



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 10 538 T2** 2004.06.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 047 711 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 10 538.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/01418**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 904 221.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/037675**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.01.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.07.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.08.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.06.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 5/00**

**C12N 15/00, C12Q 1/00, C12Q 1/02,
C07H 21/02, C07K 1/00, A61K 39/395,
C12P 21/06**

(30) Unionspriorität:

72151 P 22.01.1998 US

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of California,
Oakland, Calif., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**JULIUS, J., David, San Francisco, US; CATERINA,
Michael, Mill Valley, US; BRAKE, J., Anthony,
Berkeley, US**

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄURESEQUENZEN, WELCHE FÜR CAPSAICIN-REZEPTOREN KODIEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen, die für einen Rezeptor für Vanilloidverbindung kodieren, und Polypeptide, die mit solchen Vanilloid-Verbindungsrezeptoren verwandt sind, sowie die Verwendung dieser Sequenzen bei der Diagnose, der Untersuchung und Behandlung von Krankheiten.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es treten Schmerzen auf, wenn die peripheren Enden einer bestimmten Gruppe von sensorischen Neuronen – die so genannten Nozizeptoren – durch schädliche chemische, mechanische oder thermische Reize aktiviert werden. Diese Neuronen, deren Zellkörper in verschiedenen Spinalganglien positioniert sind, übertragen Informationen über Gewebeschädigung an die Schmerz verarbeitenden Zentren im Rückenmark und Gehirn (Fields Pain (McCraw-Hill, New York, 1987)). Nozizeptoren sind teilweise durch ihre Sensitivität gegenüber Capsaicin, einem natürlichen Produkt der Capsicum-Pfefferschote, gekennzeichnet, das der Wirkstoff vieler scharfer Nahrungsmittel ist. In Säugetieren führt Kontakt mit Nozizeptor-Enden anfänglich zur Wahrnehmung von Schmerz und zur lokalen Freisetzung von Neurotransmittern. Bei längerer Exposition werden diese Enden gegenüber Capsaicin und anderen schädlichen Reizen unempfindlich (Szolcsanyi, Capsaicin in the Study of Pain (Wood, Hg.), S. 255–272 (Academic Press, London, 1993)). Dieses Phänomen der Nozizeptor-Desensibilisierung liegt der anscheinend paradoxen Verwendung von Capsaicin als Analgetikum zur Behandlung von Schmerzzuständen zugrunde, die von viralen und diabetischen Neuropathien bis zu rheumatoider Arthritis reichen (Campbell, Capsaicin and the Study of Pain (Wood, Hg.), S. 255–272 (Academic Press, London, 1993); Szallasi et al., Pain 68, 195–208 (1996)). Während ein Teil dieser reduzierten Sensitivität gegenüber schädlichen Reizen auf reversible Veränderungen des Nozizeptors schließen lassen kann, z. B. auf ein Schwinden entzündlicher Mediatoren, kann der langfristige Verlust des Reaktionsvermögens durch die Zerstörung des Nozizeptors oder seiner peripheren Enden nach Capsaicin-Exposition erklärt werden (Jancso et al., Nature 270, 741–743 (1977); Szolcsanyi, s. o.).

[0003] Man macht sich die Fähigkeit, auf Capsaicin zu reagieren, zunutze, um sensorische afferente Fasern zu definieren, die Signale als Reaktion auf schädliche Reize übertragen (chemische, thermische und mechanische Reize); der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt. Elektrophysiologische Studien (Bevan et al. Trends Pharmacol. Sci. 11, 330–333 (1990); Oh et al., J. Neurosci. 16, 1659–1667 (1996)) und biochemische Studien (Wood et al., J. Neuroscience 8, 3208–3220 (1988)) belegten, dass Capsaicin Nozizeptoren anregt, indem die Plasmamembran-Leitfähigkeit durch Bildung oder Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle erhöht wird. Während es die hydrophobe Beschaffenheit von Capsaicin schwierig machte, die Möglichkeit auszuschließen, dass seine Wirkungsweise durch direkte Störung von Membranlipiden mediert wird (Feigin et al. Neuroreport 6, 2134–2136 (1995)), gilt es aufgrund von Beobachtungen, dass Capsaicin-Derivate Struktur-Funktions-Beziehungen aufweisen und dosisabhängige Reaktionen hervorrufen, als allgemein anerkannt, dass diese Verbindung als spezifische Rezeptorstelle auf oder innerhalb von sensorischen Neuronen dient (Szolcsanyi et al., Drug Res. 25, 1877–1881 (1975); Szolcsanyi et al. Drug Res. 2, 33–37 (1976)). Die Entwicklung von Capsazepin, einem kompetitiven Capsaicin-Antagonisten (Bevan et al., Br. J. Pharmacol. 107, 544–552 (1992)) und die Entdeckung von Resiniferatoxin, einem ultrawirksamen Capsaicin-Analog aus Euphorbia-Pflanzen, das die Zell-Wirkmechanismen von Capsaicin imitiert (deVries et al. Life Sci. 44, 711–715 (1989); Szallasi et al., Neurosci. 30, 515–520 (1989)), legen nahe, dass Capsaicin seine Wirkungen durch einen Rezeptor mediert. Die nanomolare Wirksamkeit von Resiniferatoxin erleichterte seine Verwendung als hochaffiner Radioligand, um sättigungsfähige Capsaicin- und Capsazepin-sensitive Bindungsstellen auf Nozizeptoren zu visualisieren (Szallasi, Gen. Pharmac. 25, 223–243 (1994)). Da eine Vanilloidgruppe eine essenzielle strukturelle Komponente von Capsaicin und Resiniferatoxin darstellt, wurde die vorgeschlagene Wirkungsstelle dieser Verbindungen im Allgemeinen als Vanilloidrezeptor bezeichnet (Szallasi, 1994, s. o.). Die Wirkung von Capsaicin, Resiniferatoxin und dem Antagonisten Capsazepin wurden unter Verwendung primärer neuronaler Kulturen physiologisch charakterisiert (siehe z. B. Szolcsanyi, Actions of Capsaicin on Sensory Receptors; Bevan et al., Cellular Mechanisms of the Action of Capsaicin; und James et al., The Capsaicin Receptor; alle in: Capsaicin in the Study of Pain; 1993 Academic Press Limited, S. 1–26, 27–44 bzw. 83–104); Bevan et al. 1990, s. o.).

[0004] Die analgetischen Eigenschaften von Capsaicin und Capsaicinoiden sind bezüglich ihres Einsatzes zur Behandlung von Schmerz und Entzündung in einer Reihe von Störungen von großem Interesse (siehe z. B. Fusco et al., Drugs 53, 909–914 (1997); Towheed et al., Semin. Arthritis Rheum. 26, 755–770 (1997); Appendino et al., Life Sci. 60, 681–696 (1997) (die Autoren beschreiben die Aktivitäten und die Anwendung von Resiniferatoxin); Campbell et al., Clinical Applications of Capsaicin and Its Analogues, in: Capsaicin in the Stu-

dy of Pain 1993, Academic Press, S. 255–272). Obwohl Capsaicin und damit verwandte Verbindungen die Wahrnehmung von Schmerz hervorrufen, Hyperalgesie auslösen, autonome Reflexe (z. B. Veränderungen des Blutdrucks) aktivieren und die Freisetzung von Peptiden und anderen mutmaßlichen Transmittern von Nervenenden hervorrufen können (z. B. um Bronchienkonstriktion und Entzündung zu induzieren), führt die längere Exposition sensorischer Neuronen gegenüber diesen Verbindungen zur Desensibilisierung der Neuronen bezüglich mehrerer Modalitäten schädlicher sensorischer Reize, ohne die normale mechanische Sensitivität oder motorische Funktion zu beeinträchtigen oder das Zentralnervensystem zu schwächen. Dieses Phänomen macht die Capsaicine und verwandte Verbindungen in Bezug auf ihren potenziellen therapeutischen Nutzen so interessant.

[0005] Trotz des großen Interesses an Capsaicin und damit verwandten Verbindungen sowie an ihren Wirkungen auf sensorische afferente Fasern, wurden der bzw. die Rezeptoren, durch die diese Verbindungen ihre Wirkungen medieren, bislang weder isoliert noch molekularer Charakterisierung unterzogen. Dies erschwerte die Entwicklung leistungsstarker und vielseitiger Systeme zum Screenen oder Charakterisieren neuartiger Rezeptor-bindender Verbindungen oder zum Identifizieren endogener, aus Gewebe abgeleiteter Mediatoren von Schmerz und/oder Entzündung. Die einzige bislang zur Verfügung stehende Möglichkeit, die Aktivität von Verbindungen als Capsaicinrezeptor-Agonisten oder -Antagonisten zu beurteilen, ist die Untersuchung ihres Einflusses auf sensorische Neuronen in Kultur oder in intakten Tieren. Die vorliegende Erfindung möchte dieses Problem lösen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft Vanilloidrezeptor-Polypeptide und mit Vanilloidrezeptor verwandte Polypeptide, genauer gesagt mit Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptide, sowie Nucleotidsequenzen, die für mit Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptide kodieren. In damit in Zusammenhang stehenden Aspekten betrifft die Erfindung Expressionsvektoren und Wirtszellen, die Polynucleotide umfassen, die für mit Capsaicinrezeptor verwandtes Polypeptid kodieren. In anderen Aspekten betrifft die Erfindung transgene Tiere mit veränderter Capsaicinrezeptor-verwandter Expression, z. B. infolge der Gegenwart einer Polynucleotidsequenz, die für modifizierten Capsaicinrezeptor oder jenen der exogenen Wildform kodiert. Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf Antikörper, die sich spezifisch an Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid binden, und auf Verfahren zur Produktion von Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden.

[0007] In einem Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren von Verbindungen, die sich an ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid binden, vorzugsweise eine Verbindung, die ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid bindet und eine Zellreaktion auslöst, die mit Capsaicinrezeptor-verwandter biologischer Aktivität assoziiert ist (z. B. intrazellulärer Calciumfluss).

[0008] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Detektieren einer Vanilloidverbindung in einer Probe, worin die Vanilloidverbindung Aktivität beim Binden von Capsaicinrezeptor-Polypeptid besitzt, mittels In-Kontakt-Bringen einer Probe, die vermutlich eine Vanilloidverbindung enthält, mit einer Zelle (z. B. einem Oozyten wie etwa einem Amphibienoozyten oder einer Säugetierzelle), die ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid exprimiert, und Detektieren einer Veränderung der Zellreaktion, die mit Capsaicinrezeptor-verwandter Aktivität in der Capsaicinrezeptor exprimierenden Wirtszelle assoziiert ist. Vorzugsweise ist die mit Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziierte Zellreaktion eine Änderung des intrazellulären Calciumspiegels in der Capsaicinrezeptor exprimierenden Wirtszelle. Das Verfahren kann zum Detektieren von Vanilloidverbindungen in Proben aus natürlichen Produkten (z. B. natürlichen Produktextrakten) oder zum Screenen von potenzieller Verbindungen zur Verwendung als Analgetika (z. B. Vanilloidanaloge, therapeutische Antikörper, Anti-Sense-Oligonucleotide, für Capsaicinrezeptor kodierende Nucleotide für die Genersatz-Therapie), Geschmacksverstärker usw. dienen.

[0009] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von mit Capsaicinrezeptor verwandten Polypeptiden und spezifischen Antikörpern dagegen zur Diagnose und Behandlung menschlicher Krankheit und von Schmerzsyndromen.

[0010] In einem zusätzlichen Aspekt bezieht sich die Erfindung auf transgene nichthumane Säugetiere, die ein für Capsaicinrezeptor kodierendes Transgen exprimieren, sowie auf den Einsatz eines solchen transgenen Säugetiers beim Screenen von Kandidaten für mit Capsaicinrezeptor verwandten Agonisten- und Antagonistenverbindungen.

[0011] Ein Hauptziel der Erfindung ist die Bereitstellung isolierter Polynucleotide zur Verwendung bei der Expression von mit Capsaicinrezeptor verwandten Polypeptiden (z. B. in einer rekombinanten Wirtszelle oder in einer Zielzelle im Rahmen von Organochemotherapie) sowie zur Identifikation von mit Capsaicinrezeptor verwandten Bindungsverbindungen (insbesondere jener Verbindungen, die Capsaicinrezeptor-verwandte Mediationsaktivität beeinflussen).

[0012] Es folgt eine ausführliche Beschreibung der Erfindung.

KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0013] **Fig. 1A** zeigt die mutmaßlichen Domänen, die in der Capsaicinrezeptor-Aminosäuresequenz vorhanden sind. Leere Kästchen identifizieren Ankyrin-Wiederholungsdomänen; nach rechts schraffierte Kästchen stehen für die vorhergesagten transmembranen Domänen; und die nach links schraffierten Kästchen kennzeichnen eine mögliche Poren-Loop-Region. Die Punkte identifizieren Kinase A-Phosphorylierungsstellen.

[0014] **Fig. 1B** veranschaulicht die vorhergesagte Membranentopologie und Domänenstruktur des Capsaicinrezeptors. Nicht ausgefüllte und mit „A“ markierte Kreise kennzeichnen Ankyrindomänen; Zylinder stehen für transmembrane Domänen; und die doppelt unterstrichene Fläche kennzeichnet eine mögliche Poren-Loop-Region. „i“ und „o“ stehen für das Innen- bzw. Außenmembranblättchen.

[0015] **Fig. 1C** zeigt die Ausrichtung des Capsaicinrezeptors VR1 mit verwandten Sequenzen. Identische Reste befinden sich in quer schraffierten Kästchen, konservative Substitutionen in einzeln unterstrichenen Kästchen.

[0016] **Fig. 2** ist eine Stromspur der Vollzellen-Spannungsklemmen-Analyse von Capsaicinrezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen.

[0017] **Fig. 3** ist ein Graph der Spannungsschritte (400 ms) von -100 mV auf $+100$ mV für die in **Fig. 2** gezeigten Daten.

[0018] **Fig. 4** ist ein Graph, der in Bezug auf die Daten von **Fig. 3** die Strom-Spannungs-Beziehung veranschaulicht.

[0019] **Fig. 5** ist ein Graph der Spannung, die über Membranen rekombinanter Capsaicinrezeptor exprimierender Zellen erzeugt wird, wenn sie Capsaicin ausgesetzt und unter Bedingungen variierender ionischer Zusammensetzungen getestet werden. a = NaCl; b = KCl; c = CsCl; d = $MgCl_2$; e = $CaCl_2$.

[0020] Die **Fig. 6A bis 6F** sind Graphen, die die Wirkung von extrazellulärem Calcium auf Capsaicin-induzierten Strom in Experimenten mit Vollzellen-Spannungsklemmen veranschaulichen.

[0021] **Fig. 7** ist ein Graph, der das Einzelkanalverhalten von Capsaicin-induziertem Strom in Capsaicinrezeptor exprimierenden HEK293-Zellen unter Verwendung von Outside-out- (O/O-) und Inside-out- (I/O-) Patches darstellt.

[0022] **Fig. 8** ist ein Graph, der die Strom-Spannungs-Beziehung der in **Fig. 7** erhaltenen Daten veranschaulicht.

[0023] **Fig. 9A** ist ein Graph, der die Wirkung von Capsaicin und Resiniferatoxin auf den Strom in Vollzellen-Spannungsklemmen-Versuchen in *Xenopus*-Oozyten zeigt, die den Capsaicinrezeptor exprimieren. Die Balken kennzeichnen die Dauer der Agonisten-Applikation. Membranströme wurden in der Vollzellen-Spannungsklemmen-Konfiguration aufgezeichnet ($V_{hold} = -40$ mV).

[0024] **Fig. 9B** ist ein Graph, der die Konzentrations-Reaktions-Kurve für Capsaicin (Quadrate) und Resiniferatoxin (leere Kreise) in VR1-exprimierenden Oozyten darstellt. In **Fig. 9B** wurden die Membranströme in jedem Oozyten auf eine mit $1 \mu M$ Capsaicin erhaltene Reaktion normalisiert und als Prozentsatz der maximalen Reaktion auf Capsaicin ausgedrückt. Jeder Punkt stellt Mittelwerte ($\pm$ S. E. M.) von 5 unabhängigen Oozyten dar.

[0025] **Fig. 10A** ist ein Graph, der den Einfluss von Capsazepin auf Capsaicin-induzierten Strom in Vollzellen-Spannungsklemmen-Experimenten veranschaulicht. Die Striche kennzeichnen Auswaschphasen von 2 bzw. 3 min ($n = 3$). cap = Capsaicin; cpz = Capsazepin; R = Rutheniumrot. Jeder Punkt stellt 4 unabhängige Oozyten dar. Die Stromreaktion wurde auf die durch Capsaicin in jedem Oozyten hervorgerufene normalisiert ($0,6 \mu M$, offene Raute). Die Striche stehen für 2- bzw. 12-minütige Auswaschphasen ($n = 3$).

[0026] **Fig. 10B** ist ein Graph, der die Capsazepin-Hemmungskurve der Capsaicin-Reaktion in Vollzellen-Spannungsklemmen-Studien zeigt.

[0027] **Fig. 11** ist ein Histogramm mit korrespondierenden Stromspuren, aus dem der relative Capsaicin-Gehalt unterschiedlicher Pfefferschoten ersichtlich ist.

[0028] **Fig. 12** ist ein Graph, der die Induktion des Zelltods in HEK293-Zellen zeigt, die transient mit für Capsaicinrezeptor kodierender cDNA transfiziert sind. Nicht ausgefüllte Balken = nur Träger ausgesetzte Zellen (Ethanol); ausgefüllte Balken = Capsaicin ausgesetzte Zellen; pcDNA3 = Vergleichszellen ohne für Capsaicinrezeptor kodierender DNA; VR1 (1 : 50) = Zeilen, die transient mit für Capsaicinrezeptor-s kodierender cDNA transfiziert sind, 1 : 50 mit Vergleichs-pcDNA3 verdünnt; VR1 = Zelle, die nur mit für Capsaicinrezeptor kodierender cDNA transient transfiziert sind. Die Sterne stehen für eine signifikante Differenz gegenüber mit Ethanol behandelten Zellen.

[0029] **Fig. 13** ist eine Stromspur, aus der die Wirkung von Wasserstoffionen auf die Capsaicinrezeptor-Aktivität in den Capsaicinrezeptor exprimierenden Oozyten ersichtlich ist. cap on = Zeit der Capsaicin-Induktion; cap off = Zeit des Capsaicin-Auswaschens. Der pH-Wert der Badlösung wurde während des Experiments geändert (angezeigt durch die horizontalen Balken).

[0030] **Fig. 14** ist ein Graph, der die Stromreaktionen aus 9 unabhängigen Capsaicinrezeptor-exprimierenden Oozyten zusammenfasst. Der offene Teil jedes Balkens steht für Spitzenstrom, hervorgerufen durch Capsaicin

bei pH 7,6, während der quer schraffierte Abschnitt für zusätzlichen Strom steht, der durch Verändern der Badlösung auf pH 6,3 induziert wird.

[0031] **Fig. 15A** ist eine Stromspur, aus der die Wirkung von Wärme und Capsaicin auf die Capsaicinrezeptor-Aktivität in Capsaicinrezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen veranschaulicht (bestimmt durch Whole-Patch-Klemmenanalyse).

[0032] **Fig. 15B** ist ein Graph, der die Strom-Spannungs-Beziehung der in **Fig. 15A** erhaltenen Daten veranschaulicht.

[0033] **Fig. 16** ist ein Graph, der die Aktivierung des Capsaicinrezeptors in Capsaicinrezeptor-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten durch schädigende – nicht aber harmlose – Wärme darstellt. Der Stern deutet auf eine signifikante Differenz gegenüber den mit Vergleichswasser injizierten Oozyten hin.

[0034] **Fig. 17** liefert repräsentative Stromspuren der Wirkungen von Capsaicin, Wärme und Wärme plus Rutheniumrot (RR) auf Capsaicinrezeptor-exprimierende *Xenopus*-Oozyten und wasserinjizierte Vergleichs-Oozyten.

[0035] **Fig. 18** ist eine schematische Darstellung der Beziehung zwischen Ratten-VR1, Ratten-VRRP-1 und der Human-EST-Sequenz AA321554.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Definitionen

[0036] „Polynucleotid“ bezieht sich hierin auf ein Oligonucleotid, Nucleotid und Fragmente oder Abschnitte davon sowie auf Peptidnucleinsäuren (PNA), Fragmente, Abschnitte oder Anti-Sense-Moleküle davon, ebenso wie auf DNA oder RNA genomischen oder synthetischen Ursprungs, die einzel- oder doppelsträngig sein und den Sense-oder Anti-Sense-Strang darstellen kann. Wenn sich „Polynucleotid“ auf eine spezifische Polynucleotidsequenz bezieht (z. B. ein für Capsaicinrezeptor kodierendes Polynucleotid oder ein für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodierendes Polynucleotid), bedeutet „Polynucleotid“ hierin Polynucleotide, die für ein Polypeptid kodieren, das funktionell dem angeführten Polypeptid entspricht, z. B. Polynucleotide, die degenerierte Varianten sind, oder Polynucleotide, die für biologisch aktive Varianten oder Fragmente des angeführten Polypeptids kodieren. „Polypeptid“ bezieht sich hierin auf ein Oligopeptid, Peptid oder Protein. Wenn „Polypeptid“ hierin für eine Aminosäuresequenz eines in der Natur vorkommenden Proteinmoleküls steht, sollen „Polypeptid“ und ähnliche Ausdrücke die Aminosäuresequenz nicht auf die komplette native Aminosäuresequenz, die mit dem angeführten Proteinmolekül assoziiert ist, einschränken. Unter „Anti-Sense-Polynucleotid“ ist hierin ein Polynucleotid mit einer Nucleotidsequenz zu verstehen, die komplementär zu einer bestimmten Polynucleotidsequenz ist (z. B. eine für einen Capsaicinrezeptor kodierende Polynucleotidsequenz); Beispiele sind Polynucleotidsequenzen, die mit der Transkription oder Translation der bestimmten Polynucleotidsequenz assoziiert sind (z. B. ein Promotor einer für Capsaicinrezeptor kodierenden Polynucleotids), wobei das Anti-Sense-Polynucleotid zur Hybridisierung an eine Capsaicinrezeptor-Polynucleotidsequenz in der Lage ist. Von besonderem Interesse sind Anti-Sense-Polynucleotide, die zur In-vitro oder In-vivo-Hemmung der Transkription und/oder Translation eines Polynucleotids, das für Capsaicinrezeptor oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, fähig sind.

[0037] „Peptidnucleinsäure“ bezieht sich hierin auf ein Molekül, das ein Oligomer umfasst, dem ein Aminosäurerest, z. B. Lysin, und eine Aminosäuregruppe zugesetzt sind. Diese kleinen Moleküle, die man auch Anti-Gen-Mittel nennt, stoppen die Transkript-Verlängerung durch Bindung an ihren komplementären (Templat-) Strang von Nucleinsäure (Nielsen et al., *Anticancer Drug Des.* 8, 53–63 (1993)).

[0038] „Capsaicinrezeptor“ oder „Capsaicinrezeptor-Polypeptid“ bezieht sich hierin auf ein rekombinantes oder nicht-rekombinantes Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz i) eines nativen Capsaicinrezeptor-Polypeptids, ii) eines biologisch aktiven Fragments eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids, iii) biologisch aktiver Polypeptidanaloga eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids oder iv) einer biologisch aktiven Variante eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids. Die Capsaicinrezeptor-Polypeptide der Erfindung können aus jeder beliebigen Spezies erhalten werden, insbesondere aus Säugetieren, z. B. aus Menschen, Nagetieren (wie etwa Mäusen oder Ratten), Rindern, Schafen, Schweinen, Mäusen oder Pferden, vorzugsweise aus Ratten oder Menschen; die Quelle kann natürlich, synthetisch, semisynthetisch oder rekombinant sein. Der Ausdruck „Capsaicinrezeptor“ umfasst hierin den ausführlich beschriebenen Vanilloidrezeptor-Untertyp 1 (VR1), ist aber nicht auf VR1 beschränkt; der Ausdruck kann allgemein für die Rezeptoruntertypen VR1 und VR2 verwendet werden.

[0039] Der Ausdruck „Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid“ oder „Vanilloid-ähnliches Rezeptor- (VLR-) Polypeptid“ bezieht sich auf ein rekombinantes oder nicht-rekombinantes Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz i) eines nativen Capsaicinrezeptorverwandten Polypeptids, ii) eines biologisch aktiven Fragments eines Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids, iii) biologisch aktiver Polypeptidanaloga von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid oder iv) einer biologisch aktiven Variante von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid (hierin auch als „VRRP-1“, „VLR1“ oder „VR2“ bezeichnet. Capsaicinrezeptor-Polypeptide können aus

jeder beliebigen Quelle gewonnen werden, insbesondere aus Säugetieren wie etwa Menschen, Nagetieren (z. B. Mäusen oder Ratten), Rindern, Schafen, Schweinen, Mäusen oder Pferden, bevorzugt aus Ratten oder Menschen; die Quelle kann natürlich, synthetisch, halbsynthetisch oder rekombinant sein. Der Ausdruck „Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid“ umfasst hierin jedes Polypeptid mit zumindest 40% Identität, besonders bevorzugt zumindest 45% Identität, insbesondere bevorzugt 49% Identität, mit einer Aminosäuresequenz eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids der gleichen Spezies (z. B. Ratten- oder Human-Capsaicinrezeptor-Polypeptid). Der Ausdruck „Sequenz, die für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert“ bezieht sich hierin auch auf eine Nucleotidsequenz mit zumindest etwa 50% Identität, vorzugsweise zumindest etwa 55% Identität, noch bevorzugter zumindest etwa 59% Identität mit einer Nucleotidsequenz eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids der gleichen Spezies. In einer Ausführungsform tritt das Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid mit Capsaicinrezeptor in Wechselwirkung. „Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid“ umfasst hierin das ausführlich beschriebene Vanilloidrezeptor-verwandte Polypeptid 1 (VRRP-1), ist aber keinesfalls darauf beschränkt.

[0040] „Antigene Aminosäuresequenz“ bezieht sich hierin auf eine Aminosäuresequenz, die entweder alleine oder in Assoziation mit einem Trägermolekül eine Antikörperreaktion in einem Säugetier hervorrufen kann.

[0041] Eine „Variante“ eines Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids ist als Aminosäuresequenz definiert, die durch eine oder mehrere Aminosäuren modifiziert sind. Die Variante kann „konservative“ Änderungen aufweisen, worin eine substituierte Aminosäure ähnliche strukturelle oder chemische Eigenschaften besitzt, z. B. das Ersetzen von Leucin mit Isoleucin. Seltener kann eine Variante „nicht-konservative“ Änderungen aufweisen, z. B. den Ersatz eines Glycins mit einem Tryptophan. Ähnliche kleine Variationen können auch Aminosäure-Deletionen oder -Insertionen oder beides umfassen. Hilfestellung bei der Bestimmung, welche und wie viele Aminosäurereste substituiert, insertiert oder deletiert werden können, ohne biologische oder immunologische Aktivität zu eliminieren, geben auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannte Computerprogramme wie etwa die DNASTar-Software.

[0042] Eine „Deletion“ ist als Änderung der Aminosäure- oder Nucleotidsequenz definiert, in der ein oder mehrere Aminosäure- oder Nucleotidreste im Vergleich zu einer Aminosäuresequenz oder Nucleotidsequenz eines natürlich vorkommenden Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids fehlen.

[0043] Eine „Insertion“ oder „Addition“ ist eine Änderung einer Aminosäure- oder Nucleotidsequenz, die gegenüber einer Aminosäuresequenz oder Nucleotidsequenz eines natürlich vorkommenden Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids zur Hinzufügung einer oder mehrerer Aminosäure- oder Nucleotidreste führt.

[0044] Eine „Substitution“ ergibt sich aus dem Wechsel einer oder mehrerer Aminosäuren oder Nucleotide mit anderen Aminosäuren oder Nucleotiden (im Vergleich zu einer Aminosäuresequenz oder Nucleotidsequenz eines natürlich vorkommenden Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids).

[0045] Der Ausdruck „biologisch aktiv“ bezieht sich auf Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid mit strukturellen, regulatorischen oder biochemischen Funktionen eines natürlich vorkommenden Capsaicinrezeptor-Polypeptids oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids. „Immunologisch aktiv“ definiert die Fähigkeit des natürlichen, rekombinanten oder synthetischen Capsaicinrezeptors (oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids) oder jedes Oligopeptids davon, eine spezifische Immunresponse in zweckmäßigen Tieren oder Zellen zu induzieren und sich mit spezifischen Antikörpern zu binden.

[0046] Der Ausdruck „Derivat“ steht hierin für die chemische Modifikation einer Nucleinsäure, die für einen Capsaicinrezeptor oder ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert. Beispiele für derartige Modifikationen sind der Austausch von Wasserstoff durch eine Alkyl-, Acyl- oder Aminogruppe. Ein Nucleinsäurederivat würde für ein Polypeptid kodieren, das wesentliche biologische Eigenschaften eines natürlichen Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids beibehält.

[0047] Unter „isoliert“ ist hierin eine Verbindung von Interesse zu verstehen (entweder ein Polynucleotid oder ein Polypeptid), die sich in einer anderen Umgebung befindet als in jener, in der die Verbindung natürlich vorkommt. „Isoliert“ umfasst hierin Verbindungen, die sich in Proben befinden, die um die Verbindung von Interesse substantziell angereichert sind und/oder in denen die Verbindung von Interesse partiell oder substantziell (im Wesentlichen) gereinigt ist.

[0048] Der Ausdruck „im Wesentlichen gereinigt“ bezieht sich auf eine Verbindung (z. B. entweder ein Polynucleotid oder ein Polypeptid), die aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt und zumindest 60% frei, vorzugsweise 75% frei, insbesondere 90% frei, von anderen Komponenten ist, mit denen sie natürlich assoziiert ist.

[0049] Der Ausdruck „Hybridisierung“ soll hierin „jedes Verfahren, durch das ein Strang einer Nucleinsäure mit einem komplementären Strang mittels Basenpaarung verknüpft wird (Coombs 1994 Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, NY, USA) umfassen. Die Amplifikation in Polymerase-Kettenreaktions-Technologien wird in Dieffenbach et al., 1995, PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, USA beschrieben.

[0050] „Sequenzidentität“ bezieht sich hierin allgemein auf die Sequenzidentität einer Nucleotid- oder Aminosäuresequenz von im Allgemeinen zumindest etwa 65%, vorzugsweise zumindest etwa 75%, noch bevorzugter zumindest etwa 85%; sie kann auch mehr als zumindest etwa 90% betragen (bestimmt durch den

Smith-Waterman-Homologie-Suchalgorithmus, der im MPSRCH-Programm (Oxford Molecular) implementiert wird). Für die Zwecke der Erfindung ist ein bevorzugtes Verfahren zur Berechnung der prozentuellen Identität der Smith-Waterman-Algorithmus wie folgt: Die globale DNA-Sequenzidentität muss mehr als 65% betragen (bestimmt durch den Smith-Waterman-Homologie-Suchalgorithmus, der im MPSRCH-Programm (Oxford Molecular) implementiert ist), wobei eine Suche nach affinen Lücken mit den folgenden Suchparametern durchgeführt wird: „gap open penalty“ (Bestrafung für das Eröffnen der Lücke), 12; und „gap extension penalty“ (Bestrafung für das Verlängern der Lücke), 1.

[0051] Der Ausdruck „transgen“ beschreibt hierin genetisches Material, das künstlich in das Genom eines Säugetiers, insbesondere eine Säugetierzelle eines lebenden Tiers, inseriert wurde oder inseriert werden soll.

[0052] Unter einem „transgenen Tier“ sind nichthumane Tiere – üblicherweise Säugetiere – zu verstehen, die nicht-endogene (d. h. heterologe) Nucleinsäuresequenzen besitzen, die als extrachromosomales Element in einem Abschnitt ihrer Zellen vorhanden oder stabil in ihre Keimbahn-DNA integriert sind (z. B. in der genomischen Sequenz der meisten oder aller ihrer Zellen). Heterologe Nucleinsäure wird in die Keimbahn-DNA solcher transgenen Tiere mittels genetischer Manipulation eingesetzt; Beispiele dafür sind Embryonen oder embryonale Stammzellen des Wirtstiers.

[0053] Ein „Knockout“ des Zielgens bedeutet eine Änderung der Gensequenz, die zur reduzierten Funktion des Zielgens führt, vorzugsweise solcherart, dass die Zielgen-Expression undetektierbar oder insignifikant ist. Beispielsweise bedeutet ein Knockout eines Capsaicinrezeptor-Gens, dass die Funktion des Capsaicinrezeptors substantiell verringert wurde, sodass die Capsaicinrezeptor-Expression nicht detektierbar oder nur insignifikant vorhanden ist. Transgene Knockout-Tiere der Erfindung können transgene Tiere sein, die einen heterozygoten oder homozygoten Knockout des Capsaicinrezeptor-Gens oder der für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodierenden Sequenz aufweisen. Zu Knockouts zählen konditionelle Knockouts, bei denen die Modifikation des Zielgens z. B. nach dem Kontakt des Tiers mit einer Substanz, die die Veränderung des Zielgens fördert, nach Einführung eines Enzyms, das die Rekombination an der Zielgen-Stelle unterstützt (z. B. Cre im Cre-lox-System), oder nach einem anderen Verfahren zur Steuerung der postnatalen Veränderung des Zielgens eintreten kann.

[0054] Ein „Knockin“ eines Zielgens bezieht sich auf eine Modifikation in einem Wirtszellengenom, die zur geänderten Expression (z. B. zur höheren – wie etwa ektopischen – oder zur verringerten Expression) des Zielgens führt, z. B. durch Einsetzen einer zusätzlichen Kopie des Zielgens oder durch operatives Insertieren einer regulatorischen Sequenz, die für stärkere Expression einer endogenen Kopie des Zielgens sorgt. Beispielsweise können transgene Knockin-Tiere der Erfindung transgene Tiere mit einem heterozygoten oder homozygoten Knockin des Capsaicinrezeptor-Gens sein. Knockins umfassen auch konditionelle Knockins.

[0055] Die wesentlichen hierin bereitgestellten genetischen Sequenzen sind wie folgt:

SEQ.-ID Nr.	Sequenz
1	Ratte-VR1-cDNA-Sequenz
2	Ratten-VR1-Aminosäuresequenz
3	Ratten-VRRP-1-(VR2)-cDNA-Sequenz
4	Ratten-VRRP-1-(VR2)-Aminosäuresequenz
5	Human-VRRP-1-Konsensussequenz, Region A
6	Human-VRRP-1-Konsensussequenz, Region B
7	Human-VRRP-1-Konsensussequenz, Region C
8	EST AA321554-DNA-Sequenz
9	EST AA321554-Aminosäuresequenz
10	Mäuse-MR1-cDNA-Sequenz
11	Mäuse-VR1-cDNA
12	Primer
13	Primer
14	Ratten-VR1-Aminosäuresequenz
15	Human-T11251-Aminosäuresequenz
16	Caliphora-z80230-Aminosäuresequenz
17	Drosophila-TRP-Aminosäuresequenz
18	Rinder-x99792-Aminosäuresequenz
19	C.-elegans-z72508-Aminosäuresequenz
20	Human-VRRP-1-(VR2)-DNA-Sequenz
21	Human-VRRP-1-(VR2)-DNA-Sequenz
22	Human-VRRP-1-(VR2)-DNA-Sequenz

23	Human-VRRP-1-(VR2)-DNA-Sequenz
24	Hühner-VR1-cDNA-Sequenz
25	Hühner-VR1-Aminosäuresequenz
26	Human-VR1-cDNA-Sequenz
27	Human-VR1-Aminosäuresequenz
33	Human-VR1-cDNA-Sequenz
34	Human-VR1-Aminosäuresequenz
35	Human-VR2-cDNA-Sequenz
36	Human-VR2-Aminosäuresequenz

Zusammenfassung der Erfindung

[0056] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Identifikation und Isolation einer Polynucleotidsequenz, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid (z. B. das hierin beschriebene Vanilloidrezeptor-Untertyp 1- (VR1-) Polypeptid) und ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid (z. B. das hierin beschriebene Vanilloidrezeptor-verwandte Polypeptid 1 (VRRP-1; oder VR2)) kodiert. Die entsprechenden genetischen Sequenzen sind in der Sequenzaufzählung und in obiger Tabelle angeführt. Demzufolge erstreckt sich die Erfindung auf solche Polynucleotide, die für Capsaicinrezeptor und/oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren, sowie auf den Capsaicinrezeptor und die Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptide, die durch solche Polynucleotide kodiert sind.

[0057] Ein für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierendes Polynucleotid wurde zunächst mittels der für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierenden Sequenz isoliert, um die Expression eines funktionellen Capsaicinrezeptors in einem Zell-Test zu erleichtern. Zusammenfassend gesagt erleichterte das für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierende Polynucleotid – exprimiert in einer Säugetier- oder Amphibien-Wirtszelle – die Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration in der Wirtszelle nach Capsaicin-Agonisten-Exposition. Diese Arbeit führte zur Identifikation und Isolation einer für einen Capsaicinrezeptor kodierenden Polynucleotidsequenz (hierin als Vanilloidrezeptor-Untertyp 1 (VR1) bezeichnet). Die für Capsaicinrezeptor kodierende VR1-Sequenz diente dann dazu, mittels PCR-Amplifikation eine Sequenz zu isolieren, die für verwandte Polypeptide kodiert, was zur Isolation und Identifikation von Sequenzen führte, die für ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren (ein Beispiel dafür ist VRRP-1-(VR2)).

[0058] Die Erfindung betrifft überdies die Verwendung von Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptidnucleinsäure- und Aminosäuresequenzen zur Identifikation von Capsaicinrezeptor-bindenden Verbindungen, insbesondere von Capsaicinrezeptor-bindenden Verbindungen mit Capsaicinrezeptor-Agonist- oder -Antagonist-Aktivität. Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung der hierin offenbarten Polynucleotide zur Unterstützung der Identifikation und Isolation von Polynucleotid- und Polypeptidsequenzen mit Homologie zu einem Capsaicinrezeptor und/oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid der Erfindung; sowie die Diagnose, Prävention und Behandlung von Krankheit und/oder Schmerzsyndromen, die mit biologischer Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziiert sind.

[0059] Die Polynucleotide der Erfindung können auch als molekulare Sonde verwendet werden, mit der man die Struktur, Position und Expression von Capsaicinrezeptor, Rezeptor-Untertypen und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden in Säugetieren (einschließlich Menschen) bestimmt und potenzielle Assoziationen zwischen Krankheitsstadien oder klinischen Störungen (insbesondere mit akuten oder chronischen Schmerzen oder Entzündungen) und Defekten oder Modifikationen der Rezeptorstruktur, -Expression oder -Funktion untersucht.

Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid-Kodiersequenzen

[0060] Gemäß der Erfindung kann jede beliebige Nucleinsäure, die für eine Aminosäuresequenz eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids kodiert, dazu dienen, rekombinante Moleküle zu erzeugen, die ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid exprimieren. Die Nucleinsäure-Zusammensetzungen der Erfindung können je nach Bedarf für das gesamte oder einen Teil eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids der Erfindung kodieren. Fragmente können aus der DNA-Sequenz durch chemisches Synthetisieren von Oligonucleotiden mittels herkömmlicher Verfahren (Restriktionsenzym-Verdau, PCR-Amplifikation usw.) gewonnen werden. DNA-Fragmente bestehen meistens aus etwa 10 zusammenhängenden Nucleotiden, üblicherweise von zumindest etwa 15 nt, noch häufiger von zumindest etwa 18 nt bis etwa 20 nt, noch häufiger von zumindest etwa 25 nt bis etwa 50 nt. Derartige kleine DNA-Fragmente eignen sich als Primer für PCR, Hybridisierungs-Screenen usw. Größere DNA-Fragmente, d. h. von mehr als etwa 100 nt, sind nützlich bei der Herstellung des kodierten Polypeptids.

[0061] Die Nucleinsäure- und die abgeleitete Aminosäuresequenz von Ratten-Capsaicinrezeptor (Untertyp VR1) sind als SEQ.-ID Nr. 1 bzw. 2 bereitgestellt. Nucleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenzen eines Human-Capsaicinrezeptors (Untertyp VR1) sind als SEQ.-ID Nr. 33 und 34 bereitgestellt. Eine für Mäuse-Capsaicinrezeptor-Untertyp VR1 kodierende Nucleotidsequenz umfasst die Sequenzen von SEQ.-ID Nr. 10 und 11. Der Hühner-Capsaicinrezeptor-Untertyp VR1 ist als SEQ.-ID Nr. 24 und 25 bereitgestellt.

[0062] Die Nucleinsäure- und die abgeleitete Aminosäuresequenz von Ratten-Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid 1 (VRRP-1; oder Untertyp VR2) sind als SEQ.-ID Nr. 3 bzw. 4 bereitgestellt. Eine Sequenz, die für Human-Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert (als Human-VR2 bezeichnet), umfasst die Nucleotidsequenzen SEQ.-ID Nr. 35 und 36.

[0063] Die Erfindung erstreckt sich auch auf Varianten von Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden. Eine bevorzugte Variante ist eine mit zumindest 80% Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit,

noch bevorzugter von zumindest 90% Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit, noch bevorzugter von zumindest 95% Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit, mit einer Aminosäuresequenz eines Capsaicinrezeptors, Untertyp VR1 oder VR2.

[0064] Es ist für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig, dass infolge der Degeneration des genetischen Codes eine Vielzahl an degenerierten Varianten von Nucleotidsequenzen, die für Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren, wobei einige minimale Homologie mit den Nucleotidsequenzen bekannter und natürlich vorkommender Gene aufweisen, produziert werden können. Die Erfindung betrifft jede mögliche Variation von Nucleotidsequenz, die durch Selektieren von Kombinationen auf der Basis potenzieller ausgewählter Codons gebildet werden kann. Diese Kombinationen erfolgen gemäß dem genetischen Standard-Triplett-Code (angewandt auf die Nucleotidsequenz von natürlich vorkommendem Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid), wobei alle derartige Variationen als spezifisch hierin offenbart gelten.

[0065] Obwohl Nucleotidsequenzen, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptide kodieren, und ihre Varianten vorzugsweise zur Hybridisierung an die Nucleotidsequenz der natürlich vorkommenden Polypeptide unter entsprechend ausgewählten Stregebedingungen fähig sind, kann es vorteilhaft sein, Nucleotidsequenzen zu produzieren, die für Rezeptoren oder ihre Derivate kodieren, die einen wesentlich anderen Codon-Verwendungszweck aufweisen. Codons können ausgewählt sein, um die Rate zu erhöhen, mit der die Expression des Polypeptids in einem bestimmten prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt je nach Häufigkeit, mit der bestimmte Codons durch den Wirt verwendet werden, eintritt. Andere Gründe für die wesentliche Veränderung der Nucleotidsequenz, die für Capsaicinrezeptor, Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid und ihre Derivate kodiert, ohne die kodierten Aminosäuresequenzen zu modifizieren, umfassen die Produktion von RNA-Transkripts mit günstigeren Eigenschaften (z. B. verlängerte Halbwertszeit) als Transkripte, die aus der natürlich vorkommenden Sequenz stammen.

[0066] Nucleotidsequenzen, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid, Capsaicinrezeptorverwandtes Polypeptid und/oder ihre Derivate kodieren, können zur Gänze durch synthetische Chemie synthetisiert und das synthetische Gen anschließend in beliebige der zahlreichen zur Verfügung stehenden DNA-Vektoren und Expressionssysteme unter Einsatz von Reagenzien inseriert werden, die zum Zeitpunkt der Einreichung der vorliegenden Anmeldung allgemein bekannt. Außerdem kann synthetische Chemie dazu dienen, Mutationen in eine Sequenz einzuführen, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert.

[0067] Im Schutzzumfang der Erfindung sind auch Polynucleotidsequenzen enthalten, die zur Hybridisierung an die Nucleotidsequenz beliebiger der bereitgestellten Nucleinsäuresequenzen von Capsaicinrezeptoren, Untertypen VR1 oder VR2, fähig sind. Von besonderem Interesse sind Polynucleotidsequenzen, die zur Hybridisierung unter verschiedenen Stregebedingungen an die Kodiersequenz für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid (z. B. Nucleotide 81-2594 von SEQ.-ID Nr.1 oder Nucleotide 14-2530 von SEQ.-ID NR. 33), an Folgendes fähig sind: eine Region einer für Capsaicinrezeptor kodierenden Sequenz oder einer für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodierenden Sequenz, die Homologie mit anderen derartigen Sequenzen aufweist (z. B. eine Sequenz, die für einen zusammenhängenden Abschnitt von Aminosäureresten in SEQ.-ID Nr. 2 kodiert (z. B. Aminosäurereste 636–706 von SEQ.-ID Nr. 2), eine Sequenz, die für einen zusammenhängenden Abschnitt von Aminosäureresten in SEQ.-ID Nr. 33 kodiert (z. B. Aminosäurereste 636–706 von SEQ.-ID Nr. 33), und andere Sequenzen, die Bereiche von Homologie mit anderen für Capsaicinrezeptor kodierenden Sequenzen und/oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden kodierenden Sequenzen aufweist, sowie Sequenzen, die in einzigartiger Weise Sequenzen identifizieren, die für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren. Von besonderem Interesse sind Capsaicinrezeptor-VR1- oder -VR2-Polynucleotidsequenzen, die für Human-Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Human-Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren. Die Hybridisierungsbedingungen basieren auf der Schmelztemperatur (T_m) des Nucleinsäure-Bindungskomplexes oder der Sonde, wie dies von Berger et al., 1987 Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Bd. 152, Academic Press, San Diego, CA, USA (hierin durch Verweis aufgenommen) gelehrt wird, und können unter definierter Strenge herrschen.

[0068] Modifizierte Nucleinsäuresequenzen, die für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren und gemäß der Erfindung verwendet werden können, enthalten Deletionen, Insertionen oder Substitutionen unterschiedlicher Nucleotide, die ein Polynucleotid ergeben, das für den gleichen oder einen funktionell gleichwertigen Capsaicinrezeptor oder das gleiche oder ein funktionell gleichwertiges Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodiert. Das Protein kann auch Deletionen, Insertionen oder Substitutionen von Aminosäureresten umfassen, die ein Polypeptid ergeben, das gegenüber einem Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid funktionell gleichwertig ist. Beabsichtigte Aminosäure-Substitutionen können basierend auf der Ähnlichkeit hinsichtlich Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobie, Hydrophilie und/oder der amphipathischen Beschaffenheit der Reste erfolgen – mit der Maßgabe, dass die biologische Aktivität des Capsaicinrezeptors beibehalten wird. Beispielsweise sind negativ geladene Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure; positiv geladene Aminosäuren sind Lysin und Arginin; und Aminosäuren mit ungeladenen po-

laren Kopfgruppen mit ähnlichen Hydrophiliewerten sind Leucin, Isoleucin, Valin; Glycin, Alanin; Asparagin, Glutamin; Serin, Threoninphenylalanin und Tyrosin.

[0069] Allele von Capsaicinrezeptor und Allele von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid sind ebenfalls im Schutzbereich der Erfindung enthalten. Ein „Allel“ oder eine „allelische Sequenz“ ist hierin eine alternative Form eines Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids. Allele resultieren aus einer Mutation (d. h. einer Änderung der Nucleinsäuresequenz) und produzieren im Allgemeinen modifizierte mRNA und/oder Polypeptide, die eine veränderte Struktur oder Funktion im Vergleich zum natürlich vorkommenden Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid aufweisen können oder nicht. Jedes beliebige Gen kann keine, eine oder zahlreiche allele Formen besitzen. Übliche Mutationsveränderungen, die zu Allelen führen, werden im Allgemeinen natürlichen Deletionen, Additionen oder Substitutionen von Aminosäuren zugeschrieben. Jede dieser Veränderungen kann alleine oder in Kombination mit den anderen Veränderungen sowie einmal oder mehrmals in einer bestimmten Sequenz erfolgen.

Isolierung von Polynucleotiden, die für Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid kodieren, aus anderen Spezies

[0070] Für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierende Polynucleotide, für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodierende Polynucleotide oder Abschnitte davon können als Sonden zur Identifikation und Klonieren von Homologen der hierin offenbarten Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptidsequenzen verwendet werden. Von besonderem Interesse sind Säugetierhomologe (insbesondere die Humanhomologie der offenbarten Sequenzen, die für Ratten-Capsaicinrezeptor und für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren), wobei die Homologen substantielle Sequenzähnlichkeit untereinander aufweisen, d. h. zumindest 40%, üblicherweise zumindest 60%, noch häufiger zumindest 75%, noch häufiger zumindest 90%, noch häufiger zumindest 95%. Säugetierhomologe von Capsaicinrezeptor können auch einen hohen Grad an Ähnlichkeit mit dem hierin offenbarten Capsaicinrezeptor in der Nähe der vorhergesagten Pore-Loop- und sechsten Transmembran-Domänen aufweisen. In diesen Regionen können die Capsaicinrezeptor-Homologen hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, z. B. zumindest etwa 40%, üblicherweise zumindest etwa 60–75% Aminosäuresequenz-Identität, wobei die Nucleotidsequenz-Ähnlichkeit zumindest etwa 40%, üblicherweise zumindest etwa 60–90% beträgt.

[0071] Die Sequenzähnlichkeit wird auf der Basis einer Referenzsequenz berechnet, die eine Untergruppe einer größeren Sequenz sein kann, z. B. ein konserviertes Motiv, eine kodierende Region, eine flankierende Region usw. Eine Referenzsequenz besitzt eine Länge von zumindest etwa 18 nt, noch häufiger von zumindest etwa 30 nt, und kann sich bis zur kompletten Sequenz erstrecken, die gerade verglichen wird. Algorithmen für die Sequenzanalyse sind auf dem Gebiet allgemein bekannt, z. B. der von Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403–10 (1990) beschriebene BLAST. Die Spezifität der Sonde, die Frage, ob sie aus einer hochspezifischen Region, z. B. aus 10 einmalig vorhandenen Nucleotiden in der 5'-Regulatorregion, oder einer weniger spezifischen Region, z. B. insbesondere in der 3'-Region, besteht, und die Strenge der Hybridisierung oder Amplifikation (maximal, hoch, mittel oder niedrig) bestimmen, ob die Sonde nur natürlich vorkommende und für Capsaicinrezeptor kodierende Sequenzen, Allele oder verwandte Sequenzen identifiziert.

[0072] Die Sonden der Erfindung – ob sie nun für die Detektion verwandter Sequenzen verwendet werden oder nicht – umfassen vor zumindest 30%, noch bevorzugter zumindest 50%, der Nucleotide aus beliebigen der hierin beschriebenen Sequenzen, die für Capsaicinrezeptor oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren. Die Hybridisierungssonden der Erfindung können aus den bereitgestellten VR1- und VR2-Nucleotidsequenzen oder aus ihren entsprechenden genomischen Sequenzen stammen, z. B. aus Promotoren, Enhancer- (Verstärker-) Elementen und Introns der natürlichen für Capsaicinrezeptor kodierenden Sequenz. Die Hybridisierungssonden können mit einer Vielzahl an Reportermolekülen detektierbar markiert sein, z. B. mit Radionucliden (z. B. ³²P oder ³⁵S) oder mit enzymatischen Markern (z. B. alkalische Phosphatase, mittels Avidin/Biotin-Kopplungssystemen an die Sonde gebunden) u. dgl.

[0073] Spezifische Hybridisierungssonden können auch durch Klonieren der bereitgestellten Nucleinsäuresequenzen zu Vektoren für die Produktion von mRNA-Sonden hergestellt werden. Solche Vektoren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und im Handel erhältlich sind, können dazu dienen, RNA-Sonden in vitro unter Einsatz geeigneter RNA-Polymerase (z. B. T7- oder SP6-RNA-Polymerase) und zweckmäßiger radioaktiv markierter Nucleotide zu synthetisieren.

[0074] Nucleinsäuren mit Sequenzähnlichkeit werden durch Hybridisierung unter wenig strengen Bedingungen detektiert, z. B. bei 50°C und 10 × SSC (0,9 M Salzlösung/ 0,09 M Natriumcitrat), und bleiben gebunden, wenn sie Waschen bei 55°C in 1 × SSC unterzogen werden. Die Sequenzidentität kann durch Hybridisierung unter strengen Bedingungen bestimmt werden, z. B. bei 50°C oder mehr und 0,1 × SSC (9 mM Salzlösung/0,9 mM Natriumcitrat). Durch Verwendung von Sonden, insbesondere von markierten Sonden von DNA-Sequenzen, kann man homologe oder verwandte Gene isolieren. Die Quelle homologer Gene kann jede Spezies sein, beispielsweise Primaten, insbesondere Menschen; Nagetiere, z. B. Ratten und Mäuse; Hunde; Katzen; Rinder;

Schafe, Pferde; Hefe; Drosophila, Caenorhabditis usw. Von besonderem Interesse ist die Identifikation und Isolation von für Human-Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierenden Polynucleotiden und von Polynucleotiden, die für Human-Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren.

[0075] Die Nucleinsäuresequenzen von Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid können auch dazu dienen, Hybridisierungs sonden für die Kartierung einer natürlich vorkommenden genomischen Sequenz zu erzeugen. Die Sequenz kann zu einem bestimmten Chromosom oder einer spezifischen Region des Chromosoms unter Anwendung allgemein bekannter Techniken kartiert werden. Dazu zählen In-situ-Hybridisierung an Chromosomenspreads, fluss sortierte chromosomale Präparationen oder künstliche Chromosomenkonstruktionen wie z. B. künstliche Hefechromosome, künstliche bakterielle Chromosome, bakterielle P1-Konstruktionen oder Einzelchromosomen-cDNA-Bibliotheken (siehe Price, Blood Rev. 7, 127–134 (1993) und Trask, Trends Genet. 7, 149–154 (1991)). Die fluoreszierende In-situ-Hybridisierung von Chromosomenspreads ist z. B. von Verma et al., 1988 Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York, NY, USA beschrieben.

[0076] Informationen bezüglich der chromosomalen Kartierung von Sequenzen, die für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren, können mit zusätzlichen genetischen Kartierungsdaten korreliert werden. Die Korrelation zwischen der Position einer Sequenz, die für Capsaicinrezeptor oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, auf einer physikalischen chromosomalen Karte und einer spezifischen Krankheit (oder Prädisposition für eine bestimmte Krankheit) kann dazu beitragen, die mit dieser genetischen Krankheit assoziierte DNA-Region einzuengen. Die Nucleotidsequenzen der Erfindung können dazu dienen, Differenzen der Gensequenzen (z. B. Unterschiede hinsichtlich der chromosomalen Position infolge von Translokation, Inversion usw. oder andere Unterschiede in der für Capsaicinrezeptor kodierenden Region infolge einer oder mehrerer Insertionsmutationen oder der Deletion der Sequenzen, die für Capsaicinrezeptor oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren) zwischen normalen, Träger oder betroffenen Individuen zu detektieren. Beispiele für Krankheiten, deren Behandlung von solchen Informationen profitieren könnte, sind u. a. komplexe regionale Schmerzsyndrome, Morbus Sudeck, postherpetische Neuralgie, Psoriasis, reaktive Atemwegserkrankungen (z. B. Asthma, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung), Osteoarthritis, rheumatoide Arthritis, diabetische Neuropathie, AIDS-assoziierte Neuropathien und vererbte Neuropathien (z. B. assoziiert mit Capsaicinrezeptor-Dysfunktion).

Verlängerung der für Capsaicinrezeptor kodierenden Polynucleotidsequenz

[0077] Die Polynucleotidsequenz, die für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, kann mittels einer partiellen Nucleotidsequenz und unter Anwendung verschiedener auf dem Gebiet bekannter Verfahren verlängert werden, um stromauf gelegene Sequenzen wie z. B. Promotoren und regulatorische Elemente zu detektieren. Gobinda et al., PCR Methods Applic. 2, 318–322 (1993) offenbaren „Restriktionsstellen“-PCR als direktes Verfahren, das universelle Primer verwendet, um an einen bekannten Locus angrenzende unbekannte Sequenzen zu gewinnen. Zunächst wird genomische DNA in Gegenwart eines Primers für eine Linkersequenz und eines für die bekannte Region spezifischen Primers amplifiziert. Die amplifizierten Sequenzen werden einer zweiten PCR-Runde mit dem gleichen Linkerprimer und einem anderen spezifischen Primer innerhalb des ersten unterzogen. Die Produkte jeder PCR-Runde werden mit einer geeigneten RNA-Polymerase transkribiert und mittels reverser Transkriptase sequenziert.

[0078] Inverse-PCR kann dazu dienen, Sequenzen unter Verwendung divergierender Primer auf der Basis einer bekannten Region zu amplifizieren oder zu verlängern (Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16, 8186 (1988)). Die Primer können mittels OLIGO® 4.06 Primer Analysis Software (1992; National Biosciences Inc., Plymouth, MN, USA) oder anderer zweckmäßiger Programme so konstruiert sein, dass sie eine Länge von 22–30 Nucleotiden aufweisen, einen GC-Gehalt von 50% oder mehr besitzen und bei Temperaturen von etwa 68°C bis 72°C an die Zielsequenz anellieren. Das Verfahren verwendet mehrere Restriktionsenzyme, um ein geeignetes Fragment in der bekannten Region eines Gens zu erzeugen. Das Fragment wird dann durch intramolekulare Ligation zirkularisiert und als PCR-Templat verwendet.

[0079] Einfang- bzw. Capture-PCR (Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1, 111–119 (1991)) ist ein Verfahren zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten, die an eine bekannte Sequenz in Human- und künstlicher Hefe-Chromosomen-DNA angrenzen. Capture-PCR erfordert auch mehrfache(n) Restriktionsenzym-Verdau und Ligationen, um eine konstruierte doppelstrangige Sequenz in einen unbekannten Abschnitt des DNA-Moleküls vor der PCR zu setzen.

[0080] Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung unbekannter Sequenzen ist jenes von Parker et al., Nucleic Acids Res. 19, 3055–3060 (1991). Außerdem kann man PCR, verschachtelte Primer und PromoterFinder-Bibliotheken verwenden, um genomische DNA „durchzugehen“ (PromoterFinder™ Clontech, Palo Alto, CA, USA). Dieses Verfahren macht das Screenen von Bibliotheken überflüssig und eignet sich zur Lokalisierung von Intron-Exon-Verbindungsstellen. Vorzugsweise wurden die Bibliotheken zur Identifikation von cDNA voller Länge größtenteils solcherart ausgewählt, um größere cDNA zu enthalten. Noch bevorzugter sind die zur

Identifikation von cDNA voller Länge verwendeten Bibliotheken jene, die mittels zufallsverteilt bindender Primer erzeugt werden – solche Bibliotheken enthalten nämlich mehrere Sequenzen, die Regionen 5' von der bzw. den Sequenzen) von Interesse umfassen. Eine mittels zufallsverteilt bindender Primer erzeugte Bibliothek kann besonders dann nützlich sein, wenn Oligo-d(T)-Bibliotheken keine cDNA voller Länge liefern. Genomische Bibliotheken sind zur Identifikation und Isolation nichttranslatierter 5'-Regulatorregionen einer oder mehrerer Sequenzen) von Interesse.

[0081] Kapillar-Elektrophorese kann zur Analyse der Größe oder Bestätigung der Nucleotidsequenz von Sequenzierungs- oder PCR-Produkten dienen. Systeme zum raschen Sequenzieren sind von Perkin Elmer, Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA) und anderen Firmen erhältlich. Das kapillare Sequenzieren kann fließfähige Polymere für elektrophoretische Trennung, vier unterschiedliche Laser-aktivierbare Fluoreszenzfarbstoffe (einen für jedes Nucleotid) und eine CCD-Kamera für die Detektion der durch die Fluoreszenzfarbstoffe ausgestrahlten Wellenlängen verwenden. Die Ausgangs-/Licht-Intensität wird unter Einsatz geeigneter Software (z. B. Genotyper™ und Sequence Navigator™ von Perkin Elmer) in elektrisches Signal umgewandelt. Das gesamte Verfahren vom Laden der Proben bis zur Computeranalyse und elektronischen Datenanzeige ist computergesteuert. Die kapillare Elektrophorese kommt besonders für das Sequenzieren kleiner DNA-Stücke in Frage, die in begrenzten Mengen in einer bestimmten Probe vorkommen können. Die Kapillar-Elektrophorese sorgt in 30 Minuten für reproduzierbares Sequenzieren von bis zu 350 bp M13-Phagen-DNA (Ruiz-Martinez, Anal. Chem. 65, 2851–2858 (1993)).

Herstellung von Polynucleotiden, die für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren

[0082] Gemäß der vorliegenden Erfindung können Polynucleotidsequenzen, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptide oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren (welche Capsaicinrezeptor-Polypeptide und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide, Fragmente des natürlich vorkommenden Polypeptids, Fusionsproteine und funktionelle Äquivalente davon enthalten) in rekombinanten DNA-Molekülen verwendet werden, die die Expression von Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden in geeigneten Wirtszellen lenken. Infolge der inhärenten Degeneration des genetischen Codes können andere DNA-Sequenzen, die für im Wesentlichen die gleiche oder eine funktionell gleichwertige Aminosäuresequenz kodieren, für das Klonieren und Exprimieren von Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid herangezogen werden. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung offenkundig ist, kann es vorteilhaft sein, für Capsaicinrezeptor kodierende Nucleotidsequenzen und Nucleotidsequenzen, die für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren, zu produzieren, die nicht natürlich vorkommende Codons besitzen. Es können von einem bestimmten prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt bevorzugte Codons (Murray et al., Nucl. Acids Res. 17, 477–508 (1989)) beispielsweise ausgewählt sein, um die Expressionsrate zu erhöhen oder rekombinante RNA-Transkripte mit einer oder mehreren günstigen Eigenschaften) zu produzieren (z. B. längere Halbwertszeit als Transkripte aus natürlich vorkommender Sequenz).

[0083] Die Nucleotidsequenzen der Erfindung können konstruiert sein, um eine Sequenz, die für Capsaicinrezeptor oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, aus einer Vielzahl an Gründen zu verändern; Beispiele dafür sind Änderungen, die die Klonierung, Verarbeitung und/oder Expression des Genprodukts erleichtern. Beispielsweise können unter Anwendung auf dem Gebiet bekannter Techniken Mutationen eingeführt werden, z. B. mittels stellergerichteter Mutagenese, um neue Restriktionsstellen zu insertieren, Glykosylierungsmuster oder Codonpräferenz zu modifizieren, Spleißvarianten zu produzieren usw.

[0084] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann ein natürliches, modifiziertes oder rekombinantes Polynucleotid, das für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, an eine heterologe Sequenz ligiert sein, um für ein Fusionsprotein zu kodieren. Solche Fusionsproteine können auch konstruiert sein, eine Spaltungsstelle zwischen einer für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierenden Sequenz (oder einer Sequenz, die für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert) und einer heterologen Polypeptidsequenz zu enthalten, sodass die heterologe Polypeptidsequenz weg vom Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid gespalten und gereinigt werden kann.

[0085] In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung kann eine Nucleotidsequenz, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, unter Anwendung auf dem Gebiet allgemein bekannter chemischer Verfahren teilweise oder zur Gänze synthetisiert werden (siehe z. B. Caruthers et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215–223 (1980), Horn et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225–232 (1980)). Alternativ dazu kann das Polypeptid selbst unter Anwendung chemischer Verfahren produziert werden, um eine Aminosäuresequenz eines Capsaicinrezeptors oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids ganz oder teilweise zu synthetisieren. Beispielsweise kann die Peptidsynthese mittels verschiedener Festphasentechniken erfolgen (Roberge et al., Science 269, 202–204 (1995)); automatisierte Synthese kann z. B. mittels des ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt werden.

[0086] Das neu synthetisierte Polypeptid kann durch präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (z. B. Creighton, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co, New York, NY, USA (1983)) substanziell gereinigt werden. Die Zusammensetzung der synthetischen Polypeptide kann durch Aminosäureanalyse oder -Sequenzierung bestätigt werden (z. B. mittels des Edman-Abbauverfahrens; Creighton, s. o.). Außerdem kann die Aminosäuresequenz von Capsaicinrezeptor, Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid oder jedem Teil davon mit direkter Synthese verändert und/oder mittels chemischer Verfahren mit Sequenzen aus anderen Proteinen oder jedem beliebigen Teil davon kombiniert werden, um eine Polypeptidvariante zu produzieren.

Expressionssysteme für Capsaicinrezeptor und Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid

[0087] Die Erfindung betrifft die Expression von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden einzeln oder in Kombination (z. B. Co-Expression). Um ein biologisch aktives Capsaicinrezeptor-Polypeptid und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid zu exprimieren, wird die Nucleotidsequenz, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid, ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid und/oder ein funktionelles Äquivalent davon kodiert, in einen zweckmäßigen Expressionsvektor inseriert, d. h. einen Vektor mit den notwendigen Elementen für die Transkription und Translation der inserierten Kodiersequenz. Verfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt sind, eignen sich zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die eine erwünschte für ein Polypeptid kodierende Sequenz und vorteilhafte Transkriptions- oder Translations-Steuerungen umfassen. Zu diesen Verfahren zählen In-vitro-DNA-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren und In-vivo-Rekombination oder genetische Rekombination. Solche Techniken sind in Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, USA, und in Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA beschrieben.

[0088] Es kann eine Vielzahl von Expressionsvektor/Wirtszellsystemen verwendet werden, um eine Sequenz zu exprimieren, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid und ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert. Dazu zählen u. a. Amphibien-Oozyten (z. B. *Xenopus*-Oocyte); Mikroorganismen wie etwa Bakterien, transformiert mit rekombinanten Bakteriophagen, Plasmid- oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren; mit Hefe-Expressionsvektoren transformierte Hefe; mit viralen Expressionsvektoren infizierte Insektenzellsysteme (z. B. Baculovirus); mit viralen Expressionsvektoren transfigierte Pflanzenzellsysteme (z. B. Blumenkohl-Mosaikvirus, CaMV; Tabak-Mosaikvirus, TMV) oder mit bakteriellen Expressionsvektoren transfigierte Pflanzensysteme (z. B. Ti oder pBR322-Plasmid); oder tierische Zellsysteme (z. B. Säugetier-Zellsysteme). Vorzugsweise werden die Sequenzen der Erfindung, insbesondere für Capsaicinrezeptor kodierende Sequenzen, in Säugetier-Zellsystem (z. B. Humanembryo-Nierenzellen wie etwa HEK 293), einem Amphibien-Oozyten (z. B. durch Injizieren von *Xenopus*-Oozyten mit komplementärer Capsaicinrezeptor-kodierender RNA) oder anderen Wirtszellen exprimiert, die leicht in Kultur vermehrt und transformiert oder transfigiert werden können, um transient oder stabil – vorzugsweise stabil – eine Sequenz zu exprimieren, die für Capsaicinrezeptor und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert.

[0089] Wirtszellen können für die Expression von Capsaicinrezeptor-Polypeptid und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid je nach der Fähigkeit der Zelle ausgewählt werden, die Expression der inserierten Sequenzen zu modulieren oder das exprimierte Protein auf erwünschte Art zu verarbeiten. Solche Modifikationen des Polypeptids sind u. a. Acetylierung, Carboxylierung, Glykosylierung, Phosphorylierung, Lipidation und Acylierung. Die posttranslationelle Verarbeitung, die das Spalten einer „Präpro“-Form des Proteins umfasst, kann hinsichtlich der korrekten Polypeptidfaltung, Membraninsertion und/oder Funktion auch von Bedeutung sein. Wirtszellen wie z. B. HEK293, CHO, HeLa, MDCK, W138, *Xenopus*-Oozyten u. a. besitzen eine spezifische Zell-Maschinerie und charakteristische Mechanismen für solche posttranslationellen Aktivitäten und können ausgewählt sein, um die korrekte Modifikation und Verarbeitung des eingeführten fremden Polypeptids zu gewährleisten.

[0090] Der bzw. die für die Expression eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids und/oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids verwendete Vektoren) variiert bzw. variieren und hängen von folgenden Faktoren ab: der Wirtszelle, in der das Capsaicinrezeptor-Polypeptid zu exprimieren ist; ob Capsaicinrezeptor-Polypeptid- und mit Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptidsequenzen entweder aus einem Einzelkonstrukt oder aus getrennten Konstrukten zu co-exprimieren sind; und von der beabsichtigten Verwendung des produzierten Polypeptids. Wenn beispielsweise große Mengen an Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid erforderlich sind (z. B. für die Antikörperproduktion), sind unter Umständen Vektoren wünschenswert, die die hochgradige Expression von problemlos zu reinigenden Fusionsproteinen lenken. Zu solchen Vektoren zählen z. B. bakterielle Expressionsvektoren wie etwa multifunktionelle *E.coli*-Klonierungs- und Expressionsvektoren, z. B. Bluescript® (Stratagene; sorgt für die Produktion von Polypeptid- β -Galactosidase-Hybridproteinen); und pGEX-Vektoren (Promega, Madison, WI, USA; sorgt für die Produktion von Glutathion-S-Transferase- (GST-) Fusionsproteinen). Wenn die Wirtszelle Hefe ist (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*),

kommen einige Vektoren mit konstitutiven oder induzierbaren Promotoren wie z. B. α -Faktor, Alkohol-Oxidase und PGH in Frage. Ein Überblick findet sich in Ausubel et al. (s. o.) und Grant et al., *Methods in Enzymology* 153, 516–544 (1987).

[0091] Wenn die Wirtszelle eine Säugetierzelle ist, können einige Expressionssysteme verwendet werden. Beispielsweise kann der Expressionsvektor aus einem Expressionssystem auf viraler Basis abgeleitet sein, z. B. einem Expressionssystem, das aus einer Adenovirus-, SV40-, CMV- oder RSV-Nucleotidsequenz abgeleitet ist. Der Wirkungsgrad der Expression kann durch Vorsehen von Enhancern verstärkt werden, die für das jeweils verwendete Zellsystem geeignet sind (Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125–162 (1994); Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153, 516–544 (1987); z. B. kann der RSV-Enhancer zur Steigerung der Expression in Säugetier-Wirtszellen dienen).

[0092] Die „Steuerelemente“ oder „regulatorischen Sequenzen“ dieser Systeme, die hinsichtlich ihrer Stärke und Spezifität variieren, sind jene nichttranslatierten Regionen des Vektors, Enhancer, Promotoren und untranslatierten 3'-Regionen, die mit Zell-Wirtsproteinen in Wechselwirkung treten, um die Transkription und Translation einer Nucleotidsequenz von Interesse zu vereinfachen. Je nach dem verwendeten Vektorsystem und Wirt kommen einige transkriptionelle und translationelle Elemente, z. B. konstitutive und induzierbare Promotoren, in Frage. Solche Steuerelemente oder regulatorischen Sequenzen werden je nach der Wirtszelle ausgewählt, in der das für Capsaicinrezeptor kodierende Polynucleotid und/oder das für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodierende Polynucleotid exprimiert werden soll. Beispielsweise sind in Säugetier-Zellsystemen Promotoren aus den Säugetiergenen oder Säugetierviren am geeignetsten. Wenn es erwünscht ist, eine Zelllinie mit mehreren Kopien einer Sequenz zu erzeugen, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, kommen aus SV40 oder EBV abgeleitete Vektoren in Verbindung mit anderen optionalen Vektorelementen, z. B. einem zweckmäßigen selektierbaren Marker, in Frage.

[0093] Möglicherweise sind auch spezifische Initiationssignale für die effiziente Translation einer Sequenz erforderlich, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, z. B. das ATG-Initiationscodon und flankierende Sequenzen für die bakterielle Expression. Wenn eine native Sequenz, einschließlich ihres Initiationscodons und stromauf gelegener Sequenzen, in den geeigneten Expressionsvektor insertiert wird, sind unter Umständen keine zusätzlichen Translationssteuersignale erforderlich. Wenn hingegen nur die kodierende Sequenz oder ein Abschnitt davon in einen Expressionsvektor insertiert wird, müssen exogene Transkriptionssteuersignale einschließlich des ATG-Initiationscodons zur Verfügung stehen. Außerdem muss das Initiationscodon im korrekten Leserahmen vorliegen, um die Transkription des gesamten Inserts sicherzustellen. Exogene transkriptionelle Elemente und Initiationscodons können aus verschiedenen Quellen stammen und entweder natürlich oder synthetisch sein.

[0094] Wenn langfristige rekombinante Polypeptidproduktion mit hoher Ausbeute erwünscht ist, ist stabile Expression vorzuziehen. Beispielsweise können Zelllinien, die Capsaicinrezeptor- und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid stabil exprimieren, unter Verwendung von Expressionsvektoren transformiert werden, die virale Replikationsursprünge oder endogene Expressionselemente und ein selektierbares Marker-Gen enthalten. Nach der Einführung des Vektors können Zellen in einem angereicherten Medium gezüchtet werden, bevor sie selektivem Medium ausgesetzt werden. Der selektierbare Marker, der Resistenz gegenüber dem selektiven Medium verleiht, ermöglicht das Wachstum und die Gewinnung von Zellen, die die eingesetzten Sequenzen erfolgreich exprimieren. Resistente, stabil transformierte Zellen können unter Anwendung von Gewebekulturtechniken, die für den Wirtszellentyp adäquat sind, vermehrt werden.

[0095] Es kann eine beliebige Anzahl an Selektionssystemen zur Gewinnung transformierter Zelllinien herangezogen werden. Dazu zählen die Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase- (Wigler et al., *Cell* 11, 223–232 (1977)) und Adenin-Phosphoribosyl-Transferase- (Lowy et al., *Cell* 22, 817–823 (1980)) Gene, die in tk- bzw. aprt-Zellen verwendet werden können. Antimetabolit- oder Antibiotikaresistenz kann ebenso als Grundlage für die Auswahl dienen, z. B. dhfr, das Methotrexat-Resistenz verleiht (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567–3570 (1980)), und npt, das Resistenz gegenüber den Aminoglycosiden Neomycin und G-418 verleiht (Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150, 1–14 (1981)). Zusätzliche auswählbare Gene wurden ebenfalls beschrieben, z. B. trpB, das es den Zellen ermöglicht, Indol anstelle von Tryptophan zu verwenden, oder hisD, das es den Zellen ermöglicht, Histidin anstelle von Histidin zu verwenden (Hartman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047–8051 (1988)). Auswählbare Marker enthalten auch sichtbare Marker wie z. B. Anthocyanine, β -Glucuronidase und ihr Substrat, GUS, und Luciferase und ihr Substrat, Luciferin. Solche sichtbaren Marker eignen sich dazu, Transformanten zu identifizieren und die Menge an transienter oder stabiler Proteinexpression zu quantifizieren, die man einem spezifischen Vektorsystem zuschreiben kann (Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55, 121–131 (1995)).

[0096] Alternativ dazu können Wirtszellen, die die kodierende Sequenz für Capsaicinrezeptor-Polypeptide und/oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide enthalten und Capsaicinrezeptor-Polypeptide und/oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide exprimieren, durch eine Vielzahl an Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren identifiziert werden. Zu diesen Verfahren zählen DNA-DNA- oder

DNA-RNA-Hybridisierung und Protein-Bioassay- oder Immunassay-Techniken zur Detektion und/oder Quantifizierung der Nucleinsäure oder des Proteins.

[0097] Die Gegenwart von Polynucleotidsequenzen, die für ein Capsaicinrezeptor- und/oder ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren, kann durch DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybridisierung oder PCR-Amplifikation unter Einsatz von Sonden, Abschnitten oder Fragmenten von Polynucleotiden detektiert werden, die für Capsaicinrezeptor und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren. Tests auf der Basis von Nucleinsäure-Amplifikation umfassen die Verwendung von Oligonucleotiden oder Oligomeren auf der Basis einer Sequenz, die für ein Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, um Transformatanten zu detektieren, die die erwünschte DNA oder RNA enthalten. Der Ausdruck „Oligonucleotide“ oder „Oligomere“ bezieht sich hierin auf eine Nucleinsäuresequenz von zumindest etwa 10 Nucleotiden bis zu etwa 60 Nucleotiden, vorzugsweise von etwa 15 bis 30 Nucleotiden, noch bevorzugter von etwa 20 bis 25 Nucleotiden, die als Sonde oder Amplimer verwendbar ist.

[0098] Eine Vielzahl an Immunassays zum Detektieren und Messen der Expression eines spezifischen Proteins unter Einsatz proteinspezifischer polyklonaler oder monoklonaler Antikörper ist auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Beispiele sind der Enzymverbundene Immunosorbent-Assay (ELISA), der Radioimmunassay (RIA) und die Sortierung fluoreszierender aktivierter Zellen (FACS). Diese und andere Tests sind z. B. in Hampton et al., 1990, *Serological Methods, A Laboratory Manual*, APS Press, St. Paul, MN, USA und von Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158, 1211 (1983) beschrieben.

[0099] Es sind zahlreiche detektierbare Marker und Konjugationstechniken auf dem Gebiet bekannt, die in verschiedenen Nucleinsäure- und Aminosäuretests einsetzbar sind. Möglichkeiten zur Produktion markierter Hybridisierungs- oder PCR-Sonden zur Detektion von Sequenzen, die mit Sequenzen verwandt sind, die für ein Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren, sind Oligomarkieren, Nick-Translation, Endmarkierung oder PCR-Amplifikation unter Einsatz eines markierten Nucleotids. Alternativ dazu kann eine Nucleotidsequenz, die für ein Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, zwecks Produktion einer mRNA-Sonde in einen Vektor kloniert werden. Vektoren und Verfahren zur Produktion von mRNA-Sonden sind auf dem Gebiet allgemein bekannt. Geeignete Reportermoleküle oder Marker sind jene Radionuclide, Enzyme, fluoreszierenden, chemilumineszierenden oder chromogenen Mittel sowie Substrate, Co-Faktoren, Inhibitoren, magnetische Teilchen o. dgl., die in US-Patenten 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 und 4.366.241 beschrieben sind, die hierin jeweils durch Verweis aufgenommen sind.

[0100] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Capsaicinrezeptor exprimierenden Wirtszellen unter Anwendung eines funktionellen Tests betreffend die Capsaicinrezeptor-Aktivität gescreent und selektiert. Beispielsweise kann man funktionellen Capsaicinrezeptor exprimierende Wirtszellen auf Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen screenen, nachdem sie einer Capsaicinrezeptor-bindenden Verbindung ausgesetzt wurden (z. B. Capsaicin oder Resiniferatoxin). Wenn die Capsaicinrezeptor-bindende Verbindung ein Capsaicinrezeptor-Agonist ist, führt die Bindung der Agonistenverbindung an den Capsaicinrezeptor zu höheren Werten an intrazellulärem Calcium in der Wirtszelle, die die für Capsaicinrezeptor kodierende Nucleinsäure exprimiert. Verfahren und Zusammensetzungen (z. B. fura-2) zur Überwachung der intrazellulären Calciumkonzentration sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt.

Reinigung von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden

[0101] Verfahren zur Produktion eines Polypeptids nach der Identifikation seines kodierenden Polynucleotids sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt. Wirtszellen, die mit einer oder mehreren Nucleotidsequenz(en) transformiert sind, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert bzw. kodieren, können unter Bedingungen kultiviert werden, die sich für die Expression und Gewinnung des kodierten Polypeptids aus Zellkultur eignen. Das durch eine rekombinante Zelle produzierte Polypeptid kann je nach der im Einsatz befindlichen Sequenz und/der dem Vektor sekretiert oder intrazellulär gehalten werden. Wie dies für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt ist, können Expressionsvektoren, die Polynucleotide enthalten, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptide oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren, mit Signalsequenzen versehen werden, die die Sekretion des oder der kodierten Polypeptids bzw. Polypeptide durch eine prokaryotische oder eukaryotische Zellmembran lenken.

[0102] Die Reinigung von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden kann durch Verwendung eines rekombinanten Konstrukts vereinfacht werden, das eine oder mehrere Nucleotidsequenz(en) enthält, die für eine oder mehrere Polypeptid-domäne(n) kodiert bzw. kodieren, die – wenn sie innerhalb des Rahmens mit der Sequenz exprimiert wird bzw. werden, die für das Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid kodiert – ein Fusionsprotein mit einer die Reinigung erleichternden Domäne liefert (Kroll et al., *DNA Cell Biol.* 12, 441–453 (1993)). Eine oder mehrere spaltbare Linkersequenz(en) zwischen der Reinigungsdomäne und der Sequenz, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptide oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodiert, kann bzw. können vorgesehen sein, um die Reinigung zu ver-

einfachen.

[0103] Capsaicinrezeptor-Polypeptide und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide (dieser Polypeptide umfasst Polypeptide mit einem Abschnitt der nativen Aminosäuresequenz) können auch durch direkte Peptidsynthese unter Anwendung von Festphasentechniken produziert werden (siehe z. B. Stewart et al. 1969, Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco, CA, USA; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154 (1963)). Verschiedene Fragmente von Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid können getrennt chemisch synthetisiert und unter Anwendung chemischer Verfahren kombiniert werden, um das Molekül voller Länge zu produzieren.

[0104] Verfahren zur Reinigung eines erwünschten Polypeptids entweder nach künstlicher Synthese oder rekombinanter Produktion sind Routinevorgänge und auf dem Gebiet allgemein bekannt.

Verwendungszwecke von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden, Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden und Nucleinsäure, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptide oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodiert

[0105] Neben den oben beschriebenen Verwendungszwecken können die hierin offenbarten Nucleotid- und Polypeptidsequenzen in unterschiedlicher Weise verwendet werden, z. B. bei der Produktion von Antikörpern, bei der Identifikation von Capsaicinrezeptor-bindenden Verbindungen und Verbindungen, die Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid binden, welche die Capsaicinrezeptor-Funktion beeinflussen (z. B. in einem Medikamenten-Screeningassay), und bei der Identifikation anderer Polynucleotidsequenzen, die für Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren. Außerdem können Sequenzen, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptide und für Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide kodieren, in diagnostischen Tests zum Einsatz kommen (z. B. für die pränatale oder die postnatale Diagnose). Überdies können für Capsaicinrezeptor kodierende Sequenzen und ihre kodierten Polypeptide auch in Assays verwendet werden, um den Capsaicin-Gehalt einer Probe (z. B. aus einem natürlichen Produkt wie etwa Chili-Extrakt) oder die Capsaicin-fördernden Wirkungen eines Mittels (z. B. eines Kandidatenmittels zur Verwendung als Geschmacks-verstärkendes Additiv in Nahrungsmitteln) zu bewerten.

[0106] Diese und andere Anwendungen der Sequenzen der Erfindung sind nachstehend ausführlich beschrieben.

Screenen hinsichtlich Verbindungen, die Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid binden

[0107] Capsaicinrezeptor-Polypeptide und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide, die jeweils biologisch aktive oder immunogene Fragmente oder Oligopeptide davon besitzen, können für das Screenen von Verbindungen verwendet werden, die Capsaicinrezeptor-Aktivität beeinflussen; dies geschieht z. B. durch spezifische Bindung von Capsaicinrezeptor und Beeinflussung seiner Funktion oder spezifischen Bindung von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid und Beeinflussung seiner Wechselwirkung mit Capsaicinrezeptor, wodurch die Capsaicinrezeptor-Aktivität betroffen wird. Die Identifikation solcher Verbindungen kann in unterschiedlicher Weise mittels Techniken zum Screenen von Medikamenten erfolgen. Von besonderem Interesse ist die Identifikation von Mitteln, deren Aktivität die Beeinflussung von Capsaicinrezeptor-Funktion umfasst. Solche Mittel sind Kandidaten für die Entwicklung von Behandlungen für entzündliche Zustände, die zumindest teilweise mit Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziiert sind (z. B. Psoriasis, reaktive Atemwegserkrankungen (Asthma, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung)), Arthritis (z. B. Osteoarthritis, rheumatoide Arthritis) sowie zur Verwendung als Analgetika. Von besonderem Interesse sind Screeningtests für Mittel, die niedrige Toxizität für Humanzellen aufweisen. Das in einem solchen Test verwendete Polypeptid kann frei in Lösung, an einem festen Träger befestigt, auf einer Zelloberfläche angeordnet oder intrazellulär positioniert sein. Die Screeninganalysen der Erfindung basieren im Allgemeinen auf der Fähigkeit des Mittels, sich an ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid zu binden, an ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid zu binden und/oder eine biologische Aktivität hervorzurufen oder zu hemmen, die man mit Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid assoziiert (es handelt sich also um einen funktionellen Assay oder einen Test unter Einsatz von Radioliganden-Bindungsassays).

[0108] Der hierin verwendete Ausdruck „Mittel“ beschreibt jedes Molekül, z. B. Protein oder Pharmazeutikum, mit der Fähigkeit, eine erwünschte physiologische Funktion von Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid zu verändern (d. h. hervorzurufen oder zu hemmen) oder zu imitieren. Im Allgemeinen werden mehrere Testgemische parallel mit unterschiedlichen Konzentrationen des Mittels laufen gelassen, um eine unterschiedliche Response auf die Konzentrationen zu erhalten. Typischerweise dient eine dieser Konzentrationen als negativer Vergleich, d. h. bei Null-Konzentration oder unterhalb der Detektionsschwelle.

[0109] Kandidaten für Mittel stammen aus mehreren chemischen Klassen, obwohl sie typischerweise organische Moleküle sind, vorzugsweise kleine organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 50 und weniger als etwa 2.500 Da. Kandidaten der Mittel umfassen funktionelle Gruppen, die für die struktu-

relle Wechselwirkung mit Proteinen, insbesondere die Wasserstoffbindung, notwendig sind, und enthalten typischerweise zumindest eine Amin-, Carbonyl-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, vorzugsweise zumindest zwei der funktionellen chemischen Gruppen. Die Kandidaten-Mittel umfassen oft zyklischen Kohlenstoff oder heterozyklische Strukturen und/oder aromatische oder polyaromatische Strukturen, die mit einer oder mehreren der obigen funktionellen Gruppen substituiert sind. Kandidaten-Mittel finden sich auch unter Biomolekülen wie z. B. Peptiden, Sacchariden, Fettsäuren, Steroiden, Purinen, Pyrimidinen, Derivaten, strukturellen Analogen oder Kombinationen davon.

[0110] Kandidaten für Mittel stammen aus einer Vielzahl an Quellen, z. B. aus Bibliotheken synthetischer oder natürlicher Verbindungen. Beispielsweise gibt es zahlreiche Möglichkeiten für die Zufalls- oder gerichtete Synthese einer Vielzahl an organischen Verbindungen und Biomolekülen, etwa die Expression randomisierter Oligonucleotide und Oligopeptide. Alternativ dazu stehen Bibliotheken natürlicher Verbindungen in Form bakterieller, Pilz-, pflanzlicher und tierischer Extrakte (einschließlich Extrakte von Humangewebe zur Identifikation endogener Faktoren, die die Aktivität von Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid beeinflussen) zur Verfügung oder können problemlos produziert werden. Außerdem werden natürliche oder synthetisch produzierte Bibliotheken und Verbindungen durch konventionelle chemische, physikalische und biochemische Verfahren problemlos modifiziert und können zur Produktion kombinatorischer Bibliotheken verwendet werden. Bekannte pharmakologische Mittel können gelenkten oder zufälliger chemischen Modifikationen ausgesetzt werden, z. B. Acylierung, Alkylierung, Veresterung, Amidierung usw., um strukturelle Analoge zu bilden.

[0111] Vorzugsweise ermöglicht das angewendete Medikamenten-Screeningverfahren das Screening von Verbindungen mit hohem Durchsatz, die geeignete Bindungsaffinität für das Capsaicinrezeptor- oder das Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid aufweisen und/oder die eine erwünschte Reaktion hervorrufen, die mit Capsaicinrezeptor- oder mit Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid assoziiert ist. Beispielsweise kann eine große Anzahl unterschiedlicher kleiner Peptid-Testverbindungen auf einem festen Substrat synthetisiert werden, z. B. auf Kunststoffstiften oder einer anderen Oberfläche (siehe z. B. Geysen WO 84/03564, veröffentlicht am 13. September 1984), die Peptid-Testverbindungen können mit Capsaicinrezeptor-Polypeptiden (oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden) in Kontakt gebracht werden, nicht umgesetzte Materialien können gewaschen werden, und gebundener Capsaicinrezeptor (oder gebundenes Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid) kann mittels eines detektierbaren Markers oder Detektion einer biologischen Aktivität, die mit Capsaicinrezeptor-Aktivität (oder der Aktivität von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid) assoziiert ist, detektiert werden. Gereinigter Capsaicinrezeptor oder gereinigtes Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kann auch direkt auf Platten aufgetragen werden, um in In-vitro-Screeningtechniken zum Einsatz zu kommen. Alternativ dazu kann man nichtneutralisierende Antikörper zum Einfangen des Polypeptids und dessen Immobilisieren auf einem festen Träger verwenden.

[0112] Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung von kompetitiven Tests zum Medikamentenscreening, in denen für Capsaicinrezeptor spezifische neutralisierende Antikörper oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid spezifische neutralisierende Antikörper mit einer Testverbindung um die Bindung von Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid konkurrieren. Auf diese Weise können die Antikörper für das Detektieren der Gegenwart von Polypeptid herangezogen werden, das eine oder mehrere antigene Determinante(n) mit einem Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid teilt.

Screening potenzieller Mittel

[0113] Es eignet sich eine Vielzahl an Tests zur Identifikation von Bindungsmitteln für Capsaicinrezeptor-Polypeptid und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid, z. B. markierte In-vitro-Bindungstests, Immunsays für Proteinbindung u. dgl. Beispielsweise kann man durch Produktion großer Mengen an Capsaicinrezeptor-Polypeptiden oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden Liganden oder Substrate identifizieren, die sich an das Protein binden oder ihre Wirkung modulieren oder imitieren. Das gereinigte Protein kann auch zur Bestimmung dreidimensionaler Kristallstruktur verwendet werden, was beim Modellieren intermolekularer Wechselwirkungen zur Anwendung kommt.

[0114] Der Screeningtest kann ein Bindungstest sein, in dem eines oder mehrere Moleküle mit einem Marker verknüpft werden kann bzw. können und der Marker direkt oder indirekt ein detektierbares Signal liefert. Zu Markern zählen Radioisotope, Fluoreszenzmittel, Chemilumineszenzmittel, Enzyme, spezifische Bindungsmoleküle, Teilchen, z. B. magnetische Teilchen, u. dgl. Spezifische Bindungsmoleküle sind z. B. Paare wie etwa Biotin und Streptavidin, Digoxin und Antidigoxin usw. Für die spezifischen Bindungselemente würde das komplementäre Element normalerweise mit einem Molekül markiert werden, das für Detektion sorgt (dies erfolgt in Einklang mit bekannten Verfahren).

[0115] Eine Vielzahl anderer Reagenzien kann in den hierin beschriebenen Screeningtests enthalten sein. Wenn der Test ein Bindungsassay ist, sind Reagenzien wie Salze, neutrale Proteine, z. B. Albumin, Detergen-

zien usw. enthalten, die zur Erleichterung optimaler Protein-Protein-Bindung, Protein-DNA-Bindung dienen und/oder nichtspezifische oder Hintergrund-Wechselwirkungen reduzieren. Reagenzien, die die Wirksamkeit des Tests verbessern, z. B. Protease-Hemmer, Nuclease-Hemmer, antimikrobielle Mittel usw., kommen in Frage. Das Gemisch von Komponenten kann in jeder beliebigen Reihenfolge zugesetzt werden, die für die erforderliche Bindung sorgt. Inkubationen erfolgen bei jeder geeigneten Temperatur, typischerweise zwischen 4 °C und 40°C. Die Inkubationsdauer wird hinsichtlich optimaler Aktivität ausgewählt, kann aber auch optimiert werden, um rasches Screenen mit hohem Durchsatz zu erleichtern. Typischerweise reicht eine Dauer zwischen 0,1 und 1 Stunde aus.

Funktionelle Screeningtests für Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid

[0116] Vorzugsweise werden Capsaicinrezeptor bindende Verbindungen auf Agonisten- oder Antagonistenwirkung in einem funktionellen Test gescreent, der eine biologische Aktivität überwacht, die mit Capsaicinrezeptor-Funktion assoziiert ist, z. B. die Wirkung auf intrazelluläre Werte von Kationen in einer Capsaicinrezeptor exprimierenden Wirtszelle (z. B. Calcium, Magnesium, Guanidin, Kobalt, Kalium, Cäsium, Natrium und Cholin, vorzugsweise Calcium), Liganden-aktivierte Leitfähigkeit, Zelltod (d. h. Rezeptor-medierter Zelltod, der z. B. mittels morphologischer, chemischer oder immunologischer Tests überwacht werden kann), Depolarisierung der Capsaicinrezeptor exprimierenden Zellen (z. B. mittels fluoreszierender Spannungsempfindlicher Farbstoffe), Produktion von zweitem Messenger (z. B. durch Detektion von Veränderungen zyklischer GMP-Werte; siehe z. B. Wood et al., J. Neurochem. 53, 1203–1211 (1989), die durch Radioimmunassay oder ELISA detektiert werden können), Calcium-induzierte Reporter-Gen-Expression (siehe z. B. Ginty, Neuron 18, 183–186 (1997)) oder eine andere problemlos bestimmbare biologische Aktivität, die mit Capsaicinrezeptor-Aktivität oder der Hemmung von Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziiert ist. Vorzugsweise basiert der funktionelle Assay auf der Detektion einer biologischen Aktivität von Capsaicinrezeptor, die mittels gleichzeitigen Screenens mehrerer Proben mit hohem Durchsatz untersucht werden kann; ein Beispiel dafür ist ein funktioneller Test auf der Basis der Detektion einer Änderung der Fluoreszenz, die ihrerseits mit einer Änderung der Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziiert ist. Solche funktionellen Tests dienen dazu, potenzielle Mittel hinsichtlich Aktivität als Capsaicinrezeptor-Agonisten oder -Antagonisten zu screenen.

[0117] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Capsaicinrezeptor exprimierende Zellen (vorzugsweise rekombinante Capsaicinrezeptor exprimierende Zellen) mit fluoreszierend markiertem Calcium vorgeladen (z. B. fura-2). Die Capsaicinrezeptor exprimierenden Zellen werden dann einer Capsaicinrezeptor bindenden Verbindung ausgesetzt und die Wirkung dieser Exposition überwacht. Verbindungskandidaten, die Capsaicinrezeptor-Agonistenaktivität besitzen, sind jene, die im Kontakt mit den Capsaicinrezeptor exprimierenden Zellen eine Capsaicinrezeptor-medüerte Zunahme an intrazellulärem Calcium gegenüber den Vergleichszellen hervorrufen (z. B. Capsaicinrezeptor exprimierende Zellen in Abwesenheit der Kandidatenverbindung, Wirtszellen ohne für Capsaicinrezeptor kodierende Nucleinsäure, Capsaicinrezeptor exprimierende Zellen, die einem bekannten Capsaicinrezeptor-Agonisten ausgesetzt sind). Ebenso können funktionelle Capsaicinrezeptor-Tests dazu dienen, Kandidatenverbindungen zu identifizieren, die die Aktivität eines bekannten Capsaicinrezeptor-Agonisten blockieren (z. B. Blockieren der Aktivität von Capsaicin oder Resiniferatoxin oder Konkurrieren damit), die die Aktivität eines bekannten Capsaicinrezeptor-Antagonisten blockieren (z. B. Blockieren der Aktivität von Capsazepin oder Konkurrieren damit) und/oder die Aktivität als Capsaicinrezeptor-Antagonisten besitzen.

[0118] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifikation von Verbindungen, die Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid binden, wodurch eine agonistische oder antagonistische Wirkung auf Capsaicinrezeptor-assoziierte Funktion hervorgerufen wird (detektiert z. B. durch intrazelluläre Werte von Kationen in der Wirtszelle). Zu diesem Zweck umfasst der funktionelle Assay das In-Kontakt-Bringen von Wirtszellen, die einen Capsaicinrezeptor alleine exprimieren (z. B. VR1), und von Wirtszellen, die ein Capsaicinrezeptor- und ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid co-exprimieren (z. B. VR1 und VRRP-1). Verbindungen, die Capsaicinrezeptor-Aktivität beeinflussen, indem die Funktion eines Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids beeinflusst wird, sind jene, die eine Capsaicinrezeptor-assoziierte Aktivität in Zellen beeinflussen, die Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid co-exprimieren, aber Capsaicinrezeptor-assoziierte Aktivität in Wirtszellen, die Capsaicinrezeptor alleine exprimieren, nicht signifikant beeinflussen. Beispielsweise werden Verbindungen, die eine Capsaicinrezeptor-medüerte Zunahme an intrazellulärem Calcium in Zellen, die Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid co-exprimieren, nicht aber in Zellen, die Capsaicinrezeptor alleine exprimieren, hervorrufen, als Verbindungen identifiziert, die Capsaicinrezeptor-Agonistenaktivität mittels Wechselwirkung mit einem Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid hervorrufen.

Pharmazeutische Zusammensetzungen und andere Zusammensetzungen mit Mitteln, die Capsaicinrezeptor-Aktivität beeinflussen (identifiziert durch den Screeningtest der Erfindung)

[0119] Capsaicinrezeptor bindende Verbindungen und Verbindungen, die Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid binden, eignen sich dazu, Capsaicinrezeptor-medüerte physiologische Reaktionen hervorzurufen oder zu hemmen und kommen besonders in einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Linderung von Symptomen in Frage, die mit chronischen Schmerzen, Entzündung und anderen physiologischen Reaktionen assoziiert sind, die man mit Capsaicinrezeptor-medüerter Aktivität verbindet.

[0120] Die Verbindungen mit der erwünschten pharmakologischen Aktivität können in einem physiologisch annehmbaren Träger an einen Wirt verabreicht werden, um einen Zustand zu behandeln, der auf Capsaicinrezeptor-Aktivität zurückzuführen ist. Alternativ dazu können die identifizierten Verbindungen dazu dienen, Capsaicinrezeptor-Funktion zu steigern, zu regulieren oder in anderer Weise zu manipulieren. Die Therapeutika können in einer Vielzahl an Wegen verabreicht werden, z. B. topisch, subkutan, intraperitoneal, intravasculär, oral, intrathekal, epidermal, intravesiculär (z. B. bei Blasenspülung zur Behandlung neurogener Blasen-syn-drome), parenteral usw. Inhalationsbehandlungen sind für die Behandlung von Capsaicinrezeptor-assoziierter Entzündung im Falle von Krankheiten wie Asthma von besonderem Interesse.

[0121] Je nach der Verabreichungsart können die Verbindungen unterschiedlich formuliert sein. Die Konzentration einer therapeutisch aktiven Verbindung in der Formulierung kann von 0,1 bis 100 Gew.-% reichen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in unterschiedlichen Formen vorliegen, z. B. als Granulat, Tabletten, Pillen, Kapseln, Suspensionen, Salben, Lotionen u. dgl. Organische oder anorganische Träger in pharmazeutischer Qualität und/oder Verdünner, die sich für den ausgewählten Verabreichungsweg eignen, können zur Bildung von Zusammensetzungen dienen, die die therapeutisch aktiven Verbindungen enthalten. Auf dem Gebiet bekannte Verdünner sind wässrige Medien, pflanzliche und tierische Öle und Fette. Stabilisierungsmittel, Benetzungsmittel und Emulgatoren, Salze zum Variieren des osmotischen Drucks oder Puffer zur Sicherstellung eines adäquaten pH-Werts sowie Mittel für das leichtere Eindringen in die Haut können als Zusatzstoffe verwendet werden.

[0122] Außerdem eignen sich Zusammensetzungen, die Mittel umfassen, die Capsaicinrezeptor-Aktivität beeinflussen (z. B. durch Bindung von Capsaicinrezeptor oder durch Bindung eines Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids) für andere Anwendungen, z. B. für Abwehrsprays (z. B. „Pfeffersprays“) oder als Gegenmittel für solche Sprays. Die Screeningverfahren der Erfindung können zu diesem Zweck in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden, z. B. zur Identifikation von Medikamenten mit Capsaicin-ähnlicher Aktivität, die aber eine oder mehrere unerwünschte und mit Capsaicin assoziierte Nebenwirkungen) nicht oder nur sehr eingeschränkt aufweisen. Während z. B. Capsaicin in Sprayabwehrstoffen wirksam ist, kann der Kontakt mit Capsaicin tödlich sein. Das Screeningverfahren der Erfindung kann verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die den erwünschten abschreckenden Effekt haben, die aber wahrscheinlich keinen Tod verursachen würden nach Exposition zu einer Menge, die normalerweise in Verteidigungssprays verwendet wird. Das Screeningverfahren der Erfindung kann somit dazu dienen, Verbindungen zu identifizieren, die Capsaicinrezeptoren verschiedener Säugetierspezies unterschiedlich beeinflussen, wodurch die Identifikation und Konstruktion von Capsaicinrezeptor-Agonisten und -Antagonisten ermöglicht wird, die Capsaicinrezeptoren mit Gattungs- oder Spezies-Spezifität substanziell beeinflussen. Das Verfahren der Erfindung kann somit die Identifikation von Capsaicinrezeptor-Agonisten für Hunde- oder Bären-Capsaicinrezeptoren ermöglichen, die aber Human-Capsaicinrezeptoren nicht wesentlich stimulieren. Dies könnte erfolgen, indem auf Verbindungen gescreent wird, die eine mit Capsaicinrezeptor assoziierte biologische Aktivität in Wirtszellen hervorrufen, die einen Hunde-Capsaicinrezeptor exprimieren, aber relativ wenig oder überhaupt keine biologische Aktivität in Wirtszellen hervorrufen, die Human-Capsaicinrezeptor exprimieren.

Therapeutisch wirksame Dosierungen

[0123] Die Bestimmung einer wirksamen Dosis liegt innerhalb des Ermessensspielraums von Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung. Für jede beliebige Verbindung kann die therapeutisch wirksame Dosis anfänglich entweder in Zellkulturtests, z. B. mit Wirtszellen, die einen rekombinanten Capsaicinrezeptor exprimieren, oder in Tiermodellen unter Verwendung von Ratten, Mäusen, Kaninchen, Hunden oder Schweinen geschätzt werden. Das Tiermodell dient auch dazu, einen erwünschten Konzentrationsbereich und Verabreichungsweg zu bestimmen. Diese Informationen dienen dann zur Bestimmung nützlicher Dosen und Verabreichungswege beim Menschen. Eine therapeutisch wirksame Dosis bezieht sich auf jene Menge eines Mittels (z. B. einer Verbindung mit Aktivität als Capsaicinrezeptor-Agonist oder -Antagonist), Polypeptids oder Anti-Polypeptid-Antikörpers, die für die erwünschte physiologische Wirkung sorgt (z. B. zur Linderung von Symptomen, die mit Capsaicinrezeptor-medüerter Entzündung oder Schmerzen assoziiert sind oder die den Verlust von Temperaturempfinden hervorrufen).

[0124] Die therapeutische Wirksamkeit und Toxizität solcher Verbindungen kann durch herkömmliche phar-

pharmazeutische Verfahren in Zellkulturen oder Versuchstieren bestimmt werden, z. B. ED50 (die Dosis, die in 50% der Bevölkerung therapeutisch wirksam ist) und LD50 (die Dosis, die für 50% der Bevölkerung letal ist). Das Dosisverhältnis zwischen therapeutischen und toxischen Wirkungen ist der therapeutische Index und ist als Verhältnis LD50/ED50 ausgedrückt. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die hohe therapeutische Indices aufweisen, sind vorzuziehen. Die Daten aus Zellkulturtests und Tierstudien werden für die Formulierung eines Dosierungsbereichs für die menschliche Verwendung herangezogen. Die Dosierung derartiger Verbindungen liegt vorzugsweise im Bereich zirkulierender Konzentrationen (umfassend ED50 mit geringer oder wenig Toxizität). Die tatsächliche Dosierung kann innerhalb dieses Bereichs variieren und hängt z. B. von der verwendeten Dosierung, der Empfindlichkeit des Patienten und dem Verabreichungsweg ab.

[0125] Die exakte Dosierung wird vom jeweiligen Arzt in Hinblick auf den zu behandelnden Patienten ermittelt. Die Dosierung und die Verabreichung sind eingestellt, um ausreichende Mengen der aktiven Gruppe bereitzustellen oder die erwünschte Wirkung aufrechtzuerhalten. Weitere Faktoren, die man möglicherweise berücksichtigen muss, sind der Schweregrad des Krankheitszustands, die Position der zu behandelnden Stelle; das Alter, das Gewicht und das Geschlecht des Patienten; die Ernährung; die Zeit und Häufigkeit der Verabreichung; Medikamentenkombination(en); Reaktionsempfindlichkeiten; sowie Toleranz gegenüber und Ansprechen auf Therapie. Lang anhaltende pharmazeutische Zusammensetzungen können alle 3–4 Tage, jede Woche oder einmal alle 2 Wochen verabreicht werden (dies hängt von der Halbwertszeit und der Clearance rate der jeweiligen Formulierung ab).

[0126] Normale Dosierungsmengen können variieren und von der Verabreichungsweise abhängen. Hilfestellung bezüglich konkreter Dosierungen und Zufuhrverfahren finden sich in der Literatur und sind für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung allgemein zugänglich. Die Verwendung von Capsaicin und Capsaicin-Analogen in klinischen Anwendungen sowie ihre Verabreichungsverfahren (z. B. Formulierungen, Dosierungen, Verabreichungswege usw.) sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt (siehe z. B. Campbell et al, 1993, *Clinical Applications of Capsaicin and Its Analogues*, in: *Capsaicin in the Study of Pain*, S. 255–272; US-Patent 5.5690.910 (topische entzündungshemmende Zusammensetzungen mit Capsaicin); US-Patent 5.296.225 (topische Zusammensetzung mit Capsaicin zur Behandlung von Schmerzen im Mund- und Gesichtsbereich); US-Patent 5.290.816 (topische Creme mit Resiniferatoxin zur Desensibilisierung neurogener Entzündung); US-Patent 4.997.853 (topische Zusammensetzung mit Capsaicin zur Behandlung oberflächlicher Schmerzen); US-Patent 5.403.868 (Capsaicin-Derivate, die sich als Analgetika und Entzündungshemmer eignen); US-Patent 4.939.149 (Verabreichung von Resiniferatoxin, um sensorische afferente C-Faser- und thermoregulatorische Desensibilisierung zu bewirken); US-Patent 4.536.404 (topische Behandlung postherpetischer Neuralgie durch Applikation von Capsaicin); welche Publikationen alle in ihrer Gesamtheit aufgenommen sind. Weitere Informationen über die Verabreichung von Capsaicinrezeptor-Agonist und -Antagonisten finden sich z. B. in der United States Pharmacopeia (USP), 17. Ausgabe, S. 710–711; und im Physician's Desk Reference 1996, Medical Economics Com., Montvale, NJ, USA (siehe insbesondere Dolorac™ bei 1054, Zostrix™ bei 1056 und Zostrix-HP™ analgetische Creme bei 1056, die alle Capsaicin enthalten); und die aktuelle Ausgabe von Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, USA.

Verwendung von für Capsaicinrezeptor kodierenden Polynucleotiden in Tests zur Quantifizierung des Capsaicin-Gehalts einer Probe oder Bestimmung der Capsaicin-Aktivität eines Nahrungsmitteladditiv-Kandidaten

[0127] Für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierende Polynucleotide und Capsaicinrezeptor-Polypeptide können in einem Test verwendet werden, um entweder qualitativ oder quantitativ Capsaicin oder ein Mittel mit Capsaicin-Aktivität in einer Probe zu detektieren, wobei die Probe aus einem Nahrungsmittelprodukt stammt oder ein potenzielles Mittel zur Verwendung als Geschmacksstoff enthält (z. B. als Gewürz in Lebensmitteln). Dieser Test macht sich die Tatsache zunutze, dass zusätzlich zur analgetischen Wirkung auf afferente Neuronen Capsaicin ein Mitglied der Familie der Vanilloidverbindungen ist, die dafür verantwortlich sind, dass Nahrungsmittel scharf werden. Beispielsweise ist Capsaicin in Pfefferschoten vorhanden (Beispiele dafür sind thailändische, grüne Poblano verde-, habenero- und Guero-Schoten). Herkömmliche Tests zur Bestimmung der Menge an Capsaicin in einem Pfefferschotenextrakt umfassen die mühsame Extraktion der Verbindung aus Pfefferschotenproben und die Quantifizierung durch HPLC (siehe z. B. Woodbury, J. Assoc. Oft. Anal. Chem. 63, 556–558 (1980)). Die Menge an Capsaicin wird dann mit der Anzahl an Scoville-Einheiten, einem Maß der „Schärfe“, korreliert.

[0128] Der Test der Erfindung verwendet ein isoliertes Capsaicinrezeptor-Polypeptid, um die Menge an Capsaicin in einer Probe zu detektieren, wodurch das chemische Extraktionsverfahren des herkömmlichen Assays vermieden wird. Das verwendete Capsaicinrezeptor-Polypeptid kann entweder an einem festen Träger gebunden, in Lösung vorhanden oder auf der Oberfläche einer rekombinanten Wirtszelle positioniert sein. Die Bindung von Capsaicin an das Capsaicinrezeptor-Polypeptid wird wie in den oben angeführten Screeningtests detektiert.

[0129] Vorzugsweise erfolgt der Test betreffend Capsaicin oder einer Verbindung mit Capsaicin-Aktivität in ei-

ner Probe unter Anwendung eines der oben beschriebenen funktionellen Tests. Noch bevorzugter verwendet der funktionelle Test Capsaicinrezeptor exprimierende, rekombinante, eukaryotische Zellen (vorzugsweise Säugetierzellen oder Amphibien-Oozyten), die mit einem Calcium-sensitiven fluoreszierenden Farbstoff vorge-laden sind (z. B. fura-2, indo-1, fluo-3). Die Gegenwart und/oder Menge an Capsaicin oder Capsaicin-Verbin-dung in der Probe wird dann durch Messen einer Capsaicinrezeptor-medierten Zell-Wirkung bestimmt, d. h. mittels einer Änderung der Spannungs-aktivierten Leitfähigkeit über der Zellmembran oder einer Änderung der intrazellulären Mengen des detektierbar markierten Kations. Wenn z. B. das detektierbar markierte Kation flu-oreszierend markiertes Calcium ist, führt der Kontakt der vorgeladenen Wirtszellen mit einer Capsaicin-enthaltenden Probe zur Bindung des Capsaicins an das Capsaicinrezeptor-Polpeptid und zur Capsaicinrezeptor-me-diierten Zunahme an intrazellulärem Calcium, wobei dies leicht zu detektieren und quantifizieren ist. Beispiels-weise wird die Menge an durch die Testprobe mediiertem intrazellulärem Calciumzufluss mit dem intrazellulä-ren Calciumzufluss verglichen, der mit einer Vergleichsprobe assoziiert ist (z. B. mit einer Probe mit bekannter Menge an Capsaicin). Das Ausmaß der Veränderung des Stroms, der intrazellulären Calciumkonzentration oder eines anderen Capsaicinrezeptor-medierten Phänomens wird dann mit der Konzentration an Capsaicin korreliert, die ihrerseits mit einer Scoville-Schärfeeinheit versehen werden kann.

[0130] Potenzielle Mittel zur Verwendung als Nahrungsmitteladditive, um den Lebensmitteln Schärfe zu ver-leihen, können hinsichtlich ihrer Fähigkeit gescreent werden, eine Capsaicinrezeptor-medüerte Zell-Reaktion hervorzurufen (z. B. eine Änderung Spannungsaktivierter Leitfähigkeit oder intrazellulärer Kationenkonzentra-tionen). Der Test besitzt den Vorteil, dass das Maß der Schärfe objektiv bestimmbar ist, d. h. basierend auf den Reaktionen, die durch Capsaicinrezeptor-Exposition hervorgerufen werden.

Diagnostische Verwendungsmöglichkeiten von Polynucleotiden, die für Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinre-zeptor-verwandte Polypeptide kodieren, zur Detektion von für Capsaicinrezeptor kodierenden Sequenzen

[0131] Polynucleotidsequenzen, die für Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren, können für die Diagnose (z. B. die pränatale oder die postnatale Diagnose) von Zustän-den oder Krankheiten herangezogen werden, die z. B. mit Capsaicinrezeptor-Expression, einem bestimmten Capsaicinrezeptor-Polymorphismus oder einer bestimmten Capsaicinrezeptor-Mutation und/oder mit Capsai-cinrezeptor-verwandter Polypeptid-Expression assoziiert sind. Beispielsweise können Polynucleotidsequen-zen, die für Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren, bei der Hybridisie-rung oder in PCR-Tests von Flüssigkeiten oder Geweben aus Biopsien verwendet werden, um die Expression von Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid zu detektieren. Geeignete qualitative oder quantitative Verfahren sind Southern- oder Northern-Analyse, Dot-Blot oder andere Membran-basierte Technologien; PCR-Technologien; Dip-Stick-, pIN-, Chip- und ELISA-Technologien. Alle diese Techniken sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt und bilden die Grundlage vieler im Handel erhältlicher diag-nostischer Sets. Sobald die Krankheit bestimmt ist, wird ein Therapeutikum verabreicht, oder es werden ande-re Interventionen oder Präventivmaßnahmen ergriffen, die für die jeweilige Capsaicinrezeptor-assoziierte Stö-rung indiziert sind.

[0132] Oligonucleotide auf der Basis von Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid-sequenzen können in Techniken auf PCR-Basis zur Beurteilung von Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Expressi-on, zur Detektion von mit Störungen assoziierten Capsaicinrezeptor-Polymorphismen und/oder zur Expression von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid zum Einsatz kommen. Verfahren zur PCR-Amplifikation sind in US-Patenten 4.683.195 und 4.965.188 beschrieben. Solche Oligomere werden im Allgemeinen chemisch syn-thetisiert oder enzymatisch oder rekombinant produziert. Oligomere umfassen im Allgemeinen zwei Nucleotid-sequenzen, eine mit Sense-Orientierung (5'→3') und eine mit Anti-Sense-Orientierung (3'←5'), die unter opti-mierten Bedingungen für die Identifikation eines spezifischen Gens oder Zustands verwendet werden. Die glei-chen zwei Oligomere, verschachtelte Gruppen an Oligomeren oder sogar ein degenerierter Pool an Oligome-ren können unter weniger strengen Bedingungen für die Detektion und/oder Quantifizierung eng verwandter DNA- oder RNA-Sequenzen verwendet werden.

[0133] Weitere Verfahren zur Quantifizierung der Expression eines bestimmten Moleküls gemäß der Erfin-dung sind das Radiomarkieren (Melby et al., J. Immunol. Methods 159, 235–244 (1993)) oder das Biotinylieren (Duplaa C., Anal. Biochem. 229-236 (1993)) von Nucleotiden, die Co-Amplifikation einer Vergleichs-Nuclein-säure und die Interpolation experimenteller Ergebnisse gemäß Standardkurven. Die Quantifizierung mehrerer Proben kann zeitlich effizienter erfolgen, indem der Test in einem ELISA-Format durchgeführt wird, wobei das Oligomer von Interesse in verschiedenen Verdünnungen präsentiert wird und die rasche Quantifizierung durch spektralphotometrische oder kolorimetrische Detektion erfolgt.

Therapeutische Verwendungsmöglichkeiten von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden und für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierender Nucleinsäure

[0134] Polypeptide von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden sowie dafür kodierende Nucleotidsequenzen eignen sich zur Behandlung von Zuständen, die mit Capsaicinrezeptor-Dysfunktion assoziiert sind (z. B. Capsaicinrezeptor-Aktivität, die relativ zu Capsaicinrezeptor-Aktivität in einem nichtbetroffenen Patienten erhöht ist, oder Capsaicinrezeptor-Aktivität, die relativ zur Capsaicinrezeptor-Aktivität in einem nicht-betroffenen Patienten reduziert ist). Außerdem kann die Expression dominant-negativer für Capsaicinrezeptor kodierender Sequenzen in einem Zustand von therapeutischem Nutzen sein, der mit erhöhten Werten an Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziiert ist. Wenn die Wechselwirkung von Capsaicinrezeptor und einem Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid mit einem Zustand assoziiert ist, kann die Wechselwirkung dieser Polypeptide z. B. durch Einführung eines Peptids gestört werden, das mit einer Wechselwirkungsdomäne von Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid übereinstimmt. Außerdem kann die Expression einer Capsaicinrezeptor-Sequenz der Wildform in Tumorzellen diese für Capsaicinrezeptor-medierten Zelltod empfänglicher machen.

[0135] Expressionsvektoren aus Retroviren, Adenovirus, Herpes oder Vacciniaviren oder aus verschiedenen bakteriellen Plasmiden können für die Zufuhr von Nucleotidsequenzen an das Zielorgan, an das Zielgewebe oder an die Zielpopulation verwendet werden. Vorzugsweise ist die Zielzelle für die Zufuhr und die Expression von für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierenden Sequenzen eine neuronale Zelle, noch bevorzugter ein afferentes Neuron, um die Capsaicinrezeptor-Aktivität in der neuronalen Zelle zu steigern. Rekombinante Vektoren für die Expression von Anti-Sense-Capsaicinrezeptor-Polynucleotiden können gemäß auf dem Gebiet bekannter Verfahren konstruiert werden (z. B. mittels der von Sambrook et al. (s. o.) und von Ausubel et al. (s. o.) beschriebenen Verfahren).

[0136] Alternativ dazu kann die Expression von Genen, die für Capsaicinrezeptor kodieren, durch Transfizieren einer Zelle oder eines Gewebes mit Expressionsvektoren reduziert werden, die hohe Werte eines erwünschten für Capsaicinrezeptor kodierenden Fragments exprimieren. Solche Konstrukte können Zellen mit untranslatierbaren Sense- oder Anti-Sense-Sequenzen überfluten. Sogar ohne Integration in die DNA können derartige Vektoren weiterhin RNA-Moleküle transkribieren, bis alle Kopien durch endogene Nucleasen deaktiviert sind. Eine solche Vorgangsweise zur Regulierung von Capsaicinrezeptor-Expression und -Aktivität kann sich zur Behandlung von Schmerzsyndromen und/oder Entzündungszuständen eignen, die mit Capsaicinrezeptor-Aktivität assoziiert sind.

[0137] Modifikationen der Gen-Expression können durch Konstruktion von Anti-Sense-Molekülen, DNA, RNA oder PNA erhalten werden, um Bereiche, die für Capsaicinrezeptor kodieren, zu kontrollieren (d. h. die Promotoren, Enhancer und Introns). Oligonucleotide, abgeleitet aus der Transkriptionsinitiationsstelle, z. B. zwischen -10 und +10 Regionen der Leadersequenz, sind vorzuziehen. Die Anti-Sense-Moleküle können auch konstruiert sein, um die Translation von mRNA zu blockieren, indem das Transkript an der Bindung an Ribosome gehindert wird. Die Hemmung der Expression kann mittels „Tripelhelix“-Basenpaarungs-Methodologie erreicht werden. Die Tripelhelix-Paarung beeinträchtigt die Fähigkeit der Doppelhelix, sich ausreichend für die Bindung von Polymerasen, Transkriptionsfaktoren oder regulatorischen Molekülen zu öffnen. In letzter Zeit erzielte therapeutische Fortschritte mit Triplex-DNA wurden von Gee, J. E. et al., in: Huber et al. 1994, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, USA besprochen. Anti-Sense-Moleküle der Erfindung können durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren für die Synthese von RNA-Molekülen hergestellt werden, z. B. mittels Techniken für die chemische Oligonucleotidsynthese, z. B. die chemische Festphasen-Phosphoramidit-Synthese. Solche DNA-Sequenzen können in eine Vielzahl an Vektoren mit geeigneten RNA-Polymerase-Promotoren (z. B. T7 oder SP6) inkorporiert sein. Alternativ dazu können Anti-Sense-cDNA-Konstrukte, die sich für die konstitutive oder induzierbare Synthese von Anti-Sense-RNA eignen, in Zelllinien, Zellen oder Gewebe eingesetzt werden.

[0138] Insbesondere wenn RNA-Moleküle zwecks Anti-Sense-Therapie verabreicht werden sollen, kann die RNA modifiziert sein, um die intrazelluläre Stabilität und Halbwertszeit zu erhöhen. Mögliche Modifikationen sind u. a. die Hinzufügung flankierender Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende des Moleküls oder die Verwendung von Thiophosphat oder 2'-O-Methyl anstelle der Phosphodiesterase-Bindungen innerhalb der Hauptkette des Moleküls. Dieses Konzept ist in der Produktion von PNA inhärent und kann auf alle diese Molekülen ausgedehnt werden durch Einschluss von nichttraditionellen Basen wie etwa Inosin, Queosin und Wybutosin sowie Acetyl-, Methyl-, Thio- und ähnlich modifizierte Formen von Adenin, Cytidin, Guanin, Thymin und Uridin, die durch endogene Endonucleasen nicht so leicht zu erkennen sind.

[0139] Verfahren zur Einführung von Vektoren in Zellen oder Gewebe sind z. B. die hierin besprochenen, die sich ebenso für die In-vivo-Therapie eignen.

[0140] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierenden Polynucleotide in vivo in eine Zieltumorzelle eingesetzt, für die Organo-chemotherapie erwünscht ist. Dieser Aspekt der Erfindung macht sich den Bereich der Capsaicinrezeptor-Response auf die Exposition mit Agonisten

(z. B. Capsaicin, Resiniferatoxin) und/oder auf die Temperatur zunutze. Beispielsweise sind niedrige Konzentrationen an Capsaicinrezeptor-Agonisten (z. B. Capsaicinrezeptor-Agonistenkonzentrationen im nanomolaren Bereich, z. B. von etwa 200 nM bis etwa 800 nM) mit Capsaicinrezeptor-Stimulation und intrazellulärem Calciumzufluss assoziiert. Wenn der Capsaicinrezeptor in einer neuronalen Zelle exprimiert ist, ist die Capsaicinrezeptor-Stimulation durch niedrige Konzentrationen an Capsaicinrezeptor-Agonist gefolgt von neuronaler Desensibilisierung. Hohe Konzentrationen an Capsaicinrezeptor-Agonisten (z. B. Capsaicinrezeptor-Agonistenkonzentrationen im mikromolekularen Bereich, z. B. von etwa 1 μ M bis etwa 10 μ M) medieren neuronale Degeneration und Zelltod. Durch Exprimieren von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden in Tumorzellen kann der Tumorzelltod durch lokale Verabreichung hoher Konzentrationen eines Capsaicinrezeptor-Agonisten oder durch lokale Exposition gegenüber Wärmereizen oder durch beides substanziell und selektiv erleichtert werden, wobei die Agonistenkonzentration und/oder der Wärmereiz ausreicht, Zelltod in der Capsaicinrezeptor exprimierenden Zieltumorzelle zu medieren, aber die normalen Capsaicinrezeptor exprimierenden Zellen nicht wesentlich beeinflusst oder nur eine minimale Anzahl solcher normaler Zellen beeinflusst.

[0141] Alternativ dazu kann das in die Tumorzellen inkorporierte Capsaicinrezeptor-Polypeptid konstruiert sein, für mehr Selektivität hinsichtlich der Reaktion auf Organotherapie zu sorgen (d. h. für die Aktivierung des in den Tumorzellen exprimierten Capsaicinrezeptors ohne oder nur mit geringer Aktivierung von endogenem Capsaicinrezeptor der Wildform zu sorgen). Beispielsweise kann Capsaicinrezeptor modifiziert sein, um einen spezifischen Capsaicinrezeptor-Agonistenanalog zu binden, der hinsichtlich seiner Fähigkeit, Capsaicinrezeptoren der Wildform zu binden, wesentlich eingeschränkt ist. Daher können Zielzellen (z. B. Tumorzellen), die den modifizierten Capsaicinrezeptor exprimieren, selektiv stimuliert werden, indem die Verabreichung des Agonisten mit Spezifität für das geänderte Capsaicinrezeptor-Polypeptid erfolgt, ohne jene Zellen substanziell zu beeinflussen, die Capsaicinrezeptor der Wildform exprimieren. Alternativ dazu können die Tumorzellen in vivo mit einer Sequenz transformiert sein, die für einen modifizierten Capsaicinrezeptor kodiert, der stärker auf Agonisten reagiert (z. B. stärker auf Agonist reagiert, höhere Affinität zu Agonisten im Vergleich zur Wildform besitzt, wodurch die Aktivierung der modifizierten Rezeptoren ohne oder nur mit geringer Aktivierung des endogenen Capsaicinrezeptors ermöglicht wird, und/oder solcherart modifiziert ist, um stärker auf Wärmereize zu reagieren als Capsaicinrezeptor der Wildform). Diese Ausführungsformen gestatten somit die Verabreichung hoher oder höherer Konzentrationen des Organotherapeutikums, das auf den modifizierten Capsaicinrezeptor abzielt, wodurch eine selektivere Organotherapie möglich ist.

Anti-Capsaicinrezeptor- und Anti-Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid-Antikörper

[0142] Capsaicinrezeptor-spezifische Antikörper und Antikörper, die für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid spezifisch sind, eignen sich zur Identifikation von Zellen, die entweder natürlich vorkommende oder rekombinante Capsaicinrezeptor-Polypeptide oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide exprimieren, sowie zur Diagnose von Zuständen und Krankheiten, die mit der Expression und/oder Funktion von Capsaicinrezeptor- und/oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden assoziiert sind. Beispielsweise können Anti-Capsaicinrezeptor-Antikörper und mit Anti-Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid-Antikörper dazu dienen, erhöhte oder reduzierte Rezeptorprotein-Werte und/oder aberrante Proteinverarbeitung oder Oligomerisation zu detektieren.

[0143] Anti-Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Antikörper und mit Anti-Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptid-Antikörper der Erfindung sind u. a. polyklonal, monoklonal, chimär, einkettig, Fab-Fragmente und durch eine Fab-Expressionsbibliothek produzierte Fragmente. Antikörper von besonderem Interesse sind z. B. Antikörper, die Capsaicinrezeptor-Funktion stimulieren und/oder die Bindung von Capsaicinrezeptor bindenden Verbindungen an Capsaicinrezeptor blockieren. Solche Antikörper eignen sich beispielsweise für die Regulierung von Schmerzen in Schmerzsyndromen, für Screeningtests hinsichtlich Capsaicinrezeptor bindender Mittel und zur Messung von Capsaicinrezeptor aktivierenden Verbindungen in einer Probe.

[0144] Capsaicinrezeptor-Polypeptide und Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide, die sich zur Produktion von Antikörpern eignen, müssen nicht biologisch aktiv sein; vielmehr muss das Polypeptid oder Oligopeptid nur antigen sein. Polypeptide zur Erzeugung Capsaicinrezeptor-spezifischer Antikörper und von mit Capsaicinrezeptor verwandten Polypeptid-Antikörpern besitzen im Allgemeinen eine Aminosäuresequenz, die aus zumindest 5 Aminosäuren, vorzugsweise aus zumindest 10 Aminosäuren, besteht. Vorzugsweise imitieren antigene Capsaicinrezeptor-Polypeptide und antigene Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide ein Epitop des nativen Capsaicinrezeptors bzw. nativen Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids. Antikörper, die für kurze Polypeptide spezifisch sind, können produziert werden, indem das Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid mit einem Träger verknüpft wird oder indem das Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder das Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid mit einem weiteren Protein fusioniert (z. B. Napfschnecken-Hämocyanin) und das trägerverbundene chimäre Molekül als Antigen verwendet wird. Im Allgemeinen können Anti-Capsaicinrezeptor-Antikörper und mit Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptid-Antikörper in Einklang mit auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannten Verfahren erzeugt werden. Rekombinante Im-

immunglobuline können gemäß US-Patent 4.816.567 (hierin durch Verweis aufgenommen) produziert werden.

[0145] Verschiedene Wirte, im Allgemeinen Säugetiere oder Amphibien, können zur Produktion von Anti-Capsaicinrezeptor-Antikörpern und mit Anti-Capsaicinrezeptor verwandten Polypeptid-Antikörpern dienen (z. B. Ziegen, Kaninchen, Ratten, Mäuse). Im Allgemeinen werden Antikörper durch Immunisieren des Wirts (z. B. mittels Injektion) mit einem Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid produziert, das immunogene Eigenschaften beibehält (diese umfassen jeden Abschnitt des nativen Polypeptids, Fragments oder Oligopeptids). Je nach der Wirtsspezies können verschiedene Adjuvantien verwendet werden, um die immunologische Reaktion des Wirts zu steigern. Solche Adjuvantien sind z. B. Freund-Adjuvans, Mineralgele (z. B. Aluminiumhydroxid) und oberflächenaktive Substanzen wie etwa Lysolecithin, Pluronic-Polyole, Polyanione, Peptide, Ölemulsionen, Napfschnecken-Hämocyanin und Dinitrophenol. BCG (Bacilli Calmette-Guerin) und *Corynebacterium parvum* sind potenzielle nützliche Human-Adjuvantien.

[0146] Monoklonale Antikörper können unter Anwendung beliebiger Techniken gebildet werden, die für die Produktion von Antikörpermolekülen durch immortalisierte Zelllinien in Kultur sorgen. Diese Techniken sind u. a. das Hybridomverfahren, das ursprünglich von Koehler und Milstein beschrieben wurde (Nature 256, 495–497 (1975)), das Human-B-Zellen-Hybridomverfahren (Kosbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983); Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2026–2030 (1983)) und die EBV-Hybridomtechnik (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., New York, NY, USA, S. 77–96).

[0147] Außerdem eignen sich Techniken zur Produktion „chimärer Antikörper“, das Spleißen von Mäuse-Antikörper-Genen in Human-Antikörper-Gene, um ein Molekül mit geeigneter Antigen-Spezifität und biologischer Aktivität zu erzielen (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851–6855 (1984); Neuberger et al., Nature 312, 604–608 (1984); Takeda et al., Nature 314, 452–454 (1985)). Alternativ dazu können Techniken, die für die Produktion einzelkettiger Antikörper beschrieben wurden (US-Patent 4.946.778) angepasst werden, um einzelkettige Antikörper zu produzieren, die Capsaicinrezeptor-spezifisch oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid spezifisch sind.

[0148] Antikörper können in vivo oder durch Screenen rekombinanter Immunglobulin-Bibliotheken oder Panels hochspezifischer Bindungsreagenzien produziert werden, wie dies von Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833–3837 (1989) und Winter et al., Nature 349, 293–299 (1991) offenbart ist.

[0149] Antikörperfragmente mit spezifischen Bindungsstellen für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid können auch hergestellt werden. Zu solchen Fragmenten zählen u. a. F(ab')₂-Fragmente, die durch Pepsin-Verdau des Antikörpermoleküls produziert werden können, und Fab-Fragmente, die durch Reduzieren der Disulfidbrücken der F(ab')₂-Fragmente erzeugt werden können. Alternativ dazu können Fab-Expressionsbibliotheken konstruiert werden, um die rasche und einfache Identifikation monoklonaler Fab-Fragmente mit der erwünschten Spezifität zu ermöglichen (Huse et al., Science 256, 1275–1281 (1989)).

[0150] Es sind zahlreiche Arbeitsvorschriften für kompetitive Bindungs- oder immunradiometrische Tests entweder unter Einsatz polyklonaler oder monoklonaler Antikörper mit festgelegten Antigenspezifitäten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Solche Immunassays umfassen typischerweise die Bildung von Komplexen zwischen einem Capsaicinrezeptor-Polypeptid und einem spezifischen Anti-Capsaicinrezeptor-Antikörper sowie die Detektion und Quantifizierung von Capsaicinrezeptor-Antikörper-Komplex-Bildung. Ein Zwei-Stellen-Immunassay auf monoklonaler Basis unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die auf zwei nicht-interferierenden Epitope auf einem spezifischen Capsaicinrezeptor-Protein reagieren, ist vorzuziehen, doch ein kompetitiver Bindungstest kommt auch in Frage. Diese Tests sind in Maddox et al., J. Exp. Med. 158, 1211 (1983) beschrieben.

Diagnostische Assays unter Verwendung von Capsaicinrezeptor-spezifischen Antikörpern oder Antikörpern, die für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid spezifisch sind

[0151] Bestimmte Capsaicinrezeptor-Antikörper und mit Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptid-Antikörper eignen sich zur Diagnose von Zuständen oder Krankheiten, die durch abnormale Expression oder Funktion von Capsaicinrezeptor gekennzeichnet sind (z. B. Detektion von Capsaicinrezeptor-Expression in der Haut zur Detektion von Neuropathien oder in Tests zur Überwachung von Patienten, die eine Capsaicinrezeptor-assoziierte Störung oder Erkrankung aufweisen und/oder mit Capsaicinrezeptor-Agonisten, -Antagonisten oder -Inhibitoren behandelt werden). Beispielsweise könnte aberrante Fruchtfunktion das Ergebnis von Über- oder Unterproduktion eines Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids sein; somit können mit Anti-Capsaicinrezeptor verwandte Antikörper dazu dienen, diese Veränderungen qualitativ oder quantitativ zu detektieren. Diagnostische Tests für Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid umfassen Verfahren unter Verwendung von detektierbar markiertem Anti-Capsaicinrezeptor-Antikörper oder von mit Anti-Capsaicinrezeptor verwandtem Polypeptid, um Capsaicinrezeptor in Proben (z. B. Extrakten von Zellen oder Geweben) zu detektieren. Die Polypeptide und Antikörper der Erfindung können mit oder ohne Modifikation verwendet werden. Häufig sind die Polypeptide und Antikörper durch kovalente oder nicht-kovalente Bindung an ein Repor-

termolekül markiert. Es sind auf dem Gebiet der Erfindung zahlreiche solcher zweckmäßiger Reportermoleküle bekannt. Verfahren zum Detektieren und Quantifizieren von Antikörperbindung sind ebenfalls bekannt.

Pharmazeutische Zusammensetzungen mit Capsaicinrezeptor-Polypeptiden, Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden und/oder Antikörpern dagegen

[0152] Die Erfindung erstreckt sich auch auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die Capsaicinrezeptor-Polypeptide, Anti-Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Antikörper, Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide oder Anti-Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide alleine oder in Kombination mit zumindest einem anderen Mittel wie z. B. einer Stabilisierungsverbindung umfassen, die in jedem beliebigen sterilen, biologisch verträglichen pharmazeutischen Träger verabreicht werden können. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung können alleine oder in Kombination mit anderen Mitteln, Medikamenten oder Hormonen, in pharmazeutischen Zusammensetzungen im Gemisch mit einem oder mehreren Exzipienten oder mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern an einen Patienten verabreicht werden. In einer Ausführungsform der Erfindung ist der pharmazeutisch annehmbare Träger pharmazeutisch inert.

[0153] Capsaicinrezeptor-Polypeptide und/oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide können verabreicht werden, um die Wirkungen von z. B. einem endogenen Faktor zu lindern, der als Capsaicinrezeptor-Agonist oder -Antagonist dient, oder um die Wirkungen eines Capsaicinrezeptor-Agonisten oder -Antagonisten zu blockieren oder zu regulieren, der an ein Individuum verabreicht wird. Anti-Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Antikörper und/oder mit Anti-Capsaicinrezeptor verwandte Polypeptid-Antikörper können verabreicht werden, um einen Capsaicinrezeptor in erwünschter Weise zu stimulieren oder die Wirkungen eines endogenen oder exogenen Capsaicinrezeptor-Bindungsagonisten oder -Antagonisten zu blockieren, z. B. mittels kompetitiver Bindung an den Capsaicinrezeptor. Pharmazeutische Formulierungen mit Capsaicinrezeptor-Polypeptiden, Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden, Anti-Capsaicinrezeptor-Antikörpern und/oder mit Anti-Capsaicinrezeptor verwandten Polypeptid-Antikörpern können in Einklang mit auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren formuliert werden.

Transgene Tiere, die Polynucleotide exprimieren, die für Capsaicinrezeptor und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren

[0154] Für Capsaicinrezeptor kodierende Nucleinsäuren und/oder für Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodierende Nucleinsäuren können dazu dienen, genetisch modifizierte nichtmenschliche Tiere oder stellenspezifische Gen-Modifikationen in Zelllinien zu erzeugen. Der Ausdruck „transgen“ bezieht sich hierin auf genetisch modifizierte Tiere mit z. B. einer Deletion oder einem anderen Knockout von Capsaicinrezeptor-Gen-Aktivität (und/oder Capsaicinrezeptor-verwandter Polypeptid-Aktivität), einem exogenen Capsaicinrezeptor-Gen (oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid-Gen), das stabil in den Wirtszellen übertragen wird, einem Knockin modifizierter Gen-Expression von Capsaicinrezeptor (und/oder von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid) oder einem exogenen Promotor von Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid, der funktionsfähig mit einem Reporter-Gen verbunden ist. Von besonderem Interesse sind homozygote und heterozygote Knockouts und Knockins von Capsaicinrezeptor- und/oder Capsaicinrezeptor-verwandter Polypeptidfunktion.

[0155] Transgene Tiere können durch homologe Rekombination geschaffen werden, wobei der endogene Capsaicinrezeptor-Locus (und/oder der Locus von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid) geändert ist. Alternativ dazu ist ein Nucleinsäurekonstrukt zufällig in das Genom integriert. Vektoren für die stabile Integration sind Plasmide, Retroviren und andere Tierviren, YAC u. dgl. Von Interesse sind transgene Säugetiere, vorzugsweise ein Säugetier aus einer Gattung, die aus der Gruppe bestehend aus Mus (z. B. Mäusen), Rattus (z. B. Ratten), Oryctolagus (z. B. Kaninchen) und Mesocricetus (z. B. Hamstern) ausgewählt ist.

[0156] Ein Knockout-Tier ist genetisch manipuliert, um endogene Capsaicinrezeptor-Funktion (und/oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptidfunktion) substanziell zu reduzieren oder zu eliminieren. Unterschiedliche Vorgangsweisen können gewählt werden, um den Knockout zu erzielen. Beispielsweise kann chromosomale Deletion des gesamten oder eines Teils des nativen Capsaicinrezeptor-Homologs (oder des nativen Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptidhomologs) induziert werden. Deletionen der nicht-kodierenden Regionen, insbesondere der Promotorregion, regulatorischen 3'-Sequenzen, Enhancer oder Deletionen von Genen, die Expression des Capsaicinrezeptor-Gens und/oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid-Gens aktivieren. Ein funktioneller Knockout kann auch durch Einführung eines Anti-Sense-Konstrukts erzielt werden, das Expression des oder der nativen Gens bzw. Gene blockiert (siehe z. B. Li und Cohen, Cell 85, 319–329 (1996)).

[0157] Konditionelle Knockouts von Capsaicinrezeptor-Gen-Funktion (und/oder der Gen-Funktion von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid) sind ebenfalls im Schutzbereich der Erfindung enthalten. Konditionelle Knockouts sind transgene Tiere, die einen Defekt der Capsaicinrezeptor-Gen-Funktion (und/oder der Gen-Funktion des Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids) aufweisen, nachdem das Tier einer Substanz

ausgesetzt wurde, die die Zielgen-Modifikation fördert, ein Enzym eingesetzt wurde, das die Rekombination an der Ziel-Gen-Stelle unterstützt (z. B. Cre im Cre-loxP-System) oder ein anderes Verfahren zum Lenken der Ziel-Gen-Modifikation durchgeführt wurde.

[0158] Beispielsweise kann ein transgenes Tier mit einem konditionellen Knockout der Capsaicinrezeptor-Gen-Funktion unter Einsatz des Cre-loxP-Rekombinationssystems produziert werden (siehe z. B. Kilby et al., Trends Genet. 9, 413–421 (1993)). Cre ist ein Enzym, das die DNA zwischen zwei Erkennungssequenzen ausschneidet (als loxP bekannt). Dieses System kann in unterschiedlicher Weise angewendet werden, um konditionelle Knockouts von Capsaicinrezeptor zu bilden. Beispielsweise können zwei unabhängige transgene Mäuse gebildet werden: eine transgene Maus für eine Capsaicinrezeptor-Sequenz, die von loxP-Stellen flankiert ist, und eine zweite transgene Maus für Cre. Das Cre-Transgen kann unter der Steuerung eines induzierbaren oder entwicklungsregulierten Promotors (Gu et al., Cell 73, 1155–1164 (1993); Gu et al., Science 265, 103–106 (1994)) oder unter der Steuerung eines gewebespezifischen oder zelltypspezifischen Promotors (z. B. eines neuronenspezifischen Promotors) stehen. Das transgene Capsaicinrezeptor-Tier wird dann mit dem transgenen Cre-Tier gekreuzt, um Nachkommen mit Capsaicinrezeptor-Gen-Defizienz nur in jenen Zellen zu bilden, die Cre während der Entwicklung exprimieren.

[0159] Transgene Tiere können geschaffen werden, die ein exogenes Capsaicinrezeptor-Gen und/oder exogenes Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid-Gen aufweisen. Das exogene Gen stammt entweder aus einer anderen Spezies als das Wirtstier oder ist hinsichtlich seiner kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz modifiziert. Das eingesetzte Gen kann ein Gen der Wildform, ein natürlich vorkommender Polymorphismus oder eine genetisch manipulierte Sequenz sein, z. B. jene bereits beschriebenen mit Deletionen, Substitutionen oder Insertionen in den kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen. Die eingeführte Sequenz kann für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid und/oder ein Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren. Wenn das eingeführte Gen eine kodierende Sequenz ist, ist sie üblicherweise mit einem konstitutiven oder induzierbaren Promotor, der konstitutiv oder induzierbar sein kann, oder anderen regulatorischen Sequenzen, die zur Expression im Wirtstier erforderlich sind, funktionsfähig verbunden.

[0160] Spezifische Konstrukte von Interesse sind u. a. Anti-Sense-Polynucleotide, die für Capsaicinrezeptor oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodieren, oder ein Ribozym auf der Basis einer Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptidsequenz, die die Capsaicinrezeptor-Expression bzw. die Expression von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid blockiert. Derartige Anti-Sense-Polynucleotide oder Ribozyme blockieren auch die Expression dominant-negativer Mutationen und die Überexpression des entsprechenden Gens. Von Interesse ist ferner die Expression von Konstrukten, die für Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptide in einem Wirt kodieren, worin das Capsaicinrezeptor- und/oder Capsaicinrezeptor-verwandte Polypeptid, für das das Konstrukt kodiert, aus einer anderen Spezies stammt als die Spezies des Wirts, in dem es exprimiert wird (z. B. Expression eines Human-Capsaicinrezeptors in einer transgenen Maus). Ein detektierbarer Marker, z. B. lac Z, kann im Locus des Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids eingesetzt sein, wo Hochregulierung der Expression des entsprechenden Gens zu einer leicht detektierbaren Änderung des Phänotyps führt. Konstrukte unter Einsatz einer Promotor-region des Capsaicinrezeptor-Gens oder Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid-Gens in Kombination mit einem Reporter-Gen sind ebenfalls von Interesse. Konstrukte mit einer Sequenz, die für ein gekürztes oder modifiziertes (z. B. mutiertes) Capsaicinrezeptor- oder Capsaicinrezeptor-verwandtes Polypeptid kodiert, sind ebenfalls von Interesse.

[0161] Die modifizierten Zellen oder Tiere eignen sich zur Untersuchung der Funktion und Regulation von Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid. Solche modifizierten Zellen oder Tiere eignen sich auch z. B. zur Untersuchung der Funktion von Capsaicinrezeptor- und Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden sowie zur Analyse der Entwicklung nozizeptiver Neuronen. Tiere können in funktionellen Studien, Medikamenten-Screening usw. verwendet werden, um beispielsweise die Wirkung eines Medikamentenkandidaten auf die Capsaicinrezeptor-Funktion oder auf Symptome zu ermitteln, die mit Krankheit oder Zuständen einhergehen, die man mit Capsaicinrezeptor-Funktion assoziiert (z. B. Capsaicinrezeptor-Defekte oder veränderte Capsaicinrezeptor-Aktivität). Durch Vorsehen von Expression von Capsaicinrezeptor-Polypeptid und/oder Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid in Zellen, in denen es normalerweise nicht produziert wird (z. B. ektopische Expression), kann man Veränderungen des Zellverhaltens herbeiführen.

[0162] DNA-Konstrukte für die homologe Rekombination umfassen zumindest einen Abschnitt des Capsaicinrezeptor-Gens (oder des Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptid-Gens) mit der erwünschten genetischen Modifikation sowie Regionen von Homologie mit dem Ziellocus. DNA-Konstrukte für Zufallsintegration müssen keine Regionen von Homologie enthalten, um Rekombination zu medieren. In geeigneter Weise sind Marker für positive und negative Auswahl eingeschlossen. Verfahren zur Erzeugung von Zellen mit Ziel-Gen-Modifikationen durch homologe Rekombination sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Zahlreiche Techniken für das Transfizieren von Säugetierzellen sind in Keown et al., Methods in Enzymology 185, 527–537 (1990) beschrieben.

[0163] Für embryonale Stammzellen (ES-Zellen) kann eine ES-Zelllinie verwendet werden, oder es können

embryonale Zellen frisch aus einem Wirt gewonnen werden, z. B. aus einer Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen usw. Solche Zellen werden auf einer geeigneten Fibroblast-Nährschicht oder in Gegenwart geeigneter Wachstumsfaktoren gezüchtet, z. B. in Gegenwart von Leukämie-inhibierendem Faktor (LIF). Wenn ES-Zellen transformiert sind, können sie für die Produktion transgener Tiere herangezogen werden. Nach der Transformation werden die Zellen auf eine Nährschicht in einem zweckmäßigen Medium aufplattiert. Zellen mit dem Konstrukt können durch Verwendung eines selektiven Mediums detektiert werden. Nachdem man den Kolonien ausreichend Zeit für das Wachstum gegeben hat, werden sie herausgegriffen und hinsichtlich des Auftretens homologer Rekombination oder Integration des Konstrukts analysiert. Positive Kolonien können dann für die embryonale Manipulation und Blastozysten-Injektion verwendet werden. Blastozysten stammen aus 4–6 Wochen alten superovulierten Weibchen. Die ES-Zellen werden trypsinisiert und die modifizierten Zellen in das Blastocoel der Blastozyste injiziert. Nach der Injektion werden die Blastozysten in jedes Cornu uteri pseudoträchtiger Weibchen rückgeführt. Man lässt dann die Weibchen ihre Jungen austragen und gebären, wobei die resultierenden Würfe auf Zellmutanten mit dem Konstrukt gescreent werden. Indem man einen unterschiedlichen Phänotyp der Blastozyste und der ES-Zellen vorsieht, kann chimäre Nachkommenschaft problemlos detektiert werden.

[0164] Die chimären Tiere werden auf die Gegenwart des modifizierten Gens gescreent. Chimäre Tiere, die die Modifikation aufweisen (normal chimäre Männchen) werden mit Tieren der Wildform gekreuzt, um Heterozygoten zu produzieren, und die Heterozygoten werden gepaart, um Homozygoten zu produzieren. Wenn die Genänderungen an einem Punkt während der Entwicklung letal enden, können Gewebe oder Organe als allogene oder kongene Transplantate oder in In-vitro-Kultur aufrechterhalten werden.

[0165] Die Erforschung genetischer Funktion kann Nicht-Säugetiermodelle verwenden, insbesondere jene unter Verwendung von Organismen, die biologisch und genetisch gut charakterisiert sind, z. B. *C. elegans*, *D. melanogaster* und *S. cerevisiae*. Beispielsweise können Transposon- (Tc1-) Insertionen im Nematod-Homolog eines Capsaicinrezeptor-Gens oder einer Promotorregion eines Capsaicinrezeptor-Gens gebildet werden. Die Capsaicinrezeptor-Gen-Sequenzen können dazu dienen, definierte genetische Läsionen Knockout zu unterziehen oder zu komplementieren, um die physiologischen und biochemischen Wege zu verfolgen, die an der Funktion neuronaler Zellen beteiligt sind. Es ist allgemein bekannt, dass Human-Gene Mutationen in niederen eukaryotischen Modellen komplementieren.

Biosensor-Membranen mit Capsaicinrezeptor-Polypeptiden

[0166] Infolge des Ansprechens von Capsaicinrezeptor-Polypeptiden auf Wärme können Capsaicinrezeptor-Polypeptide in einem Biosensor zur Detektion von Temperaturschwankungen verwendet werden. Der Biosensor verwendet elektrochemische Messung eines Ionenstroms über eine Lipidmembran (oder ein anderes Medium) mit einem darin inkorporierten Capsaicinrezeptor-Polypeptid. Nach Stimulierung des Capsaicinrezeptor-Polypeptids durch Wärme erleichtert das Capsaicinrezeptor-Polypeptid die Bewegung von Ionen (z. B. Calcium) über die Membran, die dann als Stromänderung über die Lipid-Doppelschicht detektiert wird. Die Temperatur und/ oder Veränderung der Temperatur kann mit der relativen Zunahme der Leitfähigkeit über die Doppelschicht infolge von Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Aktivierung korreliert werden.

[0167] Es ist allgemein bekannt, dass amphiphile Moleküle in Lösung zur Aggregation gebracht werden können, um zwei- oder dreidimensionale geordnete Anordnungen wie z. B. Monoschichten, Mizellen, schwarze Lipidmembranen und Vesikel oder Liposome zu bilden, welche Vesikel ein einzelnes Kompartiment oder multilamellar sein können und mehrere Kompartimente aufweisen können. Die Membran kann jede geeignete Kombination an Lipiden, langkettigen (C12–C24) organischen Verbindungen sowie Kunststoffmaterialien oder ähnlichen Polymeren zwecks physikalischer Verstärkung enthalten. Verfahren und Zusammensetzungen zur Herstellung von Lipid-Doppelschichten, die ein Protein von Interesse inkorporieren, sowie Verfahren und Zusammensetzungen zur Herstellung der elektrischen und mechanischen Komponenten von Biosensoren sind auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt (siehe z. B. US-Patent 5.328.847 (Dünnmembransensor mit biochemischem Schalter); US-Patent 5.443.955 (Rezeptormembranen und Ionencarriereinlaufsystem); US-Patent 5.234.566 (Sensitivität und Selektivität von Ionenkanal-Biosensormembranen); US-Patent 5.047.977 (digitale Biosensoren und Verfahren zu ihrer Verwendung); und US-Patent 5.156.810 (Biosensoren unter Verwendung elektrischer, optischer und mechanischer Signale), welche Publikationen alle hierin durch Verweis aufgenommen sind und die einen Überblick über die Herstellung und Verwendung von Biosensoren geben, die einen Rezeptor von Interesse inkorporieren (d. h. Capsaicinrezeptor).

[0168] Biosensoren der Erfindung umfassen zumindest eine Lipidmembran, wobei die Membran zumindest ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid enthält. Da Capsaicinrezeptor-Polypeptide funktionieren können, wenn sie mit Ligand (z. B. Capsaicin) oder einem anderen Effektor, der Capsaicinrezeptor-Aktivität mediiert (z. B. Wärme), in Kontakt gebracht werden, ist die Orientierung des Capsaicinrezeptors in der Membran für die Funktion des Biosensors praktisch nicht entscheidend.

[0169] Herkömmliche mikroelektronische Konfigurationen dienen dazu, Energie für den Sensor zuzuführen,

eine konstante direkte Stromspannung über die Doppelschicht vor der Wärmedetektion bereitzustellen und den Ionenstromanstieg nach Capsaicinrezeptor-Aktivierung aufgrund eines Temperaturwechsels zu messen. Es kann außerdem wünschenswert sein, in der Detektionselektronik eine Vorkehrung für die Bestimmung der Membranintegrität auf der Basis des elektrischen Rauschens vorzusehen, das ein ausgelöstes Stromsignal begleitet.

[0170] Im Allgemeinen wird Wärme unter Verwendung des Biosensors der Erfindung detektiert, indem eine Änderung der Leitfähigkeit über die Capsaicinrezeptor-Polypeptid enthaltende Doppelschicht detektiert wird. Beispielsweise ist die Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Lipid-Doppelschicht so ausgebildet, dass eine erste Fläche der Lipid-Doppelschicht (die „Wärmedetektionsfläche“) mit einer Pufferlösung von neutralem pH-Wert in Kontakt steht und ein ausgewähltes Kation enthält, das zum Transport durch den Capsaicinrezeptor fähig ist (z. B. jedes Kation wie z. B. Calcium oder Magnesium, vorzugsweise Natrium), während eine zweite Fläche der Capsaicinrezeptor-Polypeptid-Lipid-Doppelschicht mit einem neutralen pH-Puffer in Kontakt steht, der eine Konzentration des ausgewählten Kations aufweist, die deutlich geringer ist als die Konzentration des ausgewählten Kations im Puffer, in dem die Wärmedetektionsschicht der Doppelschicht eingetaucht ist. Nachdem die Wärmedetektionsschicht der Doppelschicht einem Temperaturwechsel ausgesetzt wurde, vereinfacht die Wärme die Capsaicinrezeptor-Funktion insofern, als der Transport des ausgewählten Kations über die Doppelschicht ermöglicht wird, was zu einer Änderung der Leitfähigkeit über die Doppelschicht führt. Die Änderung der Leitfähigkeit wird dann mit einem Temperaturwechsel korreliert.

[0171] Die nachstehenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung veranschaulichen und ihren Schutzzumfang keinesfalls einschränken.

BEISPIELE

Beispiel 1: Expressionsklonieren von für Ratten-Capsaicinrezeptor kodierender DNA

[0172] Während elektrophysiologische Tests in *Xenopus*-Oozyten verwendet wurden, um cDNA zu erhalten, die für eine Vielzahl an Zelloberflächen-Rezeptoren und Ionenkanälen kodieren (Brake et al., *Nature* 371, 519–523 (1995)), erwies sich dieser Ansatz beim Identifizieren eines Capsaicinrezeptor-Klons als erfolglos. Es wurde eine Säugetierzellen-Expressions-Klonierungsstrategie basierend auf der Fähigkeit von Capsaicin entwickelt, einen Zufluss von Calciumionen in sensorische Neuronen auszulösen. Zunächst wurde eine Nage-tier-Dorsalwurzelganglion-Plasmid-cDNA-Bibliothek in pCDNA3 (Invitrogen) konstruiert, wobei dies im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Brake et al., s. o., erfolgte. Ein Gemisch polyadenylierter RNA aus neugeborenen (P1) Ratten und den Dorsalwurzelganglien ausgewachsener Mäuse wurde dazu verwendet, cDNA des ersten Strangs unter Einsatz eines oligo-(dT)-Primers zu erzeugen, der eine Not1-Restriktionsstelle enthielt. Nach der Synthese des zweiten Strangs und der Befestigung von BstX1-Adaptoren wurde die cDNA mit Not1 verdaut. cDNA und BstX1/Not1-linearisierte pCDNA3 wurden jeweils auf Kaliumacetat-Gradienten gereinigt, miteinander ligiert und in *DH5 α* -Bakterien durch Elektroporation transformiert. Die resultierenden $2,4 \times 10^6$ unabhängigen bakteriellen Klone wurden in 144 Pools unterteilt und bei -80°C gelagert.

[0173] HEK293- (humanembryonale Nieren-) Zellen, die das große SV40-T-Antigen konstitutiv exprimieren, wurden in Medium A (DMEM, ergänzt mit 10% Rinderfötenserum (Hyclon), Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin) bei 37°C und 5% CO_2 gehalten. Außer wo dies anders angeführt ist, wurden transiente Transfektionen mit nahezu konfluenten Zellen durchgeführt, die mit $3,2 \times 10^5/35$ mm Gewebekulturschale erneut plattiert wurden. Nach 24 h wurde das Medium mit 1 ml Medium B (DMEM, ergänzt mit 10% dialysiertem Kalbsfötenserum, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin) ersetzt. Nach 2 h bei 37°C wurden die Zellen mit $12 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA unter Verwendung eines Calciumphosphat-Fällungssets (Specialty Media) transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 1 mM EDTA gespült, von den Platten abgewaschen, durch Zentrifugation gesammelt ($200 \times g$, 5 min, 22°C), in Medium B resuspendiert und erneut auf mit Polyornithin beschichtete Deckgläser aufplattiert. Unter diesen Bedingungen erwarb jede Zelle Plasmide, die für etwa 200 unterschiedliche cDNA kodieren.

[0174] Zwischen 6 und 24 Stunden später wurden die Zellen mit fura-2 (30 min bei 37°C) in CIB-Puffer (mM: 130 NaCl, 3 KCl, 2,5 CaCl_2 , 0,6 MgCl_2 , 1,2 NaHCO_3 , 10 Glucose, 10 Hepes, pH 7,45), umfassend $10 \mu\text{M}$ fura-2 Acetoxymethylester und 0,02% Pleuronsäure (Molecular Probes), beladen, dann zweimal mit CIB gespült. Es erfolgte ratiometrische Calcium-Bildgebung unter Einsatz eines Nikon Diaphot-Fluoreszenzmikroskops, das mit einem variablen Filterrad (Sutter Instruments) und einer intensivierten CCD-Kamera (Hamamatsu) ausgestattet war. Duale Bilder (bei 340 nm und bei 380 nm Anregung, 510 nm Emission) wurden gewonnen und ratiometrische Pseudo-Farbbilder während des Experiments überwacht (Metafluor-Bildgebungssoftware, Universal Imaging). Zellen wurden anfänglich in 200 ml CIB abgebildet, bevor 200 ml CIB mit Capsaicin im Zweifachen der erwünschten Konzentration zugesetzt wurden. Nach den Reizen wurden die Zellen 60 bis 120 s lang beobachtet. Für jeden Bibliothekspool wurde ein mikroskopisches Feld (300–500 Zellen) in jedem von acht Näpfen untersucht.

[0175] Während die mit den meisten der untersuchten Pools oder mit pcDNA3 alleine transfizierten Zellen keine Capsaicin-Reaktionsfähigkeit zeigten, wiesen 1 bis 5% der mit einem der cDNA-Bibliothekspools transfizierten Zellen eine starke Zunahme der zytoplasmatischen Calciumkonzentrationen nach Capsaicin-Behandlung auf. cDNA aus diesem Pool wurde in kleinere Pools unterteilt, und diese Subpools wurden in HEK293-Zellen retransfiziert. In mit einigen dieser Subpools transfizierten Zellpopulationen reagierte eine sogar noch größere Zellfraktion auf Capsaicin – ein Indiz dafür, dass eine für Capsaicinrezeptor kodierende cDNA innerhalb der Population angereichert worden war. Der Vorgang der Pool-Unterteilung und der erneuten Tests wurde fortgesetzt, bis ein einzelnes Plasmid isoliert wurde, das mehr als 70% der transfizierten Zellen Capsaicin-Reaktionsfähigkeit verlieh. Der Klon, der Capsaicin-Reaktionsfähigkeit verlieh, enthielt ein 3 kb großes cDNA-Insert.

Beispiel 2: Sequenzieren und Charakterisieren von für Capsaicinrezeptor kodierender cDNA

[0176] Das 3 kb cDNA-Insert wurde unter Einsatz eines automatisierten Sequenzierers (ABI) sequenziert. Homologie-Suchen erfolgten im Abgleich mit der nichtredundanten Genbank-Datenbank und einer EST-Datenbank (dbest) unter Zuhilfenahme der Suchprogramme blastn, blastx und tblastx. Die Hydrophilie wurde unter Einsatz des Hopp-Woods-Algorithmus und einer Fenstergröße von 10×47 berechnet. Das Insert wurde als Rattenursprung bestimmt, indem Sequenzieren einer unabhängigen cDNA (isoliert aus einer Ratten-DRG-Bibliothek) und eines PCR-Produkts (abgeleitet aus Mäuse-DRG-cDNA) erfolgte. Die Sequenz des isolierten für Ratten-Capsaicinrezeptor kodierenden Polynucleotids (SEQ.-ID Nr. 1) und ihre entsprechende Aminosäuresequenz (SEQ.-ID Nr. 2) sind aus **Fig. 1** ersichtlich. Da eine Vanilloidgruppe eine wesentliche chemische Komponente von Capsaicin- und Resiniferatoxin-Strukturen darstellt, wird die vorgeschlagene Wirkungsstelle dieser Verbindungen allgemeiner als Vanilloidrezeptor bezeichnet (Szallasi, Gen. Pharmac. 25, 223–243 (1994)). Demzufolge wurde die neu klonierte cDNA VR1 (für Vanilloidrezeptor-Untertyp 1) genannt. Der Ausdruck „Capsaicinrezeptor“ umfasst hierin VR1, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0177] Die für VR1 kodierende cDNA enthält einen aus 2514 Nucleotiden bestehenden offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 838 Aminosäuren mit einer vorhergesagten Molekülmasse von 95 kD kodiert (**Fig. 1** und 2A). Die Hydrophilieanalyse belegt, dass VR1 ein polytopes Protein ist, das sechs transmembrane Domänen (als „TM“ bezeichnet und als schraffierte Kästchen in **Fig. 1** dargestellt; laut Prognose größtenteils β -Faltblatt (siehe **Fig. 1B**)) enthält, wobei sich ein kurzer zusätzlicher hydrophober Abschnitt zwischen den transmembranen Regionen 5 und 6 befindet (leicht schraffierter Bereich). Das aminoterminal hydrophile Segment (432 aa) enthält eine relativ Prolin-reiche Region, an die sich drei Ankyrin-Wiederholungsdomänen (offene Kästchen) schließen. Der Carboxyterminus (154 aa) enthält keine erkennbaren Motive.

[0178] Eine Homologiesuche der Proteindatenbanken lieferte keine signifikanten Ähnlichkeiten zwischen VR1 und den Mitgliedern der Familie mutmaßlicher „Speicheroperierter“ Calciumkanäle (SOC), deren prototypischen Mitglieder die retinalen Drosophila-Proteine RTP und RTPL 32, 33 enthalten (**Fig. 1C**). Es wurde vorgeschlagen, dass die Mitglieder dieser Familie den Eintritt von extrazellulärem Calcium in Zellen als Reaktion auf den Schwund intrazellulärer Calciumlager 34 medieren. Diese Proteine ähneln VR1 in Bezug auf ihre vorhergesagte topologische Organisation und die Gegenwart mehrerer aminoterminaler Ankyrin-Wiederholungen 33. Es besteht auch eine auffällige Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit zwischen VR1 und SOC innerhalb und angrenzend an die sechste transmembrane Region, einschließlich der kurzen hydrophoben Region zwischen den transmembranen Domänen 5 und 6, die zum Ionen-Permeationsweg 33 beitragen kann. Außerhalb dieser Regionen weist VR1 wenig Sequenzähnlichkeit mit SOC auf, was den Schluss zulässt, dass VR1 ein entfernter Verwandter dieser Familie von Kanalproteinen ist. Angesichts der hohen Permeabilität von VR1 gegenüber Calciumionen berücksichtigten die Anmelder trotzdem die Möglichkeit der Funktion als SOC.

[0179] Eine EST-Datenbank-Homologiesuche (EST = expressed sequence tag = exprimierter Sequenzmarker) zeigte mehrere Humanklone mit hohem Grad an Ähnlichkeit mit VR1 sowohl auf Ebene des Nucleotids als auch auf Ebene der vorhergesagten Aminosäuren (**Fig. 1C**). Drei dieser partiellen cDNA (unabhängig aus unterschiedlichen Quellen isoliert) kodieren für Sequenzen in der Nähe der vorhergesagten VR1-Poren-Loop und der sechsten transmembranen Domäne. Wie aus **Fig. 2C** ersichtlich, ist die Ähnlichkeit eines dieser Klone (hVR, Genbank-Zugriffsnummer T12251) mit der entsprechenden Region von VR1 extrem hoch (68% Aminosäure-Identität und 84% Ähnlichkeit innerhalb der dargestellten Region), was nahe legt, dass es sich wahrscheinlich um den Human-VR1-Ortholog oder einen eng verwandten Untertyp handelt. Human-EST-Klone, die anderen Domänen von VR1 entsprechen, weisen vergleichbare Ähnlichkeitsgrade auf (nicht gezeigt) und könnten Fragmente des gleichen Humantranskripts darstellen.

Beispiel 3: VR1 wirkt nicht als Speicher-operierter Calciumkanal (SOC)

[0180] Die Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten zwischen VR1 und SOC legen nahe, dass der Capsaicinrezeptor als SOC funktionieren könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Calcium-abhängige nach innen gerichtete Ströme in VR1-exprimierenden Oozyten mit Schwund an intrazellulärem Calcium in Einklang mit auf dem Ge-

biet der Erfindung bekannten Verfahren analysiert.

[0181] Zusammenfassend gesagt wurden cRNA-Transkripts aus Not1-linearisierten VR1-cDNA-Templaten mittels T7-RNA-Polymerase 17 synthetisiert. Defollikulierte *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit 0,5–5 ng VR1-cRNA injiziert. Vier bis sieben Tage nach der Injektion wurden zwei Elektronen-Spannungsklemmen-Aufzeichnungen durchgeführt ($E_{\text{hold}} = -60$ mV für IC_{50} -Kurve und thermische Stimulationsexperimente sowie -40 mV für alle anderen Experimente), wobei ein Geneclamp 500-Amplifikator (Axon Instruments) und ein MacLab A/D-Wandler (MacLab) zum Einsatz kamen. Die Aufzeichnungskammer wurde mit einer Rate von 2 ml/min mit Frosch-Ringer-Lösung, umfassend (mM) 90 NaCl, 1,0 KCl, 2,4 NaHCO₃, 0,1 BaCl₂, 1,0 MgCl₂ und 10 HEPES, pH 7,6, bei Raumtemperatur perfundiert. Vor der Durchführung von SOC-Tests wurden Oozyten 1–2 h lang in Calcium-freier, Barium-freier Frosch-Ringer-Lösung, die 1 mM EGTA und 1 μ M Thapsigargin enthielt, inkubiert. Während der Spannungsklemmen-Aufzeichnung wurden diese Oozyten intermittierend Frosch-Ringer-Lösung mit 2 mM Ca²⁺ und ohne EGTA ausgesetzt, um Calcium-abhängige Ströme zu detektieren (15 s-Pulse in 2-min-Intervallen) (Petersen et al., *Biochem* 311, 41–44 (1995)).

[0182] In mit Wasser injizierten Vergleichsoozyten wurde klarer Schwund-induzierter Strom beobachtet, wie dies bereits beschrieben wurde (Petersen et al., s. o.). In VR1-exprimierenden Oozyten wurden keine quantitativen oder qualitativen Unterschiede hinsichtlich dieser Reaktion beobachtet (nicht dargestellt). Außerdem hatte die Anwendung von SKF 96365 (20 μ M), eines Inhibitors des Schwund-stimulierten Calcium-Eintritts (Merrit et al., *Biochem. J.* 271, 515–522 (1990)), keine Auswirkung auf die Capsaicin-induzierten Ströme in VR1-exprimierenden Oozyten. Somit scheint VR1 unter diesen Bedingungen kein funktioneller SOC zu sein.

Beispiel 4: Sensorische Neuronen-spezifische Expression von Capsaicinrezeptor

[0183] Die Verteilung von VR1-Transkripts in neuronalen und nicht-neuronalen Rattengewebe wurde durch Northern-Blot- und In-situ-Hybridisierungsanalysen beurteilt. Ausgewachsene Sprague-Dawley-Ratten wurden durch Erstickung in CO₂ getötet und Gewebe frisch zerteilt. Poly-A⁺-RNA wurde entweder durch Lyse in Guanidiniumisothiocyanat, gefolgt von Reinigung auf oligo-dT-Cellulose oder mit dem FastTrack-Set (Invitrogen). Etwa 2 μ g jeder Probe wurden durch ein 0,8% Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoresiert, auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond N, Amersham) und mit einer ³²P-markierten Sonde (stellt die gesamte VR1-cDNA dar) hybridisiert. Blots wurden unter Bedingungen hoher Strenge gewaschen und autoradiographiert. Nach dem Sondieren mit Capsaicinrezeptor-cDNA wurden die gleichen Filter mit einem radiomarkierten cyclophilinen cDNA-Fragment als Vergleich erneut sondiert (z. B. um bezüglich relativer RNA-Ladung zwischen Proben zu korrigieren).

[0184] Für die In-situ-Hybridisierungs-Histochemie wurden ausgewachsene Sprague-Dawley-Rattenweibchen anästhesiert und mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Dorsalwurzganglien, Trigeminalganglien und Rückenmark wurden zerteilt, in flüssigem N₂ gefroren, in OCT-einbauendes Medium eingebettet und auf einem Kryostat zerschnitten. Die Abschnitte (15 μ m) wurden verarbeitet und bei 55°C über Nacht mit einer Digoxigenin-markierten cRNA (erzeugt durch In-vitro-Transkription eines 1 kb-Fragments der VR1-cDNA (nt 1513–2482)) unter Verwendung des Genius-Sets (Boehringer Mannheim) sondiert. Die Abschnitte wurden mit an alkalische Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten gemäß den Anleitungen des Herstellers entwickelt.

[0185] Sowohl die Northern-Blot-Analyse als auch die In-situ-Hybridisierungs-Histochemie zeigten, dass VR1-Transkripte selektiv innerhalb der Dorsalwurzel- und Trigeminalganglien exprimiert werden. Eine mRNA-Spezies von etwa 4 kb wurde prominent in Trigeminal- und sensorischen Dorsalwurzganglien exprimiert (es wurde aufgezeigt, dass beide Capsaicin-sensitive Neuronen aufweisen). Dieses Transkript fehlte in allen anderen untersuchten Geweben (einschließlich Rückenmark und Gehirn). Eine viel kleinere RNA-Spezies (etwa 1,5 kb) wurde in der Niere detektiert, aber es ist unklar, ob dieses Transkript für ein funktionelles VR1-Protein kodieren könnte.

[0186] Die In-situ-Hybridisierung zur Beurteilung des Zellmusters von VR1-Expression innerhalb sensorischer Ganglien zeigte, dass VR1 vor allem in einer Untergruppe von Neuronen mit kleinem Durchmesser innerhalb der Dorsalwurzel- und Trigeminalganglien exprimiert wurde. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die meisten Capsaicin-sensitiven Neuronen Zellkörper relativ kleiner bis mittlerer Größe aufweisen (Holzer, *Pharmacol. Rev.* 43, 143–201 (1991); Jansco et al., *Nature* 270, 741–743 (1977)). Im Gegensatz zur prädominanten Expression von VR1-Transkripten in Neuronen des Dorsalwurzganglions wurde kein sichtbares Signal im angrenzenden Hirnhorn des Rückenmarks beobachtet. Während Bindungsstellen für radiomarkiertes Resiniferatoxin im Hirnhorn detektiert wurden, geht man davon aus, dass diese Stellen auf präsynaptischen Enden liegen, die aus primären Nozizeptoren innerhalb angrenzender Dorsalwurzganglien ragen (Holzer 1991, s. o.). Die Ergebnisse unterstützen diese Vermutung.

Beispiel 5: Beurteilung von VR1-Pharmakologie in Xenopus-Oozyten

[0187] Um die pharmakologischen Eigenschaften des klonierten Capsaicinrezeptors mit jenen der nativen Vanilloidstellen in sensorischen Ganglien zu vergleichen, wurde VR1 in Oozyten exprimiert und in einer Vollzellen-Spannungsklemmen-Analyse verwendet, um seine elektrophysiologischen Reaktionen auf eine Vielzahl an Vanilloid-Agonisten (Capsaicin, Resiniferatoxin) und -Antagonisten (Capsazepin) quantitativ zu untersuchen. VR1 wurde in Xenopus-Oozyten wie oben (Beispiel 3) exprimiert, außer dass CaCl_2 (2 mM) anstelle von BaCl_2 verwendet wurde, als die Capsazepin-Hemmungskurve erstellt wurde. Die Agonisten Capsaicin und Resiniferatoxin wurden hintereinander auf den gleichen VR1 exprimierenden Xenopus-Oozyten aufgebracht. Membranströme wurden in der Vollzellen-Spannungsklemmen-Konfiguration aufgezeichnet ($V_{\text{hold}} = -40$ mV).

[0188] Die Ergebnisse der Capsaicin- und Resiniferatoxin-Studien sind in **Fig. 10A–10B** veranschaulicht. Die Balken stehen für die Dauer der Agonisten-Zufuhr. Bei negativen Haltepotenzialen produzierte die Capsaicin- oder Resiniferatoxin-Exposition dosisabhängige nach innen gerichtete Strom-Reaktionen in VR1-exprimierenden Oozyten, jedoch nicht in Wasser-injizierten Vergleichszellen. Wie dies in sensorischen Neuronen beobachtet wurde (Winter et al., Brain Res. 520, 131–140 (1990); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9, 738–741 (1994)), kehrten Capsaicininduzierte Stromreaktionen nach Entfernung von Agonist rasch zur Grundlinie zurück, während sich die Resiniferatoxin-Reaktionen sogar nach verlängerter Auswaschdauer oft nicht erholen konnten. Halbmaximale wirksame Konzentrationen für diese Agonisten lagen innerhalb einer Größenordnung jener, die für native Vanilloidrezeptoren angeführt wurden (Oh et al., s. o.; Bevan et al., Br. J. Pharmacol. 107, 544–552 (1992)), wobei Resiniferatoxin etwa 20fach wirksamer ist als Capsaicin ($\text{EC}_{50} = 39,1$ nM bzw. 711,9 nM). Aus diesen Analysen abgeleitete Hill-Koeffizienten (1,95 bzw. 2,08) legen nahe, dass die volle Aktivierung des Rezeptors die Bindung mehr als eines Agonistenmoleküls umfasst, was ebenfalls mit bereits beschriebenen Eigenschaften nativer Vanilloidrezeptoren übereinstimmt (Oh et al., s. o.; Szallasi, Gen. Pharmac. 25, 223–243 (1994)).

[0189] Wie aus den **Fig. 11A und 11B** ersichtlich, wurden Capsaicin-induzierte Reaktionen in VR1-exprimierenden Oozyten durch den kompetitiven Vanilloidrezeptor-Antagonisten Capsazepin bei Konzentrationen ($\text{IC}_{50} = 283,5$ nM) blockiert, die native Rezeptoren hemmen (**Fig. 10A–10B**). Die Stromspur zeigt, dass die Blockierung der Capsaicin-Aktivität (cap; 0,6 μM) durch Capsazepin (cpz; 10 μM) reversibel ist. Ein weiteres pharmakologisches Merkmal von Vanilloidrezeptoren ist ihre Sensitivität gegenüber dem nicht-kompetitiven Antagonisten Rutheniumrot (RR; 10 μM), das Capsaicin-induzierte Reaktionen (cap; 0,6 μM) ebenfalls reversibel blockierte (**Fig. 11A**). Die Reaktionen auf Resiniferatoxin (50 nM) wurden durch Capsazepin (5 μM) oder Rutheniumrot (10 μM) ebenfalls reversibel antagonisiert (nicht dargestellt).

Beispiel 6: Patch-Clamp-Analyse rekombinanter Capsaicinrezeptoren, die in HEK293-Embryonierzellen exprimiert werden

[0190] Der in Beispiel 1 klonierte rekombinante Capsaicinrezeptor wurde in Studien unter Anwendung der Patch-Clamp-Analyse in Capsaicinrezeptor-exprimierenden HEK-293-Zellen weiter charakterisiert. HEK293-Zellen wurden mit einem Vergleichsvektor transfiziert (cDNA3 ohne eine für Capsaicinrezeptor kodierende Sequenz). Die Patch-Clamp-Aufzeichnungen erfolgten mit transient transfizierten HEK293-Zellen bei 22°C. Eine Standard-Badlösung für die Vollzellen-Aufzeichnungen enthielt (mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 Glucose, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH). In Calcium-freier Badlösung wurde CaCl_2 entfernt und 5 mM EGTA zugesetzt.

[0191] Für Substitutionsexperimente mit einwertigen Kationen wurde – nach dem Erhalten der Vollzellen-Konfiguration in Vergleichsbadlösung – die Badlösung geändert auf (mM): 140 NaCl (oder KCl oder CsCl), 10 Glucose und 10 HEPES (eingestellt auf pH 7,4 mit NaOH, KOH bzw. CsOH) und das Umkehrpotential unter Verwendung von Spannungsanstiegen gemessen. Für Permeabilitätsexperimente mit zweiwertigen Kationen wurde die Badlösung geändert auf (mM): 110 MgCl_2 (oder CaCl_2), 2 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$), 10 Glucose, 10 HEPES, pH 7,4 (eingestellt mit HCl).

[0192] Die Badlösung für Outside-out-Patch-Aufzeichnungen und die Pipettenlösung für Inside-out-Patch-Aufzeichnungen enthielt (mM) 140 NaCl, 10 HEPES, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH). Die Badlösung für Inside-out-Patch-Aufzeichnungen und die Pipettenlösungen für Outside-out-Patch-Aufzeichnungen und Ionen-Substitutionsexperimente enthielten (mM) 140 NaCl, 10 HEPES, 5 EGTA, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH). Die Pipettenlösung für Vollzellen-Aufzeichnungen enthielt (mM) 140 CsCl (oder 130 CsAspartat und 10 NaCl), 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7,4 (eingestellt mit CsOH). Die Flüssigkeits-Verbindungsstellen-Potentiale wurden direkt in getrennten Experimenten gemessen; sie überschritten bei den verwendeten Lösungen nicht 3 mV, und es wurde keine Korrektur bezüglich dieses Offsets vorgenommen.

[0193] Die die Vollzellen-Aufzeichnung betreffenden Daten wurden bei 20 kHz erhoben und bei 5 kHz zwecks Analyse gefiltert (Axopatch 200-Amplifier mit pCLAMP-Software, Axon Instruments). Die die Einzelkanal-Aufzeichnung betreffenden Daten wurden bei 10 kHz erhoben und bei 1 kHz gefiltert. Die Permeabilitätsverhält-

nisse für einwertigen Kationen zu Na (P_X/P_{Na}) wurden wie folgt berechnet: $P_X/P_{Na} = \exp(\Delta V_{rev} F/RT)$, worin V_{rev} das Umkehrpotential ist, F die Faraday-Konstante ist, R die universelle Gaskonstante ist und T die absolute Temperatur ist. Für Messungen zweiwertiger Permeabilität wurde P_Y/P_{Na} wie folgt berechnet: $P_Y/P_{Na} = [Na^+]_i \exp(\Delta V_{rev} F/RT) / (1 + \exp(\Delta V_{rev} F/RT)) / 4[Y^{2+}]_o$. Die Ionenaktivitäts-Koeffizienten von 0,75 (Natrium) und 0,25 (Calcium oder Magnesium) wurden als Korrekturfaktoren verwendet.

[0194] **Fig. 3** zeigt die Ergebnisse der Vollzellen-Spannungsklemmen-Analyse von Capsaicinrezeptor exprimierenden HEK293-Zellen bei -60 mV unter Verwendung einer mit CsAspartat gefüllten Pipette. Diese Daten zeigen einen nach innen gerichteten Kationen spezifischen Strom, der nur während der Capsaicin-Behandlung vorhanden ist (die Zeitdauer, während der Capsaicin vorhanden war ($1 \mu M$), ist durch den Balken oberhalb des Graphen angezeigt) und sich mit kurzer Latenz nach Zufuhr von Capsaicin in das Bad entwickelte. Es wurden keine derartigen Ströme in Mock-transfizierten Vergleichszellen beobachtet. **Fig. 4** zeigt die Spannungsschritte (400 ms) von -100 mV auf $+40$ mV (vertikale Linien in **Fig. 3**) in erweitertem Zeitmaßstab. Die Ströme in Abwesenheit von Capsaicin (a) wurden von den in Anwesenheit von Capsaicin erhaltenen Strömen (b) subtrahiert. Diese Analyse der Daten zeigte einen zeitunabhängigen, Rezeptor-abhängigen Strom. In Calcium-freiem Medium war der Capsaicin-induzierte Strom ebenfalls zeitunabhängig – sowohl beim konstanten Haltepotential von -60 mV (**Fig. 3**) als auch während der Spannungsschritte von -100 auf $+40$ mV (in 20 mV-Inkrementen; **Fig. 4**). Diese Eigenschaft ermöglichte die Charakterisierung von Capsaicin-medüerten Strömen unter stationären Reaktionsbedingungen in nachfolgenden Experimenten. Die sich aus diesen Daten ergebenden Verhältnisse zwischen Strom und Spannung zeigen, dass solche Reaktionen eine auffällige nach außen gerichtete Berichtigung aufweisen, die jener ähnelt, die man in kultivierten Dorsalwurzelganglion-Neuronen beobachtet (**Fig. 3**; Oh et al., s. o.). Da die in diesen Experimenten verwendete Badlösung hauptsächlich aus Natriumchlorid bestand, während die Patch-Pipette mit Cäsiumaspartat gefüllt war, zeigt das beobachtete Umkehrpotential nahe an 0 mV ($E_{rev} = 0,5 \pm 0,9$ mV; $n = 13$), dass die Capsaicin-medierte Reaktion die Öffnung eines Kation-selektiven Kanals umfasst.

[0195] In sensorischen Neuronen werden Vanilloid-induzierte Ströme durch ein Gemisch ein- und zweiwertiger Kationen getragen (Bevan et al., Trends Pharmacol. Sci. 11, 330–333 (1990); Oh et al., s. o.; Wood et al., J. Neuroscience 8, 3208–3220 (1988)). Dieses Phänomen wurde in VR1-exprimierenden Säugetierzellen durch eine Reihe von Ionen-Substitutionsexperimenten untersucht, um die relativen Beiträge verschiedener Kationen zu Capsaicin-induzierten Strömen in VR1-exprimierenden Zellen zu erforschen. Die Strom-Spannungs-Verhältnisse (festgelegt für Zellen, die in Lösungen variierender kationischer Zusammensetzungen eingetaucht sind (**Fig. 5**; Na^+ (mit a beschriftet), K^+ (mit b beschriftet), Cs^+ (mit c beschriftet), Mg^{++} (mit d beschriftet) oder Ca^{++} (mit e beschriftet))) zeigten, dass VR1 unter einwertigen Kationen nicht unterscheidet, aber eine auffällige Präferenz für zweiwertigen Kationen an den Tag legt. Der Austausch von extrazellulärem NaCl (140 mM) mit äquimolarem KCl oder CsCl sorgte für keine signifikante Verschiebung des Umkehrpotentials ($E_{rev} = -0,7 \pm 1,2$ mV, $n = 8$; $-1,5$ mV, $n = 9$; $-4,3 \pm 0,9$ mV, $n = 8$. $P_K/P_{Na} = 0,94$; $P_{Cs}/P_{Na} = 0,85$). Der Austausch von extrazellulärem NaCl mit isotonischem (112 mM) $MgCl_2$ oder $CaCl_2$ verschob E_{rev} auf $14,4 \pm 1,3$ mV ($n = 3$) bzw. $24,3 \pm 2,3$ mV ($n = 7$). Wie in **Fig. 5** zusammengefasst, zeigten die Daten somit, dass die Capsaicinrezeptor-exprimierenden Zellmembranen die folgenden relativen Kationen-Permeabilitätswerte für den Capsaicin-aktivierten Strom besaßen: $Ca^{++} > Mg^{++} \gg Na^+ \sim K^+ \sim Cs^+$. Diese sehr hohe relative Permeabilität von VR1 gegenüber Calciumionen ($P_{Ca}/P_{Na} = 9,60$; $P_{Mg}/P_{Na} = 4,99$) ist höher als jene, die man für die meisten nicht-selektiven Kationenkanäle beobachtet, und vergleichbar mit Werten, die für Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ ermittelt wurden ($P_{Ca}/P_{Na} = 10,6$; Mayer et al., J. Physiol. 394, 501–527 (1987)), die für diese Eigenschaft bekannt sind. Bei allen untersuchten Badlösungen wurde eine nach außen gerichtete berichtigte Strom-Spannungs-Beziehung beobachtet, obwohl dieses Merkmal in $MgCl_2$ - oder $CaCl_2$ -enthaltenden Badlösungen weniger auffällig war.

[0196] In kultivierten sensorischen Neuronen zeigten elektrophysiologische Analysen von Vanilloid-induzierten Reaktionen, dass sie kinetisch komplex sind und bei kontinuierlicher Vanilloid-Exposition desensibilisieren (Liu et al., s. o.; Yeats et al., J. Physiol. 446, 390P (1992)). Die elektrophysiologische Desensibilisierung (die Aspekten physiologischer Desensibilisierung infolge von Vanilloiden in vivo zugrunde liegen kann) scheint teilweise von der Gegenwart von extrazellulärem Calcium abzuhängen (Yeats et al., s. o.; Holzer, Pharmacol. Rev. 43, 143–201 (1991)). Um die Calcium-Abhängigkeit der Capsaicin-Reaktionsfähigkeit VR1-exprimierender Zellen zu untersuchen, wurden Vollzellen-Stromreaktionen sowohl in Calcium-hältiger Standardbadlösung als auch in Calcium-freier Lösung analysiert (**Fig. 6A–6F**). Capsaicin ($1 \mu M$) wurde alle 5 min aufgebracht; CsCl wurde als Pipettenlösung verwendet. Die Verhältnisse der Stromgröße am Ende der dritten Zufuhr zum Peak der ersten Zufuhr waren $95,3 \pm 2,6\%$ ($n = 3$) in Calcium-freier Lösung und $13,0 \pm 4,3\%$ ($n = 5$) in Calcium-hältiger Lösung (T-Test; $p < 0,00001$). In Abwesenheit von extrazellulärem Calcium zeigten Capsaicin-induzierte Reaktionen in VR1-transfizierten Zellen wenig oder überhaupt keine Desensibilisierung während längerer Agonisten-Zufuhr oder im Falle hintereinander erfolgreicher Agonisten-Exposition ($4,7 \pm 2,3\%$ Abnahme zwischen der ersten und der dritten Zufuhr, $n = 5$). Im Gegensatz dazu bestanden die in Calcium-hältiger Badlösung hervorgerufene Reaktionen aus zumindest zwei voneinander verschiedenen Komponenten: aus einer desensibi-

lisierenden ($87 \pm 4,3\%$ Abnahme zwischen der ersten und der dritten Zufuhr, $n = 5$) und einer relativ nichtdesensibilisierenden. Somit können die Desensibilisierung und die Mehrphasenkinetik von Vanilloid-aktivierten Reaktionen außerhalb eines neuronalen Kontexts reproduziert und aufgrund ihrer Abhängigkeit von Calcium-Umgebungswerten voneinander unterschieden werden.

[0197] Das Verhalten der VR1-Reaktion wurde auch in aus transfizierten Zellen exzidierten Membran-Patches untersucht. Inside-out- (I/O-) oder Outside-out- (O/O-) Patches wurden aus VR1-transfizierten Zellen exzidiert und in symmetrischem 140 mM NaCl bei den angegebenen Haltepotentialen mit Capsaicin ($1 \mu\text{M}$) in der Badlösung analysiert. Die gestrichelte Linien in den in **Fig. 7** gezeigten Daten zeigen den geschlossenen Kanalzustand an. In anderen Patches wurden mehrere gleichzeitige Kanalöffnungen beobachtet. Die großen und gut aufgelösten Ströme einheitlicher Amplitude, die man nur in Gegenwart von Capsaicin beobachtet (**Fig. 7**), deuten auf die Gegenwart von Ionenkanälen mit Capsaicin-Gates innerhalb dieser Patches hin, deren Aktivierung nicht von löslichen zytoplasmatischen Komponenten abhängt. Die Stromspannungskurve mittlerer Einzelkanalamplituden ($\pm$ s. e. m.; **Fig. 8**), die anhand der Daten von **Fig. 7** errechnet wurde, weist eine auffällige nach außen gerichtete Berichtigung auf. Die Strom-Spannungs-Beziehung auf Einzelkanal-Ebene war im Wesentlichen identisch mit der in der Vollzellen-Konfiguration festgelegten, was auf die nach außen gerichtete Berichtigung und das Umkehrpotential in der Nähe von 0 mV unter ähnlichen ionischen Bedingungen zurückzuführen war. Einheitliche Leitfähigkeiten von 76,7 pS bei positiven Potentialen und 35,4 pS bei negativen Potentialen wurden mit Natrium als alleinigem Ladungsträger beobachtet. Diese Einzelkanal-Eigenschaften spiegeln jene wider, die bereits für native Vanilloidrezeptoren beschrieben wurden (Oh et al., s. o.; Forbes et al., *Neurosci. Lett. Suppl.* 32, S3 (1988)).

[0198] Es wurde vorgeschlagen, dass die Vanilloid-Wirkungsstelle möglicherweise nicht auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran beschränkt ist (aufgrund der lipophilen Beschaffenheit dieser Verbindungen) (James et al., in: *Capsaicin in the Study of Pain* (Wood Hg.), S. 83–104 (Academic Press, London, 1993)). Interessanterweise konnte Capsaicin identische Reaktionen hervorrufen, wenn es beiden Seiten eines aus einer VR1-exprimierenden Zelle exzidierten Patches zugesetzt wurde (**Fig. 7**) – dies stimmt mit der Vorstellung überein, dass Vanilloide in die Lipid-Doppelschicht eindringen oder sie überqueren können, um ihre Wirkungen zu mediieren. Eine weniger wahrscheinliche, jedoch formal konsistente Erklärung ist, dass Vanilloidrezeptoren funktionell äquivalente Capsaicin-Bindungsstellen auf beiden Seiten der Plasmamembran besitzen.

[0199] Diese Daten belegen, dass sich der klonierte Capsaicinrezeptor in der Patch-Clamp-Analyse sehr ähnlich verhält wie der Capsaicinrezeptor der Wildform.

Beispiel 7: Verwendung von rekombinantem Capsaicinrezeptor zur Quantifizierung von Vanilloid-Konzentrationen

[0200] Wie dies schon seit Jahren bekannt ist, variieren die relativen Schärfegrade von Pfefferschoten-Varianten äußerst stark, was teilweise auf ihren unterschiedlichen Vanilloidgehalt zurückzuführen ist. Verfahren zur Klassifizierung von Pfefferschoten hinsichtlich ihrer relativen Schärfe beruhen auf subjektiven psychophysikalischen Tests, wobei die Werte in Scoville-Einheiten angeführt sind (Scoville, *J. Am. Pharm. Assoc.* 1, 453–454 (1912)), oder auf biochemischen Bestimmungen des Capsaicingehalts (Woodbury, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 556–558 (1980)). Es wurde die Frage weiter erforscht, ob die elektrophysiologische Reaktion des klonierten Vanilloidrezeptors auf Pfefferschotenextrakte im Verhältnis zur Fähigkeit dieser Pfefferschoten steht, Schmerzen zu verursachen.

[0201] Es wurden mehrere Arten scharfer Pfefferschoten (15 g; grüne Thai-Pfefferschote, Poblano verde, Habanero und Wachs) gemahlen und über Nacht bei Raumtemperatur mit 50 ml absolutem Alkohol extrahiert. Lösliche Extrakte wurden 15fach durch Vakuumtrocknung konzentriert und dann 1000fach in Frosch-Ringer-Lösung für den elektrophysiologischen Test verdünnt. Äquivalente Fraktionen (normalisiert auf Pfefferschotengewicht) wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten rekombinanten Capsaicinrezeptor zu aktivieren. Die Capsaicinrezeptor-Aktivierung wurde unter Anwendung eines Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Tests ermittelt, um die durch jeden Pfefferschotenextrakt hervorgerufenen Ströme quantitativ zu messen. Die Reaktionen wurden auf die Reaktion auf reines Capsaicin normalisiert ($10 \mu\text{M}$, eingestellt auf 100). Die Daten sind aus **Fig. 11** ersichtlich (jeder Wert stellt einen Durchschnitt vier unabhängiger Bestimmungen jeweils aus getrennten Oozyten dar; 30 s Zufuhr). Die relative Reaktion des klonierten Rezeptors auf die Pfefferschotenproben und den Capsaicin-Vergleich sind im Histogramm zu sehen, wobei repräsentative Stromspuren rechts von jedem Balken im Histogramm dargestellt sind. Die Extrakte riefen in Wasser-injizierten Zellen keine Reaktion hervor.

[0202] Die relativen Reaktionen von Capsaicinrezeptor auf die Pfefferschotenextrakte korrelieren mit der relativen Schärfe jeder Pfefferschote (bestimmt durch konventionelle Analysen und Scoville-Schärfeeinheiten). Außerdem korrelierten die unterschiedlichen Schärfegrade dieser Pfefferschotenvarianten (bestimmt durch subjektive psychophysikalische Bewertungen; Berkeley et al., *Peppers: A Cookbook*, S. 1–120, Simon and Schuster, New York, USA, 1993) mit ihrem Wirkungsgrad als Aktivatoren von VR1.

Beispiel 8: Capsaicin führt zum Tod von VR1-exprimierenden Zellen

[0203] Capsaicin ist weithin als Neurotoxin bekannt, das selektiv primäre afferente Nozizeptoren in vitro und in vivo zerstört (Jansco et al., *Nature* 270, 741–743 (1977); Wood et al., *J. Neurosci.* 8, 3208–3220 (1988)). Um zu bestimmen, ob diese selektive Toxizität nur das Ergebnis der Spezifität der Rezeptorexpression ist oder ob sie von weiteren Eigenschaften sensorischer Neuronen oder ihrem Milieu abhängt, wurde die Fähigkeit von Capsaicin, Vanilloidrezeptoren-exprimierende nicht-neuronale Zellen zu töten, in vitro untersucht. HEK293-Zellen wurden entweder mit Vektor alleine (pcDNA3), Vanilloidrezeptor-cDNA, 1 : 50 verdünnt in pcDNA3 (VR1 1 : 50), oder Vanilloidrezeptor-cDNA alleine (VR1) transient transfiziert. 14 Stunden später wurde Kulturmedium mit Capsaicin-hältigem Medium (3 μ M, ausgefüllte Balken) oder Vehikel (Ethanol 0,3%, nicht-ausgefüllte Balken) ersetzt (**Fig. 12**). Nach 7 Stunden bei 37 °C wurde der Prozentsatz toter Zellen mittels Ethidiumhomodimer-Einfärbung ermittelt. Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ s. e. m. von Dreifachbestimmungen aus einem repräsentativen Experiment dar. Die Sterne stehen für eine signifikante Differenz gegenüber den mit Ethanol behandelten Zellen (T-Test, $p < 0,0001$). Es wurden ähnliche Ergebnisse in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

[0204] Wie aus **Fig. 12** ersichtlich, wurde innerhalb einiger Stunden der kontinuierlichen Capsaicin-Exposition der Tod zahlreicher der mit VR1 transfizierten HEK293-Zellen festgestellt; dies wurde morphologisch und durch Verwendung von Vitalfärbung bestimmt. Im Gegensatz dazu wurden mit Vektor alleine transfizierte Zellen durch diese Behandlung nicht getötet. Der Zelltod war durch auffällige zytoplasmatische Schwellung, Koaleszenz des zytoplasmatischen Inhalts und schlussendlich durch Lyse gekennzeichnet. Somit kann VR1-Expression in einem nicht-neuronalen Kontext die Zytotoxizität, die man bei mit Vanilloid behandelten sensorischen Neuronen beobachtet, reproduzieren. Die Einfärbung mit Hoechst-Farbstoff 33342 zeigte keine Hinweise auf Kernfragmentierung, die oft mit apoptotischem Zelltod 28 assoziiert ist (nicht dargestellt). Insgesamt stimmen diese Beobachtungen mit nekrotischem Zelltod infolge exzessiven Ionenzuflusses überein, so wie dies für Vanilloid-induzierten Tod von Nozizeptoren (Bevan et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 330–333 (1990)), Glutamat-induzierte Exzitotoxizität (Choi, *Prog. Brain Res.* 199, 47–51 (1994)) und Neurodegeneration infolge konstitutiv aktivierender Mutationen verschiedener Ionenkanäle (Hong et al., *Nature* 367, 470–473 (1994); Hess, *Neuron* 16, 1073–1076 (1996)) vorgeschlagen wurde.

Beispiel 9: Wasserstoffionen potenzieren die Wirkung von Capsaicin auf VR1

[0205] Eine Reduktion von Gewebe-pH infolge von Infektion, Entzündung oder Ischämie kann Schmerzen in Säugetieren bewirken. Diese Wirkung wurde der Fähigkeit von Protonen zugeschrieben, Anregungskanäle auf der Oberfläche nozizeptiver Neuronen zu aktivieren. Es wurde berichtet, dass eine Untergruppe dieser Reaktionen Eigenschaften mit jenen teilt, die durch Vanilloide hervorgerufen werden – beispielsweise eine ähnliche Kinetik, Ionenselektivität und Antagonismus durch Rhuteniumrot (Bevan et al., *Trends Neurosci.* 17, 509–512 (1994)). Außerdem wurde gezeigt, dass unterhalb der Schwelle gelegene Konzentrationen von Wasserstoffionen die Wirkung niedriger Konzentrationen von Capsaicin in sensorischen Neuronen potenzieren können (Petersen et al., *Pain* 54, 37–42 (1993); Kress et al., *Neurosci. Lett.* 211, 5–8 1996). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Protonen möglicherweise als endogene Aktivatoren oder Modulatoren von Vanilloidrezeptoren dienen (Bevan et al. 1994, s. o.).

[0206] Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Wirkungen von Wasserstoffionen auf den klonierten Vanilloidrezeptor unter Verwendung des Oozyten-Expressionssystems analysiert. Capsaicin (0,3 μ M) wurde während der gesamten Versuchsdauer (angezeigt durch die Pfeile in **Fig. 13**) verabreicht ($V_{\text{hold}} = -40$ mV). Der pH-Wert der Badlösung wurde während des Experiments geändert (angezeigt durch die horizontalen Balken in **Fig. 13**). VR1-exprimierende Oozyten wiesen keine Reaktionen auf die Badlösung (pH 6,3) ohne Capsaicin auf; Wasser-injizierte Oozyten zeigten keine Reaktionen auf Capsaicin oder die Badlösung bei pH 6,3 (nicht dargestellt). Die Stromreaktionen aus den 9 unabhängigen VR1-exprimierenden Oozyten sind in **Fig. 14** zusammengefasst. Der graue Abschnitt jedes Balkens zeigt den durch Capsaicin bei pH 7,6 induzierten Spitzenstrom an, während der schwarze Abschnitt den durch Veränderung des pH-Werts auf 6,3 hervorgerufenen zusätzlichen Strom darstellt.

[0207] Die abrupte Reduktion des pH-Werts der Badlösung (von 7,6 auf 5,5) reichte nicht aus, um VR1 in Abwesenheit von Capsaicin zu aktivieren (weniger als 10% der auf diese Weise behandelten VR1-exprimierenden Oozyten wiesen einen starken nach innen gerichteten Strom auf (nicht dargestellt)), was nahe legt, dass Wasserstoffionen alleine dieses Protein nicht wirkungsvoll aktivieren können. Als nächstes wurde die Wirkung von Capsaicin und des pH-Werts auf VR1-Aktivierung untersucht. VR1-exprimierende Oozyten wurden mit einer submaximalen Konzentration an Capsaicin (500 nM) bei pH 7,6 behandelt (**Fig. 13**). Sobald ihre Stromreaktionen ein relativ stabiles Plateau erreichten, wurden die Oozyten einer Lösung ausgesetzt, die die gleiche Konzentration von Capsaicin bei pH 6,3 besaß. Unter diesen Bedingungen nahm der nach innen gerichtete Strom rasch auf einen neuen Plateauwert zu, dessen Größenordnung bis zu 5fach höher ist als jene des ers-

ten. Nach Rückführung auf pH 7,6 sank die Oozytenreaktion auf ihren anfänglichen Plateauwert, und nach der Entfernung von Capsaicin kehrte sie zur Grundlinie zurück. Diese Potenzierung wurde nur mit untersättigten Konzentrationen an Agonist beobachtet, da reduzierter pH-Wert die Reaktionen auf 10 μM Capsaicin nicht erhöhte (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass zwar Wasserstoffionen alleine zur Aktivierung von VR1 nicht ausreichen, aber die Capsaicin-induzierten Reaktionen deutlich potenzieren können.

Beispiel 10: Vanilloidrezeptor wird durch schädliche Wärme aktiviert

[0208] Es wurden die Wirkungen erhöhter Temperaturen auf die VR1-Aktivität bei Calciumzufluss, Leitfähigkeit und Capsaicin- und RR-Reaktionsfähigkeit untersucht.

a) Wirkung der Wärme auf intrazelluläres Calcium

[0209] Die Wirkung von Wärme auf VR1-Aktivität beim Medieren von Calciumzufluss wurde unter Verwendung von transfizierten HEK293-Zellen und mittels des oben beschriebenen Screeningverfahrens mit Zufluss von fluoreszierendem Calcium untersucht. Die Zellen wurden mittels mikroskopischer fluoreszierender Calcium-Bildgebung vor und unmittelbar nach der Zugabe von erwärmtem Calcium-Bildgebungspuffer analysiert (300 ml CIB bei 65°C wurde auf Zellen aufgebracht, die sich in 150 ml CIB bei 22°C befanden). Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen transient einer Spitzentemperatur von ~45°C ausgesetzt.

[0210] Während die mit Vektor alleine transfizierten Zellen nur eine milde, diffuse Änderung an zytoplasmatischem freiem Calcium aufwiesen, zeigte ein großer Anteil der VR1-exprimierenden Zellen Sekunden nach Beginn der Wärmebehandlung eine deutliche Erhöhung des Calciumwerts. Die Reaktionen flauten innerhalb weniger Minuten ab, und eine nachfolgende Exposition mit Capsaicin führte zu einer charakteristischen Calciumreaktion – ein Hinweis darauf, dass die Reaktion auf Wärme ein spezifisches Signalisierungsereignis und keine Folge nicht-spezifischer Membranstörung oder Beeinträchtigung der Zellintegrität ist.

b) Auswirkung der Wärme auf Leitfähigkeit

[0211] Es erfolgte Vollzellen-Patch-Clamp-Analyse ($V_{\text{hold}} = -60 \text{ mV}$) von VR1-transfizierten HEK293-Zellen, um die Frage zu klären, ob spezifische Wärme-induzierte Membranströme mit diesem Phänomen assoziiert sind. Die Temperatur des Badmediums wurde von 22°C auf 48°C (Wärme) angehoben und dann auf 22°C rückgeführt; anschließend wurde Capsaicin (0,5 μM) dem Bad zugesetzt. Die ioni-schen Bedingungen waren identisch mit jenen, die für die Daten von **Fig. 2** beschrieben sind. Es wurden vor, zwischen und während der Reaktionen Spannungsanstiege durchgeführt (-100 auf +40 mV in 500 ms).

[0212] Da die Zellen einem raschen Temperaturanstieg (22°C auf 50°C in 25 s, überwacht mit einem im Bad befindlichen Thermistor) ausgesetzt wurden, entstanden starke nach innen gerichtete Ströme ($791 \pm 235 \text{ pA}$ bei 60 mV; $n = 9$), die typischerweise eine ähnliche Amplitude aufwiesen wie die durch eine nachfolgende Aufbringung von Capsaicin bei 500 nM hervorgerufenen (**Fig. 15A**). Sowohl Wärme- als auch Vanilloid-induzierte Reaktionen zeigten nach außen gerichtete Berichtigung, was den Schluss zulässt, dass sie durch die gleiche Funktionseinheit mediert werden (**Fig. 15B**). Im Vergleich dazu waren thermisch aktivierte Reaktionen der Vektor-transfizierten Vergleichszellen viel geringer und wiesen keine Berichtigung auf ($131 \pm 23 \text{ nA}$, $n = 8$). Darüber hinaus desensibilisierte die Wärmereaktion in Vektor-transfizierten Zellen während der Reizzufuhr, während dies bei der kleinen thermischen Reaktion in den Vektor-transfizierten Vergleichszellen nicht der Fall war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass VR1 als thermischer Wandler dient – entweder an sich oder in Verbindung mit anderen Zellkomponenten.

c) Wärmeaktivierung von VR1 in Oozyten

[0213] Um zu bestimmen, ob VR1 ähnliche Reaktionen auf Wärme in einer unterschiedlichen Zellumgebung medieren könnte, wurde die Wärmeaktivierung von VR1 im Oozytensystem getestet. Oozyten, injiziert entweder mit VR1-cRNA oder Wasser, wurden der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ($V_{\text{hold}} = -60 \text{ mV}$) ausgesetzt, während die Temperatur des Perfusionspuffers von 22,7°C auf den angegebenen Wert gehoben und dann 60 s lang konstant gehalten wurde. Die Größenordnungen der resultierenden nach innen gerichteten Ströme sind in **Fig. 16** als Mittel $\pm$ S. E. M. dargestellt (VR1, $n = 8$; Wasser, $n = 6$, unabhängige Zellen). Der Stern zeigt eine signifikante Differenz gegenüber Wasser-injizierten Oozyten an (T-Test, $p < 0,0005$).

[0214] In den Wasser-injizierten Vergleichsoozyten führte die akute Erhöhung der Perfusat-Temperatur einen kleinen nach innen gerichteten Strom, der linear bis 50°C anstieg (**Fig. 16**). VR1-exprimierende Oozyten wiesen ähnliche Reaktionen bei Temperaturen bis zu 40°C auf, doch oberhalb dieser Schwelle waren ihre Reaktionen deutlich stärker als jene der Vergleiche. Somit stimmt sogar in diesem Nicht-Säugetier-Zusammenhang das VR1-medierte Temperaturreaktionsprofil mit jenem für thermale Nozizeptoren gut überein (Fields, s. o.).

d) Hemmung von VR1-Wärmeaktivierung durch Rutheniumrot

[0215] Um ferner zu ermitteln, ob Wärme spezifisch durch einen Capsaicinrezeptor wirkt, wurde die Fähigkeit von Rutheniumrot, die Wärme-medierte Reaktion zu hemmen, in VR1-exprimierenden Oozyten im oben beschriebenen System getestet. Die Stromspuren in **Fig. 17** wurden anhand repräsentativer VR1- oder Wasser-injizierter Oozyten ($V_{\text{hold}} = -60$ mV) während aufeinander folgender Zufuhren der angegebenen Reize erstellt.

[0216] VR1-injizierte Oozyten wiesen die folgenden mittleren Reaktionen mit nach innen gerichtetem Strom auf ($\pm$ s. e. m.; $n = 5$): Capsaicin ($1 \mu\text{M}$), 1221 ± 148 nA; Wärme (50°C), 2009 ± 134 nA; Wärme plus Rutheniumrot ($10 \mu\text{M}$), 243 ± 47 nA. Die Hemmung durch Rutheniumrot war signifikant ($88 \pm 2\%$, $n = 5$; gepaarter T-Test, $p < 0,0001$). Es wurde keine Verringerung der Stromreaktion beobachtet, wenn aufeinander folgende Wärmepulse in Abwesenheit von Rutheniumrot verabreicht wurden. Wasser-injizierte Oozyten zeigten keine Reaktion auf Capsaicin und viel geringere Reaktionen auf Wärme (338 ± 101 nA, $n = 5$). Rutheniumrot hemmte diese Reaktionen um nur $21 \pm 26\%$ ($n = 5$; gepaarter T-Test, $P < 0,1$).

[0217] Diese Daten belegen, dass VR1 direkt an dieser thermischen Reaktion beteiligt ist; die Zufuhr von Rutheniumrot reduzierte die Reaktion von VR1-exprimierenden Oozyten auf Wärme signifikant ($88 \pm 2\%$; $n = 5$), während die weniger stark ausgeprägte Reaktion in Vergleichszellen um nur $21 \pm 26\%$ reduziert wurde ($n = 5$) (**Fig. 17**). Insgesamt unterstützen diese Beobachtungen klar die Hypothese, dass VR1 durch schädliche, aber nicht harmlose Wärme aktiviert wird.

Beispiel 11: Chromosomale Lokalisation und Isolation des Mäuse-VR1-Gens

[0218] Die chromosomale Lokalisation des Mäuse-VR1-Gens wurde mittels fluoreszierender In-situ-Hybridisierung (FISH) in Einklang mit auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren bestimmt. Zusammenfassend gesagt wurde ein bakterielles künstliches Chromosom, das ein 90–100 kb Insert genomischer Mäuse-DNA, die für Abschnitte des Mäuse-VR1-Gens kodiert, enthielt, durch PCR-Analyse und Southern-Hybridisierung unter Verwendung aus Ratten-VR1 stammender Sonden isoliert. Das Insert wurde mit Digoxigenin markiert und auf Metaphasen-Spreads von Mäuse-Chromosomen aufgebracht. Fluoreszierend markierte Anti-Digoxigenin-Antikörper wurden dann dazu verwendet, die Position auf den Chromosomen zu visualisieren, an die das VR1-Gen hybridisierte.

[0219] Das VR1-Gen wurde bis zur B3-Bande von Mäuse-Chromosom 11 abgebildet, etwa 49% des Wegs von der heterochromatisch-euchromatischen Grenze zum Telomer von Chromosom 11. Diese Region des Mäuse-Chromosoms ist zu Human-Chromosom 17 syntenisch, insbesondere die Regionen 17p11–13, 17pter und 17qter. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich das Human-VR1-Gen innerhalb dieser analogen Regionen auf dem Human-Chromosom befindet.

[0220] Das Mäuse-VR1-Gen wurde gemäß auf dem Gebiet bekannter Verfahren sequenziert. Die Nucleotidsequenz (SEQ.-ID Nr. 10) und die Aminosäuresequenz (SEQ.-ID Nr. 11) von Mäuse-VR1 sind in der nachstehenden Sequenzaufzählung angeführt. Die Ratten- und Mäuse-VR1-Aminosäuresequenzen sind zu mehr als 95% identisch.

Beispiel 12: Identifikation von Capsaicinrezeptor-verwandtem Polypeptid VRRP-1

[0221] Eine Genbank-Datenbanksuche unter Verwendung von VR1 ergab einige Human- und Mäuse-EST-Sequenzen, die VR1 ähnelten. Die Anordnung dieser EST-Sequenzen legte nahe, dass sie alle mit Ausnahme einer (siehe unten) für identische und sehr ähnliche Gene kodieren – ein Indikator dafür, dass sie Fragmente der Human- und Mäuseversionen des VR1-Gens darstellen. In allen analysierten Regionen waren die vorhergesagten Sequenzen der kodierten Mäuse- und Humanproteine miteinander hochgradig identisch, doch nur zu etwa 50% mit dem Ratten-VR1 identisch. Da Mäuse-VR1-Protein dem Ratten-VR1-Protein zu mehr als 50% ähnelt, schlossen die Anmelder daraus, dass diese EST-Sequenzen für Human- und Mäuseversionen eines verwandten Proteins kodieren müssen, das als VRRP-1 bezeichnet wurde. VRRP-1 ist ein Beispiel für die im Schutzbereich der Erfindung enthaltenen Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptide.

[0222] Abschnitte der VRRP-1-Gene aus Mäusegehirn, Rattengehirn und Human-CCRF-CEM-Zellen wurden unter Verwendung von PCR-Primern kloniert (GAC CAG CAA GTA CCT CAC (SEQ.-ID Nr. 12) und C TCC CAT GCA GCC CAG TTT ACT TCC TCC ACC CTG AAG CAC CAG CGC TCA (SEQ.-ID Nr. 13)), die auf dem Konsens von Human- und Mäuse-EST-Sequenzen basierten. Eine Ratten-VRRP-1-cDNA voller Länge wurde aus einer Rattengehirn-cDNA-Bibliothek unter Verwendung des Ratten-PCR-Produkts als radiomarkierte Sonde isoliert. Die Ratten-VRRP-1-cDNA (SEQ.-ID Nr. 3; Aminosäuresequenz SEQ.-ID Nr. 4) ist zu etwa 49% mit Ratten-VR1 auf Aminosäure-Ebene (SEQ.-ID Nr. 2 (Ratten-VR1 und 4 (Ratten-VRRP-1)) und zu 59% auf Nucleotid-Ebene (SEQ.-ID Nr. 1 (Ratten-VR1) und 3 (Ratten-VRRP-1)) identisch.

[0223] VRRP-1 scheint nicht durch Capsaicin oder Wärme aktiviert zu sein. Vorläufige Hinweise deuten dar-

auf hin, dass VRRP-1 möglicherweise mit VR1 in Wechselwirkung steht.

Beispiel 13: Identifikation von Human-Capsaicinrezeptor VR1

[0224] Der Vergleich von VR1 mit VRRP-1 und anderen Sequenzen in der Genbank-Datenbank zeigte, dass VR1 und VRRP-1 viel enger miteinander verwandt sind als andere klonierte Sequenzen – mit einer Ausnahme. Eine einzelne Human-EST-Sequenz (Zugriffsnummer AA321554; SEQ.-ID Nr. 8) aus Human-CCRF-CEM-Lymphzellen kodiert für eine Aminosäuresequenz (SEQ.-ID Nr. 9), die mit der vorhergesagten extremen Carboxy-terminalen Domäne von Ratten-VR1 zu zumindest 71% identisch und ihr zu zumindest 80% ähnelt (Aminosäurereste 774–838 von SEQ.-ID Nr. 2; siehe Region 2 der schematischen Darstellung in **Fig. 18**). Ferner sind Ratten-VR1 (SEQ.-ID Nr. 1) und Human-EST-AA321554 (SEQ.-ID Nr. 8) zu 75% identisch auf Nucleotid-Ebene. Außerdem enthält EST AA321554 ein Stopcodon an der gleichen Position wie das Stopcodon in Ratten-VR1. Im Gegensatz dazu besteht zwar Homologie zwischen einem Abschnitt von EST AA321554 und dem Carboxy-Terminus von Ratten-VRRP-1 (siehe Region 1 in **Fig. 18**), doch das Ratten-VRRP-1-Polypeptid ist kürzer als das Ratten-VR1-Polypeptid und das Protein, aus dem EST AA321554 abgeleitet zu sein scheint. Sogar in Region 1 besteht größere Homologie zwischen Ratten-VR1 und EST AA321554 als zwischen Ratten-VR1 und Ratten-VRRP-1 oder zwischen Ratten-VRRP-1 und EST AA 321554. Daher stellt die Human-EST-Sequenz AA321554 die Humanversion (Ortholog) von Ratten-VR1 dar.

[0225] Es wurden auf der Humansequenz basierende PCR-Primer konstruiert, um dieses Fragment aus cDNA (isoliert aus CCRF-CEM-Zellen oder aus der cDNA sensorischer Humanganglien) zu amplifizieren. Das resultierende Fragment wird als Sonde verwendet, um eine genomische Human-DNA-Bibliothek zu screenen, um eine Human-VR1-cDNA-Sequenz voller Länge aus CCRF-CEM-Zellen oder der cDNA sensorischer Humanganglien zu gewinnen. Unter Verwendung des resultierenden genomischen Human-VR1-Fragments wird die chromosomale Lokalisierung des VR1-Gens durch FISH bestätigt. Die Funktion des Polypeptids, für das durch das Human-VR1-Gen kodiert ist, wird mittels der oben beschriebenen funktionellen Tests bestätigt.

Beispiel 14: Identifikation des Human-Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptids VRRP-1

[0226] Ratten-VRRP-1-Sequenzen wurden dazu verwendet, die Genbank-Datenbank zwecks Identifikation von Capsaicinrezeptor-verwandten Polypeptiden aus anderen Organismen zu screenen. Das Screenen identifizierte mehrere Human- und Mäuse-EST-Sequenzen mit Homologie zu drei getrennten Regionen von Ratten-VRRP-1, welche Regionen als Regionen A, B und C bezeichnet werden. Regionen A, B und C stellen Abschnitte der VRRP-1-Sequenz dar, in denen die für Human- und Mäuse-VRRP-1 kodierenden EST versammelt sind (gelistet von 5' bis 3'). Region A reicht von etwa Rest 580 bis etwa Rest 850; Region B reicht von etwa Nucleotid-Rest 960 bis etwa Rest 1730; und Region C reicht von etwa Nucleotid-Rest 1820 bis etwa Rest 2505 in der Ratten-VRRP-1-Nucleotidsequenz. Eine Zusammenfassung der Human- und Mäuse-EST-Sequenzen, die jeder dieser Regionen entsprechen, findet sich in nachstehender Tabelle:

Tabelle: Ratten-VRRP-1 entsprechende Human- und Mäuse-EST-Sequenzen

	Ratten-VRRP-1-Region A (Genbank-Zugriffsnummer)	Ratten-VRRP-1-Region B (Genbankzugriffsnummer)	Ratten-VRRP-1-Region C (Genbankzugriffsnummer)
Human ESTs	H20025, AA236416, H51393, AA236417, H27879, H50364, N21167, AA461295, N26729, H21490, H49060	AA281349, W44731, N23395, W38665, AA357145, N24224	W92895, T12251, AA304033, N35179, AA281348
Mäuse ESTs	W82502, W53556	AA139413	AA476107, AA015295, AA274980

[0227] Diese Human- und Mäuse-EST-Sequenzen können dazu dienen, eine Konsens-Nucleotidsequenz für jede der Regionen A, B und C zu bestimmen. Die Konsens-Nucleotidsequenzen für Human-VRRP-1 für Region A (SEQ.-ID Nr. 5), Region B (SEQ.-ID Nr. 6) und Region C (SEQ.-ID Nr. 7) sind im nachstehenden Sequenzprotokoll angeführt. Die Konsenssequenzen können dazu dienen, PCR-Sonden zu konstruieren, um ein Fragment zu isolieren, das für VRRP-1 voller Länge kodiert; dies erfolgt mittels auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannter Verfahren.

Beispiel 15: Klonieren und Sequenzieren von Human-VRRP-1

[0228] Die Ratten-VR1-Nucleotid- und -Proteinsequenzen wurden dazu verwendet, die Genbank-Datenbanken auf verwandte Sequenzen zu durchsuchen. Es fanden sich einige EST-Sequenzen, die Homologie zu Ratten-VR1 aufwiesen. Diese stammten aus Human- und Mäusequellen. Diese Sequenzen wurden miteinander und mit Ratten-VR1 ausgerichtet, und es stellte sich heraus, dass alle außer einer der Humansequenzen für das gleiche Protein zu kodieren schien und dass dieses Protein mit dem Protein, für das die Mäusesequenzen kodieren, stark homolog war. Die vorhergesagten Sequenzen dieser Human- und Mäuse-Proteine waren zu etwa 50% mit dem Ratten-VR1-Protein identisch, aber viel enger miteinander verwandt.

[0229] Unter Verwendung der Human- und Mäuse-EST-Sequenzen wurden PCR-Primer konstruiert, die dann auf einer aus Rattengehirn stammenden cDNA verwendet wurden, um ein für den Großteil dieses mutmaßlichen Proteins kodierendes DNA-Fragment zu amplifizieren. Dieses Fragment wurde radiomarkiert und als Hybridisierungssonde verwendet, um eine cDNA voller Länge aus einer Rattengehirn-cDNA-Bibliothek zu isolieren. Die cDNA (Ratten-VRRP-1) kodiert für ein Protein von 761 aa (SEQ.-ID Nr. 3), das zu 49% identisch mit dem Ratten-VR1-Protein und zu 74% identisch mit dem Human-VRRP1-Protein (SEQ.-ID Nr. 23) ist (vorhergesagt anhand verfügbarer EST-Sequenzen). Ratten-VRRP-1-mRNA wird in sensorischen Ganglien und anderen Geweben wie z. B. Gehirn, Rückenmark, Milz, Lunge und Dünndarm exprimiert.

[0230] Die Human- und Mäuse-EST-Sequenzen dienten zur Konstruktion von PCR-Primern, die die Amplifikation der Human-VRRP-1-Sequenz aus einer Human-cDNA-Quelle ermöglichen würden. Unter Einsatz von cDNA aus Human-CCRF-CEM-Zellen wurde ein Fragment der Human-VRRP-1-cDNA amplifiziert und sequenziert, wodurch ihre Identität mit einer Untergruppe der angeführten EST-Sequenzen bestätigt wurde. Anschließend wurden PCR-Primer (gerichtet gegen die 5'- und 3'-Enden der vorhergesagten Human-VRRP-1-Sequenz) dazu verwendet, aus CCRF-CEM-abgeleiteter cDNA eine DNA-Bande von etwa 2500 bp zu amplifizieren; dies ist die korrekte Größe für die Human-cDNA (vorhergesagt anhand der Anordnung der Human-EST-Sequenzen mit Ratten-VRRP-1). Die Human-cDNA wurde dann unter Anwendung auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Standardverfahren sequenziert. Die DNA-Sequenz von Human-VRRP-1 (VR2) ist als SEQ.-ID Nr. 35 bereitgestellt, die abgeleitete Aminosäuresequenz als SEQ.-ID Nr. 36.

Beispiel 16: Klonieren von Hühner-VR1-Homologen

[0231] Degenerierte Oligonucleotide wurden auf der Basis der Aminosäuresequenz von Ratten-VR1 konstruiert. Die Oligonucleotide ODJ3885 und ODJ3887, die VR1-Aminosäureresten 638-644 bzw. 676-682 entsprechen, wurden als Primer für PCR mit genomischer Küken-DNA als Templat verwendet.

ODJ3885 (SEQ ID NO:28) – 5' TT (TC) AA (AG) TT (TC) AC (GATC) AT (ATC) GG (GATC) ATG

ODJ3887 (SEQ ID NO:29) 5' CAT (GATC) A (GA) (GATC) GC (GAT) AT (GATC) A (GA) CAT (AG) TT

[0232] Es ergaben sich Produkte von etwa 130 bp, die dann isoliert und in den Vektor pT-Adv (Clontech) ligiert wurden. Die Inserts in mehreren dieser Plasmidklone wurden sequenziert. Die Produkte aus genomischer Küken-DNA fielen in zwei Klassen:

eines, das auch einem sehr engen Homolog entsprach, und ein anderes, das einem etwas stärker divergierenden Homolog entsprach.

CVR-PCR1 (SEQ ID NO:30)

TTCAAGTTCACGATTGGGATGGGTGACCTGGATTTTCATGAACATGCCAGATTCAGATACTTTGTCATGCTTCTG
CTGCTGCTTTTTGTGATCCTACCTACATCCTTTTGCTCAACATGCTTATAGCCCTTATA

CVR-PCR2 (SEQ ID NO:31)

TTCAAGTTCACGATTGGGATGGGAGACCTGGAGTTTACAGAGAACTACAGGTTCAAGTCTGTGTTTGTATCCTT
TTGGTCTCTATGTCATCCTTACGTACATCCTCCTGCTCAATATGCTTATAGCCCTAATG

[0233] Ein 150 bp großes EcoRI-Fragment mit CVR-PCR2 wurde als Hybridisierungssonde verwendet, um Klone aus einer cDNA-Bibliothek aus RNA zu screenen (isoliert aus Kükenembryonen-Dorsalwurzelganglien (DRG)). Mehrere hybridisierende Plasmide wurden identifiziert. Zwei dieser entsprachen einem wahrscheinlichen Küken-Ortholog von Ratten-VR1. Das Insert eines dieser pCVR2 wurde in seiner Gesamtheit sequenziert (SEQ.-ID Nr. 24). Die abgeleitete Proteinsequenz (SEQ.-ID Nr. 25) zeigt eine Aminosäureidentität mit Ratten-VR1 von 67%. Die Nucleotid-Anordnung der kodierenden Regionen von Ratten- und Küken-VR1-cDNA weist ebenfalls 67 Identität auf. Elektrophysiologische und Calcium-Bildgebungs-Analysen von mit pCVR2 transfizierten HEK293-Zellen zeigen, dass das kodierte Protein auf Protonen und hohe Dosen des Vanilloids, Reiniferatoxin, aber nicht auf Capsaicin und auf Erwärmungs-Arbeitsvorschriften, die Ratten-VR1 aktivieren, reagiert.

Beispiel 17: Klonieren eines Human-Vanilloidrezeptors

[0234] Eine PCR-Reaktion unter Einsatz von ODJ3885 und ODJ3887 mit genomischer Human-DNA als Templat erzeugte ein 130 bp großes Produkt. Diese Bande wurde gereinigt und zu pT-Advkloniert. Die Inserts mehrerer Klone wurden sequenziert, und es stellte sich heraus, dass sie alle für einen sehr engen Homolog oder Ortholog von Ratten-VR1 kodieren. Die Nucleotidsequenz (SEQ.-ID Nr. 26) ist zu 91% mit der entsprechenden Region von Ratten-VR1 identisch. Die abgeleitete Proteinsequenz über diesem 45-Codon-Segment ist mit jener von Ratten-VR1 identisch.

[0235] Unter Anwendung dieser neuen Anordnung wurden zusätzliche PCR-Primer konstruiert, um die Amplifikation größerer Segmente von VR1-homologen Sequenzen aus Human-cDNA-Quellen zu ermöglichen. Die Primer ODJ4018 (entspricht VR1-Aminosäureresten 423–429) und ODJ3767 (stammt aus der Sequenz von Human-EST AA321554) dienten in einer PCR-Reaktion als Templat-cDNA aus Human-DRG.

ODJ4018 (SEQ ID NO:32) 5' TA(TC) TT(TC) AA(TC) TT(TC) TT(TC) GT(GATC) TA 3'

ODJ3767 (SEQ ID NO:33) 5' AAA AGG GGG ACC AGG GC 3'

[0236] Die resultierenden Produkte wurden durch Gel-Elektrophorese getrennt und auf Nylonmembranen zwecks Hybridisierung mit einer 150 bp-Sonde aus der vorherigen PCR-Analyse übertragen. Ein hybridisierendes Fragment von etwa 1100 bp wurde somit identifiziert. Dies ist die Größe, die man aufgrund der Position dieser Primer in der Ratten-VR1-Sequenz erwarten kann.

[0237] Das Fragment wird für die Sequenzanalyse kloniert. Die Daten der resultierenden Sequenz dienen dazu, Primer für das Klonieren einer Human-cDNA voller Länge zu konstruieren, die dieser Sequenz entspricht. Dies erfolgt mittels des RACE PCR-Klonierungsverfahrens (Frohman, M. A. Methods Enzymol. 218, 340–358 (1993)), kann aber auch unter Einsatz von Primern erfolgen, die aus der Sequenz des kleinen PCR-Fragments HVR-PCR1 abgeleitet sind.

Beispiel 18: Klonieren und Sequenzieren eines Human-Vanilloidrezeptors (VR1)

[0238] Um Sequenzen zu erhalten, die dem Human-Ortholog von Ratten-VR1 entsprechen, wurde ein Segment genomischer Human-DNA identifiziert, das in hVR-PVR1 vorhandene Sequenzen enthielt. Diese genomische DNA wurde aus einer Bibliothek von BAC-Plasmidklonen isoliert, die große Segmente genomischer Human-DNA enthielt (Shizuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8794–8797 (1992); Produkt von Genomic Systems, Inc.); dies erfolgte mittels Oligonucleotid-PCR-Primern, die aus der für hVR-PVR1 bestimmten Sequenz abgeleitet waren. PCR-Reaktionen unter Verwendung von Oligonucleotiden ODJ4079 (GGCGACCTG-GAGTTCACTGAG (SEQ.-ID Nr. 37)) und ODJ4080 (GAGCAGGAGGATGTAGGTGAG (SEQ.-ID Nr. 38)) als Primer sowie unter Verwendung von genomischer Human-DNA als Templat führte zum erwarteten 92 bp-Produkt. Ein Produkt der gleichen Größe wurde auch unter Einsatz von cDNA aus CCRF-CEM als Templat erhalten – es handelt sich hier um eine Human-Zelllinie, aus der die EST-Sequenz Nr. 24046 stammt. Diese EST-Sequenz schien mit einem engen Homolog oder Ortholog von Ratten-VR1 übereinzustimmen.

[0239] Unter Verwendung dieser Primer zum Screenen einer Human-BAC-Bibliothek durch PCR lieferte Genomes Systems zwei BAC-Plasmidklone 20614 und 20615.

[0240] Diese zwei Klone wurden durch Restriktionsverdau und Southern-Blotting mittels der oben beschriebenen VR1-Hybridisierungssonden weiter analysiert. Die Kontrolle des Musters der Restriktionsfragmente unter Verwendung mehrerer unterschiedlicher Restriktions-Endonucleasen zeigte, dass diese zwei Klone wahrscheinlich identisch waren. Um zu bestätigen, dass diese Plasmide tatsächlich VR1-verwandte Sequenzen enthielten, wurden Southern-Blots aus diesen Verdauen hybridisiert und mit unterschiedlichen VR1-Hybridisierungssonden inkubiert. Die Blots wurden zunächst an ein ³²P-markiertes 150 bp EcoRI-Fragment aus hVR-PCR1 hybridisiert. Ein einzelnes Fragment aus jedem Verdau hybridisierte mit dieser Sonde.

[0241] Im Fall eines PstI-Verdaus besaß das hybridisierende Fragment eine Größe von etwa 250 bp. Die Produkte des PstI-Verdaus dieses BAC-Plasmids wurden in PstI-verdauten pBluescriptSK+ ligiert. Die resultierenden Ligationsprodukte dienten zum Transformieren von Zellen des E.-coli-Stamms DH5α. Die resultierenden Transformanten wurden durch Hybridisierung mit der gleichen hVR-PCR1-Sonde gescreent. Das Insert eines dieser Klone, hVR1-P1, wurde sequenziert. Die Ergebnisse zeigten, dass es große Ähnlichkeit mit Ratten-VR1 aufwies und hVR-PCR1 entsprach. Die Anordnung des Exon-Abschnitts dieses Inserts mit rVR1-cDNA ist nachstehend dargestellt.


```

hVR1-P1: 1      ctgcagcttcagatgttcttgcctcctgtgcgatcttggtgacagtctcaccatgag
            |||
rVR1:      2180 ctgcagcttcagatgttcttgcctcctgtgcaatcttggtgacggtctcaccatgag

hVR1-P1: 61     ggcgatgagcatggtgagcaggaggatgtagggtgagaattacataggccagcagcaggat
            ||
rVR1:      2120 agcaatgagcatggtgagcagaaggatgtagggtgagaatcacataggccagtaacaggat

hVR1-P1: 121    gatgaagacagccttgaagtcatagttctcagtgaactccaggtcgcccatgccgatggt
            |||
rVR1:      2060 gatgaagacagccttgaagtcgtagttctcagtgaactccaggtcgcccatgccgatggt

hVR1-P1: 181    gaacttgaacagctccaggcaggtggagtacaggctggtgtaggag (SEQ ID NO:39)
            |||
rVR1:      2000 gaacttgaacagctccagacatgtggaatacaggctggtgtaagag (SEQ ID NO:40)

```

[0242] Um VR-1-verwandte Sequenzen auf diesem BAC-Plasmidinsert weiter zu lokalisieren, wurden Southern-Blots unter Einsatz eines 1008 bp großen NheI-Fragments aus der rVR1-cDNA als Hybridisierungs-sonde durchgeführt. Dieses Fragment enthält fast den gesamten 5'-Abschnitt der rVR1-Kodiersequenz. In diesem Fall erzeugte jeder Verdau ein oder mehrere Fragmente, die stark mit dieser Sonde hybridisierten. Insbesondere lieferte der HindIII-Verdau zwei Hybridisierungsfragmente von etwa 12 kbp und 18 kbp. Das 18 kbp große Fragment hybridisierte auch mit der hVR-PCR1-Sonde – ein Indikator dafür, dass das 12 kbp-Fragment wahrscheinlich das 5'-Ende der für hVR1 kodierenden Region enthielt. Diese Fragmente wurden zwecks weiterer Analyse in pBluescriptSK+ subkloniert. Man erhielt drei resultierende Klone. Die Klonen hVR1-H1 und hVR1-H2 enthielten das 12 kbp-Fragment, das in entgegengesetzten Orientierungen inseriert war. Klon hVR1-N3 enthielt ein 18 kbp Insert. Die Sequenzreaktionen unter Verwendung von aus Vektor stammenden Primern lieferten keine VR1-verwandten Sequenzen, was nahe legt, dass diese Endsegmente entweder Introns oder 5'- oder 3'-flankierenden Sequenzen entsprachen. Eine Sequenzierreaktion von hVR1-H3 unter Verwendung des Primers CCRF2, der aus der EST-24046-Sequenz stammte, wurde ebenfalls durchgeführt. Die resultierenden Sequenzdaten zeigten, dass hVR1-H3 VR1-verwandte Sequenz enthielt, die mit der in EST24046 vorhandenen identisch zu sein schien. Die Anordnung dieser zwei Sequenzen ist nachstehend dargestellt.

```

HVR1-H3: 1      aagacctcagcgctcctctggcttcagagaccctgnaaaaactgtcgcagataaaacttcctc
            |||
EST24046:168 aagacctcagcgctcctctggcttcagagaccctg-aaaaactgtcgcagataaaacttcctc

HVR1-H3: 61     gggctgagcanactgcctatctcgagcacttgccctctcttaaaagggggaccagggcaaa
            |||
EST24046: 109 gggctgagcagactgcctatntcgagnacttgccctctcttaaaagggggaccagggcaaa

HVR1-H3: 121    gttcttccagtgtctgcctgaaact 145 (SEQ ID NO:41)
            |||
EST24046: 49    gttcttccagtgtctgcctgaaact 25 (SEQ ID NO:42)

```

[0243] Um Sequenzen am 5'-Ende der kodierenden Human-VR1-Region im genomischen Klon zu identifizieren, wurde ein 1500 bp-BamHI-Fragment aus hVR1-H1 in pBluescriptSK+ subkloniert. Das Insert in einem der resultierenden Klone, hVR1-B2, wurde unter Einsatz von Vektor-basierten Primern (T3 und T7) sequenziert. Die Sequenz aus einem Ende dieses Klons wies – wie sich dies in der Nucleotid-Anordnung oder im Anordnungsvergleich der abgeleiteten Proteinsequenz dieses Klons mit jener von rVR1 zeigte – eine VR1-verwandte Sequenz auf. Die Kontrolle dieser nachstehend angeführten Anordnungen ergab, dass der translationelle Beginn der kodierenden hVR1-Region wahrscheinlich an Position 14 dieser Sequenz angeordnet ist.

```

HVR1-B2: 55  cccactccaaaaggacacctgccagacccccctggatggagaccctaactccaggccacc
              ||||| |||| | | || ||||| |||| | | || ||||| |||| | | |||||
rVR1:      122 cccaccccaagagaactcctgcctggaccctccagacagagaccctaactgcaagccacc

HVR1-B2: 115  tccagccaagccccagctctccacggccaagagccgcacccggctctttgggaaggggtga
              ||||| ||||| |||| | | || |||| | | ||||| ||||| ||||| |||||
rVR1:      182  tccagtcaagccccacatcttactaccaggagtcgtacccggctttttgggaaggggtga

HVR1-B2: 175  ctccggaggaggctttcccggtggattgccctcacgaggaaggtgagctggactcctgcc
              ||||| ||||| |||| | | |||| | | ||||| |||| | ||||| |||||
rVR1:      242  ctccggaggaggcctctccctggactgcccttatgaggaaggcgggctggcttctgcc

HVR1-B2: 235  gaccatcacagtcagccctgttatcaccatccagaggcc 273 (SEQ ID NO:44)
              | ||||| ||||| |||| | | ||||| |||||
rVR1:      302  tatcatcactgtcagctctgttctaactatccagaggcc 340 (SEQ ID NO:45)

HVR1-B2: 14   MKKWSSTD LGAAADPLQKDTCPDPLDGPNSRPPPAKPQLSTAKSRTRLFGKGDSEEAFF
              M++ +S D  +  P Q+++C DP D DPN +PPP KP +  T +SRTRLFGKGDSEEA P
rVR1:      1   MEQRASLDSEESPPQENSCLDPPDRDPNCKPPPVKPHIFTTSRTRLFGKGDSEEA SP

HVR1-B2: 194  VDCPHEEGELDSCPTITVSPVITIQRPRXRP 286 (SEQ ID NO:45)
              +DCP+EEG L SCP ITVS V+TIQRF  P
rVR1:      61  LDCPYEEGGLASCPITVSSVLTIQRPGDGP 91 (SEQ ID NO:46)

```

[0244] Unter Verwendung dieser Sequenzinformation wurden zwei Primer konstruiert, um die Produktion einer Human-VR1-cDNA unter Einsatz von RT-PCR aus polyA+-RNA (isoliert aus der CCRF-CEM-Zelllinie) zu ermöglichen. Die zwei Primer ODJ4157 (AGAAATGGAGCAGCACAGACTTGG) (SEQ.-ID Nr. 47) und ODJ4162 (TCACTTCTCCCCGGAAGCGGCAG) (SEQ.-ID Nr. 48) wurden als Primer in einer PCR-Reaktion mit CCRF-DEM-cDNA als Templat verwendet. Ein Produkt von etwa 2500 bp war das Ergebnis dieser Reaktion. Southern-Blot-Analyse dieses Produkts mittels einer hVR-PCR1-Hybridisierungssonde ergab, dass dieses Produkt tatsächlich VR1-verwandt war. Das Produkt wurde durch präparative Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und in den Vektor pT-Adv (Clontech) subkloniert. Mehrere Klone wurden isoliert und vier davon DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Die resultierende DNA-Sequenz von Human-VR1 ist als SEQ.-ID Nr. 33 bereitgestellt, die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz als SEQ.-ID Nr. 34.

[0245] Alle hierin angeführten Veröffentlichungen und Patente sind durch Verweis aufgenommen. Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung sind verschiedene Modifikationen und Variationen des beschriebenen Systems und Verfahren der Erfindung bekannt, ohne vom Schutzzumfang und Geist der Erfindung abzuweichen. Obwohl die Erfindung unter Bezugnahme auf konkrete bevorzugte Ausführungsformen beschrieben wurde, ist zu beachten, dass die hierin beanspruchte Erfindung nicht unzulässig auf diese spezifischen Ausführungsformen beschränkt ist. Es sind verschiedene Modifikationen der beschriebenen Durchführungsarten der Erfindung für Fachleute auf dem Gebiet der Molekularbiologie oder verwandten Gebieten offenkundig und im Schutzzumfang der nun folgenden Patentansprüche enthalten.

[0246] Vor einer Beschreibung der vorliegenden Nucleotid- und Polypeptidsequenzen ist zu beachten, dass die Erfindung keinesfalls auf die hierin angeführten Methodologien, Arbeitsvorschriften, Zelllinien, Vektoren und Reagenzien beschränkt ist, die alle natürlich variieren können. Es ist ferner zu beachten, dass die hierin verwendete Terminologie nur der Beschreibung bestimmter Ausführungsformen dient und keinesfalls den Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung einschränkt, der nur durch die beiliegenden Patentansprüche eingeschränkt ist.

[0247] Zu betonen ist außerdem, dass sich die hierin und in den Ansprüchen verwendeten Artikel wie „ein“, „eine“ oder „eines“ bzw. „der“, „die“ und „das“ – sofern nicht anders angeführt – auf mehrere damit bezeichnete Dinge beziehen. Somit bezieht sich der Ausdruck „eine Wirtszelle“ auch auf eine Vielzahl solcher Wirtszellen, und der Ausdruck „der Antikörper“ bezieht sich auch auf einen oder mehrere Antikörper oder Äquivalente davon, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind.

[0248] Sofern nicht anders definiert, besitzen alle hierin erwähnten fachlichen und wissenschaftlichen Ausdrücke jene Bedeutung, die von Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung gemeinhin verstanden wird. Obwohl beliebige Verfahren, Vorrichtungen und Materialien, die den hierin erläuterten ähneln oder entsprechen, in der praktischen Durchführung der Erfindung zum Einsatz kommen können, werden nun die bevorzugten Verfahren, Vorrichtungen und Materialien beschrieben.

[0249] Alle hierin angeführten Publikationen sind durch Verweis aufgenommen, um z. B. die Zelllinien, Vektoren und Methodologien zu beschreiben und zu offenbaren, die in den Publikationen erläutert werden und sich im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung als geeignet erweisen könnten. Die hierin besprochenen Veröffentlichungen sind nur aufgrund ihrer Offenbarung vor dem Einreichdatum der vorliegenden Anmeldung

angeführt. Nichts hierin darf als Eingeständnis aufgefasst werden, dass die Anmelder nicht dazu berechtigt wären, eine solche Offenbarung aufgrund einer früheren Erfindung mit einem früheren Datum zu versehen.

Sequenzprotokoll

<110> Julius, David J.
Caterina, Michael J.
Brake, Anthony J.

<120> NUCLEIC ACID SEQUENCES ENCODING
CAPSAICIN RECEPTOR AND CAPSAICIN RECEPTOR-RELATED
POLYPEPTIDES AND USES THEREOF

<130> 9076/084PCT

<140> Unassigned

<141> 1999-01-22

<150> 60/072,151

<151> 1998-01-22

<160> 48

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2880

<212> DNA

<213> R. rattus

<220>

<221> CDS

<222> (81)...(2594)

<223> VR1 capsaicin receptor

<400> 1

```

cagctccaag gcacttgctc catttggggt gtgcctgcac ctagctgggt gcaaattggg      60
ccacagagga tctggaaagg atg gaa caa cgg gct agc tta gac tca gag gag      113
                Met Glu Gln Arg Ala Ser Leu Asp Ser Glu Glu
                  1                5                10

tct gag tcc cca ccc caa gag aac tcc tgc ctg gac cct cca gac aga      161
Ser Glu Ser Pro Pro Gln Glu Asn Ser Cys Leu Asp Pro Pro Asp Arg
                15                20                25

gac cct aac tgc aag cca cct cca gtc aag ccc cac atc ttc act acc      209
Asp Pro Asn Cys Lys Pro Pro Pro Val Lys Pro His Ile Phe Thr Thr
                30                35                40

agg agt cgt acc cgg ctt ttt ggg aag ggt gac tcg gag gag gcc tct      257
Arg Ser Arg Thr Arg Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Ser
                45                50                55

ccc ctg gac tgc cct tat gag gaa ggc ggg ctg gct tcc tgc cct atc      305
Pro Leu Asp Cys Pro Tyr Glu Glu Gly Gly Leu Ala Ser Cys Pro Ile
                60                65                70                75

```

atc act gtc agc tct gtt cta act atc cag agg cct ggg gat gga cct Ile Thr Val Ser Ser Val Leu Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro	353
80 85 90	
gcc agt gtc agg ccg tca tcc cag gac tcc gtc tcc gct ggt gag aag Ala Ser Val Arg Pro Ser Ser Gln Asp Ser Val Ser Ala Gly Glu Lys	401
95 100 105	
ccc ccg agg ctc tat gat cgc agg agc atc ttc gat gct gtg gct cag Pro Pro Arg Leu Tyr Asp Arg Arg Ser Ile Phe Asp Ala Val Ala Gln	449
110 115 120	
agt aac tgc cag gag ctg gag agc ctg ctg ccc ttc ctg cag agg agc Ser Asn Cys Gln Glu Leu Glu Ser Leu Leu Pro Phe Leu Gln Arg Ser	497
125 130 135	
aag aag cgc ctg act gac agc gag ttc aaa gac cca gag aca gga aag Lys Lys Arg Leu Thr Asp Ser Glu Phe Lys Asp Pro Glu Thr Gly Lys	545
140 145 150 155	
acc tgt ctg cta aaa gcc atg ctc aat ctg cac aat ggg cag aat gac Thr Cys Leu Leu Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asn Gly Gln Asn Asp	593
160 165 170	
acc atc gct ctg ctc ctg gac gtt gcc cgg aag aca gac agc ctg aag Thr Ile Ala Leu Leu Leu Asp Val Ala Arg Lys Thr Asp Ser Leu Lys	641
175 180 185	
cag ttt gtc aat gcc agc tac aca gac agc tac tac aag ggc cag aca Gln Phe Val Asn Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln Thr	689
190 195 200	
gca ctg cac att gcc att gaa cgg cgg aac atg acg ctg gtg acc ctc Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Thr Leu Val Thr Leu	737
205 210 215	
ttg gtg gag aat gga gca gat gtc cag gct gcg gct aac ggg gac ttc Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala Asn Gly Asp Phe	785
220 225 230 235	
ttc aag aaa acc aaa ggg agg cct ggc ttc tac ttt ggt gag ctg ccc Phe Lys Lys Thr Lys Gly Arg Pro Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro	833
240 245 250	
ctg tcc ctg gct gcg tgc acc aac cag ctg gcc att gtg aag ttc ctg Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Leu Ala Ile Val Lys Phe Leu	881
255 260 265	
ctg cag aac tcc tgg cag cct gca gac atc agc gcc cgg gac tca gtg Leu Gln Asn Ser Trp Gln Pro Ala Asp Ile Ser Ala Arg Asp Ser Val	929
270 275 280	

ggc aac acg gtg ctt cat gcc ctg gtg gag gtg gca gat aac aca gtt Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Val 285 290 295	977
gac aac acc aag ttc gtg aca agc atg tac aac gag atc ttg atc ctg Asp Asn Thr Lys Phe Val Thr Ser Met Tyr Asn Glu Ile Leu Ile Leu 300 305 310 315	1025
ggg gcc aaa ctc cac ccc acg ctg aag ctg gaa gag atc acc aac agg Gly Ala Lys Leu His Pro Thr Leu Lys Leu Glu Glu Ile Thr Asn Arg 320 325 330	1073
aag ggg ctc acg cca ctg gct ctg gct gct agc agt ggg aag atc ggg Lys Gly Leu Thr Pro Leu Ala Leu Ala Ala Ser Ser Gly Lys Ile Gly 335 340 345	1121
gtc ttg gcc tac att ctc cag agg gag atc cat gaa ccc gag tgc cga Val Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Arg Glu Ile His Glu Pro Glu Cys Arg 350 355 360	1169
cac cta tcc agg aag ttc acc gaa tgg gcc tat ggg cca gtg cac tcc His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Ala Tyr Gly Pro Val His Ser 365 370 375	1217
tcc ctt tat gac ctg tcc tgc att gac acc tgt gaa aag aac tcg gtt Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Cys Ile Asp Thr Cys Glu Lys Asn Ser Val 380 385 390 395	1265
ctg gag gtg atc gct tac agc agc agt gag acc cct aac cgt cat gac Leu Glu Val Ile Ala Tyr Ser Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His Asp 400 405 410	1313
atg ctt ctc gtg gaa ccc ttg aac cga ctc cta cag gac aag tgg gac Met Leu Leu Val Glu Pro Leu Asn Arg Leu Leu Gln Asp Lys Trp Asp 415 420 425	1361
aga ttt gtc aag cgc atc ttc tac ttc aac ttc ttc gtc tac tgc ttg Arg Phe Val Lys Arg Ile Phe Tyr Phe Asn Phe Phe Val Tyr Cys Leu 430 435 440	1409
tat atg atc atc ttc acc gcg gct gcc tac tat cgg cct gtg gaa ggc Tyr Met Ile Ile Phe Thr Ala Ala Ala Tyr Tyr Arg Pro Val Glu Gly 445 450 455	1457
ttg ccc ccc tat aag ctg aaa aac acc gtt ggg gac tat ttc cga gtc Leu Pro Pro Tyr Lys Leu Lys Asn Thr Val Gly Asp Tyr Phe Arg Val 460 465 470 475	1505
acc gga gag atc ttg tct gtg tca gga gga gtc tac ttc ttc ttc cga Thr Gly Glu Ile Leu Ser Val Ser Gly Gly Val Tyr Phe Phe Phe Arg 480 485 490	1553
ggg att caa tat ttc ctg cag agg cga cca tcc ctc aag agt ttg ttt Gly Ile Gln Tyr Phe Leu Gln Arg Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu Phe 495 500 505	1601

gtg gac agc tac agt gag ata ctt ttc ttt gta cag tcg ctg ttc atg Val Asp Ser Tyr Ser Glu Ile Leu Phe Phe Val Gln Ser Leu Phe Met 510 515 520	1649
ctg gtg tct gtg gta ctg tac ttc agc caa cgc aag gag tat gtg gct Leu Val Ser Val Val Leu Tyr Phe Ser Gln Arg Lys Glu Tyr Val Ala 525 530 535	1697
tcc atg gtg ttc tcc ctg gcc atg ggc tgg acc aac atg ctc tac tat Ser Met Val Phe Ser Leu Ala Met Gly Trp Thr Asn Met Leu Tyr Tyr 540 545 550 555	1745
acc cga gga ttc cag cag atg ggc atc tat gct gtc atg att gag aag Thr Arg Gly Phe Gln Gln Met Gly Ile Tyr Ala Val Met Ile Glu Lys 560 565 570	1793
atg atc ctc aga gac ctg tgc cgg ttt atg ttc gtc tac ctc gtg ttc Met Ile Leu Arg Asp Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr Leu Val Phe 575 580 585	1841
ttg ttt gga ttt tcc aca gct gtg gtg aca ctg att gag gat ggg aag Leu Phe Gly Phe Ser Thr Ala Val Val Thr Leu Ile Glu Asp Gly Lys 590 595 600	1889
aat aac tct ctg cct atg gag tcc aca cca cac aag tgc cgg ggg tct Asn Asn Ser Leu Pro Met Glu Ser Thr Pro His Lys Cys Arg Gly Ser 605 610 615	1937
gcc tgc aag cca ggt aac tct tac aac agc ctg tat tcc aca tgt ctg Ala Cys Lys Pro Gly Asn Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Ser Thr Cys Leu 620 625 630 635	1985
gag ctg ttc aag ttc acc atc ggc atg ggc gac ctg gag ttc act gag Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu 640 645 650	2033
aac tac gac ttc aag gct gtc ttc atc atc ctg tta ctg gcc tat gtg Asn Tyr Asp Phe Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val 655 660 665	2081
att ctc acc tac atc ctt ctg ctc aac atg ctc att gct ctc atg ggt Ile Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly 670 675 680	2129
gag acc gtc aac aag att gca caa gag agc aag aac atc tgg aag ctg Glu Thr Val Asn Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu 685 690 695	2177
cag aga gcc atc acc atc ctg gat aca gag aag agc ttc ctg aag tgc Gln Arg Ala Ile Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys 700 705 710 715	2225

atg agg aag gcc ttc cgc tct ggc aag ctg ctg cag gtg ggg ttc act 2273
Met Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Phe Thr
720 725 730

cct gac ggc aag gat gac tac cgg tgg tgt ttc agg gtg gac gag gta 2321
Pro Asp Gly Lys Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val
735 740 745

aac tgg act acc tgg aac acc aat gtg ggt atc atc aac gag gac cca 2369
Asn Trp Thr Thr Trp Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro
750 755 760

ggc aac tgt gag ggc gtc aag cgc acc ctg agc ttc tcc ctg agg tca 2417
Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser
765 770 775

ggc cga gtt tca ggg aga aac tgg aag aac ttt gcc ctg gtt ccc ctt 2465
Gly Arg Val Ser Gly Arg Asn Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu
780 785 790 795

ctg agg gat gca agc act cga gat aga cat gcc acc cag cag gaa gaa 2513
Leu Arg Asp Ala Ser Thr Arg Asp Arg His Ala Thr Gln Gln Glu Glu
800 805 810

gtt caa ctg aag cat tat acg gga tcc ctt aag cca gag gat gct gag 2561
Val Gln Leu Lys His Tyr Thr Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu
815 820 825

gtt ttc aag gat tcc atg gtc cca ggg gag aaa taatggacac tatgcaggga 2614
Val Phe Lys Asp Ser Met Val Pro Gly Glu Lys
830 835

tcaatgcggg gtctttgggt ggtctgctta gggaaccagc agggttgacg ttatctgggt 2674
ccactctgtg cctgcctagg cacattccta ggacttcggc gggcctgctg tgggaactgg 2734
gaggtgtgtg ggaattgaga tgtgtatcca accatgatct ccaaacattt ggctttcaac 2794
tctttatgga ctttattaaa cagagtgaat ggcaaatctc tacttggaca cataaaaaaa 2854
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2880

<210> 2

<211> 838

<212> PRT

<213> R. rattus

<400> 2

Met Glu Gln Arg Ala Ser Leu Asp Ser Glu Glu Ser Glu Ser Pro Pro
1 5 10 15
Gln Glu Asn Ser Cys Leu Asp Pro Pro Asp Arg Asp Pro Asn Cys Lys
20 25 30
Pro Pro Pro Val Lys Pro His Ile Phe Thr Thr Arg Ser Arg Thr Arg
35 40 45
Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Ser Pro Leu Asp Cys Pro
50 55 60
Tyr Glu Glu Gly Gly Leu Ala Ser Cys Pro Ile Ile Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

Val	Leu	Thr	Ile	Gln	Arg	Pro	Gly	Asp	Gly	Pro	Ala	Ser	Val	Arg	Pro	85	90	95
Ser	Ser	Gln	Asp	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	Glu	Lys	Pro	Pro	Arg	Leu	Tyr	100	105	110
Asp	Arg	Arg	Ser	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Ala	Gln	Ser	Asn	Cys	Gln	Glu	115	120	125
Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	Pro	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Lys	Lys	Arg	Leu	Thr	130	135	140
Asp	Ser	Glu	Phe	Lys	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Lys	Thr	Cys	Leu	Leu	Lys	145	150	155
Ala	Met	Leu	Asn	Leu	His	Asn	Gly	Gln	Asn	Asp	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	165	170	175
Leu	Asp	Val	Ala	Arg	Lys	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Gln	Phe	Val	Asn	Ala	180	185	190
Ser	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Gln	Thr	Ala	Leu	His	Ile	Ala	195	200	205
Ile	Glu	Arg	Arg	Asn	Met	Thr	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Val	Glu	Asn	Gly	210	215	220
Ala	Asp	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	Gly	Asp	Phe	Phe	Lys	Lys	Thr	Lys	225	230	235
Gly	Arg	Pro	Gly	Phe	Tyr	Phe	Gly	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	245	250	255
Cys	Thr	Asn	Gln	Leu	Ala	Ile	Val	Lys	Phe	Leu	Leu	Gln	Asn	Ser	Trp	260	265	270
Gln	Pro	Ala	Asp	Ile	Ser	Ala	Arg	Asp	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Val	Leu	275	280	285
His	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Asp	Asn	Thr	Val	Asp	Asn	Thr	Lys	Phe	290	295	300
Val	Thr	Ser	Met	Tyr	Asn	Glu	Ile	Leu	Ile	Leu	Gly	Ala	Lys	Leu	His	305	310	315
Pro	Thr	Leu	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Asn	Arg	Lys	Gly	Leu	Thr	Pro	325	330	335
Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Lys	Ile	Gly	Val	Leu	Ala	Tyr	Ile	340	345	350
Leu	Gln	Arg	Glu	Ile	His	Glu	Pro	Glu	Cys	Arg	His	Leu	Ser	Arg	Lys	355	360	365
Phe	Thr	Glu	Trp	Ala	Tyr	Gly	Pro	Val	His	Ser	Ser	Leu	Tyr	Asp	Leu	370	375	380
Ser	Cys	Ile	Asp	Thr	Cys	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Ala	385	390	395
Tyr	Ser	Ser	Ser	Glu	Thr	Pro	Asn	Arg	His	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Glu	405	410	415
Pro	Leu	Asn	Arg	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Trp	Asp	Arg	Phe	Val	Lys	Arg	420	425	430
Ile	Phe	Tyr	Phe	Asn	Phe	Phe	Val	Tyr	Cys	Leu	Tyr	Met	Ile	Ile	Phe	435	440	445
Thr	Ala	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Glu	Gly	Leu	Pro	Pro	Tyr	Lys	450	455	460
Leu	Lys	Asn	Thr	Val	Gly	Asp	Tyr	Phe	Arg	Val	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu	465	470	475
Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Val	Tyr	Phe	Phe	Phe	Arg	Gly	Ile	Gln	Tyr	Phe	485	490	495
Leu	Gln	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu	Phe	Val	Asp	Ser	Tyr	Ser	500	505	510

Glu Ile Leu Phe Phe Val Gln Ser Leu Phe Met Leu Val Ser Val Val
 515 520 525
 Leu Tyr Phe Ser Gln Arg Lys Glu Tyr Val Ala Ser Met Val Phe Ser
 530 535 540
 Leu Ala Met Gly Trp Thr Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln
 545 550 555 560
 Gln Met Gly Ile Tyr Ala Val Met Ile Glu Lys Met Ile Leu Arg Asp
 565 570 575
 Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr Leu Val Phe Leu Phe Gly Phe Ser
 580 585 590
 Thr Ala Val Val Thr Leu Ile Glu Asp Gly Lys Asn Asn Ser Leu Pro
 595 600 605
 Met Glu Ser Thr Pro His Lys Cys Arg Gly Ser Ala Cys Lys Pro Gly
 610 615 620
 Asn Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Glu Leu Phe Lys Phe
 625 630 635 640
 Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu Asn Tyr Asp Phe Lys
 645 650 655
 Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val Ile Leu Thr Tyr Ile
 660 665 670
 Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Asn Lys
 675 680 685
 Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu Gln Arg Ala Ile Thr
 690 695 700
 Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys Met Arg Lys Ala Phe
 705 710 715 720
 Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Phe Thr Pro Asp Gly Lys Asp
 725 730 735
 Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn Trp Thr Thr Trp
 740 745 750
 Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu Gly
 755 760 765
 Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser Gly Arg Val Ser Gly
 770 775 780
 Arg Asn Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Asp Ala Ser
 785 790 795 800
 Thr Arg Asp Arg His Ala Thr Gln Gln Glu Glu Val Gln Leu Lys His
 805 810 815
 Tyr Thr Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Asp Ser
 820 825 830
 Met Val Pro Gly Glu Lys
 835

<210> 3

<211> 2736

<212> DNA

<213> R. rattus

<220>

<400> 3

```

ggcgttaaacc ctgctctgtc cactgtgtga gacgaacagg tggaggggtgg acgacgcaga      60
gaaagctcgg agcggggccgc ggaggttccc acagcccat tactgtcagc gttgagccgc      120
acctctccgg gccgcacttc ctctctcagt ccccgctgcc ggagagcccc gctaggctcg      180
gtgatcctag cctgcagttt gccgcgccta caccttggtc tcagcctgcg gggccccagc      240

```

```

caggcctgcc cctgcggtat gagagaggaa ccttaacatc tccatctcta cagaggtttc 300
agctgtaagg agcatcctcc tctctcagga tgacttcagc ctccagcccc ccagctttca 360
ggctggagac ttccgatgga gatgaagagg gcaatgctga ggtgaacaag gggaagcagg 420
aaccgcccc catggagtca ccattccaga gggaggaccg gaattcctcc ctcagatca 480
aagtgaacct caacttcata aagagacctc ctaaaaacac ttctgctccc agccagcagg 540
agccagatcg ytttgaccgt gaccgactct tcagtgtggt ctcccggggt gtccccgagg 600
aactgactgg actgctagaa tacctgcgct ggaacagcaa gtacctcact gactctgcat 660
acacagaagg ctccactgga aagacgtgcc tgatgaaggc tgtgctgaac cttcaggatg 720
gggtcaatgc ctgcatcatg ccgctgctgc agattgacaa ggattccggc aatcccaagc 780
ccctcgtcaa tgcccagtgc accgatgagt tctaccaagg ccacagtgcg ctgcacatcg 840
ccatagagaa gaggagcctg cagtgcgtga agctgctggt agagaatgga gcggatgttc 900
acctccgagc ctgtggccgc ttcttccaaa agcaccaagg aacttgtttc tattttggag 960
agctacctct ttctctggct gcgtgcacca agcagtggga tgtggtgacc tacctcctgg 1020
agaaccaca ccagccggcc agcctggagg ccaccgactc cctgggcaac acagtcctgc 1080
atgctctggt aatgattgca gacaactcgc ctgagaacag tgccctgggtg atccacatgt 1140
acgacgggct tctacaaatg ggggcgcgcc tctgccccac tgtgcagctt gaggaaatct 1200
ccaaccacca aggcctcaca cccctgaaac tagccgccaa ggaaggcaaa atcgagattt 1260
tcaggcacat tctgcagcgg gaattctcag gaccgtacca gcccctttcc cgaaagttaa 1320
ctgagtgggtg ttacggctct gtgcgggtat cgctgtacga cctgtcctct gtggacagct 1380
gggaaaagaa ctcggtgctg gagatcatcg cttttcattg caagagcccc aaccggcacc 1440
gcatggtggt tttagaacca ctgaacaagc ttctgcagga gaaatgggat cggctcgtct 1500
caagattctt cttcaacttc gcctgctact tggctctacat gttcatcttc accgtcgttg 1560
cctaccacca gccttcctct gatcagccag ccacccctc atcaaaagcg acttttgggg 1620
aatccatgct gctgctgggc cacattctga tctgcttgg gggatattac ctcttactgg 1680
gccagctgtg gtacttttgg cggcggcgcc tgtttatctg gatctcattc atggacagct 1740
actttgaaat cctctttctc cttcaggctc tgctcacagt gctgtcccag gtgctgcgct 1800
tcatggagac tgaatggtac ctaccctcgc tagtgttatc cctagtgtctg ggctggctga 1860
acctgcttta ctacacacgg ggctttcagc acacaggcat ctacagtgtc atgatccaga 1920
aggatcatct tcgagacctg ctccgtttct tgctgggtcta cctgggtctc cttttcggct 1980
ttgctgtagc cctagtaagc ttgagcagag agggccgaag tcccaaagcc cctgaagata 2040
acaactccac agtgacggaa cagcccacgg tgggccagga ggaggagcca gctccatctc 2100
ggagcattct ggatgcctcc cttagagctgt tcaagttcac cattgggatg ggggagctgg 2160
ctttccagga acagctgcgt tttcgtgggg tggtcctgct gttgctgttg gcctacgtcc 2220
ttctcaccta cgtcctgctg ctcaacatgc tcattgctct catgagcgaa actgtcaacc 2280
acgttgctga caacagctgg agcatctgga agttgcagaa agccatctct gtcttgga 2340
tggaagaatg ttactgggtg tgccggagga agaaacatcg tgaagggagg ctgctgaaag 2400
tcggcaccag gggggatggt acccctgatg agcgtggtg cttcagggtg gaggaagtaa 2460
attgggctgc ttgggagaag actcttccca ccttatctga ggatccatca gggccaggca 2520
tactggtaa taaaaagaac ccaacctcta aaccggggaa gaacagtgcc tcagaggaag 2580
accatctgcc ctttcaggte ctccagtcct cctgatggcc cagatgcagc agcaggctgg 2640
caggatggag tagggaatct tcccagccac accagaggct actgaatttt ggtggaaata 2700
taaataatttt ttttgcataa aaaaaaaaaa aaaaaa 2736

```

<210> 4

<211> 761

<212> PRT

<213> R. rattus

<400> 4

```

Met Thr Ser Ala Ser Ser Pro Pro Ala Phe Arg Leu Glu Thr Ser Asp
1           5           10           15
Gly Asp Glu Glu Gly Asn Ala Glu Val Asn Lys Gly Lys Gln Glu Pro
20           25           30
Pro Pro Met Glu Ser Pro Phe Gln Arg Glu Asp Arg Asn Ser Ser Pro
35           40           45

```

Gln Ile Lys Val Asn Leu Asn Phe Ile Lys Arg Pro Pro Lys Asn Thr
 50 55 60
 Ser Ala Pro Ser Gln Gln Glu Pro Asp Arg Phe Asp Arg Asp Arg Leu
 65 70 75 80
 Phe Ser Val Val Ser Arg Gly Val Pro Glu Glu Leu Thr Gly Leu Leu
 85 90 95
 Glu Tyr Leu Arg Trp Asn Ser Lys Tyr Leu Thr Asp Ser Ala Tyr Thr
 100 105 110
 Glu Gly Ser Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Val Leu Asn Leu
 115 120 125
 Gln Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Met Pro Leu Leu Gln Ile Asp Lys
 130 135 140
 Asp Ser Gly Asn Pro Lys Pro Leu Val Asn Ala Gln Cys Thr Asp Glu
 145 150 155 160
 Phe Tyr Gln Gly His Ser Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Lys Arg Ser
 165 170 175
 Leu Gln Cys Val Lys Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val His Leu
 180 185 190
 Arg Ala Cys Gly Arg Phe Phe Gln Lys His Gln Gly Thr Cys Phe Tyr
 195 200 205
 Phe Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Lys Gln Trp Asp
 210 215 220
 Val Val Thr Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro Ala Ser Leu Glu
 225 230 235 240
 Ala Thr Asp Ser Leu Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Met Ile
 245 250 255
 Ala Asp Asn Ser Pro Glu Asn Ser Ala Leu Val Ile His Met Tyr Asp
 260 265 270
 Gly Leu Leu Gln Met Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr Val Gln Leu Glu
 275 280 285
 Glu Ile Ser Asn His Gln Gly Leu Thr Pro Leu Lys Leu Ala Ala Lys
 290 295 300
 Glu Gly Lys Ile Glu Ile Phe Arg His Ile Leu Gln Arg Glu Phe Ser
 305 310 315 320
 Gly Pro Tyr Gln Pro Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Cys Tyr Gly
 325 330 335
 Pro Val Arg Val Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Val Asp Ser Trp Glu
 340 345 350
 Lys Asn Ser Val Leu Glu Ile Ile Ala Phe His Cys Lys Ser Pro Asn
 355 360 365
 Arg His Arg Met Val Val Leu Glu Pro Leu Asn Lys Leu Leu Gln Glu
 370 375 380
 Lys Trp Asp Arg Leu Val Ser Arg Phe Phe Phe Asn Phe Ala Cys Tyr
 385 390 395 400
 Leu Val Tyr Met Phe Ile Phe Thr Val Val Ala Tyr His Gln Pro Ser
 405 410 415
 Leu Asp Gln Pro Ala Ile Pro Ser Ser Lys Ala Thr Phe Gly Glu Ser
 420 425 430
 Met Leu Leu Leu Gly His Ile Leu Ile Leu Leu Gly Gly Ile Tyr Leu
 435 440 445
 Leu Leu Gly Gln Leu Trp Tyr Phe Trp Arg Arg Arg Leu Phe Ile Trp
 450 455 460
 Ile Ser Phe Met Asp Ser Tyr Phe Glu Ile Leu Phe Leu Leu Gln Ala
 465 470 475 480

Leu Leu Thr Val Leu Ser Gln Val Leu Arg Phe Met Glu Thr Glu Trp
 485 490 495
 Tyr Leu Pro Leu Leu Val Leu Ser Leu Val Leu Gly Trp Leu Asn Leu
 500 505 510
 Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln His Thr Gly Ile Tyr Ser Val Met
 515 520 525
 Ile Gln Lys Val Ile Leu Arg Asp Leu Leu Arg Phe Leu Leu Val Tyr
 530 535 540
 Leu Val Phe Leu Phe Gly Phe Ala Val Ala Leu Val Ser Leu Ser Arg
 545 550 555 560
 Glu Ala Arg Ser Pro Lys Ala Pro Glu Asp Asn Asn Ser Thr Val Thr
 565 570 575
 Glu Gln Pro Thr Val Gly Gln Glu Glu Glu Pro Ala Pro Tyr Arg Ser
 580 585 590
 Ile Leu Asp Ala Ser Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly
 595 600 605
 Glu Leu Ala Phe Gln Glu Gln Leu Arg Phe Arg Gly Val Val Leu Leu
 610 615 620
 Leu Leu Leu Ala Tyr Val Leu Leu Thr Tyr Val Leu Leu Leu Asn Met
 625 630 635 640
 Leu Ile Ala Leu Met Ser Glu Thr Val Asn His Val Ala Asp Asn Ser
 645 650 655
 Trp Ser Ile Trp Lys Leu Gln Lys Ala Ile Ser Val Leu Glu Met Glu
 660 665 670
 Asn Gly Tyr Trp Trp Cys Arg Arg Lys Lys His Arg Glu Gly Arg Leu
 675 680 685
 Leu Lys Val Gly Thr Arg Gly Asp Gly Thr Pro Asp Glu Arg Trp Cys
 690 695 700
 Phe Arg Val Glu Glu Val Asn Trp Ala Ala Trp Glu Lys Thr Leu Pro
 705 710 715 720
 Thr Leu Ser Glu Asp Pro Ser Gly Pro Gly Ile Thr Gly Asn Lys Lys
 725 730 735
 Asn Pro Thr Ser Lys Pro Gly Lys Asn Ser Ala Ser Glu Glu Asp His
 740 745 750
 Leu Pro Leu Gln Val Leu Gln Ser Pro
 755 760

<210> 5

<211> 273

<212> DNA

<213> H. sapiens

<400> 5

tgcggtctcc cnggggtgtc cccgaggatc tggctggact tccnagagta cctgagcaag	60
accagcaagt acctcaccga ctcggaatac acagagggct ncnacaggta agacgtgcct	120
gatgaaggct gtgctgaacc ttaaggacgg ggtcaatgcc tgcattctgc cactgctgca	180
gatcgachgg gactctggca atcctcagcc cctggtaaat gcccagtgca cagatgacta	240
ttaccgaggc cacagcctc tgcacatcgc cat	273

<210> 6

<211> 768

<212> DNA

<213> H. sapiens

<400> 6

```

tcggtgagct acccctctcc ttggccgctt gcaccaagca gtgggatgtg gtaagctacc      60
tcctggagaa cccacaccag cccgccagcc tgcagnncac tgactcccag ggcaacacag      120
tcctgcatgc cctagtgatg atctcggaca actcagctga gaacattgca ctggtgacca      180
gcatgtatga tgggctcctc caagctgggg cccgncctct gccctaccgt gcnagcttga      240
ggacatccgc aacctgcagg atctcacgcc tctgnaannt ggccgccaag gagggcaaga      300
tcgrrwttty maggcacatc cttnsmagcg ggrrktttca ggactgnagc caccttttnc      360
ccgaaagttc accgagtggg ngctannkgg gcctgtccgg gntgtcgctg tnatgacctg      420
gnnyttctnt ggacagctgt naggagaact cagtgtctga gatcattgcc tttcattngc      480
aaragcccg n accgacaccg aatggctcgt ttggagcccc tgaacaaact gctgcaggcn      540
gaaatgggat ctgctcatcc ccaagttctt cttaaacttc ctgtgtaatc tgatntacat      600
gttcatcttc amckctgttg cctaccatca gcctaccnng aagaagcagg ccgcccctca      660
cctgaaagcg gaggttgga actccatgct gctgacgggc cacatcctta tcctgctagg      720
ggggatctac ctccctcgtg ggcaaaagtg gaaatttttg gggggaat      768

```

<210> 7
 <211> 650
 <212> DNA
 <213> H. sapiens

```

<400> 7
tgtttctctg ccategagtg gtacctgccc ctgcttgtgt ctgcgtggt gctgggctgg      60
ctgaacctgc tttactatac acgtggcttc cagcacacag gcactacag tgtcatgatc      120
cagaagccct ggtgagcctg agccaggatt ggcccccga agctcctaca ggccccaatg      180
ccacagagtc agtgcagccc atggaggagc aggaggacga gggcaacggg gcccagtaca      240
ggggtatcct ggwagectcc ttggagctct tcaaattcac catcggcctg ggcgagctgg      300
ccttcagggn gcagctgcac ttccgcggca tnggtgctgc tgcgtctnct ggccctacgtn      360
ctgctcacct acatcctgct gctcaacatg ctcatcgccc tcatngagcg agaccgtcaa      420
cankktcgcc actgacagct ggagcatctg gaagctgcag aaagncatct nntgtcctgg      480
agatggagaa tggctatttg tgggtgcanga agaagcagcg ggcagggtgt atgctgancc      540
ttggcactaa gccagatggc agcccs gatg agcgtggtg cttcagggtg gaggaggtga      600
actgggcttc atngggagca gacgctgcct acgctgtgtg aggaccctgc      650

```

<210> 8
 <211> 317
 <212> DNA
 <213> H. sapiens

```

<400> 8
gagcttctcc ctgcgggtcaa gcagagtttc aggcagacac tggagaact ttgccctggt      60
ccccctttta agagaggcaa gtctcgaata ggcagtctgc tcagcccag gaagtttata      120
tgcgacagtt ttcagggtct cttaaagccag aggacgctga ggtcttcaag agtcctgccg      180
cttccgggga gaagttagga cgtcacgcag acagcactgt caaactggg ccttaggaga      240
ccccgttgcc acggggggct ctgaggggaa acagtgcctt ttcagcagcc ttgctggctc      300
ttgctgcca gcatgtt      317

```

<210> 9
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

```

<400> 9
Ser Phe Ser Leu Arg Ser Ser Arg Val Ser Gly Arg His Trp Lys Asn
 1             5             10            15
Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu Ala Ser Xaa Arg Xaa Arg Gln
      20             25             30

```

Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg Gln Phe Ser Gly Ser Leu
 35 40 45
 Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser Pro Ala Ala Ser Gly Glu
 50 55 60
 Lys
 65

<210> 10
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> M. musculus

<400> 10
 cctgcagaag agcancangc gcctgannga cagcgagttc aaagaccag agacgggaaa 60
 gacctgtctg ctcaaagcca tgctcaatct gcacaatggg cagaacgaca ccattgctct 120
 gtccttggaac attgcccggg agacagatag cctgaagcag tttgtcaatg ccagctacac 180
 agacagctac tacaagggcc agacagcatt acacattgcc attgaaaggc ggaacatggc 240
 nctggtgacc ctcttggtgg agaattggagc agatgtccag gctgctgctg acggggactt 300
 cttcnanaaa accaangggg ggccctggctt ctactttggt gagctgcccc tgtccctggc 360
 tgcgtgcacc aaccagctgg ccattgtgaa attcctgctg cagaactcct gggcagcctg 420
 cagacatcag tggcncggga ttcngtgggc aacacngtgc tgcacncctt t 471

<210> 11
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> M. musculus

<400> 11
 caagtgtcgg ggatctgcct tgcagggcca agttaattct ttacaacagc ctgtattcca 60
 catgtctgga gctgttcâag ttcaccatcg gcatgggtga cctggagttc accgagaact 120
 atgacttcaa ggctgtcttt catcâctctg ttactggcct atgtgattct cacctacatc 180
 ctctgtctca acatgctcat tgctctcatg ggcgagactg tcaâcaagat tgcacaagag 240
 agcaagaaca tctggaagct gcagcgagcc atcaccatcc tggatacaga gaagagtttc 300
 ctgaagtgca tgaggaaggc cttccgctcc ggcaagctgc tgcaggtggg gttcacgccg 360
 gacggcaagg atgacttccg gtggtgcttc aggggtggatg aggtgaactg gactacctgg 420
 aacaccaacg tgggcatcat caacgaggac 450

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> R. rattus

<400> 12
 gaccagcaag tacctcac 18

<210> 13
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> R. rattus

<400> 13
 ctcccatgca gccagtttta ctctctccac cctgaagcac cagcgctca 49

<210> 14
 <211> 71

<212> PRT

<213> R. rattus

<400> 14

Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu
 1 5 10 15
 Asn Tyr Asp Phe Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val
 20 25 30
 Ile Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly
 35 40 45
 Glu Thr Val Asn Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu
 50 55 60
 Gln Arg Ala Ile Thr Ile Leu
 65 70

<210> 15

<211> 57

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 15

Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly Glu Leu Ala Phe Gln Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu His Phe Arg Gly Met Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala Tyr Val
 20 25 30
 Leu Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Ser
 35 40 45
 Glu Thr Val Asn Ser Val Ala Thr Asp
 50 55

<210> 16

<211> 75

<212> PRT

<213> Caliphora

<400> 16

Ser Leu Phe Trp Ala Ser Phe Gly Leu Val Asp Leu Val Ser Phe Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Ile Lys Ser Phe Thr Arg Phe Trp Ala Leu Leu Met Phe
 20 25 30
 Gly Ser Tyr Ser Val Ile Asn Ile Ile Val Leu Leu Asn Met Leu Ile
 35 40 45
 Ala Met Met Ser Asn Ser Tyr Gln Ile Ile Ser Glu Arg Ala Asp Val
 50 55 60
 Glu Trp Lys Phe Ala Arg Ser Gln Leu Trp Met
 65 70 75

<210> 17

<211> 75

<212> PRT

<213> D. melanogaster

<400> 17

Ser Leu Phe Trp Ala Ser Phe Gly Leu Val Asp Leu Val Ser Phe Asp
 1 5 10 15

Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	Ser	Phe	Thr	Arg	Phe	Trp	Ala	Leu	Leu	Met	Phe
			20					25					30		
Gly	Ser	Tyr	Ser	Val	Ile	Asn	Ile	Ile	Val	Leu	Leu	Asn	Met	Leu	Ile
		35					40					45			
Ala	Met	Met	Ser	Asn	Ser	Tyr	Gln	Ile	Ile	Ser	Glu	Arg	Ala	Asp	Val
	50					55					60				
Glu	Trp	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Gln	Leu	Trp	Met					
65					70					75					

```
<210> 18
<211> 75
<212> PRT
<213> B. taurus
```

<400> 18															
Ser	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ile	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr	Asn
1				5					10					15	
Val	Lys	Ala	Gln	His	Glu	Phe	Thr	Glu	Phe	Val	Gly	Ala	Thr	Met	Phe
			20					25					30		
Gly	Thr	Tyr	Asn	Val	Ile	Ser	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Asn	Met	Leu	Ile
		35					40					45			
Ala	Met	Met	Asn	Asn	Ser	Tyr	Gln	Leu	Ile	Ala	Asp	His	Ala	Asp	Ile
	50					55					60				
Glu	Trp	Lys	Phe	Ala	Arg	Thr	Lys	Leu	Trp	Met					
65				70						75					

```
<210> 19
<211> 61
<212> PRT
<213> C. elegans
```

Arg Thr Phe Ile Met Thr Ile Gly Glu Phe Ser Val Leu Tyr Arg Glu															
1 5 10 15															
Met Ser Ala Cys Asp Asn Phe Trp Met Lys Trp Ile Gly Lys Leu Ile															
20 25 30															
Phe Val Ile Phe Glu Thr Phe Val Ser Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu															
35 40 45															
Ile Ala Met Met Thr Arg Thr Tyr Glu Thr Ile Phe Leu															
50 55 60															

```
<210> 20
<211> 350
<212> DNA
<213> H. sapiens
```

```
<220>  
<221> CDS  
<222> (41)...(350)  
<223> Human VR2 cDNA
```

<400> 20
gagaggtcct ggctggacnn ngcagcctcc tcctcctagg atg acc tca ccc tcc 55
Met Thr Ser Pro Ser
1 5

agc tct cca gtt ttc agg ttg gag aca tta gat gga ggc caa gaa gat 103
 Ser Ser Pro Val Phe Arg Leu Glu Thr Leu Asp Gly Gly Gln Glu Asp
 10 15 20

ggc tct gag gcg gac aga gga aag ctg gat ttt ggg agc ggg ctg cct 151
 Gly Ser Glu Ala Asp Arg Gly Lys Leu Asp Phe Gly Ser Gly Leu Pro
 25 30 35

ccc atg gag tca cag ttc cag ggc gag gac cgg aaa ttc gcc cct cag 199
 Pro Met Glu Ser Gln Phe Gln Gly Glu Asp Arg Lys Phe Ala Pro Gln
 40 45 50

ata aga gtc aac ctc aac tac cga aag gga aca ggt gcc agt cag ccg 247
 Ile Arg Val Asn Leu Asn Tyr Arg Lys Gly Thr Gly Ala Ser Gln Pro
 55 60 65

gat cca aac cga ttt gac cga gat cgg ctc ttc aat gcg gtc tcc cgg 295
 Asp Pro Asn Arg Phe Asp Arg Asp Arg Leu Phe Asn Ala Val Ser Arg
 70 75 80 85

ggt gtc ccc gag gat ctg gct gga ctt cca gag tac ctg agc aag acc 343
 Gly Val Pro Glu Asp Leu Ala Gly Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Lys Thr
 90 95 100

agc aag t 350
 Ser Lys

<210> 21
 <211> 764
 <212> DNA
 <213> H. sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)...(764)

<400> 21
 tc ggt gag cta ccc ctc tct ttg gcc gct tgc acc aag cag tgg gat 47
 Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Lys Gln Trp Asp
 1 5 10 15

gtg gta agc tac ctc ctg gag aac cca cac cag ccc gcc agc ctg cag 95
 Val Val Ser Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro Ala Ser Leu Gln
 20 25 30

gcc act gac tcc cag ggc aac aca gtc ctg cat gcc cta gtg atg atc 143
 Ala Thr Asp Ser Gln Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Met Ile
 35 40 45

tcg gac aac tca gct gag aac att gca ctg gtg acc agc atg tat gat 191
 Ser Asp Asn Ser Ala Glu Asn Ile Ala Leu Val Thr Ser Met Tyr Asp
 50 55 60

ggg ctc ctc caa gct ggg gcc cgc ctc tgc cct acc gtg cag ctt gag Gly Leu Leu Gln Ala Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr Val Gln Leu Glu 65 70 75	239
gac atc cgc aac ctg cag gat ctc acg cct ctg aag ctg gcc gcc aag Asp Ile Arg Asn Leu Gln Asp Leu Thr Pro Leu Lys Leu Ala Ala Lys 80 85 90 95	287
gag ggc aag atc grr aty ttc aag gca cat cct tgc aag cgg gaa gtt Glu Gly Lys Ile Xaa Xaa Phe Lys Ala His Pro Cys Lys Arg Glu Val 100 105 110	335
ttc agg act gaa gcc acc ttt tcc ccg aaa gtt cac cga gtg gtg gct Phe Arg Thr Glu Ala Thr Phe Ser Pro Lys Val His Arg Val Val Ala 115 120 125	383
aat ggg gcc tgt ccg ggt tgt cgc tgt aat gac ctg ggc ttt ctg tgg Asn Gly Ala Cys Pro Gly Cys Arg Cys Asn Asp Leu Gly Phe Leu Trp 130 135 140	431
aca gct gtg agg aga act cag tgc tgg rra tca ttg cct ttc att tgc Thr Ala Val Arg Arg Thr Gln Cys Trp Xaa Ser Leu Pro Phe Ile Cys 145 150 155	479
aar agc ccg acc gac acc gaa tgg tcg ttt tgg agc ccc tga aca aac Xaa Ser Pro Thr Asp Thr Glu Trp Ser Phe Trp Ser Pro * Thr Asn 160 165 170	527
tgc tgc agg cga aat ggg atc tgc tca tcc cca agt tct tct taa act Cys Cys Arg Arg Asn Gly Ile Cys Ser Ser Pro Ser Ser Ser * Thr 175 180 185	575
tcc tgt gta atc tga tta cat gtt cat ctt cac cgc tgt tgc cta cca Ser Cys Val Ile * Leu His Val His Leu His Arg Cys Cys Leu Pro 190 195 200	623
tca gcc tac cct gaa gaa gca ggc cgc ccc tca cct gaa agc gga ggt Ser Ala Tyr Pro Glu Glu Ala Gly Arg Pro Ser Pro Glu Ser Gly Gly 205 210 215 220	671
tgg aaa ctc cat gct gct gac ggg cca cat cct tat cct gct agg ggg Trp Lys Leu His Ala Ala Asp Gly Pro His Pro Tyr Pro Ala Arg Gly 225 230 235	719
gat cta cct cct cgt ggg gca aaa gtg gaa att ttg ggg ggg aat Asp Leu Pro Pro Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Leu Gly Gly Asn 240 245 250	764

<210> 22

<211> 884

<212> DNA

<213> H. sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)...(764)
 <223> Human VR2 cDNA

<400> 22

tg ttt cct ggc cat cga gtg gta cct gcc cct gct tgt gtc tgc gct	47
Phe Pro Gly His Arg Val Val Pro Ala Pro Ala Cys Val Cys Ala	
1 5 10 15	
ggg gct ggg ctg gct gaa cct gct tta cta tac acg tgg ctt cca gca	95
Gly Ala Gly Leu Ala Glu Pro Ala Leu Leu Tyr Thr Trp Leu Pro Ala	
20 25 30	
cac agg cat cta cag tgt cat gat cca gaa gcc ctg gtg agc ctg agc	143
His Arg His Leu Gln Cys His Asp Pro Glu Ala Leu Val Ser Leu Ser	
35 40 45	
cag gat tgg cgc ccc gaa gct cct aca ggc ccc aat gcc aca gag tca	191
Gln Asp Trp Arg Pro Glu Ala Pro Thr Gly Pro Asn Ala Thr Glu Ser	
50 55 60	
gtg cag ccc atg gag gga cag gag gac gag ggc aac ggg gcc cag tac	239
Val Gln Pro Met Glu Gly Gln Glu Asp Glu Gly Asn Gly Ala Gln Tyr	
65 70 75	
agg ggt atc ctg gwa gcc tcc ttg gag ctc ttc aaa ttc acc atc ggc	287
Arg Gly Ile Leu Xaa Ala Ser Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly	
80 85 90 95	
atg ggc gag ctg gcc ttc cag gag cag ctg cac ttc cgc ggc atg gtg	335
Met Gly Glu Leu Ala Phe Gln Glu Gln Leu His Phe Arg Gly Met Val	
100 105 110	
ctg ctg ctg ctg ctg gcc tac gtg ctg ctc acc tac atc ctg ctg ctc	383
Leu Leu Leu Leu Leu Ala Tyr Val Leu Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu	
115 120 125	
aac atg ctc atc gcc ctc wtg agc gag acc gtc aac agt gtc gcc act	431
Asn Met Leu Ile Ala Leu Xaa Ser Glu Thr Val Asn Ser Val Ala Thr	
130 135 140	
gac agc tgg agc atc tgg aag ctg cag aaa gcc atc tct gtc ctg gag	479
Asp Ser Trp Ser Ile Trp Lys Leu Gln Lys Ala Ile Ser Val Leu Glu	
145 150 155	
atg gag aat ggc tat tgg tgg tgc agg aag aag cag cgg gca ggt gtg	527
Met Glu Asn Gly Tyr Trp Trp Cys Arg Lys Lys Gln Arg Ala Gly Val	
160 165 170 175	
atg ctg acc gtt ggc act aag cca gat ggc agc ccs gat gag cgc tgg	575
Met Leu Thr Val Gly Thr Lys Pro Asp Gly Ser Xaa Asp Glu Arg Trp	
180 185 190	

tgc ttc agg gtg gag gag gtg aac tgg gct tca tgg gag cag acg ctg 623
 Cys Phe Arg Val Glu Glu Val Asn Trp Ala Ser Trp Glu Gln Thr Leu
 195 200 205

cct acg ctg tgt gag gac ccg tca ggg gca ggt gtc cct cga act ctc 671
 Pro Thr Leu Cys Glu Asp Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Arg Thr Leu
 210 215 220

gag aac cct gtc ctg gct tcc cct ccc aag gag gat gag gat ggt gcc 719
 Glu Asn Pro Val Leu Ala Ser Pro Pro Lys Glu Asp Glu Asp Gly Ala
 225 230 235

tct gag gaa aac tat gtg ccc gtc cag ctc ctc cag tcc aac tga 764
 Ser Glu Glu Asn Tyr Val Pro Val Gln Leu Leu Gln Ser Asn *
 240 245 250

tggcccagat gcagcaggag gccagaggac agagcagagg atctttccaa ccacatctgc 824
 tggctctggg gtcccagtga attctggtgg caaatatata ttttcactaa mmwmaaaaac 884

<210> 23
 <211> 727
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 23

Met Thr Ser Pro Ser Ser Ser Pro Val Phe Arg Leu Glu Thr Leu Asp
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Glu Asp Gly Ser Glu Ala Asp Arg Gly Lys Leu Asp Phe
 20 25 30
 Gly Ser Gly Leu Pro Pro Met Glu Ser Gln Phe Gln Gly Glu Asp Arg
 35 40 45
 Lys Phe Ala Pro Gln Ile Arg Val Asn Leu Asn Tyr Arg Lys Gly Thr
 50 55 60
 Gly Ala Ser Gln Pro Asp Pro Asn Arg Phe Asp Arg Asp Arg Leu Phe
 65 70 75 80
 Asn Ala Val Ser Arg Gly Val Pro Glu Asp Leu Ala Gly Leu Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Lys Thr Ser Lys Tyr Leu Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Glu
 100 105 110
 Gly Ser Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Val Leu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Leu Pro Leu Leu Gln Ile Asp Arg Asp
 130 135 140
 Ser Gly Asn Pro Gln Pro Leu Val Asn Ala Gln Cys Thr Asp Asp Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Gly His Ser Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Lys Arg Ser Leu
 165 170 175
 Gln Cys Val Lys Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala Asn Val His Ala Arg
 180 185 190
 Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Lys Gln Trp Asp Val
 210 215 220
 Val Ser Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro Ala Ser Leu Gln Ala
 225 230 235 240

```

Thr Asp Ser Gln Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Met Ile Ser
      245                      250                      255
Asp Asn Ser Ala Glu Asn Ile Ala Leu Val Thr Ser Met Tyr Asp Gly
      260                      265                      270
Leu Leu Gln Ala Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr Val Gln Leu Glu Asp
      275                      280                      285
Ile Arg Asn Leu Gln Asp Leu Thr Pro Leu Lys Leu Ala Ala Lys Glu
      290                      295                      300
Gly Lys Ile Xaa Ile Phe Xaa Arg His Ile Leu Ala Ser Gly Lys Phe
305                      310                      315                      320
Ser Gly Leu Lys Pro Pro Phe Pro Arg Lys Phe Thr Glu Trp Trp Leu
      325                      330                      335
Met Gly Pro Val Arg Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      340                      345                      350
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      355                      360                      365
Pro Asp Arg His Arg Met Val Val Leu Glu Pro Leu Asn Lys Leu Leu
      370                      375                      380
Gln Ala Lys Trp Asp Leu Leu Ile Pro Lys Phe Phe Leu Asn Phe Leu
385                      390                      395                      400
Cys Asn Leu Xaa Tyr Met Phe Ile Phe Thr Ala Val Ala Tyr His Gln
      405                      410                      415
Pro Thr Leu Lys Lys Gln Ala Ala Pro His Leu Lys Ala Glu Val Gly
      420                      425                      430
Asn Ser Met Leu Leu Thr Gly His Ile Leu Ile Leu Leu Gly Gly Ile
      435                      440                      445
Tyr Leu Leu Val Gly Gln Lys Trp Lys Phe Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      450                      455                      460
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Pro Gly His Arg Val
465                      470                      475                      480
Val Pro Ala Pro Ala Cys Val Cys Ala Gly Ala Gly Leu Ala Glu Pro
      485                      490                      495
Ala Leu Leu Tyr Thr Trp Leu Pro Ala His Arg His Leu Gln Cys His
      500                      505                      510
Asp Pro Glu Ala Leu Val Ser Leu Ser Gln Asp Trp Arg Pro Glu Ala
      515                      520                      525
Pro Thr Gly Pro Asn Ala Thr Glu Ser Val Gln Pro Met Glu Gly Gln
      530                      535                      540
Glu Asp Glu Gly Asn Gly Ala Gln Tyr Arg Gly Ile Leu Xaa Ala Ser
545                      550                      555                      560
Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly Glu Leu Ala Phe Gln
      565                      570                      575
Glu Gln Leu His Phe Arg Gly Met Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala Tyr
      580                      585                      590
Val Leu Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Xaa
      595                      600                      605
Ser Glu Thr Val Asn Ser Val Ala Thr Asp Ser Trp Ser Ile Trp Lys
      610                      615                      620
Leu Gln Lys Ala Ile Ser Val Leu Glu Met Glu Asn Gly Tyr Trp Trp
625                      630                      635                      640
Cys Arg Lys Lys Gln Arg Ala Gly Val Met Leu Thr Val Gly Thr Lys
      645                      650                      655
Pro Asp Gly Ser Pro Asp Glu Arg Trp Cys Phe Arg Val Glu Glu Val
      660                      665                      670

```

Asn Trp Ala Ser Trp Glu Gln Thr Leu Pro Thr Leu Cys Glu Asp Pro
 675 680 685
 Ser Gly Ala Gly Val Pro Arg Thr Leu Glu Asn Pro Val Leu Ala Ser
 690 695 700
 Pro Pro Lys Glu Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu Glu Asn Tyr Val Pro
 705 710 715 720
 Val Gln Leu Leu Gln Ser Asn
 725

<210> 24

<211> 2845

<212> DNA

<213> chicken

<220>

<221> CDS

<222> (121) ... (2649)

<223> chicken VR1 cDNA

<400> 24

ttcctataga acagaggggag tttgctgaga ctggactatt ctgcagaaga caggatattt	60
ttgcaatatt tggatgatcgg acggaggggac acagaaaact tgaaaggctg cttgttcac	120
atg tct tcc att ctt gag aag atg aag aaa ttt ggc agt tct gac ata	168
Met Ser Ser Ile Leu Glu Lys Met Lys Lys Phe Gly Ser Ser Asp Ile	
1 5 10 15	
 gaa gaa tct gaa gtg aca gat gaa cac acg gat ggg gaa gac tca gca	216
Glu Glu Ser Glu Val Thr Asp Glu His Thr Asp Gly Glu Asp Ser Ala	
20 25 30	
 ctg gaa aca gct gac aac ctc cag ggt aca ttc agc aac aag gtg cag	264
Leu Glu Thr Ala Asp Asn Leu Gln Gly Thr Phe Ser Asn Lys Val Gln	
35 40 45	
 cca tcc aaa agc aac atc ttt gca aga cgt gga cgg ttt gtg atg ggg	312
Pro Ser Lys Ser Asn Ile Phe Ala Arg Arg Gly Arg Phe Val Met Gly	
50 55 60	
 gat tgt gac aag gac atg gct cca atg gac tcc ttt tac cag atg gat	360
Asp Cys Asp Lys Asp Met Ala Pro Met Asp Ser Phe Tyr Gln Met Asp	
65 70 75 80	
 cac ctg atg gca cct tct gtc atc aaa ttt cat gcc aat atg gag agg	408
His Leu Met Ala Pro Ser Val Ile Lys Phe His Ala Asn Met Glu Arg	
85 90 95	
 ggg aaa ctt cac aag ctc ctg tca aca gac tcc atc aca ggc tgc tct	456
Gly Lys Leu His Lys Leu Leu Ser Thr Asp Ser Ile Thr Gly Cys Ser	
100 105 110	
 gaa aaa gct ttc aaa ttt tat gac cgc aga agg atc ttt gat gct gta	504
Glu Lys Ala Phe Lys Phe Tyr Asp Arg Arg Arg Ile Phe Asp Ala Val	
115 120 125	

gcc cga ggc agc aca aag gac ctg gat gat ctg ctg ctc tat cta aat	552
Ala Arg Gly Ser Thr Lys Asp Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Leu Asn	
130 135 140	
agg acc ttg aag cat ctc aca gat gat gaa ttc aaa gaa cca gaa act	600
Arg Thr Leu Lys His Leu Thr Asp Asp Glu Phe Lys Glu Pro Glu Thr	
145 150 155 160	
ggg aaa acc tgc tta ctg aaa gcc atg ctg aat cta cat gat ggg aaa	648
Gly Lys Thr Cys Leu Leu Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Lys	
165 170 175	
aat gat acc att ccc ttg ctg ctg gat att gca aag aaa act gga act	696
Asn Asp Thr Ile Pro Leu Leu Leu Asp Ile Ala Lys Lys Thr Gly Thr	
180 185 190	
ctg aaa gag ttt gta aat gca gaa tat act gac aac tat tac aaa ggc	744
Leu Lys Glu Phe Val Asn Ala Glu Tyr Thr Asp Asn Tyr Tyr Lys Gly	
195 200 205	
cag act gca ctc cac att gcc att gag aga agg aac atg tac ctg gta	792
Gln Thr Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Tyr Leu Val	
210 215 220	
aaa ctc ttg gtc cag aat gga gca gat gtt cat gca aga gca tgt ggg	840
Lys Leu Leu Val Gln Asn Gly Ala Asp Val His Ala Arg Ala Cys Gly	
225 230 235 240	
gag ttc ttc agg aaa atc aaa ggg aaa cct ggt ttt tat ttt gga gag	888
Glu Phe Phe Arg Lys Ile Lys Gly Lys Pro Gly Phe Tyr Phe Gly Glu	
245 250 255	
ctg ccc ctg tcc ctg gct gcc tgc acc aat cag ctc tgc att gtg aaa	936
Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Leu Cys Ile Val Lys	
260 265 270	
ttt ctc ctt gag aac ccc tac cag gct gct gac att gct gct gag gac	984
Phe Leu Leu Glu Asn Pro Tyr Gln Ala Ala Asp Ile Ala Ala Glu Asp	
275 280 285	
tcc atg ggc aat atg gtt ctg cat act ctg gtg gag att gca gat aat	1032
Ser Met Gly Asn Met Val Leu His Thr Leu Val Glu Ile Ala Asp Asn	
290 295 300	
act aag gat aat acc aag ttc gtt acg aag atg tac aat aac ata ttg	1080
Thr Lys Asp Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asn Asn Ile Leu	
305 310 315 320	
atc ctt ggt gcc aaa ata aat cct atc ctg aag ttg gaa gaa ctc acc	1128
Ile Leu Gly Ala Lys Ile Asn Pro Ile Leu Lys Leu Glu Glu Leu Thr	
325 330 335	
aac aaa aaa ggg ctg act cca tta acg ttg gca gcc aaa aca ggg aag	1176
Asn Lys Lys Gly Leu Thr Pro Leu Thr Leu Ala Ala Lys Thr Gly Lys	
340 345 350	

ata ggg att ttc gct tac atc ctc aga cga gag atc aaa gat cct gaa Ile Gly Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Arg Arg Glu Ile Lys Asp Pro Glu 355 360 365	1224
tgc aga cac ttg tct agg aag ttc act gaa tgg gct tat gga cct gtc Cys Arg His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Ala Tyr Gly Pro Val 370 375 380	1272
cat tca tct ctt tat gac ctg tcc tgc ata gac aca tgt gag aaa aat His Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Cys Ile Asp Thr Cys Glu Lys Asn 385 390 395 400	1320
tca gtg ctt gaa att att gcc tac agt agt gaa aca cca aat cgt cat Ser Val Leu Glu Ile Ile Ala Tyr Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His 405 410 415	1368
gag atg ctg ctg gta gag ccc ctt aac agg cta ctg caa gac aag tgg Glu Met Leu Leu Val Glu Pro Leu Asn Arg Leu Leu Gln Asp Lys Trp 420 425 430	1416
gac cga ttt gtc aag cac tta ttt tac ttc aac ttc ttt gta tat gca Asp Arg Phe Val Lys His Leu Phe Tyr Phe Asn Phe Phe Val Tyr Ala 435 440 445	1464
att cat atc agc atc ctc acc aca gct gcc tac tac aga cct gtg cag Ile His Ile Ser Ile Leu Thr Thr Ala Ala Tyr Tyr Arg Pro Val Gln 450 455 460	1512
aag ggg gac aag cct ccc ttc gct ttt ggt cac agc act ggg gaa tat Lys Gly Asp Lys Pro Pro Phe Ala Phe Gly His Ser Thr Gly Glu Tyr 465 470 475 480	1560
ttt cga gtg act gga gag ata ctg agt gta ttg gga gga ctg tat ttt Phe Arg Val Thr Gly Glu Ile Leu Ser Val Leu Gly Gly Leu Tyr Phe 485 490 495	1608
ttt ttc aga ggg ata cag tat ttt gtg cag agg cgc cca tca ttg aag Phe Phe Arg Gly Ile Gln Tyr Phe Val Gln Arg Arg Pro Ser Leu Lys 500 505 510	1656
acg ctg ata gtt gac agt tac agt gaa gtt ctt ttc ttc gtt cac tct Thr Leu Ile Val Asp Ser Tyr Ser Glu Val Leu Phe Phe Val His Ser 515 520 525	1704
ttg ctc ctc ctg agc tct gtg gtg ctg tac ttc tgt ggc cag gaa ctg Leu Leu Leu Leu Ser Ser Val Val Leu Tyr Phe Cys Gly Gln Glu Leu 530 535 540	1752
tat gtg gct tcc atg gtc ttc tcc ttg gct ctg ggc tgg gct aac atg Tyr Val Ala Ser Met Val Phe Ser Leu Ala Leu Gly Trp Ala Asn Met 545 550 555 560	1800

cta tac tac acc cgt ggc ttc cag cag atg ggc att tac tct gtc atg Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln Gln Met Gly Ile Tyr Ser Val Met 565 570 575	1848
att gca aag atg atc cta aga gac tta tgt cgc ttc atg ttt gtc tat Ile Ala Lys Met Ile Leu Arg Asp Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr 580 585 590	1896
cta gta ttc ctc ttg gga ttt tcc aca gct gtg gtg act tta att gaa Leu Val Phe Leu Leu Gly Phe Ser Thr Ala Val Val Thr Leu Ile Glu 595 600 605	1944
gat gac aat gag ggg cag gac aca aat agc tct gaa tat gcc cga tgc Asp Asp Asn Glu Gly Gln Asp Thr Asn Ser Ser Glu Tyr Ala Arg Cys 610 615 620	1992
agc cat acg aaa cga ggc cgc aca tcc tat aac agt ctg tat tat acc Ser His Thr Lys Arg Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Tyr Thr 625 630 635 640	2040
tgc ttg gaa ctt ttc aag ttc act att ggg atg gga gac ctg gag ttt Cys Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe 645 650 655	2088
aca gag aac tac agg ttc aag tct gtg ttt gtc atc ctt ttg gtt ctc Thr Glu Asn Tyr Arg Phe Lys Ser Val Phe Val Ile Leu Leu Val Leu 660 665 670	2136
tat gtc atc ctt acg tac atc ctc ctg ctc aat atg ctt att gca ctg Tyr Val Ile Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu 675 680 685	2184
atg gga gaa act gtg agc aaa att gca cag gag agc aag agc atc tgg Met Gly Glu Thr Val Ser Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Ser Ile Trp 690 695 700	2232
aaa ctc cag agg ccc atc acg atc ttg gat att gaa aac agc tac ttg Lys Leu Gln Arg Pro Ile Thr Ile Leu Asp Ile Glu Asn Ser Tyr Leu 705 710 715 720	2280
aac tgt ttg agg cgc tca ttc cga tct gga aaa aga gtc ttg gtg gga Asn Cys Leu Arg Arg Ser Phe Arg Ser Gly Lys Arg Val Leu Val Gly 725 730 735	2328
atc aca cct gat ggc caa gat gat tac aga tgg tgc ttt aga gtt gat Ile Thr Pro Asp Gly Gln Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp 740 745 750	2376
gaa gtg aac tgg tcc acg tgg aat aca aat ttg ggc ata atc aac gaa Glu Val Asn Trp Ser Thr Trp Asn Thr Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu 755 760 765	2424
gat cct ggg tgc tct ggt gac ctc aaa cga aat ccc agt tac tgt att Asp Pro Gly Cys Ser Gly Asp Leu Lys Arg Asn Pro Ser Tyr Cys Ile 770 775 780	2472

aag cct ggt aga gtt tca ggg aaa aat tgg aaa act ttg gtt cca ctt 2520
 Lys Pro Gly Arg Val Ser Gly Lys Asn Trp Lys Thr Leu Val Pro Leu
 785 790 795 800

tta aga gat gga agc agg aga gaa gaa aca cca aaa cta cca gaa gaa 2568
 Leu Arg Asp Gly Ser Arg Arg Glu Glu Thr Pro Lys Leu Pro Glu Glu
 805 810 815

atc aaa tta aaa ccc att ttg gaa cct tat tat gag cca gag gat tgt 2616
 Ile Lys Leu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Tyr Tyr Glu Pro Glu Asp Cys
 820 825 830

gag aca ttg aag gaa tcg ctt cca aag tca gtc tgatcttttg tttttaagaa 2669
 Glu Thr Leu Lys Glu Ser Leu Pro Lys Ser Val
 835 840

ggttaattct agttgtttgt gttggttctt acaaggagga caattaaaac gcttccttca 2729
 taagagcggg gatttatgga aaaaggccaa agaagctagg aaatgactgt gtgcaaggat 2789
 tcattaagta tcttgaataa actacttggt gtttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2845

<210> 25
 <211> 843
 <212> PRT
 <213> chicken

<400> 25
 Met Ser Ser Ile Leu Glu Lys Met Lys Lys Phe Gly Ser Ser Asp Ile
 1 5 10 15
 Glu Glu Ser Glu Val Thr Asp Glu His Thr Asp Gly Glu Asp Ser Ala
 20 25 30
 Leu Glu Thr Ala Asp Asn Leu Gln Gly Thr Phe Ser Asn Lys Val Gln
 35 40 45
 Pro Ser Lys Ser Asn Ile Phe Ala Arg Arg Gly Arg Phe Val Met Gly
 50 55 60
 Asp Cys Asp Lys Asp Met Ala Pro Met Asp Ser Phe Tyr Gln Met Asp
 65 70 75 80
 His Leu Met Ala Pro Ser Val Ile Lys Phe His Ala Asn Met Glu Arg
 85 90 95
 Gly Lys Leu His Lys Leu Leu Ser Thr Asp Ser Ile Thr Gly Cys Ser
 100 105 110
 Glu Lys Ala Phe Lys Phe Tyr Asp Arg Arg Arg Ile Phe Asp Ala Val
 115 120 125
 Ala Arg Gly Ser Thr Lys Asp Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Arg Thr Leu Lys His Leu Thr Asp Asp Glu Phe Lys Glu Pro Glu Thr
 145 150 155 160
 Gly Lys Thr Cys Leu Leu Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Lys
 165 170 175
 Asn Asp Thr Ile Pro Leu Leu Leu Asp Ile Ala Lys Lys Thr Gly Thr
 180 185 190
 Leu Lys Glu Phe Val Asn Ala Glu Tyr Thr Asp Asn Tyr Tyr Lys Gly
 195 200 205
 Gln Thr Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Tyr Leu Val
 210 215 220

Lys	Leu	Leu	Val	Gln	Asn	Gly	Ala	Asp	Val	His	Ala	Arg	Ala	Cys	Gly
225					230					235					240
Glu	Phe	Phe	Arg	Lys	Ile	Lys	Gly	Lys	Pro	Gly	Phe	Tyr	Phe	Gly	Glu
				245					250					255	
Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Cys	Thr	Asn	Gln	Leu	Cys	Ile	Val	Lys
			260					265					270		
Phe	Leu	Leu	Glu	Asn	Pro	Tyr	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Ala	Ala	Glu	Asp
		275					280					285			
Ser	Met	Gly	Asn	Met	Val	Leu	His	Thr	Leu	Val	Glu	Ile	Ala	Asp	Asn
	290				295						300				
Thr	Lys	Asp	Asn	Thr	Lys	Phe	Val	Thr	Lys	Met	Tyr	Asn	Asn	Ile	Leu
305					310					315					320
Ile	Leu	Gly	Ala	Lys	Ile	Asn	Pro	Ile	Leu	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr
				325					330						335
Asn	Lys	Lys	Gly	Leu	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Thr	Gly	Lys
			340					345					350		
Ile	Gly	Ile	Phe	Ala	Tyr	Ile	Leu	Arg	Arg	Glu	Ile	Lys	Asp	Pro	Glu
		355					360					365			
Cys	Arg	His	Leu	Ser	Arg	Lys	Phe	Thr	Glu	Trp	Ala	Tyr	Gly	Pro	Val
	370					375					380				
His	Ser	Ser	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	Cys	Ile	Asp	Thr	Cys	Glu	Lys	Asn
385					390					395					400
Ser	Val	Leu	Glu	Ile	Ile	Ala	Tyr	Ser	Ser	Glu	Thr	Pro	Asn	Arg	His
				405						410				415	
Glu	Met	Leu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Asn	Arg	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Trp
			420					425					430		
Asp	Arg	Phe	Val	Lys	His	Leu	Phe	Tyr	Phe	Asn	Phe	Phe	Val	Tyr	Ala
		435					440					445			
Ile	His	Ile	Ser	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Gln
	450					455					460				
Lys	Gly	Asp	Lys	Pro	Pro	Phe	Ala	Phe	Gly	His	Ser	Thr	Gly	Glu	Tyr
465					470					475					480
Phe	Arg	Val	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Gly	Gly	Leu	Tyr	Phe
				485					490					495	
Phe	Phe	Arg	Gly	Ile	Gln	Tyr	Phe	Val	Gln	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Lys
			500					505					510		
Thr	Leu	Ile	Val	Asp	Ser	Tyr	Ser	Glu	Val	Leu	Phe	Phe	Val	His	Ser
			515				520					525			
Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Leu	Tyr	Phe	Cys	Gly	Gln	Glu	Leu
			530			535					540				
Tyr	Val	Ala	Ser	Met	Val	Phe	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Trp	Ala	Asn	Met
545					550					555					560
Leu	Tyr	Tyr	Thr	Arg	Gly	Phe	Gln	Gln	Met	Gly	Ile	Tyr	Ser	Val	Met
				565					57						

Thr Glu Asn Tyr Arg Phe Lys Ser Val Phe Val Ile Leu Leu Val Leu
 660 665 670
 Tyr Val Ile Leu Thr Tyr Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu
 675 680 685
 Met Gly Glu Thr Val Ser Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Ser Ile Trp
 690 695 700
 Lys Leu Gln Arg Pro Ile Thr Ile Leu Asp Ile Glu Asn Ser Tyr Leu
 705 710 715 720
 Asn Cys Leu Arg Arg Ser Phe Arg Ser Gly Lys Arg Val Leu Val Gly
 725 730 735
 Ile Thr Pro Asp Gly Gln Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp
 740 745 750
 Glu Val Asn Trp Ser Thr Trp Asn Thr Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu
 755 760 765
 Asp Pro Gly Cys Ser Gly Asp Leu Lys Arg Asn Pro Ser Tyr Cys Ile
 770 775 780
 Lys Pro Gly Arg Val Ser Gly Lys Asn Trp Lys Thr Leu Val Pro Leu
 785 790 795 800
 Leu Arg Asp Gly Ser Arg Arg Glu Glu Thr Pro Lys Leu Pro Glu Glu
 805 810 815
 Ile Lys Leu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Tyr Tyr Glu Pro Glu Asp Cys
 820 825 830
 Glu Thr Leu Lys Glu Ser Leu Pro Lys Ser Val
 835 840

<210> 26
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> H. sapiens

<400> 26
 ttcaagttta cgatcgggat gggcgacctg gagttcactg agaactatga cttcaaggct 60
 gtcttcatca tctgtctgct ggcctatgta attctcacct acatcctcct gctcaacatg 120
 tttatcgctc tcatg 135

<210> 27
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus

<400> 27
 tttcaaagtt tcacgatcat atcgggatca tg 32

<210> 28
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus

<400> 28

catgatcaga gatcgcgata tgatcagaca tagtt

35

<210> 29

<211> 135

<212> DNA

<213> chicken

<400> 29

ttcaagttca cgattgggat gggtagacctg gattttcatg aacatgccag attcagatac	60
tttgtcatgc ttctgctgct gctttttgtg atcctcacct acatcctttt gctcaacatg	120
cttatagccc ttata	135

<210> 30

<211> 135

<212> DNA

<213> chicken

<400> 30

ttcaagttca ctattgggat gggagacctg gagtttacag agaactacag gttcaagtct	60
gtgtttgtca tccttttggt tctctatgtc atccttacgt acatcctcct gctcaatatg	120
cttatagccc taatg	135

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> H. sapiens

<400> 31

tatctttcaa tctttctttc gtgatcta	28
--------------------------------	----

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> H. sapiens

<400> 32

aaaaggggga ccagggc	17
--------------------	----

<210> 33

<211> 2544

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (14) ... (2530)

<223> Human VR1

<400> 33

ggatccagca agg atg aag aaa tgg agc agc aca gac ttg ggg gca gct	49
Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala	
1 5 10	

gcg gac cca ctc caa aag gac acc tgc cca gac ccc ctg gat gga gac Ala Asp Pro Leu Gln Lys Asp Thr Cys Pro Asp Pro Leu Asp Gly Aso 15 20 25	97
cct aac tcc agg cca cct cca gcc aag ccc cag ctc tcc acg gcc aag Pro Asn Ser Arg Pro Pro Pro Ala Lys Pro Gln Leu Ser Thr Ala Lys 30 35 40	145
agc cgc acc cgg ctc ttt ggg aag ggt gac tgc gag gag gct ttc ccg Ser Arg Thr Arg Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe Pro 45 50 55 60	193
gtg gat tgc cct cac gag gaa ggt gag ctg gac tcc tgc ccg acc atc Val Asp Cys Pro His Glu Glu Gly Glu Leu Asp Ser Cys Pro Thr Ile 65 70 75	241
aca gtc agc cct gtt atc acc atc cag agg cca gga gac ggc ccc acc Thr Val Ser Pro Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr 80 85 90	289
ggt gcc agg ctg ctg tcc cag gac tct gtc gcc gcc agc acc gag aag Gly Ala Arg Leu Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys 95 100 105	337
acc ctc agg ctc tat gat cgc agg agt atc ttt gaa gcc gtt gct cag Thr Leu Arg Leu Tyr Asp Arg Arg Ser Ile Phe Glu Ala Val Ala Gln 110 115 120	385
aat aac tgc cag gat ctg gag agc ctg ctg ctc ttc ctg cag aag agc Asn Asn Cys Gln Asp Leu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Gln Lys Ser 125 130 135 140	433
aag aag cac ctc aca gac aac gag ttc aaa gac cct gag aca ggg aag Lys Lys His Leu Thr Asp Asn Glu Phe Lys Asp Pro Glu Thr Gly Lys 145 150 155	481
acc tgt ctg ctg aaa gcc atg ctc aac ctg cac gac gga cag aac acc Thr Cys Leu Leu Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr 160 165 170	529
acc atc ccc ctg ctc ctg gag atc gcg cgg caa acg gac agc ctg aag Thr Ile Pro Leu Leu Leu Glu Ile Ala Arg Gln Thr Asp Ser Leu Lys 175 180 185	577
gag ctt gtc aac gcc agc tac acg gac agc tac tac aag ggc cag aca Glu Leu Val Asn Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln Thr 190 195 200	625
gca ctg cac atc gcc atc gag aga cgc aac atg gcc ctg gtg acc ctc Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Ala Leu Val Thr Leu 205 210 215 220	673
ctg gtg gag aac gga gca gac gtc cag gct gcg gcc cat ggg gac ttc Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala His Gly Asp Phe 225 230 235	721

ttt aag aaa acc aaa ggg cgg cct gga ttc tac ttc ggt gaa ctg ccc	769
Phe Lys Lys Thr Lys Gly Arg Pro Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro	
240 245 250	
ctg tcc ctg gcc gcg tgc acc aac cag ctg ggc atc gtg aag ttc ctg	817
Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu	
255 260 265	
ctg cag aac tcc tgg cag acg gcc gac atc agc gcc agg gac tcg gtg	865
Leu Gln Asn Ser Trp Gln Thr Ala Asp Ile Ser Ala Arg Asp Ser Val	
270 275 280	
ggc aac acg gtg ctg cac gcc ctg gtg gag gtg gcc gac aac acg gcc	913
Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala	
285 290 295 300	
gac aac acg aag ttt gtg acg agc atg tac aat gag att ctg atc ctg	961
Asp Asn Thr Lys Phe Val Thr Ser Met Tyr Asn Glu Ile Leu Ile Leu	
305 310 315	
ggg gcc aaa ctg cac ccg acg ctg aag ctg gag gag ctc acc aac aag	1009
Gly Ala Lys Leu His Pro Thr Leu Lys Leu Glu Glu Leu Thr Asn Lys	
320 325 330	
aag gga atg acg ccg ctg gct ctg gca gct ggg acc ggg aag atc ggg	1057
Lys Gly Met Thr Pro Leu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Lys Ile Gly	
335 340 345	
gtc ttg gcc tat att ctc cag cgg gag atc cag gag ccc gag tgc agg	1105
Val Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Arg Glu Ile Gln Glu Pro Glu Cys Arg	
350 355 360	
cac ctg tcc agg aag ttc acc gag tgg gcc tac ggg ccc gtg cac tcc	1153
His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Ala Tyr Gly Pro Val His Ser	
365 370 375 380	
tcg ctg tac gac ctg tcc tgc atc gac acc tgc gag aag aac tcg gtg	1201
Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Cys Ile Asp Thr Cys Glu Lys Asn Ser Val	
385 390 395	
ctg gag gtg atc gcc tac agc agc agc gag acc cct aat cgc cac gac	1249
Leu Glu Val Ile Ala Tyr Ser Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His Asp	
400 405 410	
atg ctc ttg gtg gag ccg ctg aac cga ctc ctg cag gac aag tgg gac	1297
Met Leu Leu Val Glu Pro Leu Asn Arg Leu Leu Gln Asp Lys Trp Asp	
415 420 425	
aga ttc gtc aag cgc atc ttc tac ttc aac ttc ctg gtc tac tgc ctg	1345
Arg Phe Val Lys Arg Ile Phe Tyr Phe Asn Phe Leu Val Tyr Cys Leu	
430 435 440	

tac atg atc atc ttc acc atg gct gcc tac tac agg ccc gtg gat ggc Tyr Met Ile Ile Phe Thr Met Ala Ala Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gly 445 450 455 460	1393
ttg cct ccc ttt aag atg gaa aaa act gga gac tat ttc cga gtt act Leu Pro Pro Phe Lys Met Glu Lys Thr Gly Asp Tyr Phe Arg Val Thr 465 470 475	1441
gga gag atc ctg tct gtg tta gga gga gtc tac ttc ttt ttc cga ggg Gly Glu Ile Leu Ser Val Leu Gly Gly Val Tyr Phe Phe Phe Arg Gly 480 485 490	1489
att cag tat ttc ctg cag agg cgg ccg tcg atg aag acc ctg ttt gtg Ile Gln Tyr Phe Leu Gln Arg Arg Pro Ser Met Lys Thr Leu Phe Val 495 500 505	1537
gac agc tac agt gag atg ctt ttc ttt ctg cag tca ctg ttc atg ctg Asp Ser Tyr Ser Glu Met Leu Phe Phe Leu Gln Ser Leu Phe Met Leu 510 515 520	1585
gcc acc gtg gtg ctg tac ttc agc cac ctc aag gag tat gtg gct tcc Ala Thr Val Val Leu Tyr Phe Ser His Leu Lys Glu Tyr Val Ala Ser 525 530 535 540	1633
atg gta ttc tcc ctg gcc ttg ggc tgg acc aac atg ctc tac tac acc Met Val Phe Ser Leu Ala Leu Gly Trp Thr Asn Met Leu Tyr Tyr Thr 545 550 555	1681
cgc ggt ttc cag cag atg ggc atc tat gcc gtc atg ata gag aag atg Arg Gly Phe Gln Gln Met Gly Ile Tyr Ala Val Met Ile Glu Lys Met 560 565 570	1729
atc ctg aga gac ctg tgc cgt ttc atg ttt gtc tac gtc gtc ttc ttg Ile Leu Arg Asp Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr Val Val Phe Leu 575 580 585	1777
ttc ggg ttt tcc aca gcg gtg gtg acg ctg att gaa gac ggg aag aat Phe Gly Phe Ser Thr Ala Val Val Thr Leu Ile Glu Asp Gly Lys Asn 590 595 600	1825
gac tcc ctg ccg tct gag tcc acg tcg cac agg tgg cgg ggg cct gcc Asp Ser Leu Pro Ser Glu Ser Thr Ser His Arg Trp Arg Gly Pro Ala 605 610 615 620	1873
tgc agg ccc ccc gat agc tcc tac aac agc ctg tac tcc acc tgc ctg Cys Arg Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Ser Thr Cys Leu 625 630 635	1921
gag ctg ttc aag ttc acc atc ggc atg ggc gac ctg gag ttc act gag Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu 640 645 650	1969
aac tat gac ttc aag gct gtc ttc atc atc ctg ctg ctg gcc tat gta Asn Tyr Asp Phe Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val 655 660 665	2017

att ctg acc tac atc ctc ctg ctc aac atg ctc atc gcc ctc atg ggt 2065
 Ile Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly
 670 675 680

gag act gtc aac aag atc gca cag gag agc aag aac atc tgg aag ctg 2113
 Glu Thr Val Asn Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu
 685 690 695 700

cag aga gcc atc acc atc ctg gac acg gag aag agc ttc ctt aag tgc 2161
 Gln Arg Ala Ile Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys
 705 710 715

atg agg aag gcc ttc cgc tca ggc aag ctg ctg cag gtg ggg tac aca 2209
 Met Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Tyr Thr
 720 725 730

cct gat ggc aag gac gac tac cgg tgg tgc ttc agg gtg gac gag gtg 2257
 Pro Asp Gly Lys Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val
 735 740 745

aac tgg acc acc tgg aac acc aac gtg ggc atc atc aac gaa gac ccg 2305
 Asn Trp Thr Thr Trp Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro
 750 755 760

ggc aac tgt gag ggc gtc aag cgc acc ctg agc ttc tcc ctg cgg tca 2353
 Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser
 765 770 775 780

agc aga gtt tca ggc aga cac tgg aag aac ttt gcc ctg gtc ccc ctt 2401
 Ser Arg Val Ser Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu
 785 790 795

tta aga gag gca agt gct cga gat agg cag tct gct cag ccc gag gaa 2449
 Leu Arg Glu Ala Ser Ala Arg Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu
 800 805 810

gtt tat ctg cga cag ttt tca ggg tct ctg aag cca gag gac gct gag 2497
 Val Tyr Leu Arg Gln Phe Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu
 815 820 825

gtc ttc aag agt cct gcc gct tcc ggg gag aag tgaaagccga attc 2544
 Val Phe Lys Ser Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys
 830 835

<210> 34

<211> 839

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu
 1 5 10 15

Gln	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Asp	Pro	Asn	Ser	Arg	20	25	30
Pro	Pro	Pro	Ala	Lys	Pro	Gln	Leu	Ser	Thr	Ala	Lys	Ser	Arg	Thr	Arg	35	40	45
Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Asp	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Pro	Val	Asp	Cys	Pro	50	55	60
His	Glu	Glu	Gly	Glu	Leu	Asp	Ser	Cys	Pro	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Pro	65	70	75
Val	Ile	Thr	Ile	Gln	Arg	Pro	Gly	Asp	Gly	Pro	Thr	Gly	Ala	Arg	Leu	85	90	95
Leu	Ser	Gln	Asp	Ser	Val	Ala	Ala	Ser	Thr	Glu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	100	105	110
Tyr	Asp	Arg	Arg	Ser	Ile	Phe	Glu	Ala	Val	Ala	Gln	Asn	Asn	Cys	Gln	115	120	125
Asp	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Lys	Ser	Lys	Lys	His	Leu	130	135	140
Thr	Asp	Asn	Glu	Phe	Lys	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Lys	Thr	Cys	Leu	Leu	145	150	155
Lys	Ala	Met	Leu	Asn	Leu	His	Asp	Gly	Gln	Asn	Thr	Thr	Ile	Pro	Leu	165	170	175
Leu	Leu	Glu	Ile	Ala	Arg	Gln	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Val	Asn	180	185	190
Ala	Ser	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Gln	Thr	Ala	Leu	His	Ile	195	200	205
Ala	Ile	Glu	Arg	Arg	Asn	Met	Ala	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Val	Glu	Asn	210	215	220
Gly	Ala	Asp	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	His	Gly	Asp	Phe	Phe	Lys	Lys	Thr	225	230	235
Lys	Gly	Arg	Pro	Gly	Phe	Tyr	Phe	Gly	Glu	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	245	250	255
Ala	Cys	Thr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ile	Val	Lys	Phe	Leu	Leu	Gln	Asn	Ser	260	265	270
Trp	Gln	Thr	Ala	Asp	Ile	Ser	Ala	Arg	Asp	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Val	275	280	285
Leu	His	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Ala	Asp	Asn	Thr	Ala	Asp	Asn	Thr	Lys	290	295	300
Phe	Val	Thr	Ser	Met	Tyr	Asn	Glu	Ile	Leu	Ile	Leu	Gly	Ala	Lys	Leu	305	310	315
His	Pro	Thr	Leu	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr	Asn	Lys	Lys	Gly	Met	Thr	325	330	335
Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Lys	Ile	Gly	Val	Leu	Ala	Tyr	340	345	350
Ile	Leu	Gln	Arg	Glu	Ile	Gln	Glu	Pro	Glu	Cys	Arg	His	Leu	Ser	Arg	355	360	365
Lys	Phe	Thr	Glu	Trp	Ala	Tyr	Gly	Pro	Val	His	Ser	Ser	Leu	Tyr	Asp	370	375	380
Leu	Ser	Cys	Ile	Asp	Thr	Cys	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Ile	385	390	395
Ala	Tyr	Ser	Ser	Ser	Glu	Thr	Pro	Asn	Arg	His	Asp	Met	Leu	Leu	Val	405	410	415
Glu	Pro	Leu	Asn	Arg	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Trp	Asp	Arg	Phe	Val	Lys	420	425	430
Arg	Ile	Phe	Tyr	Phe	Asn	Phe	Leu	Val	Tyr	Cys	Leu	Tyr	Met	Ile	Ile	435	440	445

Phe Thr Met Ala Ala Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gly Leu Pro Pro Phe
 450 455 460
 Lys Met Glu Lys Thr Gly Asp Tyr Phe Arg Val Thr Gly Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Ser Val Leu Gly Gly Val Tyr Phe Phe Phe Arg Gly Ile Gln Tyr Phe
 485 490 495
 Leu Gln Arg Arg Pro Ser Met Lys Thr Leu Phe Val Asp Ser Tyr Ser
 500 505 510
 Glu Met Leu Phe Phe Leu Gln Ser Leu Phe Met Leu Ala Thr Val Val
 515 520 525
 Leu Tyr Phe Ser His Leu Lys Glu Tyr Val Ala Ser Met Val Phe Ser
 530 535 540
 Leu Ala Leu Gly Trp Thr Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln
 545 550 555 560
 Gln Met Gly Ile Tyr Ala Val Met Ile Glu Lys Met Ile Leu Arg Asp
 565 570 575
 Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr Val Val Phe Leu Phe Gly Phe Ser
 580 585 590
 Thr Ala Val Val Thr Leu Ile Glu Asp Gly Lys Asn Asp Ser Leu Pro
 595 600 605
 Ser Glu Ser Thr Ser His Arg Trp Arg Gly Pro Ala Cys Arg Pro Pro
 610 615 620
 Asp Ser Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Glu Leu Phe Lys
 625 630 635 640
 Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu Asn Tyr Asp Phe
 645 650 655
 Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val Ile Leu Thr Tyr
 660 665 670
 Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Asn
 675 680 685
 Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu Gln Arg Ala Ile
 690 695 700
 Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys Met Arg Lys Ala
 705 710 715 720
 Phe Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Tyr Thr Pro Asp Gly Lys
 725 730 735
 Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn Trp Thr Thr
 740 745 750
 Trp Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu
 755 760 765
 Gly Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser Ser Arg Val Ser
 770 775 780
 Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu Ala
 785 790 795 800
 Ser Ala Arg Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg
 805 810 815
 Gln Phe Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser
 820 825 830
 Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys
 835

<210> 35

<211> 2380

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (19)...(231),

<223> Human VR2

<400> 35

cagcctcctc ctcctagg	atg acc tca ccc tcc agc tct cca gtt ttc agg	51
	Met Thr Ser Pro Ser Ser Ser Pro Val Phe Arg	
	1 5 10	
ttg gag aca tta gat gga ggc caa gaa gat ggc tct gag gcg gac aga		99
Leu Glu Thr Leu Asp Gly Gly Gln Glu Asp Gly Ser Glu Ala Asp Arg		
	15 20 25	
gga aag ctg gat ttt ggg agc ggg ctg cct ccc atg gag tca cag ttc		147
Gly Lys Leu Asp Phe Gly Ser Gly Leu Pro Pro Met Glu Ser Gln Phe		
	30 35 40	
cag ggc gag gac cgg aaa ttc gcc cct cag ata aga gtc aac ctc aac		195
Gln Gly Glu Asp Arg Lys Phe Ala Pro Gln Ile Arg Val Asn Leu Asn		
	45 50 55	
tac cga aag gga aca ggt gcc agt cag ccg gat cca aac cga ttt gac		243
Tyr Arg Lys Gly Thr Gly Ala Ser Gln Pro Asp Pro Asn Arg Phe Asp		
	60 65 70 75	
cga gat cgg ctc ttc aat gcg gtc tcc cgg ggt gtc ccc gag gat ctg		291
Arg Asp Arg Leu Phe Asn Ala Val Ser Arg Gly Val Pro Glu Asp Leu		
	80 85 90	
gct gga ctt cca gag tac ctg agc aag acc agc aag tac ctc acc gac		339
Ala Gly Leu Pro Glu Tyr Leu Ser Lys Thr Ser Lys Tyr Leu Thr Asp		
	95 100 105	
tcg gaa tac aca gag ggc tcc aca ggt aag acg tgc ctg atg aag gct		387
Ser Glu Tyr Thr Glu Gly Ser Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala		
	110 115 120	
gtg ctg aac ctt aag gac gga gtc aat gcc tgc att ctg cca ctg ctg		435
Val Leu Asn Leu Lys Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Leu Pro Leu Leu		
	125 130 135	
cag atc gac agg gac tct ggc aat cct cag ccc ctg gta aat gcc cag		483
Gln Ile Asp Arg Asp Ser Gly Asn Pro Gln Pro Leu Val Asn Ala Gln		
	140 145 150 155	
tgc aca gat gac tat tac cga ggc cac agc gct ctg cac atc gcc att		531
Cys Thr Asp Asp Tyr Tyr Arg Gly His Ser Ala Leu His Ile Ala Ile		
	160 165 170	
gag aag agg agt ctg cag tgt gtg aag ctc ctg gtg gag aat ggg gcc		579
Glu Lys Arg Ser Leu Gln Cys Val Lys Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala		
	175 180 185	

aat gtg cat gcc cgg gcc tgc ggc cgc ttc ttc cag aag ggc caa ggg Asn Val His Ala Arg Ala Cys Gly Arg Phe Phe Gln Lys Gly Gln Gly 190 195 200	627
act tgc ttt tat ttc ggt gag cta ccc ctc tct ttg gcc gct tgc acc Thr Cys Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr 205 210 215	675
aag cag tgg gat gtg gta agc tac ctc ctg gag aac cca cac cag ccc Lys Gln Trp Asp Val Val Ser Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro 220 225 230 235	723
gcc agc ctg cag gcc act gac tcc cag ggc aac aca gtc ctg cat gcc Ala Ser Leu Gln Ala Thr Asp Ser Gln Gly Asn Thr Val Leu His Ala 240 245 250	771
cta gtg atg atc tcg gac aac tca gct gag aac att gca ctg gtg acc Leu Val Met Ile Ser Asp Asn Ser Ala Glu Asn Ile Ala Leu Val Thr 255 260 265	819
agc atg tat gat ggg ctc ctc caa gct ggg gcc cgc ctc tgc cct acc Ser Met Tyr Asp Gly Leu Leu Gln Ala Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr 270 275 280	867
gtg cag ctt gag gac atc cgc aac ctg cag gat ctc acg cct ctg aag Val Gln Leu Glu Asp Ile Arg Asn Leu Gln Asp Leu Thr Pro Leu Lys 285 290 295	915
ctg gcc gcc aag gag ggc aag atc gag att ttc agg cac atc ctg cag Leu Ala Ala Lys Glu Gly Lys Ile Glu Ile Phe Arg His Ile Leu Gln 300 305 310 315	963
cgg gag ttt tca gga ctg agc cac ctt tcc cga aag ttc acc gag tgg Arg Glu Phe Ser Gly Leu Ser His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp 320 325 330	1011
tgc tat ggg cct gtc cgg gtg tcg ctg tat gac ctg gct tct gtg gac Cys Tyr Gly Pro Val Arg Val Ser Leu Tyr Asp Leu Ala Ser Val Asp 335 340 345	1059
agc tgt gag gag aac tca gtg ctg gag atc att gcc ttt cat tgc aag Ser Cys Glu Glu Asn Ser Val Leu Glu Ile Ile Ala Phe His Cys Lys 350 355 360	1107
agc ccg cac cga cac cga atg gtc gtt ttg gag ccc ctg aac aaa ctg Ser Pro His Arg His Arg Met Val Val Leu Glu Pro Leu Asn Lys Leu 365 370 375	1155
ctg cag gcg aaa tgg gat ctg ctc atc ccc aag ttc ttc tta aac ttc Leu Gln Ala Lys Trp Asp Leu Leu Ile Pro Lys Phe Phe Leu Asn Phe 380 385 390 395	1203
ctg tgt aat ctg atc tac atg ttc atc ttc acc gct gtt gcc tac cat Leu Cys Asn Leu Ile Tyr Met Phe Ile Phe Thr Ala Val Ala Tyr His 400 405 410	1251

cag cct acc ctg aag aag cag gcc gcc cct cac ctg aaa gcg gag gtt Gln Pro Thr Leu Lys Lys Gln Ala Ala Pro His Leu Lys Ala Glu-Val 415 420 425	1299
gga aac tcc atg ctg ctg acg ggc cac atc ctc atc ctg cta ggg ggg Gly Asn Ser Met Leu Leu Thr Gly His Ile Leu Ile Leu Leu Gly Gly 430 435 440	1347
atc tac ctc ctc gtg ggc cag ctg tgg tac ttc tgg cgg cgc cac gtg Ile Tyr Leu Leu Val Gly Gln Leu Trp Tyr Phe Trp Arg Arg His Val 445 450 455	1395
ttc atc tgg atc tcg ttc ata gac agc tac ttt gaa atc ctc ttc ctg Phe Ile Trp Ile Ser Phe Ile Asp Ser Tyr Phe Glu Ile Leu Phe Leu 460 465 470 475	1443
ttc cag gcc ctg ctc aca gtg gtg tcc cag gtg ctg tgt ttc ctg gcc Phe Gln Ala Leu Leu Thr Val Val Ser Gln Val Leu Cys Phe Leu Ala 480 485 490	1491
atc gag tgg tac ctg ccc ctg ctt gtg tct gcg ctg gtg ctg ggc tgg Ile Glu Trp Tyr Leu Pro Leu Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Gly Trp 495 500 505	1539
ctg aac ctg ctt tac tat aca cgt ggc ttc cag cac aca ggc atc tac Leu Asn Leu Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln His Thr Gly Ile Tyr 510 515 520	1587
agt gtc atg atc cag aag gtc atc ctg cgg gac ctg ctg cgc ttc ctt Ser Val Met Ile Gln Lys Val Ile Leu Arg Asp Leu Leu Arg Phe Leu 525 530 535	1635
ctg atc tac tta gtc ttc ctt ttc ggc ttc gct gta gcc ctg gtg agc Leu Ile Tyr Leu Val Phe Leu Phe Gly Phe Ala Val Ala Leu Val Ser 540 545 550 555	1683
ctg agc cag gag gct tgg cgc ccc gaa gct cct aca ggc ccc aat gcc Leu Ser Gln Glu Ala Trp Arg Pro Glu Ala Pro Thr Gly Pro Asn Ala 560 565 570	1731
aca gag tca gtg cag ccc atg gag gga cag gag gac gag ggc aac ggg Thr Glu Ser Val Gln Pro Met Glu Gly Gln Glu Asp Glu Gly Asn Gly 575 580 585	1779
gcc cag tac agg ggt atc ctg gaa gcc tcc ttg gag ctc ttc aaa ttc Ala Gln Tyr Arg Gly Ile Leu Glu Ala Ser Leu Glu Leu Phe Lys Phe 590 595 600	1827
acc atc ggc atg ggc gag ctg gcc ttc cag gag cag ctg cac ttc cgc Thr Ile Gly Met Gly Glu Leu Ala Phe Gln Glu Gln Leu His Phe Arg 605 610 615	1875

ggc atg gtg ctg ctg ctg ctg ctg gcc tac gtg ctg ctc acc tac atc 1923
 Gly Met Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala Tyr Val Leu Leu Thr Tyr Ile
 620 625 630 635

ctg ctg ctc aac atg ctc atc gcc ctc atg agc gag acc gtc aac agt 1971
 Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Ser Glu Thr Val Asn Ser
 640 645 650

gtc gcc act gac agc tgg agc atc tgg aag ctg cag aaa gcc atc tct 2019
 Val Ala Thr Asp Ser Trp Ser Ile Trp Lys Leu Gln Lys Ala Ile Ser
 655 660 665

gtc ctg gag atg gag aat ggc tat tgg tgg tgc agg aag aag cag cgg 2067
 Val Leu Glu Met Glu Asn Gly Tyr Trp Trp Cys Arg Lys Lys Gln Arg
 670 675 680

gca ggt gtg atg ctg acc gtt ggc act aag cca gat ggc agc ccc gat 2115
 Ala Gly Val Met Leu Thr Val Gly Thr Lys Pro Asp Gly Ser Pro Asp
 685 690 695

gag cgc tgg tgc ttc agg gtg gag gag gtg aac tgg gct tca tgg gag 2163
 Glu Arg Trp Cys Phe Arg Val Glu Glu Val Asn Trp Ala Ser Trp Glu
 700 705 710 715

cag acg ctg cct acg ctg tgt gag gac ccg tca ggg gca ggt gtc cct 2211
 Gln Thr Leu Pro Thr Leu Cys Glu Asp Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro
 720 725 730

cga act ctc gag aac cct gtc ctg gct tcc cct ccc aag gag gat gag 2259
 Arg Thr Leu Glu Asn Pro Val Leu Ala Ser Pro Pro Lys Glu Asp Glu
 735 740 745

gat ggt gcc tct gag gaa aac tat gtg ccc gtc cag ctc ctc cag tcc 2307
 Asp Gly Ala Ser Glu Glu Asn Tyr Val Pro Val Gln Leu Leu Gln Ser
 750 755 760

aac tga tggcccagat gcagcaggag gccagaggac agagcagagg atctttccaa 2363
 Asn *

ccacatctgc tggctct 2380

<210> 36
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Met Thr Ser Pro Ser Ser Ser Pro Val Phe Arg Leu Glu Thr Leu Asp
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Glu Asp Gly Ser Glu Ala Asp Arg Gly Lys Leu Asp Phe
 20 25 30
 Gly Ser Gly Leu Pro Pro Met Glu Ser Gln Phe Gln Gly Glu Asp Arg
 35 40 45

Lys Phe Ala Pro Gln Ile Arg Val Asn Leu Asn Tyr Arg Lys Gly Thr
 50 55 60
 Gly Ala Ser Gln Pro Asp Pro Asn Arg Phe Asp Arg Asp Arg Leu Phe
 65 70 75 80
 Asn Ala Val Ser Arg Gly Val Pro Glu Asp Leu Ala Gly Leu Pro Glu
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Lys Thr Ser Lys Tyr Leu Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Glu
 100 105 110
 Gly Ser Thr Gly Lys Thr Cys Leu Met Lys Ala Val Leu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Leu Pro Leu Leu Gln Ile Asp Arg Asp
 130 135 140
 Ser Gly Asn Pro Gln Pro Leu Val Asn Ala Gln Cys Thr Asp Asp Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Gly His Ser Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Lys Arg Ser Leu
 165 170 175
 Gln Cys Val Lys Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala Asn Val His Ala Arg
 180 185 190
 Ala Cys Gly Arg Phe Phe Gln Lys Gly Gln Gly Thr Cys Phe Tyr Phe
 195 200 205
 Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Lys Gln Trp Asp Val
 210 215 220
 Val Ser Tyr Leu Leu Glu Asn Pro His Gln Pro Ala Ser Leu Gln Ala
 225 230 235 240
 Thr Asp Ser Gln Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Met Ile Ser
 245 250 255
 Asp Asn Ser Ala Glu Asn Ile Ala Leu Val Thr Ser Met Tyr Asp Gly
 260 265 270
 Leu Leu Gln Ala Gly Ala Arg Leu Cys Pro Thr Val Gln Leu Glu Asp
 275 280 285
 Ile Arg Asn Leu Gln Asp Leu Thr Pro Leu Lys Leu Ala Ala Lys Glu
 290 295 300
 Gly Lys Ile Glu Ile Phe Arg His Ile Leu Gln Arg Glu Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Ser His Leu Ser Arg Lys Phe Thr Glu Trp Cys Tyr Gly Pro Val
 325 330 335
 Arg Val Ser Leu Tyr Asp Leu Ala Ser Val Asp Ser Cys Glu Glu Asn
 340 345 350
 Ser Val Leu Glu Ile Ile Ala Phe His Cys Lys Ser Pro His Arg His
 355 360 365
 Arg Met Val Val Leu Glu Pro Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ala Lys Trp
 370 375 380
 Asp Leu Leu Ile Pro Lys Phe Phe Leu Asn Phe Leu Cys Asn Leu Ile
 385 390 395 400
 Tyr Met Phe Ile Phe Thr Ala Val Ala Tyr His Gln Pro Thr Leu Lys
 405 410 415
 Lys Gln Ala Ala Pro His Leu Lys Ala Glu Val Gly Asn Ser Met Leu
 420 425 430
 Leu Thr Gly His Ile Leu Ile Leu Leu Gly Gly Ile Tyr Leu Leu Val
 435 440 445
 Gly Gln Leu Trp Tyr Phe Trp Arg Arg His Val Phe Ile Trp Ile Ser
 450 455 460
 Phe Ile Asp Ser Tyr Phe Glu Ile Leu Phe Leu Phe Gln Ala Leu Leu
 465 470 475 480

Thr Val Val Ser Gln Val Leu Cys Phe Leu Ala Ile Glu Trp Tyr Leu
 485 490 495
 Pro Leu Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Gly Trp* Leu Asn Leu Leu Tyr
 500 505 510
 Tyr Thr Arg Gly Phe Gln His Thr Gly Ile Tyr Ser Val Met Ile Gln
 515 520 525
 Lys Val Ile Leu Arg Asp Leu Leu Arg Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Val
 530 535 540
 Phe Leu Phe Gly Phe Ala Val Ala Leu Val Ser Leu Ser Gln Glu Ala
 545 550 555 560
 Trp Arg Pro Glu Ala Pro Thr Gly Pro Asn Ala Thr Glu Ser Val Gln
 565 570 575
 Pro Met Glu Gly Gln Glu Asp Glu Gly Asn Gly Ala Gln Tyr Arg Gly
 580 585 590
 Ile Leu Glu Ala Ser Leu Glu Leu Phe Lys Phe Thr Ile Gly Met Gly
 595 600 605
 Glu Leu Ala Phe Gln Glu Gln Leu His Phe Arg Gly Met Val Leu Leu
 610 615 620
 Leu Leu Leu Ala Tyr Val Leu Leu Thr Tyr Ile Leu Leu Leu Asn Met
 625 630 635 640
 Leu Ile Ala Leu Met Ser Glu Thr Val Asn Ser Val Ala Thr Asp Ser
 645 650 655
 Trp Ser Ile Trp Lys Leu Gln Lys Ala Ile Ser Val Leu Glu Met Glu
 660 665 670
 Asn Gly Tyr Trp Trp Cys Arg Lys Lys Gln Arg Ala Gly Val Met Leu
 675 680 685
 Thr Val Gly Thr Lys Pro Asp Gly Ser Pro Asp Glu Arg Trp Cys Phe
 690 695 700
 Arg Val Glu Glu Val Asn Trp Ala Ser Trp Glu Gln Thr Leu Pro Thr
 705 710 715 720
 Leu Cys Glu Asp Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Arg Thr Leu Glu Asn
 725 730 735
 Pro Val Leu Ala Ser Pro Pro Lys Glu Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu
 740 745 750
 Glu Asn Tyr Val Pro Val Gln Leu Leu Gln Ser Asn
 755 760

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

ggcgacctgg agttcactga g

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

gagcaggagg atgtaggatga g

21

<210> 39

<211> 226

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

ctgcagcttc	cagatgttct	tgtctctctg	tgcgatcttg	ttgacagtct	cacccatgag	60
ggcgatgagc	atgttgagca	ggaggatgta	ggtgagaatt	acataggcca	gcagcaggat	120
gatgaagaca	gccttgaagt	catagttctc	agtgaactcc	aggtcgcca	tgccgatggt	180
gaacttgaac	agctccaggc	agggtggagta	caggctgttg	taggag		226

<210> 40

<211> 226

<212> DNA

<213> R. rattus

<400> 40

gagaatgttg	tccgacataa	ggtgtacaga	cctcgacaag	ttcaagtggg	agccgtaccc	60
gctggacctc	aagtgactct	tgatgctgaa	gttccgacag	aagtagtagg	acaatgaccg	120
gatacactaa	gagtggatgt	aggaagacga	gttgtagcag	taacgagagt	accactctg	180
gcagttgttc	taacgtgttc	tctcgttctt	gtagaccttc	gacgtc		226

<210> 41

<211> 145

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

aagacctcag	cgctctctgg	cttcagagac	cctgnaaaac	tgtcgcagat	aaacttcttc	60
gggctgagca	nactgcctat	ctcgagcact	tgctctcttt	aaaaggggga	ccagggcaaa	120
gttcttccag	tgtctgcctg	aaact				145

<210> 42

<211> 144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

tcaaagtccg	tctgtgacct	tcttgaaacg	ggaccagggg	gaaaattctc	tccgttcang	60
agctntatcc	gtcagacgag	tccgggtcct	tcaaatagac	gctgtcaaaa	gtcccagaga	120
tttcgggtctc	ctgcgactcc	agaa				144

<210> 43

<211> 219

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

cccactccaa	aaggacacct	gccagaccc	cctggatgga	gaccctaact	ccaggccacc	60
tccagccaag	cccagctct	ccacggccaa	gagccgcacc	cggctctttg	ggaaggggtga	120
ctcggaggag	gctttcccgg	tggattgcc	tcacgaggaa	ggtgagctgg	actcctgcc	180
gaccatcaca	gtcagccctg	ttatcaccat	ccagaggcc			219

<210> 44

<211> 219

<212> DNA

<213> R. rattus

<400> 44

```

cccaccccaa gagaactcct gcctggaccc tccagacaga gaccctaact gcaagccacg      60
tccagtcaag cccacatct tcaactaccag gagtcgtac cggttttttg ggaagggtg      120
ctcggaggag gcctctcccc tggactgccc ttatgaggaa ggcgggctgg cttcctgcc      180
tatcatcact gtcagctctg ttctaactat ccagaggcc      219

```

<210> 45

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

```

Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu
 1          5          10          15
Gln Lys Asp Thr Cys Pro Asp Pro Leu Asp Gly Asp Pro Asn Ser Arg
          20          25          30
Pro Pro Pro Ala Lys Pro Gln Leu Ser Thr Ala Lys Ser Arg Thr Arg
          35          40          45
Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe Pro Val Asp Cys Pro
          50          55          60
His Glu Glu Gly Glu Leu Asp Ser Cys Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro
65          70          75          80
Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Arg Xaa Arg Pro
          85          90

```

<210> 46

<211> 91

<212> PRT

<213> R. rattus

<400> 46

```

Met Glu Gln Arg Ala Ser Leu Asp Ser Glu Glu Ser Glu Ser Pro Pro
 1          5          10          15
Gln Glu Asn Ser Cys Leu Asp Pro Pro Asp Arg Asp Pro Asn Cys Lys
          20          25          30
Pro Pro Pro Val Lys Pro His Ile Phe Thr Thr Arg Ser Arg Thr Arg
          35          40          45
Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Ser Pro Leu Asp Cys Pro
          50          55          60
Tyr Glu Glu Gly Gly Leu Ala Ser Cys Pro Ile Ile Thr Val Ser Ser
65          70          75          80
Val Leu Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro
          85          90

```

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

```

agaaatggag cagcacagac ttgg      24

```

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

tcactttctcc ccggaagcgg cag

23

Patentansprüche

1. Isoliertes Capsaicinrezeptor-Polypeptid, worin das Polypeptid ein VR2-Untertyp ist, der zumindest 90%ige Sequenzähnlichkeit mit Seq.-ID Nr. 36 aufweist.
2. Isolierteres Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach Anspruch 1, das zumindest 95%ige Sequenzähnlichkeit mit Seq.-ID Nr. 36 aufweist.
3. Isoliertes Human-Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach Anspruch 1, das Seq.-ID Nr. 36 umfasst.
4. Isolierte Polynucleotidsequenz, die für ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.
5. Isolierte Polynucleotidsequenz nach Anspruch 4, die Seq.-ID Nr. 35 umfasst.
6. Rekombinanter Expressionsvektor, der eine Polynucleotidsequenz nach Anspruch 4 oder 5 umfasst.
7. Rekombinante Wirtszelle, die eine Polynucleotidsequenz nach Anspruch 4 oder 5 oder einen Vektor nach Anspruch 6 enthält.
8. Verfahren zur Herstellung eines Capsaicinrezeptor-Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
 - a) das Kultivieren einer rekombinanten Wirtszelle, die eine für Capsaicinrezeptor-Polypeptid kodierende Polynucleotidsequenz nach Anspruch 4 oder 5 enthält, unter Bedingungen, die für die Expression des Polypeptids geeignet sind; und
 - b) das Gewinnen des Polypeptids aus der Wirtszellenkultur.
9. Isolierter Antikörper, der spezifisch ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 bindet.
10. Verfahren zum Identifizieren von Verbindungen, die ein Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
 - das In-Kontakt-Bringen des Capsaicinrezeptor-Polypeptids mit einer Testverbindung; und
 - das Detektieren von spezifischer Bindung der Testverbindung an das Capsaicinrezeptor-Polypeptid.
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin das Detektieren durch Detektieren einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration in der Capsaicinrezeptor exprimierenden Wirtszelle erfolgt.
12. Verfahren zum Screenen bezüglich biologischer Wirkstoffe, welche die Capsaicinrezeptor-Funktion modulieren, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
 - das Kombinieren eines Kandidatenmittels mit einem Beliebigen von:
 - (a) einem Säugetier-Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3;
 - b) einer Zelle, die eine Nucleinsäure enthält, die für ein Säugetier-Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert; oder
 - (c) einem nicht-menschlichen transgenen Tier-Modell für die Funktion eines Capsaicinrezeptor-Gens, das für ein Polynucleotid nach Anspruch 4 oder 5 kodiert, umfassend eines von:
 - (i) einem Knockout des Capsaicinrezeptorgens;
 - (ii) einer exogenen und stabil übertragenen Säugetier-Capsaicinrezeptor-Gen-Sequenz; oder
 - (iii) einer Capsaicinrezeptor-Promotorsequenz, die mit einem Reportergen operabel verbunden ist; und
 - das Bestimmen der Wirkung des Mittels auf die Capsaicinrezeptor-Funktion.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein im Wesentlichen gereinigtes Capsaicinrezeptor-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und einen geeigneten pharmazeutischen Träger umfasst.
14. Nicht-menschliches transgenes Tiermodell für Capsaicinrezeptorgen-Funktion, worin das transgene

DE 699 10 538 T2 2004.06.24

Tier dadurch gekennzeichnet ist, dass es in Bezug auf ein normales Tier derselben Spezies eine Veränderung der Capsaicinrezeptor-Funktion aufweist, für die ein Polynucleotid nach einem der Ansprüche 4 bis 5 kodiert.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

MEQRA SLDSEESPPQENSCLDPPDRDPNCKPPPVKPHI FT T T R S R 46
 TRLFGKGDSEEA SPLDCPYEEGGCLASCP I I TVSSVLT I QRP GDGPAS 93
 VRPSSQDSSV SAGEKPPRLYDRRSIFDAVAQSNQCQELLESLLPFLQRSK 140
 KRLTDSEFKDPE T GKTCLLKAMLNLHNGQNDTIALLLDVARKTDSLK 187
 QFVNAS YTD S Y Y KGQTALHIAIERRNM TLLV TLLVENGADVQAANGD 234
 FFKKT KGRPGFY FGELPLSLAACTNQLAIVKFL LQNSWQPADISAR D 281
 SVGNTVLHALVEVADNTVDNTKFTV TSMYNEI LILGAKLHPT LKLEEIT 329
 NR KGLTPLAALASSGKIGVLAYILQREIHEPECRH LSRKFT EWAYGP 376
 VHSSLYDLSCIDTCEKNSVLEVIAYSSSETPNRHDM L LVEPLNRLLQ 423
 DKWDRFVKR IFYFNFFVYCLYMIIF TAAAYY RPVEGLPPYK LKNTVG 470
 DYFRVTGEI LSVSGGVYFFFRGIQY FLQRRPS LKSLFVD SYSEILFFV 518
QSLFMLVSVVLYFSQRKEYVASMV FLAMGW T NMLYYTRG FQ Q MGI 564
YAVMI EKMILRD LCRFMFVYL VFLFGFSTAVV T L IEDGKNNSLPMEST 612
 PHKCRGSACKP GNSYNSLYSTC LELFKFTIGMG D L EFTENYD FKAVF 659
IILLAYVILT Y ILLNMLIALMGE TVNKIAQESKNIWKLQRAITILDTE 709
 KSFLKCMRKAFRSCKLLQVGFTPDGKDDYRWCFRVDENVNTTWN T 754
 NVGIINEDPGNCEGVKRTL SFSLSRSGRVSGRNWKNFALVPLLRDAST 801
 RDRHATQQEEVQLKH YTGSLKPEDAEVFKDSMVPGEK SEQ ID NO: 2 838

FIG. 1A

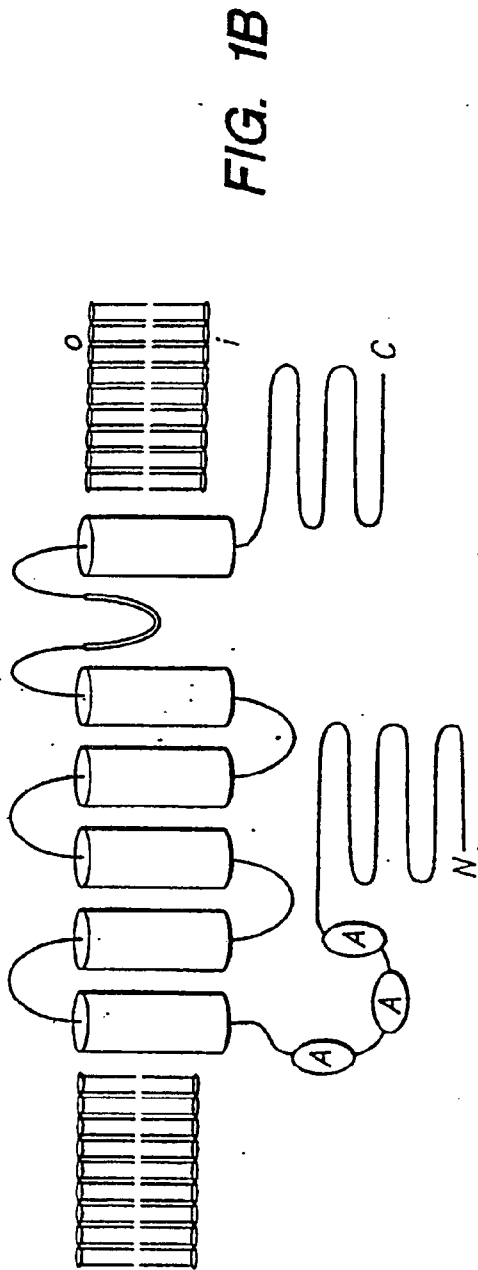


FIG. 1C

Ratten-VR1	636	E L F K F T I G M G D L . . . E F T E N Y D F K A . V F I I L L L . A Y V I L T	670
Human T12251		E L F K F T I G M G E L . . . A F Q E Q L H F R G . M V L L L L L . A Y V L L T	
Caliphora z80230		S L F W A S F G L V D L V S F D L A G I K S F F T R . F W A L L M F G S Y S V I N	
Drosophila TRP		S L F W A S F G L V D L V S F D L A G I K S F F T R . F W A L L M F G S Y S V I N	
Rinder- x99792		S L F W S I F G L I N L Y V T N V K A Q H E F T E . F V G A T M F G T Y N V I S	
C. elegans z72508		R T F I M T I G E F S V L Y R E M S A C D N F W M K W I G K L I F V I F E T F V	
Ratten-VR1	671	Y I L L N M L I A L M G E T V N K I A Q E S K N I W K L Q R A I T I L	706
Human T12251		Y I L L N M L I A L M S E I T V N S V I A T I D	
Caliphora z80230		I I V L L N M L I A M M S N S Y Q I I I S E R A D V E W K F A R S Q L W M	
Drosophila TRP		I I V L L N M L I A M M S N S Y Q I I I S E R A D T E W K F A R S Q L W M	
Rinder- x99792		L V V L L N M L I A M M N N S Y Q L I A D H A D I E W K F A R T K L W M	
C. elegans z72508		S I L Q F N L L I A M M T R T Y E T I F L	

(SEQ ID NO: 14)
(SEQ ID NO: 15)
(SEQ ID NO: 16)
(SEQ ID NO: 17)
(SEQ ID NO: 18)
(SEQ ID NO: 19)

Capsaicin 1 μM

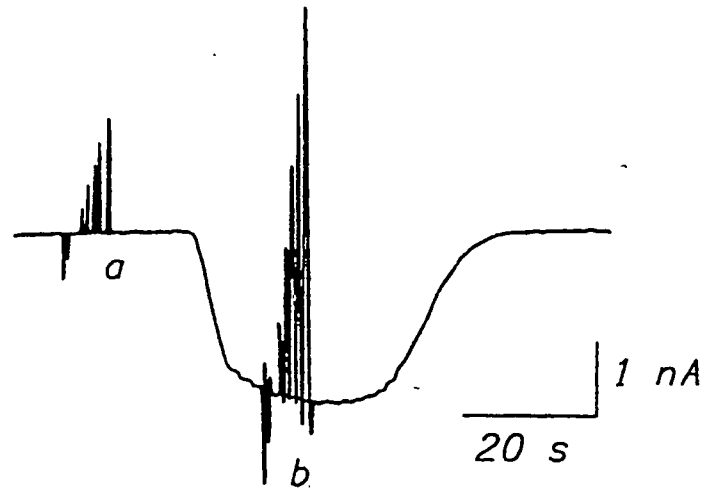


FIG. 2

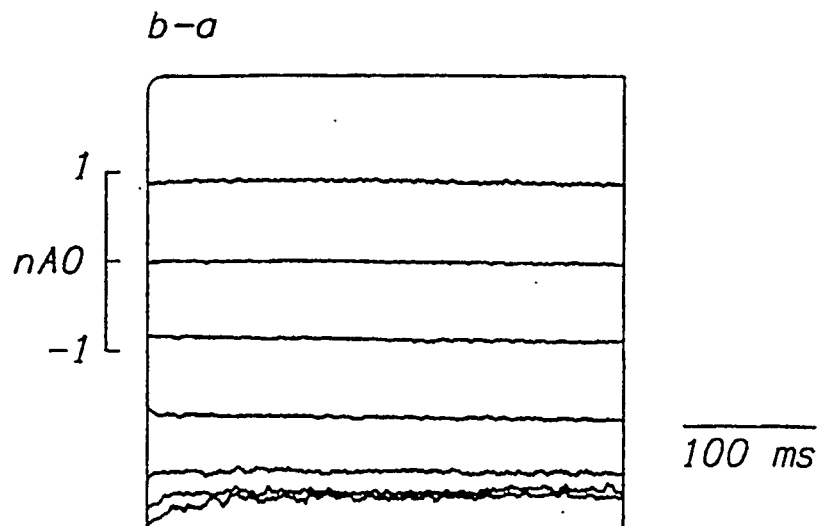


FIG. 3

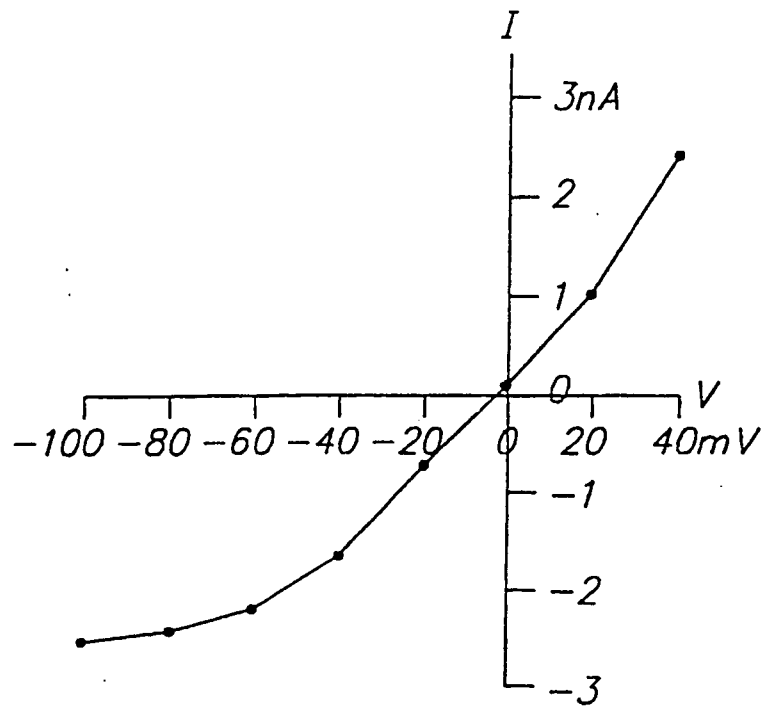


FIG. 4

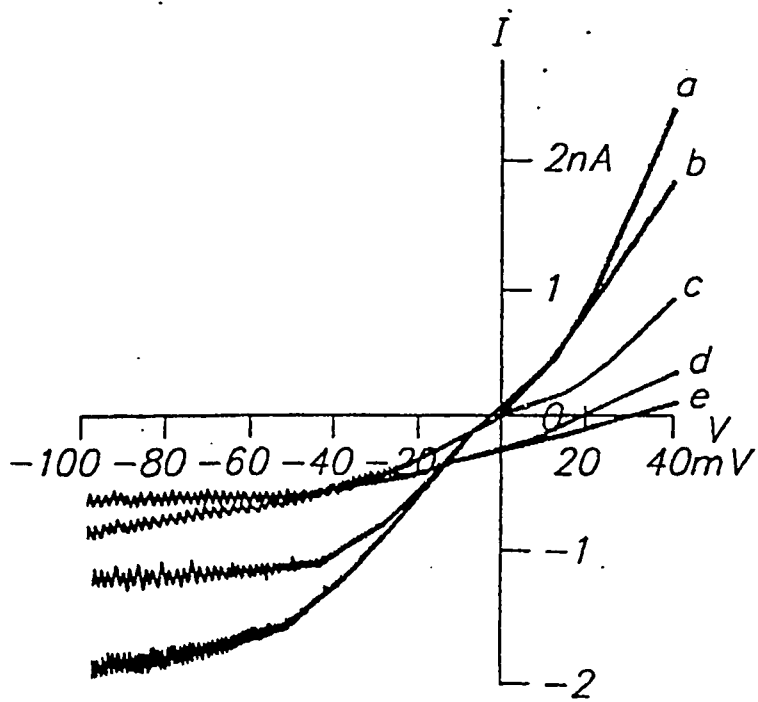
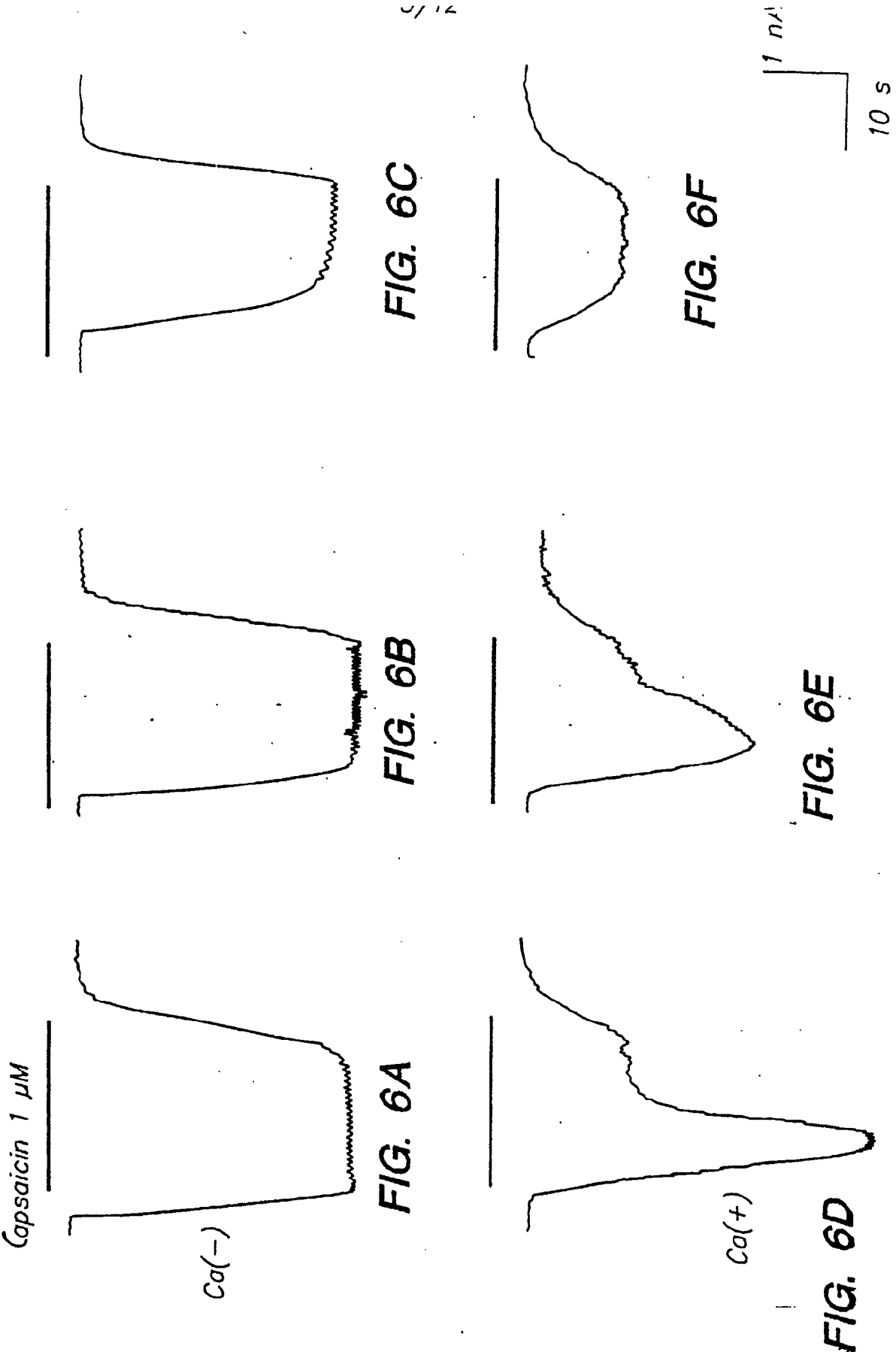


FIG. 5



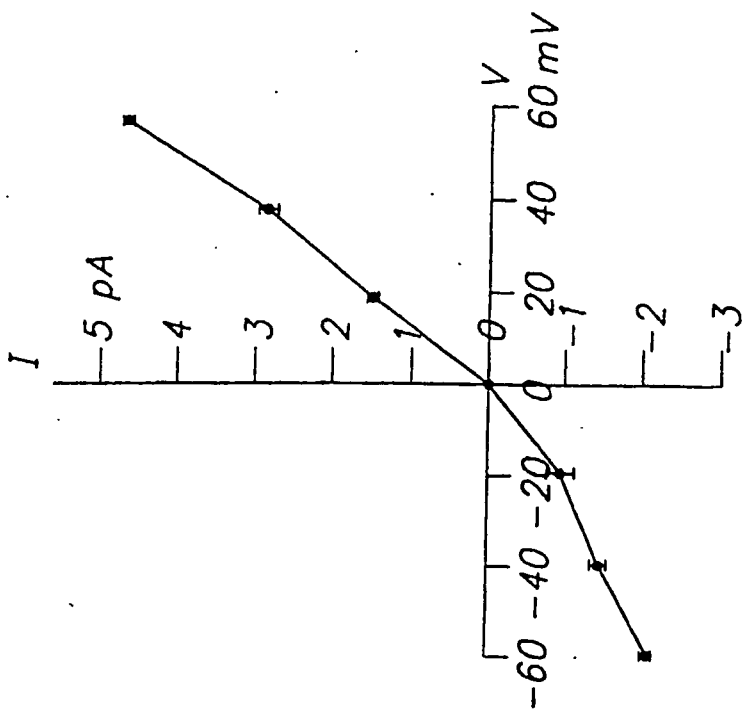


FIG. 8

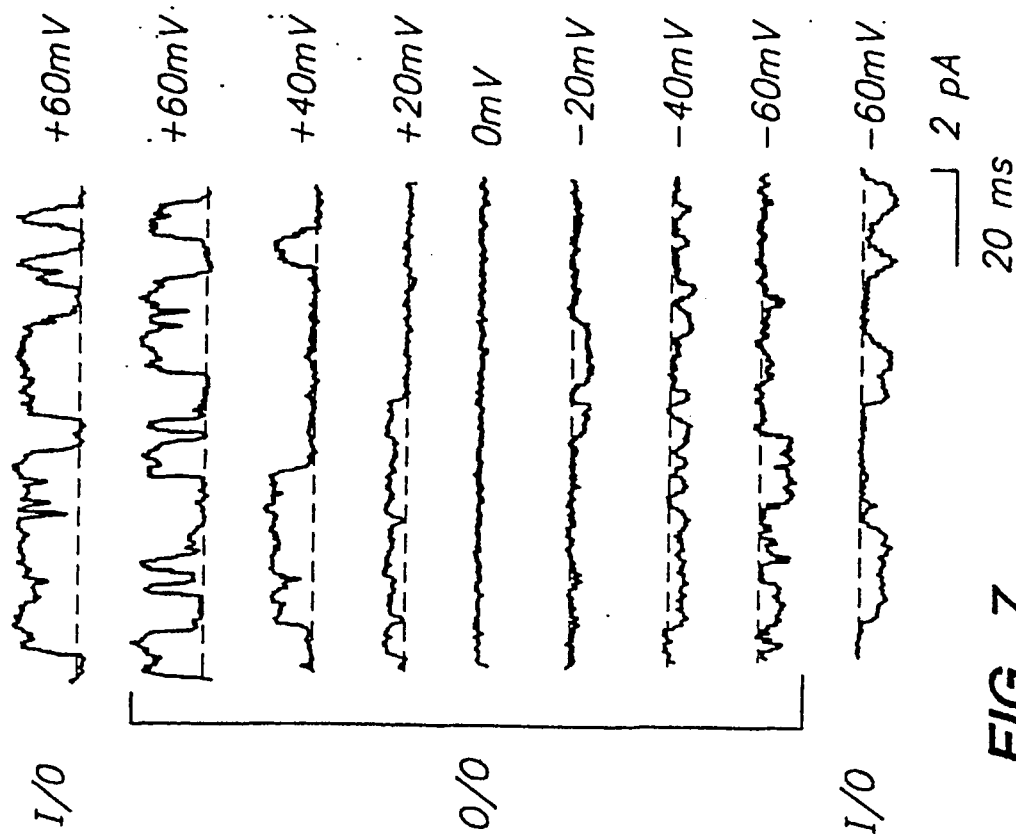


FIG. 7

FIG. 9A

Capsaicin (1 μ M) Resiniferatoxin (0.1 μ M)

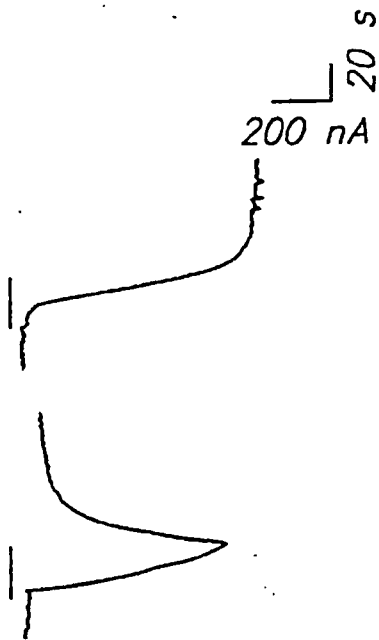


FIG. 10A

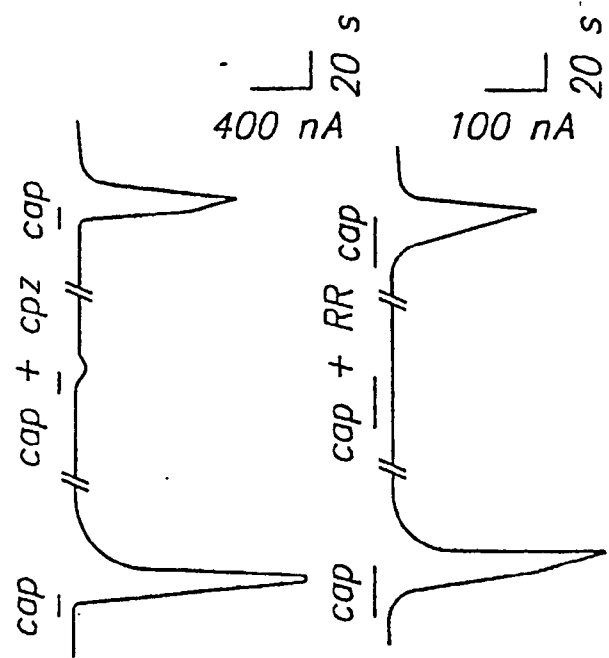


FIG. 9B

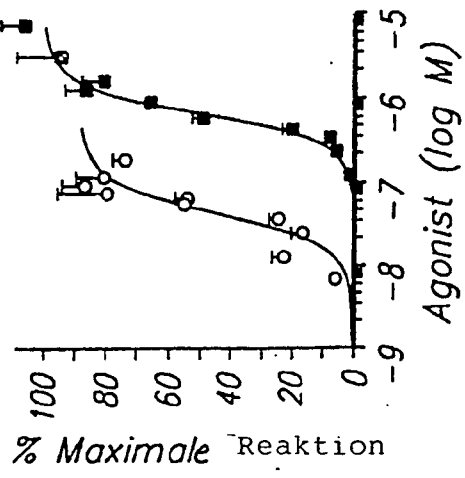


FIG. 10B

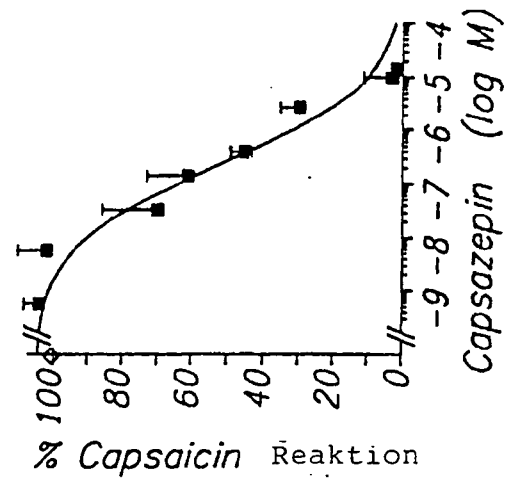
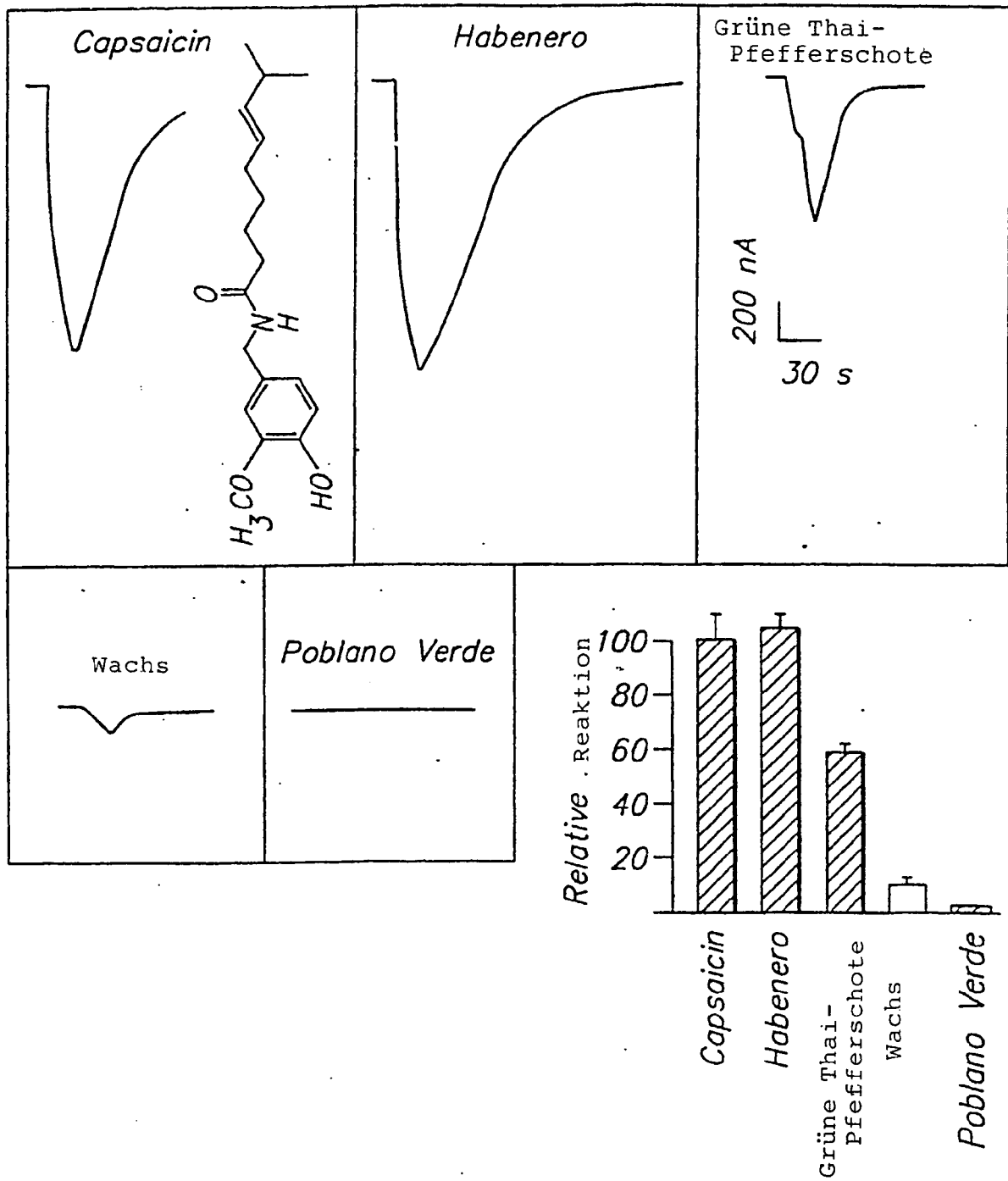


FIG. 11



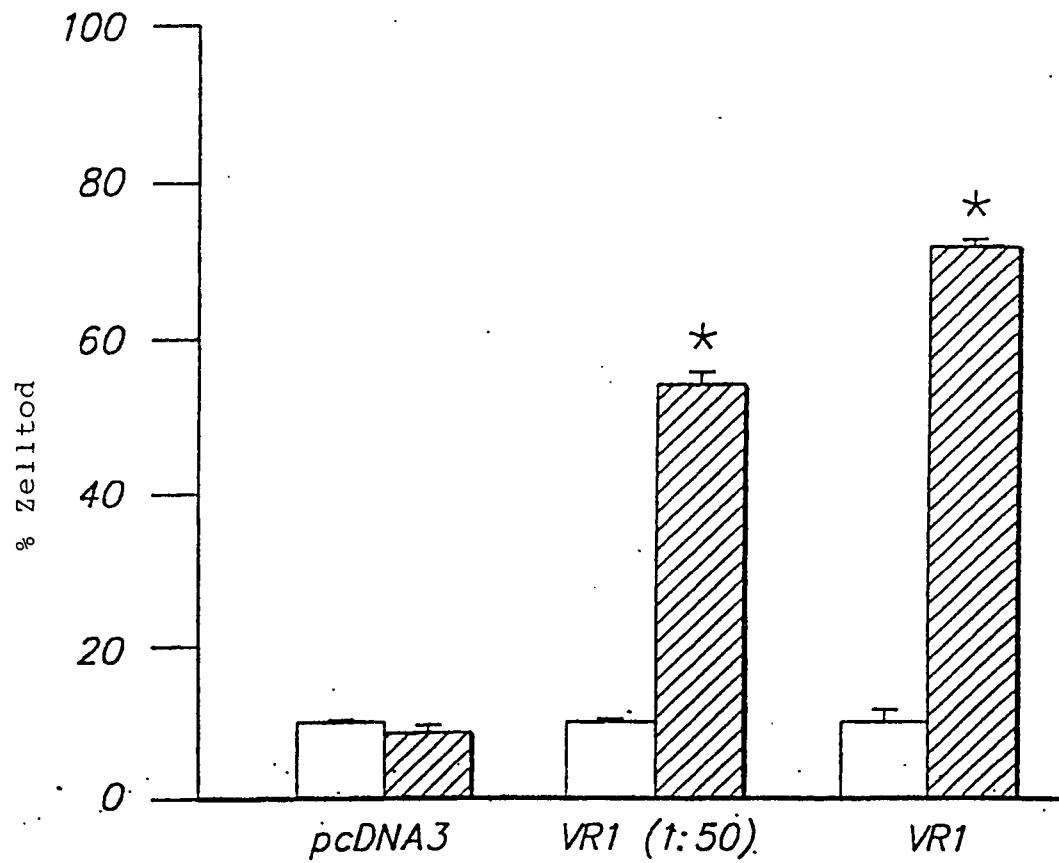


FIG. 12

FIG. 13

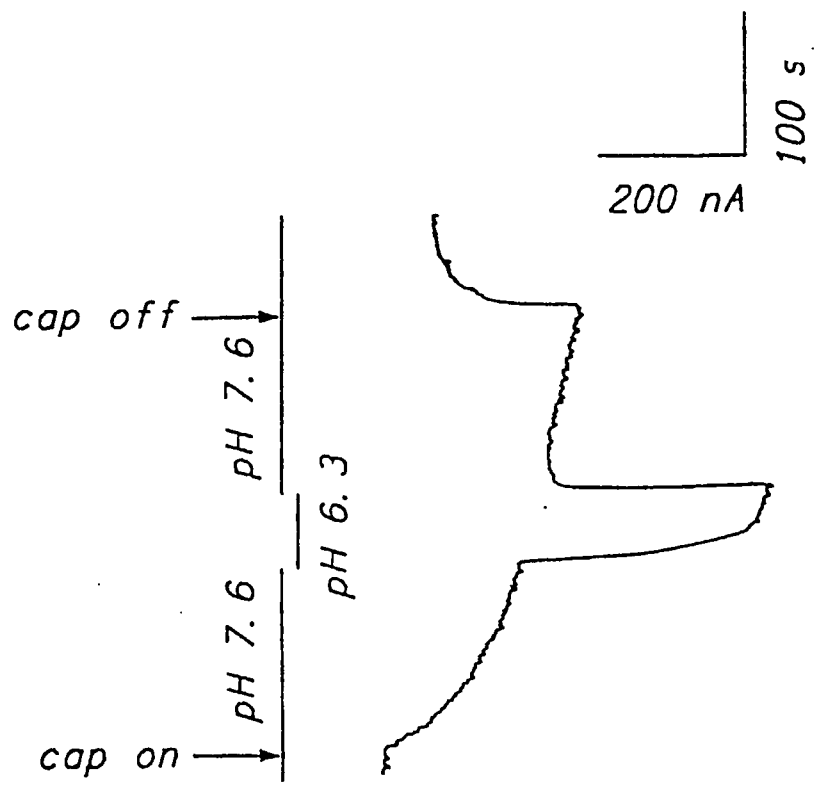


FIG. 14

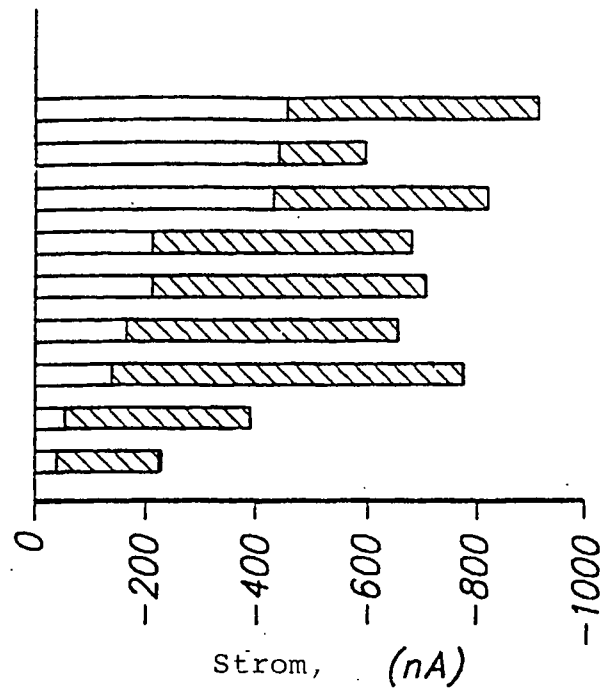


FIG. 15A

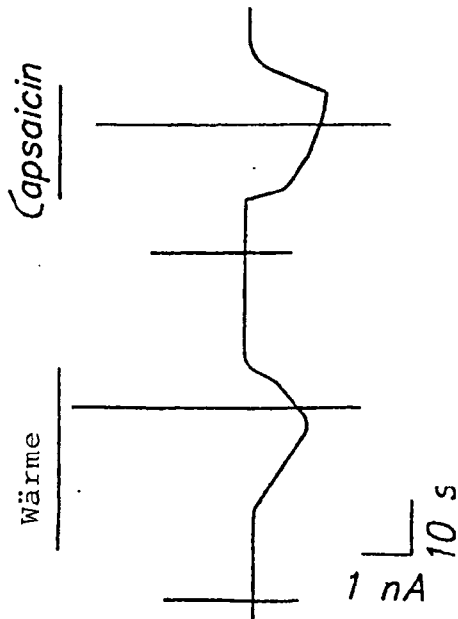


FIG. 15B

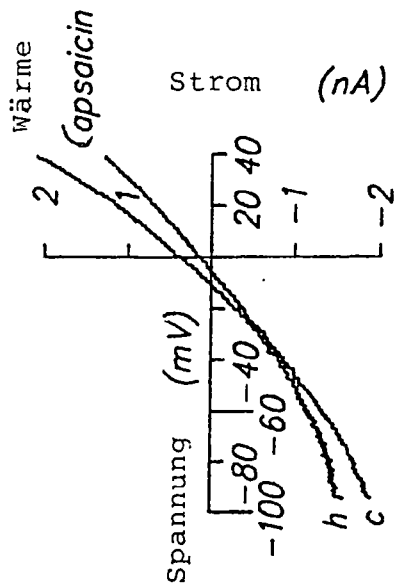


FIG. 16

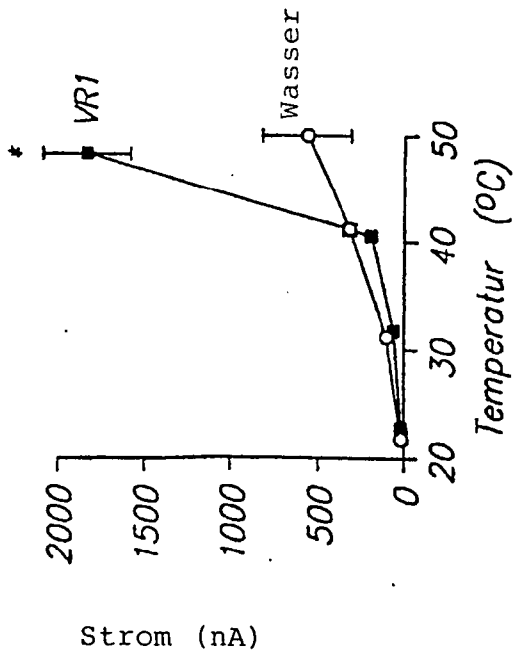


FIG. 17

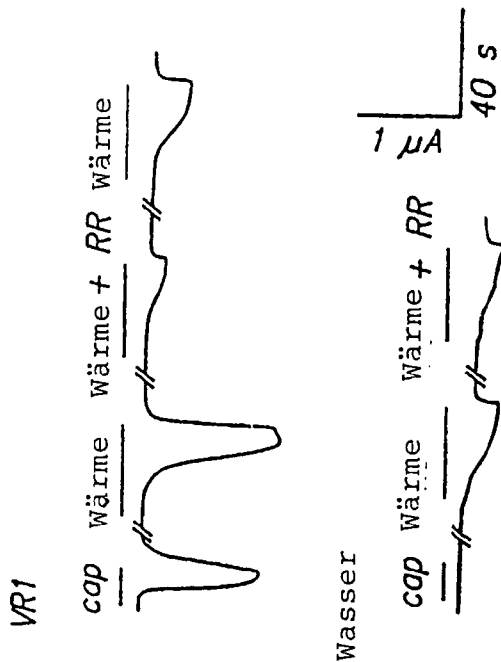


FIG. 18

