1990年, Mol. Cell. Biol. 10: 1281-1286)及びI B (Haskillら, 1991年, Cell 65: 1281-1289)を含む。これらの各参考文献はそれぞれ参考として本明細書に組み入れられる。NF- $\kappa$ B応答レポータをコードするベクターは当該分野でもよく知られており、例えば、合成NF- $\kappa$ B応答要素と最小プロモータを用いて、あるいはNF- $\kappa$ B制御を受けると知られている遺伝子のNF- $\kappa$ B配列を用いて、当業者が容易く作ることができる。さらに、NF- $\kappa$ B応答レポータ構成要素は、例えばCLONTECH社から商業上入手可能である。

10

【0186】

与えられたプロモータ構成要素は、構成要素でトランスフェクトされたGPR86発現細胞を、ADPにさらすことによってテストされるべきである。ADPに反応してレポータの発現が少なくとも2倍増加することは、レポータがGPR86の指示薬となることを示している。

20

【0187】

ADP応答転写レポータ構成要素を用いてGPR86活性を解析するために、安定にGPR86ポリペプチドを発現する細胞が、安定にレポータ構成要素でトランスフェクトされる。アゴニストをスクリーニングするために、細胞は未処理のままおかれて、候補モジュレーターにさらされるか、ADPにさらされて、レポータの発現が測定される。ADP処理された培養は既知のアゴニストによって転写誘導されたレベルの標準として役立つ。候補モジュレーターの存在下でのレポータ発現における少なくとも50%の増加は、その候補がGPR86活性のモジュレーターであることを示す。アゴニストは、少なくとも、ADP単独よりも等量又はそれ以上の量のレポータ発現を誘導する。このアプローチは、ADP又は他のアゴニストの不在下で、レポータの基礎活性を上昇するようなレベルで、細胞がGPR86ポリペプチドを発現するところでは、逆アゴニストのためのスクリーニングに用いられることもできる。候補モジュレーターの存在下、その不在下に対して、10%以上レポータ活性が減少していると、その化合物が逆アゴニストであることを示す。

30

【0188】

アンタゴニストをスクリーニングするために、GPR86発現細胞及びレポータ構成要素の運搬が、候補モジュレーターの存在及び不在下でADP(又は他のアゴニスト)にさらされる。候補モジュレーターの不在下に対して、候補モジュレーターの存在下でのレポータ発現が10%以上減少していると、その候補がGPR86活性のモジュレーターであることを示す。

40

【0189】

転写解析のためのコントロールは、GPR86を発現しないがレポータ構成要素を運ぶ細胞を含み、またプロモータのないレポータ構成要素を有する細胞を含む。GPR86調節型転写のモジュレーターとして同定された化合物が解析され、またこれらの化合物の活性の特異性とスペクトルを決定するために、これらの化合物が他の制御配列及び他のレセプターによって駆動される転写に影響を与えるかどうかを決定すべきである。

【0190】

転写レポータ解析及び殆どの細胞ベース解析は、GPR86活性をモジュレートするもの

50

のためのタンパク質のための発現ライブラリーをスクリーニングするのに好適である。このライブラリーは、例えば植物、動物、バクテリアなどの天然源からのcDNAライブラリーであることができ、あるいはこれらが1つ以上のポリペプチドをランダムに又は系統的に突然変異させた変異体を発現するライブラリーであることもできる。ウィルスベクターのゲノムライブラリーは、また、GPR86のスクリーニングのために用いられた異なるライブラリーの中で、1細胞又は組織のmRNA内容物を発現するのに用いられることができる。

#### 【0191】

h) イノシトールリン酸 (IP) 測定:

本発明の細胞、例えば1321N1細胞は、5% FCS, 抗生物質, アンフォテリシン, 10  
ピルビン酸ナトリウム及びG418を含む400 µg/ml イノシトールフリーのDME  
Mの中で、10 µCi/ml [<sup>3</sup>H] イノシトールで、24時間標識した。細胞は、2時  
間、下記組成のKrebs-Ringer Hepes (KRH) バッファー (NaCl  
が124 mM, KClが5 mM, MgSO<sub>4</sub>が1.25 mM, CaCl<sub>2</sub>が1.45 mM  
, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が1.25 mM, Hepesが25 mM (pH 7.4) 及び8 mM グルコ  
ース) 中で培養された。そして、この細胞は、種々のヌクレオチドを用いて、30秒間チ  
ャレンジされた。培養は、氷冷3%過塩素酸溶液の添加によって停止させられる。IPは  
抽出され、上述(非特許文献25)のDowexカラム上で分離される。2 MeSATP  
とATP溶液(1 mM)は、室温で、20ユニット/ml CPK及び10 mMのCPを用  
いて90分間処理され、汚染とヌクレオチド3リン酸の分解から問題がおこることを回避  
した。 20

#### 【0192】

II GPR86解析

本発明は、サンプル中の本発明のレセプターの活性を検出するための解析を提供する。例  
えば、GPR86活性は、GPR86を発現する細胞又は細胞膜を含むサンプル中で測定  
される。この解析は、ADPの存在又は不在下でサンプルを培養することによって達成さ  
れ、上記のようにセカンドメッセンジャー解析を実行している。ADP存在又は不在下で  
行われたセカンドメッセンジャー解析の結果が比較されて、GPR86レセプターが活性  
であるかどうかを決める。本明細書で定義するように、ADP不在下で行われた解析で検  
出された量に対して、ADP存在下での与えられたセカンドメッセンジャーの検出レベル  
が10%以上増加していることが、GPR86活性の指標となる。 30

#### 【0193】

レセプター活性の解析のいずれも、GPR86レセプター分子の活性に影響を与えるサン  
プル(例えば組織サンプル)内での物質の存在を決めるために用いられる。ここで、レセ  
プター活性の解析には、GTP結合, GTPase, アデニレート, シクラーゼ, cAMP,  
リン脂質分解, ジアシルグリセロール, イノシトール3リン酸, アラキドン酸放出  
(下記参照), PKC, キナーゼ, 及び翻訳レポータ解析を含むが、これらに限定されない  
。レセプター活性の解析を用いると、GPR86ポリペプチドは、サンプルの存在及び不  
在下で、又はサンプル抽出物における活性について、解析される。サンプルの不在下  
に対して、サンプル又は抽出物の存在下におけるGPR86活性が増加していることは、サン  
プルがレセプター活性のアゴニストを含むことを意味している。ADPの存在下または他  
のアゴニストと当該サンプルの存在下でのレセプターの活性が、ADPだけの存在下にお  
けるレセプターの活性に対して減少していれば、サンプルがGPR86活性のアゴニスト  
を含むことを示す。所望であれば、次いでサンプルは分画され、さらにテストされて、ア  
ゴニスト又はアンタゴニストを単離又は精製する。モジュレーターを含むといわれている  
サンプルに必要な測定された活性における増加量又は減少量は、用いられる解析のタイプ  
に依存する。一般にサンプルの不在下で行われた解析に対して10%以上の大きい変化  
(増加又は減少)は、サンプル中にモジュレーターが存在することを示す。1つの例外は、  
モジュレーターが含まれているといわれているサンプルではシグナルの少なくとも2倍の  
増大又は10%減少が必要であるような転写のレポータ解析である。 40

## 【0194】

他の機能的解析は、例えばマイクロフィジオメータ又はバイオセンサー解析 (Hafner, 2000年, Biosens. Bioelectron. 15: 149-158参照、これは参考文献として組み入れられる)。アラキドン酸の細胞内レベルは、Gi j i o nら、2000年, J. Biol. Chem., 275: 20146-20156で説明されるように決定されることもできる。

## 【0195】

従って、サンプルにおけるGPR86活性の検出方法は、GPR86とADPが結合することを許容する条件下でGPR86及びADPを含むサンプルを培養する工程、及びセカンドメッセンジャーを検出する工程を含むことができる。あるいは、この方法は、GPR86とADPが結合することを許容する条件下でADPの不在下でGPR86を含む第2のサンプルを培養する工程、及びセカンドメッセンジャーを検出する工程を、さらに含む。このサンプルは、GPR86を発現する細胞又はGPR86を有している細胞膜を含んでもよい。あるいは、その培養工程は、GPR86ポリペプチドを含む、ウィルス誘導により出芽している膜内又は膜上で行われてもよい。

## 【0196】

I I I GPR86とADPの相互作用に基づく診断解析

GPCRを通じてのシグナリングは、大量の疾患又は疾病の病理に役立つ。GPR86は、白血球細胞と同様にリンパ球系列の細胞、血小板、脾臓内で発現され、免疫プロセス、癌、血栓症、及びこれらの関連疾患又は疾病における役割がある。GPR86発現パターンは、また、脳に含まれ、さらにADPニューロトランスミッターとしての潜在的役割を

## 【0197】

GPR86の発現パターン及びGPCRによって一般に仲介される疾患に関する知識は、細胞移住障害、癌、腫瘍及び腫瘍転移の発達、炎症プロセス、腫瘍性プロセス、損傷治癒、骨治癒、調節性成長機能の調節不良、糖尿病、肥満、食欲不振；大食症、急性心不全、低血圧、高血圧、尿閉；骨粗しょう症；狭心症；心筋梗塞；レステノシス ( r e s e t e n o s i s )、アテローム硬化、血栓症、及び他の心血管病；自己免疫疾患；炎症疾患；過剰な平滑筋細胞増殖により特徴づけられる疾患；動脈瘤；平滑筋細胞の損失又は平滑筋細胞増殖の減少により特徴づけられる疾患；脳卒中；虚血；潰瘍；アレルギー；前立腺肥大；片頭痛；嘔吐；恐怖、精神分裂症、激しい鬱病、鬱病、譫妄、痴呆、いくつかの精神的遅滞等の精神病、神経病；消耗性疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病のような精神性消耗疾患、ハンチントン病又はギルトドラトレット症候群のようなジスキネシア；血栓症及び他の心血管病；自己免疫病及び炎症疾患を含む他の関連病に、GPR86が関連し得ることを提案している。

## 【0198】

GPR86とADPの相互作用は、GPR86シグナリングを含む疾病、疾患又はプロセスを診断又はモニタする解析の基礎として用いられることができる。GPR86関連疾患又は疾病の診断解析には、いくつかの異なる型を有することができる。第1の型では、診断解析は、組織サンプル中のGPR86、遺伝子、mRNA量を測定することができる。GPR86ポリペプチドをコードするmRNAの量を測定する解析は、また、このカテゴリーにあてはまる。第2の型では、解析は、そのレセプター又はリガンドの量を評価することができる。例えば、GPR86又はポリペプチドの突然変異体型又は変異体 ( v a r i a n t ) 型を個体が発現するかどうかを決める解析は、診断的に用いられることができる。第3に、GPR86ポリペプチドの1つ以上の活性を測定する解析が、診断的に用いられることができる。

## 【0199】

A . GPR86量を測定する解析

異常レベルのレセプター又はそのリガンドが、サンプル中に存在するかどうか、そのいずれかがGPR86シグナリングの可能性ある調節不良を示しているかどうかを決めるために、GPR86レベルが測定され、標準と比較される。ポリペプチドレベルが測定され、

10

20

30

40

50

例えば、ポリペプチドに特異的な抗体を用いて、免疫組織化学によって測定される。

GPR86 活性によって特徴付けられた疾患又は疾病で悩んでいると疑いのある個体から単離されたサンプルが、GPR86 の抗体と接触させられ、その抗体の結合はその分野で既知であるとして測定される（例えば、二次抗体に結合した（conjugated）酵素の活性を測定することによって）。

#### 【0200】

GPR86 レベルの測定に対する他のアプローチは、影響された組織からの細胞のフローサイトメトリー解析を用いる。フローサイトメトリー方法は、GPR86 に特異的な抗体の蛍光標識を含めて、この分野でよく知られている。他のアプローチは、放射性免疫測定又は ELISA を含む。これらの各方法は、その分野でよく知られている。

10

#### 【0201】

検出された結合量は、健康な個体又はそんなに影響されていない影響された個体の部位からの類似組織のサンプル中での結合と比較される。標準に対して 10% 以上増加している、GPR86 調節不良によって特徴付けられた疾患又は疾病の徴候であるとする。

#### 【0202】

GPR86 発現は、また、組織サンプル中でポリペプチドをコードする mRNA 量を決定することによって測定されることができる。mRNA レベルは、定量的又は半定量 PCR によって測定される。「定量的」増幅の方法は、当業者によく知られていて、両 GPR86 の増幅のためのプライマー配列が、本明細書に開示されている。定量 PCR の共通の方法は、同じプライマーを用いてコントロール配列の既知量を、同時に共増幅する工程を含む。これは、PCR 反応を計算するのに用いられることができる内部標準を提供する。定量 PCR のための詳細なプロトコルは、「PCR プロトコル、方法と応用のためのガイド」Innisら、アカデミックプレス社、ニューヨーク（1990年）の中で提供され、これは参考として本明細書に組み入れられる。健康な個体からの類似の組織サンプル又は影響された個体の影響されない位置からの組織サンプルにおいて発現される量に対して、サンプルの中で GPR86 をコードする mRNA の量における 10% 以上の増加は、GPR86 シグナリングの調節不良によって特徴づけられた疾患又は疾病の徴候である。

20

#### 【0203】

##### B. 定量解析

GPR86 ポリペプチド又はこれをコードする mRNA が野生型であるかどうかを評価する解析は、診断的に用いられることができる。この様式で GPR86 調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病を診断するために、サンプルから単離された RNA が、GPR86 の PCR 増幅のための鋳型として用いられる。そして、増幅された配列は、標準的方法を用いて直接的に配列化されるか、又は最初にベクターの中にクローン化され、続いて配列決定されるかのいずれかである。野生型 GPR86 の配列に関して 1 つ以上コードされたアミノ酸を変化させる配列の差異は、GPR86 シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の徴候であり得る。コード配列における変化がサンプル内で同定されるとき、変異レセプター又はリガンドを発現させ、その活性を、野生型 GPR86 の活性と比較するのに有用である。他の利益の中で、このアプローチは、構造的に活性で又ルな突然変異体を含む新規突然変異体を提供できる。

30

40

#### 【0204】

標準的な配列決定方法に加えて、増幅された配列は、例えば、野生型と変異配列の間を区別する分子的目印のハイブリダイゼーションを用いて、特異的な突然変異の存在について解析されることができる。1ヌクレオチド程度の小さな変化に基づいて区別するハイブリダイゼーション解析は、当該分野でよく知られている。あるいは多数の「ミニシーケンシング」解析のいずれも行うことができ、例えば米国特許 5888819, 6004744, 6013431（これらは参考として組み入れられる）で説明されているような解析方法も含むことができる。これらの解析及び当該分野で知られた他の方法は、与えられたサンプルにおいて、既知の多型性を伴う核酸の存在を決定することができる。

#### 【0205】

50

所望であれば、アレイ又はマイクロアレイベースの方法は、GPR86配列において、突然変異の発現又は存在を解析するのに用いられることができる。ミニシークエンシング及び核酸発現の定量のためのアレイベースの方法は、当該分野でよく知られている。

#### 【0206】

##### C. 機能的解析

GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の診断は、機能的解析を用いて解析されることもできる。そうすると、細胞膜は又は組織サンプルから調製された細胞抽出物が、本明細書で説明されているように、GPR86の解析に用いられることができる(例えば、リガンド結合解析、GTP結合解析、GTPase解析、アデニレートシクラーゼ解析、cAMP解析、アラキドン酸レベル、リン脂質分解、ジアシルグリセロール、又はイノシトール3リン酸解析、PKC活性解析、又はキナーゼ解析)。検出された活性は、健康な個体又は影響された個体の影響されていない部位から採取した標準的サンプル内の活性と比較される。代替品として、サンプル又はサンプル抽出物が、GPR86を発現する細胞に適用され、続いて標準サンプルに対してGPR86シグナリング活性が測定される。これらの解析のいずれかで測定された10%以上の差異は、GPR86シグナリングの調節不良によって特徴づけられる疾患又は疾病の徴候である。

10

#### 【0207】

##### 本発明による細胞のGPR86活性のモジュレーション

GPR86のリガンドとしてのADPの発見は、細胞内のGPR86の活性をモジュレートする方法を提供する。GPR86活性は、GPR86ポリペプチドの機能をモジュレートする物質をその細胞に配送することによって、細胞内でモジュレートされる。このモジュレーションは、付加的なモジュレーティング物質の同定のための解析の部分としての培養細胞の中、又は例えばヒトを含む動物の中で、行われることができる。物質には、ADP及びここで定義されるようなADPアナログが含まれ、また本明細書で説明されるようなスクリーニング方法を用いて同定された付加的モジュレーターも同様に含み、米国特許5700786に表示されたADPアナログのいずれも含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0208】

物質を培養培地に添加することによって、細胞にその物質を供与することができる。供与量は、物質のアイデンティティ及びそれが供与される目的とともに変わるだろう。例えば、GPR86活性のアンタゴニストを同定する培養解析において、一般に、レセプターを最大の半分を活性化するADP量(例えば約 $EC_{50}$ )で、例えばレセプター飽和に要求される投与量を超えることない量を添加するだろう。この投与量は、ADPの付加量が、GPR86活性に付加的効果をさらに有しない点を決定するADP量を滴定することによって決定されることができる。

30

#### 【0209】

GPR86活性のモジュレーターが疾患又は疾病の治療のための動物に投与されるとき、投与される量は、所望の出力に基づいて、当業者によって調節されることができる。病理学の1つ以上の測定できる様子(例えば、腫瘍細胞の成長、炎症性細胞の蓄積)が、治療前のその様子についての値に対して少なくとも10%変化すれば、治療は成功したことになる。

40

#### 【0210】

##### 本発明に有用な候補モジュレーター

本発明は、本発明のレセプターのモジュレーターである化合物を提供する。

#### 【0211】

候補モジュレーターは、ヌクレオチド又は糖に結合したヌクレオチド(ADPグルコース、又はADPガラクトースを含むがこれらに限定されない)であり得る。候補モジュレーターは、また、UDPグルコースレセプターに結合するどのリガンドとも同様に、当該分野で既知のADPアナログのいずれであってもよい。

#### 【0212】

50

候補化合物は、合成化合物であってもよいし、化合物の混合物であってもよいし、天然産物（例えば、植物抽出物又は培養上清）であってもよい。本発明によれば、候補化合物は、合成されることができる小さな分子、天然抽出物、ペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質などを含む。

【0213】

候補モジュレーターは、例えば、ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP S, Ap<sub>3</sub>A, RB-2, スラミン, 又はPPADSであってもよい。

【0214】

合成又は天然化合物の大きなライブラリーから、候補モジュレーター化合物はスクリーニングされることができる。サッカライド、ペプチド、及び核酸ベース化合物のランダムかつ直接的合成のために、多くの手段が、現在用いられている。合成化合物ライブラリーは、メイブリッジケミカル社（トレビレット、コーンウォール、イギリス）、Comgenex（ニュージャージー州プリンストン）、Brandon Associates（ニューハンプシャー州メリマック）及びマイクロソース（コネチカット州ニューミルフォード）などのたくさんの会社から入手可能である。希少な化学ライブラリーは、アルドリッチ社（ウィスコンシン州、ミルウォーキー）から入手可能である。コンビナトリアルライブラリーは、入手可能で調製可能である。その代わりに、バクテリア、カビ類、植物、及び動物抽出物の形での天然化合物のライブラリーが、例えば、パンラボラトリー（ワシントン州ボスウェル）又はMycosearch（ノースカロライナ州）から入手可能で、あるいは当該分野で知られている方法によって容易く製造されることができる。さらに、天然及び合成的に製造されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的及び生化学的手段を通じて容易くモディファイされる。

【0215】

有用な化合物は、たくさんの化学的クラス内で見出されることができる。有用な化合物は、有機化合物であってもよいし、有機低分子化合物であってもよい。有機低分子化合物は、分子量が50以上であるが、約2500ダルトン未満又は約750ダルトン未満又は約350ダルトン未満である。実施例のクラスは、ヘテロサイクル、ペプチド、サッカライド、ステロイドなどを含む。その化合物は、モディファイされ、効用、安定性、薬剤上の適合性などを促進することができる。物質の構造的同定は、付加的物質を同定し、生成し、スクリーニングするのに用いられることができる。例えば、ペプチド物質が、同定される  
ところでは、これらは、D-アミノ酸、特にD-アラニンのような天然でないアミノ酸を用いるような安定性を促進する種々の方法において、アミノ末端又はカルボキシ末端を機能化することによって、例えばアミノ基についてであればアシル化又はアセチル化、カルボキシル基についてであればエステル化又はアミド化などによって、モディファイされることができる。

【0216】

第1次スクリーニングにとって、本発明の候補化合物の有用な濃度は、約1 μMから約60 μM以上（すなわち100 μM、1 mM、10 mM、100 mM、1 Mなど）である。二次的スクリーニングのために又は濃度曲線を作り出すために、ハーフログ間隔（例えば、9以上の濃度）で第1次スクリーニング濃度を減じることによって添加濃度が決められるところでは、9つの添加濃度にそって、第1次スクリーニング濃度が上限として用いられるだろう。

【0217】

G 16タンパク質

本発明は、GPR86及びADPのようなリガンドの培養がG 16タンパク質の存在下で行われる解析及び方法を提供する。G 16タンパク質は、ホスホリパーゼCへのGPR86レセプターと共役できる。

【0218】

本発明に有用な抗体

本発明は、GPR86に対する抗体を提供する。抗体は、当該分野で知られた標準プロト

コルを用いて作られることができる（例えば、抗体：実験マニュアル、編集Harlow及びLane（コールドスプリングハーバース社：1988年）。マウス、ハムスター、又はウサギのようなほ乳類が、ペプチドの免疫原型（例えばGPR86ポリペプチド又は抗体応答を引出すことができる抗原的フラグメント、又は上記で説明されるような融合タンパク質）で免疫感作されることができる。抗体を生み出す免疫原は、ポリペプチド（例えば単離された組換えペプチド又は合成ペプチド）とアジュバントを混合することによって調製される。あるいは、GPR86ポリペプチド又はペプチドは、より大きな免疫原タンパク質に対する融合タンパク質として作られることができる。ポリペプチドは、また、笠貝ヘモシアニンの鍵穴のような、他のより大きな免疫原タンパク質に共有結合されることができる。あるいは、GPR86ポリペプチドをコードするプラスミド又はウィルスベクター、又はこれらのタンパク質の断片が、Costagliolaら、2000年、J. Clin. Invest. 105: 803 - 811（参考として本明細書に組み入れられる）の中で説明されているように、ポリペプチドを発現するのに用いられ、動物体内で免疫応答を生み出す。抗体を生み出すために、免疫原は、典型的には、ウサギ、ヒツジ、マウスのような実験動物に皮内注射、皮下注射、又は筋肉内注射される。上記で論じた抗体に加えて、遺伝学的に設計された抗体誘導体は、単一鎖抗体のように作られることができる。

10

#### 【0219】

血漿又は血清における抗体滴定の検出によって、免疫感作の発達がモニタされることができる。標準的なELISA、フローサイトメトリー又は他の免疫解析は、抗原として免疫原とともに用いられ抗体のレベルを評価することができる。抗体の調製としては、免疫感作された動物からの単なる血清であってもよく、あるいは所望であれば、例えば、固定化された免疫原を用いたアフィニティクロマトグラフィによって血清から単離されるポリクローナル抗体であってもよい。

20

#### 【0220】

モノクローナル抗体を生産するために、抗体産生脾臓細胞（splenocyte）が免疫感作された動物から獲得され、ミエローマ細胞のような不死化細胞を用いてハイブリドーマ細胞を生じさせる標準的な体細胞融合処理によって融合される。このような技術は、当該分野でよく知られており、例えばハイブリドーマ技術（KohlerとMilstein, 1975年, Nature, 256: 495-497）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbarら, 1983年, Immunology Today, 4: 72）、及びEBVハイブリドーマ技術でヒトモノクローナル抗体を生産する（Coleら, 1985年, モノクローナル抗体とガン治療, Alan R. Liss, Inc. 77-96頁）を含む。ハイブリドーマ細胞は、GPR86ポリペプチドと特異的に反応する抗体及びそのようなハイブリドーマ細胞を含む培養培地から単離されたモノクローナル抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングされることができる。

30

#### 【0221】

##### ハイスループットスクリーニングキット

本発明のハイスループットスクリーニングキットは、ADP存在下、例えば1 nM乃至10  $\mu$ Mの範囲の濃度でのADP存在下で、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、逆アゴニスト、又は本発明のレセプターの阻害剤等のモジュレーター化合物の検出を実行するための必要な手段及び培地のすべてを含む。このキットは、下記の連続的工程を含む。本発明の組換え細胞は、GPR86（P2Y<sub>13</sub>）レセプターをコードするヌクレオチド配列を含み且つ発現し、W000/02045（参考として本明細書に特異的に組み入れられる）に説明されるような当業者によく知られた方法によれば、マイクロタイタープレート、例えば96ウェルマイクロタイタープレートのような固体支持体の上で成長させられる。本発明のモジュレーター化合物は、約1 nMから10  $\mu$ M以上までの濃度で、好適な濃度のADP（例えば1 nM乃至1  $\mu$ Mの範囲で）が存在する決められたウェルの培地に添加される。

40

#### 【0222】

セカンドメッセンジャー解析は、ハイスループットスクリーニング解析に修正可能で、cAMP, 細胞内イノシトールリン酸、細胞内ジアシルグリセロール濃度、アラキドン酸濃

50

度又はMAPキナーゼ又はチロシンキナーゼ活性(上記のように)などの測定を含むが、これらに限定されない。例えば、GPR86活性は、サイクリックAMP解析で測定されるように、先に述べられた(非特許文献26)ように、放射性免疫解析によって定量される。結果は、ADPは存在するが添加されたモジュレーター化合物は不在のときには、本発明の組換え細胞から得られたGPR86活性の基底レベルと比較される。モジュレーターの不在下での活性レベルと比べて、GPR86活性が少なくとも2倍、5倍又は10倍、ほぼ100倍以上の増大又は減少を示すウェルが選ばれて、さらに解析される。

#### 【0223】

本発明の他の有用なキット

本発明は、GPR86活性、GPR86への結合を検出するキット、さらにはGPR86 10  
シグナリングの調節不良によって特徴付けられる疾患又は疾病の診断に有用なキットをモジュレートする物質などのモジュレーターの検出又はスクリーニングに有用なキットを提供する。本発明の有用なキットは、単離されたGPR86ポリペプチド(膜関連又は細胞関連GPR86ポリペプチド、例えば単離膜上、又はGPR86を発現する細胞、又はSPRチップ上)を含むことができる。本発明のキットは、ADPのようなリガンドを含み得る。さらに、キットは、G16ポリペプチドを含む。キットは、GPR86に特異的な抗体も含む。あるいは、又はさらに、キットはGPR86ポリペプチドを発現するようにトランスフォームされた細胞を含むことができる。さらなる態様においては、本発明の 20  
キットは、GPR86ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。なおも更なる態様において、本発明のキットは、下記で説明されるようにGPR86の増幅に有用な特異的プライマーを含むことができる。あるいは、本発明のキットは、GPR86シグナリングを検出するための手段を含む。物質、モジュレーター、特性、又は不調の検出は、GPR86又はGPR86特異的核酸プローブに特異的な抗体を用いて達成されることが 30  
できる。更なる態様において、本発明のキットは、GPR86活性の標準、例えばADPのようなリガンドの存在下でGPR86を発現する細胞系列で測定されるような標準を含むことができる。従って、本発明のキットは全て、述べられた品目又は品目の組み合わせ、及びパッケージ材料を含み得る。キットは、また、使用のための指南書も含み得る。

#### 【0224】

トランスジェニック動物

トランスジェニックマウスは、遺伝的及び発生生物学の研究のための有用なツール、及び新規配列の機能決定のための有用なツールを提供する。従来のトランスジーン過程(transgenesis)の方法によれば、正常又はモデファイされた遺伝子の付加的コピーが、接合体の雄前核の中へインジェクトされ、レシピエントマウスのゲノムDNAの中へ集積されるようになる。トランスジーンは、樹立されたトランスジェニック株において、メンデルの法則にしたがって伝えられる。トランスジェニック動物を作り出すのに有用な構成要素は、正常プロモータ又は誘導プロモータのいずれか一方；組織発現及び調節のパターンに関して解析されるプロモータのコントロール下でのレポート遺伝子；及びドミナント突然変異、突然変異プロモータ及び人工的融合遺伝子を含む構成要素を含み、特異的な発生の結果に関して研究される。典型的には、10kb以下のオーダーのDNAフラグメントが用 40  
いられて、トランスジェニック動物を構成する(Reeves, 1998年, New. Anat., 253: 19)。トランスジェニック動物は、本発明の1つ以上の多型性を含む候補遺伝子を含む構成要素とともに作り出されることができ、あるいは、単一の多型性を含む候補遺伝子を発現するトランスジェニック動物が、異なる多型性を含む候補遺伝子を発現する第2のトランスジェニック動物と交差されることができ、2つの多型性の組合わされた影響は子孫の動物の中で研究される。

#### 【0225】

他のトランスジェニック動物

本発明は、トランスジェニックマウス、ウサギ、ラット、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ヤギなどのトランスジェニック動物を含むが、これらに限定されない。トランスジェニック 50

ブタも生産のためのプロトコルは、WhiteとYannoutsos, *Current Topics in Complement Research*: 64回免疫学フォーラム, 88-94頁; 米国特許No. 5523226; 米国特許No. 5573933: PCT出願WO93/25071; 及びPCT出願WO95/04744の中で見いだせる。トランスジェニックマウス作製のプロトコルは、米国特許No. 5530177の中で見つけ出すことができる。トランスジェニックラットの作製プロトコルは、BaderとGanten, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 追補3: S81 - S87, 1996年の中で見いだすことができる。トランスジェニックウシの生産プロトコルは、トランスジェニック動物技術, ハンドブック, 1994年編集, Carl A. Pinkert, アカデミックプレス社の中で見いだすことができる。トランスジェニックウサギの作製プロトコルは、Hammerら, *Nature*315: 680 - 683, 1985年及びTaylor 10  
及びFan, *Frontiers in Bioscience* 2: d298 - 308, 1997年の中で見いだされる。

#### 【0226】

##### ノックアウト動物

###### i 標準

ノックアウト動物は、相同組換えで遺伝子欠失を作り出す方法によって製造される。この技術は、胎児由来で培養の中で維持され、宿主胚盤胞の中へ導入されるときマウス内のあらゆる組織の分化に参加する能力を有している胚性幹(ES)細胞の発展に基づいている。ノックアウト動物は、ES細胞の特異的標的遺伝子に相同組換えを指向することによって生産され、これによりヌル対立遺伝子を生み出す。このヌル対立遺伝子の考えられる表現型の結果(ヘテロ接合体又はホモ接合体子孫のいずれか)を解析することができる(Reeves, 上記)。 20

#### 【0227】

ii Cre-loxを用いたマウスにおけるインビボ組織特異的ノックアウト標的とされた相同組換えの方法は、バクテリオファージP1部位特異的リコンビナーゼCreに基づく部位特異的組換えシステムの発達によって、改良されてきた。バクテリオファージP1部位からのCre-loxP部位特異的DNAリコンビナーゼが、限定された組織又は分化のステージに制限される遺伝子ノックアウトを作り出すために、トランスジェニックマウス解析で用いられる。領域的に限定された遺伝子の欠失、グローバル遺伝子ノックアウトとは反対に、表現型は部分的細胞/組織に寄与されることができる(Martha, 1996年, *Clin. Invest.* 97: 1999)。あるトランスジェニックマウス株のCre-loxP部位において、loxP部位が興味ある遺伝子の1つ以上のエキソンを側面に配置するように、設計される。「floxed遺伝子」と呼ばれるこのホモ接合体は、細胞/組織タイプ転写プロモータのコントロール下でCre遺伝子を発現する第2のトランスジェニックマウスと交差される。そして、Creタンパク質は、loxP認識配列の間のDNAを切り取り、有効に標的遺伝子機能を除去する(Sauer, 1998年, *Methods*, 14: 381)。今では、この方法のインビボ実施例は、ほ乳類の組織特異的遺伝子の誘導可能な不活性化を含めてたくさんある(Wagnerら, 1997年, *Nucleic Acids Res.*, 25: 4323)。 30

#### 【0228】

iii ノックアウト表現型のBacRescue特定の遺伝的多型性/突然変異は、インビボで機能を変更されたタンパク質の原因となることを明らかにするために、問題の遺伝子の野生型コピーを導入することによって変更されたタンパク質機能を「救い出す」ことができる。トランスジェニックマウスの中で発現されたバクテリアの人工的染色体(BAC)クローンを用いたインビボ相補性が、これらの目的のために用いられることができる。この方法は、マウスのサーカディアンクロック遺伝子の同定に用いられてきた(Antochら, 1997年, *Cell* 89: 655)。 40

#### 【0229】

##### 材料

トリプシンはフローラボラトリーズ(スイス、ビジョー)から得た。培養培地, G418, ウシ胎児血清(FBS), 制限酵素, プラチナPfx, 及びTaqDNAポリメラーゼは、ライフテクノロジー社(ベルギー, メレルベーク)から購入した。放射性産物myo 50

- D - [ 2 - <sup>3</sup> H ] イノシトール ( 17 . 7 C i / m m o l ) はアメルシャム ( ベルギー , ゲント ) から得た。D o w e x A G I X 8 ( ギ酸型 ) は、B i o - R a d ラボラトリー ( カリフォルニア州 , リッチモンド ) から得た。A T P , A D P , アデノシン , A D P S ( アデノシン 5 ' - O - ( 2 - チオジホスフェート ) ) , A 2 P 5 P ( アデノシン 2 ' , 5 ' - ジリン酸 ) , A 3 P 5 P ( アデノシン 3 ' , 5 ' - ジリン酸 ) , A 3 P 5 P S ( アデノシン 3 ' - リン酸 5 ' - ホスホサルフェート ) , U T P , U D P , I T P , I D P , U D P - グルコース及び 3 - イソブチル - 1 - メチル - キサンチン ( I B M X ) がシグマケミカル社 ( ミズーリ州 , セントルイス ) から入手された。2 - メチルチオ - A D P ( 2 M e S A D P ) と 2 - メチルチオ - A T P ( 2 M e S A T P ) が、リサーチバイオケミカルインターナショナル ( マサチューセッツ州 , ナティック ) から得た。フォルスコリンは、カルバイオケム社 ( ベルギー , ベルージュ ) から購入した。ロリプラム ( r o l i p r a m ) は、ラボラトリーズ・ジャックス・ロジェア ( フランス , トラップス ) から授けられた。E r k 1 及び E r k 2 ( <sup>2 0 2</sup> T h y と <sup>2 0 4</sup> T h y ) の二重リン酸化型に特異的なモノクローナル抗体は、ニューイングランドバイオラボ ( マサチューセッツ州 , ベベリー ) から入手した。

#### 【 0 2 3 0 】

##### 投与の量とモード

実施例を経由して、患者は、G P R 8 6 のモジュレーター ( 例えば、本発明のアゴニスト、アンタゴニスト、G P R 8 6 阻害剤 ) の投与によって下記のように治療されることができ。本発明の G P R 8 6 のモジュレーターは、患者に投与され、例えば生物学的に適合する溶液又は薬学的に受け入れられるデリバリー担体、消化により、インジェクション、インハレーション、又は他のいくつかの方法のいずれかによって、投与され得る。投与量は患者ごとにより；「治療学的に有効な投与量」は、例えば、機能の促進レベルによって ( 例えば、本明細書で述べられているセカンドメッセンジャー解析において決められるように ) 決められることができるが、これには限定されない。A D P 結合のモニタは、当業者に投与される量を選択し、調節させるようにすることができるだろう。本発明の G P R 8 6 のモジュレーターの投与量は、毎日、毎週、毎月、毎年又は患者治療によって適当と考えられるように、繰り返されるだろう。

#### 【 0 2 3 1 】

##### 薬剤組成物

本発明は、生理学上適合できるキャリアと添加混合された、本発明の G P R 8 6 モジュレーターを含む組成物を提供する。本明細書で用いられるように、「生理学上、適合できるキャリア」は、生理学上受け入れられる希釈剤をいい、水、リン酸緩衝化生理食塩水、又は生理食塩水などがあり、さらにアジュバントを含んでもよい。不完全なフロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、又はミョウバンのようなアジュバントが、当該分野でよく知られている材料である。

#### 【 0 2 3 2 】

本発明は、薬剤組成物も提供する。活性成分に加えて、これらの薬剤組成物は、薬剤上用いられることが薬剂的に好適に受け入れられるキャリア調製物を含み得る。

#### 【 0 2 3 3 】

経口投与用の薬剤組成物は、経口投与に適切な投与量で当業者によく知られている薬剂的に受け入れられるキャリアを用いて調製されることができ。そのようなキャリアは、患者による摂取のために、この薬剤組成物を、タブレット、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして調製することができる。

#### 【 0 2 3 4 】

経口使用のための薬剤調製は、固体賦形剤、好適な補助剤の添加後、ときには破碎した結果生じる混合物、及び処理による顆粒混合物と活性化化合物との組み合わせを通じて、得られることができ、所望であれば、タブレット又は糖衣錠のコアを得ることができる。好適な賦形剤は、ラクトース、シュクロース、マンニトール、またはソルビトール等の糖類；コーンスターチ、小麦、米、ジャガイモ、又はその他の植物；メチルセルロース、ヒドロキ

10

20

30

40

50

シプロピルメチルセルロース、又はカルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース；アラビアゴム、トラガカントゴム等のゴム；ゼラチン及びコラーゲンのようなタンパク質のような炭水化物又はタンパク質フィラーである。所望であれば、架橋したポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はアルギン酸ナトリウムのようなアルギン酸塩のような分解剤又は溶解剤が添加されてもよい。

【0235】

糖衣錠のコアは、濃縮した糖溶液のような好適なコーティングとともに提供され、この糖溶液には、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポル(carpol)ゲル、ポリエチレングリコール、及び/又は酸化チタン、ラッカー溶液、及び好適な有機溶媒、または溶媒混合物を含んでもよい。染料又は顔料を、タブレット又は産物同定の糖衣錠コーティングに添加してもよく、活性化合物の量、すなわち投与量を特徴づけてもよい。

10

【0236】

経口的に用いられることができる薬剤調製物は、ゼラチンから作られるプッシュフィットカプセルだけでなく、ゼラチンから作られる柔軟でシールされたカプセル及びグリセロール又はソルビトールのようなコーティングも含む。プッシュフィットカプセルは、ラクトース又はスターチのようなフィラー又はバインダー、タルク又はステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、及びときには安定化剤と混合された活性成分を含むことができる。柔らかいカプセルでは、活性な化合物は、脂肪油、液体パラフィン、又は液体ポリエチレングリコールのような好適な液体の中で、安定化剤と共に又は伴わずに、溶解され又は懸濁されてもよい。

20

【0237】

非経口的投与の薬剤組成は、活性化合物の水溶液を含む。注射薬のためには、本発明の薬剤組成物は、水溶液の中で調製され、好ましくはハックス溶液、リングル溶液又は生理学的に緩衝化された生理食塩水のような生理学的に適合する緩衝液の中で調製されることができる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランのような懸濁液の粘度を上昇させる物質を含む。さらに、活性溶媒又は担体の懸濁液は、ゴマ油のような脂肪油、オレイン酸エチルやトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、又はリポゾームを含む。任意には、懸濁液は、好適な安定化剤又はその化合物の溶解度を増加させて高濃度溶液の調製を許容させる物質を含んでもよい。

30

【0238】

鼻への投与のためには、透過される特定バリアにふさわしい浸透剤が組成に用いられる。そのような浸透剤は、一般に当該分野でよく知られている。

【0239】

本発明の薬剤組成物は、当該分野で知られた方式例えば従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、空中浮遊化、エマルジョン化、カプセル化、捕捉、又は親油化プロセスによって作製されることができる。

【0240】

塩として提供されることができる薬剤組成物は、多くの酸とともに形成されることができる。当該酸としては、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などが挙げられるが、これらに限定されない。塩は、フリーの塩基型に該当する他のプロトン溶媒又は水中でより溶解される傾向にある。他の場合には、その調製は、使用前にバッファーと組合わされる4.5乃至5.5のpH領域で、1mM - 50mMヒスチジン、0.1% - 2%スクロース、2% - 7%マンニトール中の親油化された粉末であり得る。

40

【0241】

受け入れられるキャリアにおいて組成された本発明の化合物を含む薬剤組成物が調製された後、これらは、ふさわしい容器に入れられ、投与量、投与回数、及び投与方法などの情報とともに指示された状態の治療のために標識されることができる。

【0242】

本発明は、下記材料及び方法が採用される実施例に限定されることなく、説明される。本

50

明細書で以下に引用される各参考文献の開示全体は、本明細書に参考として組み入れられる。

【実施例】

【0243】

実施例1 クローニングとシーケンシング

ヒトP2Y<sub>12</sub>に強く関係する新規レセプターをコードするイントロンのないコード配列が、3q24領域に位置し、下記特許：WO00/31258 ARENA配列番号18のゲノムクローンRP11-25K24 (GenBank承認番号AC024886)上に同定された。

【0244】

特異的なオリゴヌクレオチドプライマーが、GPR86ヒトレセプターの配列：センスプライマー5'-CCGGAATTCACCATGAACACCCACAGTGATGC-3'とアンチセンスプライマー5'-CTTGTCCTAGATCAGCCCTAAGGTTATGTTGTC-3'に基づいて合成された。ポリメラーゼ鎖反応(PCR)が、プラチナPfxDNAポリメラーゼを用いて3つの異なる脾臓cDNA上で達成された。増幅条件は、次の通りである：94℃, 15秒；50℃, 30秒；68℃, 2分で35サイクル。増幅は、結局、GPR86遺伝子のコード配列全体を含む1キロベースの断片となった。コード配列は、次いでサブクローニングされ、BigDyeターミネータサイクルシーケンシングキットを用いて、3つのcDNAの各々のための両方の鎖上に配列された(アプライドバイオシステムズ社、ウェーリントン、イギリス)。

【0245】

この1002塩基対(bp)-オープンリーディングフレームも、Wittenbergerらによって最近同定され(GenBank承認番号AF295368)、彼らがGPR86(非特許文献24)と呼ぶオーファンGタンパク共役型レセプターをコードすると報告された。開始コドンは、停止コドンより18塩基上流にある。オリゴヌクレオチドプライマーは、このコード配列に基づいて合成された。これらは、脾臓cDNAから開始するPCRの中で用いられた。GPR86コード配列とサイズ競合しているPCR産物は、発現ベクターの中へ挿入され、双方の鎖上で配列された(図1)。推定上の膜上に広がるドメイン(membrane-spanning domain)は、アンダーラインされ、IからVIIの番号が付けられている。プロテインキナーゼA又はプロテインキナーゼCによる推定上のリン酸化部位が、黒丸( )又は黒三角( )によってそれぞれ示されている。ポテンシャルN-グリコシル化部位は、黒四角( )によって示されている。

【0246】

得られた配列は、胎児の脳及び胎盤からのヒトcDNAライブラリーから増幅されたWittenbergerの配列に完全にマッチした。1002塩基対オープンリーディングフレームは、Kozakコンセンサス中のATGコドンから開始され、333アミノ酸のプロテインをコードする。ペプチド配列は、N連結グリコシル化のための3つのポテンシャル部位(細胞外のN末端部分の2つ(N<sup>2</sup>とN<sup>10</sup>)と3番目の細胞外ループ(N<sup>264</sup>)の一つで、プロテインキナーゼCによるリン酸化のための2つのポテンシャル部位(3番目の細胞内ループ(S<sup>217</sup>)とカルボキシ末端部分(T<sup>304</sup>)内の1つ)と、プロテインキナーゼAによる1つの部位(カルボキシ末端部分(T<sup>316</sup>))(図1))を含む。新規なレセプターは、ヒトP2Y<sub>12</sub>及びUDPグルコースレセプターと顕著なホモロジーを表わして(図2)、それぞれ48%及び45%アミノ酸アイデンティティを示す。他のP2Yレセプターとの類似性は、もっと低く(図2)、例えばヒトP2Y<sub>1</sub>及びP2Y<sub>2</sub>レセプターとそれぞれ25%、26%アミノ酸アイデンティティを示す。プリン作動性レセプター(P2Y<sub>1</sub>, -2, -4, -11, -12)、UDPグルコースレセプター及び他のプリン作動性関連配列(GPR17, GPR87, H963)とGPR86(P2Y<sub>13</sub>)のアミノ酸配列が一行になっていることは、ClustalXアルゴリズムを用いて行われた。そして、TreeViewアルゴリズムを用いて、樹状図が構築された(図2)。

10

20

30

40

50

## 【0247】

実施例2 GPR86ヒトレセプターの組織分布

GPR86 mRNAがいくつかのヒト組織中のRT-PCRによって増幅された(図3A)。

逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)実験は、ポリA<sup>+</sup>RNA(クロンテック社)のパネルを用いて実施された。GPR86プライマーは、次の通りである: GPR86センスプライマー(5'-TG TGTCTCTTTCTTCGGTG-3')とGPR86アンチセンスプライマー(5'-CTGCCAAAAGAGAGTTG-3')。増幅されたDNAバンドの予期されたサイズは、575bpである。配列をコードするアルドラーゼに基づいて合成された2つのプライマーが、コントロールとして用いられ、443bpの予期されたサイズを伴う産物を生産する: アルドラーゼセンスプライマー(5'-GGCAAGGGCATCCTGGCTGC-3')とアルドラーゼアンチセンス逆5'-TAACGGGCCAGAACATTTGGCATT-3')。約75ngのポリA<sup>+</sup>RNAが、SuperscriptII(ライフテクノロジーズ社、メレルベーク、ベルギー)を用いて逆転写されて、PCRのために用いられた。PCRは、下記条件下でTaqポリメラーゼを用いて行われた: 94℃で3分間、94℃で1分間、38サイクル、58℃で2分間及び72℃で2分間変性。PCR反応のアリコート(10μl)が、1%アガロースゲル電気泳動によって解析された。

10

## 【0248】

RT-PCR実験は、ポリA<sup>+</sup>RNA(クロンテック社)のパネル及びGPR86配列の特異的プライマーを用いて実施された。増幅されたGPR86とアルドラーゼバンドの予期されたサイズは、それぞれ575bp及び443bpであった。cDNA(-)は、cDNA鋳型なしのPCR反応のネガティブコントロールを示す。PCR反応のアリコート(10μl)は、1%アガロースゲル電気泳動によって解析された。予期されたサイズ(575bp)の強いバンドは、脾臓及び脳(大人)の中で検出され、胎盤、肺、肝臓、骨髄、胸腺、小腸、子宮、胃、精巣、胎児脳及び副腎では、より強度が低いところで検出されたが、膵臓、心臓、腎臓、骨格筋、卵巣、大動脈、またはcDNAなしのネガティブコントロール(図3A)では検出されなかった。575bpバンドも、リンパ節及び骨髄で明確に検出され、末梢血単球(PBMC)で弱く検出された(図3A)。末梢血リンパ球(PBL)と多形核細胞(PMN)の中では、シグナルは検出されなかった(図3A)。

GPR86メッセンジャーは、異なる脳領域(視床、尾状核、黒色物質(substantial nigra)、海馬、小脳、脳梁、及びアミグダラ(図3B)で検出された。配列をコードするアルドラーゼの断片増幅はコントロールとして用いられた。

20

30

## 【0249】

hGPR86を用いるノザンプロット解析では、脾臓中で強い2.9kb転写物を示し、肝臓、胎盤、白血球、及び脳中に弱い転写物を示した。異なる脳領域におけるhGPR86の発現の評価は、黒色物質(substantial nigra)、視床、及び骨髄の中では強いシグナルとして、前頭葉及び側頭葉、硬膜、アミグダラ(amygdala)、尾状核、海馬、骨髄、脳梁では少し強いシグナルとして、小脳及び後頭葉では弱いシグナルとして、2.9kb転写物を示した。この転写物は、大脳皮質の中では検出されなかった。ノザンプロット解析で示されるhGPR86の広範にひろがった発現は、生殖細胞腫瘍、胎児肝臓、胎児脾臓、結腸、妊娠中の子宮、及び多種の硬化症障害として異なった組織由来の、公共のデータベース中でこのGPCRのために見出された16EST配列のオリジンによって、もたらされる。脳及び胎盤cDNAからのhGPR86のPCR増幅は、またこれらの結果(非特許文献24)と調和している。

40

## 【0250】

実施例3 1321N1アストロサイトーマにおける新規レセプターの安定した発現

新規レセプターの完全な配列は、1321N1アストロサイトーマ細胞系列をトランスフェクトするために、発現ベクターの中に導入された。予め、いくつかのP2Yサブタイプ(5, 13, 14)を特徴づけるのに用いた。G<sub>16</sub>タンパクを発現する1321N1

50

アストロサイトーマ細胞は、GPR86プラスミド組換え体又はプラスミド単体を用いてトランスフェクトされた。

【0251】

CHO-K1細胞及び1321N1細胞は、GPR86プラスミド組換え体又はプラスミドのみで、FuGENE<sup>TM</sup>6トランスフェクション試薬（ロシュモレキュラーバイオケミカルズ社）を用いて、トランスフェクトされた。G<sub>16</sub>（ユーロスクリーンより提供）をコードするpERAEQ2プラスミドで予めトランスフェクトされた1321N1細胞に相当するAG32とよばれるクローンがトランスフェクトされた。CHO-K1及び1321N1トランスフェクト細胞は、完全培地（HamのF12培地又はDMEM（ダルベッコの修飾イーグル培地）のそれぞれにおいて、10% FBS、100ユニット/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、及び2.5 µg/mlのアンフォテリシンB）の中で、トランスフェクション2日後、400 µg/mlのG418を用いて選ばれ、同じ培地で保持された。AG32細胞が500 µg/mlゼオシン（zeocin）を添加した同じDMEM完全培地の中で、保持された。

【0252】

G-418抵抗クローンのプールは、上記で説明した方法にしたがって、いくつかのヌクレオチドに応答して機能的IP<sub>3</sub>応答のためにテストされた。この細胞は、種々のヌクレオチド（ATP、ADP、UTP、UDP、ITP、IDP、TDP）100 µM濃度で30秒間刺激された。GPR86レセプターだけを発現する1321N1細胞では、応答は得られなかったが、これらの細胞内でヒスタミンに対する強いIP<sub>3</sub>応答が観察されたが、GPR86レセプター及びG<sub>16</sub>タンパク質の双方を発現する1321N1細胞内では、ADP、UDP及びIDPがIP<sub>3</sub>応答を誘導した。他のヌクレオチドに対しては、ATP及び2MeSATPを除いてIP<sub>3</sub>応答は観察されなかったが、このケースにおけるHPLC精製後にこれらの応答は失われた（データは示さず；しかしながら、実施例7を参照）。野生型発現ベクターを用いてトランスフェクトされた1321N1又は1321N1-G<sub>16</sub>細胞内ではいずれのヌクレオチドに対してもIP<sub>3</sub>応答は観察されず、ネガティブコントロールとして用いられた。

【0253】

GPR86レセプター及びG<sub>16</sub>の双方を発現する1321N1細胞内では、濃度作動カーブがADP、IDP、UDPについて作成され、ADPに対してGPR86の強い親和性を示した。次のような効力範囲が観察された：ADP >>> IDP > UDP。ADPに対するGPR86の親和性は、IDP及びUDPの親和性よりも約1000倍以上大きかった。ADP、2MeSATP及びADP<sub>S</sub>に対して、濃度作動はカーブしている。ADP、2MeSATP及びADP<sub>S</sub>については、それぞれ次の様なEC<sub>50</sub>値が観察された：11.4 ± 2.2 nM、14.2 ± 3.0 nM及び48.4 ± 0.4 nM（3つの独立した実験の平均値 ± S.D.）（図4A）。1321N1トランスフェクト細胞は、ADP、2MeSATP及びADP<sub>S</sub>の種々の濃度存在下で30秒間培養された。データは、3回の各回の実験の中で観察された3つの実験値の平均値 ± S.D.を示している。A2P5P（ADP 2', 5'-ジホスフェート）、A3P5P（アデノシン 3', 5'-ジホスフェート）及びA3P5PS（アデノシン 3'-ホスフェート 5'-ホスホサルフェート）については、IP<sub>3</sub>応答は観察されなかった。

【0254】

2MeSATP及びATPの効果は、それぞれのジホスフェートヌクレオチド（図4B）についてよりも高濃度で得られた（図4B）。1321N1トランスフェクト細胞は、100 ng/mlの百日咳トキシンと共に又は伴わずに、18時間ブレインキュベートされ、次いで、ADP（300 nM）又は水（CONT）の存在下で、30秒間インキュベートされた。そのデータは、2回のうちの1つの代表的実験で観察された3つの実験の平均値 ± S.D.を示す。

【0255】

先に論じたように、市販のヌクレオチド粉末は、分解産物によって、しばしば汚染される

(非特許文献4, 13, 28)。汚染は、通常ATPについて1%、2MeSATPについて10%である(非特許文献28)。2MeSATPとATP溶液(1mM)は、室温で、20ユニット/mlCPK及び10mMのCPとともに、90分間、処理された。このATP再生システムは、ヌクレオチド3リン酸溶液の汚染及び分解からおこる問題を阻止する(非特許文献28)。これらの条件では、ATP及び2MeSATPに対する応答は、廃止された(図4B)。

#### 【0256】

100ng/mlの百日咳トキシン(PTx)でトランスフェクトされた細胞の18時間プレ処理後のADP応答(300nM)の $86 \pm 8\%$ (2つの独立した実験の平均値 $\pm$ 範囲)の阻害が、観察された(図4C)。1321N1トランスフェクト細胞は、18時間100ng/mlの百日咳トキシン(PTx)と共に又は伴わずにプレインキュベートされ、ADP(300nM)の存在下で、又はコントロール培地(CONT)で30秒間、インキュベートされた。そのデータは、2回のうち、各実験で観察された3つの実験値の平均値 $\pm$ S.D.を示す。

10

#### 【0257】

実施例4 CHO-K1細胞の新規レセプターの安定な発現

ヌクレオチドの潜在的効果は、ヒトGPR86レセプターを発現するCHO-K1細胞におけるcAMP経路上でテストされた。cAMPレベルの顕著な阻害は、フォルスコリンの存在下(4 $\mu$ M)で、低濃度のADP(図5A)及び2MeSADPで観察された。CHO-K1トランスフェクト細胞は、種々のADP濃度及び4 $\mu$ Mフォルスコリンの存在下で、10分間、インキュベートされた。そのデータは、3回のうちの1つの代表的実験で得られる3つの実験値の平均 $\pm$ S.D.で表される。ADPのIC<sub>50</sub>は、 $1.5 \pm 0.6$ nM(3つの独立した実験の平均値 $\pm$ S.D.)は、30nMで最大阻害率 $52 \pm 7\%$ (3つの独立した実験の平均値 $\pm$ S.D.)である。第2フェーズは、30nMよりも高い濃度で観察される：減少又は小さく増加したアデニルシクラーゼの阻害は、10 $\mu$ Mで観察された(図5A)。100ng/mlの百日咳毒素でトランスフェクトされたCHO-K1細胞の18時間-前処理後、ADP(10nM及び100 $\mu$ M)がcAMPレベルの顕著な増加を誘導した(図5B)。CHO-K1トランスフェクト細胞は、種々の濃度のADPと4 $\mu$ Mのフォルスコリンの存在下、10分間でインキュベートされた。そのデータは、3回のうちの1回の代表的実験で得られた3つの実験値の平均値 $\pm$ S.D.を表している。CHO-K1トランスフェクト細胞は、100ng/ml百日咳毒素と共に又は伴わずに18時間プレインキュベートされ、次いでADP(100nM及び100 $\mu$ M)又は水(CONT)と4 $\mu$ Mフォルスコリンの存在下で10分間インキュベートされた。そのデータは、2回の実験のうち1回の代表的実験で得られた3つ実験値の平均値 $\pm$ S.D.を示す。アデニルシクラーゼ上でのADPの2局面的(biphasic)効果は、ヒトGPR86レセプターでトランスフェクトされた1321N1細胞内で再生産された。

20

30

#### 【0258】

ヒトGPR86レセプターの刺激におけるMAPキナーゼErk1及びErk2の活性化状態に変化をみるために、CHO-K1トランスフェクト細胞全体の抽出物が、Erkの活性型である二重にリン酸化されたキナーゼ(Tyr<sup>202</sup>及びTyr<sup>204</sup>)用の特異的抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法によって解析された。リン酸化されたErk1及びErk2タンパク質のウエスタンブロット解析。

40

#### 【0259】

GPR86トランスフェクトされたCHO-K1細胞は、 $1.5 \times 10^6$ 個/ディッシュで植え付けられた。24時間後、細胞は、KRHバッファー内で、2時間、血清飢餓状態とされた。アゴニストによる刺激後、細胞は、1mlのPBS pH7.3(137mMのNaCl, 2.7mMのKCl, 4.3mMのNaHPO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O及び1.4mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)内で、かき集められた。細胞は、遠心分離によって回収され、150 $\mu$ lのLaemmliバッファー(10%w/v)グリセロール、5%(v/v) -メルカプ

50

トエタノール、2.3% (w/v) SDS、62.5 mMのTris塩酸 (pH 6.8) 内で消化された。タンパク濃度は、Minamide及びBamburgの方法を用いて決定された (非特許文献27)。各条件について同量のタンパク質は、12%のSDSポリアクリルアミドゲル内で、電気泳動された。タンパク質は、60 V、4 で、一晚、ニトロセルロース膜上で、20 mM Tris、154 mMグリシン、20% (v/v) メタノールをトランスファーバッファとして用いて、トランスファーされた。免疫検出が、高められた化学発光ウエスタンブロッティング検出システム (ECL, アメルシャム・ファルマシア・バイオテック社) を用いて、ピオチン標識二次マウス抗体を用いて (1/25000) 達成された。Erk1及びErk2の二重リン酸化型 ( $\text{Tyr}^{202}$  及び  $\text{Tyr}^{204}$ ) に特異的なモノクローナル抗体が、1/1000希釈で用いられた。

10

## 【0260】

CHO-K1細胞において、リン酸化されたErk1とErk2は、それぞれ、分子量44 kDaと42 kDaと予測された。CHO-K1細胞内で1  $\mu$ MのADP又は2-MeSADPを用いて、ヒトGPR86レセプターの刺激が安定的に発現されて、Erk2の強いリン酸化に導いた (図6A)。GPR86トランスフェクトされたCHO-K1細胞は、異なる時間の間中、種々の濃度のADPと2MeSADP又は水 (CONT) で刺激された。100 ng/mlの百日咳毒素 (PTx) の効果は、1  $\mu$ MのADP又は2-MeSADPの存在下で5分および30分でテストされた。プロテッキング及び免疫検出は、高められたウエスタンブロッティング検出システムを用いて説明されたように達成された (ECL, アメルシャム・ファルマシア・バイオテック社)。

20

## 【0261】

Erk1も弱くリン酸化された。Erkリン酸化は、刺激の1分後検出され、時間とともに増大した (図6A)。最大応答は、ADP又は2MeSADPを用いた刺激の5分後に得られた。そして最大応答後、Erk活性は、1時間後の基礎レベルまでゆっくり減少した。内在レセプターが、CHO-K1細胞内で、ADP又は2-MeSADP依存性Erk活性の原因となるかどうかをきめるために、これらのヌクレオチドが、空のベクターでトランスフェクトされた細胞上でテストされた: Erk1又はErk2リン酸化は、CHO-K1コントロール細胞が5分、20分又は1時間、1  $\mu$ Mのは2-MeSADP又はADPとともにインキュベートされるときには観察されなかった。ADPによって誘導された濃度依存性のErkリン酸化は、一過性応答 (5分) のピークで決められた。ADP又は2-MeSADP (1 nM乃至10  $\mu$ M) によるヒトGPR86レセプターの刺激は、Erk1及びErk2の濃度依存性リン酸化に導いた (図6B)。最大効果は、1  $\mu$ Mで得られるが、顕著な効果は、すでに10 nMで双方のアゴニストに対して観察された。これらの効果におけるGiタンパク質の影響を評価するために、我々は、ADP (1  $\mu$ M) 又は2-MeSADP (1  $\mu$ M) 刺激に先立って、百日咳毒素 (100 ng/mlで18時間) とともに、GPR86-CHO-K1トランスフェクト細胞をプレインキュベートした。ADP又は2-MeSADP (1  $\mu$ M) 処理の5分又は30分によって通常誘導されるErkリン酸化は、強く阻害された (図6B)。

30

## 【0262】

P2Yファミリー、仮にP2Y<sub>13</sub>と呼ばれるファミリーの新規なヒトGタンパク共役型レセプターのクローニングと薬理学的特徴付けは、先に説明されたGPR86オーファンレセプターに該当する (非特許文献24)。その配列に関連して、P2Y<sub>1</sub>乃至P2Y<sub>11</sub>サブタイプとのホモロジーは、約25%に制限される。逆に、GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターは、ヒト (P2Y<sub>12</sub>) 及びUDP-グルコースレセプターとの顕著なホモロジーを示す。最も近いG共役型レセプターは、ヒトP2Y<sub>12</sub>レセプター (48%アミノ酸アイデンティティ) であり、ADPに応答するレセプターでもある。P2Y<sub>2</sub>レセプターを用いた変異誘発実験は、6回目及び7回目の膜貫通ドメインで正に荷電された3つのアミノ酸 ( $\text{His}^{262}$ ,  $\text{Arg}^{265}$ , 及び  $\text{Arg}^{292}$ ) を同定した。これらは (多分、リン酸基の陰性荷電を中和することによって)、ヌクレオチド結合の中できわめて重大な役目を果たす (非特許文献28)。はじめの2残基は、251位及び254位のそ

40

50

れぞれで、GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターの中で保存されている。これらの2残基は、また、P2Y<sub>12</sub> レセプター及びUDP-グルコースレセプターの中でも保存されている。P2Y<sub>2</sub> レセプターのArg<sup>292</sup> 残基は、P2Y<sub>12</sub>, GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) 及びUDPグルコースレセプターの中で陰性荷電されたグルタミン酸残基によって置換されていて、レセプターの薬理学に非常に重要である。

#### 【0263】

P2Y<sub>12</sub> レセプター及びGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターは、このようにしてP2Yレセプターのサブグループを形成し、構造上、他のP2Yレセプターと異なり、それらのリガンドADPに対する高い親和性を分配する。GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターに対するADPのEC<sub>50</sub>の値は、比較できるトランスフェクト細胞系列における他のP2YレセプターのそれぞれのリガンドのEC<sub>50</sub>の値よりも20倍~1000倍低い。薬学的見地から、ADPと2-MeSADPの相対的親和性は、P2Y<sub>12</sub> とGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) サブタイプの間で区別することを許容する。類似の親和性は、GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) について観察される一方、2-MeSADPは、発現系に依存して、P2Y<sub>12</sub> レセプターに対するADPよりも10倍~100倍高い効能を示す(非特許文献21, 22)。

10

#### 【0264】

G<sub>16</sub> のタンパク質の存在は、1321N1細胞におけるホスホリパーゼCに対するGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターと共役するのに必要である。1321N1-G<sub>16</sub> トランスフェクト細胞におけるADPによって誘導されたIP<sub>3</sub> 蓄積における百日咳毒素の強い阻害効果は、G<sub>16</sub> タンパク質とGiタンパク質との間の共同作用を提案する。そのような現象は、HEL細胞内で予め説明され、P2Y<sub>2</sub> アゴニストによるCa<sup>2+</sup> 可動性が、G<sub>16</sub> アンチセンスによって完全に阻害され、百日咳毒素によって部分的に阻害される(非特許文献29)。

20

#### 【0265】

アデニルシクラーゼの阻害とMAPキナーゼ(ERK-1及び2)の刺激は、GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターに関連するとともに双方のGiタンパク質に関連する伝達メカニズムである。アデニルシクラーゼにおけるADPの二局面(biphasic)の効果は、<sub>2</sub> アドレナリンレセプターのような他のレセプターのために観察されたものを思い出させる(非特許文献30, 31)。低濃度のアゴニストで、アデニルシクラーゼの阻害がある一方、より高濃度で増加が観察され、反対の効果を伴う2つのGタンパクに同時におこる共役を提案する。この同時におこる共役(coupling)は、過剰発現(surexpression)の人造物であり得る。

30

#### 【0266】

ヒトGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターの組織分布に関して、よい関係が、現在のRT-PCRデータとWittenbergerら(非特許文献24)によって得られるノザンプロットデータとの間で得られた。ヒトGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターは、特にヒト脾臓及び脳で発現され、脳では、異なる脳領域の大きな発現を表す。P2Y<sub>12</sub> レセプターは、ヒト脳内でも検出され、グリア発現パターンを示す。ADPによるcAMP形成の阻害は、ラットC6グリオーマ細胞(非特許文献32)及びラット脳の毛細管内皮細胞(非特許文献33)の中で説明された。双方のモデルにおいて、2-MeSADPは、ADPよりももっと効力があり、2-MeSATPは2-MeSADPと類似の効力を有した。これらの特徴はGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターよりはむしろP2Y<sub>13</sub> に含まれることを意味する。脾臓、リンパ節及び骨髄におけるGPR86 (P2Y<sub>13</sub>) レセプターの発現は、造血及び免疫系において役割を果たすだろうことを提案している。

40

#### 【0267】

実施例5 トランスジェニック動物の生産

非ヒトトランスジェニック動物の製造方法は、ここで説明される。DNA構成要素は、ほ乳類の生殖系列に導入され、トランスジェニック動物を作り出すことができる。例えば、

50

構成要素の1つ又はいくつかのコピーは、標準的なトランスジェニック技術によってほ乳類の胚のゲノムの中に組み入れられる。

【0268】

実験的態様では、トランスジェニック非ヒト動物は、非ヒト動物の生殖系列の中にトランスジーンを導入することによって製造される。トランスジーンは、種々の進化的段階で胚の標的細胞の中に導入される。異なった方法が胚性標的細胞の発達段階に依存して用いられる。用いられる動物の特異的系列は、可能であれば、一般的に健康優良でよい胚を生み出すことができ、胚の中でよい前核を可視化でき、よい再生産的適合のために選択される。

【0269】

胚の中へのP2Y<sub>13</sub>レセプタータンパク質トランスジーンへの導入は、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、又はリポフェクションのようなその業界で既知の種々の手段のいずれかによって行われる。例えば、P2Y<sub>13</sub>レセプタータンパク質トランスジーンは、受精したほ乳類の卵の前核の中へのマイクロインジェクションによって構成要素をほ乳類の中へ導入し、その構成要素の1つ以上のコピーが発達したほ乳類の細胞の中に保持されるようになる。トランスジーンの下記導入は、受精卵を構成し、その受精卵は、時間の総計を変えるためにインビトロで培養され、または代理宿主または双方の中へ再び移植される。一つの共通の方法は、約1~7日間、インビトロで胚を培養し、そして、その胚を代理宿主の中へ再移植する方法である。

【0270】

トランスジェニック的に操作された胚の子孫は、組織のセグメントのサザンブロット解析によってその構成要素の存在についてテストされる。ゲノム内に安定的に集積された外因性クローン化された構成要素の1つ以上のコピーを有する胚が、トランスジェニック的に導入された構成要素を運ぶ永久的なトランスジェニックほ乳類系列の樹立に用いられる。

【0271】

子孫のゲノムの中へその構成要素を組み入れるための誕生後、トランスジェニック的に変更されたほ乳類のリッターが解析される。このことは、子孫からの染色体的材料上で融合タンパク質又はそのセグメントをコードするDNA配列に該当するプローブをハイブリダイズすることによってなされる。これらのゲノム内での構成要素の少なくとも1つのコピーを含むと見出されたこれらのほ乳類の子孫は、成熟するまで育てられる。トランスジェ

【0272】

トランスジェニックの雌は、既知の解析技術、例えばウエスタンブロットまたは酵素的解析を用いたタンパク質発現についてテストされる。

【0273】

実施例6 GPR86活性

GPR86の活性は、次の方法で検出又は測定されることができる：組換えほ乳類細胞、例えば好適なGPR86(P2Y<sub>13</sub>)発現ベクターで安定的にトランスフェクトされた1321N1アルトロサイトーマ又はCHO-K1細胞は、実施例3及び4で説明されるように、組織培養プレート上にプレートアウトされる。適当な細胞密度、通常50~75%の集密性で、培養培地は、ADPリガンド(例えば、1nM乃至1μMの範囲)を含むKRHバッファー溶液(Krebs-Ringer Hepes: NaClが124mM, KClが5mM, MgSO<sub>4</sub>が1.25mM, CaCl<sub>2</sub>が1.45mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が1.25mM, Hepesが25mM(pH7.4)及び8mMグルコース)と取り替えられ、細胞は37°Cでさらに30秒間培養される。培養後、細胞は洗浄され、溶解された。ADPリガンドの存在又は不在下でのこの細胞内抽出物中でのGPR86活性は、実施例3及び4で説明されるように、cAMP, MAPキナーゼ/ERKリン酸化及びIP<sub>3</sub>のような下流のセカンドメッセンジャーの関連する活性を検出することにより決定される。GPR86活性は、ADPの不在下対存在下での、ERKリン酸化における2倍以上の増加またはcAMPレベルの2倍以上の減少として定義される。活性は、またリガ

10

20

30

40

50

ドADPの至適濃度の存在対不在で、セカンドメッセンジャーレベルにおける2倍以上の変化によっても定義される。

【0274】

実施例7 ATP及び2MeSATPの部分的アゴニスト効果

本発明は、一部分、ADPによるGPR86の活性化、あるいは2MeSADP、ADP S又は米国特許No. 5700786で教示されたADPアナログのいずれかのようなアナログ又は等価分子に関する。従って、2つのADPアナログ、ATP及び2MeSATPは、上述のように、ヒトP2Y13レセプターでトランスフェクトされたAG32細胞でテストされた。AG32細胞は、G16タンパク質でトランスフェクトされた1321N1細胞である。

10

【0275】

AG32細胞が、35mm(直径)ペトリ皿上に播かれ( $2 \times 10^5$ 個/ディッシュ)、5%ウシ胎児血清, 抗生物質, アンホテリシン, ビルビン酸ナトリウム及び400 $\mu$ g/mlのG418を含むイノシトールフリーのDMEMで、5 $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]-myoイノシトールで、24時間標識された。細胞は、Krebs-Ringer Hepses (KRH) バッファー (NaClが124mM, KClが5mM, MgSO<sub>4</sub>が1.25mM, CaCl<sub>2</sub>が1.45mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が1.25mM, Hepsesが25mM (pH7.4) 及びD-グルコース8mM) 内で2時間培養された。そして、細胞は、ADP、ATP又は2MeSATP存在下で30秒間培養された。培養は、1mlの氷冷3%過塩素酸溶液の添加によって停止させた。刺激に先立って、ATPと2MeSATP (1mM溶液) が、90分室温で、20ユニット/mlクレアチンホスホキナーゼ (CPK) 及び10mMクレアチンリン酸 (CP) とともに培養された。反応は、10mMヨードアセトアミドの添加によって停止した。

20

【0276】

クレアチンリン酸及びクレアチンホスホキナーゼでの処理後、ATPと2MeSATPが、ヒトP2Y13レセプターの部分的アゴニストであることが明らかにされた。図8は、ADPアナログ、ATPと2MeSATPによって刺激されたGPR86活性の濃度応答曲線を示す。データは、分あたりの [ $^3$ H] IP<sub>3</sub> カウントに対してプロットされたアゴニスト濃度として示される。ATPと2MeSATPは、GPR86レセプター活性を4.2 $\pm$ 0.8 $\mu$ M及び1.5 $\pm$ 0.2 $\mu$ MのEC<sub>50</sub>でそれぞれ刺激した。このデータは、3回のうち1つの代表的実験において得られる3つの実験値の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

30

【0277】

実施例8 ジアデノシンポリリン酸活性

ADPアナログであるAp3A, Ap4A, Ap5A, 及びAp6Aが、上記のヒトP2Y13レセプターでトランスフェクトされたAG32細胞でテストされた。

【0278】

AG32細胞が、35mm(直径)ペトリ皿上に播かれ( $2 \times 10^5$ 個/ディッシュ)、5%ウシ胎児血清, 抗生物質, アンホテリシン, ビルビン酸ナトリウム及び400 $\mu$ g/mlのG418を含むイノシトールフリーのDMEM内で、5 $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]-myoイノシトールで、24時間標識された。細胞は、Krebs-Ringer Hepses (KRH) バッファー (NaClが124mM, KClが5mM, MgSO<sub>4</sub>が1.25mM, CaCl<sub>2</sub>が1.45mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が1.25mM, Hepsesが25mM (pH7.4) 及びD-グルコース8mM) 内で2時間培養された。そして細胞は、2つの異なる濃度 (100nMと10 $\mu$ M) のADP又はApnA (n=3~6) の存在下で、それぞれ30秒間培養された。この培養は、1mlの氷冷3%過塩素酸溶液の添加によって停止させた。

40

【0279】

培養の30秒後、IP<sub>3</sub> 蓄積におけるAp<sub>3</sub>Aの影響が、 [ $^3$ H] IP<sub>3</sub> の生産によって測定されるように、ADPの影響 (図9) とほぼ等しい。反対に、Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>Aと

50

A p<sub>6</sub> A が不活性である。このデータは、3回のうち代表的な1回の実験において得られる3つの実験値の平均値 ± 標準偏差を示す。

【0280】

実施例9 ポリ〔A〕活性

ポリ〔A〕とポリ〔A〕〔G〕が、上記のようにヒトP2Y<sub>13</sub>レセプターでトランスフェクトされたAG32細胞についてテストされた。本発明者は、これらの化合物は、ヒトP2Y<sub>13</sub>レセプターのターゲットとしてデンドライト細胞のワクチン治療に用いられるだろうと考えた。

【0281】

AG32細胞が、35mm（直径）ペトリ皿上に播かれ（ $2 \times 10^5$  個/ディッシュ）、5%ウシ胎児血清、抗生物質、アンホテリシン、ピルビン酸ナトリウム及び400 µg/mlのG418を含むイノシトールフリーのDMEM内で、5 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-myoイノシトールで、24時間標識された。細胞は、Krebs-Ringer Hepes (KRH) バッファー（NaClが124 mM, KClが5 mM, MgSO<sub>4</sub>が1.25 mM, CaCl<sub>2</sub>が1.45 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が1.25 mM, Hepesが25 mM (pH 7.4) 及びD-グルコース8 mM) 内で2時間培養された。そして、細胞は、ADP（至適刺激の指示薬として）、ポリ〔A〕又はポリ〔A〕〔G〕の存在下で、それぞれ30秒間、培養された。培養は、1mlの氷冷3%過塩素酸溶液の添加によって停止させた。比較の目的のために、細胞培養前に、ポリ〔A〕とポリ〔A〕〔G〕（1 mM 溶液）は、室温で90分間、20ユニット/mlクレアチンホスホキナーゼ（CPK）及び10 mMクレアチンリン酸（CP）とともに培養し、その後、反応を10 mMヨードアセトアミドの添加によって反応を停止した。図10は、ポリ〔A〕及びポリ〔A〕〔G〕を用いたヒトGPR86の活性化についての濃度応答曲線を示す。

【0282】

クレアチンリン酸及びクレアチンホスホキナーゼでの処理後、ポリ〔A〕は、なおも、とはいえ、より低いEC<sub>50</sub>（ $205 \pm 60$  µM）で、GPR86を活性化することができる。しかしながら、ポリ〔A〕〔G〕は、ヒトGPR86（図10に示されたデータ）上で、もはや、活性化しない。ポリ〔A〕とポリ〔A〕〔G〕の濃度は、AMP等価物内で発現された。データは、3回のうち代表的な1回の実験において得られる3つの実験値の平均値 ± 標準偏差を示す。

【0283】

実施例10 リアクティブブルー2、スラミン、PPADS及びMRS-2179のアンタゴニスト活性

アンタゴニストは、ヒトGPR86でトランスフェクトされたAG32細胞についてテストされた。AG32細胞が、35mm（直径）ペトリ皿上に播かれ（ $2 \times 10^5$  細胞/ディッシュ）、5%ウシ胎児血清、抗生物質、アンホテリシン、ピルビン酸ナトリウム及び400 µg/mlのG418を含むイノシトールフリーのDMEMで、5 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-myoイノシトールで、24時間標識された。細胞は、Krebs-Ringer Hepes (KRH) バッファー（NaClが124 mM, KClが5 mM, MgSO<sub>4</sub>が1.25 mM, CaCl<sub>2</sub>が1.45 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が1.25 mM, Hepesが25 mM (pH 7.4) 及びD-グルコース8 mM) 内で2時間培養された。刺激に先立って、細胞は、リアクティブブルー2（RB2）、スラミン、PPADS又はMRS-2179の存在下で10分間、プレ培養された。そして、この細胞は、ADP 100 nMの存在下で、30秒間培養された。培養は、1mlの氷冷3%過塩素酸溶液の添加によって停止させた。図11は、アンタゴニスト化合物の存在下でADPによってGPR86活性についての濃度応答曲線を示す。このデータは、3回のうちの代表的な1回の実験において得られる3つの実験値の平均値 ± S.D. を表す。

【0284】

下記表は、各化合物についてのIC<sub>50</sub>を示している。

ヒトP2Y<sub>13</sub>-AG32細胞におけるアンタゴニストの効力

10

20

30

40

50

値は、3つの独立した実験の平均値 ± S . D . を表す。

【0285】

【表1】

アンタゴニスト	IC <sub>50</sub>
リアクティブブルー2	1.9 ± 0.1 μM
スラミン	2.3 ± 0.4 μM
PPADS	11.7 ± 0.9 μM
MRS-2179	> 100 μM

10

【0286】

実施例11 GPR86活性のモジュレーターのスクリーニング

GPR86の候補モジュレーターは、次のように同定されることができ、実施例6で説明される解析は、GPR86の「モジュレーティング」用の異なる候補化合物のスクリーニングに前提を提供する。このシナリオによれば、GPR86が安定にトランスフェクトされた細胞は、ADPリガンドの好適濃度（例えば1 nM乃至1 μMの範囲）及びアゴニスト、逆アゴニスト、アンタゴニスト、又は他の候補モジュレーター化合物の異なる濃度で（例えば1 nM乃至1 μM以上の範囲）で共培養される。室温での培養後、細胞は洗浄され、溶解された。そして細胞抽出物のアリコートが、（実施例3, 4, 及び6で先に説明したように）セカンドメッセンジャー解析でテストされる。この方式で、GPR86活性上に対するモジュレーター化合物の影響が、ADPリガンド濃度、バッファー組成物、培養時間及び温度の至適テスト条件下で、候補モジュレーター化合物の存在又は不在下で、下流のセカンドメッセンジャーの活性を決めることによって、測定されることができ、この解析は、また、ハイスループットフォーマット（キットの欄で説明されたように）でも行って、種々の濃度でたくさんの候補モジュレーターを同時にテストすることができる。GPR86活性は、至適濃度のADP存在下で、定義された濃度で候補モジュレーター化合物の存在下 vs 不在下でのセカンドメッセンジャーレベルのいかなる変化も検出することによって決定される。

20

30

【0287】

他の態様

他の態様は、当業者に明らかであろう。前述の詳細な説明は、単なる明瞭化や単なる好例を提供することは理解されよう。本発明の特質及び範囲は、上記実施例に限定されず、クレームによって拡張される。

【 1 A 】

1 ATG AAC ACC ACA GTG AAG CAA GGC TTC AAC AGA TCT GAG CGG TGC 45  
 1 M N T T V M Q G F N R S E R C 15  
 46 CCC AGA GAC ACT CGG ATA GTA CAG CTG GTA TTC CCA GCC CTC TAC 90  
 16 P R D T R I V Q L V F P A L Y 30  
 91 ACA GTG GTT TTC ACC GGC ATC CTG CTG AAT ACT TTG GCT CTG 135  
 31 T V V F L T G I L L N T L A L 45  
 136 TGG GTG TTT CAG ATC CCC AGC TCC ACC TTC ACC TTC ATC ATC TAC 180  
 46 W V F V H I P S S S T F I I Y 60  
 181 CTC AAA AAC ACT TTG GAG CCC GAC TTG ATA ATG ACA CTC ATG CTT 225  
 61 L K N T L V A D L I M T L M L 75  
 226 CCT TTC AAA ATC CTC TCT GAC TCA CAC CTG GCA CCC TGG CAG CTC 270  
 76 P F K I L S D S H L A P W Q L 90  
 271 AGA GCT TTT GTG TGT CGT TTT TCT TCG GTG ATA TTT TAT GAG ACC 315  
 91 R A F V C R F S S V I F Y E T 105

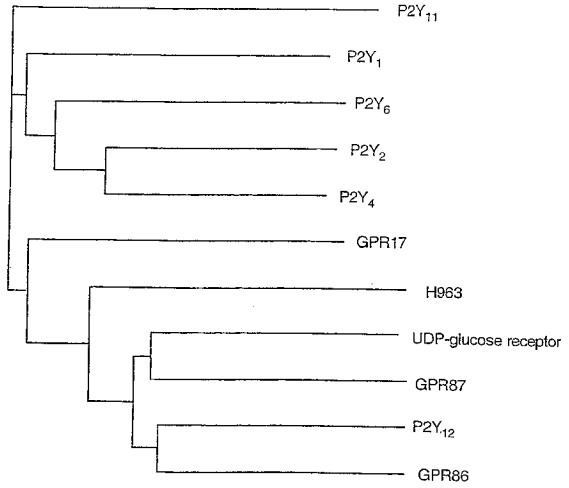
【 1 B 】

316 ATG TAT GTG GGC ATC GTG CTG TTA GGG CTC ATA GCC TTT GAC AGA 360  
 106 M Y V G I V L L G L I A F D R 120  
 361 TTC CTC AAG ATC ATC AGA CCT TTG AGA AAT ATT TTT CTA AAA AAA 405  
 121 F L K I I R P L R N I F L K K 135  
 406 CCT GTT TTT GCA AAA ACG GTC TCA ATC TTC ATC TGG TTC TTT TTG 450  
 136 P V F A K T V S I F I W F F L 150  
 451 TTC ATC TCC CTG CCA AAT ATG ATC TTG AGC AAC AAG GAA GCA 495  
 151 F F I S L P N M I L S N K E A 165  
 496 ACA CCA TCG TCT GTG AAA AAG TGT GCT FCC TTA AAG GGG CCT CTG 540  
 166 T P S S V K K C A S L K G P L 180  
 541 GGG CTG AAA TGG CAT CAA ATG GTA AAT AAC ATA TGC CAG TTT ATT 585  
 181 G L K W H Q M V N N I C Q F I 195  
 586 TTC TGG ACT GTT TTT ATC CTA ATG CTT GTG TTT TAT GTG GTT ATT 630  
 196 F W T V F I L M L V F Y V I 210  
 631 GCA AAA ATA GTA TAT GAT TCT TAT AGA AAG TCC AAA AGT AAG GAC 675  
 211 A K K V Y D S Y R K S K S K D 225

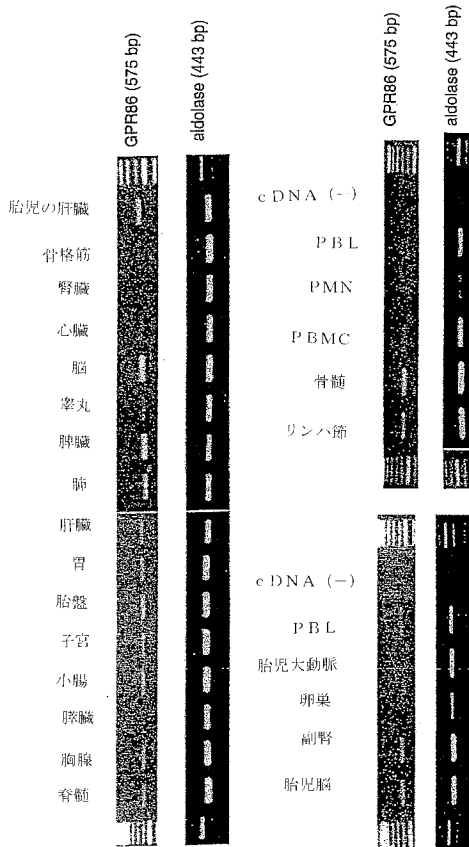
【 2 C 】

676 AGA AAA AAC AAC AAA AAG CTG GAA GGC AAA GTA TTT GTT GTC GTG 720  
 226 R K N N K K L E G K V F V V V 240  
 721 GCT GTC TTC TTT GTG TGT TTT GCT CCA TTT CAT TTT GCC AGA GTT 765  
 241 A V F F V C F A P F H F A R V 255  
 766 CCA TAT ACT CAC AGT CAA ACC AAC AAT AAG ACT GAC TGT AGA CTG 810  
 256 P Y T H S Q T N N K T D C R L 270  
 811 CAA AAT CAA CTG TTT ATT GCT AAA GAA ACA ACT CTC TTT TTG CCA 855  
 271 Q N Q L F I A K E T T L F L A 285  
 856 GCA ACT AAC ATT TGT AAG GAT CCC TTA ATA TAC ATA TTC TTA TGT 900  
 286 A E N I C M D P L I Y I F L C 300  
 901 AAA AAA TTC ACA GAA AAG CTA CCA TGT ATG CAA GGG AGA AAG ACC 945  
 301 K K F T E K L P C M Q G R K T 315  
 946 ACA GCA TCA AGC CAA GAA AAT CAT AGC AGT CAG ACA GAC AAC ATA 990  
 316 T A S S Q E N H S S Q T D N I 330  
 991 ACC TTA GGC TGA 1002  
 331 T L G \* 334

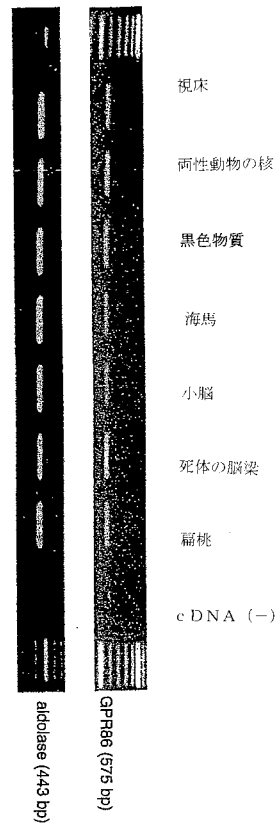
【 2 B 】



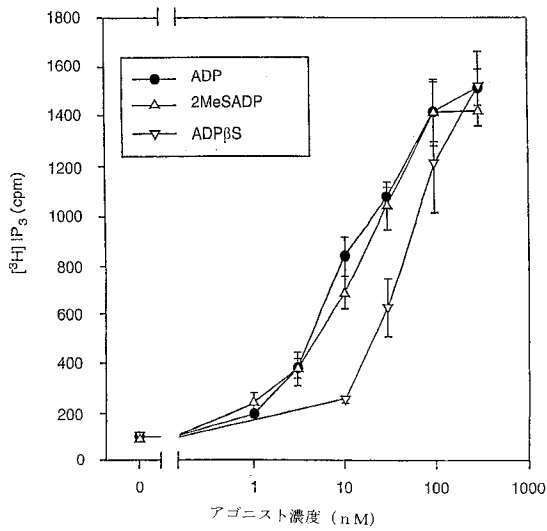
【 図 3 A 】



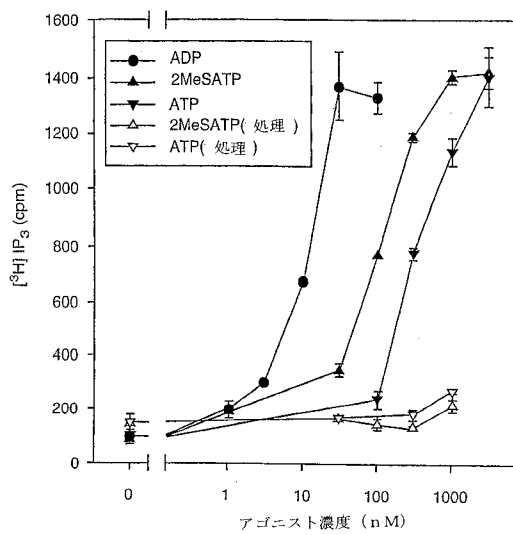
【 図 3 B 】



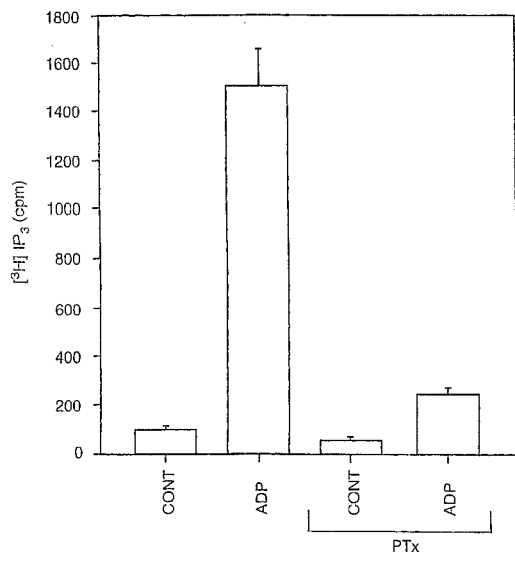
【 図 4 A 】



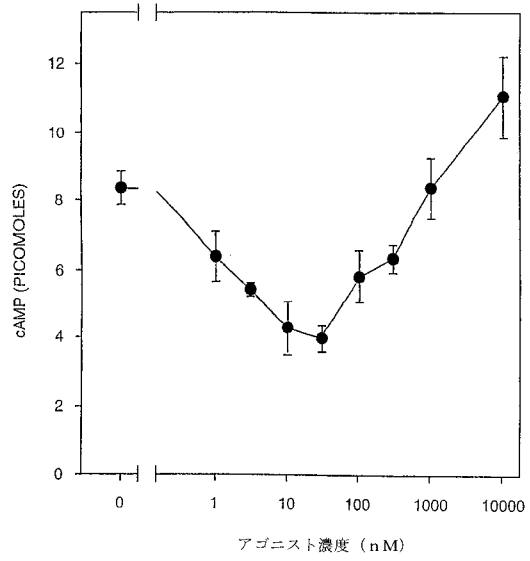
【 図 4 B 】



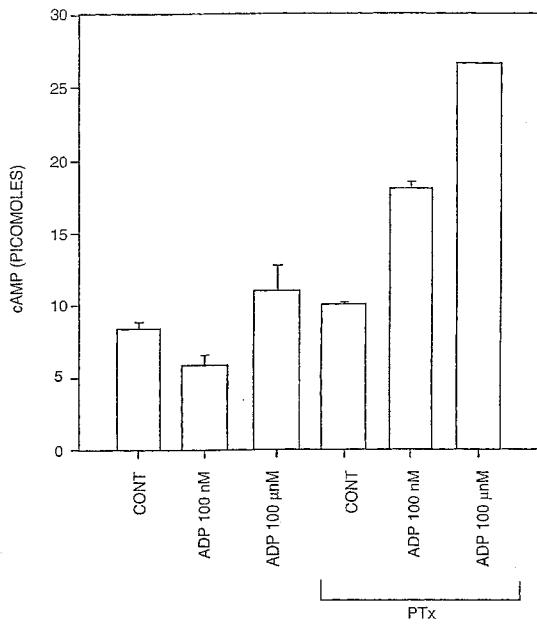
【 図 4 C 】



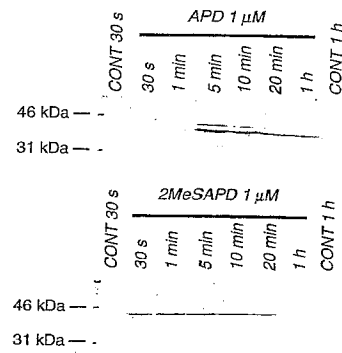
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



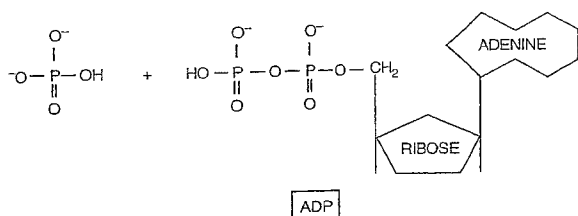
【 図 6 A 】



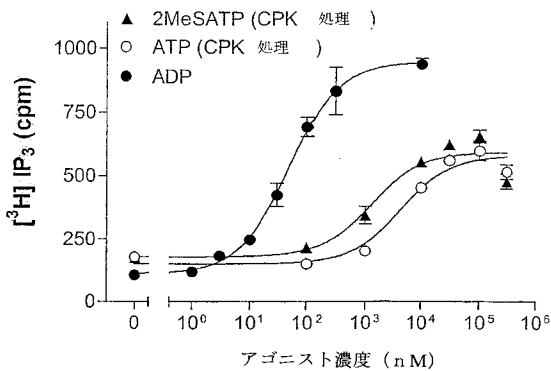
【 図 6 B 】



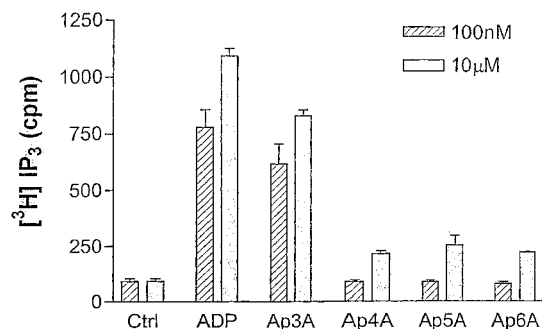
【 図 7 】



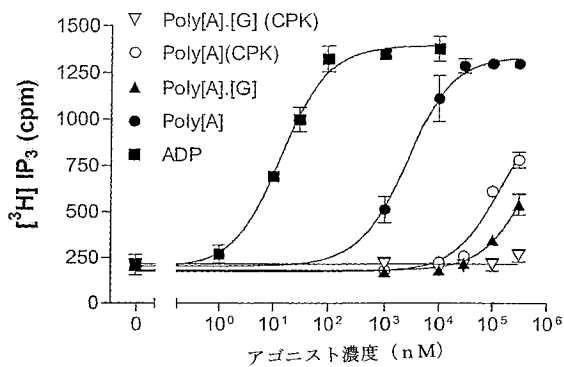
【 図 8 】



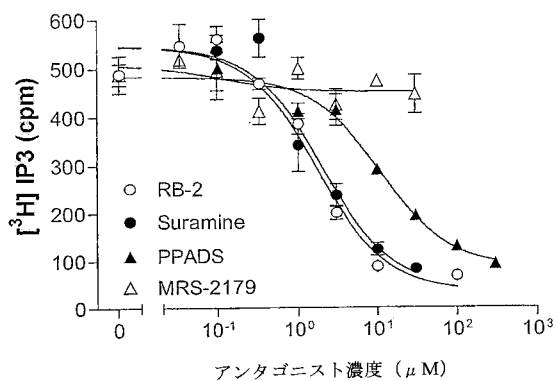
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



## 【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  
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/014731 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/48 (B1). LANNOY, Vincent; Route de Perwez 93, B-5310 Lierne (BE); PARMENTIER, Marc; Arbeidestraat 160, B-1650 Beersel (BE); BOEYNAEMS, Jean-Marie; Avenue Peter Benoît 5, B-1780 Wommel (BE).
- (21) International Application Number: PCT/LP02/08761
- (22) International Filing Date: 6 August 2002 (06.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/924,125 7 August 2001 (07.08.2001) US
- (71) Applicant: EUROSREEN S.A. [BE/BE]; 802 Route de Lennik, Building C, B-1070 Bruxelles (BE).
- (72) Inventors: COMMUNI, Didier; Baron de Vironlaan 34, B-1700 Dilbeek (BE); SUAREZ, Nathalie; Rue Martin Van Lucr 8, B-1070 Bruxelles (BE); DETHIUX, Michel; Chemin de l'Oasis 2b, B-7000 Mons (BE); BREZILLON, Stéphane; Rue de l'Insegnement 56, B-1000 Bruxelles
- (74) Agents: DE CLERCQ, Ann et al.; De Clercq, Brants & Partners, B. Gevaertdreef 10 a, B-Belgium Sint-Martens-Latem (BE).
- (81) Designated States (national): CA, JP.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR).
- 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.



WO 03/014731 A2

(54) Title: THE NATURAL LIGAND FOR ORPHAN G PROTEIN COUPLED RECEPTOR GPR86 AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention is related to the G protein coupled receptor GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) and any homologous sequence thereof, recombinant cells comprising the nucleotide sequence encoding the receptor, and the identification of the natural ligand, ADP, and equivalent molecules to be used in screening assays for identification of agonists, inverse agonists or antagonist compounds useful for the development of new drugs and the improvement of various disease diagnostics. The present invention further relates to the identification of ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADPβS, Ap3A, RB-2, Suramine and PPADS as modulators of GPR86 activity.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

1

THE NATURAL LIGAND FOR ORPHAN G PROTEINCOUPLED RECEPTOR GPR86 AND METHODS OF USEField of the Invention

The present invention is related to the natural ligand for the orphan G protein coupled  
5 receptor GPR86 and methods of use.

Background of the Invention and State of the Art

Adenine and uridine nucleotides induce pharmacological and physiological responses through several G-protein-coupled receptors (P2Y) and ligand-gated cation channels (P2X) (1, 2). The P2Y family encompasses two selective purinoceptors: the human P2Y<sub>1</sub> and  
10 P2Y<sub>11</sub> receptors which are preferentially activated respectively by ADP and ATP (3-5). Nucleotide receptors responsive to both adenine and uracil nucleotides are the P2Y<sub>2</sub> receptor, activated equipotently by ATP and UTP (6, 7) as well as the *Xenopus* P2Y<sub>8</sub> (8) and turkey tp2y receptor (9) activated equally by all triphosphate nucleotides. There are also  
15 pyrimidinoceptors: the chicken P2Y<sub>5</sub> (10) and human P2Y<sub>6</sub> (11-13) receptors activated preferentially by UDP, and the human P2Y<sub>4</sub> receptor (13-15) activated preferentially by UTP. All these P2Y subtypes are coupled to the phosphoinositide pathway. The P2Y<sub>11</sub> and tp2y receptors are additionally coupled respectively to stimulation and inhibition of adenylyl cyclase. Other receptors (P2Y<sub>5</sub> (16), P2Y<sub>7</sub> (17), P2Y<sub>9</sub> and P2Y<sub>10</sub>) have been mistakenly  
20 included in the P2Y family (18-20). Recently, a P2Y<sub>12</sub> subtype has been cloned which corresponds to the platelet ADP receptor previously called P<sub>2T</sub> (21, 22). It is coupled to an inhibition of adenylyl cyclase and is specifically expressed in the platelets and the brain. Its primary structure is not related to the other P2Y receptors but is related to that of the UDP-glucose receptor (23).

More than 300 G protein coupled receptors (GPCRs) have been cloned thus far and it  
25 is generally assumed that well over 1000 such receptors exist. Mechanistically, approximately 30-50% of all clinically relevant drugs act by modulating the functions of various GPCRs (34).

Known and unknown GPCRs now constitute major targets for drug action and development.

CONFIRMATION COPY

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

2

GPR86 is a member of the rhodopsin-like receptor family, cloned in 1997 (24). It shows a homology of 49% with the recently identified platelet ADP receptor, P2T.

The identified ORF of 1002 bp of said receptor is preceded by a stop codon 18 bp upstream, and the putative poly(A) signal AATAAA is present 1672 bp downstream of the coding sequence. hGPR86 has the same genomic localization as hGPR87 on chromosome 3q24, but in contrast to hGPR87, its coding sequence is intronless. The deduced 333 amino acid residue sequence of hGPR86 shows the typical 7 transmembrane (7TM) structure of a GPCR, with no signal peptide. It exhibits essentially the same motifs as described for GPR87 and KIAA0001, and therefore is also a member of family 1 GPCRs. Instead of the DRY motif there is a DRF motif present which is also seen in the sequences of purinergic receptors, the CSA and Bonzo receptors, and the thrombin receptor precursors.

#### Summary of the Invention

The present invention is related to the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor (identified hereafter as SEQ ID NO. 1) (or any homologous sequence) and a recombinant cell (transformed by a suitable vector) comprising the nucleotide sequence encoding the receptor, as well as the natural ligands (ADP and equivalent molecules such as 2MeSADP, ADPβS including any of the ADP analogues presented in US PAT. NO 5,700,786) to be used in screening assays for identification of agonists, inverse agonists or antagonist compounds useful for the development of new drugs and the improvement of various disease diagnostics.

A homologous sequence (which may exist in other mammalian species or specific groups of human populations), where homology indicates sequence identity, means a sequence which presents a high sequence identity (more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 98% sequence identity) with the complete human nucleotide or amino acid sequence described hereafter, and is preferably characterized by the same pharmacology, especially a preference for binding to ADP>>IDP>UDP (the affinity of ADP for GPR86 was approximately 1000-fold greater than that of IDP and UDP (ADP>IDP>UDP)).

The recombinant cell according to the invention is a recombinant cell transformed by a plasmid or viral vector, such as a baculovirus, an adenovirus, a semliki forest virus, and the cell may be selected from the group consisting of bacterial cells, yeast cells, insect cells or mammalian cells.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

3

According to another embodiment of the present invention, the cell is selected from the group consisting of COS-7 cells, a CHO cell, a LM (TK-) cell, a NIH-3T3 cell, HEK-293 cell, K-562 cell or a 1321N1 astrocytoma cell but also other transfectable cell lines. The vector may comprise all the regulatory elements, operatively linked to the polynucleotide sequence encoding the receptor according to the invention so as to permit expression thereof.

As will be obvious to the man skilled in the art, according to another embodiment of the present invention, GPR86 may be present in cell membranes.

Another aspect of the present invention is related to the use of a specific active portion of the sequences. As used herein, an "active portion" refers to a portion of a sequence that is of sufficient size to exhibit normal or near normal pharmacology (e.g., receptor activity (as defined herein), the response to an activator or inhibitor, or ligand binding are at least 90% of the level of activity, response, or binding exhibited by a wild type receptor). "A portion" as it refers to a sequence encoding a receptor, refers to less than 100% of the sequence (i.e., 99, 90, 80, 70, 60, 50% etc.). The active portion could be a receptor which comprises a partial deletion of the complete nucleotide or amino acid sequence and which still maintains the active site(s) and protein domain(s) necessary for the binding of and interaction with a specific ligand, such as ADP.

In another embodiment of any of the methods described herein, the contacting is performed in or on synthetic liposomes (see Tajib Mirzabekov, Harry Kontos, Michael Farzan, Wayne Marasco, Joseph Sodroski (2000) Paramagnetic proteoliposomes containing a pure, native, and oriented seven-transmembrane segment protein, CCR5. *Nature Biotechnology* 18, 649 - 654, which is incorporated herein by reference) or virus-induced budding membranes containing a GPR86 polypeptide (see Patent application WO0102551, Virus-like particles, their Preparation and their Use preferably in Pharmaceutical Screening and Functional Genomics (2001) incorporated herein by references.).

Hence, it will be understood that according to another aspect of the invention, GPR86 may be present in or associated with a cell, such as the cells described above, cell membranes, or in or on virus-induced budding membranes.

As used herein, "ligand" refers to a moiety that is capable of associating or binding to a receptor. According to the method of the invention, a ligand and a receptor have a binding

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

4

constant that is sufficiently strong to allow detection of binding by an assay method that is appropriate for detection of a ligand binding to a receptor (e.g. a second messenger assay to detect an increase or decrease in the production of a second messenger in response to ligand binding to the receptor, a binding assay to measure protein-ligand binding or an immunoassay to measure antibody-antigen interactions). A ligand according to the invention includes the actual molecule that binds a receptor (e.g. ADP is a ligand for GPR86) or a ligand may be any nucleotide, antibody, antigen, enzyme, peptide, polypeptide or nucleic acid capable of binding to the receptor. A ligand may be a nucleotide but can also include a polypeptide, a peptide or a nucleic acid sequence. According to the method of the invention, a ligand and receptor specifically bind to each other (e.g. via covalent or hydrogen bonding or via an interaction between, for example, a protein and a ligand, an antibody and an antigen or protein subunits).

As used herein, "ADP" refers to a nucleotide that is produced by hydrolysis of the terminal phosphate of ATP and has a structure comprising adenine, ribose and two phosphate groups (Figure 7). It is contemplated that analogs of ADP will be considered as ADP equivalents. ADP analogs according to the invention include, but are not limited to, 2MeSADP, ADP $\beta$ S. An ADP analog according to the invention will exhibit the same basic structure as ADP, defined above and presented in Figure 7, as well as one or more different substituent groups including but not limited to any of the ADP analogues presented in US PAT. NO 5,700,786. An ADP analog according to the invention will exhibit binding to GPR86 that is equivalent to ADP.

As used herein, "GPR activity" refers to the activity of a receptor comprising the sequence presented in Figure 1, or a sequence that exhibits at least 70% identity (for example, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% etc.) with the sequence presented in Figure 1. A receptor that has "GPR activity" will bind to ADP with an affinity that is at least 100-fold, or 500-fold or even 1000-fold greater than that of IDP and UDP (ADP>IDP>UDP).

Homologous sequences of a sequence according to the invention may include an amino acid or nucleotide sequence encoding a similar receptor which exists in other mammals, for instance other animal species (rat, mouse, cat, dog, etc.) or in specific human population groups, but which are involved in the same biochemical pathway. Similarly, the present invention contemplates orthologs, which are by definition genes in two different

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

5

species which have evolved from one single gene in their ancient common ancestor. Orthologs are likely to have the same function in both species.

Such homologous sequences may comprise additions, deletions or substitutions of one or more amino acids or nucleotides, which do not substantially alter the functional characteristics of the receptor according to the invention, such as the binding of a ligand to the receptor.

Such homologous sequences can also be nucleotide sequences of more than 400, 600, 800 or 1000 nucleotides able to hybridize to the complete human sequence under stringent hybridisation conditions (such as the ones described by SAMBROOK et al., 1989, Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York).

Another aspect of the present invention is related to a method for the screening, detection and possible recovery of candidate modulators of a receptor of the invention comprising the steps of: contacting a cell expressing GPR86 with ADP under conditions which permit binding of ADP to GPR86, in the presence of the candidate modulator, performing a second messenger assay, and comparing the results of the second messenger assay obtained in the presence and absence of the candidate modulator.

Another aspect of the present invention is related to a method for the screening, detection and possible recovery of candidate modulators of a receptor of the invention comprising the steps of: contacting a cell membrane expressing GPR86 with ADP under conditions which permit binding of ADP to GPR86 performing a second messenger assay, and comparing the results of the second messenger assay obtained in the presence and absence of the candidate modulator.

Another aspect of the invention relates to a method of identifying an agent that modulates the function of GPR86, said method comprising: a) contacting a GPR86 polypeptide with ADP in the presence and absence of a candidate modulator under conditions permitting the binding of ADP to the GPR86 polypeptide; and b) measuring the binding of the GPR86 polypeptide to the candidate modulator, relative to the binding in the absence of the candidate modulator, identifies the candidate modulator as an agent that modulates the function of GPR86.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

6

In another embodiment, a candidate modulator, agent or compound is selected from the group consisting of a natural or synthetic peptide, a polypeptide, an antibody or antigen-binding fragment thereof, a lipid, a carbohydrate, a nucleic acid, and a small organic molecule.

5 In another embodiment, the step of detecting or measuring a signalling activity of the GPR86 polypeptide comprises detecting a change in the level of a second messenger.

A further aspect of the present invention is related to the candidate modulator of GPR86 activity, unknown agonist and/or antagonist compounds obtainable, identified and/or recovered by a method of the invention, as well as to a diagnostic kit comprising said 10 (unknown) compounds or a pharmaceutical composition (including a vaccine) comprising an adequate pharmaceutical carrier and a sufficient amount of said (unknown) compound.

It will be understood that a candidate modulator of GPR86 activity includes, but is not limited to, ATP, 2MeSADP, ADP $\beta$ S, 2MeSATP, Ap3A, RB-2, Suramine or PPADS.

15 An antagonist compound according to the invention means a molecule or a group of molecules able to bind to the receptor according to the invention and block or decrease the binding of natural compounds, such as ADP or an equivalent molecule, for example 2MeSADP, ADP $\beta$ S, ATP, 2MeSATP or Ap3A and including but not limited to any of the ADP analogues presented in US PAT. NO 5,700,786. Antagonist compounds of the present invention include, but are not limited to, RB-2, Suramine or PPADS.

20 The invention further encompasses a method of detecting the presence, in a sample, of an agent that modulates the function of GPR86, the method comprising: a) contacting a GPR86 polypeptide with the sample; b) detecting a signalling activity of the GPR86 polypeptide in the presence of the sample; and c) comparing the activity measured in the presence of the sample to the activity measured in a reaction with GPR86 polypeptide and 25 ADP at EC50, wherein an agent that modulates the function of GPR86 is detected if the amount of the GPR86-specific activity measured in the presence of the sample is at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50% or more of that of the amount induced by ADP present at its EC50.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

7

The invention further encompasses a method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, the method comprising: a) contacting a tissue sample with an antibody specific for a GPR86 polypeptide; b) detecting binding of the antibody to the tissue sample; and c) comparing the binding detected in step (b) with a standard, wherein a difference in binding relative to the standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86.

The invention further encompasses a method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, the method comprising: a) contacting a tissue sample with an antibody specific for a GPR86 ligand; b) detecting binding of the antibody to the tissue sample; and c) comparing the binding detected in step (b) with a standard, wherein a difference in binding relative to the standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86.

The invention further encompasses a method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, the method comprising: a) contacting a tissue sample with an antibody specific for a GPR86 polypeptide and an antibody specific for a GPR86 ligand; b) detecting binding of the antibodies to the tissue sample; and c) comparing the binding detected in step (b) with a standard, wherein a difference in binding of either antibody or both, relative to the standard, is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86.

The invention further encompasses a method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, the method comprising: a) isolating nucleic acid from a tissue sample; b) amplifying a GPR86 polynucleotide, using the nucleic acid as a template; and c) comparing the amount or the sequence of amplified GPR86 polynucleotide produced in step (b) with a standard, wherein a difference in the amount or the sequence of amplified GPR86 polynucleotide relative to the standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86.

The invention further encompasses a method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, the method comprising: a) isolating nucleic acid from a tissue sample; b) amplifying a polynucleotide that encodes a GPR86-specific polypeptide ligand, using the nucleic acid as a template; and c) comparing the

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

8

amount or the sequence of amplified GPR86-specific ligand polynucleotide produced in step (b) with a standard, wherein a difference in the amount or the sequence of amplified GPR86-specific ligand polynucleotide relative to the standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86.

5 In another embodiment, the step of amplifying comprises RT/PCR. In another embodiment, the standard is SEQ ID NO: 1. In another embodiment, the step of comparing the sequence comprises minisequencing. In another embodiment, the step of comparing the sequence or the amount is performed on a microarray.

A further aspect of the present invention is related to a transgenic non-human  
10 mammal, comprising a homologous recombination (knock-out) of the polynucleotide encoding the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor according to the invention or a transgenic non-human mammal over expressing the polypeptide above the natural level of expression. As used herein, "above the natural level of expression" refers to a level that is at least 2-fold, or 5-fold, or 10-fold or even 100-fold or more (i.e., 150-fold, 200-fold, 250-fold, 500-fold, 1000-  
15 fold, 10,000-fold etc.) as compared to the level of expression of the endogenous receptor. A transgenic non-human mammal can be obtained by a method well known by a person skilled in the art, for instance, as described in document WO 98/20112 using the classical technique based upon the transfection of embryonic stem cells, preferably according to the method described by Carmeliet et al. (Nature, Vol.380, p.435-439, 1996).

20 "Gene targeting" is a type of homologous recombination that occurs when a fragment of genomic DNA is introduced into a mammalian cell and that fragment locates and recombines with endogenous homologous sequences as exemplified in U.S. Pat. No. 5,464,764, and U.S. Pat. No: 5,777,195, the contents of which are hereby incorporated by reference herein in their entireties. As used herein the term "transgenic animal" refers to a  
25 non-human animal in which one or more, or essentially all, of the cells of the animal contain a transgene introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques known in the art. The transgene can be introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

9

The transgenic non-human mammal overexpressing the polynucleotide encoding the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor according to the invention comprises the polynucleotide incorporated in a DNA construct with an inducible promoter allowing the overexpression of the receptor and possibly also tissue and cell-specific regulatory elements.

5 Accordingly, another aspect of the present invention relates to a non-human mammal comprising a partial or total deletion of the ortholog sequence of the human polynucleotide (SEQ ID NO.1), such as a non-human mammal comprising a homologous recombinant knockout of said polynucleotide or a transgenic non-human mammal overexpressing above natural level said polynucleotide.

10 Another aspect of the invention relates to an antibody and the various uses thereof, specific for a GPR86 polypeptide, as well as an antibody and the uses thereof specific for a modulator of GPR86 activity.

The diagnostic kit according to the invention includes at least GPR86 receptor and, packaged separately, ADP and also may comprise possibly all the necessary means and  
15 media for performing a detection of specific binding (for example of ADP) to the GPR86 receptor of the invention and possibly correlating the detection of specific binding to a method of monitoring of one or more of the symptoms of the diseases described hereafter. Moreover, the kit according to the invention may further comprise components of a second messenger assay.

20 Possibly, the kit comprises elements for a specific diagnostic or dosage of such bound compounds through high throughput screening techniques, well known to the person skilled in the art, especially the one described in WO 00/02045. The high throughput screening diagnostic dosage and monitoring can be performed by using various solid supports, such as microtiter plates or biochips selected by the person skilled in the art.

25 In another aspect, the present invention relates to the candidate modulator of GPR86 activity as described herein, or the antibody as described herein for use as a pharmaceutical composition or medicament for preventing, treating and/or alleviating diseases or disorders characterized by dysregulation of GPR86 signalling. Also, the present invention relates to the use of the candidate modulator of GPR86 activity as described herein, or the antibody as  
30 described herein for the manufacture of a pharmaceutical composition or medicament for

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

10

preventing, treating and/or alleviating diseases or disorders characterized by dysregulation of GPR86 signalling.

In the pharmaceutical composition according to the invention, the adequate pharmaceutical carrier is a carrier of solid, liquid, or gaseous form, which can be selected by the person skilled in the art according to the type of administration and the possible side effects of the compound according to the invention. The ratio between the pharmaceutical carrier and the specific compound can be selected by the person skilled in the art according to the patient treated, the administration and the possible side effects of the compound, as well as the type of disease or disorder treated or submitted to a specific prevention.

1. The pharmaceutical composition finds advantageous applications in the field of treatment and/or prevention of various diseases or disorders, and possibly selected from the group consisting of osatic hypertrophy, migraine, vomiting, psychotic and neurological disorders, including anxiety, schizophrenia, maniac depression, depression, delirium, dementia and severe mental retardation, degenerative diseases, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, and dyskinesias, such as Huntington's disease or Gilles de la Tourette's syndrome and other related diseases including thrombosis and other cardiovascular diseases, autoimmune and inflammatory diseases.

2. Among the mentioned diseases the applications are, for instance, related to therapeutic agents targeting 7TM receptors that can play a function in preventing, improving or correcting dysfunctions or diseases, including, but not limited to fertility, foetal development, infections such as bacterial, fungal, protozoan and viral infections, including infections caused by HIV1 and HIV2, pain, cancer, anorexia, bulimia, asthma, Parkinson's disease, acute heart failure, hypertension, urinary retention, osteoporosis, angina pectoris, myocardial infarction, ulcers, asthma, allergies, benign prostatic hypertrophy, psychotic and neurological disorders including anxiety, depression, migraine, vomiting, stroke, schizophrenia, manic depression, delirium, dementia, severe mental retardation and dyskinesias, such as Huntington's disease or Gilles de la Tourette's syndrome including thrombosis and other cardiovascular diseases, autoimmune and inflammatory diseases.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

11

Another aspect of the present invention relates to a method for the production of a pharmaceutical composition comprising the steps of admixing the candidate modulator according to present invention or the antibody according to the present invention, with a pharmaceutically carrier.

5 Accordingly, the present invention also relates to a composition comprising the candidate modulator as described herein, such as for instance, ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP $\beta$ S, Ap3A, RB-2, Suramine or PPADS, or the antibody as described herein.

As used herein, an "antagonist" is a ligand which competitively binds to the receptor at the same site as an agonist, but does not activate an intracellular response initiated by an  
10 active form of a receptor, and thereby inhibits the intracellular response induced by an agonist, for example ADP, by at least 10%, or 15-25%, or 25-50% or 50-100%, as compared to the intracellular response in the presence of an agonist and in the absence of an antagonist.

As used herein, an "agonist" refers to a ligand, that activates an intracellular response when it binds to a receptor at concentrations equal or lower to ADP concentrations which  
15 induce an intracellular response. An agonist according to the invention may increase the intracellular response mediated by a receptor by at least 2-fold, or 5-fold, or 10-fold, or 100-fold or more (i.e., 150-fold, 200-fold, 250-fold, 500-fold, 1000-fold, 10,000-fold etc.), as compared to the intracellular response in the absence of agonist. An agonist, according to the invention may decrease internalization of a cell surface receptor such that the cell surface  
20 expression of a receptor is increased by at least 2-fold, or 5-fold, or 10-fold, or 100-fold or more (i.e., 150-fold, 200-fold, 250-fold, 500-fold, 1000-fold, 10,000-fold etc.), as compared to the number of cell surface receptors present on the surface of a cell in the absence of an agonist. In another embodiment of the invention, an agonist stabilizes a cell surface receptor and increases the cell surface expression of a receptor by at least 2-fold, or 5-fold, or 10-fold,  
25 or 100-fold or more (i.e., 200-fold, 250-fold, 500-fold, 1000-fold, 10,000-fold etc.), as compared to the number of cell surface receptors present on the surface of a cell in the absence of agonist.

As used herein, an "inverse agonist" refers to a ligand which decreases a constitutive activity of a cell surface receptor when it binds to a receptor. An inverse agonist according to  
30 the invention may decrease the constitutive intracellular response mediated by a receptor by

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

12

at least 2-fold, or 5-fold, or 10-fold, or 100-fold or more (i.e., 150-fold, 200-fold, 250-fold, 500-fold, 1000-fold, 10,000-fold etc.), as compared to the intracellular response in the absence of inverse agonist.

An "inhibitor" compound according to the invention is a molecule directed against the  
5 receptor or against the natural ligand for the receptor that decreases the binding of the ligand to the receptor by at least 10%, or even 15-25%, or even 25-50% and even 50-100%, in the presence of ADP, as compared to the binding in the presence of ADP and in the absence of inhibitor. An "inhibitor" compound of the invention can decrease the intracellular response induced by an agonist, for example ADP, by at least 10%, or 15-25%, or even 25-50%, or  
10 even 50-100%. An "inhibitor" also refers to a nucleotide sequence encoding an inhibitor compound of the invention.

As used herein, "natural ligand" refers to a naturally occurring ligand, found in nature, which binds to a receptor in a manner that is equivalent to ADP (i.e., with an affinity for the ligand that is greater than the affinity of IDP and UDP (ADP>IDP>UDP). A "natural ligand"  
15 does not refer to an engineered ligand that is not found in nature and that is engineered to bind to a receptor, where it did not formerly do so in a manner different, either in degree or kind, from that which it was engineered to do, it is no longer naturally-occurring but is "non-natural" and is derived from a naturally occurring molecule.

As used herein, a "modulator" and "agent that modulates", which are used  
20 interchangeably herein, refer to any compound that "modulates", i.e. increases or decreases the cell surface expression of a receptor of the invention, increases or decreases the binding of a ligand to a receptor of the invention, or any compound that increases or decreases the intracellular response initiated by an active form of the receptor of the invention, either in the presence or absence or an agonist, and in the presence of a ligand for the receptor, for  
25 example ADP. A modulator includes an agonist, antagonist, inhibitor or inverse agonist, as defined herein. A modulator can be a protein, a nucleic acid, an antibody or fragment thereof, such as an antigen-binding fragment, a protein, a polypeptide, a peptide, a lipid, a carbohydrate, a small inorganic or organic molecule, etc. Candidate modulators can be natural or synthetic compounds, including, for example, small molecules, compounds  
30 contained in extracts of animal, plant, bacterial or fungal cells, as well as conditioned medium from such cells.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

## 13

As used herein, the term "small molecule" refers to a compound having molecular mass of less than 3000 Daltons, or even less than 2000 or 1500, or even less than 1000, and even less than 600 Daltons. A "small organic molecule" is a small molecule that comprises carbon.

- 5 As used herein, the term "change in binding" or "change in activity" and the equivalent terms "difference in binding" or "difference in activity" or difference in the amount of "amplified" PCR product refer to an at least 10% increase or decrease in binding relative to the standard, or signalling activity or mRNA levels relative to the standard in a given assay.
- 10 As used herein, the term "dysregulation" refers to the signalling activity of GPR86 in a sample wherein:
- a) a 10% increase or decrease in the amount of GPR86 or GPR86 polypeptide ligand mRNA or polypeptide levels is measured relative to the standard, as defined herein, of a given assay, or;
- 15 b) at least a single base pair change in the GPR86 or GPR86 polypeptide ligand coding sequence is detected relative to the standard, as defined herein, of a given assay and results in an alteration of GPR signalling activity as defined in paragraphs a), c), or d), or;
- c) a 10% increase or decrease in the amount of GPR86 ligand binding activity is measured relative to the standard, as defined herein, of a given assay, or;
- 20 d) a 10% increase or decrease in secondary messenger assays, as defined herein, is measured relative to the standard, as defined herein, of a given assay.

- As used herein, the term "conditions which permit the binding of ADP to GPR86" refers to conditions of, for example, temperature, salt concentration, pH and protein concentration under which ADP binds GPR86. Exact binding conditions will vary depending
- 25 upon the nature of the assay, for example, whether the assay uses viable cells or only membrane fraction of cells. However, because GPR86 is a cell surface protein favoured conditions will generally include physiological salt (90 mM) and pH (about 7.0 to 8.0). Temperatures for binding can vary from 15°C to 37°C, but will generally be between room temperature and about 30°C. The concentration of ADP and GPR86 polypeptide in a binding

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

14

reaction will also vary, but will preferably be about 0.1 nM (e.g., in a reaction with radio labelled tracer ADP, where the concentration is generally below the  $K_d$ ) to 1  $\mu$ M (e.g., ADP as competitor).

As used herein, the term "sample" refers to the source of molecules being tested for  
5 the presence of an agent or modulator compound that modulates binding to or signalling activity of a GPR86 polypeptide. A sample can be an environmental sample, a natural extract of animal, plant yeast or bacterial cells or tissues, a clinical sample, a synthetic sample, or a conditioned medium from recombinant cells or a fermentation process. The term "tissue sample" refers to a tissue that is tested for the presence, abundance, quality or an activity of a  
10 GPR86 polypeptide, a nucleic acid encoding a GPR86 polypeptide, or an agent or compound that modifies or modulates the ligand binding or activity of a GPR86 polypeptide.

As used herein, a "tissue" is an aggregate of cells that performs a particular function in an organism. The term "tissue" as used herein refers to cellular material from a particular physiological region. The cells in a particular tissue can comprise several different cell types.  
15 A non-limiting example of this would be brain tissue that further comprises neurons and glial cells, as well as capillary endothelial cells and blood cells, all contained in a given tissue section or sample. In addition to solid tissues, the term "tissue" is also intended to encompass non-solid tissues, such as blood.

As used herein, the terms "membrane fraction" and "cell membranes" refer to a  
20 preparation of cellular lipid membranes comprising a GPR86 polypeptide. As the term is used herein, a "membrane fraction" or a "cell membrane" is distinct from a cellular homogenate, in that at least a portion (i.e., at least 10%, or more) of non-membrane-associated cellular constituents has been removed. The term "membrane associated" as well as similar terms such as "membranes bearing" and "present in cell membranes" refer to those  
25 cellular constituents that are either integrated into a lipid membrane or are physically associated with a component that is integrated into a lipid membrane.

As used herein, detecting or measuring a signalling activity can be performed via a "second messenger assay", which comprises the measurement of guanine nucleotide binding or exchange, adenylate cyclase activity, intra-cellular cAMP, intracellular inositol phosphate,  
30 intra-cellular diacylglycerol concentration, arachinoid acid concentration, MAP kinase(s) or

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

15

tyrosine kinase(s) activities, protein kinase C activity, intracellular calcium, diacylglycerol, phosphatidylinositol breakdown, or reporter gene expression or an aequorin-based assay according to methods known in the art and defined herein.

As used herein, the term "second messenger" refers to a molecule, generated or  
5 caused to vary in concentration by the activation of a G-Protein Coupled Receptor (GPCR), that participates in the transduction of a signal from that GPCR. Non-limiting examples of second messengers include cAMP, diacylglycerol, inositol triphosphate, arachidonic acid release, inositol triphosphates and intracellular calcium. The term "change in the level of a second messenger" refers to an increase or decrease of at least 10% in the detected level of a  
10 given second messenger relative to the amount detected in an assay performed in the absence of a candidate modulator.

As used herein, the term "aequorin-based assay" refers to an assay for GPCR activity that measures intracellular calcium flux induced by activated GPCRs, wherein intracellular calcium flux is measured by the luminescence of aequorin expressed in the cell. The  
15 invention relates to the use of a human G protein-coupled receptor, GPR86 (P2Y<sub>13</sub>), as a screening tool to identify agonists or antagonists of the aequorin luminescence resulting from expression of this receptor.

As used herein, the term "binding" refers to the physical association of a ligand (e.g., ADP or an antibody) with a receptor (e.g., GPR86). As the term is used herein, binding is  
20 "specific" if it occurs with an EC<sub>50</sub> or a K<sub>d</sub> of 100 nM or less, generally in the range of 100 nM to 10 pM. For example, binding is specific if the EC<sub>50</sub> or K<sub>d</sub> is 100nM, 50nM, 10 nM, 1 nM, 950 pM, 900 pM, 850 pM, 800 pM, 750 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 550 pM, 500 pM, 450 pM, 400 pM, 350 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 150 pM, 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM or 10 pM or less.

As used herein, the term "EC<sub>50</sub>," refers to that concentration of a compound at which a given activity, including binding of ADP or other ligand and a functional activity of a GPR86 polypeptide, is 50% of the maximum for that GPR86 activity measurable using the same assay in the absence of compound. Stated differently, the "EC<sub>50</sub>" is the concentration  
25 of compound that gives 50% activation, when 100% activation is set at the amount of activity that does not increase with the addition of more agonist. It should be noted that the "EC<sub>50</sub> of  
30

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

16

ADP " will vary according to the identity of the ADP analogue used in the assay; for example, ADP analogues can have EC<sub>50</sub> values higher than, lower than or the same as ADP. Therefore, where an ADP analogue differs from ADP, one of the skill in the art can determine the EC<sub>50</sub> for that analogue according to conventional methods. The EC<sub>50</sub> of a given ADP is measured by performing an assay for the activity of a fixed amount of GPR86 polypeptide in the presence of doses of ADP that increase at least until the GPR86 response is saturated or maximal, and then plotting the measured GPR86 activity versus the concentration of ADP.

As used herein, the term "saturation" refers to the concentration of ADP or other ligand at which further increases in ligand concentration fail to increase the binding of ADP ligand or GPR86-specific signalling activity.

As used herein, the term "IC<sub>50</sub>" is the concentration of an antagonist or inverse agonist that reduces the maximal activation of a GPR86 receptor by 50%.

As used herein, the term "decrease in binding" refers to a decrease of at least 10% in the amount of binding detected in a given assay with a known or suspected modulator of GPR86 relative to binding detected in an assay lacking that known or suspected modulator.

As used herein, the term "delivering," when used in reference to a drug or agent, means the addition of the drug or agent to an assay mixture, or to a cell in culture. The term also refers to the administration of the drug or agent to an animal. Such administration can be, for example, by injection (in a suitable carrier, e.g., sterile saline or water) or by inhalation, or by an oral, transdermal, rectal, vaginal, or other common route of drug administration.

As used herein, the term "standard" refers to a sample taken from an individual who is not affected by a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 activity. The "standard" is used as a reference for the comparison of GPR86 mRNA levels and quality (i.e., mutant vs. wild type), as well as for the comparison of GPR86 activities. For example, the "standard" is the sequence characterized by SEQ ID NO 1.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

17

As used herein, the term "amplifying," when applied to a nucleic acid sequence, refers to a process whereby one or more copies of a nucleic acid sequence is generated from a template nucleic acid. A suitable method of "amplifying" is PCR or RT/PCR.

As used herein, the term "G-Protein coupled receptor," or "GPCR" refers to a  
5 membrane-associated polypeptide with 7 alpha helical transmembrane domains. Functional GPCRs associate with a ligand or agonist and also associate with and activate G-proteins. GPR86 is a GPCR.

As used herein, the term "antibody" is the conventional immunoglobulin molecule, as well as fragments thereof which are also specifically reactive with one of the subject  
10 polypeptides or modulators. Antibodies can be fragmented using conventional techniques and the fragments screened for utility in the same manner as described herein below for whole antibodies. For example, F(ab)<sub>2</sub> fragments can be generated by treating antibody with pepsin. The resulting F(ab)<sub>2</sub> fragment can be treated to reduce disulfide bridges to produce Fab fragments. The antibody of the present invention is further intended to include  
15 bispecific, single-chain, and chimeric and humanised molecules having affinity for a polypeptide conferred by at least one CDR region of the antibody. In other embodiments, the antibody further comprises a label attached thereto and able to be detected, (e.g., the label can be a radioisotope, fluorescent compound, chemiluminescent compound, enzyme, or enzyme co-factor). The antibodies, monoclonal or polyclonal and its hypervariable portion thereof  
20 (FAB, FAB", etc.) as well as the hybridoma cell producing the antibodies are a further aspect of the present invention which find a specific industrial application in the field of diagnostics and monitoring of specific diseases, preferably the ones hereafter described.

Inhibitors according to the invention include but are not limited to labelled monoclonal or polyclonal antibodies or hypervariable portions of the antibodies.

As used herein, the term "transgenic animal" refers to any animal, such as a non-  
25 human mammal, bird, fish or an amphibian, in which one or more of the cells of the animal contain heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic  
30 manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

18

genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. This molecule may be integrated within a chromosome, or it may be extra-chromosomally replicating DNA. In the typical transgenic animals described herein, the transgene causes cells to express a recombinant form of one of the subject polypeptide, e.g. either agonistic or antagonistic forms. However, transgenic animals in which the recombinant gene is silent are also contemplated, as for example, the FLP or CRE recombinase dependent constructs described below. Moreover, "transgenic animal" also includes those recombinant animals in which gene disruption of one or more genes is caused by human intervention, including both recombination and antisense techniques.

#### Brief Description of Figures

Figure 1 represents nucleotide and deduced amino acid sequence of the human GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor according to the invention.

Figure 2 is a dendrogram representing the structural relatedness of the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor with the other P2Y subtypes.

Figure 3 represents tissue distribution of the human GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor.

Figures 4A to 4C represent respectively:

- concentration-action curves of ADP, 2MeSADP and ADP $\beta$ S on IP<sub>3</sub> accumulation in 1321N1-G $\alpha$ 16 cells expressing the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) human receptor;
- agonistic effects of ADP, ATP and 2MeSATP on IP<sub>3</sub> accumulation in 1321N1 cells expressing the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) human receptor together with G $\alpha$ <sub>16</sub>; and;
- the effect of pertussis toxin on IP<sub>3</sub> accumulation induced by ADP on 1321N1 cells expressing the GPR86 human receptor together with G $\alpha$ <sub>16</sub>.

Figures 5A and B represent respectively a concentration-action curve of ADP on cAMP accumulation in CHO-K1 cells expressing the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) human receptor and the effect of pertussis toxin on cAMP accumulation induced by ADP in CHO-K1 cells expressing the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) human receptor according to the invention.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

19

Figure 6 shows a western blot analysis of phosphorylated Erk1 and Erk2 proteins in CHO-K1 cells expressing the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) human receptor according to the invention.

Figure 7 shows the structure of ADP.

Figure 8 shows the concentration-response curve of GPR86 activation by ATP and 2MeSATP.

Figure 9 shows the activation of GPR86 by different diadenosine polyphosphates.

Figure 10 shows the concentration-response curve of GPR86 activation by Poly[A] and Poly[A].[G].

Figure 11 shows the concentration-response curve of GPR86 activation by ADP in the presence of the receptor antagonists RB-2, Suramine, PPADS, MRS-2179.

#### Detailed description of the invention

The invention relates to the discovery that ADP is a natural ligand for the orphan G protein coupled receptor GPR86 and methods of using the binding of this ligand to the receptor in a drug screening method. The known ligand and its interaction with the receptor GPR86 also provides for the diagnosis of conditions involving dysregulated receptor activity. The invention also relates to a kit comprising GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) and homologous sequences, its corresponding polynucleotide and/or recombinant cells expressing the polynucleotide, to identify agonist, antagonist and inverse agonists compounds of the receptor polypeptide and/or its corresponding polynucleotide. Such kits are useful for the diagnosis, prevention and/or a treatment of various diseases and disorders.

The invention also relates to novel agonist, antagonist and inverse agonists compounds of the receptor polypeptide and its corresponding polynucleotide, identified according to the method of the invention.

All references referred to below and above are incorporated herein by reference in their entirety.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

20

### Sequences

The invention relates to the nucleotide and amino acid sequences encoding GPR86 (presented in Figure 1). The invention also relates to orthologs and to sequences that are homologous to the nucleotide and amino acid sequences encoding GPR86.

#### 5 Calculation Of Sequence Homology

Sequence identity with respect to any of the sequences presented herein can be determined by a simple "eyeball" comparison (i.e. a strict comparison) of any one or more of the sequences with another sequence to see if that other sequence has, for example, at least 70% sequence identity to the sequence(s).

- 10 Relative sequence identity can also be determined by commercially available computer programs that can calculate % identity between two or more sequences using any suitable algorithm for determining identity, using for example default parameters. A typical example of such a computer program is CLUSTAL. Other computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include but are not limited to the
- 15 GCG program package (Devereux *et al* 1984 *Nucleic Acids Research* 12: 387) and FASTA (Altschul *et al* 1990 *J Molec Biol* 403-410).

- % homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called
- 20 an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

- Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus
- 25 potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

21

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example, when using the GCG Wisconsin Bestfit package the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Examples of other software that can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (Ausubel *et al.*, 1995, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition, John Wiley & Sons), FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) and the GENWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (Ausubel *et al.*, 1999 *supra*, pages 7-58 to 7-60).

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pair wise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied. It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Advantageously, the BLAST algorithm is employed, with parameters set to default values. The BLAST algorithm is described in detail at:

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

22

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html), which is incorporated herein by reference. The search parameters are defined as follows, and can be advantageously set to the defined default parameters.

Advantageously, "substantial identity" when assessed by BLAST equates to  
5 sequences which match with an EXPECT value of at least about 7, preferably at least about 9 and most preferably 10 or more. The default threshold for EXPECT in BLAST searching is usually 10.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) is the heuristic search algorithm employed by the programs **blastp**, **blastn**, **blastx**, **tblastn**, and **tblastx**; these programs ascribe  
10 significance to their findings using the statistical methods of Karlin and Altschul (Karlin and Altschul 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68; Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-7; see [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)) with a few enhancements. The BLAST programs are tailored for sequence similarity searching, for example to identify homologues to a query sequence. For a discussion of basic issues in  
15 similarity searching of sequence databases, see Altschul *et al* (1994) *Nature Genetics* 6:119-129.

The five BLAST programs available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> perform the following tasks: **blastp** - compares an amino acid query sequence against a protein sequence database; **blastn** - compares a nucleotide query sequence against a nucleotide sequence  
20 database; **blastx** - compares the six-frame conceptual translation products of a nucleotide query sequence (both strands) against a protein sequence database; **tblastn** - compares a protein query sequence against a nucleotide sequence database dynamically translated in all six reading frames (both strands); **tblastx** - compares the six-frame translations of a nucleotide query sequence against the six-frame translations of a nucleotide sequence  
25 database.

BLAST uses the following search parameters:

HISTOGRAM - Display a histogram of scores for each search; default is yes. (See parameter H in the BLAST Manual).

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

23

DESCRIPTIONS - Restricts the number of short descriptions of matching sequences reported to the number specified; default limit is 100 descriptions. (See parameter V in the manual page).

5 EXPECT - The statistical significance threshold for reporting matches against database sequences; the default value is 10, such that 10 matches are expected to be found merely by chance, according to the stochastic model of Karlin and Altschul (1990). If the statistical significance ascribed to a match is greater than the EXPECT threshold, the match will not be reported. Lower EXPECT thresholds are more stringent, leading to fewer chance matches being reported. Fractional values are acceptable. (See parameter E in the BLAST  
10 Manual).

CUTOFF - Cutoff score for reporting high-scoring segment pairs. The default value is calculated from the EXPECT value (see above). HSPs are reported for a database sequence only if the statistical significance ascribed to them is at least as high as would be ascribed to a lone HSP having a score equal to the CUTOFF value. Higher CUTOFF values  
15 are more stringent, leading to fewer chance matches being reported. (See parameter S in the BLAST Manual). Typically, significance thresholds can be more intuitively managed using EXPECT.

ALIGNMENTS - Restricts database sequences to the number specified for which high-scoring segment pairs (HSPs) are reported; the default limit is 50. If more database  
20 sequences than this happen to satisfy the statistical significance threshold for reporting (see EXPECT and CUTOFF below), only the matches ascribed the greatest statistical significance are reported. (See parameter B in the BLAST Manual).

MATRIX - Specify an alternate scoring matrix for BLASTP, BLASTX, TBLASTN and TBLASTX. The default matrix is BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992). The valid  
25 alternative choices include: PAM40, PAM120, PAM250 and IDENTITY. No alternate scoring matrices are available for BLASTN; specifying the MATRIX directive in BLASTN requests returns an error response.

STRAND - Restrict a TBLASTN search to just the top or bottom strand of the database sequences; or restrict a BLASTN, BLASTX or TBLASTX search to just reading  
30 frames on the top or bottom strand of the query sequence.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

24

**5** FILTER - Mask off segments of the query sequence that have low compositional complexity, as determined by the SEG program of Wootton & Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149-163, or segments consisting of short-periodicity internal repeats, as determined by the XNU program of Claverie & States (1993) Computers and Chemistry 17:191-201, or, for BLASTN, by the DUST program of Tatusov and Lipman (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Filtering can eliminate statistically significant but biologically uninteresting reports from the blast output (e.g., hits against common acidic-, basic- or proline-rich regions), leaving the more biologically interesting regions of the query sequence available for specific matching against database sequences.

**10** Low complexity sequence found by a filter program is substituted using the letter "N" in nucleotide sequence (e.g., "NNNNNNNNNNNN") and the letter "X" in protein sequences (e.g., "XXXXXXXXX").

Filtering is only applied to the query sequence (or its translation products), not to database sequences. Default filtering is DUST for BLASTN, SEG for other programs.

**15** It is not unusual for nothing at all to be masked by SEG, XNU, or both, when applied to sequences in SWISS-PROT, so filtering should not be expected to always yield an effect.

Furthermore, in some cases, sequences are masked in their entirety, indicating that the statistical significance of any matches reported against the unfiltered query sequence should be suspect.

**20** NCBI-gi - Causes NCBI gi identifiers to be shown in the output, in addition to the accession and/or locus name.

Most preferably, sequence comparisons are conducted using the simple BLAST search algorithm provided at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. In some embodiments of the present invention, no gap penalties are used when determining sequence identity.

**25** Hybridization

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridizing to the sequences presented herein, or any fragment or derivative thereof, or to the complement of any of the above.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

25

Hybridization means a "process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" (Coombs J (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York NY) as well as the process of amplification as carried out in polymerase chain reaction technologies as described in Dieffenbach CW and GS Dveksler  
5 (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY).

Hybridization conditions are based on the melting temperature ( $T_m$ ) of the nucleic acid binding complex, as taught in Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA), and confer a defined "stringency" as explained below.

10 Nucleotide sequences of the invention capable of selectively hybridizing to the nucleotide sequences presented herein, or to their complement, will be generally at least 70%, or at least 75%, or at least 85 or 90% and even at least 95% or 98% homologous to the corresponding nucleotide sequences presented herein over a region of at least 20, or at least 25 or 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides.

15 The term "selectively hybridizable" means that the nucleotide sequence used as a probe is used under conditions where a target nucleotide sequence of the invention is found to hybridize to the probe at a level significantly above background. The background hybridization may occur because of other nucleotide sequences present, for example, in the cDNA or genomic DNA library being screened. In this event, background implies a level of  
20 signal generated by interaction between the probe and a non-specific DNA member of the library which is less than 10 fold, or even less than 100 fold as intense as the specific interaction observed with the target DNA. The intensity of interaction may be measured, for example, by radio labelling the probe, e.g. with  $^{32}\text{P}$ .

Also included within the scope of the present invention are nucleotide sequences that  
25 are capable of hybridizing to the nucleotide sequences presented herein under conditions of intermediate to maximal stringency. Hybridization conditions are based on the melting temperature ( $T_m$ ) of the nucleic acid binding complex, as taught in Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA), and confer a defined "stringency" as explained below.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

26

Maximum stringency typically occurs at about  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  below the  $T_m$  of the probe); high stringency at about  $5^\circ\text{C}$  to  $10^\circ\text{C}$  below  $T_m$ ; intermediate stringency at about  $10^\circ\text{C}$  to  $20^\circ\text{C}$  below  $T_m$ ; and low stringency at about  $20^\circ\text{C}$  to  $25^\circ\text{C}$  below  $T_m$ . As will be understood by those of skill in the art, maximum stringency hybridization can be used to identify or detect identical nucleotide sequences while an intermediate (or low) stringency hybridization can be used to identify or detect similar or related nucleotide sequences.

In another embodiment, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridize to one or more of the GPCR nucleotide sequences of the present invention under stringent conditions (e.g.  $65^\circ\text{C}$  and  $0.1\times\text{SSC}$  { $1\times\text{SSC} = 0.15\text{ M NaCl}$ ,  $0.015\text{ M Na}_3\text{ Citrate pH}$  7.0}). Where the nucleotide sequence of the invention is double-stranded, both strands of the duplex, either individually or in combination, are encompassed by the present invention. Where the nucleotide sequence is single-stranded, it is to be understood that the complementary sequence of that nucleotide sequence is also included within the scope of the present invention.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridizing to the sequences that are complementary to the sequences presented herein, or any fragment or derivative thereof. Likewise, the present invention encompasses nucleotide sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridizing to the sequence of the present invention. These types of nucleotide sequences are examples of variant nucleotide sequences. In this respect, the term "variant" encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridizing to the nucleotide sequences presented herein. However, the term "variant" encompasses also sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridizing under stringent conditions (e.g.,  $65^\circ\text{C}$  and  $0.1\times\text{SSC}$  { $1\times\text{SSC} = 0.15\text{ M NaCl}$ ,  $0.015\text{ Na}_3\text{ citrate pH } 7.0$ }) to the nucleotide sequences presented herein.

#### Cells

A cell that is useful according to the invention may be selected from the group consisting of bacterial cells, yeast cells, insect cells or mammal cells.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

27

A cell that is useful according to the invention can be any cell into which a nucleic acid sequence encoding a receptor according to the invention can be introduced or is present such that the receptor is expressed at natural levels or above natural levels, as defined herein. A receptor of the invention that is expressed in a cell may exhibit normal or near normal pharmacology, as defined herein. A receptor of the invention that is expressed in a cell may comprise the nucleotide or amino acid sequence presented in Figure 1 or a nucleotide or amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence presented in Figure 1. A receptor of the invention that is expressed in a cell may bind ADP with an affinity that is at least 100-fold, or 500-fold, or even 1000-fold greater than the affinity for IDP and UDP.

According to another embodiment of the present invention, a cell is selected from the group consisting of COS7-cells, a CHO cell, a LM (TK-) cell, a NIH-3T3 cell, HEK-293 cell, K-562 cell or a 1321N1 astrocytoma cell but also other transfectable cell lines. It will be evident that the cell membranes of the present invention may be derived from these cells.

15

#### I Assays For The Identification Of Agents That Modulate The Activity Of GPR86

Agents that modulate the activity of GPR86 can be identified in a number of ways that take advantage of the interaction of the receptor with ADP or any other ligand. For example, the ability to reconstitute GPR86/ADP binding either in vitro, on cultured cells or in vivo provides a target for the identification of agents that disrupt that binding. Assays based on disruption of binding can identify agents, such as small organic molecules, from libraries or collections of such molecules. Alternatively, such assays can identify agents in samples or extracts from natural sources, e.g., plant, fungal or bacterial extracts or even in human tissue samples (e.g., tumour tissue). In one aspect, the extracts can be made from cells expressing a library of variant nucleic acids, peptides or polypeptides. Modulators of GPR86/ADP binding can then be screened using a binding assay or a functional assay that measures downstream signalling through the receptor.

Another approach that uses the GPR86/ADP interaction more directly to identify agents that modulate GPR86 function measures changes in GPR86 downstream signalling induced by candidate agents or candidate modulators. These functional assays can be

30

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

28

performed in isolated cell membrane fractions or on cells expressing the receptor on their surfaces.

The discovery that ADP is a ligand of the GPR86 receptor permits screening assays to identify agonists, antagonists and inverse agonists of receptor activity. The screening assays

5 will have two general approaches.

- 1) Ligand binding assays, in which cells expressing GPR86, membrane extracts from such cells, virus-induced budding membranes containing a GPR86 polypeptide or immobilized lipid membranes comprising GPR86 are exposed to labelled ADP and candidate compound. Following incubation, the reaction mixture is measured for specific  
10 binding of the labelled ADP to the GPR86 receptor. Compounds that interfere with binding or displace labelled ADP can be agonists, antagonists or inverse agonists of GPR86 activity. Subsequent functional analysis can then be performed on positive compounds to determine in which of these categories they belong.
- 2) Functional assays, in which a signalling activity of GPR86 is measured.
  - 15 a) For agonist screening, cells expressing GPR86 or membranes prepared from them are incubated with a candidate compound, and a signalling activity of GPR86 is measured. The activity induced by compounds that modulate receptor activity is compared to that induced by ADP. An agonist or partial agonist will have a maximal biological activity corresponding to at least 10% of the maximal activity of ADP when the agonist or partial  
20 agonist is present at 10 nM or less, and even will have a potency which is at least as potent as ADP.
  - b) For antagonist or inverse agonist screening, cells expressing GPR86 or membranes isolated from them are assayed for signalling activity in the presence of ADP with or without a candidate compound. Antagonists will reduce the level of ADP-stimulated  
25 receptor activity by at least 10%, relative to reactions lacking the antagonist in the presence of ADP. Inverse agonists will reduce the constitutive activity of the receptor by at least 10%, relative to reactions lacking the inverse agonist.
  - c) For inverse agonist screening, cells expressing constitutive GPR86 activity or membranes isolated from them are used in a functional assay that measures an activity of the

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

29

receptor in the presence of a candidate compound. Inverse agonists are those compounds that reduce the constitutive activity of the receptor by at least 10%. Overexpression of GPR86 may lead to constitutive activation. GPR86 can be overexpressed by placing it under the control of a strong constitutive promoter, e.g., the CMV early promoter. Alternatively, certain mutations of conserved GPCR amino acids or amino acid domains tend to lead to constitutive activity. See for example: Kjelsberg et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:1430; McWhinney et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:2087; Ren et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:16483; Samama et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:4625; Parma et al., 1993, Nature 365:649; Parma et al., 1998, J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:85; and Parent et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:7949.

Ligand binding and displacement assays:

One can use GPR86 polypeptides expressed on a cell, or isolated membranes containing receptor polypeptides, along with ADP in order to screen for compounds that inhibit the binding of ADP to GPR86. When identified in an assay that measures binding or ADP displacement alone, compounds will have to be subjected to functional testing to determine whether they act as agonists, antagonists or inverse agonists.

For displacement experiments, cells expressing a GPR86 polypeptide (generally  $25 \times 10^5$  cells per assay or 1 to 100  $\mu\text{g}$  of membrane extracts) are incubated in binding buffer with labelled ADP in the presence or absence of increasing concentrations of a candidate modulator. To validate and calibrate the assay, control competition reactions using increasing concentrations of unlabeled ADP can be performed. After incubation, cells are washed extensively, and bound, labelled ADP is measured as appropriate for the given label (e.g., scintillation counting, fluorescence, etc.). A decrease of at least 10% in the amount of labelled ADP bound in the presence of candidate modulator indicates displacement of binding by the candidate modulator. Candidate modulators are considered to bind specifically in this or other assays described herein if they displace 50% of labelled ADP (sub-saturating ADP dose) at a concentration of 10 nM or less.

Alternatively, binding or displacement of binding can be monitored by surface plasmon resonance (SPR). Surface plasmon resonance assays can be used as a quantitative method to measure binding between two molecules by the change in mass near an

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

30

immobilized sensor caused by the binding or loss of binding of ADP from the aqueous phase to a GPR86 polypeptide immobilized in a membrane on the sensor. This change in mass is measured as resonance units versus time after injection or removal of the ADP or candidate modulator and is measured using a Biacore Biosensor (Biacore AB). GPR86 can be

5 immobilized on a sensor chip (for example, research grade CM5 chip; Biacore AB) in a thin film lipid membrane according to methods described by Salamon et al. (Salamon et al., 1996, *Biophys J.* 71: 283-294; Salamon et al., 2001, *Biophys. J.* 80: 1557-1567; Salamon et al., 1999, *Trends Biochem. Sci.* 24: 213-219, each of which is incorporated herein by reference.). Sarrío et al. demonstrated that SPR can be used to detect ligand binding to the GPCR A(1)

10 adenosine receptor immobilized in a lipid layer on the chip (Sarrío et al., 2000, *Mol. Cell. Biol.* 20: 5164-5174, incorporated herein by reference). Conditions for ADP binding to GPR86 in an SPR assay can be fine-tuned by one of skill in the art using the conditions reported by Sarrío et al. as a starting point.

SPR can assay for modulators of binding in at least two ways. First, ADP can be pre-

15 bound to immobilized GPR86 polypeptide, followed by injection of candidate modulator at a concentration ranging from 0.1 nM to 1  $\mu$ M. Displacement of the bound ADP can be quantitated, permitting detection of modulator binding. Alternatively, the membrane-bound GPR86 polypeptide can be pre-incubated with candidate modulator and challenged with ADP. A difference in ADP binding to the GPR86 exposed to modulator relative to that on a

20 chip not pre-exposed to modulator will demonstrate binding or displacement of ADP in the presence of modulator. In either assay, a decrease of 10% or more in the amount of ADP bound is in the presence of candidate modulator, relative to the amount of a ADP bound in the absence of candidate modulator indicates that the candidate modulator inhibits the interaction of GPR86 and ADP.

25 Another method of detecting inhibition of binding of ADP to GPR86 uses fluorescence resonance energy transfer (FRET). FRET is a quantum mechanical phenomenon that occurs between a fluorescence donor (D) and a fluorescence acceptor (A) in close proximity to each other (usually < 100 Å of separation) if the emission spectrum of D overlaps with the excitation spectrum of A. The molecules to be tested, e.g. ADP and a

30 GPR86 polypeptide, are labelled with a complementary pair of donor and acceptor fluorophores. While bound closely together by the GPR86:ADP interaction, the fluorescence

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

31

emitted upon excitation of the donor fluorophore will have a different wavelength than that emitted in response to that excitation wavelength when the ADP and GPR86 polypeptide are not bound, providing for quantitation of bound versus unbound molecules by measurement of emission intensity at each wavelength. Donor fluorophores with which to label the GPR86 polypeptide are well known in the art. Of interest are variants of the *A. victoria* GFP known as Cyan FP (CFP, Donor (D)) and Yellow FP (YFP, Acceptor(A)). As an example, the YFP variant can be made as a fusion protein with GPR86. Vectors for the expression of GFP variants as fusions (Clontech) as well as fluorophore-labeled ADP compounds (Molecular Probes) are known in the art. The addition of a candidate modulator to the mixture of labelled ADP and YFP-GPR86 protein will result in an inhibition of energy transfer evidenced by, for example, a decrease in YFP fluorescence relative to a sample without the candidate modulator. In an assay using FRET for the detection of GPR86:ADP interaction, a 10% or greater decrease in the intensity of fluorescent emission at the acceptor wavelength in samples containing a candidate modulator, relative to samples without the candidate modulator, indicates that the candidate modulator inhibits the GPR86:ADP interaction.

A variation on FRET uses fluorescence quenching to monitor molecular interactions. One molecule in the interacting pair can be labelled with a fluorophore, and the other with a molecule that quenches the fluorescence of the fluorophore when brought into close apposition with it. A change in fluorescence upon excitation is indicative of a change in the association of the molecules tagged with the fluorophore:quencher pair. Generally, an increase in fluorescence of the labelled GPR86 polypeptide is indicative that the ADP molecule bearing the quencher has been displaced. For quenching assays, a 10% or greater increase in the intensity of fluorescent emission in samples containing a candidate modulator, relative to samples without the candidate modulator, indicates that the candidate modulator inhibits GPR86:ADP interaction.

In addition to the surface plasmon resonance and FRET methods, fluorescence polarization measurement is useful to quantitate binding. The fluorescence polarization value for a fluorescently-tagged molecule depends on the rotational correlation time or tumbling rate. Complexes, such as those formed by GPR86 associating with a fluorescently labelled ADP, have higher polarization values than uncomplexed, labelled ADP. The inclusion of a candidate inhibitor of the GPR86:ADP interaction results in a decrease in fluorescence

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

32

polarization, relative to a mixture without the candidate inhibitor, if the candidate inhibitor disrupts or inhibits the interaction of GPR86 with ADP. Fluorescence polarization is well suited for the identification of small molecules that disrupt the formation of receptor:ligand complexes. A decrease of 10% or more in fluorescence polarization in samples containing a candidate modulator, relative to fluorescence polarization in a sample lacking the candidate modulator, indicates that the candidate modulator inhibits GPR86:ADP interaction.

Another alternative for monitoring GPR86:ADP interactions uses a biosensor assay. ICS biosensors have been described in the art (Australian Membrane Biotechnology Research Institute; <http://www.ambri.com.au/>; Cornell B, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek L, and Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" *Nature* 1997, 387, 580). In this technology, the association of GPR86 and its ligand, is coupled to the closing of gramicidin-facilitated ion channels in suspended membrane bilayers and thus to a measurable change in the admittance (similar to impedance) of the biosensor. This approach is linear over six orders of magnitude of admittance change and is ideally suited for large scale, high throughput screening of small molecule combinatorial libraries. A 10% or greater change (increase or decrease) in admittance in a sample containing a candidate modulator, relative to the admittance of a sample lacking the candidate modulator, indicates that the candidate modulator inhibits the interaction of GPR86 and ADP. It is important to note that in assays testing the interaction of GPR86 with ADP, it is possible that a modulator of the interaction need not necessarily interact directly with the domain(s) of the proteins that physically interact with ADP. It is also possible that a modulator will interact at a location removed from the site of interaction and cause, for example, a conformational change in the GPR86 polypeptide. Modulators (inhibitors or agonists) that act in this manner are nonetheless of interest as agents to modulate the activity of GPR86.

Accordingly, a method of screening for a candidate modulator of GPR86 activity using cells expressing GPR86, may comprise: a) incubating a first sample of the cells in the presence of a candidate modulator and a second sample of the cells in the absence of the candidate modulator, both of these samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86; b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in these first and second samples, and; c) comparing the results of the second messenger assays for the first and second samples. Also, a method of screening for a candidate modulator of GPR86 activity

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

33

using cell membranes bearing GPR86, may comprise: a) incubating a first sample of the cell membranes in the presence of the candidate modulator and a second sample of the cell membranes in the absence of the candidate modulator, both samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86; b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in these first and second samples, and; c) comparing the results of the second messenger assays for the first and second samples. In addition, a method for determining if a candidate modulator increases or decreases the activity of GPR86 using cells expressing GPR86 may comprise: a) incubating a first sample of the cells in the presence of the candidate modulator and a second sample of the cells in the absence of the candidate modulator, both of these samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86; b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in the first and second samples, and; c) comparing the results of the second messenger assays for the first and second samples. Next, a method for determining if a candidate modulator increases or decreases the activity of GPR86 using cell membranes bearing GPR86 may comprise: a) incubating a first sample of the cell membranes in the presence of the candidate modulator and a second sample of the cell membranes in the absence of the candidate modulator, both of these samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86; b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in the first and second samples, and; c) comparing the results of the second messenger assays for the first and second samples.

### 3. Other ligands

It should be understood that any of the methods or binding assays described herein can be performed with a non-ADP ligand (for example, agonist, antagonist, etc.) of GPR86, e.g., a small molecule identified as described herein or ADP analogues including but not limited to any of the ADP analogues presented in US PAT. NO 5,700,786, a natural or synthetic peptide, a polypeptide, an antibody or antigen-binding fragment thereof, a lipid, a carbohydrate, and a small organic molecule.

Any of the methods or binding assays described can be used to determine the presence of an agent in a sample, e.g., a tissue sample, that binds to the GPR86 receptor molecule, or that affects the binding of ADP to the receptor. To do so, GPR86 polypeptide is reacted with ADP or another ligand in the presence or absence of the sample, and ADP or ligand binding is measured as appropriate for the binding assay being used. A decrease of 10% or more in

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

34

the binding of ADP or other ligand indicates that the sample contains an agent that modulates ADP or ligand binding to the receptor polypeptide.

Accordingly, the present invention also relates to methods as described herein, wherein ADP is replaced by a modulator as described herein, such as for instance, ATP,  
5 2MeSATP, 2MeSADP, ADP $\beta$ S, Ap3A, RB-2, Suramine or PPADS.

Further, the agent or modulator identified or characterized by the present invention can be used in a method of modulating the GPR86 activity of a polypeptide in a cell, said method comprising the step of delivering to said cell an agent that modulates the GPR86 activity of a polypeptide, such that the GPR86 activity is modulated.

#### 10 Functional assays of receptor activity

##### i. GTPase/GTP Binding Assays:

For GPCRs such as GPR86, a measure of receptor activity is the binding of GTP by cell membranes containing receptors. In the method described by Traynor and Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol. 47: 848-854, incorporated herein by reference, one essentially  
15 measures G-protein coupling to membranes by detecting the binding of labelled GTP. For GTP binding assays, membranes isolated from cells expressing the receptor are incubated in a buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 pM <sup>35</sup>S-GTP $\gamma$ S and 3  $\mu$ M GDP. The assay mixture is incubated for 60 minutes at 30°C, after which unbound labelled GTP is removed by filtration onto GF/B filters. Bound, labelled GTP is  
20 measured by liquid scintillation counting. In order to assay for modulation of ADP-induced GPR86 activity, membranes prepared from cells expressing a GPR86 polypeptide are mixed with ADP, and the GTP binding assay is performed in the presence and absence of a candidate modulator of GPR86 activity. A decrease of 10% or more in labelled GTP binding as measured by scintillation counting in an assay of this kind containing a candidate  
25 modulator, relative to an assay without the modulator, indicates that the candidate modulator inhibits GPR86 activity. A similar GTP-binding assay can be performed without ADP to identify compounds that act as agonists. In this case, ADP-stimulated GTP binding is used as a standard. A compound is considered an agonist if it induces at least 50% of the level of GTP binding induced by ADP when the compound is present at 1  $\mu$ M or less, or will induce a  
30 level the same as or higher than that induced by ADP. GTPase activity is measured by

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

35

incubating the membranes containing a GPR86 polypeptide with  $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP. Active GTPase will release the label as inorganic phosphate, which is detected by separation of free inorganic phosphate in a 5% suspension of activated charcoal in 20 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , followed by scintillation counting. Controls include assays using membranes isolated from cells not  
5 expressing GPR86 (mock-transfected), in order to exclude possible non-specific effects of the candidate compound.

In order to assay for the effect of a candidate modulator on GPR86-regulated GTPase activity, membrane samples are incubated with ADP, with and without the modulator, followed by the GTPase assay. A change (increase or decrease) of 10% or more in the level  
10 of GTP binding or GTPase activity relative to samples without modulator is indicative of GPR86 modulation by a candidate modulator.

ii. Downstream Pathway Activation Assays:

a. Calcium flux - The Aequorin-based Assay:

The aequorin assay takes advantage of the responsiveness of mitochondrial  
15 apoaequorin to intracellular calcium release induced by the activation of GPCRs (Stables et al., 1997, Anal. Biochem. 252:115-126; Detheux et al., 2000, J. Exp. Med., 192 1501-1508; both of which are incorporated herein by reference). Briefly, GPR86-expressing clones are transfected to co express mitochondrial apoaequorin and G $\alpha$ 16. Cells are incubated with 5  $\mu\text{M}$  Coelenterazine H (Molecular Probes) for 4 hours at room temperature, washed in  
20 DMEM-F12 culture medium and resuspended at a concentration of  $0.5 \times 10^6$  cells/ml. Cells are then mixed with test agonist molecules and light emission by the aequorin is recorded with a luminometer for 30 sec. Results are expressed as Relative Light Units (RLU). Controls include assays using membranes isolated from cells not expressing GPR86 (mock transfected), in order to exclude possible non-specific effects of the candidate compound.

25 Aequorin activity or intracellular calcium levels are "changed" if light intensity increases or decreases by 10% or more in a sample of cells, expressing a GPR86 polypeptide and treated with a candidate modulator, relative to a sample of cells expressing the GPR86 polypeptide but not treated with the candidate modulator or relative to a sample of cells not  
30 expressing the GPR86 polypeptide (mock-transfected cells) but treated with the candidate modulator.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

36

When performed in the absence of ADP, the assay can be used to identify an agonist of GPR86 activity. When the assay is performed in the presence of ADP, it can be used to assay for an antagonist.

b. Adenylate Cyclase Assay:

- 5 Assays for adenylate cyclase activity are described by Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585-591, incorporated herein by reference. That assay is a modification of the assay taught by Solomon et al., 1974, Anal. Biochem. 58: 541-548, also incorporated herein by reference. Briefly, 100  $\mu$ l reactions contain 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM creatine phosphate (disodium salt), 10 units (71  $\mu$ g of protein) of creatine  
10 phosphokinase, 1 mM  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP (tetrasodium salt, 2  $\mu$ Ci), 0.5 mM cyclic AMP, G-<sup>3</sup>H-labeled cyclic AMP (approximately 10,000 cpm), 0.5 mM Ro20-1724, 0.25% ethanol, and 50-200  $\mu$ g of protein homogenate to be tested (i.e., homogenate from cells expressing or not  
15 expressing a GPR86 polypeptide, treated or not treated with ADP with or without a candidate modulator). Reaction mixtures are generally incubated at 37°C for 6 minutes. Following incubation, reaction mixtures are deproteinized by the addition of 0.9 ml of cold 6% trichloroacetic acid. Tubes are centrifuged at 1800 x g for 20 minutes and each supernatant  
20 solution is added to a Dowex AG50W-X4 column. The cAMP fraction from the column is eluted with 4 ml of 0.1 mM imidazole-HCl (pH 7.5) into a counting vial. Assays should be performed in triplicate. Control reactions should also be performed using protein homogenate from cells that do not express a GPR86 polypeptide.

- According to the invention, adenylate cyclase activity is "changed" if it increases or decreases by 10% or more in a sample taken from cells treated with a candidate modulator of GPR86 activity, relative to a similar sample of cells not treated with the candidate modulator or relative to a sample of cells not expressing the GPR86 polypeptide (mock-transfected  
25 cells) but treated with the candidate modulator.

c. cAMP Assay:

Intracellular or extracellular cAMP is measured using a cAMP radioimmunoassay (RIA) or cAMP binding protein according to methods widely known in the art. For example,

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

37

Horton & Baxendale, 1995, *Methods Mol. Biol.* 41: 91-105, which is incorporated herein by reference, describes an RIA for cAMP.

A number of kits for the measurement of cAMP are commercially available, such as the High Efficiency Fluorescence Polarization-based homogeneous assay marketed by LJI Biosystems and NEN Life Science Products. Control reactions should be performed using extracts of mock-transfected cells to exclude possible non-specific effects of some candidate modulators.

The level of cAMP is "changed" if the level of cAMP detected in cells, expressing a GPR86 polypeptide and treated with a candidate modulator of GPR86 activity (or in extracts of such cells), using the RIA-based assay of Horton & Baxendale, 1995, supra, increases or decreases by at least 10% relative to the cAMP level in similar cells not treated with the candidate modulator.

d. Phospholipid breakdown, DAG production and Inositol Triphosphate Levels:

Receptors that activate the breakdown of phospholipids can be monitored for changes due to the activity of known or suspected modulators of GPR86 by monitoring phospholipid breakdown, and the resulting production of second messengers DAG and/or inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Methods of detecting each of these are described in Phospholipid Signalling Protocols, edited by Ian M. Bird. Totowa, NJ, Humana Press, 1998, which is incorporated herein by reference. See also Rudolph et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 11824-11831, incorporated herein by reference, which also describes an assay for phosphatidylinositol breakdown. Assays should be performed using cells or extracts of cells expressing GPR86, treated or not treated with ADP with or without a candidate modulator. Control reactions should be performed using mock-transfected cells, or extracts from them in order to exclude possible non-specific effects of some candidate modulators.

According to the invention, phosphatidylinositol breakdown, and diacylglycerol and/or inositol triphosphate levels are "changed" if they increase or decrease by at least 10% in a sample from cells expressing a GPR86 polypeptide and treated with a candidate modulator, relative to the level observed in a sample from cells expressing a GPR86 polypeptide that is not treated with the candidate modulator.

e. PKC activation assays:

Growth factor receptor tyrosine kinases can signal via a pathway involving activation of Protein Kinase C (PKC), which is a family of phospholipid- and calcium-activated protein kinases. PKC activation ultimately results in the transcription of an array of proto-oncogene transcription factor-encoding genes, including c-fos, c-myc and c-jun, proteases, protease inhibitors, including collagenase type I and plasminogen activator inhibitor, and adhesion molecules, including intracellular adhesion molecule I (ICAM I). Assays designed to detect increases in gene products induced by PKC can be used to monitor PKC activation and thereby receptor activity. In addition, the activity of receptors that signal via PKC can be monitored through the use of reporter gene constructs driven by the control sequences of genes activated by PKC activation. This type of reporter gene-based assay is discussed in more detail below.

For a more direct measure of PKC activity, the method of Kikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 13341, incorporated herein by reference, can be used. This assay measures phosphorylation of a PKC substrate peptide, which is subsequently separated by binding to phosphocellulose paper. This PKC assay system can be used to measure activity of purified kinase, or the activity in crude cellular extracts. Protein kinase C sample can be diluted in 20 mM HEPES/ 2 mM DTT immediately prior to assay.

The substrate for the assay is the peptide Ac-FKKSFKL-NH<sub>2</sub>, derived from the myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate protein (MARCKS). The  $K_m$  of the enzyme for this peptide is approximately 50  $\mu$ M. Other basic, protein kinase C-selective peptides known in the art can also be used, at a concentration of at least 2-3 times their  $K_m$ . Cofactors required for the assay include calcium, magnesium, ATP, phosphatidylserine and diacylglycerol. Depending upon the intent of the user, the assay can be performed to determine the amount of PKC present (activating conditions) or the amount of active PKC present (non-activating conditions). For most purposes according to the invention, non-activating conditions will be used, such that the PKC, that is active in the sample when it is isolated, is measured, rather than measuring the PKC that can be activated. For non-activating conditions, calcium is omitted from the assay in favour of EGTA.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

39

The assay is performed in a mixture containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 1-2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM ATP, ~1 μCi γ-<sup>32</sup>P-ATP, 100 μg/ml peptide substrate (~100 μM), 140 μM / 3.8 μM phosphatidylserine/diacylglycerol membranes, and 100 μM calcium (or 500 μM EGTA). 48 μl of sample, diluted in 20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM DTT is used in a final reaction volume of 80 μl. Reactions are performed at 30°C for 5-10 minutes, followed by addition of 25 μl of 100 mM ATP, 100 mM EDTA, pH 8.0, which stops the reactions.

After the reaction is stopped, a portion (85 μl) of each reaction is spotted onto a Whatman P81 cellulose phosphate filter, followed by washes: four times 500 ml in 0.4% phosphoric acid, (5-10 min per wash), and a final wash in 500 ml 95% EtOH, for 2-5 min. Bound radioactivity is measured by scintillation counting. Specific activity (cpm/nmol) of the labelled ATP is determined by spotting a sample of the reaction onto P81 paper and counting without washing. Units of PKC activity, defined as nmol phosphate transferred per min, are calculated as follows:

The activity, in UNITS (nmol/min) is:

$$= \frac{(\text{cpm on paper}) \times (105 \mu\text{l total} / 85 \mu\text{l spotted})}{(\text{assay time, min}) (\text{specific activity of ATP cpm/nmol})}$$

An alternative assay can be performed using a Protein Kinase C Assay Kit sold by PanVera (Cat. # P2747).

Assays are performed on extracts from cells expressing a GPR86 polypeptide, treated or not treated with ADP with or without a candidate modulator. Control reactions should be performed using mock-transfected cells, or extracts from them in order to exclude possible non-specific effects of some candidate modulators.

According to the invention, PKC activity is "changed" by a candidate modulator when the units of PKC measured by either assay described above increase or decrease by at least 10%, in extracts from cells expressing GPR86 and treated with a candidate modulator, relative to a reaction performed on a similar sample from cells not treated with a candidate modulator.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

40

f. Kinase assays:

MAP kinase activity can be assayed using any of several kits available commercially, for example, the p38 MAP Kinase assay kit sold by New England Biolabs (Cat # 9820) or the FlashPlate™ MAP Kinase assays sold by Perkin-Elmer Life Sciences.

- 5        MAP Kinase activity is "changed" if the level of activity is increased or decreased by 10% or more in a sample from cells, expressing a GPR86 polypeptide, treated with a candidate modulator relative to MAP kinase activity in a sample from similar cells not treated with the candidate modulator.
- 10        Direct assays for tyrosine kinase activity using known synthetic or natural tyrosine kinase substrates and labelled phosphate are well known, as are similar assays for other types of kinases (e.g., Ser/Thr kinases). Kinase assays can be performed with both purified kinases and crude extracts prepared from cells expressing a GPR86 polypeptide, treated with or without ADP, with or without a candidate modulator. Control reactions should be performed using mock-transfected cells, or extracts from them in order to exclude possible non-specific
- 15        effects of some candidate modulators. Substrates can be either full-length protein or synthetic peptides representing the substrate. Pinna & Ruzzene (1996, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225, incorporated herein by reference) list a number of phosphorylation substrate sites useful for detecting kinase activities. A number of kinase substrate peptides are commercially available. One that is particularly useful is the "Src-related peptide,"
- 20        RRLIEDAEYAAARG (available from Sigma # A7433), which is a substrate for many receptor and nonreceptor tyrosine kinases. Because the assay described below requires binding of peptide substrates to filters, the peptide substrates should have a net positive charge to facilitate binding. Generally, peptide substrates should have at least 2 basic residues and a free amino terminus. Reactions generally use a peptide concentration of 0.7-1.5 mM.
- 25        Assays are generally carried out in a 25 µl volume comprising 5 µl of 5X kinase buffer (5 mg/mL BSA, 150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>; depending upon the exact kinase assayed for, MnCl<sub>2</sub> can be used in place of or in addition to the MgCl<sub>2</sub>), 5 µl of 1.0 mM ATP (0.2 mM final concentration), γ-32P-ATP (100-500 cpm/pmol), 3 µl of 10 mM peptide substrate (1.2 mM final concentration), cell extract containing kinase to be tested
- 30        (cell extracts used for kinase assays should contain a phosphatase inhibitor (e.g. 0.1-1 mM

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

41

sodium orthovanadate)), and H<sub>2</sub>O to 25  $\mu$ l. Reactions are performed at 30°C, and are initiated by the addition of the cell extract.

Kinase reactions are performed for 30 seconds to about 30 minutes, followed by the addition of 45 $\mu$ l of ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA). Samples are spun for 2 minutes  
5 in a micro centrifuge, and 35 $\mu$ l of the supernatant is spotted onto Whatman P81 cellulose phosphate filter circles. The filters are washed three times with 500 ml cold 0.5% phosphoric acid, followed by one wash with 200 ml of acetone at room temperature for 5 minutes. Filters are dried and incorporated <sup>32</sup>P is measured by scintillation counting. The specific activity of ATP in the kinase reaction (e.g., in cpm/pmol) is determined by spotting a small  
10 sample (2-5  $\mu$ l) of the reaction onto a P81 filter circle and counting directly, without washing. Counts per minute obtained in the kinase reaction (minus blank) are then divided by the specific activity to determine the moles of phosphate transferred in the reaction.

Tyrosine kinase activity is "changed" if the level of kinase activity is increased or decreased by 10% or more in a sample from cells, expressing a GPR86 polypeptide, treated  
15 with a candidate modulator relative to kinase activity in a sample from similar cells not treated with the candidate modulator.

g. Transcriptional reporters for downstream pathway activation:

The intracellular signal initiated by binding of an agonist to a receptor, e.g., GPR86, sets in motion a cascade of intracellular events, the ultimate consequence of which is a rapid  
20 and detectable change in the transcription or translation of one or more genes. The activity of the receptor can therefore be monitored by detecting the expression of a reporter gene driven by control sequences responsive to GPR86 activation.

As used herein "promoter" refers to the transcriptional control elements necessary for receptor-mediated regulation of gene expression, including not only the basal promoter, but  
25 also any enhancers or transcription-factor binding sites necessary for receptor-regulated expression. By selecting promoters that are responsive to the intracellular signals resulting from agonist binding, and operatively linking the selected promoters to reporter genes whose transcription, translation or ultimate activity is readily detectable and measurable, the transcription based reporter assay provides a rapid indication of whether a given receptor is  
30 activated.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

42

Reporter genes such as luciferase, CAT, GFP,  $\beta$ -lactamase or  $\beta$ -galactosidase are well known in the art, as are assays for the detection of their products.

Genes particularly well suited for monitoring receptor activity are the "immediate early" genes, which are rapidly induced, generally within minutes of contact between the  
5 receptor and the effector protein or ligand. The induction of immediate early gene transcription does not require the synthesis of new regulatory proteins. In addition to rapid responsiveness to ligand binding, characteristics of preferred genes useful for making reporter constructs include: low or undetectable expression in quiescent cells; induction that is  
10 transient and independent of new protein synthesis; subsequent shut-off of transcription requires new protein synthesis; and mRNAs transcribed from these genes have a short half-life. It is preferred, but not necessary that a transcriptional control element have all of these properties for it to be useful.

An example of a gene that is responsive to a number of different stimuli is the c-fos proto-oncogene. The c-fos gene is activated in a protein-synthesis-independent manner by  
15 growth factors, hormones, differentiation-specific agents, stress, and other known inducers of cell surface proteins. The induction of c-fos expression is extremely rapid, often occurring within minutes of receptor stimulation. This characteristic makes the c-fos regulatory regions particularly attractive for use as a reporter of receptor activation.

The c-fos regulatory elements include (see, Verma et al., 1987, Cell 51: 513-514): a  
20 TATA box that is required for transcription initiation; two upstream elements for basal transcription, and an enhancer, which includes an element with dyad symmetry and which is required for induction by TPA, serum, EGF, and PMA.

The 20 bp c-fos transcriptional enhancer element located between -317 and -298 bp upstream from the c-fos mRNA cap site, is essential for serum induction in serum starved  
25 NIH 3T3 cells. One of the two upstream elements is located at -63 to -57 and it resembles the consensus sequence for cAMP regulation.

The transcription factor CREB (cyclic AMP responsive element binding protein) is, as the name implies, responsive to levels of intracellular cAMP. Therefore, the activation of a  
30 receptor that signals via modulation of cAMP levels can be monitored by detecting either the binding of the transcription factor, or the expression of a reporter gene linked to a CREB-

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

43

binding element (termed the CRE, or cAMP response element). The DNA sequence of the CRE is TGACGTCA. Reporter constructs responsive to CREB binding activity are described in U.S. Patent No. 5,919,649.

Other promoters and transcriptional control elements, in addition to the c-fos elements  
5 and CREB-responsive constructs, include the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene promoter (cAMP responsive; Fink et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:6662-6666); the somatostatin gene promoter (cAMP responsive; Montminy et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6682-6686); the proenkephalin promoter (responsive to cAMP, nicotinic agonists, and phorbol esters; Comb et al., 1986, Nature 323:353-356); the phosphoenolpyruvate carboxy-  
10 kinase (PEPCK) gene promoter (cAMP responsive; Short et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:9721-9726).

Additional examples of transcriptional control elements that are responsive to changes in GPCR activity include, but are not limited to those responsive to the AP-1 transcription factor and those responsive to NF- $\kappa$ B activity. The consensus AP-1 binding site is the  
15 palindrome TGA(C/G)TCA (Lee et al., 1987, Nature 325: 368-372; Lee et al., 1987, Cell 49: 741-752). The AP-1 site is also responsible for mediating induction by tumour promoters such as the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol- $\beta$ -acetate (TPA), and are therefore sometimes also referred to as a TRE, for TPA-response element. AP-1 activates numerous genes that are involved in the early response of cells to growth stimuli. Examples of AP-1-  
20 responsive genes include, but are not limited to the genes for Fos and Jun (which proteins themselves make up AP-1 activity), Fos-related antigens (Fra) 1 and 2, I $\kappa$ B $\alpha$ , ornithine decarboxylase, and annexins I and II.

The NF- $\kappa$ B binding element has the consensus sequence GGGGACTTCC. A large number of genes have been identified as NF- $\kappa$ B responsive, and their control elements can be  
25 linked to a reporter gene to monitor GPCR activity. A small sample of the genes responsive to NF- $\kappa$ B includes those encoding IL-1 $\beta$  (Hiscott et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13: 6231-6240), TNF- $\alpha$  (Shakhov et al., 1990, J. Exp. Med. 171: 35-47), CCR5 (Liu et al., 1998, AIDS Res. Hum. Retroviruses 14: 1509-1519), P-selection (Pan & McEver, 1995, J. Biol. Chem. 270: 23077-23083), Fas ligand (Matsui et al., 1998, J. Immunol. 161: 3469-3473), GM-CSF  
30 (Schreck & Baeuerle, 1990, Mol. Cell. Biol. 10: 1281-1286) and I $\kappa$ B $\alpha$  (Haskill et al., 1991,

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

44

Cell 65: 1281-1289). Each of these references is incorporated herein by reference. Vectors encoding NF- $\kappa$ B-responsive reporters are also known in the art or can be readily made by one of skill in the art using, for example, synthetic NF- $\kappa$ B elements and a minimal promoter, or using the NF- $\kappa$ B-responsive sequences of a gene known to be subject to NF- $\kappa$ B regulation.

- 5 Further, NF- $\kappa$ B responsive reporter constructs are commercially available from, for example, CLONTECH.

A given promoter construct should be tested by exposing GPR86-expressing cells, transfected with the construct, to ADP. An increase of at least two-fold in the expression of reporter in response to ADP indicates that the reporter is an indicator of GPR86 activity.

- 10 In order to assay GPR86 activity with an ADP responsive transcriptional reporter construct, cells that stably express a GPR86 polypeptide are stably transfected with the reporter construct. To screen for agonists, the cells are left untreated, exposed to candidate modulators, or exposed to ADP, and expression of the reporter is measured. The ADP-treated cultures serve as a standard for the level of transcription induced by a known agonist.
- 15 An increase of at least 50% in reporter expression in the presence of a candidate modulator indicates that the candidate is a modulator of GPR86 activity. An agonist will induce at least as much, the same amount or more, reporter expression than ADP alone. This approach can also be used to screen for inverse agonists where cells express a GPR86 polypeptide at levels such that there is an elevated basal activity of the reporter in the absence of ADP or another
- 20 agonist. A decrease in reporter activity of 10% or more in the presence of a candidate modulator, relative to its absence, indicates that the compound is an inverse agonist.

- To screen for antagonists, the cells expressing GPR86 and carrying the reporter construct are exposed to ADP (or another agonist) in the presence and absence of candidate modulator. A decrease of 10% or more in reporter expression in the presence of candidate
- 25 modulator, relative to the absence of the candidate modulator, indicates that the candidate is a modulator of GPR86 activity.

Controls for transcription assays include cells not expressing GPR86 but carrying the reporter construct, as well as cells with a promoter-less reporter construct. Compounds that are identified as modulators of GPR86-regulated transcription should also be analyzed to

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

45

determine whether they affect transcription driven by other regulatory sequences and by other receptors, in order to determine the specificity and spectrum of their activity.

The transcriptional reporter assay, and most cell-based assays, are well suited for screening expression libraries for proteins for those that modulate GPR86 activity. The libraries can be, for example, cDNA libraries from natural sources, e.g., plants, animals, bacteria, etc., or they can be libraries expressing randomly or systematically mutated variants of one or more polypeptides. Genomic libraries in viral vectors can also be used to express the mRNA content of one cell or tissue, in the different libraries used for screening of GPR86.

10 h) Inositol phosphates (IP) measurement:

Cells of the invention, for example, 1321N1 cells, are labelled for 24 hours with 10  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] inositol in inositol free DMEM containing 5% FCS, antibiotics, amphotericin, sodium pyruvate and 400  $\mu\text{g/ml}$  G418. Cells are incubated for 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH) buffer of the following composition (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.45 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM Hepes (pH:7.4) and 8 mM glucose). The cells are then challenged with various nucleotides for 30 s. The incubation is stopped by the addition of an ice cold 3% perchloric acid solution. IP are extracted and separated on Dowex columns as previously described (25). 2MeSATP and ATP solutions (1mM) are treated at room temperature with 20 units/ml CPK and 10 mM CP for 90 min to circumvent problems arising from the contamination and degradation of triphosphate nucleotide solutions.

II **GPR86 Assay**

The invention provides for an assay for detecting the activity of a receptor of the invention in a sample. For example, GPR86 activity can be measured in a sample comprising a cell or a cell membrane that expresses GPR86. The assay is performed by incubating the sample in the presence or absence of ADP and carrying out a second messenger assay, as described above. The results of the second messenger assay performed in the presence or absence of ADP are compared to determine if the GPR86 receptor is active. An increase of 10% or more in the detected level of a given second messenger, as defined herein, in the

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

46

presence of ADP relative to the amount detected in an assay performed in the absence of ADP is indicative of GPR86 activity.

Any of the assays of receptor activity, including but not limited to the GTP-binding, GTPase, adenylate cyclase, cAMP, phospholipid-breakdown, diacylglycerol, inositol  
5 triphosphate, arachidonic acid release (see below), PKC, kinase and transcriptional reporter assays, can be used to determine the presence of an agent in a sample, e.g., a tissue sample, that affects the activity of the GPR86 receptor molecule. To do so, GPR86 polypeptide is assayed for activity in the presence and absence of the sample or an extract of the sample. An increase in GPR86 activity in the presence of the sample or extract relative to the absence  
10 of the sample indicates that the sample contains an agonist of the receptor activity. A decrease in receptor activity in the presence of ADP or another agonist and the sample, relative to receptor activity in the presence of ADP alone, indicates that the sample contains an antagonist of GPR86 activity. If desired, samples can then be fractionated and further tested to isolate or purify the agonist or antagonist. The amount of increase or decrease in  
15 measured activity necessary for a sample to be said to contain a modulator depends upon the type of assay used. Generally, a 10% or greater change (increase or decrease) relative to an assay performed in the absence of a sample indicates the presence of a modulator in the sample. One exception is the transcriptional reporter assay, in which at least a two-fold increase or 10% decrease in signal is necessary for a sample to be said to contain a  
20 modulator. An agonist may stimulate at least 50%, or 75% or 100% or more, e.g., 2-fold, 5-fold, 10-fold or greater receptor activation than with ADP alone.

Other functional assays include, for example, microphysiometer or biosensor assays (see Hafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15: 149-158, incorporated herein by reference). The  
intracellular level of arachinoid acid can also be determined as described in Gijon et al., 2000,  
25 J. Biol. Chem., 275:20146-20156.

Accordingly, a method for the detection of GPR86 activity in a sample may comprise the steps of incubating a sample comprising GPR86 and ADP under conditions which permit binding of GRP86 and ADP, and detecting a second messenger. Possibly, this method further  
comprises the steps of incubating a second sample comprising GPR86 in the absence of ADP  
30 under conditions which permit binding of GRP86 and ADP, and detecting a second messenger. The sample may comprise cells expressing GPR86 or cell membranes bearing

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

47

GPR86. Alternatively, the incubating may be performed in or on virus-induced budding membranes containing GPR86 polypeptide.

### III Diagnostic Assays Based upon the Interaction of GPR86 and ADP:

- 5 Signalling through GPCRs is instrumental in the pathology of a large number of diseases and disorders. GPR86, which is expressed in cells of the lymphocyte lineages, platelets, spleen as well as leukemic cells, can have a role in immune processes, cancer, thrombosis and associated disorders or diseases. The GPR86 expression pattern also includes the brain and further suggests a potential role as an ADP neurotransmitter.
- 10 The expression pattern of GPR86 and the knowledge with respect to disorders generally mediated by GPCRs suggests that GPR86 can be involved in disturbances of cell migration, cancer, development of tumours and tumour metastasis, inflammatory and neoplastic processes, wound and bone healing and dysfunction of regulatory growth functions, diabetes, obesity, anorexia, bulimia, acute heart failure, hypotension, hypertension, urinary
- 15 retention, osteoporosis, angina pectoris, myocardial infarction, restenosis, atherosclerosis, thrombosis and other cardiovascular diseases, autoimmune and inflammatory diseases, diseases characterized by excessive smooth muscle cell proliferation, aneurysms, diseases characterized by loss of smooth muscle cells or reduced smooth muscle cell proliferation, stroke, ischemia, ulcers, allergies, benign prostatic hypertrophy, migraine, vomiting,
- 20 psychotic and neurological disorders, including anxiety, schizophrenia, manic depression, depression, delirium, dementia and severe mental retardation, degenerative diseases, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, and dyskinnasias, such as Huntington's disease or Gilles de la Tourett's syndrome and other related diseases including thrombosis and other cardiovascular diseases, autoimmune and
- 25 inflammatory diseases.

The interaction of GPR86 with ADP can be used as the basis of assays for the diagnosis or monitoring of diseases, disorders or processes involving GPR86 signalling. Diagnostic assays for GPR86-related diseases or disorders can have several different forms. First, diagnostic assays can measure the amount of GPR86, genes or mRNA in a sample of

30 tissue. Assays that measure the amount of mRNA encoding GPR86 polypeptide also fit into

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

48

this category. Second, assays can evaluate the qualities of the receptor or the ligand. For example, assays that determine whether an individual expresses a mutant or variant form of GPR86 or a polypeptide ligand can be used diagnostically. Third, assays that measure one or more activities of GPR86 polypeptide can be used diagnostically.

5 A. Assays that measure the amount of GPR86

GPR86 levels can be measured and compared to standards in order to determine whether an abnormal level of the receptor or its ligand is present in a sample, either of which indicate probable dysregulation of GPR86 signalling. Polypeptide levels are measured, for example, by immunohistochemistry using antibodies specific for the polypeptide. A sample  
10 isolated from an individual suspected of suffering from a disease or disorder characterized by GPR86 activity is contacted with an antibody for GPR86, and binding of the antibody is measured as known in the art (e.g., by measurement of the activity of an enzyme conjugated to a secondary antibody).

Another approach to the measurement of GPR86 levels uses flow cytometry analysis  
15 of cells from an affected tissue. Methods of flow cytometry, including the fluorescent labelling of antibodies specific for GPR86, are well known in the art. Other approaches include radioimmunoassay or ELISA. Methods for each of these are also well known in the art.

The amount of binding detected is compared to the binding in a sample of similar  
20 tissue from a healthy individual, or from a site on the affected individual that is not so affected. An increase of 10% or more relative to the standard is diagnostic for a disease or disorder characterized by GPR86 dysregulation.

GPR86 expression can also be measured by determining the amount of mRNA encoding the polypeptides in a sample of tissue. Levels of mRNA can be measured by  
25 quantitative or semi-quantitative PCR. Methods of "quantitative" amplification are well known to those of skill in the art, and primer sequences for the amplification of both GPR86 are disclosed herein. A common method of quantitative PCR involves simultaneously co-amplifying a known quantity of a control sequence using the same primers. This provides an internal standard that can be used to calibrate the PCR reaction. Detailed protocols for  
30 quantitative PCR are provided in PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Innis

et al., Academic Press, Inc. N.Y., (1990), which is incorporated herein by reference. An increase of 10% or more in the amount of mRNA encoding GPR86 in a sample, relative to the amount expressed in a sample of like tissue from a healthy individual or in a sample of tissue from an unaffected location in an affected individual is diagnostic for a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.

#### B. Qualitative assays

Assays that evaluate whether or not the GPR86 polypeptide or the mRNA encoding it are wild-type or not can be used diagnostically. In order to diagnose a disease or disorder characterized by GPR86 dysregulation in this manner, RNA isolated from a sample is used as a template for PCR amplification of GPR86. The amplified sequences are then either directly sequenced using standard methods, or are first cloned into a vector, followed by sequencing. A difference in the sequence that changes one or more encoded amino acids relative to the sequence of wild-type GPR86 can be diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling. It can be useful, when a change in coding sequence is identified in a sample, to express the variant receptor or ligand and compare its activity to that of wild type GPR86. Among other benefits, this approach can provide novel mutants, including constitutively active and null mutants.

In addition to standard sequencing methods, amplified sequences can be assayed for the presence of specific mutations using, for example, hybridization of molecular beacons that discriminate between wild type and variant sequences. Hybridization assays that discriminate on the basis of changes as small as one nucleotide are well known in the art. Alternatively, any of a number of "minisequencing" assays can be performed, including, those described, for example, in U.S. Patents 5,888,819, 6,004,744 and 6,013,431 (incorporated herein by reference). These assays and others known in the art can determine the presence, in a given sample, of a nucleic acid with a known polymorphism.

If desired, array or microarray-based methods can be used to analyze the expression or the presence of mutation, in GPR86 sequences. Array-based methods for minisequencing and for quantitation of nucleic acid expression are well known in the art.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

50

### C. Functional assays.

Diagnosis of a disease or disorder characterized by the dysregulation of GPR86 signalling can also be performed using functional assays. To do so, cell membranes or cell extracts prepared from a tissue sample are used in an assay of GPR86 activity as described herein (e.g., ligand binding assays, the GTP-binding assay, GTPase assay, adenylate cyclase assay, cAMP assay, arachidonic acid level, phospholipid breakdown, diacyl glycerol or inositol triphosphate assays, PKC activation assay, or kinase assay). The activity detected is compared to that in a standard sample taken from a healthy individual or from an unaffected site on the affected individual. As an alternative, a sample or extract of a sample can be applied to cells expressing GPR86, followed by measurement of GPR86 signalling activity relative to a standard sample. A difference of 10% or more in the activity measured in any of these assays, relative to the activity of the standard, is diagnostic for a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.

### Modulation of GPR86 Activity in a Cell According to the Invention

The discovery of ADP as a ligand of GPR86 provides methods of modulating the activity of a GPR86 polypeptide in a cell. GPR86 activity is modulated in a cell by delivering to that cell an agent that modulates the function of a GPR86 polypeptide. This modulation can be performed in cultured cells as part of an assay for the identification of additional modulating agents, or, for example, in an animal, including a human. Agents include ADP and its analogues as defined herein, as well as additional modulators identified using the screening methods described herein including but not limited to any of the ADP analogues presented in US PAT. NO 5,700,786.

An agent can be delivered to a cell by adding it to culture medium. The amount to deliver will vary with the identity of the agent and with the purpose for which it is delivered. For example, in a culture assay to identify antagonists of GPR86 activity, one will generally add an amount of ADP that half-maximally activates the receptors (e.g., approximately  $EC_{50}$ ), for instance, without exceeding the dose required for receptor saturation. This dose can be determined by titrating the amount of ADP to determine the point at which further addition of ADP has no additional effect on GPR86 activity.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

51

When a modulator of GPR36 activity is administered to an animal for the treatment of a disease or disorder, the amount administered can be adjusted by one of skill in the art on the basis of the desired outcome. Successful treatment is achieved when one or more measurable aspects of the pathology (e.g., tumour cell growth, accumulation of inflammatory cells) is  
5 changed by at least 10% relative to the value for that aspect prior to treatment.

#### Candidate Modulators Useful According to the Invention

The invention provides for a compound that is a modulator of a receptor of the invention.

A candidate modulator can be a nucleotide or a nucleotide which binds to a sugar,  
10 including but not limited to ADP-glucose or ADP-galactose. A candidate modulator may also be any ADP analog known in the art as well as any ligand that binds to the UDP glucose receptor.

The candidate compound may be a synthetic compound, or a mixture of compounds, or may be a natural product (e.g. a plant extract or culture supernatant). A candidate  
15 compound according to the invention includes a small molecule that can be synthesized, a natural extract, peptides, proteins, carbohydrates, lipids etc.

The candidate modulator may be, for instance, ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP $\beta$ S, Ap<sub>3</sub>A, RB-2, Suramine or PPADS.

Candidate modulator compounds from large libraries of synthetic or natural  
20 compounds can be screened. Numerous means are currently used for random and directed synthesis of saccharide, peptide, and nucleic acid based compounds. Synthetic compound libraries are commercially available from a number of companies including Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), and Microsource (New Milford, CT). A rare chemical library is available  
25 from Aldrich (Milwaukee, WI). Combinatorial libraries are available and can be prepared. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available from e.g., Pan Laboratories (Bothell, WA) or MycoSearch (NC), or are readily producible by methods well known in the art. Additionally, natural and

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

52

synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical, and biochemical means.

Useful compounds may be found within numerous chemical classes. Useful compounds may be organic compounds, or small organic compounds. Small organic compounds have a molecular weight of more than 50 yet less than about 2,500 daltons, or less than about 750, or less than about 350 daltons. Exemplary classes include heterocycles, peptides, saccharides, steroids, and the like. The compounds may be modified to enhance efficacy, stability, pharmaceutical compatibility, and the like. Structural identification of an agent may be used to identify, generate, or screen additional agents. For example, where peptide agents are identified, they may be modified in a variety of ways to enhance their stability, such as using an unnatural amino acid, such as a D-amino acid, particularly D-alanine, by functionalizing the amino or carboxylic terminus, e.g. for the amino group, acylation or alkylation, and for the carboxyl group, esterification or amidification, or the like.

For primary screening, a useful concentration of a candidate compound according to the invention is from about 1 $\mu$ M to about 60 $\mu$ M or more (i.e., 100 $\mu$ M, 1mM, 10mM, 100mM, 1M etc.). The primary screening concentration will be used as an upper limit, along with nine additional concentrations, wherein the additional concentrations are determined by reducing the primary screening concentration at half-log intervals (e.g. for 9 more concentrations) for secondary screens or for generating concentration curves.

#### 20 Gq16 protein

The invention provides for assays and methods in which the incubation of GPR86 and a ligand, such as ADP, is performed in the presence of Gq16 protein, which may couple the GPR86 receptor to phospholipase C.

#### Antibodies Useful According to the Invention

25 The invention provides for antibodies to GPR86. Antibodies can be made using standard protocols known in the art (See, for example, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988). A mammal, such as a mouse, hamster, or rabbit can be immunized with an immunogenic form of the peptide (e.g., GPR86 polypeptide or an antigenic fragment which is capable of eliciting an antibody response, or a

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

53

fusion protein as described herein above). Immunogens for raising antibodies are prepared by mixing the polypeptides (e.g., isolated recombinant polypeptides or synthetic peptides) with adjuvants. Alternatively, GPR86 polypeptides or peptides are made as fusion proteins to larger immunogenic proteins. Polypeptides can also be covalently linked to other larger immunogenic proteins, such as keyhole limpet hemocyanin. Alternatively, plasmid or viral vectors encoding GPR86 polypeptide, or a fragment of these proteins, can be used to express the polypeptides and generate an immune response in an animal as described in Costagliola et al., 2000, *J. Clin. Invest.* 105:803-811, which is incorporated herein by reference. In order to raise antibodies, immunogens are typically administered intradermally, subcutaneously, or intramuscularly to experimental animals such as rabbits, sheep, and mice. In addition to the antibodies discussed above, genetically engineered antibody derivatives can be made, such as single chain antibodies.

The progress of immunization can be monitored by detection of antibody titers in plasma or serum. Standard ELISA, flow cytometry or other immunoassays can also be used with the immunogen as antigen to assess the levels of antibodies. Antibody preparations can be simply serum from an immunized animal, or if desired, polyclonal antibodies can be isolated from the serum by, for example, affinity chromatography using immobilized immunogen.

To produce monoclonal antibodies, antibody-producing splenocytes can be harvested from an immunized animal and fused by standard somatic cell fusion procedures with immortalizing cells such as myeloma cells to yield hybridoma cells. Such techniques are well known in the art, and include, for example, the hybridoma technique (originally developed by Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), the human B cell hybridoma technique (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Hybridoma cells can be screened immunochemically for production of antibodies specifically reactive with GPR86 polypeptide, and monoclonal antibodies isolated from the media of a culture comprising such hybridoma cells.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

54

High throughput screening kit

A high throughput screening kit according to the invention comprises all the necessary means and media for performing the detection of a modulator compound including, for instance, an agonist, antagonist, inverse agonist or inhibitor to the receptor of the invention in the presence of ADP, for instance at a concentration in the range of 1nM to 10 $\mu$ M. The kit comprises the following successive steps. Recombinant cells of the invention, comprising and expressing the nucleotide sequence encoding the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor, are grown on a solid support, such as a microtiter plate, e.g. a 96 well microtiter plate, according to methods well known to the person skilled in the art such as described in WO 00/02045 (specifically incorporated herein by reference). Modulator compounds according to the invention, at concentrations from about 1nM to 10 $\mu$ M or more, are added to the culture media of defined wells in the presence of an appropriate concentration of ADP (for example, in the range of 1nM to 1 $\mu$ M).

Secondary messenger assays, amenable to high throughput screening analysis, are performed including but not limited to the measurement of intracellular levels of cAMP, intracellular inositol phosphate, intracellular diacylglycerol concentrations, arachinoid acid concentration or MAP kinase or tyrosine kinase activity (as described above). For example, the GPR86 activity, as measured in a cyclic AMP assay, is quantified by a radioimmunoassay as previously described (26). Results are compared to the baseline level of GPR86 activity obtained from recombinant cells according to the invention in the presence of ADP but in the absence of added modulator compound. Wells showing at least 2 fold, or 5 fold, or 10 fold, or even a 100 fold or more increase or decrease in GPR86 activity as compared to the level of activity in the absence of modulator, are selected for further analysis.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

55

Other Kits Useful According to the Invention

The invention provides for kits useful for screening or detecting for modulators of, including agents that modulate, GPR86 activity, kits for detecting binding to GPR86 as well as kits useful for diagnosis of diseases or disorders characterized by dysregulation of GPR86 signalling. Kits useful according to the invention can include an isolated GPR86 polypeptide (including a membrane- or cell-associated GPR86 polypeptide, e.g., on isolated membranes, cells expressing GPR86, or, on an SPR chip). The kits according to the invention may comprise a ligand, such as ADP. In addition, a kit can further comprise Gα16 polypeptide. A kit can also comprise an antibody specific for GPR86. Alternatively, or in addition, a kit can contain cells transformed to express GPR86 polypeptide. In a further embodiment, a kit according to the invention can contain a polynucleotide encoding a GPR86 polypeptide. In a still further embodiment, a kit according to the invention may comprise the specific primers useful for amplification of GPR86 as described below. Possibly, the kits of the invention comprise means for detecting GPR86 signalling. The detection of agents, modulators, diagnosis or disorder can be performed with an antibody specific for GPR86 or a GPR86-specific nucleic acid probe. In a further embodiment, the kits according to the invention may further comprise a standard of GPR86 activity, for example, a standard as measured in a cell line expressing GPR86 in the presence of a ligand, such as ADP. All kits according to the invention may comprise the stated items or combinations of items and packaging materials therefore. Kits may also include instructions for use.

Transgenic Animals

Transgenic mice provide a useful tool for genetic and developmental biology studies and for the determination of the function of a novel sequence. According to the method of conventional transgenesis, additional copies of normal or modified genes are injected into the male pronucleus of the zygote and become integrated into the genomic DNA of the recipient mouse. The transgene is transmitted in a Mendelian manner in established transgenic strains. Constructs useful for creating transgenic animals comprise genes under the control of either their normal promoters or an inducible promoter, reporter genes under the control of promoters to be analyzed with respect to their patterns of tissue expression and regulation, and constructs containing dominant mutations, mutant promoters, and artificial fusion genes to be studied with regard to their specific developmental outcome. Typically, DNA

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

56

fragments on the order of 10 kilobases or less are used to construct a transgenic animal (Reeves, 1998, *New. Anat.*, 253:19). Transgenic animals can be created with a construct comprising a candidate gene containing one or more polymorphisms according to the invention. Alternatively, a transgenic animal expressing a candidate gene containing a single polymorphism can be crossed to a second transgenic animal expressing a candidate gene containing a different polymorphism and the combined effects of the two polymorphisms can be studied in the offspring animals.

#### Other Transgenic Animals

The invention provides for transgenic animals that include but are not limited to transgenic mice, rabbits, rats, pigs, sheep, horses, cows, goats, etc. A protocol for the production of a transgenic pig can be found in White and Yannoutsos, *Current Topics in Complement Research: 64<sup>th</sup> Forum in Immunology*, pp. 88-94; US Patent No. 5,523,226; US Patent No. 5,573,933; PCT Application WO93/25071; and PCT Application WO95/04744. A protocol for the production of a transgenic mouse can be found in US Patent No. 5,530,177. A protocol for the production of a transgenic rat can be found in Bader and Ganten, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Supp. 3:S81-S87, 1996. A protocol for the production of a transgenic cow can be found in *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc. A protocol for the production of a transgenic rabbit can be found in Hammer et al., *Nature* 315:680-683, 1985 and Taylor and Fan, *Frontiers in Bioscience* 2:d298-308, 1997.

#### Knock Out Animals

##### i. Standard

Knock out animals are produced by the method of creating gene deletions with homologous recombination. This technique is based on the development of embryonic stem (ES) cells that are derived from embryos, are maintained in culture and have the capacity to participate in the development of every tissue in the mouse when introduced into a host blastocyst. A knock out animal is produced by directing homologous recombination to a specific target gene in the ES cells, thereby producing a null allele of the gene. The potential phenotypic consequences of this null allele (either in heterozygous or homozygous offspring) can be analyzed (Reeves, *supra*).

ii. In vivo Tissue Specific Knock Out in Mice Using Cre-lox.

The method of targeted homologous recombination has been improved by the development of a system for site-specific recombination based on the bacteriophage P1 site specific recombinase Cre. The Cre-loxP site-specific DNA recombinase from bacteriophage P1 is used in transgenic mouse assays in order to create gene knockouts restricted to defined tissues or developmental stages. Regionally restricted genetic deletion, as opposed to global gene knockout, has the advantage that a phenotype can be attributed to a particular cell/tissue (Marth, 1996, Clin. Invest. 97: 1999). In the Cre-loxP system one transgenic mouse strain is engineered such that loxP sites flank one or more exons of the gene of interest. Homozygotes for this so called 'floxed gene' are crossed with a second transgenic mouse that expresses the Cre gene under control of a cell/tissue type transcriptional promoter. Cre protein then excises DNA between loxP recognition sequences and effectively removes target gene function (Sauer, 1998, Methods, 14:381). There are now many in vivo examples of this method, including the inducible inactivation of mammary tissue specific genes (Wagner et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:4323).

iii. Bac Rescue of Knock Out Phenotype

In order to verify that a particular genetic polymorphism/mutation is responsible for altered protein function in vivo one can "rescue" the altered protein function by introducing a wild-type copy of the gene in question. *In vivo* complementation with bacterial artificial chromosome (BAC) clones expressed in transgenic mice can be used for these purposes. This method has been used for the identification of the mouse circadian Clock gene (Antoch et al., 1997, Cell 89: 655).

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

58

Materials

Trypsin was from Flow Laboratories (Bioggio, Switzerland). Culture media, G418, foetal bovine serum (FBS), restriction enzymes, Platinum Pfx and Taq DNA polymerases were purchased from Life Technologies, Inc. (Merelbeke, Belgium). The radioactive product myo-D-[2-<sup>3</sup>H]inositol (17.7 Ci/mmol) was from Amersham (Ghent, Belgium). Dowex AG1X8 (formate form) was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.). ATP, ADP, adenosine, ADPβS (adenosine 5'-O-(2-thiodiphosphate)), A2P5P (adenosine 2',5'-diphosphate), A3P5P (adenosine 3',5'-diphosphate), A3P5PS (adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate), UTP, UDP, ITP, IDP, UDP-glucose and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 2-methylthio-ADP (2MeSADP) and 2-methylthio-ATP (2MeSATP) were from Research Biochemicals International (Natick, MA). Forskolin was purchased from Calbiochem. (Bierges, Belgium). Rolipram was a gift from the Laboratories Jacques Logeais (Trappes, France). Monoclonal antibody specific for the dually phosphorylated forms of Erk1 and Erk2 (at Thr<sup>202</sup> and Tyr<sup>204</sup>) was obtained from New England Biolabs (Beverly, MA).

Dosage and Mode of Administration

By way of example, a patient can be treated as follows by the administration of a modulator of GPR86 (for example, an agonist, antagonist or inhibitor of GPR86, of the invention). A modulator of GPR86 the invention can be administered to the patient, for example, in a biologically compatible solution or a pharmaceutically acceptable delivery vehicle, by ingestion, injection, inhalation or any number of other methods. The dosages administered will vary from patient to patient; a "therapeutically effective dose" can be determined, for example but not limited to, by the level of enhancement of function (*e.g.*, as determined in a second messenger assay described herein). Monitoring ADP binding will also enable one skilled in the art to select and adjust the dosages administered. The dosage of a modulator of GPR86 of the invention may be repeated daily, weekly, monthly, yearly, or as considered appropriate by the treating physician.

Pharmaceutical Compositions

The invention provides for compositions comprising a GPR86 modulator according to the invention admixed with a physiologically compatible carrier. As used herein,

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

59

"physiologically compatible carrier" refers to a physiologically acceptable diluent, such as water, phosphate buffered saline, or saline, and further may include an adjuvant. Adjuvants such as incomplete Freund's adjuvant, aluminium phosphate, aluminium hydroxide, or alum are materials well known in the art.

5 The invention also provides for pharmaceutical compositions. In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable carrier preparations which can be used pharmaceutically.

Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral  
10 administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and  
15 processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium carboxymethyl cellulose; and gums including arabic and tragacanth; and proteins such as  
20 gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

Dragee cores are provided with suitable coatings such as concentrated sugar solutions, which may also contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent  
25 mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, i.e., dosage.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating such as glycerol or  
30 sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders such

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

60

as lactose or starches, lubricants such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

5           Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of active compounds. For injection, the pharmaceutical compositions of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hank's solution, Ringer' solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as  
10   sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions of the active solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

15           For nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured in a manner known in the art, e.g. by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levitating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes.

20           The pharmaceutical composition may be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preparation may be a lyophilized powder in 1mM-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, 2%-7% mannitol at a Ph range of 4.5 to 5.5 that  
25   is combined with buffer prior to use.

After pharmaceutical compositions comprising a compound of the invention formulated in a acceptable carrier have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labelled for treatment of an indicated condition with information including amount, frequency and method of administration.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

61

Examples

The invention is illustrated by the following no limiting examples wherein the following materials and methods are employed. The entire disclosure of each of the literature references cited hereinafter are incorporated by reference herein.

5

**Example 1 Cloning and Sequencing**

An intronless coding sequence encoding a novel receptor strongly related to the human P2Y<sub>12</sub> receptor was identified on the genomic clone RP11-25K24 (GenBank accession AC024886) located in the 3q24 region and in the following patent: WO 00/31258; 10 ARENA; sequence number 18.

Specific oligonucleotide primers were synthesized on the basis of the sequence of the GPR86 human receptor: a sense primer 5'-CCGGAATTCACCATGAACACCACAGTGATGC-3' and an antisense primer 5'-CTTGTCTAGATCAGCCTAAGGTTATGTTGTC-3'. A polymerase chain reaction (PCR) 15 was performed on three different spleen cDNAs using the Platinum Pfx DNA Polymerase. The amplification conditions were as follows: 94°C, 15 s; 50°C, 30 s; 68°C, 2 min for 35 cycles. Amplifications resulted in a fragment of 1 kilobase containing the entire coding sequence of the GPR86 gene. The coding sequence was then subcloned and sequenced on both strands for each of the three cDNAs using the BigDye Terminator cycle sequencing kit 20 (Applied Biosystems, Warrington, Great Britain).

This 1002 base pairs (bp)-open reading frame was also identified recently by Wittenberger et al. (GenBank accession AF295368) and reported to encode an orphan G-protein-coupled receptor that they called GPR86 (24). The start codon is preceded by a stop codon 18 bp upstream. Oligonucleotide primers were synthesized on the basis of this coding 25 sequence. They were used in PCR starting from spleen cDNA. A PCR product with a size compatible with GPR86 coding sequence was inserted into an expression vector and sequenced on both strands (Fig. 1). The putative membrane-spanning domains are underlined and numbered I to VII. The putative sites of phosphorylation by protein kinase A or by

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

62

protein kinase C are indicated respectively by a black circle (●) or a black triangle (▲). The potential N-glycosylation sites are indicated by a black square (■).

The sequence obtained matched perfectly to the sequence of Wittenberger et al. amplified from human cDNA libraries from foetal brain and placenta. The 1002 bp-open reading frame starts with an ATG-codon in a Kozak consensus and encodes a protein of 333 amino acids. The peptidic sequence contains three potential sites for N-linked glycosylation (two in the extracellular N-terminal part (N<sup>2</sup> and N<sup>10</sup>) and one in the third extracellular loop (N<sup>264</sup>), two potential sites for phosphorylation by protein kinase C (one in the third intracellular loop (S<sup>217</sup>) and one in the carboxyterminal part (T<sup>304</sup>)) and one by protein kinase A (in the carboxyterminal part (T<sup>315</sup>)) (Fig. 1). The novel receptor displays a significant homology with the human P2Y<sub>12</sub> and UDP-glucose receptors (Fig. 2), 48% and 45% amino acid identity, respectively. The similarity with the other P2Y receptors is much lower (Fig. 2), for example, 25% and 26% amino acid identity with the human P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors, respectively. Alignment of the amino acid sequence of GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) with purinergic receptors (P2Y<sub>1</sub>, -2, -4, -6, -11, -12), UDP glucose receptor and other purinergic related sequences (GPR17, GPR87, H963) were performed using ClustalX algorithm. Then, the dendrogram was constructed using TreeView algorithm (Figure 2).

#### Example 2 Tissue distribution of GPR86 human receptor

GPR86 mRNA was amplified by RT-PCR in several human tissues (Fig. 3A).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments were carried out using a panel of polyA<sup>+</sup> RNA (Clontech). The GPR86 primers were as follows: GPR86 sense primer (5'-TGTGTCGTTTCTTCGCTG-3') and GPR86 antisense primer (5'-CTGCCAAAAGAGAGTTG-3'). The expected size of the amplified DNA band was 575 bp. Two primers synthesized on the basis of aldolase coding sequence were used as controls to produce a product with an expected size of 443 bp: aldolase sense primer 5'-GGCAAGGCATCCTGGCTGC-3' and aldolase antisense reverse 5'-TAACGGGCCAGAACATTGGCATT-3'. Approximately 75 ng of poly A<sup>+</sup> RNA was reverse transcribed with Superscript II (Life Technologies, Inc., Merelbeke, Belgium) and used for PCR. PCR was performed using the Taq polymerase under the following conditions:

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

63

denaturation at 94°C for 3 min, 38 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 2 min and 72°C for 2 min. Aliquots (10 µl) of the PCR reaction were analysed by 1% agarose gel electrophoresis.

RT-PCR experiments were carried out using a panel of polyA<sup>+</sup> RNA (Clontech) and specific primers of GPR86 sequence. The expected size of the amplified GPR86 and aldolase bands were respectively 575 and 443 bp. cDNA (-) indicates the negative control of the PCR reaction without cDNA template. Aliquots (10 µl) of the PCR reaction were analysed by 1% agarose gel electrophoresis. A strong band of the expected size (575 bp) was detected in spleen and brain (adult), and at lower intensity in placenta, lung, liver, spinal cord, thymus, small intestine, uterus, stomach, testis, foetal brain, and adrenal gland, but not in pancreas, heart, kidney, skeletal muscle, ovary, foetal aorta or the negative control without cDNA (Fig. 3A). A 575 bp-band was also clearly detected in lymph node and bone marrow, and weakly detected in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Fig. 3A). No signal was detected in peripheral blood lymphocytes (PBL) and polymorphonuclear cells (PMN) (Fig. 3A). GPR86 messengers were detected in different brain regions (thalamus, caudate nucleus, substantial nigra, hippocampus, cerebellum, corpus callosum and amygdala) (Fig. 3B). The amplification of a fragment of aldolase coding sequence was used as control.

Northern blot analysis with hGPR86 revealed a strong 2.9 kb transcript in spleen and a weaker one in liver, placenta, leukocytes, and brain. Evaluation of the expression of hGPR86 in different brain regions revealed the 2.9 kb transcript as a strong signal in substantial nigra, thalamus, and medulla, less strong in frontal and temporal lobe, putamen, amygdala, caudate nucleus, hippocampus, spinal cord, corpus callosum, and weak in cerebellum and occipital lobe. The transcript was not detectable in the cerebral cortex. The wide spread expression of hGPR86 shown in the Northern blot analysis is reflected by the origin of 16 EST sequences found for this GPCR in the public database, derived from diverse tissues as germ cell tumours, foetal liver, foetal spleen, colon, pregnant uterus and multiple sclerosis lesions. The PCR amplification of hGPR86 from brain and placenta cDNAs is also in agreement with these results (24).

#### Example 3 Stable expression of the novel receptor in 1321N1 astrocytoma cells

The complete sequence of the novel receptor was introduced in an expression vector in order to transfect the 1321N1 astrocytoma cell line, used previously to characterize several

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

64

P2Y subtypes (5, 13, 14). 1321N1 astrocytoma cells expressing  $G\alpha_{16}$  protein were transfected with the recombinant GPR86-plasmid or with the plasmid alone.

CHO-K1 and 1321N1 cells were transfected with the recombinant GPR86-plasmid or with the plasmid alone using the FuGENE<sup>TM</sup>6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals). A clone called AG32 corresponding to 1321N1 cells previously transfected with pERAEQ2 plasmid encoding  $G\alpha_{16}$  (provided by Euroscreen), was transfected. The CHO-K1 and 1321N1 transfected cells were selected with 400  $\mu$ g/ml G418 in complete medium (10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B in respectively Ham's F12 or DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) two days after transfection and maintained in the same medium. The AG32 cells were maintained in the same DMEM complete medium supplemented with 500  $\mu$ g/ml zeocin.

The pool of G418-resistant clones was tested for its functional  $IP_3$  response to several nucleotides, according to the method described above. The cells were challenged by various nucleotides at a concentration of 100  $\mu$ M for 30 s: ATP, ADP, UTP, UDP, ITP, IDP, TDP. No response was obtained in 1321N1 cells expressing GPR86 receptor alone, while a strong  $IP_3$  response to histamine was observed in these cells, but ADP, UDP and IDP induced an  $IP_3$  response in 1321N1 cells expressing both GPR86 receptor and  $G\alpha_{16}$  protein. No  $IP_3$  response was observed for the other nucleotides, except for ATP and 2MeSATP, but these responses were lost after HPLC-purification in this case (data not shown; however, see Example 7). No  $IP_3$  response was observed in response to any nucleotide in 1321N1 or 1321N1- $G\alpha_{16}$  cells transfected with the wild-type expression vector and used as negative control.

In 1321N1 cells expressing both GPR86 receptor and the  $G\alpha_{16}$ , concentration-action curves were established for ADP, IDP and UDP and revealed the strong affinity of GPR86 for ADP. The following range of potency was obtained: ADP >>> IDP > UDP. The affinity of GPR86 for ADP was approximately one thousand-fold greater than that of IDP and UDP. Concentration-action curves for ADP, 2MeSADP and ADP $\beta$ S. The following  $EC_{50}$  values were obtained for ADP, 2MeSADP and ADP $\beta$ S, respectively:  $11.4 \pm 2.2$  nM,  $14.2 \pm 3.0$  nM and  $48.4 \pm 0.4$  nM (mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments) (Fig. 4A). 1321N1 transfected cells were incubated in the presence of various concentrations of ADP, 2MeSADP and ADP $\beta$ S for 30 s. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

65

experimental points obtained in one representative experiment of three. No IP<sub>3</sub> response was obtained for A2P5P (ADP 2',5'-diphosphate), A3P5P (adenosine 3',5'-diphosphate) and A3P5PS (adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate).

5 Effects of 2MeSATP and ATP were obtained at concentrations higher than for the respective diphosphates nucleotides (Fig.4B). 1321N1 transfected cells were pre-incubated with or without 100 ng/ml pertussis toxin for 18 h and then incubated in the presence of ADP (300 nM) or water (CONT) for 30 s. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of two.

10 As discussed previously, commercial nucleotide powders are often contaminated by degradation products (4, 13, 28). Contamination is usually 1% for ATP and about 10% for 2MeSATP (28). 2MeSATP and ATP solutions (1 mM) were treated at room temperature with 20 units/ml CPK and 10mM CP during 90 min. This ATP-regenerating system circumvents problems arising from the contamination and degradation of triphosphate nucleotide solutions (28). In these conditions, the responses to ATP and 2MeSATP were  
15 abolished (Fig. 4B).

An inhibition of  $86 \pm 8\%$  (mean  $\pm$  range of two independent experiments) of the ADP response (300 nM) after a 18 hours pretreatment of the transfected cells with 100 ng/ml pertussis toxin (PTx) was observed (Fig. 4C). 1321N1 transfected cells were pre-incubated with or without 100 ng/ml pertussis toxin (PTx) for 18 h and then incubated in the presence  
20 of ADP (300nM) or control medium (CONT) for 30 s. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of two.

#### Example 4 Stable expression of the novel receptor in CHO-K1 cells

The potential effect of nucleotides was tested on the cAMP pathway in CHO-K1 cells expressing the human GPR86 receptor. Significant inhibitions of the cAMP level were  
25 observed at low concentrations of ADP (Fig. 5A) and 2MeSADP in the presence of forskolin (4  $\mu$ M). CHO-K1 transfected cells were incubated in the presence of various concentrations of ADP and 4  $\mu$ M forskolin for 10 min. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of three and 2MeSADP in the presence of forskolin 4  $\mu$ M. The IC<sub>50</sub> of ADP was  $1.5 \pm 0.6$  nM (mean  $\pm$  S.D. of three  
30 independent experiments) with a maximal inhibition percentage of  $52 \pm 7\%$  at 30 nM (mean

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

66

± S.D. of three independent experiments). A second phase was observed at concentrations higher than 30 nM: the inhibition of adenylyl cyclase decreased and a small increase was observed at 10 μM (Fig. 5A). After an 18h-pretreatment of the transfected CHO-K1 cells with 100 ng/ml pertussis toxin, ADP (100 nM and 100 μM) induced significant increases of the cAMP level (Fig. 5B). CHO-K1 transfected cells were incubated in the presence of various concentrations of ADP and 4 μM forskolin for 10 minutes. The data represent the mean ± S.D. of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of three. CHO-K1 transfected cells were pre-incubated with or without 100 ng/ml pertussis toxin for 18 h and then incubated in the presence of ADP (100 nM and 100 μM) or water (CONT) and 4 μM forskolin for 10 min. The data represent the mean ± S.D. of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of two. The biphasic effect of ADP on adenylyl cyclase has been reproduced in 1321N1 cells transfected with the human GPR86 receptor.

To investigate changes in the activation status of the MAP kinases Erk1 and Erk2 upon stimulation of the human GPR86 receptor, whole CHO-K1 transfected cell extracts were analysed by Western blotting using a specific antibody for the dually phosphorylated kinases (at Thr<sup>202</sup> and Tyr<sup>204</sup>), which are the active forms of Erk. Western Blot Analysis of phosphorylated Erk1 and Erk2 proteins.

GPR86-transfected CHO-K1 cells were seeded at  $1.5 \times 10^6$  cells/dish. After 24 h, the cells were serum-starved for 2 h in KRH buffer. After stimulation with the agonist, the cells were scraped in 1 ml of PBS pH 7.3 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). The cells were recovered by centrifugation and lysed in 150 μl of Laemmli buffer (10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) β-mercaptoethanol, 2.3% (w/v) SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8). The protein concentration was determined using the method of Minamide and Bamberg (27). The same amount of protein for each condition was electrophoresed in a 12% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were then transferred overnight at 60 V and 4°C onto a nitrocellulose membrane using 20 mM Tris, 154 mM glycine, 20% (v/v) methanol as a transfer buffer. Immunodetection was achieved using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) using a biotinylated-secondary mouse antibody (1/25,000). The monoclonal antibody

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

67

specific for the dually phosphorylated forms of Erk1 and Erk2 (at Thr<sup>202</sup> and Tyr<sup>204</sup>) was used at 1/1000-dilution.

In CHO-K1 cells, phosphorylated Erk1 and Erk2 had the predicted molecular mass of 44 and 42 kDa, respectively. Stimulation of the human GPR86 receptor stably expressed in  
5 CHO-K1 cells with 1  $\mu$ M ADP or 2-MeSADP led to a strong phosphorylation of Erk2 (Fig. 6A). GPR86-transfected CHO-K1 cells were stimulated during different times or with various concentrations of ADP and 2MeSADP or water (CONT). The effect of 100 ng/ml pertussis toxin (PTx) has been tested at 5 and 30 min in the presence of 1  $\mu$ M ADP or 2MeSADP. Blotting and immunodetection were achieved as described using the enhanced  
10 chemiluminescence Western blotting detection system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

Erk1 was also weakly phosphorylated. Erk phosphorylation was detected after 1 min of stimulation and increased with time (Fig. 6A). The maximal response was obtained after 5 min of stimulation with ADP or with 2-MeSADP, after which Erk activation slowly decreased to the basal level after 1 h. To determine if endogenous receptors can be  
15 responsible for ADP or 2-MeSADP-dependent Erk activation in CHO-K1 cells, these nucleotides were tested on cells transfected with the empty vector: Erk1 or Erk2 phosphorylation were not observed when CHO-K1 control cells were incubated 5 min, 20 min or 1 h with 1 $\mu$ M of 2-MeSADP or ADP. The concentration-dependence of the Erk phosphorylation induced by ADP was determined at the peak of the transient response (5  
20 min). Stimulation of the human GPR86 receptor with ADP or 2MeSADP (1 nM to 10  $\mu$ M) led to a concentration-dependent phosphorylation of Erk1 and Erk2 (Fig. 6B). A maximal effect was obtained at 1  $\mu$ M, but a significant effect was already observed at 10 nM for both agonists. In order to evaluate the involvement of G<sub>i</sub> protein in these effects, we pre-incubated GPR86-CHO-K1 transfected cells with pertussis toxin (100 ng/ml for 18h) prior to the ADP  
25 (1  $\mu$ M) or the 2-MeSADP (1  $\mu$ M) stimulation. The Erk phosphorylation normally induced by 5 or 30 minutes of ADP or 2-MeSADP treatment was strongly inhibited (Fig. 6B).

The cloning and pharmacological characterization of a novel human G-protein-coupled receptor of the P2Y family, tentatively called P2Y<sub>13</sub>, corresponds to the previously described GPR86 orphan receptor (24). Concerning its sequence, the homology with the  
30 P2Y<sub>1</sub> to P2Y<sub>11</sub> subtypes is restricted to around 25%. On the contrary, the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor displays a significant homology with the human P2Y<sub>12</sub> and UDP-glucose receptors.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

68

The closest G-coupled receptor is the human P2Y<sub>12</sub> receptor (48% amino acid identity) which is also a receptor responsive to ADP. Mutagenesis experiments with the P2Y<sub>2</sub> receptor have identified three positively charged amino acids in the sixth and seventh transmembrane domains (His<sup>262</sup>, Arg<sup>265</sup> and Arg<sup>292</sup>), which play a crucial role in nucleotide binding (presumably by neutralizing the negative charge of the phosphate groups) (28). The first two residues are conserved in the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor respectively at positions 251 and 254. These two residues are also conserved in the P2Y<sub>12</sub> and UDP-glucose receptors. The Arg<sup>292</sup> residue of the P2Y<sub>2</sub> receptor is replaced by a negatively charged glutamate residue in P2Y<sub>12</sub>, GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) and UDP-glucose receptors and could have a great importance for the pharmacology of the receptor.

P2Y<sub>12</sub> and GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptors thus form a subgroup of P2Y receptors, structurally different from the other P2Y receptors and which share a high affinity for their ligand, ADP. The EC<sub>50</sub> value of ADP for the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor is 20 to 1000-fold lower than that of the respective ligands of other P2Y receptors in comparable transfected cell lines. From a pharmacological point of view, the relative affinities of ADP and 2MeSADP allow one to discriminate between the P2Y<sub>12</sub> and GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) subtypes. Similar affinities were observed for the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor, whereas 2MeSADP displays a 10 to 100-fold higher potency than ADP for the P2Y<sub>12</sub> receptor, depending on the expression system (21, 22).

The presence of the G $\alpha_{16}$  protein was necessary to couple the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor to phospholipase C in 1321N1 cells. The strong inhibitory effect of pertussis toxin on the IP<sub>3</sub> accumulation induced by ADP in 1321N1-G $\alpha_{16}$  transfected cells suggests a synergism between G $\alpha_{16}$  and G<sub>i</sub> proteins. Such a phenomenon has been described previously in HEL cells, where Ca<sup>2+</sup> mobilisation by P2Y<sub>2</sub> agonists is inhibited completely by G $\alpha_{16}$  antisense and partially by pertussis toxin (29).

Inhibition of adenylyl cyclase and the stimulation of MAP-kinases (ERK-1 and 2) are transduction mechanisms associated to the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor and involving both G<sub>i</sub> proteins. The biphasic effect of ADP on adenylyl cyclase is reminiscent of what has been observed for other receptors like the  $\alpha_2$  adrenergic receptor (30, 31). At low concentrations of agonist, there was an inhibition of adenylyl cyclase whereas an increase was observed at

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

69

higher concentrations, suggesting the simultaneous coupling to two G-proteins with opposing effects. This simultaneous coupling could be an artefact of surexpression.

Concerning the tissue distribution of the human GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor, a good correlation has been obtained between the present RT-PCR data and the Northern blotting data obtained by Wittenberger et al. (24). The human GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor is especially expressed in human spleen and brain, where it displays a large expression in different brain regions. The P2Y<sub>12</sub> receptor is also detected in the human brain and presents a glial expression pattern. Inhibition of cAMP formation by ADP has been described in rat C6 glioma cells (32) and rat brain capillary endothelial cells (33). In both models 2MeSADP was much more potent than ADP and 2MeSATP had a similar potency to 2MeSADP : these features suggest the involvement of P2Y<sub>12</sub> rather than GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptors. Expression of the GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) receptor in spleen, lymph nodes and bone marrow suggests that it might play a role in haematopoiesis and the immune system.

#### Example 5 Production of a Transgenic Animal

Methods for generating non-human transgenic animals are described herein. DNA constructs can be introduced into the germ line of a mammal to make a transgenic mammal. For example, one or several copies of the construct can be incorporated into the genome of a mammalian embryo by standard transgenic techniques.

In an exemplary embodiment, a transgenic non-human animal is produced by introducing a transgene into the germ line of the non-human animal. Transgenes can be introduced into embryonal target cells at various developmental stages. Different methods are used depending on the stage of development of the embryonic target cell. The specific line(s) of any animal used should, if possible, be selected for general good health, good embryo yields, good pronuclear visibility in the embryo, and good reproductive fitness.

Introduction of the P2Y<sub>13</sub> Receptor protein transgene into the embryo is accomplished by any of a variety of means known in the art such as microinjection, electroporation, or lipofection. For example, an P2Y<sub>13</sub> Receptor protein transgene is introduced into a mammal by microinjection of the construct into the pronuclei of the fertilized mammalian egg(s) to cause one or more copies of the construct to be retained in the cells of the developing mammal(s). Following introduction of the transgene construct into

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

70

the fertilized egg, the egg is incubated *in vitro* for varying amounts of time, or reimplanted into the surrogate host, or both. One common method is to incubate the embryos *in vitro* for about 1 – 7 days, depending on the species, and then reimplant them into the surrogate host.

The progeny of the transgenically manipulated embryos are tested for the presence of  
5 the construct by Southern blot analysis of a segment of tissue. An embryo having one or more copies of the exogenous cloned construct stably integrated into the genome is used to establish a permanent transgenic mammal line carrying the transgenically introduced construct.

Litters of transgenically altered mammals are assayed after birth for the incorporation  
10 of the construct into the genome of the offspring. This is done by hybridizing a probe corresponding to the DNA sequence coding for the fusion protein or a segment thereof onto chromosomal material from the progeny. Those mammalian progeny found to contain at least one copy of the construct in their genome are grown to maturity. The transgenic mammals are bred to produce other transgenic progeny.

15 Transgenic females are tested for protein expression using an art-known assay technique, e.g. a Western blot or enzymatic assay.

#### Example 6 GPR86 activity

The activity of GPR 86 can be detected or measured as follows: Recombinant mammalian cells, for example 1321N1 astrocytoma or CHO-K1 cells, stably transfected with a suitable  
20 GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) expression vector, are plated out onto tissue culture plates as described in examples 3 and 4. At the appropriate cell density, usually between 50-75% confluency, the culture media is replaced with a KRH buffer solution (Krebs-Ringer Hepes: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.45 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM Hepes pH:7.4 and 8 mM glucose) containing ADP ligand (for example, in the range of 1 nM to 1 μM) and the  
25 cells are incubated for an additional 30 s at 37°C degrees. After this incubation, the cells are washed and lysed. The activity of GPR86 in this cellular extract in the absence or presence of ADP ligand is determined by detecting the associated activity of downstream second messengers such as cAMP, MAP kinase/ERK phosphorylation and IP<sub>3</sub> as described in examples 3 and 4. GPR86 activity is defined as a two fold or greater increase in ERK  
30 phosphorylation or two fold or greater decrease in cAMP levels in the absence versus the

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

71

presence of ADP. Activity is also defined by a two fold or greater change in second messenger levels in the presence versus the absence of an optimal concentration of the ligand ADP.

**Example 7** Partial agonist effect of ATP and 2MeSATP.

- 5** The present invention relates, in part, to the activation of GPR86 by ADP, or analog or equivalent molecule such as 2MeSADP, ADP $\beta$ S, or any of the ADP analogs taught in U.S. Pat. No. 5,700,786. Accordingly, two ADP analogs, ATP and 2MeSATP, were tested on AG32 cells transfected with the human P2Y<sub>13</sub> receptor as described above. AG32 cells are 1321N1 cells transfected with Ga<sub>16</sub> protein.
- 10** AG32 cells were seeded ( $2 \times 10^5$  cells per dish) on 35 mm (diameter) Petri dishes and labelled for 24h with  $5 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-myoinositol in inositol free DMEM containing 5% fetal calf serum, antibiotics, amphotericin, sodium pyruvate, and  $400 \mu\text{g/ml}$  of G418. Cells were incubated for 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH) buffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.45 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM Hepes (pH 7.4) and 8 mM D-glucose).
- 15** The cells were then incubated in presence of ADP, ATP or 2MeSATP for 30 s. The incubation was stopped by the addition of 1 ml of an ice-cold 3% perchloric acid solution. Prior to the stimulation, ATP and 2MeSATP (1 mM solutions) were incubated for 90 min at room temperature with 20 units/ml creatine phosphokinase (CPK) and 10 mM creatine phosphate (CP). The reaction was stopped by addition of 10 mM iodoacetamide.
- 20** After treatment with creatine phosphate and creatine phosphokinase, ATP and 2MeSATP revealed to be partial agonists of the human P2Y<sub>13</sub> receptor. Figure 8 shows the concentration response curve of GPR86 activation stimulated by the ADP analogs ATP and 2MeSATP. Data is shown as agonist concentration plotted against [ $^3\text{H}$ ]IP<sub>3</sub> counts per minute. ATP and 2MeSATP stimulated GPR86 receptor activity with an EC<sub>50</sub> of  $4.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$  and
- 25**  $1.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , respectively. The data represent the mean  $\pm$  the standard deviation of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of three.

**Example 8** Diadenosine polyphosphates activity.

The ADP analogs Ap3A, Ap4A, Ap5A and Ap6A were tested on AG32 cells transfected with the human P2Y<sub>13</sub> receptor as described above.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

72

AG32 cells were seeded ( $2 \times 10^5$  cells per dish) on 35 mm (diameter) Petri dishes and labeled for 24h with  $5\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-myoinositol in inositol free DMEM containing 5% fetal calf serum, antibiotics, amphotericin, sodium pyruvate, and 400  $\mu\text{g/ml}$  of G418. Cells were incubated for 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH) buffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.45 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM Hepes (pH 7.4) and 8 mM D-glucose). The cells were then incubated in presence of two different concentrations (100 nM and 10  $\mu\text{M}$ ) of ADP or  $\text{Ap}_n\text{A}$  ( $n = 3-6$ ) for 30 s, respectively. The incubation was stopped by the addition of 1 ml of an ice-cold 3% perchloric acid solution.

After 30 s of incubation, the effect of  $\text{Ap}_3\text{A}$  on  $\text{IP}_3$  accumulation was almost equal to that of ADP (Figure 9) as measured by production of [ $^3\text{H}$ ]IP<sub>3</sub>. In contrast,  $\text{Ap}_4\text{A}$ ,  $\text{Ap}_5\text{A}$  and  $\text{Ap}_6\text{A}$  were inactive. The data represent the mean  $\pm$  the standard deviation of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of three.

#### Example 9 Poly[A] activity.

Poly[A] and Poly[A].[G] were tested on AG32 cells transfected with the human P2Y<sub>13</sub> receptor as described above. The present inventors considered that these compounds could be used in dendritic cell vaccination therapy as targets of human P2Y<sub>13</sub> receptor.

AG32 cells were seeded ( $2 \times 10^5$  cells per dish) on 35 mm (diameter) Petri dishes and labeled for 24h with  $5\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-myoinositol in inositol free DMEM containing 5% fetal calf serum, antibiotics, amphotericin, sodium pyruvate, and 400  $\mu\text{g/ml}$  of G418. Cells were incubated for 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH) buffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.45 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM Hepes (pH 7.4) and 8 mM D-glucose). The cells were then incubated in presence of ADP (as an indicator of optimal stimulation), poly[A] or poly[A].[G], respectively, for 30 s. The incubation was stopped by the addition of 1 ml of an ice-cold 3% perchloric acid solution. For comparative purposes, before incubating the cells, Poly[A] and Poly[A].[G] (1 mM solutions) were incubated for 90 min at room temperature with 20 units/ml creatine phosphokinase (CPK) and 10 mM creatine phosphate (CP), after which the reaction was stopped by addition of 10 mM iodoacetamide. Figure 10 shows the concentration-response curve for activation of human GPR86 with Poly[A] and Poly[A].[G].

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

73

After treatment with creatine phosphate and creatine phosphokinase, Poly[A] was still able to activate GPR86, albeit with a lower  $EC_{50}$  ( $205 \pm 60 \mu\text{M}$ ). However, Poly[A].[G] was no longer active on human GPR86 (data shown in Figure 10). Concentration of Poly[A] and Poly[A].[G] were expressed in AMP equivalents. The data represent the mean  $\pm$  the standard deviation of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of three.

**Example 10** Antagonist activity of Reactive Blue 2, Suramine, PPADS and MRS-2179.

Antagonist were tested on AG32 cells transfected with human GPR86. AG32 cells were seeded ( $2 \times 10^5$  cells per dish) on 35 mm (diameter) Petri dishes and labelled for 24h with  $5 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-myo-inositol in inositol free DMEM containing 5% fetal calf serum, antibiotics, amphotericin, sodium pyruvate, and  $400 \mu\text{g/ml}$  of G418. Cells were incubated for 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH) buffer (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.45 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM Hepes (pH 7.4) and 8 mM D-glucose). Prior to the stimulation, cells were pre-incubated for 10 min in presence of Reactive Blue 2 (RB-2), Suramine, PPADS or MRS-2179. The cells were then incubated in presence of ADP 100 nM for 30 s. The incubation was stopped by the addition of 1 ml of an ice-cold 3% perchloric acid solution. Figure 11 shows the concentration-response curve for GPR86 activation by ADP in the presence of the antagonist compounds. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experimental points obtained in one representative experiment of three.

The following table contains the  $IC_{50}$  for the respective compounds.

**20** Potencies of antagonist in human  $P2Y_{13}$ -AG32 cells.

Value represent the means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

Antagonist	$IC_{50}$
Reactive Blue 2	$1.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$
Suramine	$2.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$
PPADS	$11.7 \pm 0.9 \mu\text{M}$
MRS-2179	$> 100 \mu\text{M}$

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

74

**Example 11**Screening for modulators of GPR86 activity

Candidate modulators of GPR86 can be identified as follows: The assay described in Example 6 provides a premise for screening different candidate compounds for 'modulating' activity of GPR86. According to this scenario, GPR86 stably transfected cells are co-incubated with an appropriate concentration of ADP ligand (for example, in the range from 1nM to 1µM) and different concentrations of an agonist, inverse agonist, antagonist or other candidate modulator compound (for example, in the range from 0.1 nM to 1 µM or more). After incubation at room temperature, the cells are washed and lysed. Aliquots of cell extract are then tested in second messenger assays (as described previously in examples 3, 4 and 6). In this manner, the effect of modulator compounds on GPR86 activity can be measured by determining the activity of downstream second messengers in the presence or absence of a candidate modulator compound under optimal test conditions of ADP ligand concentration, buffer composition, incubation time and temperature. The assay can also be performed in a high throughput format (as described in the kit section) to simultaneously test multiple candidate modulators at a variety of concentrations. GPR86 activity, in the presence of an optimal concentration of ADP, is determined by detecting any change in second messenger levels in the presence versus the absence of candidate modulator compound at a defined concentration.

**20 Other Embodiments**

Other embodiments will be evident to those of skill in the art. It should be understood that the foregoing detailed description is provided for clarity only and is merely exemplary. The spirit and scope of the present invention are not limited to the above examples, but are encompassed by the following claims.

25

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

75

References

1. Abbraccio, M.P. and Burnstock, G. (1994) *Pharmacol. Ther.* 64, 445-475.
2. Fredholm, B.B. et al. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 79-82.
3. Webb, T.E. et al. (1993) *FEBS Lett.* 324, 219-225.
- 5 4. Léon, C. et al. (1997) *FEBS Lett.* 403, 26-30.
5. Communi, D. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31969-31973.
6. Lustig, K.D. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5113-5117.
7. Parr, C.E. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3275-3279.
8. Bogdanov, Y. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12583-12590.
- 10 9. Boyer, J.L. et al. (2000) *Mol. Pharmacol.* 57, 805-810.
10. Webb, T.E. et al. (1996) *Mol. Pharmacol.* 50, 258-265.
11. Chang, K. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 26152-26158.
12. Communi, D. et al. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 303-308.
13. Nicholas, R.A. et al. (1996) *Mol. Pharmacol.* 50, 224-229.
- 15 14. Communi, D. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 30849-30852.
15. Nguyen, T. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 30845-30848.
16. Webb, T.E. et al. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 105-110.
17. Akbar, G.K.M. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 18363-18367.
18. Yokomizo, T. et al. (1997) *Nature* 387, 620-624.
- 20 19. Li, Q. et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 455-460.
20. Janssens, R. et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 106-112.
21. Zhang, F.L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (11), 8608-8615.
22. Hollopeter, G. et al. (2001) *Nature* 409, 202-207.
23. Chambers, J.K. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275 (15), 10767-10771.
- 25 24. Wittenberger, T. et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 307, 799-813.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

76

25. Communi, D. et al. (1995b). *Circ. Res.*, 76, 191-198.
26. Brooker, G. et al. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10, 1-33.
27. Minamide, L.S. and Bamberg, J.R. (1990) *Anal. Biochem.* 190, 66-70.
28. Erb, L. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 4185-4188.
- 5 29. Baltensperger, K. and Porzig, H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 10151-10159.
30. Eason, M.G. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (22), 15795-15801.
31. Chabre, O. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (8), 5730-5734.
32. Boyer, J.L. et al. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 1140-1146.
33. Simon, J. et al. (2001) *Br. J. Pharmacol.* 132, 173-182.
- 10 34. Gudermann et al. (1995) *J. Mol. Med.* 73, 51-63.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

77

Claims

1. A method for detecting GPR86 activity in a sample comprising the steps of:
  - a) incubating a sample comprising GPR86 and ADP under conditions which  
5 permit binding of GPR86 and ADP, and
  - b) detecting a second messenger.
2. The method of claim 1 further comprising the steps of:
  - a) incubating a second sample comprising GPR86 in the absence of ADP under  
10 conditions which permit binding of GPR86 and ADP, and
  - b) detecting a second messenger.
3. The method according to any of claims 1 or 2 wherein said sample comprises cells  
expressing GPR86.
- 15 4. The method according to any of claims 1 or 2 wherein said sample comprises cell  
membranes bearing GPR86.
5. The method according to of any one of claims 1 or 2 wherein said incubating is  
20 performed in or on virus-induced budding membranes containing a GPR86  
polypeptide.
6. The method according to any of claims 1 to 5, wherein step a) is further performed in  
the presence of G $\alpha$ 16 polypeptide.
- 25 7. A method of screening for a candidate modulator of GPR86 activity using cells  
expressing GPR86, said method comprising:
  - a) incubating a first sample of said cells in the presence of said candidate  
30 modulator and a second sample of said cells in the absence of said candidate  
modulator, both said samples under conditions which permit binding of ADP to  
GPR86;
  - b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in said first and second  
samples, and

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

78

- c) comparing the results of said second messenger assays for said first and second samples.
8. A method of screening for a candidate modulator of GPR86 activity using cell membranes bearing GPR86, said method comprising:
- 5 a) incubating a first sample of said cell membranes in the presence of said candidate modulator and a second sample of said cell membranes in the absence of said candidate modulator, both said samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86;
- 10 b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in said first and second samples, and
- c) comparing the results of said second messenger assays for said first and second samples.
- 15 9. A method for determining if a candidate modulator increases or decreases the activity of GPR86 using cells expressing GPR86, said method comprising:
- a) incubating a first sample of said cells in the presence of said candidate modulator and a second sample of said cells in the absence of said candidate modulator, both said samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86;
- 20 b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in said first and second samples, and
- c) comparing the results of said second messenger assays for said first and second samples.
- 25 10. A method for determining if a candidate modulator increases or decreases the activity of GPR86 using cell membranes bearing GPR86, said method comprising:
- a) incubating a first sample of said cell membranes in the presence of said candidate modulator and a second sample of said cell membranes in the absence of said candidate modulator, both said samples under conditions which permit binding of ADP to GPR86;
- 30 b) detecting a signalling activity of GPR86 polypeptide in said first and second samples, and

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

79

- c) comparing the results of said second messenger assays for said first and second samples.
- 11 A method of detecting the presence, in a sample, of an agent that modulates the function of GPR86, said method comprising:
- 5 a) contacting a GPR86 polypeptide with said sample;
- b) measuring a signalling activity of said GPR86 polypeptide in the presence of said sample; and
- 10 c) comparing said activity measured in the presence of said sample to said activity measured in a reaction in which said GPR86 polypeptide is contacted with a ADP present at its  $EC_{50}$ , wherein an agent that modulates the function of GPR86 is detected if the amount of said activity measured in the presence of said sample is at least 50% of the amount induced by said ADP present at its  $EC_{50}$ .
- 15 12. A method of identifying an agent that modulates the function of GPR86, said method comprising:
- a) contacting a GPR86 polypeptide with ADP in the presence and absence of a candidate modulator under conditions permitting the binding of said ADP to said GPR86 polypeptide; and
- 20 b) measuring the binding of said GPR86 polypeptide to said candidate modulator, relative to the binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as an agent that modulates the function of GPR86.
13. The method according to any of claims 11 or 12 wherein said GPR86 is expressed by
- 25 cells.
14. The method according to any of claims 11 or 12 wherein said GPR86 is present in cell membranes.
- 30 15. The method according to any of claims 11 or 12, wherein said GPR86 is present in or on virus-induced budding membranes.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

80

16. The method according to any of claims 1, 2, 3, 6, 7, 9 or 13 wherein said cells are selected from the group consisting of: COS7-cells, a CHO cell, a LM (TK-) cell, a NIH-3T3 cell, HEK-293 cell, K-562 cell and a 1321N1 astrocytoma cell and other cell lines.
- 5
17. The method according to any of claims 7 to 16, further performed in the presence of Ga16 polypeptide.
18. The method according to any of claims 1 to 17 wherein said measuring or said detecting is performed using a method selected from label displacement, surface plasmon resonance, fluorescence resonance energy transfer, fluorescence quenching, and fluorescence polarization.
- 10
19. The method according to any of claims 7-18 wherein said agent or said candidate modulator is selected from the group consisting of a natural or synthetic peptide, a polypeptide, an antibody or antigen-binding fragment thereof, a lipid, a carbohydrate, a nucleic acid, and a small organic molecule.
- 15
20. The method according to any of claims 7 to 19 wherein said detecting or said step of measuring a signalling activity of said GPR86 polypeptide comprises detecting a change in the level of a second messenger.
- 20
21. The method according to any of claims 7 to 20 wherein the step of detecting a signalling activity or said measuring a signalling activity comprises measurement of guanine nucleotide binding or exchange, adenylate cyclase activity, cAMP, protein kinase C activity, phosphatidylinositol breakdown, diacylglycerol, inositol triphosphate, intracellular calcium, arachinoid acid concentration, MAP kinase activity, tyrosine kinase activity, reporter gene expression.
- 25
22. The method of claim 21 wherein said measuring a signalling activity comprises using an aequorin-based assay.
- 30

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

81

23. A method of modulating the GPR86 activity of a polypeptide in a cell, said method comprising the step of delivering to said cell an agent that modulates the GPR86 activity of a polypeptide, such that the GPR86 activity is modulated.
- 5 24. A non-human mammal comprising a partial or total deletion of the ortholog sequence of the human polynucleotide (SEQ ID NO.1), such as a non-human mammal comprising a homologous recombinant knockout of said polynucleotide or a transgenic non-human mammal overexpressing above natural level said polynucleotide.
- 10 25. An antibody specific for a GPR86 polypeptide.
26. A method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, said method comprising:
- 15 a) contacting a tissue sample with an antibody specific for a GPR86 polypeptide;  
b) detecting binding of said antibody to said tissue sample; and  
c) comparing the binding detected in step (b) with a standard, wherein a difference in binding relative to said standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
- 20 27. A method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, said method comprising:
- a) contacting a tissue sample with an antibody specific for a GPR86 specific ligand;
- 25 b) detecting binding of said antibody to said tissue sample; and  
c) comparing the binding detected in step (b) with a standard, wherein a difference in binding relative to said standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
- 30 28. A method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, said method comprising:
- a) contacting a tissue sample with an antibody specific for a GPR86 polypeptide and an antibody specific for a GPR86-specific ligand;

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

82

- b) detecting binding of said antibodies to said tissue sample; and
  - c) comparing the binding detected in step (b) with a standard, wherein a difference in the binding of either antibody or both, relative to said standard, is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
- 5
29. A method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, said method comprising:
- a) isolating nucleic acid from a tissue sample;
  - b) amplifying a GPR86 polynucleotide, using said nucleic acid as a template; and
  - 10 c) comparing the amount of amplified GPR86 polynucleotide produced in step (b) with a standard, wherein a difference in said amount of amplified GPR86 polynucleotide relative to said standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
- 15
30. A method of diagnosing a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, said method comprising:
- a) isolating nucleic acid from a tissue sample;
  - b) amplifying a GPR86-specific ligand polynucleotide, using said nucleic acid as a template; and
  - 20 c) comparing the sequence of said amplified GPR86-specific ligand polynucleotide produced in step (b) with a standard, wherein a difference in said sequence, relative to said standard is diagnostic of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
- 25
31. The method of claim 29 wherein said standard is SEQ ID NO: 1.
32. The method of claim 26-31 wherein said comparing is performed on a microarray.
33. A kit for detecting binding to GPR86 or a modulator of GPR86, said kit comprising GPR86 and ADP, and packaging materials therefore, wherein said GPR86 and ADP are packaged separately.
- 30
34. The kit of claim 33, wherein GPR86 is present in a cell.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

83

35. The kit of claim 34 wherein said cell is selected from the group consisting of: COS7-cells, a CHO cell, a LM (TK-) cell, a NIH-3T3 cell, HEK-293 cell, K-562 cell and a 1321N1 astrocytoma cell and other cell lines.
- 5
36. The kit of claim 33, wherein GPR86 is associated with a cell membrane.
37. The kit according to any of claims 33-36, said kit further comprising the components of a second messenger assay.
- 10
38. The kit according to any of claims 33-37, wherein the modulator is detected using an antibody specific for GPR86 or a GPR86-specific nucleic acid probe.
39. The kit according to any of claims 33-38, said kit further comprising Gα16
- 15 polypeptide.
40. A kit for screening for agents that modulate the signalling activity of GPR86, said kit comprising an isolated polynucleotide encoding a GPR86 polypeptide and means for detecting GPR86 signalling, and packaging materials therefore.
- 20
41. The kit of claim 40, further comprising a ligand, such as ADP.
42. A kit for screening for agents that modulate the signalling activity of GPR86, said kit comprising a cell transformed with a polynucleotide encoding a GPR86 polypeptide
- 25 and means for detecting GPR86 signalling, and packaging materials therefore.
43. The kit of claim 40-42, wherein the said agents are detected using an antibody specific for GPR86 or a GPR86-specific nucleic acid probe.
- 30 44. A kit for the diagnosis of a disease or disorder characterized by dysregulation of GPR86 signalling, said kit comprising an isolated GPR86 polypeptide and means for detecting GPR86 signalling, and packaging materials therefore.

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

84

45. The kit of claim 44, wherein the said diagnosis or disorder is detected using an antibody specific for GPR86 or a GPR86-specific nucleic acid probe.
46. The kit according to any of of claims 33-45 further comprising a standard of GPR86 activity as measured in a cell line expressing GPR86 in the presence of ADP.
47. The candidate modulator of GPR86 activity, which is obtainable by using the method according to any of the claims 7-15.
48. The candidate modulator of GPR86 activity according to claim 47, wherein said candidate modulator is ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP $\beta$ S, Ap<sub>3</sub>A, RB-2, Suramine or PPADS.
49. The candidate modulator of GPR86 activity according to claim 47 or 48, or the antibody according to claim 25 for use as a pharmaceutical composition for preventing, treating and/or alleviating diseases or disorders characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
50. Use of the candidate modulator of GPR86 activity according to claim 47 or 48, or the antibody according to claim 25 for the manufacture of a pharmaceutical composition for preventing, treating and/or alleviating diseases or disorders characterized by dysregulation of GPR86 signalling.
51. Use of the candidate modulator of GPR86 activity of claim 50 or the antibody according to claim 25 for the manufacture of a pharmaceutical composition for preventing, treating and/or alleviating diseases or disorders characterized by dysregulation of GPR86 signalling, such as, for example diseases or disorders selected from the group consisting of ostatic hypertrophy, migraine, vomiting, psychotic and neurological disorders, including anxiety, depression, schizophrenia, maniac depression, delirium, dementia and severe mental retardation, degenerative diseases, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, and dyskinasias, such as Huntington's disease or Gilles de la Tourett's syndrome and other related diseases including thrombosis and other cardiovascular

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

85

- diseases, autoimmune and inflammatory diseases, fertility dysfunctions, foetal developmental disorders, infections such as bacterial, fungal, protozoan and viral infections, such as infections caused by HIV1 and HIV2, pain, cancer, anorexia, bulimia, asthma, acute heart failure, hypertension, urinary retention, osteoporosis, angina pectoris, myocardial infarction, ulcers, asthma, allergies, benign prostatic hypertrophy, and stroke.
52. A method for the production of a pharmaceutical composition comprising the steps of admixing the candidate modulator according to any of claims 47 to 49 or the antibody according to claim 25, with a pharmaceutical carrier.
53. A pharmaceutical composition comprising the candidate modulator according to any of claims 47 to 49, or the antibody according to claim 25.
54. The method or the kit according to any of claims 1 to 23, 33 to 39, 41 or 46, wherein ADP is replaced by ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADP $\beta$ S or Ap3A.
55. The method or the kit according to any of claims 7 to 23, 33 to 39, 41 or 46, wherein ADP is replaced by RB-2, Suramine or PPADS.

FIG. 1A	45
FIG. 1B	15
FIG. 1C	30

1 ATG AAC ACC ACA GTG ATG CAA GGC TTC ATC AGA TCT GAG CGG TGC 45  
1 M N T V M Q G F N R S E R C 15  
46 CCC AGA GAC ACT CGG ATA GTA CAG CTG GTA TTC CCA GCC CTC TAC 90  
16 P R D T R I V Q L V F P A L Y 30  
91 ACA GTG GTT TTC TTG ACC GGC ATC CTG CTG AAT ACT TTG GCT CTG 135  
31 T V V F L F G I L L N T L A L 45  
136 TGG GTG TTT GTT CAC ATC CCC AGC TCC ACC TTC ATC ATC TAC 180  
46 W V F V H I P S S S T F I I Y 60  
181 CTC AAA AAC ACT TTG GTC GCC GAC TTG ATA ATG ACA CTC ATG CTT 225  
61 L K N T L V A D L I M T L M L 75  
226 CCT TTC AAA ATC CTC TCT GAC TCA CAC CTG GCA CCC TGG CAG CTC 270  
76 P F K I L S D S H L A P W Q L 90  
271 AGA GCT TTT GTG TGT CGT TTT TCT TCG GTA ATA TTT TAT GAG ACC 315  
91 R A F V C R F S S V I F Y E T 105

FIG. 1A

316 ATG TAT GTG GGC ATC GTG CTG TTA GGG CTC ATA GCC TTT GAC AGA 360  
 106 M Y V G I V L L G L I A F D R 120  
 III  
 361 TTC CTC AAG ATC ATC AGA CCT TTG AGA AAT ATT TTT CTA AAA AAA 405  
 121 F L K I I R P L R N I F L K K 135  
 406 CCT GTT TTT GCA AAA ACG GTC TCA ATC TTC ATC TGG TTC TTT TTG 450  
 136 P V F A K T V S I F I W F F L 150  
 IV  
 451 TTC TTC ATC TCC CTG CCA AAT ATG ATC TTG AGC AAC AAG GAA GCA 495  
 151 F I S L P N M I L S N K E A 165  
 496 ACA CCA TCG TCT GTG AAA AAG TGT GCT TCC TTA AAG GGG CCT CTG 540  
 166 T P S S V K K C A S L K G P L 180  
 541 GGG CTG AAA TGG CAT CAA ATG GTA AAT AAC ATA TGC CAG TTT ATT 585  
 181 G L K W H Q M V N N I C Q F I 195  
 586 TTC TGG ACT GTT TTT ATC CTA ATG CTT GTG TTT TAT GTG GTT ATT 630  
 196 F W T V F I L M L V F Y V V I 210  
 V  
 631 GCA AAA AAA GTA TAT GAT TCT TAT AGA AAG TCC AAA ACT AAG GAC 675  
 211 A K K V Y D S Y R K S K S K D 225

FIG. 1B

676 AGA AAA AAC AAC AAA ARG CTG GAA GGC AAA GTA TTT GTT GTC GTC 720  
 226 R K N N K K L E G K V F V V V 240

721 GCT GTC TTC TTT CTG TGT TTT GCT CCA TTT CAT TTT GCC AGA GTT 765  
 241 A V F F V C F A P F H F A R V 255

VI

766 CCA TAT ACT CAC AGT CAA ACC AAC AAT ARG ACT GAC TGT AGA CTG 810  
 256 P Y T H S Q T N N K T D C R L 270

811 CAA AAT CAA CTG TTT AAT GCT AAA GAA ACA ACT CTC TTT TTG GCA 855  
 271 Q N Q L F I A K E T T L F L A 285

856 GCA ACT AAC AAT TGT ATG GAT CCC TTA ATA TAC ATA TTC TTA TGT 900  
 286 A T N I C M D P L I Y I F L C 300

VII

901 AAA AAA TTC ACA GAA AAG CTA CCA TGT ATG CAA GGG AGA AAG ACC 945  
 301 K K F T E K L P C M Q G R K T 315

946 ACA GCA TCA AGC CAA GAA AAT CAT AGC AGT CAG ACA GAC AAC ATA 990  
 316 T A S S Q E N H S S Q T D N I 330

991 ACC TTA GGC TGA 1002  
 331 T L G \* 334

FIG. 1C

4/17

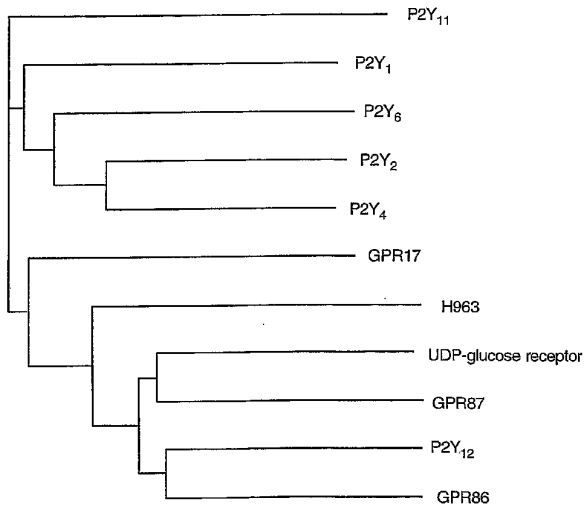


FIG. 2

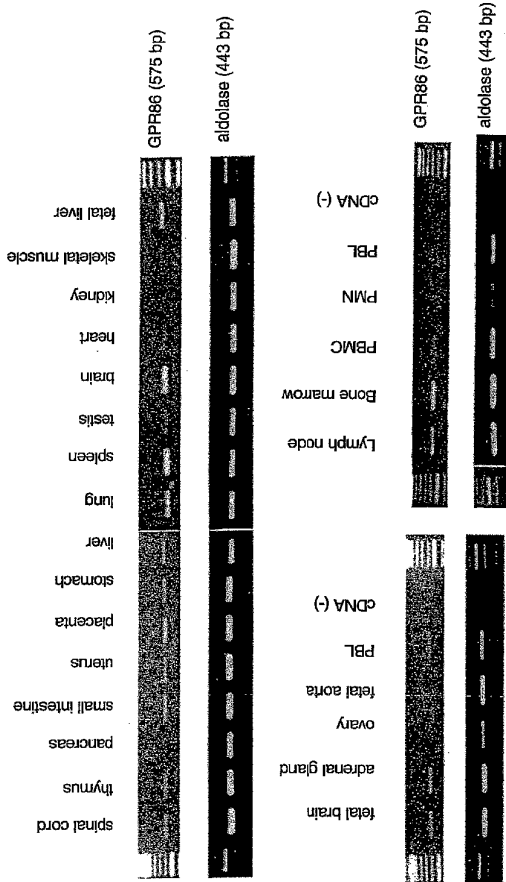


FIG. 3A

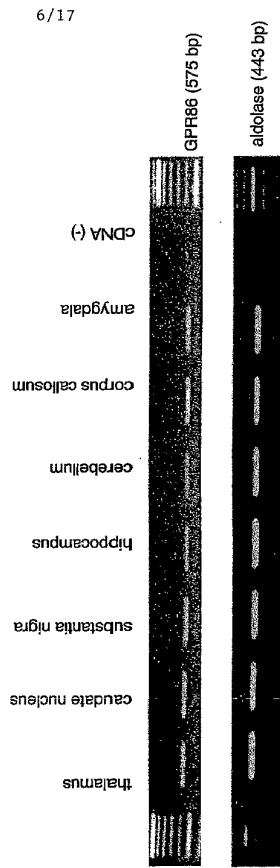


FIG. 3B

7/17

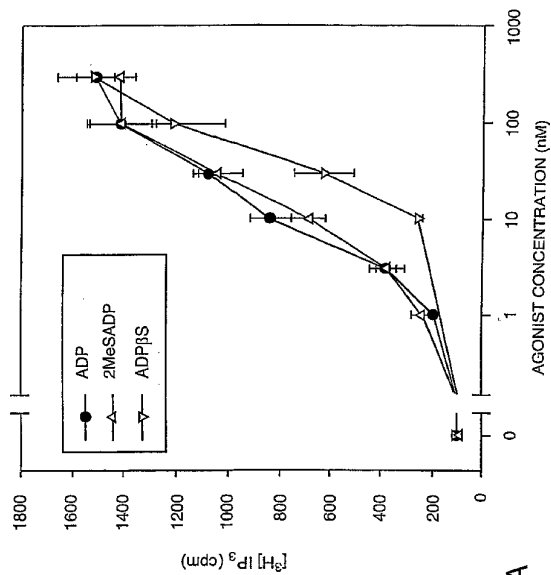


FIG. 4A

8/17

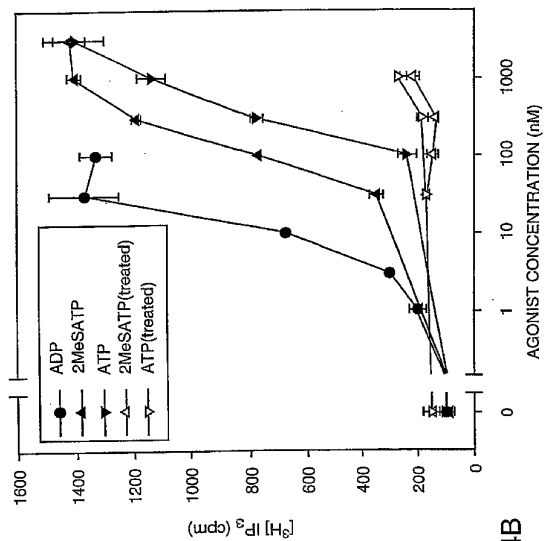


FIG. 4B

9/17

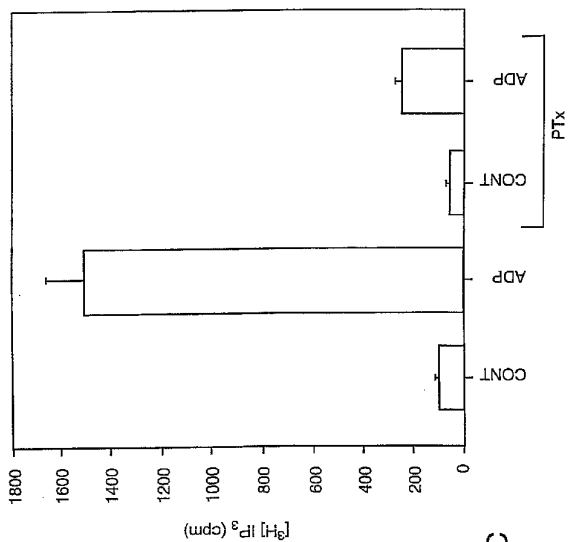


FIG. 4C

10/17

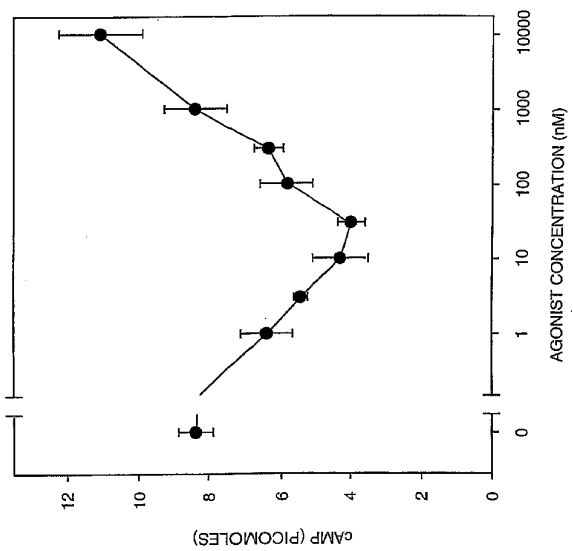


FIG. 5A

11/17

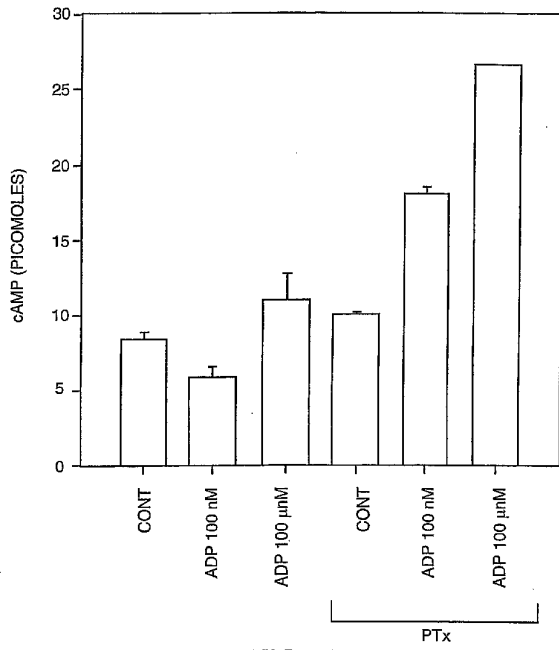


FIG. 5B

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

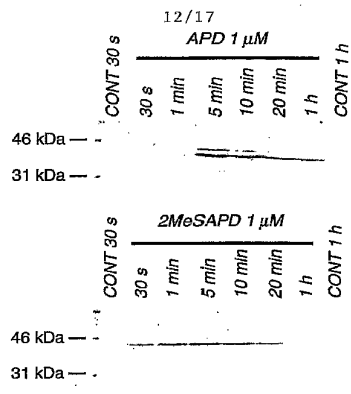


FIG. 6A

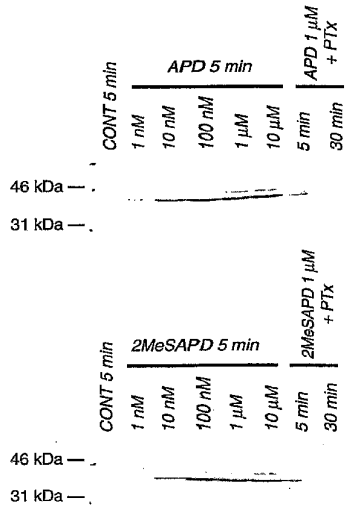
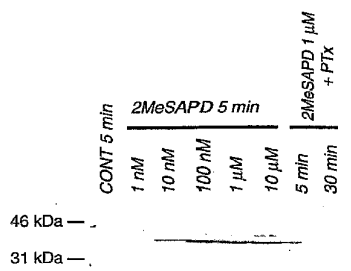


FIG. 6B



13/17

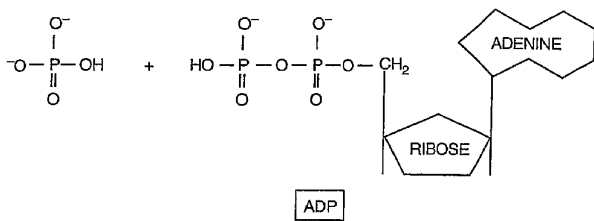


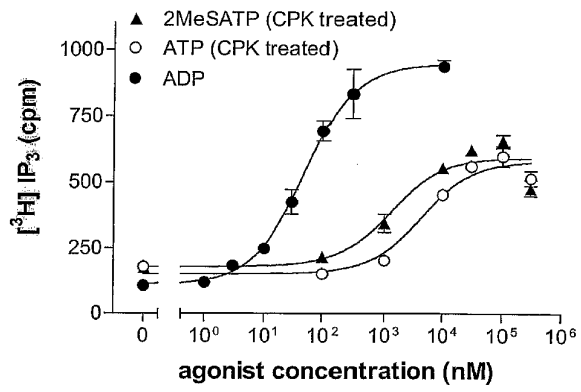
FIG. 7

WO 03/014731

PCT/EP02/08761

Figure 8.

14/17



WO 03/014731

PCT/EP02/08761

Figure 9.

15/17

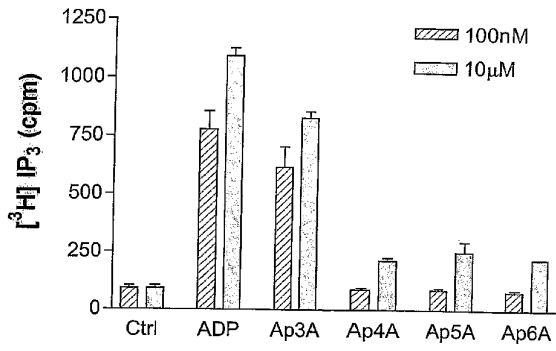
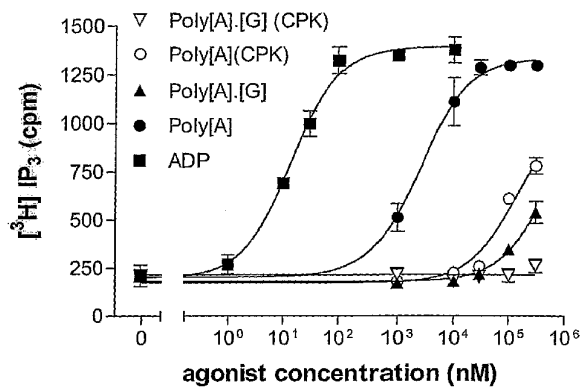


Figure 10.

16/17

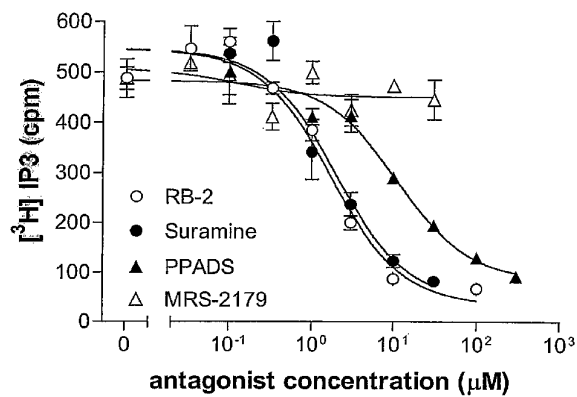


WO 03/014731

PCT/EP02/08761

Figure 11.

17/17



## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/014731 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/48, 33/68, C07K 14/47, 14/705, 14/72 (BE) LANNON, Vincent, Route de Perwez 93, B-5310 Lierne (BE). PARMENTIER, Marc, Laarbeidestraat 160, B-1650 Beersel (BE). BOEYNAEMS, Jean-Marie, Avenue Peter Benoit 5, B-1780 Wemmel (BE).
- (21) International Application Number: PCT/EP2002/008761 (74) Agents: DE CLERCQ, Ann et al., De Clercq, Brants & Partners, E. Gevaertdreef 10 a, B-Belgium Sint-Martens-Latem (BE).
- (22) International Filing Date: 6 August 2002 (06.08.2002) (81) Designated States (national): CA, JP.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/924,125 7 August 2001 (07.08.2001) US  
Published: with international search report
- (71) Applicant: EUROSREEN S.A. [BE/BE]; 802 Route de Lennik, Building C, B-1070 Bruxelles (BE). (88) Date of publication of the international search report: 19 February 2004
- (72) Inventors: COMMUNI, Didier; Baron de Vironlaan 34, B-1700 Dilbeek (BE). SUAREZ, Nathalie; Rue Martin Van Lier 8, B-1070 Bruxelles (BE). DETHIUX, Michel; Chemin de l'Oasis 2b, B-7000 Mons (BE). BREZILLON, Stéphane; Rue de l'Enseignement 56, B-1000 Bruxelles
- 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 2003/014731 A3

(54) Title: THE NATURAL LIGAND FOR ORPHAN G PROTEIN COUPLED RECEPTOR GPR86 AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention is related to the G protein coupled receptor GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) and any homologous sequence thereto, recombinant cells comprising the nucleotide sequence encoding the receptor, and the identification of the natural ligand, ADP, and equivalent molecules to be used in screening assays for identification of agonists, inverse agonists or antagonist compounds useful for the development of new drugs and the improvement of various disease diagnostics. The present invention further relates to the identification of ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADPBS, Ap3A, RB-2, Suramine and PPADS as modulators of GPR86 activity.

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/014731 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/48, B-1650 Beersel (BE), BOEYNAEMS, Jean-Marie, Avenue Peter Benoit 5, B-1780 Wemmel (BE).  
33/68, C07K 14/47, 14/705, 14/72

(21) International Application Number: PCT/EP2002/008761

(74) Agents: DE CLERCQ, Ann et al., De Clercq, Brants &amp; Partners, E. Gevaertreef 10 a, B-Belgium Sint-Martens-Latem (BE).

(22) International Filing Date: 6 August 2002 (06.08.2002)

(81) Designated States (national): CA, JP.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/924.125 7 August 2001 (07.08.2001) US

Published:  
— with international search report  
— with amended claims

(71) Applicant: EUROSREEN S.A. (BE/BE); 802 Route de Lenik, Building C, B-1070 Bruxelles (BE).

(88) Date of publication of the international search report: 19 February 2004

(72) Inventors: COMMUNI, Didier; Baron de Vironlaan 34, B-1700 Dilbeek (BE). SUAREZ, Nathalie; Rue Martin Van Lier 8, B-1070 Bruxelles (BE). DETHIUX, Michel; Chemin de l'Oasis 2b, B-7000 Mons (BE). BREZILLON, Stéphane; Rue de l'Enseignement 56, B-1000 Bruxelles (BE). L'ANNOY, Vincent; Route de Perwez 93, B-5310 Liernu (BE). PARMENTIER, Marc; Lantheidestraat 160,

Date of publication of the amended claims: 25 March 2004

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 2003/014731 A3

(54) Title: THE NATURAL LIGAND FOR ORPHAN G PROTEIN COUPLED RECEPTOR GPR86 AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention is related to the G protein coupled receptor GPR86 (P2Y<sub>13</sub>) and any homologous sequence thereto, recombinant cells comprising the nucleotide sequence encoding the receptor, and the identification of the natural ligand, ADP, and equivalent molecules to be used in screening assays for identification of agonists, inverse agonists or antagonist compounds useful for the development of new drugs and the improvement of various disease diagnostics. The present invention further relates to the identification of ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, ADPBS, Ap3A, RB-2, Suramine and PPADS as modulators of GPR86 activity.

## 【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/08761		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/48 G01N33/68 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/72				
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 G01N C07K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal				
D. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	WITTENBERGER T ET AL: "An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 307, 30 March 2001 (2001-03-30), pages 799-813, XP002191897 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1-46, 54, 55		
Y	WO 00 31258 A (ARENA PHARMACEUTICALS INC ;LIAW CHEN W (US); LIN I LIN (US); CHEN) 2 June 2000 (2000-06-02) cited in the application claim 34	1-46, 54, 55		
	-/--			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box G. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents:				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)</p> <p>*O* documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or non-obvious considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document: member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)</p> <p>*O* documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or non-obvious considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document: member of the same patent family</p>
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)</p> <p>*O* documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or non-obvious considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document: member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search 26 August 2003		Date of mailing of the international search report 03/09/2003		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 18 Patentstr. 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-8049, Tx. 51 681 epo nl, Fax (+31-70) 840-8098		Authorized officer Hincliffe, P		

Form PCT/ISA/210 (previous editions) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 02/08761

C1 (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COMMUNI D ET AL: "Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE, GB, vol. 18, no. 3, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 83-86, XP004058395 ISSN: 0165-6147 the whole document	1-46,54, 55
Y	COMMUNI D ET AL: "Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 51, 19 December 1997 (1997-12-19), pages 31969-31973, XP002083513 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-46,54, 55

Form PCT/BA/210 (continuation of record sheet) (July 1998)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP 02/08761
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 47-53 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.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02/08761

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 47-53

These claims do not define the products in a manner allowing a meaningful search to be carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No.  
**PCT/EP 02/08761**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031258 A	02-06-2000	AU 3790400 A	13-06-2000
		CA 2348377 A1	02-06-2000
		CA 2348688 A1	20-04-2000
		CN 1344319 T	10-04-2002
		EP 1137776 A2	04-10-2001
		EP 1133559 A2	19-09-2001
		WO 0031258 A2	02-06-2000
		WO 0022131 A2	20-04-2000
		US 2003148450 A1	07-08-2003
		US 2003017528 A1	23-01-2003
		US 2003018182 A1	23-01-2003
		AU 6299199 A	01-05-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/08	A 6 1 P 1/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 25/06	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
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 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/09	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	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 デセックス, ミッシェル  
ベルギー国、ベー - 7 0 0 0 モンス、ケミン・ド・ルオアシス 2 b
- (72)発明者 ブレジイロン, ステファン  
ベルギー国、ベー - 1 0 0 0 ブリュッセル、リュ ド ルエンザインメント 5 6
- (72)発明者 ラノイ, ヴィンセント  
ベルギー国、ベー - 5 3 1 0 リエルヌ、ルード ペルウェツ 9 3
- (72)発明者 パーメンテール, マルコ  
ベルギー国、ベー - 1 6 5 0 ベールセル、ラーハイデストラート 1 6 0
- (72)発明者 ボエイナエムス, ジーン・マリー  
ベルギー国、ベー - 1 7 8 0 ベメル、アベニュー ペーター ベノア 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 CA02 CA09 DA02 HA12  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ27 QQ38 QQ42 QQ63 QQ73 QQ89  
QR55 QR77 QR80 QS32 QX02  
4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA052 ZA082 ZA122 ZA162 ZA402 ZA422 ZA592  
ZA662 ZA682 ZA712 ZA812 ZA972 ZB082 ZB112 ZB262 ZB352 ZC032  
ZC552  
4C085 AA13 BB17 CC21  
4H045 AA11 AA30 CA40 DA50 DA75 EA21 EA22 EA23 EA27 EA28

EA50

专利名称(译)	孤儿G蛋白偶联受体GPR 86的天然配体及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005500053A</a>	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003519412	申请日	2002-08-06
申请(专利权)人(译)	欧元屏兴业ANONYME		
[标]发明人	コミュニディディエ スアレツナタリー デセックスミッシェル ブレジイロンステファン ラノイヴィンセント パーメンテールマルコ ボエイナエムスジーンマリー		
发明人	コミュニ,ディディエ スアレツ,ナタリー デセックス,ミッシェル ブレジイロン,ステファン ラノイ,ヴィンセント パーメンテール,マルコ ボエイナエムス,ジーン・マリー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7076 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P19/10 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61K31/7076 A61P1/04 A61P1/08 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P19/10 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 C07K14/47 C07K14/705 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5041 G01N33/5091 G01N33/5735 G01N33/68 G01N33/6842 G01N33/6845 G01N2333/726 G01N2500/00		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A01K67/027 A61K39/395.D A61K45/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P19/10 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/28 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QQ38 4B063/QQ42 4B063/QQ63 4B063/QQ73 4B063/QQ89 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS32 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA082 4C084/ZA122 4C084/ZA162 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA712 4C084/ZA812 4C084/ZA972 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZB352 4C084/ZC032 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/BB17 4C085/CC21 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA50		
优先权	09/924125 2001-08-07 US		
其他公开文献	JP2005500053A5 JP4372545B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测GPR86活性失调的方法。

アンタゴニスト	IC <sub>50</sub>
リアクティブブルー-2	1.9 ± 0.1 μM
スラミン	2.3 ± 0.4 μM
PPADS	11.7 ± 0.9 μM
MRS-2179	>100 μM