

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-517398

(P2005-517398A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B O 2 4
A 6 1 P 7/10	A 6 1 P 7/10	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-567929 (P2003-567929)	(71) 出願人	500137976
(86) (22) 出願日	平成15年2月13日 (2003. 2. 13)		アベンティス・ファーマスーティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月1日 (2004. 10. 1)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004350		アメリカ合衆国ニュージャージー州088
(87) 国際公開番号	W02003/068803		07-0800. ブリッジウォーター. サ
(87) 国際公開日	平成15年8月21日 (2003. 8. 21)		マセット・コーポレイト・ブルヴァード
(31) 優先権主張番号	60/356, 686		300
(32) 優先日	平成14年2月14日 (2002. 2. 14)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 高木 千嘉
(31) 優先権主張番号	0219574. 1	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成14年8月22日 (2002. 8. 22)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質共役型受容体をコードする核酸及びその使用

(57) 【要約】

ここに提供されるものは新規で有用なGタンパク質共役型受容体であり、それは炎症性及び生理的免疫応答について信号伝達に関与するものである。また、当該受容体の活性を調節し得る化合物をスクリーニングするために当該受容体を使用する方法をも提供する。そのような化合物は、多くの炎症性及び免疫の関与する病気及び障害の治療に容易に利用し得るものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 1 (配列番号 1) の DNA 配列を含んでいる単離された核酸分子。

【請求項 2】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において請求項 1 の単離された核酸分子にハイブリッド可能な単離された核酸分子、又は請求項 1 の単離された核酸分子に相補的なハイブリダイゼーションプローブ。

【請求項 3】

図 2 (配列番号 2) のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項 1 又は 2 に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 4】

配列番号 2 のアミノ酸配列に対し少なくとも 30% の同一性を示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項 2 の単離された核酸分子。

【請求項 5】

検出可能に標識されている請求項 1 又は 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

検出可能な標識が酵素、放射性同位元素又は蛍光を発生する化学物質を含んでいる、請求項 5 に記載の検出可能に標識されている単離された核酸分子。

【請求項 7】

図 2 (配列番号 2) のアミノ酸配列を含んでいる精製されたポリペプチド。

20

【請求項 8】

請求項 7 に記載の精製されたポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 9】

検出可能に標識されている請求項 7 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 10】

検出可能な標識が酵素、放射性同位元素、又は蛍光を発生する化学物質を含んでいる、請求項 9 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 7 に記載の精製したポリペプチドを免疫原として有する抗体。

【請求項 12】

抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はキメラ抗体からなる群から選択される、請求項 11 に記載の抗体。

30

【請求項 13】

検出可能に標識されている請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 14】

検出可能な標識は酵素、放射性同位元素又は蛍光を発生する化学物質を含んでいる、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

発現調節因子と作動可能に会合し、請求項 1 に記載の単離された核酸分子を含んでいる発現ベクター。

40

【請求項 16】

発現調節因子と作動可能に会合し、請求項 2 に記載の単離された核酸分子を含んでいる発現ベクター。

【請求項 17】

発現調節因子は構成的制御配列、細胞特異的制御配列、及び誘導的制御配列から構成される群から選択される、請求項 15 又は 16 に記載の発現ベクター。

【請求項 18】

発現調節因子がプロモーターである請求項 17 の発現ベクター。

【請求項 19】

プロモーターは、hCMV の極初期プロモーター、SV40 の初期プロモーター、アデ

50

ノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lacシステム、trpシステム、TACシステム、TRCシステム、ファージの主要なオペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の調節領域、3-ホスホグリセレートキナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、又は酵母の接合因子のプロモーターを含んでいる、請求項18に記載の発現ベクター。

【請求項20】

請求項15又は16に記載の発現ベクターでトランスフォーム又はトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項21】

宿主細胞が原核細胞又は真核細胞である請求項20に記載の宿主細胞。

【請求項22】

宿主細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、バシラス (*Bacillus*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、酵母、CHO、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10又はSf9細胞を含む、請求項21に記載の宿主細胞。

【請求項23】

以下の工程：

a) 請求項20の宿主細胞を、単離されたポリペプチドが発現するような条件下で培養すること；及び

b) 当該宿主、当該培養、又はそれらの組合せから当該単離されたポリペプチドを回収すること

から成る請求項7の精製されたポリペプチドを生産する方法。

【請求項24】

潜在的アゴニストをGAVE19を発現している細胞に接触させること、及び当該潜在的アゴニストの存在中のGAVE19の信号化活性が当該潜在的アゴニスト不在中のGAVE19の活性に比較して増大するか否かを測定すること、から成るGAVE19のアゴニストを同定する方法。

【請求項25】

潜在的インバースアゴニストをGAVE19を発現している細胞に接触させること、及び当該潜在的インバースアゴニストの存在中GAVE19の活性が当該潜在的インバースアゴニストの不在中のGAVE19の活性に比較して減少するか否か、そして内因性リガンド又はアゴニストの存在中で減少するか否かを測定すること、から成るGAVE19のインバースアゴニストを同定する方法。

【請求項26】

潜在的アンタゴニストをGAVE19を発現している細胞に接触させること、及び当該潜在的アンタゴニストの存在中のGAVE19の信号化活性が内因性リガンド又はアゴニストの存在中のGAVE19の活性に比較して減少するか否かを測定すること、から成るGAVE19のアンタゴニストを同定する方法。

【請求項27】

GAVE19信号化活性又は伝達を調節することができるGAVE19のアゴニスト、アンタゴニスト、又はインバースアゴニストから構成される治療用組成物。

【請求項28】

GAVE19信号化活性又は伝達を調節することができるGAVE19のアゴニスト、アンタゴニスト、又はインバースアゴニストを含む治療用組成物を治療を必要とする患者に投与することから成る疾病の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、従来未知のGタンパク質共役型受容体であるG A V E 1 9をコードする新規な核酸分子、当該核酸分子及びG A V E 1 9の使用に一般的に関するものである。

【背景技術】

【0002】

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞内信号伝達に關与する内在性膜タンパク質の大ファミリーである。GPCRは、神経伝達物質、ホルモン、発臭剤及び光を含む種々の細胞外信号に応答し、変換し、そして細胞内における二次メッセンジャー応答を開始する。多くの治療薬はGPCRを標的としているが、その理由はこれらの受容体が、炎症、血管拡張、心拍数、気管支拡張、内分泌及び蠕動を含む多種多様な生理的応答を仲介しているからである。

10

【0003】

GPCRは、細胞外ドメイン、7回膜貫通型ドメイン及び細胞内ドメインにより特徴付けられている。

リガンド結合及びGタンパク質との相互作用のような当該受容体が演じる作用の幾つかは、あるアミノ酸が決定的な位置に存在しているということと関係している。例えば、種々の研究により、GPCRにおけるアミノ酸配列の相違が自然リガンド或いは低分子のアゴニスト又はアンタゴニストのいずれかに対する親和力の相違を引き起こすことが明らかとなっている。言い換えれば、当該配列における微少の相違が結合親和力及び活性の相違を引き起こす(例えば、Meng et al., J. Biol. Chem. (1996) 271 (50): 32016-20; Burd et al., J. Bio. Chem. (1998) 273 (51): 34488-95; 及びHurley et al., J. Neurochem (1999) 72 (1): 413-21参照)。殊に、幾つかの研究により第3細胞内ドメインにおけるアミノ酸配列の相違が結果として活性の相違となることが明らかにされている。Myburgh等によりゴナドトロピン(性腺刺激ホルモン)放出ホルモン受容体の細胞内ループ3のアラニン261がGタンパク質共役及び受容体インターナリゼーション(受容体依存性エンドサイトーシス)にとって極めて重要であることが見い出されている(Biochem J (1998) 331 (Part3): 893-6)。Wonerow等はチロトロピン(甲状腺刺激ホルモン)受容体について研究し、細胞内第3ループの欠損が構造的受容体活性に影響することを実証している(J Bio Chem (1998) 273 (14): 7900-5)。

20

【0004】

一般的に、内因性リガンドが受容体に結合することにより、受容体の細胞内ドメインの立体配座に変化が起こり、細胞内ドメインと細胞内物質(例えばGタンパク質)との間の共役を可能とする結果となる。Gタンパク質には、 G_q 、 G_s 、 G_i 、 G_z 及び G_o のような幾つかのものが存在する(例えば、Dessauer et al., Clin Sci (Colch) (1996) 91 (5): 527-37参照)。

30

IC-3ループは当該受容体のカルボキシ末端と同様にGタンパク質と相互作用をする(Pauwels et al., Mol Neurobiol (1998) 17 (1-3): 109-135及びWonerow et. al., 上述)。ある種のGPCRはGタンパク質との関係が混然としている。即ち一つのGPCRが一つ以上のGタンパク質と相互作用をすることができる(例えば、Kenakin, Life Science (1988) 43: 1095参照)。

【0005】

リガンドにより活性化されたGPCRがGタンパク質と共役することにより信号のカスケード経路が始まる(「信号伝達(信号増幅)」と呼ばれる)。このような信号伝達が最終的に細胞活性又は細胞阻害を生ずる結果となる。

40

【0006】

GPCRは「不活性」及び「活性」という二つの異なる立体配座間で平衡を保って細胞膜の中に存在している。不活性状態の受容体は生物応答を引き起こす細胞内信号伝達経路に連結することはできない(例外は、伝達細胞における受容体の過剰発現中にみられる。例えば、www.Creighton.edu/Pharmacology/inverse.htm参照)。

【0007】

立体配座を活性状態に調節することにより伝達経路(Gタンパク質経由)に連結し、そ

50

して生物応答を生ずることが可能となる。アゴニストが結合することにより活性化立体配座となることが最もありそうなことである。しかしながら、しばしば、いかなるアゴニストが存在していないにも拘らず、既に可成りの程度の応答があり、そのような受容体は構成的活性と呼ばれている（即ち、既に活性化立体配座にあるか、リガンド非依存性であるか、又は自律的活性状態である）。このような系にアゴニストを添加した場合、応答の増大が通常は観察される。しかし、古典的アンタゴニストを添加した場合はそのような分子による結合は何ら影響を生じない。他方、ある種のアンタゴニストは受容体の構成的活性の阻害をもたらすことより、後者に属する薬物は、厳密な解釈によればアンタゴニストではなく、負の固有の活性を有するアゴニストであることを示唆している。これらの薬物はインバースアゴニスト（反作用薬）と呼ばれている（www.Creighton.edu/Pharmacology/inverse.htm）。

10

【0008】

受容体に関する伝統的研究は、アンタゴニスト及び他の受容体エフェクター分子（効果分子）の同定を行うという発見の前に先ず内在性リガンドが同定されるべきであるという前提の下に着手されている。例えばアンタゴニストが先に発見されるようなことがあるとしても、教義上の応答は内在性リガンドを同定することである（WO 00/22131）。しかしながら、活性状態が検定スクリーニング目的にとって最も役立つことから、構成的活性を有する受容体、殊にGPCRを得ることは、内在性リガンドについての情報のない状況下においては、アゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニスト及びアンタゴニストの容易な単離を可能とするものである。更に、受容体活性の障害に由来する病気においては、構成的活性の阻害を生じるような、或いはより特異的には効果的に活性化された受容体の濃度を減少させるような薬剤は、自律的活性状態における受容体を用いた検定により、更に容易に発見され得るものと思われる。例えば、病気の治療のために患者にトランスフェクトされた受容体の場合、そのような受容体の活性は、当該検定により発見されたインバースアゴニストにより微調整され得ることが考えられる。

20

【0009】

喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）及び関節リウマチ（RA）のような病気は、一般にヘルパーT細胞、単球マクロファージ及び好酸球の関与する炎症性病因によるものと考えられている。今日のステロイド剤による抗炎症治療は喘息には効果的ではあるが、しかし、代謝的及び内分泌的副作用を伴うものである。同様のことは、肺又は鼻腔粘膜を通して吸収される吸入製剤の場合でもおそらく事実であろう。RA又はCOPDに対する満足な経口治療は目下のところ存在しない。

30

【0010】

好酸球はアレルギー及び喘息における気道機能障害の大部分を仲介する。インターロイキン5（IL-5）は好酸球の成長及び活性化するサイトカインである。

気道過剰反応性をもたらす組織好酸球増加症及び好酸球仲介組織障害にとって、IL-5は不可欠であるという研究がある（Chang et al., J Allergy Clin Immunol (1996) 98 (5 pt 1): 922-931, 及びDuez et al., Am J Respir Crit Care Med (2000) 161 (1): 200-206）。IL-5はアトピー性喘息において、アレルゲン（例えば、家屋ほこりのダニ抗原）にさらされることによりヘルパーT細胞-2（Th2）によって産生される。

40

【0011】

RAは冒された滑膜における活性化マクロファージの蓄積の結果であると信じられている。インターフェロン（IFN）は、種々の炎症促進性の特性を有するヘルパーT細胞-1（Th1）由来のサイトカインである。それは最も有力なマクロファージ活性化サイトカインであり、そして、樹状突起細胞様の表現型に寄与するMHCクラスII遺伝子転写を誘導する。

【0012】

リポポリサッカライド（LPS）は、グラム陰性細菌の細胞壁の構成成分であり、腫瘍壊死因子（TNF）放出を含む炎症性応答を引き出すものである。

RAにおける静脈内抗-TNF治療の効能は臨床的に実証されている。COPDも、

50

また肺におけるマクロファージ蓄積の結果であると思われる。マクロファージは好中球化学誘引物質を産生する（例えば、I L - 8 : de Boer et al., J Pathol (2000) 190 (5): 619-626）。マクロファージと好中球は共にカテプシンを放出し、肺胞壁崩壊の原因となる。肺上皮は炎症性細胞の化学誘引物質及び他の炎症性細胞活性化物質の重要な材料となり得るものであると信じられている（例えば、Thomas et al., J Virol (2000) 74 (18): 8425-8433); Lamkhioued et al., Am J Respir Crit Care Med (2000) 162 (2 Pt. 1): 723-732; 及び Sekiya et al., J Immunol (2000) 165 (4): 2205-2213参照）。

【 0 0 1 3 】

G P C R が病気に関与し、G P C R の活性を調節することによって病気を治療する可能性があるならば、従来未知の G P C R を同定し特性を明らかにすることは、G P C R 活性が関与する病気の状態に対する治療のための新しい組成物及び方法の開発を提供することができる。それ故、必要とされるものは、従来未知の G P C R をコードする新規でかつ有用な核酸分子の発見、単離及び特性の解明である。

10

【 0 0 1 4 】

更に必要とされるものは、G P C R に対して潜在的なアゴニストやアンタゴニストとして作用することができる化合物を同定するために、従来未知の G P C R を利用する検定法である。これらの化合物は in vivo における G P C R 活性を調節するための治療薬剤として直ちに応用できるものであり、それ故、G P C R 活性に関する多くの病気の治療に使用することができる。

【 0 0 1 5 】

ここに引用するいかなる文献も、即刻応用できる「先行文献」として可能なものであるとして採用したことを意味するものではない。

20

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 6 】

本発明は新規な構成的活性なネズミの G P C R、G A V E 1 9、を同定し、及び発現の特性を解明し、並びに関連する病気の同定及び治療のための発見に応用される組成物及び方法を提供するものである。

【 0 0 1 7 】

このように広範囲には、本発明は図 1 (配列番号 1) の D N A 配列を含む単離された核酸分子、そのバリエーション (変異体)、そのフラグメント (断片)、又はその類似物若しくは誘導体に及ぶものである。本発明のバリエーションとしては、対立遺伝子バリエーション、縮重遺伝子バリエーション又は配列における縮重的変化の結果としての対立遺伝子バリエーションがある。

30

【 0 0 1 8 】

更に本発明は配列番号 1 の単離された核酸分子、又はそのバリエーションとストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリッド可能な単離された核酸分子にも及ぶものである。尚その上に、本発明は配列番号 1 の D N A 配列に相補的な核酸分子とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリッド可能な単離された核酸分子にも及ぶものである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は後述する。

40

更に本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする D N A 配列を含んでいる単離された核酸分子にも及ぶものである。

【 0 0 1 9 】

場合によっては、上述した本発明の単離された核酸分子は検出可能に標識されたものであってもよい。検出可能な標識としてここで用いられる例としては、酵素、放射性同位元素、又は蛍光を発光する化学物質が含まれるが、しかしながらこれらに限定されない。検出可能な標識の特別な例は後述する。

【 0 0 2 0 】

ある種のポリペプチドもまた本発明に包含される。例えば、本発明は、配列番号 2、その保存的バリエーション、又はその類似体若しくは誘導体のアミノ酸配列を含む精製したポリ

50

ペプチドにも及ぶものである。場合によっては本発明のポリペプチドは検出可能に標識されていてもよい。

【0021】

加えて、本発明は、本発明に係るポリペプチドが抗体産生に使用された免疫原である場合の抗体にも及ぶものである。これらの抗体はモノクローナルであっても又はポリクローナルであってもよい。更に抗体は「キメラ」であってもよく、例えば、異なる種における本発明に係る精製したポリペプチドに対して生じた抗体のタンパク質ドメインを含んでいてもよい。勿論、本発明に係る抗体は検出可能に標識されていてもよい。ここに用いられている検出可能な標識の特別な例は後述する。

【0022】

本発明は更に配列番号1、そのバリエーション、その類似体又は誘導体、或いは発現制御因子が作動可能に会合しているフラグメント(断片)のDNA配列を含む核酸分子を含んでいる発現ベクターにも及ぶものである。尚その上、本発明に係る発現ベクターは、発現制御因子が作動可能に会合している配列番号1のDNA配列を含む単離された核酸分子とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリッド可能な単離された核酸分子を含んでいてもよく、或いは、配列番号1のDNA配列を含む単離された核酸分子に相補的であるハイブリダイゼーションプローブ(ここで、ハイブリダイゼーションプローブは発現制御因子と作動可能に会合している)とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリッド可能である。ここに用いられている発現制御因子の特別な例はプロモーターである。本発明に利用可能な特別なプロモーターの例としては、hCMVの初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lacシステム、trpシステム、TACシステム、TRCシステム、ファージの主要なオペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の調節領域、3-ホスホグリセレートキナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、又は酵母接合因子のプロモーターを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0023】

本発明に係る発現ベクターを用いて、宿主細胞にトランスフェクト又はトランスフォームすることができ、そして配列番号2のアミノ酸配列又はそのバリエーションを含むポリペプチドを産生することができる。宿主細胞は原核細胞又は真核細胞のいずれでもよい。ここで用いられる単細胞の特別な例としては、大腸菌(E. coli)シュードモナス(Pseudomonas)、バシラス(Bacillus)、ストレプトミセス(Streptomyces)、酵母(yeast)、CHO、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10及びSf9細胞等が含まれる。

【0024】

更に本発明は配列番号2のアミノ酸配列、そのバリエーション、又はそのフラグメントを含む精製したポリペプチドを産生する方法にも及ぶものである。そのような方法は精製したポリペプチドの発現に適した条件下で、本発明に係る発現ベクターを用いてトランスフォーム又はトランスフェクトした宿主細胞を培養すること、及び精製したポリペプチドを単細胞宿主、宿主細胞の培地、又はその双方から採集することから構成されている。

【0025】

本発明はまたGAVE19の活性を調節することができる化合物を同定する検定にも及ぶものである。そのような化合物は、GAVE19のアゴニスト、アンタゴニスト又はインバーサアゴニストであり得る。それ故に、本発明は、内在性リガンドの存在下でGAVE19を発現する細胞に潜在的アゴニストを接触させること、及び潜在的アゴニストの存在下のGAVE19の信号化活性が潜在的アゴニストのない条件下のGAVE19の信号化活性に比較して増大するか否かを測定することから成るGAVE19のアゴニストを同定する方法にも及ぶものである。

10

20

30

40

50

【0026】

同様に、本発明はG A V E 1 9のインバースアゴニストを同定する方法にも及ぶものである。その方法は潜在的インバースアゴニストをG A V E 1 9を発現している細胞に接触させること、及び潜在的インバースアゴニスト及び内在性リガンド又はアゴニストの存在下のG A V E 1 9の信号化活性が、内在性リガンド又はアゴニストは存在しているが潜在的インバースアゴニストのない条件下のG A V E 1 9の信号化活性に比較して減少するか否かを測定することから成るものである。

【0027】

勿論、本発明はG A V E 1 9のアンタゴニストを同定する方法にも及ぶものである。その方法は潜在的アンタゴニストをG A V E 1 9を発現している細胞に接触させること、及び当該潜在的アンタゴニスト存在下のG A V E 1 9の信号化活性が、内在性リガンド又はアゴニストの存在下におけるG A V E 1 9の活性に比較して減少するか否かを測定する工程から成るものである。

10

【0028】

それ故、本発明の一局面はG A V E 1 9タンパク質、そのフラグメント又はそのバリエーションをコードする単離された核酸配列を提供するものである。

本発明の一局面は、また配列番号1のDNA配列及びストリンジェントな条件下で配列番号1にハイブリッドすることが可能なDNA分子を含む核酸分子のバリエーションを提供するものである。

【0029】

更に本発明の一局面は、G A V E 1 9のアミノ酸配列、そのバリエーション、そのフラグメント又はその類似体若しくは誘導体を提供するものである。

20

更に本発明の一局面は、G A V E 1 9、そのバリエーション、そのフラグメント又はその類似体若しくは誘導体をコードするDNA配列（そのDNA配列は発現制御因子に作動可能に会合している）を含んでいる発現ベクターを提供するものである。

尚更に、本発明は免疫原としてG A V E 1 9、そのバリエーション、その類似体若しくは誘導体、又はそのフラグメントを有している抗体を提供するものである。

【0030】

更にその上、本発明はG A V E 1 9タンパク質を調節することができる化合物を同定する方法をも含むものである。そのような調節物質はG A V E 1 9のアンタゴニスト、G A V E 1 9のアゴニスト又はG A V E 1 9のインバースアゴニストであるかも知れない。尚、その上、マウスにおいてG A V E 1 9の発現又は活性を調節する化合物は、例えば種々の炎症性の病気、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、及び関節リウマチのような多くの病気又は障害を治療するのに利用されるかも知れない。

30

【0031】

本発明のこれらの、また他の局面は、添付の図面及び詳細な説明を参照することによってより良く理解することができると思われる。

【0032】

〔詳細な説明〕

上述の通り、本発明はここにおいてG A V E 1 9と命名された従来未知のGタンパク質共役型受容体をコードする従来未知のマウス核酸分子についての驚異的で意外な発見に関するものである。特に、意外なことはG A V E 1 9は免疫組織又は腎臓、肝臓及び小腸のような器官において発現されているという事実が明らかとなったことである。それ故、G A V E 1 9は、喘息、関節リウマチ、COPD等の種々の炎症性病気の治療のための医薬品組成物の開発の対象として直ちに役立つものである。

40

【0033】

本発明を記載するために詳細な説明及び特許請求の範囲を通して使用されている種々の用語及び熟語は以下の通りである。

ここで使用されている用語「モジュレーター（調節因子）」とは、G A V E 1 9の活性を調節するもの（例えば、リガンド及び候補化合物、但しこれらに限定されない）をいう

50

。本発明のモジュレーター（調節因子）としては、G A V E 1 9 のアゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、又はインバースアゴニストが考えられる。

【0034】

ここで使用されている用語「アゴニスト」とは、受容体に結合したときに細胞内応答を活性化するもの、又は膜に対するG T P 結合を増大させるもの（例えばリガンド及び候補化合物、但しこれらに限定されない）をいう。

【0035】

ここに使用されている用語「部分アゴニスト」とは、受容体に結合したときに細胞内応答を活性化するが、その程度／範囲がアゴニストに比べて小さいもの、又は膜に対するG T P 結合を増大させるが、その程度／範囲がアゴニストに比べて小さいもの（例えば、リガンド及び候補化合物、但しこれらに限定されない）をいう。

10

【0036】

ここに使用されている用語「アンタゴニスト」とは、アゴニストが結合する部位と同じ部位の受容体に競合的に結合するもの（例えば、リガンド及び候補化合物、但しこれらに限定されない）をいう。しかしながら、アンタゴニストは受容体の活性型により開始される細胞内応答を活性化せず、それ故、アゴニスト又は部分アゴニストによる細胞内応答を阻害することができる。関連した局面において、アンタゴニストはアゴニスト又は部分アゴニストの存在しないときのベースライン細胞内応答を低下させない。

【0037】

ここに使用されている用語「インバースアゴニスト」とは、構造的に活性化受容体に結合し、ベースライン細胞内応答を阻害するもの（例えば、リガンド及び候補化合物、但しこれらに限定されない）をいう。ベースライン応答は、アゴニスト又は部分アゴニストが存在しない或いは膜に対するG T P 結合が少ないときに観察されるもので、受容体の活性型が正常の活性基準値以下の場合に開始される。

20

【0038】

ここに使用されている用語「候補化合物」とは、スクリーニング技術に適用可能なもの（例えば、化学的合成化合物、但しこれに限定されない）をいう。或る実施例においては、この用語はG A V E 1 9 のアゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニスト又はアンタゴニストから成る群から選択された化合物として公知のものは含まない。これらの化合物は伝統的な薬物発見方法によって同定されたものであり、その方法には、受容体に特異的な内因性リガンドの同定、及び／又は受容体に対する候補化合物のスクリーニングが含まれるが、そのようなスクリーニングは効果を評価するためには競合的検定が必要とされる。

30

【0039】

ここに使用されているように、用語「構造的に活性化された受容体」又は「自律的に活性化受容体」は、ここでは相互に代替可能なものとして使用されており、リガンドの存在しない条件下で活性化の対象となる受容体を意味する。そのような構造的に活性化された受容体は内因性（例えばG A V E 1 9 ）、又は非内因性、即ちG P C R の場合、組換え技術により野生型G P C R の突然変異による構造的型を産生するように修飾することができる（例えばEP 1071701；WO 00/22129；WO 00/22131；及びU.S. Pat. Nos. 6,150,393及び6,140,509参照。ここに文献としてそのままの全部が含まれている）。

40

【0040】

ここに使用されているように、用語「構成的受容体活性化」とは、内因性リガンド又はその化学的均等物との受容体結合以外の方法により、活性状態における受容体の安定化を意味する。

【0041】

ここに使用されているように、用語「リガンド」とは、他の分子に結合するものをいい、ホルモン又は神経伝達物質を含むが、これらに限定されるものではなく、そして更に受容体に対し立体的選択性をもって結合するものをいう。

【0042】

50

ここに使用されているように、本発明のタンパク質又は核酸について用いられる用語「ファミリー」とは、外観上共通の構成ドメインを有し、かつここで定義されているように十分なアミノ酸又はヌクレオチド配列の同一性を有している二つ又はそれ以上のタンパク質又は核酸分子を意味する。そのようなファミリー構成物は自然に発生し、そして同種又は異種の双方から由来するものである。例えば、一つのファミリーは、ヒト起源の第一タンパク質及びそのタンパク質のマウス起源の相同体、同様に第二タンパク質としてヒト起源の別のタンパク質及びマウス起源のその第二タンパク質の相同体とを含むことができる。また一つのファミリーの構成物は共通の作用特性を有することもある。

【0043】

ここで使用されているように、用語「G A V E 1 9 活性」、「G A V E 1 9 の生物活性」及び「G A V E 1 9 の作用活性」とは、標準的技術に基づいて *in vivo* 又は *in vitro* で測定された G A V E 1 9 応答細胞における G A V E 1 9 タンパク質、ポリペプチド又は核酸分子によって影響を受けた活性を意味する。G A V E 1 9 活性は、第二タンパク質の酵素活性に会合したような直接的活性或いは、G A V E 1 9 タンパク質と第二タンパク質との相互作用により仲介される細胞信号化活性のような間接的活性であってもよい。特別な実施例において、G A V E 1 9 活性は次の活性を少なくとも一つ又はそれ以上含むものであるが、但し、それらに限定されない：(i) G A V E 1 9 信号化経路においてタンパク質と相互作用する能力；(ii) G A V E 1 9 リガンドと相互作用する能力；及び(iii) 細胞内標的タンパク質と相互作用する能力。

【0044】

更に、本発明に従い、技術水準における通常の分子生物学、微生物学、及び組換え DNA 技術を採用することができる。そのような技術は文献において完全に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (以下「Sambrook et al., 1989」という)；DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985)；Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984)；Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]；Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]；Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]；Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]；B.Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984)；F.M. Ausbel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994)。

それ故、ここに表わされている限り、以下の用語は下記に呈示する定義を有するものである。

【0045】

「ベクター」とは、例えばプラスミド、ファージ又はコスミドのようなレプリコンをいい、他の DNA セグメントが連結することができ、その結果として連結されたセグメントの複製を生じさせることができる。ここで、「レプリコン」とは、*in vivo* における DNA 複製の自律的単位、即ち、それ自身の制御下において複製可能な作用を有するあらゆる遺伝的要素（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）をいう。ベクターの特殊な実施例は後述する。

【0046】

「カセット」とは、特異的制限部位においてベクターに挿入され得る DNA セグメントを意味する。この DNA セグメントは、目的のポリペプチドをコードしており、カセットと制限酵素認識部位は、転写及び翻訳に関して正しい読み取りフレームになるようにカセットが挿入されることが保証できるように設計されている。

【0047】

外来性又は異種 DNA が細胞内部に取り入れられたときに、細胞は「トランスフェクト」されたという。そしてトランスフェクトされた DNA が表現型変化に影響を及ぼすとき、細胞は外因性又は異種 DNA によって「トランスフォーム」されたという。好ましくは

10

20

30

40

50

、トランスフォームするDNAは染色体DNAに組み込まれて（共有結合によって連結し）細胞のゲノムに仕上げられるべきである。

【0048】

「異種」DNAとは、細胞の中に自然の状態では存在していない、又は細胞の染色体中に存在していないDNAをいう。好ましくは、異種DNAには細胞にとっては外来の遺伝子を含むものである。

【0049】

「相同的組換え」とは、ベクターの外来DNA配列を染色体へ挿入することをいう。特に、ベクターは相同的組換えのために染色体の特異部位を標的とする。特異的相同的組換えのためには、ベクターは相補的結合と染色体へのベクターの取込みのために、染色体配列に対して相同関係のある十分に長い領域を含んでいる必要がある。相同関係のある領域が長ければ長い程、また配列の相同性の程度が大きければ大きい程、相同的組換えの効率は増大する。

10

【0050】

本発明に係る単離された核酸分子

一局面において、本発明は図1（配列番号1）のDNA配列、そのバリエーション、そのフラグメント又はその類似体若しくは誘導体を含む単離された核酸分子に及ぶものである。

【0051】

「核酸分子」とは、リボヌクレオチド（アデノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン；「RNA分子」）又はデオキシリボヌクレオチド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン又はデオキシシチジン；「DNA分子」）のリン酸エステルのポリマー型、或いはそれらのホスホロチオエート及びチオエステルのようなリン酸エステル類似体をいい、一本鎖型又は二本鎖ヘリックスのどちらであってもよい。また二本鎖DNA-DNA、DNA-RNA、及びRNA-RNAヘリックスであってもよい。核酸分子、特にDNA又はRNA分子の用語は、これら分子の一次及び二次構造のみをいい、そしてそれはいかなる特別な三次構造に限定するものではない。このように、この用語は二本鎖DNA、なかでも線状又は環状DNA分子（例えば、制限フラグメント）、プラスミド及び染色体を含むものである。特別な二本鎖DNA分子構造について論じると、配列はここでは転写されていないDNA鎖に沿って5'から3'方向への配列（即ち、mRNAに対して相同な配列を有する鎖）としてのみ与えられる通常の実験的取決めに従って記載されている。「組換えDNA分子」とは、分子生物学的操作を受けたDNA分子を意味する。

20

30

【0052】

「単離された」核酸分子とは、核酸の天然材料の中に存在している他の核酸分子から分離されたものをいう。特に「単離された」核酸とは、核酸起源の器官のゲノムDNAにおいてGAVE19をコードする核酸の両端に自然の状態が存在する配列（即ち、核酸の5'及び3'末端に位置する配列）を含まない。いくつかの実施例においては、単離されたGAVE19核酸分子は核酸起源の細胞のゲノムDNAにおいて核酸分子の両端に自然状態が存在するヌクレオチド配列の約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb又は0.1 kbよりも小さいものを含むことができる。更に、cDNA分子のような「単離された」核酸分子は組換え技術で作成された場合は他の細胞成分又は培地を実質的に含んでいないこと、或いは化学合成で作成された場合は化学前駆体又は他の化合物を実質的に含んでいないことを意味する。

40

【0053】

本発明に係る核酸分子、例えば配列番号1のヌクレオチド配列、又はそのヌクレオチド配列のあらゆるフラグメント若しくは相補体、又はその類似体若しくは誘導体は、標準的分子生物学技術及びここに提供された配列情報を用いて単離することができる。配列番号1の核酸配列の全部又は部分をハイブリッドプローブとして用いることにより、GAVE19核酸分子は標準的ハイブリッド及びクローニング技術（例えば、Sambrook等の記載のような）により単離することができる。

【0054】

50

本発明の核酸分子は、鋳型としてcDNA、mRNA又はゲノムDNAを、そして適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、標準的PCR増幅技術に従って、増幅することができる。そのようなプライマーは配列番号1から得られる情報及び通常の実験技術を用いて容易に作成することができる。更にGAVE19ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは標準的合成技術、例えば自動化DNAシンテサイザーを用いて調製することもできる。

【0055】

GAVE19 DNAとハイブリッド可能な単離された核酸分子

本発明は更に、GAVE19 DNAにハイブリッド可能な、ストリンジェントなハイブリッド条件下でGAVE19 DNAに対して相補的なハイブリッドプローブにハイブリッド可能な、又はストリンジェントなハイブリッド条件下で双方にハイブリッド可能な単離された核酸分子に及ぶものである。特に本発明は、配列番号1のDNA配列を含んでいる核酸分子とストリンジェントなハイブリッド条件下でハイブリッド可能な単離された核酸分子、又は配列番号1のDNA配列を含んでいる単離された核酸分子に対して相補的であるプローブにも及ぶものである。

10

【0056】

核酸分子の一本鎖型を適当な温度及び溶液イオン強度（後述のSambrook等参照）条件下で他の核酸分子とアニールさせることができるときに、核酸分子はcDNA、ゲノムDNA又はRNAのような他の核酸分子と「ハイブリッド可能」という。温度及びイオン強度の条件がハイブリッドの「ストリンジェンシー」を決定する。

20

【0057】

相同な核酸の一次スクリーニングとしては、 T_m 55 に相当する低いストリンジェンシーのハイブリッド条件を用いることができる（例えば、 $5 \times SSC$ 、0.1% SDS、0.25% ミルク、ホルムアミドは無添加；又は30%ホルムアミド、 $5 \times SSC$ 、0.5% SDS）。高めの T_m に相当する中程度のストリンジェンシーのハイブリッド条件としては、例えば40%ホルムアミド、 $5 \times$ 又は $6 \times SSC$ を用いることができる。最も高い T_m に相当する高いストリンジェンシーのハイブリッド条件としては、例えば50%ホルムアミド、 $5 \times$ 又は $6 \times SSC$ を用いることができる。

【0058】

ハイブリッドには二つの核酸が相補的配列を含んでいることが要求されるが、ハイブリッドのストリンジェンシーによっては、塩基間でのミスマッチも起こり得る。核酸のハイブリッドにとって適当なストリンジェンシーは核酸の長さ及び相補性の度合いに依存して、変更可能であることは、技術常識としてよく知られている。二つのヌクレオチド配列間の類似性又は相同性の程度が高ければ高い程、これらの配列を有する核酸のハイブリッドの T_m 値は高いものとなる。核酸の相対的安定度（より高い T_m に対応する）は、次の順で減少する：RNA：RNA、DNA：RNA、DNA：DNA。長さとして100ヌクレオチド以上のハイブリッドの場合、 T_m を計算するための平衡定数は導き出されている（後述のSambrook等、9.50 - 0.51参照）。より短い核酸即ちオリゴヌクレオチドを用いたハイブリッドの場合は、ミスマッチの位置はより重要となり、そしてオリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定することとなる（後述のSambrook等、11.7 - 11.8参照）。ハイブリッド可能な核酸分子の最短長は、少なくとも約20ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約40ヌクレオチド、更により好ましくは少なくとも約50ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも約60ヌクレオチドである。本発明の特別な実施例において、ハイブリッド可能な核酸分子は長さとして少なくとも300、325、350、375、400、450、500、600、650、700、800、900、1000又は1100ヌクレオチドであり、そして配列番号1、その相補体又はそのフラグメントのヌクレオチド配列、好ましくはコード配列を含んでいる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリッドすることである。

30

40

【0059】

ここで使用されているように、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリッドする」

50

とは、ヌクレオチド配列が少なくとも55%、60%、65%、70%、そして好ましくは75%、或いはより相補的に互いに典型的にハイブリッドを維持するようなハイブリッド及び洗浄の条件を記述していることを意味する。このようなストリンジェンシーの条件は、技術水準として既知のものであり、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。ストリンジェントなハイブリッド条件の好ましい、但し限定的ではない例としては、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45でハイブリッドし、0.2×SSC、0.1% SDS中50~65で1回又はそれ以上洗浄することが挙げられる。好ましくは、配列番号1の配列にストリンジェントな条件下でハイブリッドする本発明の単離された核酸分子又はその相補体は自然発生の核酸分子に対応するを挙げることができる。ここに使用されているように「自然発生」の核酸分子とは、自然界で発生したヌクレオチド配列を有するRNA又はDNA分子を意味する(例えば、天然タンパク質をコードするもの)。当業者であれば、当該条件は配列特異的変動性(例えば、長さ、G-C含有率等)の観点から変更することができることを理解するであろう。

10

【0060】

本発明は、類似特性を有するGAVE19類縁分子の診断薬として使用され得るGAVE19の核酸フラグメントを包含することを意図する。この診断用フラグメントは両端の配列を含むGAVE19遺伝子のいかなる部分に由来するものであってもよい。このフラグメントは既知の方法を実践するライブラリープローブとして使用することができる。

【0061】

更に本発明の核酸分子は、GAVE19をコードする核酸配列の一部分に過ぎないもの、例えば、プローブ又はプライマーとして使用することができるフラグメント、GAVE19の生物学的に活性な一部分をコードするフラグメントをも含むものである。例えば、そのようなフラグメントは配列番号2の約1から約14までのアミノ酸残基をコードする領域を含むことができるが、但しこれらに限定されない。

20

【0062】

ヒトGAVE19遺伝子のクローニングにより決定されたヌクレオチド配列により、他の細胞型、例えば他の組織のGAVE19相同体及び他の動物由来のGAVE19相同体の同定及び/又はクローニングのためのプローブ及びプライマーを作成することができる。このプローブ/プライマーは十分に精製したオリゴヌクレオチドを典型的に含んでいる。このオリゴヌクレオチドは配列番号1のセンス又はアンチセンス配列、又は自然発生の配列番号1の突然変異体の少なくとも約12、好ましくは25、より好ましくは50、75、100、125、150、175、200、250、300、350又は400の連続したヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリッドするヌクレオチド配列の領域を典型的に含んでいる。GAVE19ヌクレオチド配列に基づくプローブは、類似の又は同一のタンパク質をコードする転写産物又はゲノム配列を検定するのに使用することができる。

30

【0063】

ここで使用されているように、本発明に係る単離された核酸分子の「フラグメント」又は「一部分」という用語は、少なくとも12、好ましくは約25、より好ましくは約50、75、100、125、150、175、200、250、300、350又は400の連続したヌクレオチドを含んでいることを意味する。それ故、本発明に係る単離された核酸分子の「フラグメント」が単に1又は2個のヌクレオチドであるということはない。

40

【0064】

同様に、本発明に係るポリペプチドの「フラグメント」又は「一部分」は、少なくとも9個の連続したアミノ酸残基を含んでいる。本発明に係るポリペプチドフラグメントの特別な実施例は、GAVE19抗体、又はそのフラグメントに結合するエピトープを含んでいる。

【0065】

「GAVE19の生物学的に活性な一部分」をコードする核酸フラグメントは、GAV

50

E 1 9 生物学的活性を有するポリペプチドをコードする配列番号 1 の一部分を単離すること、G A V E 1 9 タンパク質のコードされた一部分を発現すること（例えば *in vitro*での組換え発現）、及び G A V E 1 9 のコードされた一部分の活性を測定することにより調製することができる。

本発明は更に、遺伝暗号の縮重により配列番号 1 のヌクレオチド配列とは相違し、そしてそれ故に配列番号 1 に示したヌクレオチド配列によってコードされたと同様の G A V E 1 9 タンパク質をコードする核酸分子を含むものである。

【0066】

相同核酸分子

本発明は更に G A V E 1 9 DNA 分子に相同な単離された核酸分子、例えば配列番号 1 の DNA 配列を有する単離された核酸分子に相同なものにも及ぶ。長さが明示された DNA 配列のヌクレオチドの中、少なくとも約 50%（好ましくは少なくとも約 75%、そして最も好ましくは少なくとも約 90% 又は 95%）が対をなすとき、2本の DNA 配列は「実質的に相同」又は「実質的に類似」である。

【0067】

実質的に相同である配列は、デフォルトパラメーターを用いた配列データバンク、又は例えば特殊なシステムのために定義されたストリンジェントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験において使用可能な標準的ソフトウェアを用いて配列を比較することによって同定することができる。適当なハイブリダイゼーション条件の決定については技術水準の範囲内である。例えば後述する Maniatis 等；後述する DNA Cloning Vols. I & II；後述する Nucleic Acid Hybridization を参照。

更に、他の種（G A V E 1 9 相同体）由来の G A V E 1 9 タンパク質を、ヒト G A V E 1 9 とは異なるヌクレオチド配列を用いてコードする核酸分子も、本発明の請求範囲に属することを意図している。

【0068】

本発明に係る単離された核酸分子のバリエーション

本発明は、また配列番号 1 の DNA 配列を含んでいる単離された核酸分子のバリエーションにも及ぶ。そのようなバリエーションとは、縮重したもの、対立遺伝子、又はそれらの組合せである。

【0069】

本発明に係る G A V E 1 9 cDNA の自然対立遺伝子バリエーション及び相同体に対応する核酸分子は、ストリンジェントなハイブリッド条件下で標準的ハイブリッド技術に従って、ハイブリダイゼーションプローブとしてマウスの cDNA 又はその一部分を用いて、ここに開示されているマウスの G A V E 1 9 核酸との同一性に基づいて単離することができる。

【0070】

ここで使用されている用語「相当する」とは、類似性又は相同性を測定した分子から正確な位置が同一又は相違しているかに関わらず、類似する又は相同な配列をいうものとする。このように、用語「相当する」とは、配列の類似性をいうものであって、アミノ酸残基又はヌクレオチド塩基の数についていうものではない。

【0071】

更に、遺伝暗号におけるコドンの縮重する特性により、本発明に係る G A V E 1 9 タンパク質は幾つもの単離された核酸分子によってコードされる。「縮重特性」とは、遺伝暗号に応じてある特定のアミノ酸を特定する異なった 3 文字コドンの使用を意味する。以下のコドンがそれぞれの特定アミノ酸のコードに相互変換可能的に使用されることは技術水準として良く知られている。

【0072】

フェニルアラニン（P h e 又は F）：U U U 又は U U C

ロイシン（L e u 又は L）：U U A 又は U U G 又は C U U 又は C U C 又は C U A 又は C U G

10

20

30

40

50

イソロイシン (I l e 又は I) : A U U 又は A U C 又は A U A

メチオニン (M e t 又は M) : A U G

バリン (V a l 又は V) : G U U 又は G U C 又は G U A 又は G U G

セリン (S e r 又は S) : U C U 又は U C C 又は U C A 又は U C G 又は A G U 又は A G

C

プロリン (P r o 又は P) : C C U 又は C C C 又は C C A 又は C C G

トレオニン (T h r 又は T) : A C U 又は A C C 又は A C A 又は A C G

アラニン (A l a 又は A) : G C U 又は G C G 又は G C A 又は G C G

チロシン (T y r 又は Y) : U A U 又は U A C

ヒスチジン (H i s 又は H) : C A U 又は C A C

10

グルタミン (G l n 又は Q) : C A A 又は C A G

アスパラギン (A s n 又は N) : A A U 又は A A C

リシン (L y s 又は K) : A A A 又は A A G

アスパラギン酸 (A s p 又は D) : G A U 又は G A C

グルタミン酸 (G l u 又は E) : G A A 又は G A G

システイン (C y s 又は C) : U G U 又は U G C

アルギニン (A r g 又は R) : C G U 又は C G C 又は C G A 又は C G G 又は A G A 又は

A G G

グリシン (G l y 又は G) : G G U 又は G G C 又は G G A 又は G G G

トリプトファン (T r p 又は W) : U G G

20

【 0 0 7 3 】

終止コドン U A A (オーカー)、又は U A G (アンバー) 又は U G A (オパール)

上記に特定されているコドンは R N A 配列に対するものである。対応する D N A コドンは U を T に置き換えたものである。

【 0 0 7 4 】

配列番号 1 に見られるマウスの G A V E 1 9 ヌクレオチド配列に加えて、G A V E 1 9 のアミノ酸配列に変化をもたらす D N A 配列多型が一つの集団の中に存在するかも知れないということは当業者に理解されるものと思われる。G A V E 1 9 遺伝子におけるそのような遺伝的多型は、自然対立遺伝子変異により一つの集団の個々の中にも存在するかも知れない。対立遺伝子とは同一遺伝子座において選択的に起こる遺伝子群の一つをいう。ここで使用されている用語「遺伝子」及び「組換え遺伝子」とは、G A V E 1 9 タンパク質、好ましくは哺乳類 G A V E 1 9 タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (読取り枠) を含んでいる核酸分子をいう。ここで使用されている熟語「対立遺伝子バリエーション」とは、G A V E 1 9 遺伝子座で起こるヌクレオチド配列又はヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドをいう。選択的対立遺伝子は多数の異なった個体中の興味ある遺伝子の配列分析によって同定することができる。それは種々の個体における同一遺伝子座を同定するためのハイブリダイゼーションプローブを用いて容易に行うことができる。いかなる、そして全てのそのようなヌクレオチド変異及びその結果としてのアミノ酸多型、並びに、自然対立遺伝子変異の結果による G A V E 1 9 の変異で、G A V E 1 9 の機能的活性を変更しないものも、本発明の範囲内である。

30

40

【 0 0 7 5 】

更に、本発明に係る単離された核酸分子のバリエーションは、通常の実験技術、例えば位置指定突然変異誘発を用いた技術水準の一つによって容易に調製することができる。

【 0 0 7 6 】

アンチセンスヌクレオチド配列

本発明は、またアンチセンス核酸分子即ち、タンパク質をコードするセンス核酸に対して相補的、例えば、二重鎖 c D N A 分子のコード鎖に対して相補的又は m R N A 配列に対して相補的である分子にも及ぶものである。それ故アンチセンス核酸はセンス核酸と水素結合で結合することができる。アンチセンス核酸は全部の G A V E 1 9 コード鎖又はその一部分のみ、例えばタンパク質コード領域 (即ち、オープンリーディングフレーム) の全

50

部又は一部分に対して相補的である。アンチセンス核酸分子はG A V E 1 9をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域に対してアンチセンスであり得る。非コード領域(「5 及び3 非翻訳領域」)は、コード領域に隣接する5 及び3 配列であり、そしてアミノ酸へ翻訳されない。

【0077】

ここに開示されたG A V E 1 9をコードするコード鎖配列(例えば配列番号1)について、本発明に係るアンチセンス核酸は、ワトソン-クリック型塩基対の規則に従ってデザインすることができる。アンチセンス核酸分子はG A V E 1 9 m R N Aの全コード領域に対して相補的であり得るが、しかしより好ましくは、G A V E 1 9 m R N Aのコード鎖又は非コード鎖の一部に対してのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドはG A V E 1 9 m R N Aの翻訳開始部位周辺領域に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50ヌクレオチドの長さである。本発明に係るアンチセンス核酸は、技術水準として公知の工程を用いて、化学合成及び酵素的連結反応により構成することができる。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然のヌクレオチド、或いは、生物活性を増大させるために、又はアンチセンスとセンス核酸間に形成される二重構造の物理的安定度を高めるために、例えばホスホロチオエート誘導体、ホスホネート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドを用いて化学的に修飾した種々のヌクレオチドを用いて化学的に合成することができる。

10

20

【0078】

アンチセンス核酸の作成に使用できる修飾ヌクレオチドの例としては、

5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 - D - ガラクトシルキューオシン、イノシン、N⁶ - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N⁶ - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 - D - マンノシルキューオシン、5 - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N⁶ - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、ワイプトシン、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、及び2, 6 - ジアミノプリンが挙げられる。

30

40

或いはまた、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配向(即ち、挿入された核酸から転写されたRNAは、興味ある標的核酸に対してアンチセンス配向にある)にサブクローンされた発現ベクターを用いて生物学的に作成することもできる。

【0079】

本発明に係るアンチセンス核酸は、典型的には対象物に投与され又はその場で(*in situ*)発生させ、その結果、G A V E 1 9タンパク質をコードする細胞質mRNA及び/又はゲノムDNAにハイブリッドし又は結合し、それによって、転写及び/又は翻訳を阻害することによって該タンパク質の発現を阻害する。このハイブリダイゼーションは慣用的なヌクレオチド相補性によって安定な二重構造を形成し、或いは、例えばDNA二重構造に結合するアンチセンス核酸分子の場合は、二重らせんの主要溝中で又はG A V E 1 9の制御領域に対する特異的相互作用により、安定な二重構造を形成する。

【0080】

本発明に係るアンチセンス核酸分子の投与経路の一例としては、組織部位への直接注入

50

が挙げられる。或いはまた、アンチセンス核酸分子は選択した細胞を標的とするように修飾し、そして全身性投与することができる。例えば、全身性投与のためには、例えば細胞表面の受容体又は抗原に結合するペプチド又は抗体にアンチセンス核酸分子が連結することにより選択した細胞表面で発現した受容体又は抗原に特異的に結合するようにアンチセンス分子を修飾することができる。

【0081】

アンチセンス核酸分子はまた、ここに記載したベクターを用いて細胞中へ配達することができる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子を、強力な p o l II 又は p o l III プロモーターの制御下でベクター中に配置することが好ましい。

10

【0082】

本発明に係るアンチセンス核酸分子は、
- アノマー型核酸分子であることができる。

- アノマー型核酸分子は相補的 RNA と特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、そこでは鎖は互いに平行に走っている (Gaultier et al., *Nucleic Acids Res* (1987) 15: 6625-6641)。アンチセンス核酸分子はまたメチルリボヌクレオチド (Inoue et al., *Nucleic Acids Res* (1987) 15: 6131-6148)、又はキメラ RNA - DNA 類似体 (Inoue et al., *FEBS Lett* (1987) 215: 327-330) を含んでいてもよい。

【0083】

リボザイム (RNA 酵素)

本発明はまたリボザイム (RNA 酵素) にも及ぶ。リボザイムとは、リボヌクレアーゼ活性をもった触媒性 RNA 分子であり、リボザイムにハイブリッドする mRNA のような一本鎖の核酸を切断することができる。このように、リボザイムは (例えば、ハンマーヘッドリボザイム (Haselhoff et al., *Nature* (1988) 334: 585-591 に記載)、G A V E 1 9 mRNA 転写物を触媒的に切断するのに用いることができ、そして G A V E 1 9 mRNA の翻訳を阻止することができる。G A V E 1 9 をコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、ここに開示されている G A V E 1 9 DNA のヌクレオチド配列 (例えば、配列番号 1) に基づいてデザインすることができる。例えば、テトラヒメナ (Tetrahymena) L - 1 9 I V S RNA の誘導体を、その活性部位のヌクレオチド配列が G A V E 1 9 をコードする mRNA へ切断されるヌクレオチド配列に対して相補的であるように構成することができる。例えば、U.S. Patent Nos. 4,987,071 及び 5,116,742 参照)。或いはまた、G A V E 1 9 mRNA を特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒的 RNA を RNA 分子のプールから選択するのに使用することができる (例えば Bartel et al., *Science* (1993) 261: 1411~1418 参照)。

20

30

【0084】

本発明の三重らせん核酸分子及びペプチド核酸

本発明はまた三重らせん構造を形成する核酸分子にも及ぶ。例えば、G A V E 1 9 遺伝子発現は、G A V E 1 9 の制御領域 (例えば、G A V E 1 9 プロモーター及び / 又はエンハンサー) に相補的な標的ヌクレオチド配列によって阻止され、標的細胞における G A V E 1 9 遺伝子の転写を阻止する三重らせん構造を形成する (概論として、Helene, *Anticancer Drug Des* (1991) 6 (6) : 569; Helene *Ann NY Acad Sci* (1992) 660: 27; 及び Mahner, *Bioassays* (1992) 14 (12): 807 参照)。

40

【0085】

特別な実施例としては、本発明の核酸分子は、例えば分子の安定度、ハイブリッド形成又は溶解度を改善するために、塩基残基、糖残基又はリン酸骨格を修飾することができる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を修飾して、ペプチド核酸 (Hyrup et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1996) 4: 5) が生じるようにすることができる。ここに使用されているように、用語「ペプチド核酸」又は「PNA」とは、核酸模倣品 (mimics) を意味し、例えば、DNA 模倣品の場合、デオキシリボースのリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換されていて、四つの天然型ヌクレオ塩基のみが維持されているものをいう。この PNA の中性骨格は、低イオン強度条件下において、DNA 及び RNA

50

に対して特異的ハイブリダイゼーションを許容することが明らかにされている。PNAオリゴマーの合成は、後述するHyrup et al., (1996); Perry-O'Keefe et al., Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93: 14670に記載されている標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて実施することができる。

【0086】

GAVE19のPNAは、また治療的又は診断的応用に使用することができる。例えば、PNAは、例えば転写阻止又は翻訳阻止を誘導することにより、或いは複製を阻害することにより、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス又はアンチ遺伝子試薬として使用することができる。GAVE19のPNAもまた使用することができる。例えば、PNAを遺伝子における単一塩基対突然変異の分析に用いることができ、例えばPNA指向PCRクランプ法で、他の酵素、例えばS1ヌクレアーゼ(後述のHyrup et al. (1996))との組合せで用いる場合は人工的制限酵素として、或いはDNA配列法及びハイブリダイゼーションにおけるプローブ又はプライマーとして使用することができる(後述のHyrup et al. (1996); 後述のPerry-O'Keefe et al. (1996))。

10

【0087】

他の実施例において、GAVE19のPNAは例えば安定度、特異性又は細胞内取込みを高めるために修飾することができるが、それは親油性又はその他の有用な基をPNAに結合させることにより、PNA-DNAキメラの形成により、或いは既存のリポゾーム又はドラッグデリバリーの他の技術を用いて行うことができる。PNA-DNAキメラの合成は以下の文献に記載されているようにして行うことができる(後述のHyrup et al. (1996), Finn et al., Nucleic Acids Res (1996) 24 (17): 3357-63, Mag et al., Nucleic Acids Res (1989) 17: 5973; 及びPeterser et al., Bioorganic Med Chem Lett (1975) 5: 1119)。

20

【0088】

GAVE19タンパク質

更に、本発明は図2(配列番号2)のアミノ酸配列、そのバリエーション、そのフラグメント、又はその類似体若しくは誘導体を含んでいる単離されたポリペプチドにも及ぶ。

【0089】

配列番号2とは異なる配列、例えばそのバリエーションを有するGAVE19タンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号1のヌクレオチド配列中へ、一つ又はそれ以上のヌクレオチド置換、付加又は欠失を導入し、その結果一つ又はそれ以上のアミノ酸置換、付加又は欠失をコードすべきタンパク質へ導入することによって作成することができる。

30

【0090】

特別な実施例においては、GAVE19タンパク質の突然変異体は、(1)GAVE19信号化経路におけるタンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用を生ずる能力、(2)GAVE19リガンドと結合する能力、又は(3)細胞内標的タンパク質に結合する能力を検定するのに用いることができる。

更に他の実施例においては、GAVE19突然変異体は細胞増殖又は細胞分化を調節する能力を検定するのに用いることができる。

40

【0091】

生(native)のGAVE19タンパク質は、標準的タンパク質精製技術を用いた適当な精製操作によって細胞又は組織材料から単離することができる。或いはまたGAVE19タンパク質は組換えDNA技術によって容易に産生することができる。尚、本発明に係る他の方策としては、標準的なペプチド合成技術を用いてGAVE19タンパク質又はポリペプチドを化学的に合成することもできる。

【0092】

「単離された」又は「精製された」タンパク質、又はそれらの生物学的に活性な部分は、細胞内物質又はGAVE19タンパク質起源の細胞又は組織源に由来する汚染タンパク質を実質的に含んでおらず、或いは化学合成の場合は、合成前駆物質又は他の化学物質を

50

実質的に含んでいない。ここで熟語「細胞内物質を実質的に含んでいない」には、タンパク質が単離された又は組換え技術で産生された細胞の細胞成分を含まないG A V E 1 9タンパク質の調製を含むものである。このように細胞内物質を実質的に含んでいないG A V E 1 9タンパク質は、非G A V Eタンパク質（ここでは「汚染されているタンパク質」ともいう。）の約30%、20%、10%又は5%以下、或いはそれ以下（乾燥重として）を有するG A V E 1 9タンパク質の調製をも含む。

【0093】

G A V E 1 9タンパク質又はその生物学的に活性な部分が組換え技術で産生された場合は、好ましくは培地を実質的に含んでいないこと、即ちタンパク質調製物の容積の約20%、10%又は5%以下、或いはそれ以下の培地を含むに過ぎないことを意味する。G A V E 1 9タンパク質が化学合成で作成された場合は、好ましくは合成前駆体又は他の化学物質を実質的に含んでいないこと、即ち、タンパク質合成に関与した合成前駆体又は他の化学物質から分離されていることを意味する。それ故、そのようなG A V E 1 9タンパク質の調製品は約30%、20%、10%又は5%以下、或いはそれ以下（乾燥重量として）の合成前駆体又は非G A V E 1 9化学物質を含むに過ぎない。

10

【0094】

G A V E 1 9タンパク質の生物学的に活性な部分又はフラグメントは、G A V E 1 9タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2に表されているアミノ酸配列）に対し十分に同一性のある又はそれ由来のアミノ酸配列を含むペプチドを含んでいて、G A V E 1 9タンパク質の全長よりも少ないアミノ酸を含み、かつG A V E 1 9タンパク質の少なくとも一つの活性を表している。典型的には、生物学的に活性な部分は、G A V E 1 9タンパク質の少なくとも一つの活性に対するドメイン又はモチーフを含んでいる。G A V E 1 9タンパク質の生物学的に活性な部分は、長さとして例えば10、25、50、100又はそれ以上のアミノ酸から成るポリペプチドであり得る。特定の生物学的に活性なポリペプチドは一つ又はそれ以上の同定されたG A V E 1 9構造ドメインを含んでいる。

20

【0095】

更に、他の生物学的に活性なG A V E 1 9タンパク質の部分で、その中で他のタンパク質領域が欠失しているものは、組換え技術で調製することができ、また生のG A V E 1 9タンパク質の機能的活性の一つ又はそれ以上を評価することができる。

他の有用なG A V E 1 9タンパク質は、配列番号2と実質的に同一なものであり、自然の対立遺伝子変異又は突然変異によりアミノ酸配列に相違があっても、配列番号2の有するG A V E 1 9タンパク質の機能的活性は維持している。例えば、そのようなG A V E 1 9タンパク質及びポリペプチドは、ここに記載された生物学的活性の少なくとも一つを有している。

30

【0096】

それ故、有用なG A V E 1 9タンパク質とは、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも約45%、好ましくは55%、65%、75%、85%、95%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、配列番号2の有するG A V E 1 9タンパク質の機能的活性を維持しているタンパク質である。特別な実施例においては、G A V E 1 9タンパク質は、配列番号2の有するG A V E 1 9タンパク質の機能的活性を維持している。

40

【0097】

二つのアミノ酸配列又は二つの核酸配列の同一性百分率を決定するために、配列を最適比較の目的に合うように一列に並べる必要がある（例えば、第二アミノ酸又は核酸配列と最適な並びを得るために第一アミノ酸又は核酸の配列にギャップを導入することができる）。次にアミノ酸配置又は核酸配置に対応するアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第二配列の配置に対応して、第一配列の配置が同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占められたとき、その分子はその配置において同一性であると考えられる。二つの配列の同一性百分率は配列によって占められる同一性を有する配置の数の関数である（即ち、同一性百分率 = 同一性を有する配置の数 / 配置の合計数（例えば、重複している配置） × 10

50

0)。

【0098】

一つの実施態様においては、二つの配列は同じ長さである。二つの配列間の同一性百分率の決定は、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。二つの配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの特定の例として次のものがあるが、但し、これらに限定されない。Karlin等のアルゴリズム、Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 2264、及びKarlin等の改良アルゴリズム、Proc Natl Acad Sci USA (1993) 90: 5873-5877。そのようなアルゴリズムはAltschul等のNBLAST及びXBLASTプログラムに組込まれている(Altschul et al., J Mol Bio (1990) 215: 403)。本発明のGAVE19核酸分子に相同なヌクレオチド配列を求めるためには、BLASTヌクレオチドサーチを、NBLASTプログラムを用いて、例えばスコア = 100、ワードレングス = 12にセットして操作することができる。本発明のGAVE19タンパク質分子に相同なアミノ酸配列を求めるためには、BLASTプロテインサーチを、XBLASTプログラムを用いて、スコア = 50、ワードレングス = 3にセットして操作することができる。比較目的のためのギャップの並びを求めるためには、Gapped BLASTをAltschul等の記載通りに操作することができる(Altschul et al., Nucleic Acids Res (1997) 25: 3389)。或いはまた、PSI-Blastは、2分子間のかすかな相互作用を探索するために反復探索として操作することができる(上記のAltschul et al. (1997))。BLAST、Gapped BLAST及びPSI-Blastプログラムを使用するときは、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータズ(例えば、XBLAST及びNBLAST)を用いることができる(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。

10

20

【0099】

配列比較に使用される数学的アルゴリズムの他の特別な例としては、Myers等のアルゴリズム(Mayers et al., CABIOS (1988) 4: 11~17)があるが、但し、これに限定されるものではない。そのようなアルゴリズムはGC G配列並びソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを使用するときは、PAM120重量残基表、ギャップ長さペナルティ12及びギャップ長さペナルティ4を用いることができる。

2本の配列間の同一性百分率は、ギャップがあるかないかに関わらず、上記に記載したものと同様の技術を用いて決定することができる。同一性百分率を計算するに当たっては、エグザクトマッチ(正確に対をなすもの)のみを計算に入れるべきである。

30

【0100】

本発明は更にまたGAVE19キメラ又は融合タンパク質にも及ぶものである。ここで使用されているように、GAVE19「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、非GAVE19ポリペプチドに作動可能に連結したGAVE19ポリペプチドを含むものである。「GAVE19ポリペプチド」とは、GAVE19に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。「非GAVE19ポリペプチド」とは、GAVE19タンパク質と本質的には同一ではないタンパク質、例えば、同種又は異種の生物から由来し、GAVE19タンパク質とは異なるタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。GAVE19融合タンパク質については、GAVE19ポリペプチドはGAVE19タンパク質の全て又は一部と対応できるものであり、好ましくは、GAVE19タンパク質の生物学的に活性な部分の少なくとも一つと対応できるものである。

40

【0101】

GAVE19融合タンパク質に関しては、GAVE19ポリペプチドはGAVE19タンパク質の全て又は一部と対応できるものであり、好ましくは、GAVE19タンパク質の生物学的に活性な部分の少なくとも一つと対応できるものである。融合タンパク質に関しては、用語「作動可能に連結」とは、GAVE19ポリペプチドと非GAVE19ポリペプチドが互いに枠内で融合していることを意味する。非GAVE19ポリペプチドはGAVE19ポリペプチドのN-末端又はC-末端に融合することができる。一つの有用な融合タンパク質は、GAVE19配列がグルタチオン-S-トランスフェラー

50

ゼ (G S T) の C - 末端へ融合した G S T - G A V E 1 9 である。そのような融合タンパク質は、組換え G A V E 1 9 の精製を容易にするものである。

【 0 1 0 2 】

他の実施態様において、本発明に係る融合タンパク質は、 G A V E 1 9 の全部又は一部分が免疫グロブリンタンパク質ファミリーの一メンバー由来の配列に融合した G A V E 1 9 - 免疫グロブリン融合タンパク質にも及ぶ。本発明に係る G A V E 1 9 - 免疫グロブリン融合タンパク質は、細胞表面における G A V E 1 9 リガンドと G A V E 1 9 タンパク質間の相互作用を阻害し、それによって *in vivo* における G A V E 1 9 - 仲介信号変換を抑制するために、医薬品組成物中に混合して被検者に投薬することができる。 G A V E 1 9 - 免疫グロブリン融合タンパク質は G A V E 1 9 と同種 (コグネイト) なリガンドの利用可能な量に作用するように使用することができる。 G A V E 1 9 リガンド - G A V E 1 9 相互作用の阻害は、増殖及び分化の障害の治療及び細胞生存の調節 (例えば、促進又は阻止) の双方にとって治療的に有用である。更に本発明に係る G A V E 1 9 - 免疫グロブリン融合タンパク質は、被検体における抗 - G A V E 1 9 抗体産生の免疫原として、 G A V E 1 9 リガンドの精製に、及び G A V E 1 9 と G A V E 1 9 リガンドとの相互作用を阻止する分子同定のスクリーニング検定に使用することができる。

10

【 0 1 0 3 】

特別な実施態様において、本発明に係る G A V E 1 9 キメラ又は融合タンパク質は、標準的な組換え技術により作成することができる。例えば、異なるポリペプチド配列をコードする D N A フラグメントは、通常の技術、例えば連結のために平滑末端又は付着末端の使用、適切な末端を提供するための制限酵素による消化、適切となるように付着末端の埋め込み、不適切な結合を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、及び酵素による連結反応に従って枠内において連結させることができる。他の実施態様においては、融合遺伝子は、自動化 D N A シンテサイザーを含む通常の技術によって合成することができる。

20

【 0 1 0 4 】

或いはまた、遺伝子フラグメントの P C R 増幅は、二本の共役する遺伝子フラグメント間に、相補的な突き出しを作り、続いてアニールして、そして再増幅することによりキメラ遺伝子配列を作成させるアンカープライマーを用いて実施することができる (例えば上述の Ausubel et al. 参照) 。

30

【 0 1 0 5 】

更に、融合対象物を既にコードしている多くの発現ベクターが市場で入手可能である (例えば、 G S T ポリペプチド) 。 G A V E 1 9 コードされた核酸はそのような発現ベクターへクローン化することができ、融合対象物は G A V E 1 9 タンパク質に対して枠内において連結される。

【 0 1 0 6 】

バリエーション

上記に説明したように、本発明は更に G A V E 1 9 タンパク質のバリエーションにも及ぶものである。例えば、突然変異は位置指定突然変異誘発及び P C R 介在突然変異誘発のような標準的技術を用いて配列番号 2 のアミノ酸配列へ導入することができる。更に保存性のアミノ酸置換は一つ又はそれ以上の予想される非不可欠なアミノ酸残基において作成することができる。「保存性のアミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものをいう。例えば、一つ又はそれ以上のアミノ酸が類似極性を有するアミノ酸で置換されて、機能的均等として作用するため、その結果サイレント変異 (沈黙変異) となる。本発明に係るポリペプチドのアミノ酸配列におけるアミノ酸置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のアミノ酸から選択することもできる。例えば、非極性 (疎水性) アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンを含んでいる。芳香族環構造を含むアミノ酸には、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンがある。極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンを

40

50

含む。陽性荷電（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リシン及びヒスチジンを含む。陰性荷電（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含む。そのような変換はポリアクリルアミドゲル電気泳動又は等電点により測定される外見上の分子量に影響を与えない。

【0107】

特に好ましい置換は、以下の通りである。

- ArgをLysで置換、又はその逆で、陽性荷電は維持されている；
- AspをGluで置換、又はその逆で、陰性荷電は維持されている；
- ThrをSerで置換、遊離-OHは維持されている；及び
- AsnをGlnで置換、遊離NH₂は維持されている。

10

【0108】

尚、アミノ酸置換は特に好ましい特性を有するアミノ酸を置換するためにも導入することができる。例えば、Cysはもう一つのCysとジスルフィド架橋を形成する可能性のある部位に導入することができる。Hisは特に「触媒」部位に導入することができる（即ち、Hisは酸としても塩基としても作用することができ、そして生物化学的触媒として最も良く用いられているアミノ酸である）。Proは特にその平面的構造故にタンパク質構造におけるβ-ターンを誘発させるために導入することができる。

【0109】

突然変異もまた、GAVE19コード配列の全体又は一部分に沿って、例えば飽和（saturation）突然変異誘発によりランダムに誘発させることができ、発生した突然変異体はGAVE19生物学的活性について、その活性を維持している突然変異体を同定するために、スクリーニングすることができる。突然変異誘発に続いて、コードされたタンパク質は組換え技術によって発現し、そしてタンパク質の活性を測定することができる。

20

【0110】

本発明に係るバリエーションはGAVE19アゴニスト（擬態（mimetic）の）又はGAVE19アンタゴニストとして作用することができる。GAVE19タンパク質のバリエーションは、突然変異、即ちGAVE19タンパク質の個別の点突然変異又は短縮化（truncation）によって、発生させることもできる。GAVE19タンパク質のアゴニストは、自然発生のGAVE19タンパク質の生物学的活性と同一の又はサブセットを実質的に維持することができる。例えば、GAVE19タンパク質のアンタゴニストは、GAVE19タンパク質を含む細胞内信号伝達カスケードの下流方向又は上流方向経路に競合的に結合することができる、そしてGAVE19タンパク質の自然発生型の活性の一つ又はそれ以上を阻害することができる。このようにして、特異的な生物学的効果は、制限された機能を有するバリエーションを処理することによって引き出すことができる。GAVE19タンパク質の自然発生型の生物学的活性のサブセットを有するバリエーションによる被検体への処置は、GAVE19タンパク質の自然発生型による処置と比較してより少ない副作用を被検体に与える。

30

【0111】

GAVE19アゴニスト（擬態の）又はGAVE19アンタゴニストのいずれかの作用を有するGAVE19タンパク質のバリエーションは、突然変異体のスクリーニングコンビナトリアルライブラリー、例えば、GAVE19アゴニスト又はアンタゴニスト活性に対するGAVE19タンパク質の短縮化（truncation）突然変異体によって同定することができる。在る実施態様においては、GAVE19バリエーションの多彩なライブラリーは、核酸レベルにおけるコンビナトリアル突然変異誘発によって生じさせることができ、そして多彩な遺伝子ライブラリーによってコードすることができる。GAVE19バリエーションの多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチド混合物を潜在的GAVE19配列の縮重セットをそれぞれのポリペプチドに、或いはまたGAVE19配列のセットをそこに含んでいるより大きな融合タンパク質（例えば、ファージディスプレイ）のセットとして発現している遺伝子配列に酵素的に連結して作成することができる。

40

【0112】

50

縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的 G A V E 1 9 バリエーションのライブラリーを作成するのに用いられる方法には、種々のものがある。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動化 DNA 合成機中で合成し、その後合成された遺伝子を適当な発現ベクターに連結させることによって作成することができる。遺伝子の縮重セットを用いることにより、潜在的 G A V E 1 9 配列の望ましいセットをコードする配列の全てを、一つの混合物として準備することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成法は技術水準として既知である（例えば、Narang, Tetrahedron (1983) 39: 3; Itakura et al., Ann Rev Biochem (1984) 53: 323; Itakura et al., Science (1984) 198: 1056; Ike et al., Nucleic Acid Res (1983) 11: 477参照）。

【 0 1 1 3 】

加えて、G A V E 1 9 タンパク質のコード配列のフラグメントのライブラリーは、G A V E 1 9 タンパク質のバリエーションのスクリーニング及びその後の選択に用いるため、G A V E 1 9 フラグメントの雑多な集団を発生させるのに使用することができる。ある実施態様においては、配列フラグメントをコードしているライブラリーは、G A V E 1 9 コード配列の二本鎖 PCR フラグメントをニック（切れ目）が分子当たり約 1 個起こるような条件下でヌクレアーゼを処理し、二本鎖 DNA を変性した後、異なるニック処理物からのセンス/アンチセンス対を含む二本鎖 DNA を形成するように、DNA を再生し、S 1 ヌクレアーゼ処理により再生した二重体から一本鎖部分を除去して得られるフラグメントライブラリーを発現ベクターへ連結させることによって作成することができる。この方法により、発現ライブラリーは、G A V E 1 9 タンパク質の種々の大きさの N - 末端及び細胞内フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

【 0 1 1 4 】

点突然変異又は短縮化（truncation）によって作られたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物のスクリーニング及び選択された特性を有する遺伝子産物の c DNA ライブラリーのスクリーニングのための幾つかの技術は技術水準として既知である。そのような技術は G A V E 1 9 タンパク質のコンビナトリアル突然変異誘発により作成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適用することができる。巨大な遺伝子ライブラリーのスクリーニングのハイスループット分析に使用可能なものとして最も広く用いられている技術は、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、そのライブラリーを有するベクターを適当な細胞へトランスフォームすること、及び、求め

【 0 1 1 5 】

りカーシブアンサンブル（recursive ensemble）突然変異誘発（REM）、ライブラリーにおいて機能的突然変異の頻度を高める技術は、G A V E 1 9 バリエーションを同定するスクリーニング検定と組み合わせて使用することができる（Arkin et al., Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89: 7811-7815; Delgrave et al., Protein Engineering (1993) 6 (3): 327-331）。

【 0 1 1 6 】

G A V E 1 9 の類似体及び誘導体

更に、本発明は、化学的修飾により作成された G A V E 1 9 の誘導体又は類似体を含む。本発明に係る G A V E 1 9 タンパク質は一つ又はそれ以上の化学成分を当該タンパク質成分に結合させることによって誘導化することができる。

【 0 1 1 7 】

誘導化のための化学成分：誘導化に適する化学成分は水溶性ポリマーの中から選択することができるが、それは G A V E 1 9 類似体又は誘導体が生理的環境のような水溶性環境において沈殿しないためである。場合によっては、ポリマーは薬剤としても許容される。当業者は、有望なポリマーを、ポリマー/成分の結合が薬剤として使用されるか否か、そしてもしそうであれば望ましい投与量、循環時間、タンパク質分解耐性、及びその他を考慮して選択することができる。

10

20

30

40

50

【0118】

G A V E 1 9 についてのこれらの要件は、ここに提示された検定法を用いることによって確認することができる。ここで利用される水溶性ポリマーの例としては、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサソラン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれでもよい）、デキストラン、ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレンの多価アルコール等が挙げられるが、但しこれらに限定されるものではない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水中での安定度により、工業的生産において有利であると思われる。

10

【0119】

ポリマーはいかなる分子量でもよく、また分枝鎖又は直鎖のいずれでもよい。ポリエチレングリコールの場合は、取扱い及び生産の容易さから好ましい分子量は約2 kDa ~ 100 kDaの範囲である（用語「約」とは、ポリエチレングリコール合成において、或る分子は記載された分子量よりも大きく、また或る分子はそれよりも小さいことを意味する）。

【0120】

他の大きさのものは、所望される薬剤の局面に依存して使用することができる（例えば、所望する放出維持時間、効能がある場合はその生物活性、取扱い易さ、免疫原性の程度又はその欠損、及びその他の治療タンパク質又はその類似体に対するポリエチレングリコールの既知の効果）。

20

多数のポリマー分子がG A V E 1 9 に結合するため、当業者であれば作用に対する影響を確認することができると思われる。或る分子はモノ誘導体であり、また或る分子はジ-、トリ-、テトラ-誘導体、又は同一若しくは異なる化学残基の組合せによる誘導体である（例えば、異なる分子量のポリエチレングリコールのようなポリマー）。G A V E 1 9 分子に対するポリマー分子の比率は、反応混合物の濃度によって異なる。一般的には、最適比率（過剰な無反応成分及びポリマーが存在しないという意味での反応効率の用語として）は、誘導体の所望する程度（例えば、モノ、ジ-、トリ-等）、選択したポリマーの分子量、ポリマーが分枝鎖か直鎖か、及び反応条件のような要因によって決定される。

30

【0121】

ポリエチレングリコール分子（又は他の化学成分）は、G A V E 1 9 の機能又は抗原ドメインへの影響を考慮してG A V E 1 9 に結合すべきである。幾つかの結合方法が当業者にとって可能であり、例えばE P 0 4 0 1 3 8 4 中に文献として記載されているもの（G - C S F へのP E G カップリング）、及びMalik et al., 1992, Exp. Hematol. 20: 1028-1035（塩化トレスル（tresyl chloride）を用いたG M - C S F のペジレーションが報告されている）を参照することができる。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離アミノ酸又はカルボキシ基のような活性基により、アミノ酸残基に共有結合で結合することができる。ここで活性基とは、活性化したポリエチレングリコール分子が結合し得るもの

40

【0122】

特異的にはN末端が化学的修飾を受けたG A V E 1 9 が望ましい。本組成物の説明のようにポリエチレングリコールを用いて、種々のポリエチレングリコール分子から（分子量、分枝鎖等により）、反応混合物におけるG A V E 1 9 分子に対するポリエチレングリコール分子の比率、実施すべきペジレーション反応の型、及び選択的N末端ペジル化タンパ

50

ク質を得る方法を選択することができる。N末端ペジル化調製を得る方法（即ち、必要な場合は、この分子を他のモノペジル化分子から分離）は、ペジル化タンパク質分子の集団からN末端ペジル化分子を精製することによって行うことができる。選択的N末端化学修飾は、G A V E 1 9誘導化に可能な第一アミノ基の相違（リシン対N末端）の特異的反応性を活用する還元的アルキル化によって行うことができる。適当な反応条件下において、カルボニル基を含んでいるポリマーによるN末端におけるG A V E 1 9の実質的に選択的誘導化を達成することができる。例えば、リシン残基の - アミノ基とG A V E 1 9のN末端残基の - アミノ基との間のp K a相違を利用できるようなp Hにおいて反応を行うことによりG A V E 1 9の選択的N末端ペジル化を行うことができる。そのような選択的誘導化により、G A V E 1 9に対する水溶性ポリマーの結合は調節される：ポリマーとの接合はG A V E 1 9のN末端において優勢的に起こり、リシン側鎖のアミノ基のような他の活性基の修飾はほとんど起こらない。還元的アルキル化を用いた場合、水溶性ポリマーは上記のタイプに該当し、G A V E 1 9にカップリングするためには一つの活性なアルデヒドを持たなければならない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは一つの活性なアルデヒドを含んでいるから使用することができる。

10

【0123】

G A V E 1 9抗体、そのバリエーション、そのフラグメント又はその類似体若しくは誘導体
単離されたG A V E 1 9タンパク質若しくは小部分又はそのフラグメントは、ポリクローナル又はモノクローナル抗体調製の標準的技術を用いて、G A V E 1 9に結合する抗体を製造するための免疫原として使用することができる。ここで用いる用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ちG A V E 1 9又はそのフラグメントのような抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含んでいる分子をいう。G A V E 1 9に特異的に結合する分子は、G A V E 1 9には結合するが、しかしながら例えばG A V E 1 9を自然に含んでいる生物学的標品中の他の分子には実質的には結合しない分子をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、抗体に例えばペプシンのような酵素を処理して得られるF_(ab)及びF_{(ab)₂}フラグメントが挙げられる。本発明はG A V E 1 9、そのバリエーション、そのフラグメント又はその類似体若しくは誘導体を免疫原として有するポリクローナル、モノクローナル及びキメラ抗体を提供する。

20

【0124】

完全長のG A V E 1 9タンパク質を用いることができ、また代わりに本発明は免疫原として用いるためにG A V E 1 9の抗原ペプチドフラグメントを提供するものである。G A V E 1 9の抗原ペプチドは配列番号2に提示されたアミノ酸配列の少なくとも8個（好ましくは10、15、20、30又はそれ以上）のアミノ酸残基を含み、かつG A V E 1 9と特異な免疫複合体を形成するペプチドに対して抗体を生じさせるG A V E 1 9のエピトープを含んでいる。

30

【0125】

G A V E 1 9免疫原は典型的には、当該免疫原を適当な動物（例えば、兔、山羊、マウス又はその他の哺乳類）に免疫感作させて抗体を調製するのに使用することができる。適当な免疫原調製物には例えば組換え技術で発現させたG A V E 1 9タンパク質又は化学的に合成したG A V E 1 9ポリペプチドを含むものでもよい。

40

調製は更に完全若しくは不完全フロイントアジュバンドのようなアジュバンド又は同様の免疫促進物質を含むことができる。適当な動物にG A V E 1 9免疫原調製物を用いて免疫感作することによりポリクローナル抗-G A V E 1 9抗体応答が誘発される。

本発明に係る抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はキメラ抗体である。ここで使用されている用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」とは、G A V E 1 9の特異的なエピトープと免疫反応することができる種類の抗原結合部位を含んでいる抗体分子の集団をいう。モノクローナル抗体組成物は、このように典型的には特異なG A V E 1 9タンパク質エピトープに対し単一の結合アフィニティを提示する。

50

【0126】

ポリクローナル抗 - G A V E 1 9 抗体は、上記の記載の如く、適当な動物を G A V E 1 9 免疫原を用いて免疫感作することにより調製することができる。免疫感作した動物における抗 - G A V E 1 9 抗体の力価は、固定化 G A V E 1 9 を用いたエンザイムイムノアッセイ (E L I S A) のような標準的技術により経時的に測定することができる。必要な場合は、G A V E 1 9 に対する抗体分子は、哺乳類 (例えば、血液から) から単離することができ、更に I g G 画分を得るためにはタンパク質 A クロマトグラフィーのような既知の技術により精製することができる。免疫感作後の適当な時間に、例えば抗 - G A V E 1 9 抗体力価が最高に達した時、抗体産生細胞を被検体から採集し、そして Kohler 等により最初に記載されたハイブリドーマ技術 (Kohler et al., Nature (1975) 256: 495-497)、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (Kohler et al., Immunol Today (1983) 4: 72)、E B V ハイブリドーマ技術 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, (1985), Alan R. Liss, Inc., pp. 77~96) 又はトリオーマ技術のような標準的技術によりモノクローナル抗体を調製するのに用いることができる。ハイブリドーマを産生する技術はよく知られている (概説として Current Protocols in Immunology (1994) Coligan et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY 参照)。簡単に言えば、不死化細胞系 (典型的にはミエローマ) を上記の記載の如く G A V E 1 9 免疫原で免疫した哺乳類由来のリンパ球 (典型的には脾臓細胞) に融合し、そして得られたハイブリドーマの培養液の上澄をスクリーニングして、G A V E 1 9 に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定することである。

10

20

【0127】

リンパ球と不死化細胞系の融合に用いられる多くの既知のプロトコールのいかなるものも、抗 - G A V E 1 9 モノクローナル抗体を生成する目的に利用することができる (例えば、Current Protocols in Immunology, 上記; Galfre et al., Nature (1977) 266: 550-552; Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); 及び Lerner, Yale J Biol Med (1981) 54: 387-402 参照)。更に、当業者であれば、そのような方法には多くの変法があり、それらもまた有用なものであると理解するであろう。典型的には不死化細胞系 (例えば、ミエローマ細胞系) は、リンパ球と同種の哺乳類に由来するものである。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原調製で免疫したマウス由来のリンパ球を、不死化マウス細胞系、例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン (H A T 培地) を含んでいる培地に対して感受性であるミエローマ細胞系とを融合して作成することができる。

30

多くのミエローマ細胞系のいかなるものも、(例えば、P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 - 1、P 3 - x 6 3 - A g 8 . 6 5 3 又は S p 2 / O - A g 1 4 ミエローマ系) 標準的技術に従って融合の相手として使用することができる。これらのミエローマ系は A T C C から入手可能である。典型的には、H A T - 感受性ネズミミエローマ細胞はポリエチレングリコール (P E G) を用いてネズミ脾臓細胞と融合させる。融合により得られたハイブリドーマ細胞は、非融合又は非生産的融合の細胞を死滅させる H A T 培地を用いて選択することができる (トランスフォームされないため、非融合スプレノサイトは数回後に死滅する)。本発明に係るモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、G A V E 1 9 に結合する抗体を含んでいるハイブリドーマ培養の上澄のスクリーニング (例えば、標準的 E L I S A 法) を用いて検出することができる。

40

【0128】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代わりに、モノクローナル抗 - G A V E 1 9 抗体は、G A V E 1 9 に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離するために、G A V E 1 9 との組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー (例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー) をスクリーニングすることによって同定し及び単離することができる。ファージディスプレイライブラリーの作成及びスクリーニングのキットは市場にて入手可能である (例えば、the Pharmacia Recombinant Phage

50

Antibody System, Catalog No. 27-9400-01;及びthe Stratagene「SURFZAP」Phage Display Kit, Catalog No. 240612)。

【0129】

加えて、抗体ディスプレイライブラリーの作成及びスクリーニングに特に使用することができる方法及び試薬の例としては、例えば、U.S. Patent No. 5,223,409; PCT Publication No. WO 92/18619; PCT Publication No. WO 91/17271; PCT Publication No. WO 92/20791; PCT Publication No. WO 92/15679; PCT Publication No. WO 93/01288; PCT Publication No. WO 92/01047; PCT Publication No. WO 92/09690; PCT Publication No. WO 90/02809; Fuchs et al., Bio/Technology (1991) 9: 1370~1372; Hay et al., Hum Antibody Hybridomas (1992) 3: 81~85; Huse et al., Science (1989) 246: 1275~1281; 及びGriffiths et al., EMBO J (1993) 25 (12): 725~734が挙げられる。

10

【0130】

尚更に、組換え抗 - G A V E 1 9 抗体は、例えばモノクローナル及びキメラ抗体を含めて、標準的組換えDNA技術を用いて作成することができる。そのような抗体は、技術水準として既知の組換えDNA技術、例えばPCT Publication No. WO 87/02671; Europe Patent Application No. 184,187; Europe Patent Application No. 171,496; Europe Patent Application No. 173,494; PCT Publication No. WO 86/01533; U.S. Patent No. 4,816,567; Europe Patent Application No. 125,023; Better et al., Science (1988) 240: 1041~1043; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA (1987) 84: 3439~3443; Lin et al., J Immunol (1987) 139: 3521~3526; Sun et al., Proc Natl Acad Sci USA (1987) 84: 214~218; Nishimura et al., Canc Res (1987) 47: 999~1005; Wood et al., Nature (1985) 314: 446~449; Shaw et al., J Natl Cancer Inst (1988) 80: 1553~1559; Morrison, Science (1985) 229: 1202~1207; Oi et al., Bio/Techniques (1986) 4: 214; U.S. Patent No. 5,225,539; Jones et al., Nature (1986) 321: 552~555; Verhoeven et al., Science (1988) 239: 1534; 及びBeidler et al., J Immunol (1988) 141: 4053~4060に記載されている方法を用いて作成することができる。

20

【0131】

抗 - G A V E 1 9 抗体 (例えば、モノクローナル抗体) は、アフィニティクロマトグラフィ又は免疫沈降法のような標準的技術によりG A V E 1 9を単離するのに使用することができる。抗 - G A V E 1 9 抗体は、細胞からの自然G A V E 1 9 及び組換え技術で作成したG A V E 1 9を発現した宿主細胞からの精製を容易にすることができる。

30

更に、抗 - G A V E 1 9 抗体は、G A V E 1 9 タンパク質の発現の数及びパターンを評価するために、G A V E 1 9 タンパク質 (例えば、細胞溶解物又は細胞上澄画分中の) を検出するのに用いることができる。抗 - G A V E 1 9 抗体は、臨床的検査手順の一部として、例えば、与えられた治療法の効果を判定するために、組織におけるタンパク質レベルをモニターする診断に使用することができる。検出は、抗体を後述する検出可能な物質 (標識) とカップリングすることによって容易化することができる。

【0132】

検出可能な標識

場合によっては、本発明に係る単離された核酸分子、本発明に係るポリペプチド及び本発明に係る抗体、並びにそれらのフラグメントは、検出可能に標識することができる。適当な標識としては、酵素、蛍光体 (例えば、蛍光イソチオシアネート (FITC)、フィコエリトリン (PE)、テキサスレッド (TR)、ロダミン、遊離又はキレートランタニド系塩、特にEu³⁺等の蛍光体)、発色団、放射性同位元素、キレート剤、染料、金コロイド、ラテックス粒子、リガンド (例えば、ビオチン)、生物発光体、及び化学発光試薬を挙げることができる。

40

【0133】

対照マーカを採用するときは、同一の又は相違する標識を受容体及び対照マーカに使用することができる。同位元素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I及び¹⁸⁶Reのような放射性活性標識を使用する場合

50

は、既知で現在使用可能な計測方法を利用することができる。標識が酵素の場合は、検出は、現在使用されている技術水準として既知の比色分析、分光分析、蛍光分光分析、電流測定又は気体定量法のいかなるものによっても遂行することができる。

【0134】

直接標識は、本発明に従って使用することができる標識の一つの例である。直接標識とは、自然の状態において、肉眼で又は光学フィルター及び/又は例えば蛍光を発生させる紫外線のような利用促進の助けを得て容易に目視することのできるものと定義される。本発明に従って使用することができる有色標識の例には、金属ゾル粒子があり、例えばLeuering (U.S. Patent 4,313,734)の記載のような金ゾル粒子、Gribnau等(U.S. Patent 4,373,932)及びMay等(WO 88/08534)の記載のような染料ゾル粒子、May(上述)、Snyder (EP-A 0 280 559 及び0 281 327)記載のような染色ラテックス、又はCampbell等(U.S. Patent 4,703,017)記載のようなリポソームにカプセル化された染料が挙げられる。他の直接標識としては、放射性ヌクレオチド、蛍光体、又は発光体がある。これら直接標識の方法に加えて、酵素を含む間接標識も本発明に従って使用することができる。エンザイムノアッセイの種々のタイプは技術水準としてよく知られており、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、リゾチーム、グルコース-6-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼがあり、これら及びその他のものは、Eva Engvall 著, Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT in Methods in Enzymology, 70. 419~439, 1980 及び U.S. Patent 4,857,453において詳細に議論されている。

10

【0135】

本発明で使用される他の標識には、磁気ビーズ、又は磁気共鳴イメージング標識が含まれる。

20

【0136】

他の実施態様においては、 ^{32}P で標識するために、リン酸化部位が本発明に係る単離されたポリペプチド、本発明に係る抗体又はそれらのフラグメント上に作成されているが、それらは、Foxwell等に対して1995年10月17日に発行されたEuropean Patent No. 0372707又はU.S. Patent No. 5,459,240に記載されている。

【0137】

ここに例証したように、抗体を含めたタンパク質は代謝標識によって標識することができる。代謝標識は、 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン又は $[^{32}\text{P}]$ -オルトリン酸のような代謝標識物を補足した培地の存在下でタンパク質を発現する細胞の*in vitro*インキュベーション中に行われる。 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンをを用いた代謝(又は生合成)標識に加えて、本発明は更に $[^{14}\text{C}]$ -アミノ酸及び $[^3\text{H}]$ -アミノ酸(不安定でない部位にトリチウムを置換したもの)を用いた標識をも考慮に入れている。

30

【0138】

組換え発現ベクター及び宿主細胞

本発明のもう一つの局面は、ベクター、特にGAVE19(又はその部分)をコードする核酸を含んでいる発現ベクターに関するものである。上記に説明したように、ベクターの一つのタイプは、「プラスミド」であり、それは他のDNA断片を連結することができる環状二本鎖DNAループのことをいう。あるベクターは宿主細胞(例えば細菌性複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター)の中で自律的複製が可能である。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞の中へ取り入れられて、宿主細胞のゲノム中へ組み込まれ、その結果宿主ゲノムに沿って複製される。尚、発現ベクターは、作動可能に連結した遺伝子の発現を支配することができる。一般に、組換えDNA技術において用いられる発現ベクターは、多くの場合プラスミド(ベクター)型で用いられる。しかしながら本発明は、同様の機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)のような発現ベクターの他の型をも含むことを意図している。

40

【0139】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞での核酸発現に適する型の本発明に係る核酸

50

分子を含んでいる。それは、本発明に係る組換え発現ベクターは、発現に使用される宿主細胞を基礎として選択された一つ又はそれ以上の制御配列を含んでおり、そしてそれは発現すべき核酸に作動可能に連結している。組換え発現ベクターが「作動可能に連結している」とは、興味あるヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を許容する態様（例えば、*in vitro*転写/翻訳系において、又はベクターが宿主細胞中へ取り込まれたときは宿主細胞中において）で制御配列に連結していることを意味する。

【0140】

用語「制御配列」とは、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御因子（例えば、ポリアデニンシグナル）を含むことを意味する。そのような制御配列は、例えば Goeddel 著 Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Vol. 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) に記載されている。制御配列は宿主細胞の多くのタイプにおけるヌクレオチド配列の直接構成的発現を含む（例えば、組織特異的制御配列）。当業者であれば、発現ベクターの設計は、トランスフォームする宿主細胞の選択、所望するタンパク質発現の程度等の要因に依存するものであることを理解できるものと思われる。本発明に係る発現ベクターは、ここに記載された核酸によってコードされたタンパク質又はペプチド（例えば、G A V E 1 9 タンパク質、G A V E 1 9 の突然変異体、融合タンパク質等）を産生するために、宿主細胞中へ取り込ませることができる。

【0141】

本発明に係る組換え発現ベクターは、原核細胞又は真核細胞、例えば大腸菌 (*E. coli*) のような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いて）、酵母細胞又は哺乳類細胞中で、G A V E 1 9 を発現するように設計することができる。適当な宿主細胞については前述の Goeddel において更に議論する。或いはまた、組換え発現ベクターは、例えば T 7 プロモーター及び/又は T 7 ポリメラーゼのようなファージ制御因子及びタンパク質を用いて、*in vitro* で転写及び翻訳することができる。

【0142】

真核細胞におけるタンパク質発現は、融合又は非融合タンパク質の発現を支配する構成的又は誘導的プロモーターを含んでいるベクターを用いて、最も頻繁には大腸菌 (*E. coli*) 中で行われる。融合ベクターは多くのアミノ酸をそこでコードされたタンパク質、通常は組換えタンパク質のアミノ末端へ付加する。そのような融合ベクターは典型的には三つの目的：1) 組換えタンパク質の発現を増加させるため；2) 組換えタンパク質の溶解度を増大させるため、及び3) アフィニティ精製においてリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製を補助するために、役割を果たす。しばしば融合発現ベクターにおいては、タンパク質分解の切断部位を融合の接合部に導入し、融合体から組換えタンパク質の分離を可能とし、続いて融合タンパク質の精製を可能とする。そのような酵素及び同種の (cognate) 識別配列は、X a 因子、トロンピン及びエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターは pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith et al., Gene (1988) 67: 31~40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) 及び pRITS (Pharmacia, Piscataway, NJ) を含み、それらはグルタチオン - 5 - トランスフェラーゼ (GST)、マルトース E 結合タンパク質又はプロテイン A をそれぞれ標的組換えタンパク質へ融合させる。

【0143】

適当な誘導的非融合大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクターは、pTrc (Amann et al., Gene (1988) 69: 301~315) 及び pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, California (1990) 185: 60~89) を含んでいる。pTrc ベクター由来の標的遺伝子発現はハイブリッド *trp-lac* 融合プロモーターからの宿主 RNA ポリメラーゼ転写に依存している。

【0144】

大腸菌 (*E. coli*) における組換えタンパク質発現を最適化する一つの方策は、組換えタンパク質をタンパク質分解によって切断する能力を欠損した宿主においてタンパク質を発現させることである (Gottesman, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology

10

20

30

40

50

gy, Academic Press, San Diego, California (1990) 185: 119~128)。他のもう一つの方策は、発現ベクターへ挿入されるべき核酸分子の核酸配列を変更して、各アミノ酸に対する個々のコドンが大腸菌 (*E. coli*) において好適に使用されるようにすることである (Wada et al., *Nucleic Acids Res* (1992) 20: 2111~2118)。本発明に係る核酸分子のそのような変更は、標準的なDNA合成技術により行うことができる。

【0145】

他の実施態様において、GAVE19発現ベクターは酵母発現ベクターである。パン酵母 (*S. cerevisiae*) のような酵母における発現用のベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari et al., *EMBO J* (1987) 6: 229~234)、pMFa (Kurjan et al., *Cell* (1982) 30: 933~943)、pJRY88 (Schultz et al., *Gene* (1987) 54: 113~123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 及び pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) が挙げられる。

10

【0146】

或いはまた、GAVE19はバキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞においても発現することができる。培養昆虫細胞においてタンパク質発現に使用可能なバキュロウイルスベクターには、pAc系 (Smith et al., *Mol Cell Biol* (1983) 3: 2156~2165) 及び pVL系 (Lucklow et al., *Virology* (1989) 170: 31~39) が含まれる。

【0147】

尚他の実施態様において、本発明に係る核酸は哺乳類発現ベクターを用いて哺乳類細胞中でも発現される。ここで利用されている哺乳類発現ベクターの例としては、pCDM8 (Nature (1987) 329: 840参照) 及び pMT2PC (Kaufman et al., *EMBO J* (1987) 6: 187~195) が挙げられるが、但し、これらに限定されない。哺乳類細胞中で使用する場合は、発現ベクターの制御機能がしばしばウイルス制御因子によって提供される。例えば、よく使用されるプロモーターはポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス及びシミアンウイルス40由来のものである。原核細胞及び真核細胞の双方に対する他の適当な発現系については、上記のSambrook等の文献第16及び17章を参照することができる。

20

【0148】

他のもう一つの実施態様において、本発明に係る組換え哺乳類発現ベクターは、好適には或る特殊な細胞型 (例えば、組織特異的制限因子が核酸の発現に使用されているもの) において、核酸の発現を支配することができる。組織特異的制御因子は技術水準として既知のものである。適当な組織特異的プロモーターの例示列挙としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異性; Pinkert et al., *Genes Dev* (1987) 1: 268~277)、リンパ球特異的プロモーター (Calame et al., *Adv Immunol* (1988) 43: 235~275)、特にT細胞受容体のプロモーター (Winoto et al., *EMBO J* (1989) 8: 729~733) 及び免疫グロブリン (Banerji et al., *Cell* (1983) 33: 729~740; Queen et al., *Cell* (1983) 33: 741~748)、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86: 5473~5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund et al., *Science* (1985) 230: 912~916) 及び乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター; U.S. Patent No. 4,873,316 及び Europe Application No. 264,166) を挙げることができる。発生制御プロモーターもまた含まれ、例えばマウスホックスプロモーター (Kessel et al., *Science* (1990) 249: 374~379) 及び -フェトプロテインプロモーター (Campes et al., *Genes Dev* (1989) 3: 537~546) がある。

30

40

【0149】

本発明は更に発現ベクター中にアンチセンス配位にクローンした本発明に係るDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。即ち、GAVE19 mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現 (DNA分子の転写により) を許容する態様で、DNA分子が制御配列に操作可能に連結している。アンチセンス配位にクローンした核酸に作動可能に連結された制御配列は、種々の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的発現を支配するように選択することができる。例えば、ウイルスのプロモーター及び/又はエンハンサー又は制御配列は、アンチセンスRNAの構成的組織特異的又は細胞型特異的発

50

現を支配するように選択することができる。

アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が高効率制御領域の調節の下に産生される、組換えプラスミド、ファージミド又は弱毒化ウイルスの型をしていて、その活性はベクターが導入された細胞型によって判定することができる。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の制御についての議論は、Weintraub等の文献 (Reviews-Trends in Genetics, Vol 1 (1) 1986) を参照することができる。

【0150】

本発明の他のもう一つの局面は、本発明に係る組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関するものである。用語「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」は、ここでは相互に変換可能に用いられている。そのような用語は単に特別な対象細胞を意味するのではなく、またそのような細胞の子孫又はその潜在的子孫をも意味するものである。突然変異又は環境の影響のいずれかにより継代培養中にはいくつかの変化が起こり得るから、そのような子孫は実際には親細胞とは同一ではないかも知れないが、しかしながら尚ここで使用される用語の範囲内に含まれる。

10

【0151】

宿主細胞はいかなる原核細胞又は真核細胞であってもよい。例えば、G A V E 1 9 タンパク質は大腸菌 (*E. coli*) のような細菌細胞、昆虫細胞、酵母又は哺乳類細胞 (例えばチャニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、293細胞又はCOS細胞) 中で発現することができる。他の適当な宿主細胞は当業者にとっては既知のものである。ベクターDNAは通常のトランスフォーメーション又はトランスフェクション技術を用いて原核細胞又は真核細胞中へ導入することができる。ここで使用されている用語「トランスフォーメーション」及び「トランスフェクション」は、外来の核酸 (例えば、DNA) を宿主細胞中へ導入するための技法として認知された各種の技術を意味し、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿、形質導入、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、リポフェクション、又はエレクトロポレーションが含まれる。

20

【0152】

哺乳類細胞の安定なトランスフェクションのためには、使用する発現ベクター及びトランスフェクション技術にもよるが、細胞のほんの少数のもののみが外来性DNAをゲノム中へ組み込むに過ぎないことが知られている。この組込み体を同定し及び選択するためには、選択マーカー (例えば、抗生物質に耐性を与える) をコードしている遺伝子を一般に興味ある遺伝子と共に宿主細胞中へ取り込ませる。好適な選択マーカーとしては、G 4 1 8、ヒグロマイシン及びメトトレキサートのような薬剤耐性を付与するものがある。選択的マーカーをコードする核酸は、G A V E 1 9 をコードしている同一ベクターを用いて、又は他のベクターを用いて、宿主細胞へ導入することができる。導入された核酸により安定にトランスフェクトされた細胞は、薬剤選択によって同定することができる (例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞に死滅する)。

30

【0153】

培養されている原核細胞又は真核細胞のような本発明に係る宿主細胞は、G A V E 1 9 タンパク質を産生 (即ち、発現) するのに使用することができる。それ故、本発明は、本発明に係る宿主細胞を用いたG A V E 1 9 タンパク質を産生する方法をも提供するものである。或る実施態様においては、その方法は、G A V E 1 9 タンパク質が生成されるような安定培地中で本発明に係る宿主細胞 (G A V E 1 9 をコードする組換え発現ベクターが既に導入されているもの) を培養することを含む。他の実施態様においては、その方法は、培地又は宿主細胞からG A V E 1 9 を単離することを更に含むものである。

40

【0154】

他のもう一つの実施態様においては、G A V E 1 9 は、修飾された発現ベクターにサブクローンした他のタンパク質の組換え発現のための誘導的発現系を含んでいる。例えば、突然変異を起こしたGタンパク質を含んでいる宿主細胞 (例えば、酵母細胞、Y 2 副腎皮質細胞及び-cyc S49, U.S. Pat. Nos. 6,168,927B1, 5,739,029 及び 5,482,835; Mitchell et al., Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89 (19): 8933~37 及び Katada et al., J

50

Biol Chem (1984) 259 (6): 3586~95参照) は、G A V E 1 9 が宿主細胞中で機能的に発現している G A V E 1 9 をコードしている核酸配列を含んでいるベクター第一発現ベクターで形質導入される。例え、発現された G A V E 1 9 が構成的活性であっても、突然変異体は信号伝達を許容するものではない；即ち、下流カスケード方向の G タンパク質の活性化は起こらない（例えば、アデニルシクラーゼの活性化は起こらない）。それ故に、第二発現ベクターが G A V E 1 9 含有宿主細胞の形質導入に使用される。第二ベクターは宿主細胞の G タンパク質突然変異に対して相補的な構造遺伝子（即ち、機能的な哺乳類又は酵母 G_s、G_i、G_o、又は G_q、例えば P C T Publication No. W0 97 / 48820; U.S. Pat. Nos. 6,168,927 B1, 5,739,029及び5,482,835参照）を、誘導系によって発現させるべき興味ある遺伝子に加えて含んでいる。

10

第二ベクターの相補的構造遺伝子は誘導的であり、即ち、外因的に添加された成分の調節下において（例えば、テトラサイクリン、I P T G、低分子等、上述の Sambrook et al., 参照）、相補的構造遺伝子に作動可能に連結しているプロモーターを活性化する。インデューサー（誘導物質）に加えて、相補的構造遺伝子によりコードされたタンパク質は機能的に発現し、構成的活性な G A V E 1 9 は複合体を形成し、そして適当な下流経路の活性化を導く（例えば、二次メッセンジャーの形成）。二次ベクターを含んでいる興味ある遺伝子は、適当な二次メッセンジャー（例えば、C R E B、A P 1 因子）によって活性化された作動可能に連結しているプロモーターを有している。このように、二次メッセンジャーが蓄積するにつれて、興味ある遺伝子から上流のプロモーターは当該遺伝子産物を発現するように活性化される。誘導物質がないときは、興味ある遺伝子の発現は、スイッチオフとなる。

20

【 0 1 5 5 】

特別な実施態様においては、誘発的発現系の宿主細胞としては S 4 9 (c y c⁺) 細胞があるが、但し、これに限定されない。G タンパク質突然変異を含むように意図した細胞系は、適当な突然変異は人工的に作成 / 構成することができる。（U.S. Pat. Nos. 6,168,927B1, 5,739,029及び5,482,835, 酵母細胞系、参照）。

【 0 1 5 6 】

関連した局面として、配列番号 2 において説明したようにタンパク質をコードしている配列を含んでいる c D N A に作動可能に連結したベクターにより細胞はトランスフェクトされる。そのような系を含んでいる一次及び二次ベクターとしては、pCDM8 (Seed, Nature (1987) 329: 840) 及び pMT2PC (Kaufman et al., EMBO J (1987) 6: 187~195)、pYep Sec1 (Baldari et al., EMBO J (1987) 6: 229~234)、pMFa (Kurjan et al., Cell (1982) 30: 933-943、pJRY88 (Schultz et al., Gene (1987) 54: 113~123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 及び pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) が挙げられるが、但しこれらに限定されない。

30

【 0 1 5 7 】

また関連した局面として、宿主細胞はそのような適当な方法によりトランスフェクトされ、トランスフェクションの結果として、機能的 G A V E 1 9 タンパク質が発現される（例えば、上述の Sambrook et al., 及び Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, Stockton Press, New York, NY, 1990）。そのような「機能的タンパク質」には、発現後に G タンパク質と複合体を形成するが、そこでは G タンパク質が二次メッセンジャー形成を制御しているようなタンパク質が含まれるが、但し、これらに限定されない。ここで利用される宿主細胞にトランスフェクトする他の方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション（電気穿孔）、マイクロインジェクション（微量注入）、トランスダクション（形質導入）、セルフュージョン（細胞融合）、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション（リソソーム融合）、遺伝子ガンの使用、又は D N A ベクタートランスポーター（例えば、Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 963~967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263: 14621~14624; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990参照）が挙げられるが、但しこれらに限定されない。

40

50

【0158】

本発明においては、プロモーターの多彩な利用法がある。実際本発明に係るポリペプチドの発現は、技術水準として既知のいかなるプロモーター/エンハンサー因子によっても制御され得るが、しかしながらこれらの制御因子は発現のために選択された宿主中で機能的でなければならない。G A V E 19 発現を調節するのに用いられるプロモーターには、S V 40 初期プロモーター領域 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304~310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端の長いリピート配列中に含まれているプロモーター (Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787~797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441~1445)、メタロチオネイン遺伝子の制御配列 (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39~42)、 γ -ラクタマーゼプロモーターのような原核細胞の発現ベクター (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727~3731) 又は t a c プロモーター (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 80: 21~25) が含まれるが、但し、これらに限定されない。尚、以下の文献をも参照することができる。「Useful proteins from recombinant bacteria」 in Scientific American, 1980, 242: 74~94; G a l 4 プロモーターのような酵母又は他の菌類由来のプロモーター因子、A D C (アルコールデヒドロゲナーゼ) プロモーター、P G K (ホスホグリセロールキナーゼ) プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター; 組織特異性を有し、トランスジェニック動物に使用される動物転写調節領域: 脾小胞体細胞中で活性なエラストラーゼ I 遺伝子調節領域 (Swift et al., 1984, Cell 38: 639~646; Ormitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399~409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425~515); 脾臓細胞中で活性なインスリン遺伝子調節領域 (Hanahan, 1985, Nature 315: 115~122), リンパ球で活性な免疫グロブリン遺伝子調節領域 (Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647~658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533~538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444)、精巣、乳房、リンパ球及びマスト細胞中で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域 (Leder et al., 1986, Cell 45: 485~495)、肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268~276)、肝臓で活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639~1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53~58)、肝臓で活性な α -1-アンチトリプシン遺伝子調節領域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161~171)、骨髄細胞で活性な β -グロビン遺伝子調節領域 (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338~340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89~94)、脳の乏突起膠細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子調節領域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703~712)、骨格筋で活性なミオシン軽鎖-2 遺伝子調節領域 (Sani, 1985, Nature 314: 283~286)、及び視床下部で活性な性腺刺激ゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子調節領域 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372~1378)。

【0159】

本発明に係る核酸分子を含んでいる発現ベクターは四つの一般的アプローチによって同定することができる: (a) 所望するプラスミド DNA 又は特異的 mRNA の PCR 増幅、(b) 核酸ハイブリダイゼーション、(c) 選択マーカー遺伝子機能の存在又は不存在、(d) 挿入された配列の発現。最初のアプローチでは、核酸は増幅産物の検出に供給するために PCR で増幅することができる。2 番目のアプローチでは、発現ベクターに挿入された外来遺伝子の存在は、挿入されたマーカー遺伝子に相同な配列を含んでいるプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーションによって検出することができる。3 番目のアプローチでは、組換えベクター/宿主系は、ベクターに外来遺伝子を挿入することによって生じた或る「選択マーカー」遺伝子機能 (例えば、 β -ガラクトシダーゼ活性、チミジンキナーゼ活性、抗生物質耐性、トランスフォーメーション表現型、パキユロウイルスでの封入体 (occlusion body) の形成等) の存在又は欠損に基づいて同定及び選択することができる。他の実施態様において、もし G A V E 19 タンパク質、そのバリエーション、又はその類似体若しくは誘導体をコードしている核酸がベクターの「選択マーカー」遺伝子配列の

中に挿入された場合、その挿入物を含んでいる組換え体は G A V E 1 9 遺伝子機能の欠損により同定することができる。4番目のアプローチでは、組換え発現ベクターは、発現したタンパク質は機能的に活性な立体配座であるという条件で、組換え体によって発現された遺伝子産物の活性、生化学的又は免疫学的特性を検定することにより同定することができる。

【0160】

本発明の DNA 配列の発現には、種々の宿主 / 発現ベクター組合せを採用することができる。例えば、有用な発現ベクターは、染色体、非染色体及び合成 DNA 配列のセグメント（分節）から構成されている。適当なベクターとしては、SV40 の誘導體、及び細菌プラスミドで、例えば、大腸菌 (*E. coli*) プラスミド *col E 1*、*pCR1*、*pBR322*、*pMal-C2*、*pET*、*pGEX* (Smith et al., 1988, *Gene* 67: 31-40)、*pMB9* 及びそれらの誘導體、*RP4* のようなプラスミド；ファージ DNA S、例えば ファージの種々の誘導體、例えば、*NM989*、及び他のファージ DNA、例えば *M13*、及び一本鎖繊維状ファージ DNA； 2μ プラスミド又はその誘導體のような酵母プラスミド；昆虫又は哺乳類細胞で有用なベクターのような真核細胞で有用なベクター；ファージ DNA と組合せるために修飾されたプラスミドのようなプラスミドとファージ DNA の組合せから誘導されたベクター、又は他の発現調節配列等が挙げられる。

【0161】

例えば、バキュロウイルス発現系においては、非融合トランスファーベクターとしては、*pVL941* (BamHIクローニング部位；Summers)、*pVL1393* (BamHI, SmaI, XbaI, EcoRI, NotI, XmaIII, BglIII, 及びPstIクローニング部位；Invitrogen)、*pVL1392* (BglIII, PstI, NotI, XmaIII, EcoRI, XbaI, SmaI, 及びBamHIクローニング部位；Summers and Invitrogen)、及び *pBlueBacIII* (BamHI, BglIII, PstI, NcoI, 及びHindIIIクローニング部位、青色 / 白色組換えスクリーニング可；Invitrogen)、並びに融合トランスベクターとしては、*pAc700* (BamHI及びKpnIクローニング部位、ここでBamHI認識部位は開始コドンにより開始する；Summers)、*pAc701* 及び *pAc702* (読取り枠以外はpAc700に同じ)、*pAc360* (ポリヘドリン開始コドンの下流36塩基対のBamHIクローニング部位；Invitrogen (195))、及び *pBlueBacHis A, B, C* (3種の異なる読取り枠、BamHI, BglIII, PstI, NcoI, 及びHindIIIクローニング部位、ProBond精製のためのN末端ペプチド、及びプラークの青色 / 白色組換えスクリーニング；Invitrogen(220)) を使用することができるが、但し、これらに限定されない。

【0162】

本発明において使用され得る哺乳類発現ベクターには、シヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) のような誘発的プロモーター、例えば、*pED* (クローンされた遺伝子及びDHFR双方を発現するベクターによるPstI, SalI, SbaI, SmaI, 及びEcoRIクローニング部位；Kaufman, *Current Protocols in Molecular Biology*, 16.12 (1991)) のようなDHFR発現ベクター、又はDHFR / メトトレキサート共役増幅ベクターのいかなる発現ベクターをも含む。或いはまた、*pEE14* (HindIII, XbaI, SmaI, SbaI, EcoI, 及びBclIクローニング部位で、そこではベクターがグルタミンシンターゼ及びクローンされた遺伝子を発現している；Celltech) のようなグルタミンシンターゼ / メチオニンスルホキシミン共役増幅ベクターが含まれる。

他の実施態様においては、エプスタイン・バーウイルス (EBV) の調節下のエピソーム発現を支配するベクター、例えば *pREP4* (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, 及びKpnIクローニング部位, 構成的RSV-LTRプロモーター, ハイグロマイシン選択マーカー；Invitrogen)、*pCEP4* (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, 及びKpnIクローニング部位, 構成的hCMV極初期遺伝子, ハイグロマイシン選択マーカー；Invitrogen)、*pMEP4* (KpnI, PvuI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, BamHIクローニング部位, 誘発的メタロチオネイン*lia*遺伝子プロモーター, ハイグロマイシン選択マーカー；Invitrogen)、*pREP8* (BamHI,

10

20

30

40

50

XhoI, NotI, HindIII, NheI, 及びKpnI クローニング部位, RSV-LTRプロモーター, ヒスチジノール選択マーカー; Invitrogen)、pREP9 (KpnI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, 及びBamHIクローニング部位, RSV-LTRプロモーター, G418選択マーカー; Invitrogen)、及びpEBVHis (RSV-LTRプロモーター, ハイグロマイシン選択マーカー, ProBond 樹脂で精製されエンテロキナーゼで開裂されるN末端ペプチド; Invitrogen) が挙げられる。

本発明において使用される選択的哺乳類発現ベクターには、pRc/CMV (HindIII, BstXI, NotI, SbaI, 及びApaIクローニング部位, G418選択; Invitrogen)、pRc/RSV (HindIII, SpeI, BstXI, NotI, XbaIクローニング部位, G418選択; Invitrogen)、及びその他のものが含まれる。本発明に従って用いられるワクシニアウイルス哺乳類発現ベクター (上記のKaufman, 1991参照) には、pSC11 (SmaIクローニング部位, TK-及び -gel選択)、pMJ601 (SalI, SmaI, AflI, NarI, BspMII, BamHI, ApaI, NheI, SacII, KpnI, 及びHindIIIクローニング部位; TK-及び -gel選択)、及びpTKgptF1S (EcoRI, PstI, SalI, AccI, HindII, SbaI, BamHI, 及びHpaクローニング部位, TK又はXPRT選択) が含まれるが、但しこれらに限定されない。

10

【0163】

酵母発現系も、本発明に基づいて、GAVE19タンパク質、そのバリエーション、或いはその類似体又は誘導体を発現するために使用することができる。例えば、非融合pYE32ベクター (XbaI, SphI, ShoI, NotI, GstXI, EcoRI, BstXI, BamHI, SacI, KpnI 及び HindIIIクローニング部位; Invitrogen) 又は融合pYESHisA、B、C (XbaI, SphI, ShoI, NotI, BstXI, EcoRI, BamHI, SacI, KpnI, 及びHindIIIクローニング部位, ProBond 樹脂で精製されエンテロキナーゼで開裂されるN末端ペプチド; Invitrogen) の二つを挙げることができるが、これらは本発明に従って使用することができる。

20

【0164】

一旦或る組換えDNA分子が同定されて単離されれば、技術水準として既知の数種の方法を増殖のために使用することができる。一旦適当な宿主系及び増殖条件が確立されれば、組換え発現ベクターを増殖して定量的に調製することができる。上記に説明したように、使用することができる発現ベクターは、以下のベクター又はそれらの誘導体を含むが、但し、これらに限定されない：ワクシニアウイルス又はアデノウイルスのようなヒト又は動物ウイルス；パキユロウイルスのような昆虫ウイルス；酵母ベクター；バクテリオファージベクター (例えば、ラムダ)、並びにプラスミド及びコスミドDNAベクターを挙げることができる。

30

【0165】

加えて、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調整し、或いは所望する特別な様態に遺伝子産物を修飾し及びプロセスするように選択することができる。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳及び翻訳後のプロセス及び修飾 (例えば、グリコシル化、開裂 (例えば、シグナル配列の)) のための特性及び特異的機構を有している。適当な細胞系又は宿主システムは発現された外来タンパク質の所望する修飾及びプロセスを確かなものとするように選択することができる。例えば、細菌システムにおける発現は、非グリコシル化のコアタンパク質産物を産生するように使用することができる。

40

【0166】

トランスジェニック動物

本発明に係る宿主細胞は、またトランスジェニック動物を作成するためにも使用することができる。例えば、或る実施態様においては、本発明の宿主細胞は、GAVE19コード配列が導入された受精卵母細胞又は胚幹細胞であり、そのような宿主細胞は外因性GAVE19配列がゲノム中へ導入されているヒト以外のトランスジェニック動物、又は内因性GAVE19配列が変異した相同組換え動物を創り出すために使用することができる。そのような動物は、GAVE19の機能及び/又は活性を研究するのに、並びにGAVE19活性の修飾因子の同定及び/又は評価のために有用である。ここで使用されている「トランスジェニック動物」とは、ヒト以外の動物、好ましくは哺乳類で、その中で、一つ

50

又はそれ以上の動物細胞が導入遺伝子を含んでいることをいう。トランスジェニック動物の例には、ヒト以外の霊長類、羊、犬、牛、山羊、鶏、ラット、両生類等が含まれる。

【0167】

ここで使用されている用語「導入遺伝子」とは、トランスジェニック動物が成長し、生体となってもゲノム中に維持されている細胞のゲノム中へ取り込まれた外因性DNAを意味する。導入遺伝子は、トランスジェニック動物の一つ又はそれ以上の細胞型又は組織中のコードされた遺伝子産物の発現を支配する。

ここで使用されている「相同組換え動物」とは、ヒト以外の動物、好ましくは哺乳類で、その中では内因性GAVE19遺伝子が相同組換えによって変異しているものをいう。そしてそれは、内因性遺伝子及び動物細胞（例えば、成体動物へと分化する以前の動物の胚細胞）中へ導入された外因性DNA分子間において行われる。

10

【0168】

本発明に係るトランスジェニック動物は、上記のトランスフェクション方法の一つを用いて、GAVE19をコードする核酸分子を受精卵母細胞の雄性前核中へ導入することによって創出することができる。そして卵母細胞は偽妊娠の雌の養親中で成長することができる。例えば、GAVE19 cDNA配列、例えば配列番号1のものをヒト以外の動物のゲノム中へ導入遺伝子として導入することができる。

イントロン配列及びポリアデニル化信号もまた導入遺伝子発現の効率を高めるために、導入遺伝子の中に含ませることができる。組織特異的制御配列は、特別な細胞中でGAVE19タンパク質発現を支配するために、GAVE19導入遺伝子へ作動可能に連結することができる。胚操作及び微量注入（マイクロインジェクション）によりトランスジェニック動物を発生させる方法は技術常識であり、例えば、U.S. Patent Nos. 4,736,866、及び4,870,009、及び4,873,191に記載されている、類似する他の方法も、動物の組織又は細胞中におけるゲノム中の導入遺伝子及び/又はGAVE19 mRNAの発現により他のトランスジェニック動物の作成に使用することができる。そして初代のトランスジェニック動物は、当該導入遺伝子を持っている別の動物を繁殖するために使用することができる。尚その上、GAVE19をコードする導入遺伝子を持っているトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を持つ他のトランスジェニック動物を作成するために交配することもできる。

20

【0169】

相同組換え動物を創出するために、ベクターは、例えばGAVE19遺伝子を機能的に変異させるために欠損、付加又は置換を導入したGAVE19遺伝子の少なくとも一部を含んでいるように調製する。特別な実施態様においては、ベクターは、相同組換え上で、内因性GAVE19遺伝子が機能的に乱された（即ち、機能的タンパク質をもちやコードできない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）ように設計することもできる。

30

【0170】

或いはまた、ベクターを、相同組換え体中で、内因性GAVE19遺伝子が突然変異し、又は他の変異をしているが機能的タンパク質を依然としてコードしているように設計することもできる（例えば、上流の制御領域が変異し、その結果内因性GAVE19タンパク質の発現が変異する）。

40

【0171】

相同組換えベクターにおいては、GAVE19遺伝子の変異を受けた部分は、GAVE19遺伝子の付加的核酸配列によって5'及び3'末端において縁取られており、ベクターにより運び込まれた外因性GAVE19遺伝子と胚幹細胞中の内因性GAVE19遺伝子の間に起こる相同組換えを許容する。この付加的なGAVE19のフランキング核酸配列は、内因性遺伝子と良好な相同組換えのために十分な長さである。典型的には、数千塩基のフランキングDNA（5'及び3'末端の双方に）がベクター中に含まれている（例えば、相同組換えベクターの記載についてはThomas et al., Cell (1987) 51: 503参照）。

【0172】

50

ベクターを胚幹細胞系（例えば、電気穿孔により）に導入し、導入された G A V E 1 9 遺伝子が内因性 G A V E 1 9 遺伝子と相同的に組換えした細胞を選択する（例えば、Liet al., Cell (1992) 69: 915）。そして選択した細胞を動物の胚盤胞中へ注入すると、集合キメラが形成される（例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach, Robertson, ed., IRL, Oxford, (1987) pp. 113~152参照）。その後キメラ胚は適当な偽妊娠の雌の養親に移植し、そして胚を生産に至らしめる。胚細胞に相互組換え DNA を有している子孫は動物の育種に使用することができ、その動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖細胞透過によって相同的に組み換えられた DNA を含んでいる。

【 0 1 7 3 】

相同組換えベクター及び相同組換え動物を作成する方法については、更に、Bradley, Current Opinion in Bio/Technology (1991) 2: 823~829及びPCT Publication Nos. WO 90/11354、WO 91/01140、WO 92/0968及びWO 93/04169に記載されている。

【 0 1 7 4 】

他のもう一つの実施態様において、非ヒトトランスジェニック動物は、導入遺伝子の発現を制御できるような選択的システムを含むように作成することができる。そのようなシステムの一つの例は、バクテリオファージ P 1 の *cre* / *loxP* レコンビナーゼシステムである。この *cre* / *loxP* レコンビナーゼシステムの記載については、例えばLaks et al., Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89: 6232~6236を参照することができる。レコンビナーゼシステムのもう一つの例としては、サッカロミセスセレビシエ (*S. cerevisiae*) の *FLP* レコンビナーゼシステムがある (O'Gorman et al., Science (1991) 251: 1351~1355)。もし、*cre* / *loxP* レコンビナーゼシステムを導入遺伝子の発現制御に使用する場合は、*cre* レコンビナーゼと選択したタンパク質の双方をコードする導入遺伝子を含んでいる動物が必要となる。そのような動物は「二重」トランスジェニック動物の作成によって供給され得るが、それは、例えば、一方は選択したタンパク質をコードする導入遺伝子を含み、他方はレコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含んでいる 2 匹のトランスジェニック動物を交配させることにより作成することができる。

【 0 1 7 5 】

ここで記載した非ヒトトランスジェニック動物のクローンは、またWilmut et al., Nature (1997) 385: 810~813及びPCT Publication Nos. WO 97/07668及びWO 97/07669に記載されている方法に従っても作成することができる。簡単に説明すると、例えばトランスジェニック動物から体細胞を単離し、そして成長周期を脱して G₀ 期へ入るように誘導する。その後静止期の細胞を、例えば電気パルスを用いて、当該静止期の細胞が単離されたものと同種の動物からの除核卵母細胞に融合させることができる。そして再構成した卵母細胞を培養し、桑実胚又は胚盤胞にまで成長させ、その後偽妊娠の雌の養親に移植する。その雌の養親動物から生まれた子供は、例えば単離された体細胞由来の動物のクローンである。

【 0 1 7 6 】

本発明の使用及び方法

本発明に係る核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、抗体及びそれらのフラグメントは以下の方法の一つ又はそれ以上に使用することができる： a) スクリーニング検定； b) 探知検定法（例えば、染色体マッピング、組織類別、法生物学）； c) 予測医学（例えば、診断検定、予後検定、臨床試験のモニタリング及び薬理ゲノム）；及び d) 治療法（例えば、治療及び予防）。G A V E 1 9 タンパク質は他の細胞内タンパク質と相互作用し、それ故 (i) 細胞増殖の制御； (ii) 細胞分化の制御；及び (iii) 細胞生存の制御に使用することができる。

本発明に係る単離された核酸分子は、G A V E 1 9 タンパク質の発現（例えば、遺伝子治療の応用では宿主細胞中での組換え発現ベクターを経由して）のため G A V E 1 9 mRNA の検出（例えば、生物学標品中の）又は G A V E 1 9 遺伝子における遺伝的傷害の検出のため、及び G A V E 1 9 活性の調節のために使用することができる。付言するに、

10

20

30

40

50

G A V E 1 9 タンパク質は G A V E 1 9 活性又は発現を調節する薬剤又は化合物のスクリーニングにも使用することができる。そのような薬剤又は化合物は、関節リウマチ、C O P D (慢性閉塞性肺疾患) 等のような炎症性の病気の治療に容易に利用することができる。G A V E 1 9 野生型タンパク質に比べて低下した又は異常な活性を示す G A V E 1 9 タンパク質産生のスクリーニングも本発明を用いて行うことができる。加えて、本発明に係る抗 - G A V E 1 9 抗体は、G A V E 1 9 タンパク質の検出及び単離にも、また G A V E 1 9 活性の調節にも使用することができる。本発明は更に上記スクリーニング検定によって同定された新規薬剤及びここに記載したような治療としてのその使用にも及ぶものである。

【 0 1 7 7 】

10

スクリーニング検定

内因性リガンドの存在下における G タンパク質の活性化は、G タンパク質受容体複合体を形成し、そして G T P が G タンパク質へ結合するように導く。G タンパク質の G T P アーゼドメインは徐々に G T P を G D P へと加水分解し、通常の条件においては、受容体は不活性化される。しかしながら、構成的に活性化された受容体は G T P を G D P へ加水分解し続ける。

【 0 1 7 8 】

G タンパク質による加水分解を受けない基質、 $[^{35}\text{S}] \text{GTP}$ S は、構成的に活性化された受容体を発現する膜への結合の増強をモニターするのに使用することができる。Traynor と Nahorski は、 $[^{35}\text{S}] \text{GTP}$ S を、リガンドの存在下及び不在下において、G タンパク質が膜に結合するのをモニターするのに使用できることを報告している (Traynor et al., Mol Pharmacol (1995) 47 (4): 848~54)。そのような検定システムの好ましい使用は、候補化合物の一次スクリーニングであり、その理由は、受容体に結合する特殊な G タンパク質を考慮することなしに、全ての G タンパク質共役型受容体に対してそのシステムは一般的に利用できるからである。

20

【 0 1 7 9 】

G_{s20} は酵素アデニルシクラーゼを刺激するが、 G_i 及び G_o はその酵素を阻害する。技術常識として、アデニルシクラーゼは A T P を c A M P に変換するのを触媒することはよく知られている；それ故 G_s タンパク質と共役する構成的に活性化された G P C R は、c A M P の増大した細胞内レベルと関係している。或いはまた、 G_i (又は G_o) タンパク質と共役するかも知れない構成的に活性化された G P C R は、c A M P の低下した細胞内レベルと関係している。「Indirect Mechanism of Synaptic Transmission」, Chpt. 8, from Neuron to Brain (3rd Ed.), Nichols et al. Sinauer Associates, Inc., 1992 参照。それ故、c A M P を検出する測定法は、候補化合物が受容体に対してインバースアゴニストであるか否かを決定するのに使用することができる。技術常識として知られている多くのアプローチが c A M P の測定に利用することができる。或る実施態様においては、抗 - c A M P 抗体が E L I S A - 基本フォーマット中で使用される。他の実施態様では、全細胞二次メッセンジャーレポーターシステム検定法が考慮される (PCT Publication No. WO 00 / 22131 参照)。

30

【 0 1 8 0 】

40

関連した局面において、サイクリック A M P は、c A M P 応答 D N A 結合タンパク質又は転写因子 (C R E B) を刺激し、c A M P 応答因子と呼ばれる特異な部位でプロモーターに結合させて、遺伝子の発現方向に向わせることによって、遺伝子発現を促進する。このようにして、レポーターシステムは多重 c A M P 応答因子を含んでいるプロモーターが例えば - ガラクトシダーゼ又はルシフェラーゼのようなレポーター遺伝子の前方になるように構成することができる。尚、構成的に活性化された G_s - 連結受容体が c A M P の蓄積を起こすにつれて、遺伝子及びレポータータンパク質の発現を活性化する。そして - ガラクトシダーゼ又はルシフェラーゼのようなレポータータンパク質は、標準的生化学的検定法により検出される (PCT Publication No. WO 00 / 22131)。

【 0 1 8 1 】

50

G_o及びG_qのような他のGタンパク質は、酵素ホスホリパーゼCの活性化に関係し、次いでリン脂質、PIP₂を加水分解して、2種の細胞内メッセンジャー：ジアセチルグリセロール(DAG)及びイノシトール1,4,5-トリホスフェート(IP₃)を放出する。IP₃の蓄積増大はG_q-会合受容体及びG_o-会合受容体(PCT Publication No. WO 00/22131)の活性化に関係している。IP₃蓄積を検出する検定法は候補化合物がG_q-会合受容体又はG_o-会合受容体に対するインバーサゴニストであるか否かを判定するのに使用することができる。G_q-会合受容体はG_q依存性ホスホリパーゼCがAP1因子を含んでいる遺伝子の活性化を起こすか否かを測定するAP1レポーター検定法を用いても判定することができる。このようにして、活性化されたG_q-会合受容体は、インバーサゴニストが当該発現を低下させるのに対し、当該遺伝子の発現を増加させることが実証される。

10

【0182】

修飾因子即ちGAVE19タンパク質に結合する又は例えばGAVE19発現又はGAVE19活性を促進又は阻害する候補化合物、テスト化合物又は薬剤(例えば、ペプチド、ペプチド模倣物(mimetics)、低分子、又はその他の薬剤等)を同定する方法(ここでは「スクリーニング検定」という)も提供される。

【0183】

或る実施態様において、本発明は、GAVE19タンパク質、ポリペプチド又はそれらの生物学的に活性な部分の膜結合型に結合するか又はその活性を修飾する候補化合物又はテスト化合物の検定法を提供する。本発明のテスト化合物は、技術常識として知られているコンビナトリアルライブラリー法における数多くのいかなるアプローチをも用いて入手することができるが、ライブラリーには、生物学的ライブラリー；空間的に記憶可能な並列ライブラリー(固相又は液相)；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「ビーズ化合物」ライブラリー法；アフィニティクロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法がある。生物学的ライブラリーのアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は化合物の低分子ライブラリー(Lam, Anticancer Drug Des (1997) 12: 145)に対しても利用可能である。

20

【0184】

分子ライブラリーの合成法の例は、技術常識として例えばDeWitt et al., Proc Natl Acad Sci USA (1993) 90: 6909; Erb et al., Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91: 11422; Zuckermann et al., J Med Chem (1994) 37: 2678; Cho et al., Science (1993) 261: 1303; Carrell et al., Angew Chem Int Ed Engl (1994) 33: 2059; Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl (1994) 33: 2061; 及び Gallop et al., J Med Chem (1994) 37: 1233の文献中に記載されている。

30

【0185】

化合物のライブラリーは、溶液(例えば、Houghten Bio/Techniques (1992) 13: 412~421)又はビーズ(Lam, Nature (1991) 354: 82~84), チップス(Fodor, Nature (1993) 364: 555~556), 細菌(U.S. Patent No. 5,223,409), 孢子(U.S. Patent Nos. 5,571,698; 5,403,484; 及び 5,223,409), プラスミド(Cull et al., Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89: 1865~1869)又はファージ(Scott et al., Science (1990) 249: 386~390; Devlin, Science (1990) 249: 404~406; Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 6378~6382; 及び Felici, J Mol Biol (1991) 222: 301~310)中で存在することができる。

40

【0186】

本発明の特別な実施態様において、検定法は細胞を基礎とした検定法であり、そこでは細胞表面においてGAVE19タンパク質、又はその生物学的に活性な部分の膜結合型を発現している細胞がテスト化合物と接触し、そしてテスト化合物がGAVE19タンパク質に結合する能力が測定される。細胞は例えば酵母細胞又は哺乳類起源の細胞であってもよい。テスト化合物がGAVE19タンパク質に結合する能力の測定は、例えば、放射性

50

同位元素又は酵素標識を有するテスト化合物との共役によって行うことができ、テスト化合物の G A V E 1 9 タンパク質、又はその生物学的に活性な部分との結合は複合体における標識化された化合物を検出することによって測定することができる。例えば、テスト化合物は¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C又は³Hで、直接的又は間接的に標識することができ、そして放射性同位元素は放射能放出の直接計測又はシンチレーション計測により検出することができる。或いはまた、テスト化合物は、例えば西洋ワサビペロキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又はルシフェラーゼ等で酵素的に標識することもでき、そして酵素標識は適当な基質の生成物への変換を測定することによって検出することができる。

特別な実施態様において、検定法は、G A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分の膜結合型を発現している細胞表面に、G A V E 1 9 に結合して検定混合物を形成する既知の化合物を接触させること、その検定混合物をテスト化合物に接触させること、及びG A V E 1 9 タンパク質と相互作用するテスト化合物の能力を測定することから成り、ここにおいてG A V E 1 9 タンパク質との相互作用するテスト化合物の能力の測定は、G A V E 1 9 又はその生物学的に活性な部分に結合するテスト化合物の能力を既知化合物のものと比較することによって行うことができる。

10

【0187】

他の実施態様においては、検定法は、細胞を基礎とした検定法 (cell-based assay) であり、G A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分の膜結合型を発現している細胞表面に、テスト化合物を接触させること、及びG A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分の活性を調節する (例えば、刺激する又は阻害する) テスト化合物の能力を測定することから成る。G A V E 1 9 又はその生物学的に活性な部分の活性を調節するテスト化合物の能力測定は、例えばG A V E 1 9 タンパク質と結合する又はG A V E 1 9 標的分子と相互作用する能力を測定することによって行うことができる。ここで使用されている「標的分子」とは、G A V E 1 9 タンパク質が実際に結合するか又は相互作用する分子をいい、例えばG A V E 1 9 タンパク質を発現している細胞表面上の分子、二次細胞の表面上の分子、細胞外液中の分子、細胞膜の内側表面に会合している分子、又は細胞質分子をいう。G A V E 1 9 標的分子は、非G A V E 1 9 分子であってもよく、或いは本発明に係るG A V E 1 9 タンパク質又はポリペプチドであってもよい。或る実施態様では、G A V E 1 9 標的分子は、細胞外信号 (例えば、化合物を膜結合G A V E 1 9 分子に結合させることによって生じる信号) を細胞膜透過の及び細胞内への伝達を容易とする信号伝達経路の構成物である。標的は、例えば触媒活性を有する二次細胞内タンパク質又はG A V E 1 9 との下流信号分子との会合を容易にするタンパク質であってもよい。

20

30

【0188】

G A V E 1 9 標的分子と結合又は相互作用するG A V E 1 9 タンパク質の能力測定は、直接的結合を測定する上記記載方法の一つを用いて行うことができる。特別な実施態様においては、G A V E 1 9 標的分子と結合又は相互作用するG A V E 1 9 タンパク質の能力測定は、標的分子の活性を測定することにより行うことができる。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞内二次メッセンジャー (例えば、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP3等) の誘導の測定、適当な基質に対する標的の触媒/酵素活性の測定、レポーター遺伝子 (例えば、検出可能なマーカー、例えばルシフェラーゼ、をコードする核酸に作動可能に連結しているG A V E 1 9 応答制御因子) の誘導の測定、又は細胞内応答、例えば細胞分化又は細胞増殖、の検出によって測定することができる。

40

【0189】

本発明は、更にG A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分にテスト化合物を接触させること、及びG A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分に対するテスト化合物の結合能力の測定から成る無細胞系検定法にも及ぶものである。G A V E 1 9 タンパク質とテスト化合物の結合は上記記載の通り、直接的にも又は間接的にも測定することができる。好適な実施態様においては、検定法は、G A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分に、G A V E 1 9 に結合して検定混合物を形成する既知の化合物を接触させること、その検定混合物をテスト化合物に接触させること、及びG A V E 1 9 タ

50

ンパク質と相互作用するテスト化合物の能力を測定することを含み、ここにおいてG A V E 1 9 又はその生物学的に活性な部分に結合するテスト化合物の能力を既知化合物のものと比較することによって行うことができる。

【0190】

本発明に係る他の無細胞系検定法は、G A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分にテスト化合物を接触させること、及びG A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激する又は阻害する）テスト化合物の能力を測定することから成る。G A V E 1 9 の活性を調節するテスト化合物の能力は、例えばG A V E 1 9 標的分子に対するG A V E 1 9 タンパク質の結合能力を直接結合を測定する上記記載の方法の一つを用いて測定することができる。他の実施態様においては、G A V E 1 9 の活性を調節するテスト化合物の能力測定は、G A V E 1 9 標的分子を更に調節するG A V E 1 9 タンパク質の能力を測定することによって行うことができる。例えば、適当な基質を用いたときの標的分子の触媒 / 酵素活性を上記記載のようにして測定することができる。

10

【0191】

尚、本発明に係る他の無細胞系検定は、G A V E 1 9 タンパク質又はその生物学的活性部分にG A V E 1 9 と結合して検定混合物を作成する既知化合物を接触させること、その検定混合物をテスト化合物に接触させること、及びG A V E 1 9 タンパク質と相互作用するテスト化合物の能力を測定することから成る。G A V E 1 9 タンパク質と相互作用するテスト化合物の能力を測定する工程は、G A V E 1 9 タンパク質がG A V E 1 9 標的分子と好適に結合又は調節する能力を測定することを含んでいる。

20

【0192】

受容体は、必ずしもリガンド結合を阻害しないが、しかしG タンパク質結合、そしておそらく活性化を引き起こす受容体凝集、二量体化又はクラスター化を可能とする受容体における構造的変化を引き起こす非リガンド分子によって活性化される。例えば、抗体は細胞表面にさらされたG A V E 1 9 の種々の部分において発生することができる。これらの抗体は、c A M P レベル、又は細胞内C a²⁺ レベルのモニターのような標準的検定法によって判定されるように、G タンパク質のカスケードを経由して細胞を活性化することができる。分子マッピング及び特にエピトープマッピングが関与している故に、モノクローナル抗体がより好適である。モノクローナル抗体は細胞表面で発現された完全な受容体及び細胞表面で形成されることが知られているペプチドの双方に対して誘導される。Geysen et al., U.S. Pat. No. 5,998,577の方法は関連するペプチドの大多数を採集するのに使用することができる。G A V E 1 9 を活性化することが知られている抗体は、補体結合反応のようなG A V E 1 9 活性化にとって異質な活性を最小限にするために修飾することができる。このように、抗体分子はG A V E 1 9 活性化以外の活性を最小限とする又は除去するために短縮化 (truncated) 又は変異化することができる。例えば、或る種の抗体は、抗原結合部分のみが必要とされる。このような場合は抗体のF_c部分は除去することができる。

30

【0193】

G A V E 1 9 を発現している細胞は抗体にさらされることによってG A V E 1 9 を活性化するようになる。活性化された細胞は次に種々の分子にさらされることによりどの分子が受容体活性を調節するのかを同定することができる、その結果高い活性化レベル或いは低い活性化レベルであることが分かる。これらのゴールに達成した分子は、次に非活性化細胞に対する効果を観察するために、抗体なしでG A V E 1 9 を発現している細胞上で試験にかけることができる。標的分子は、次に既知の技術を用いて改変G P C R 代謝の関係する障害の治療候補薬としてテストされ、そして修飾される。

40

【0194】

本発明に係る無細胞系検定は、G A V E 1 9 の可溶型及び膜結合型の双方の型として使用することができる。G A V E 1 9 の膜結合型から成る無細胞系検定の場合はG A V E 1 9 の膜結合型を溶液中に保持しておくために可溶化試薬を使用することが望ましい。その

50

ような可溶化試薬としては、*n*-オクチルグルコシド、*n*-ドデシルグルコシド、*n*-ドデシルマルトシド、オクタノイル-*N*-メチルグルカミド、デカノイル-*N*-メチルグルカミド、TRITON X-100、TRITON X-114、THESIT、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)_{*n*}、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアミノ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)、又は*N*-ドデシル=*N,N*-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートのような非イオン表面活性剤が含まれる。

【0195】

本発明に係る上記の検定法の一つ以上の実施態様において、GAVE19又はその標的分子のいずれかを固定化することによって、当該タンパク質の一つ又は双方の非複合体から複合体を分離することを容易にし、また当該検定の自動化に対応できるようにすることが望ましい。候補化合物の存在又は不在下における、テスト化合物のGAVE19との結合又はGAVE19と標的分子との相互作用は、反応混合物を収容するのに適当ないかなる容器中においても行うことができる。そのような容器には、マイクロタイタープレート、試験管、及び微小遠心管が含まれる。或る実施態様においては、マトリックスの一つ又は両方のタンパク質が結合するドメインを付加するために、融合タンパク質を提供することもできる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/GAVE19融合タンパク質又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質をグルタチオンSEPHAROSEビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)に吸着させることができる。

10

20

或いはまた、グルタチオン-誘導化マイクロタイタープレートをテスト化合物と結合させることもできる。その後、非吸着標識的タンパク質又はGAVE19タンパク質のいずれかと上記混合物とを、複合体形成を促す条件下(例えば、塩及びpHの生理的条件下)でインキュベートする。インキュベート後、ビーズ又はマイクロタイタープレート穴を洗浄して非結合成分を全て除去し、そして複合体を形成したものを直接的又は間接的に測定する。或いはまた、複合体をマトリックスから解離させ、そしてGAVE19結合又は活性レベルを標準的技術を用いて測定することができる。

【0196】

マトリックス上におけるタンパク質固定の他の技術は、本発明に係るスクリーニング検定においても使用することができる。例えば、GAVE19又はその標的分子のいずれかをビオチンとストレプトアビジンとの抱合化を利用して固定化することができる。ビオチン結合のGAVE19又は標的分子は、技術常識として良く知られている技術を用いて(例えばbiotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL)ビオチン-NHS(*N*-ヒドロキシ-スクシニミド)から調製することができ、そしてストレプトアビジンをコートした96穴プレート(Pierce Chemicals)の各穴に固定することができる。或いはまた、GAVE19又は標的分子と反応するが、しかしGAVE19タンパク質の標的分子への結合には干渉しない抗体をプレートの各穴に対し誘導化することができる。インキュベーションにつれて、非結合標的分子又はGAVE19は抗体抱合により各穴の中に捕えられる。そのような複合体の検出法にはGST-固定複合体について上記に記載したものに加えて、GAVE19又は標的分子と活性な抗体を使用した複合体の免疫検出法、並びに、GAVE19又は標的分子と会合した酵素活性の検出に依存した固相酵素検定法がある。

30

40

【0197】

他の実施態様において、GAVE19発現の修飾因子は、候補化合物が接触した細胞におけるGAVE19 mRNA又はタンパク質を検出することによって同定することができる。候補化合物の存在下におけるGAVE19 mRNAの発現又はタンパク質のレベルを候補化合物の不在下におけるGAVE19 mRNAの発現又はタンパク質のレベルと比較する。候補化合物は、その比較に基づいてGAVE19発現の修飾因子として同定することができる。例えば、GAVE19 mRNA発現又はタンパク質が候補化合物の不在のときに比べて存在下の方がより大きければ(統計的には有意義により大きいこと)

50

、候補化合物は、G A V E 1 9 mRNA又はタンパク質発現の賦活物質又はアゴニストであると同定される。或いはまた、G A V E 1 9 mRNAの発現又はタンパク質が候補化合物の不在のときに比べて存在下の方がより少ない（統計的には有意義により少ないこと）場合は、候補化合物は、G A V E 1 9 mRNA又はタンパク質発現の阻害物質又はアンタゴニストであると同定される。もしG A V E 1 9活性がリガンド又はアゴニスト存在下で減少するか、或いは構成的G A V E 1 9がベースラインよりも低ければ、候補化合物はインバーサアゴニストであると同定される。細胞中のG A V E 1 9 mRNA又はタンパク質発現のレベルは、G A V E 1 9 mRNA又はタンパク質検出のためにここで記載されている方法によって検出することができる。

【0198】

本発明の他の局面において、G A V E 1 9タンパク質は二本ハイブリッド検定又は三本ハイブリッド検定（例えば、U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos et al., Cell (1993) 72: 223~232; Madura et al., J Biol Chem. (1993) 268: 12046~12054; Bartel et al., Bio/Techniques (1993) 14: 920~924; Iwabuchi et al., Oncogene (1993) 8: 1693~1696; 及び PCT Publication No. WO 94/10300）において、G A V E 1 9と結合する（「G A V E 1 9 - 結合タンパク質」又は「G A V E 1 9 - b p」）又は相互作用する、及びG A V E 1 9活性を調節する他のタンパク質を同定するための「ベイトプロテイン（餌タンパク質）」として使用することができる。このようなG A V E 1 9 - 結合タンパク質は、また例えばG A V E 1 9経路の上流又は下流因子のようなG A V E 1 9タンパク質による信号の伝播に關与しているものと思われる。

【0199】

本発明が純品のG A V E 1 9の大量生産を可能とすることより、機能を発揮すると思われる領域の立体配座の物理的特性を合理的なドラッグデザイン（医薬設計）により確かめることができる。例えば、分子のIC3領域及びECドメインは特に興味のある領域である。一旦、その領域の形及びイオン配置が見分けられれば、これらの領域と相互作用する候補化合物は形造られて、そして完全な細胞、動物又は患者でテストされる。そのような3-D構造情報を引き出すことを可能とする方法には、X線結晶回折、NMR分光法（核磁気共鳴分析）、モレキュラーモデリング（分子設計）等が含まれる。3-D構造はまた既知の薬剤が作用する部位が存在する他の既知のタンパク質における類似な立体配座部位の同定へと導くことができる。これらの薬剤又はそれらの誘導體は関節リウマチ又はC O P D（慢性閉塞肺疾患）等の炎症性病気又は障害の治療における使用が見い出されるものと思われる。

【0200】

本発明は更に上記に記載したスクリーニング検定によって同定される新規な薬剤及びそれらのここに記載したような治療のための使用にも及ぶものである。

【0201】

本発明に係る検定法

A. 探知検定法

本発明に係るDNA配列の部分又はフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として種々の方法において使用することができる。例えば、当該配列は（i）染色体上の各遺伝子のマップ作成及び遺伝病と関係した遺伝領域の場所搜索；（ii）微小な生物標品からの個人の同定（ティッシュタイピング）；（iii）生物標品の法医学的同定の補助手段として使用することができる。これらの利用については以下に詳述してある。

【0202】

1. 染色体マッピング

一旦、遺伝子の配列（又は配列の一部）が単離されれば、その配列は染色体上のG A V E 1 9遺伝子の配置をマップするのに使用することができる。それ故、ここに記載したG A V E 1 9核酸分子又はそのフラグメントは、ゲノム中のG A V E 1 9の配置をマップするのに使用することができる。ゲノムにおけるG A V E 1 9配列の配置のマッピングは遺伝子が関係する病気と配列との因果関係を示す上で重要な一歩である。

【0203】

簡単に言えば、G A V E 1 9 遺伝子は、G A V E 1 9 配列から P C R プライマー（好ましくは 1 5 ~ 2 5 b p の長さ）を調製することによってゲノム中にマップすることができる。そのプライマーは、個々のマウス染色体を含んでいる体細胞ハイブリッドの P C R スクリーニングに使用される。そして G A V E 1 9 配列に対応するマウス遺伝子を含んでいるハイブリッドのみが増幅されたフラグメントを作成する。

【0204】

特別な方法としては、マウス染色体を変性し、その後検出可能に標識された G A V E 1 9 D N A 分子にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接触させることを含むが、但しこれらに限定されない。検出可能に標識された G A V E 1 9 D N A 分子のハイブリダイゼーション及び配列決定は、マウス染色体中の G A V E 1 9 の位置を明らかとする。そのような in situ ハイブリダイゼーション技術は Fan et al., Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 6223~27 に記載されているがその中には標識されたフローソートされた (flow-sorted) 染色体によるプレスクリーニング及び染色体特異的 c D N A ライブラリーとのハイブリダイゼーションによるプレセクションも含まれている。細胞分裂中期の染色体分散に対する D N A 配列の in situ ハイブリダイゼーション (F I S H) もまた一段階で正確な染色体配置を提供するのに使用することができる。染色体分散は、有糸分裂の紡錘体形成を阻害する化合物、例えばコルセミドにより細胞分裂が中期で阻止されている細胞を用いて作成することができる。染色体はトリプシンを短時間処理し次いでギムザ (Giemsa) で染色される。明暗バンドパターンが各染色体上に展開し、その結果染色体は個別に同定することができる。F I S H 法は、5 0 0 から 6 0 0 塩基数以下の短い D N A 配列についても行うことができる。しかしながら、1, 0 0 0 塩基よりも長いクローンは独特な染色体配位に結合する高い可能性があり、その信号強度も簡単な検出法にとって十分なものである。好ましくは 1, 0 0 0 塩基及びより好ましくは 2, 0 0 0 塩基が、無理のない時間で良好な結果を得るために必要である。この技術を概観するには、Verma et al. (Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988)) が参照される。染色体マッピングは、イン・シリコ (in silico) で推論することができるものであり、そしてロッドスコア法 (lod scores) 又は単に近接法 (proximity) のような統計的考察を活用することができる。

【0205】

染色体マッピング用の試薬は、染色体上の単一部位を突きとめるために個々に使用することができる。更にまた、試薬のパネルは多重部位及び/又は多重染色体をマークするのに使用することができる。G A V E 1 9 遺伝子が並んでいる領域に対応する試薬は、実際にマッピングの目的に好適である。コード配列は、遺伝子ファミリー内に保存されているものと思われ、それ故に染色体マッピング中の交差ハイブリダイゼーションの機会を増大させる。

【0206】

一旦配列が正確な染色体配位に対してマップされたときは、染色体における配列の物理的配位は、遺伝的マップデータと相関しているものである。同一染色体領域にマップされた遺伝子と病気との相関関係は、それ故例えば Egeland et al., Nature (1987) 325: 783 ~ 787 に記載されている連結分析 (物理的に隣接している遺伝子の共同遺伝) により同定することができる。

【0207】

尚、G A V E 1 9 の関与する病気に患っている動物と患っていない動物間における D N A 配列の相違も検出することができる。もし、ある突然変異が病気に患っている幾つかの又は全ての動物において観察されるが、しかし患っていない動物では観察されなければ、その突然変異はその特別な病気の原因となるものと思われる。病気に患っている動物と患っていない動物との比較は、通常第一に染色体中の構造的変化を探ることであり、それは、例えば染色体分散から目視できる又は D N A 配列に基づく P C R を用いて検出できる欠損又は転移である。最後に、幾つかの動物からの遺伝子の完全配列を行うことによって突

然変異の存在及び突然変異を多型から区別できることを確認することである。

【0208】

1. 診断的検定法

生物標品中における G A V E 1 9 の存在又は不在を検出する模範的な方法は、テスト動物から生物標品を入手すること、及び G A V E 1 9 タンパク質又は G A V E 1 9 タンパク質をコードする核酸（例えば、m R N A 又はゲノム D N A）を検出することができて、その結果 G A V E 1 9 の存在を生物標品中で検出することができる化合物又は試薬に生物標品を接触させることから成る。G A V E 1 9 m R N A 又はゲノム D N A を検出するための好ましい試薬としては、G A V E 1 9 m R N A 又はゲノム D N A にハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブがある。この核酸プローブは、例えば配列番号 1 の核酸のような全長 G A V E 1 9 核酸又はその部分、例えば少なくとも 1 5、3 0、5 0、1 0 0、2 5 0 又は 5 0 0 或いはそれ以上のヌクレオチドを長さにおいて有するオリゴヌクレオチドで、ストリンジェントな条件下で G A V E 1 9 m R N A 又はゲノム D N A に特異的にハイブリダイズするものである。

10

【0209】

G A V E 1 9 タンパク質を検出する特別な試薬は、G A V E 1 9 タンパク質に結合することができる抗体であり、好ましくは、検出可能に標識された抗体である。抗体はポリクローナル、キメラ或いはより好ましくはモノクローナルである。完全な抗体又はそのフラグメント（例えば F_{ab} 又は $F_{(ab)_2}$ ）を使用することができる。

用語「生物標品」とは、被検体から単離された組織、細胞及び細胞液をいうが、また、被検体中に存在している組織、細胞及び細胞液をも含む。即ち、本発明に係る検出方法は生物標品中の G A V E 1 9 m R N A、タンパク質又はゲノム D N A の検出をイン・ビボ (*in vivo*) のみならずイン・ビトロ (*in vitro*) においても使用することができる。例えば、G A V E 1 9 m R N A を検出するイン・ビトロ法にはノーザン (Northern) ハイブリダイゼーション及びイン・シトウ (*in situ*) ハイブリダイゼーションが含まれる。G A V E 1 9 ゲノム D N A を検出するイン・ビトロ法にはサザン (Southern) ハイブリダイゼーションが含まれる。更に G A V E 1 9 タンパク質を検出するイン・ビボ法には、標識された抗 - G A V E 1 9 抗体の動物体内への導入が含まれる。例えば、抗体が放射性マーカーで標識され、動物体内におけるその存在及び位置が標準的イメージング法により検出することができる。

20

30

【0210】

他の実施態様において、生物標品はテスト動物由来のタンパク質分子を含んでいる。或いはまた生物標品はテスト動物由来の m R N A 分子又はテスト動物由来のゲノム D N A 分子を含んでいる。ここで利用されている特殊な生物標品は動物体内から常法によって単離した末梢血の白血球標品である。

【0211】

他の実施態様においては、当該方法は更に対照動物から生物標品を入手すること、G A V E 1 9 タンパク質、m R N A 又はゲノム D N A を検出することができて、その結果 G A V E 1 9 タンパク質、m R N A 又はゲノム D N A の存在及び量を生物標品中で検出することができる化合物又は試薬に生物標品を接触させること、及び対照標品中における G A V E 1 9 タンパク質、m R N A 又はゲノム D N A の存在及び量をテスト標品中における G A V E 1 9 タンパク質、m R N A 又はゲノム D N A の存在及び量と比較して、その化合物が G A V E 1 9 の発現又は活性を調節するか否かを決定することから成る。

40

【0212】

化学ライブラリーのハイスループット検定法

G A V E 1 9 の活性を調節することができる化合物のいかなる検定法も高生産性スクリーニングに適用できる。高生産性スクリーニングシステムは市場において入手可能である（例えば、Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA 等参照）。これらのシステムは、標品及び試薬のヒベットでの採取、液体分与、時間設定イン

50

キュベーション、検定に適合する検出器におけるマイクロプレートの最終読取りを含む全工程が典型的に自動化されている。これらの組合せ可能なシステムはハイスループット及び迅速な測定開始を可能とし、また高度な適応性及び受注生産を可能とする。そのようなシステムの製造会社は種々の高生産性の詳細なプロトコールを提供している。例えば、Zymark Corp.は遺伝子転写、リガンド結合、その他の調節を検出するためのスクリーニングシステムについて記載している技術報告書を提供している。

【0213】

キット

本発明はまた生物標品（テストサンプル）におけるG A V E 19の存在を検出するためのキットにも及ぶものである。そのようなキットは、ある特定の化合物がG A V E 19の発現又は活性を調節するか否かを判定するのに用いることができる。例えば、当該キットは生物標品中のG A V E 19タンパク質又はmRNAを検出することができる標識された化合物又は試薬、及びその標品中のG A V E 19の量を測定する方法（例えば抗-G A V E 19抗体又はG A V E 19、例えば配列番号1をコードしているDNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）とから構成されている。

10

【0214】

抗体を基礎とするキットの場合は、当該キットは、例えば（1）G A V E 19タンパク質に結合する一次抗体（例えば、固相支持体に結合した）；及び場合によっては（2）二次抗体で、G A V E 19タンパク質又は一次抗体に結合し且つ検出可能な試薬に共役している異なる抗体から構成されている。もし二次抗体が存在しないときは、一次抗体を検出可能に標識するか、又は一次抗体に結合する他の分子を検出可能に標識することができる。いずれにせよ、標識されて結合するものは、技術常識として知られているように、検出可能なレポーター分子としての役割を有する。

20

【0215】

オリゴヌクレオチドを基礎とするキットの場合は、本発明に係るキットは、例えば：（1）G A V E 19核酸配列とハイブリッドする検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチド、又は（2）G A V E 19核酸分子を増幅するために有用な一対のプライマーから構成することができる。当該キットは更に例えば緩衝剤、保存剤又はタンパク質安定剤を含むことができる。当該キットはまた検出可能な試薬（例えば、酵素又は基質）を検出するために必要な成分を含むことができる。更にその上、当該キットはまた検定しそしてテストサンプルと比較するために対照サンプル又は対照サンプルシリーズをも含むことができる。

30

【0216】

2. 薬理ゲノム学

ここに説明したように、G A V E 19発現は活性化された又は炎症状態に関係する細胞内において調節される。炎症と関係した障害には、アナフィラキシー状態、大腸炎、クローン病、浮腫状態、接触過敏症、アレルギー、関節炎の他の形態、髄膜炎及びその他の状態が含まれ、そこでは免疫システムが腫脹及び同様な状態になっている部位において血管拡張、熱感、集合細胞、液体及び同様の物による発作に対して反応する。このように、ここに記載されたスクリーニング検定法によって同定されたようにG A V E 19活性（例えば、G A V E 19遺伝子発現）に刺激的又は阻害的效果を有する試薬又は調節因子は、障害（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患又は関節リウマチの関与する炎症）に対する処置（予防的又は治療的）として個々に投薬することができる。そのような処置との結びつきにおいて、個体の薬理ゲノム学（即ち、個体のゲノムタイプと外来性化合物又は薬剤に対する個体の応答間の相関関係の研究）が考慮される。治療剤の代謝における相違が、投薬量と薬理的に活性な薬剤の血液濃度間の相関関係の変更により重症な副作用或いは治療不全を導くこととなり得る。このように、個体の薬理ゲノム学は、個人のゲノムタイプを考慮して、予防的又は治療的処置のための効果的な試薬（例えば、薬剤）の選択を可能とするものである。そのような薬理ゲノム学は、更に適当な投薬量及び治療法を決定するのにも使用することができる。

40

50

【0217】

薬理ゲノム学は、罹患者における薬物処理の変異及び異常作用による薬物応答の臨床上重要な遺伝的変異についても取り扱う。例えば、Linder, Clin Chem (1997) 43 (2): 254 ~ 266参照。一般的に、薬理ゲノム学の条件には、二つのタイプを区別することができる。薬剤が身体に対して作用する仕方を変動する単一の因子として継代される遺伝的條件は「薬剤作用変異」と呼ばれる。身体が薬剤に対して作用する仕方を変動する単一の因子として継代される遺伝的條件は「薬剤代謝変異」と呼ばれる。薬理ゲノム学の条件は希少な欠損又は多型のいずれかとして発生する。例えば、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症(G6PD)は、よく知られた遺伝的酵素病であるが、そこにおける主要な臨床上の合併症は、酸化剤(抗マラリア薬、サルファ剤、鎮痛剤又はニトロフラン剤)の摂取及びソラマメ(fava beans)の食餌後の赤血球溶血である。

【0218】

説明的状态としては、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度及び時間双方の主要な決定事項である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)及びシトクロムP450酵素、CYP2D6及びCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、何故ある患者は薬物の標準的そして安全投与量を摂取後に期待通りの効果又は過大な薬物応答及び重症な毒性を受けないのかという疑問に対する説明を与えている。多型は個体における二種の表現型、強力な代謝体(EM)及び微力な代謝体(PM)で表現される。PMの罹患者率は異なる個体間において相違している。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そして数種の突然変異がPM中で同定されており、その全てが機能的CYP2D6の欠如であることが知られている。CYP2D6及びCYP2C19の微力な代謝体は標準的な投与量を摂取したときに、過大な薬物応答及び副作用を極めて頻繁に経験する。もしも代謝物が活性な治療剤であるならば、PMは治療応答を示さないこととなるが、それはCYP2D6により生成した代謝物、モルヒネによって仲介されるコデインの鎮痛効果について実証されている。他の極端な例は、いわゆる超特急代謝体であり、それは標準的投与量に対して全く応答しない。最近、超特急代謝の分子基礎がCYP2D6遺伝子増幅によるものであることが同定されている。

【0219】

個体中のGAVE19タンパク質の相同体の活性又はGAVE19核酸の相同体であるDNA分子の発現は、個体の治療的又は予防的処置にとって適当な試薬を選択するために決定することができる。加えて、薬理ゲノム科学の研究は、個体の薬物応答表現型を同定するために薬物代謝酵素をコードしている多型対立遺伝子のゲノムタイピング(遺伝型分類)に利用するために使用することもできる。投薬量決定又は薬物選択に利用されたときの知見は、副作用又は治療不全を回避することができ、そしてそれ故にここで記載した模範的なスクリーニング検定法の一つを用いて同定された分子のような、GAVE19分子を被検体に処置するときは、治療的又は予防的効果を増大させることができる。

【0220】

D. 処置の方法

上記に説明したように、本発明はマウスにおけるGAVE19の発現を調節する薬剤又は試薬を同定するための検定法に及ぶものである。

GAVE19の発現の側面、即ち、正常の脾臓における高度な発現により、コラーゲン誘発関節炎(CIA)のRAマウス脾臓における発現レベルは正常な脾臓に比べて2倍増加し、また、CIA RAマウスの肺においては正常な肺に比べて5倍以上も発現レベルが上昇したことより、そのような薬剤又は試薬は、炎症性障害(例えば喘息)、慢性閉塞性肺疾患及び関節リウマチ等のような病気又は障害の処置に容易に利用され得るものである。

【0221】

1. 予防法

或る局面において本発明は被検体にGAVE19発現又は少なくともGAVE19活性の一つを調節する薬剤を投与することにより、上記記載のような病気又は症状を予防する

ための方法を提供するものである。そのような処置から得られる利益を受けるものは、例えば当業者によく知られている診断又は予後判定のいかなる又はその組合せによって同定することができる。予防薬の投与は、病気又は障害の予防或いは進行を遅らせるためには、そのような病気又は障害の症状が顕在化する前に行うことによってできる。

【0222】

2. 治療法

炎症性病気の処置に用いられる試薬、即ちマウスにおけるG A V E 1 9タンパク質の活性を調節することができるものは、核酸又はタンパク質、G A V E 1 9タンパク質の自然発生の同種のリガンド、ペプチド、G A V E 1 9ペプチド様又は他の低分子のようなもので、ここに記載されているような試薬である。或る実施態様においては、当該試薬はG A V E 1 9タンパク質の一つ又はそれ以上の生物学的活性を刺激する。そのような刺激剤の例としては、細胞中に取り込まれたG A V E 1 9タンパク質及びG A V E 1 9をコードする核酸分子が含まれる。他の態様においては、G A V E 1 9タンパク質の一つ又はそれ以上の生物学的活性を阻害する試薬がある。そのような阻害剤の例としては、アンチセンスG A V E 1 9核酸分子及び抗-G A V E 1 9抗体がある。変形的な方法は、イン・ビトロ (*in vitro*) (例えば、細胞を試薬と共に培養することにより) 或いはイン・ビボ (*in vivo*) (例えば、試薬を被検体に投与することにより) に行うことができる。そのようなものとして、本発明は試薬 (例えば、ここに記載されているスクリーニング検定法で同定された試薬) 又はマウスにおけるG A V E 1 9の発現又は活性を調節する (例えば上流制御又は下流制御) 試薬の混合剤を個体に投与することを含んでいる上記記載のような病気又は障害に苦しんでいる個体を治療する方法を提供するものである。他の態様としては、当該方法を治療としてG A V E 1 9タンパク質又は核酸分子を投与することに関するものである。

10

20

【0223】

本発明は、以下に限定列举としてではなく掲げられている本発明の模範例によって、よりよく理解されるものと思われる。以下の例は本発明の好適な実施態様をより完全に説明するために提示している。しかしながら、本発明の範囲を制限することを意味するものではない。

【実施例】

【0224】

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の多くは、市場における今日の治療薬の約50%が標的としているものである。GPCRはペプチド、神経伝達物質、ホルモン、成長因子、アミン類、脂質、脂肪酸、発臭剤及び光を含む広範囲のリガンドによって活性化される。GPCR作用の不安定は多くの病理学的条件をもたらす。正常な脾臓において高度に発現するヒトG A V E 1 8のオーソログ (ortholog) であるG A V E 1 9は、正常な脾臓に比べて2倍も増加した発現レベルをコラーゲン誘発関節炎 (CIA) のR Aマウス脾臓中で示し、また正常な肺に比べて5倍以上も上昇した発現レベルをCIAのR Aマウス肺で示した。このように、G A V E 1 9は、炎症性障害 (例えば、喘息)、慢性閉塞性肺疾患及び関節リウマチ等の病気又は障害治療に用いる薬剤又は試薬を標的とする新規な医薬品を提供するものである。

30

40

【0225】

G A V E 1 9の同定及びクローニングは、またデ・オーファニング (de-orphaning) 工程により、内因性リガンドを見付ける機会を提供するものである。デ・オーファニングにより同定した自然リガンド又は代用リガンドは、受容体の信号伝達を活性又は阻止し、それ故に細胞内生理又は細胞機能を変化させる分子をスクリーニングするための道具を提供するものである。

【0226】

材料及び方法

G A V E 1 9の同定及びクローニング：マウスのゲノムDNAデータベースに重ね合せたヒトG A V E 1 8 DNA配列を用いても、マウス相同DNA配列は明らかにできなかつ

50

た。そこで、コード領域を含んでいるヒト G A V E 1 8 D N A を Research Genetics のマウスゲノム B A C ライブラリーをスクリーンするためのプローブとして使用した。ヒト G A V E 1 8 配列に従って設計した多重 D N A プライマーをポジティブマウス B A C を配列するために使用した。唯一のプライマー、5' G G C T T C C C C C A A A G A C A A A G 3' (配列番号 3) がマウス G A V E 1 9 D N A 配列データを与えた。そこで、多重マウス D N A 配列プライマーをマウス G A V E 1 9 コード領域の配列を決定するためのプライマーウォーキング (primer walking) 用に設計した。

【 0 2 2 7 】

マウス病気モデル及び R N A の単離：各種の組織及び器官からのマウス全 R N A の単離は、G I B C O B L R のトリゾール (Trizol) 試薬を用い、製造使用説明書に基づいて行った。全 R N A は、A B I の Multiscribe R T - P C R キットを用いて、c D N A に変換した。

10

【 0 2 2 8 】

T a q M a n 分析：T a q M a n 反応はマウス組織 c D N A を用いて二連で行い、そして G A P D H 遺伝子を内部対照として使用した。その後 T a q M a n の結果を、相対的発現として計算した。相対的発現は $(2^{-(0-ddCt)})^{*1000}$ で、ここで d d C t は (G A V E 1 9 平均値 C t s - G A P D H 平均値 C t s) - (G A V E 1 9 平均値 N T C C t s - G A P D H 平均値 N T C C t s) である。T a q M a n プローブは、Operon Technologies により、注文製で合成した。T a q M a n プライマー配列 1 は：5' C T G T T C T T G C T G G T G A A A A T G A A 3' (配列番号 4) 及び配列 2 は、5' C C A T G A A C C A C C A C G A G G T T 3' (配列番号 5) である。T a q M a n プローブ配列は 5' (F a m) - T C A C G T T C A G T G A C C A C C A T G G C T G - (T e t) 3' (配列番号 6) である。T a q M a n 反応は 9 6 穴プレート MicroAmp 光学チューブ (P E) 中に行なった。

20

【 0 2 2 9 】

結果の説明

T a q M a n 発現プロフィールは、C I A (コラーゲン誘発関節炎) R A モデルの関節における G A V E 1 9 の発現レベルが、正常な対照サンプルから R A グレード 4 に至るまで、徐々に増加していることを示している。関節における R A グレードが高ければ高いほど、より高い G A V E 1 9 発現の相関関係を示している。G A V E 1 9 はまた正常な対照肺及び脾臓に比べて、C I A R A 肺及び脾臓における発現レベルを顕著に増大していることも示している。多発性硬化症のマウス E A E (実験的アレルギー脳脊髄炎) モデルにおいては、G A V E 1 9 は前臨床期中の脳における発現レベルと比較して、E A E ピーク期中の脳における発現レベルを増大することを示している。

30

【 0 2 3 0 】

【表 1】

マウス組織におけるG A V E 1 9のT a q M a n発現プロフィールの表

組織型	CT	平均値	GAPDH CT	GAPDH平均値			発現
EAE 対照(未免疫)脳	34.78	34.58	19.04	19.35	15.24	15.24	0.03
	34.38		19.65				
EAE 対照(未免疫)心臓	35.63	35.86	22.12	22.07	13.80	13.80	0.07
	36.09		22.01				
EAE 対照(未免疫)肝臓	36.81	36.80	20.63	20.93	15.87	15.87	0.02
	36.78		21.22				
EAE バイクル脳	34.21	34.12	19.12	19.09	15.04	15.04	0.03
	34.03		19.05				
EAE バイクル心臓	33.01	32.64	19.13	18.66	13.98	13.98	0.06
	32.26		18.18				
EAE バイクル肝臓	35.37	35.27	20.86	20.70	14.57	14.57	0.04
	35.16		20.54				
EAE 発症前, d7 脳	35.06	35.10	19.94	19.99	15.12	15.12	0.03
	35.14		20.03				
EAE 発症前, d7 心臓	34.33	34.32	19.05	18.99	15.33	15.33	0.02
	34.3		18.93				
EAE 発症前, d7 肝臓	34.15	34.24	20.23	20.33	13.91	13.91	0.06
	34.33		20.43				
EAE ピーク脳	30.75	30.73	19.96	19.93	10.80	10.80	0.56
	30.7		19.9				
EAE ピーク心臓	32.82	32.75	18.84	19.09	13.67	13.67	0.08
	32.68		19.33				
EAE ピーク肝臓	32.61	32.41	19.93	20.48	11.93	11.93	0.26
	32.2		21.03				
EAE 継続寛解	33.6	33.52	19.61	19.80	13.73	13.73	0.07
	33.44		19.98				
EAE 再発脳	34.32	34.42	20.89	20.71	13.71	13.71	0.07
	34.51		20.52				
EAE (未免疫)肺	32.04	32.11	22	22.46	9.66	9.66	1.24

10

20

30

【0231】

発現プロフィールデータはまた図3にグラフとして表示している。これら全てのデータはG A V E 1 9が炎症関連疾患において重要な役割を演じていることを指摘している。

【0232】

論考

ヒトG A V E 1 8とオーソログである新規なマウスG共役型受容体G A V E 1 9が同定されそしてクローンされた。当該DNAの全長コード領域及びそれから推論されるアミノ酸配列が特定された。当該受容体の組織分布は、正常な対照マウス及びコラーゲン誘発関節炎(C I A)マウスにおいて、R T - P C R (T a q M a n)分析法によって分析した。G A V E 1 9の発現プロフィールは、G A V E 1 8(ヒトオーソログ)との類似性を示し、また関節リウマチのような炎症性病気におけるその重要な役割が指摘された。それ故、ここに記載された種々の検定法を用いることにより、G A V E 1 9は喘息、R A (関節リウマチ)、C O P D (慢性閉塞性肺疾患)のような炎症性病気に対する新しい医薬品標的を提供する。尚、本発明に係る検定法により見い出されたマウスにおけるG A V E 1 9の発現及び/又は活性を調節する化合物及び試薬は、そのような病気の治療に容易に利用し得るものと思われる。

40

【0233】

本発明はここに記載されている特別な実施態様によって、その範囲が限定されるものではない。実際ここに記載されているものに加えて、本発明の数々の変形が前述の記載から

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/04350
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 1/00, 16/00; C12P 21/06; G01N 33/53; C12N 15/00; C07H 21/02, 21/04; A01N 37/18 US CL : 530/350, 387.1; 435/69.1, 320.1, 7.1; 536/23.1, 23.5; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 387.1; 435/69.1, 320.1, 7.1; 536/23.1, 23.5; 514/2		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS, USPATFUL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENBANK ACC NO. AC078995, August 2000, see a copy of the sequence alignment attached.	4
A	SAUTEL et al. Molecular manipulation of G-protein-coupled receptors: a new avenue into drug discovery. Current Medical Chemistry, 2000, Vol. 7, pp.889-896	1-28
A	LIEBMANN et al. Signal transduction pathways of G-protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. Current Medical Chemistry, 2000, 7, pp.911-943	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 29 September 2003 (29.09.2003)		Date of mailing of the international search report 24 MAR 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Olga N. Chernyshev Telephone No. (703) 303-0196

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハイフェング・アイシングドレロ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 0 4 5 . モントヴィル . フレッチャードドライブ 1 7

(72) 発明者 ホリー・ドレスラー

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 2 3 . フランクリンパーク . ペアトゥリーレーン 1 0 6

(72) 発明者 ジドング・カイ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 8 1 . ホイッパニー . シーダーノウルズロード 1 6 5

(72) 発明者 ポール・ライト

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 8 9 3 8 . ニューホープ . ウィンドミアウェイ 5 0 5

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01

4B024 AA01 AA11 BA63 CA02 DA02 DA05 DA12 FA02

4B063 QA18 QQ96 QR55 QR77 QS33 QX01 QX02 QX07

4B064 AG20 AG27 CA02 CA04 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA15 AA26 AA41 AA50 AA72 AA90 AB01 BA02 CA24 CA44

CA46

4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA071 ZA361 ZA591 ZA681 ZA831 ZA891 ZA961

ZB021 ZB111 ZB131 ZB151 ZB211 ZB212 ZC412

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 BA70 BA71 CA40 DA50 DA76

EA22 EA23 EA27 FA74

专利名称(译)	编码G蛋白偶联受体的核酸及其用途		
公开(公告)号	JP2005517398A	公开(公告)日	2005-06-16
申请号	JP2003567929	申请日	2003-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	安万特制药公司莱特每次		
申请(专利权)人(译)	每次Aventis制药公司的股份有限公司莱特		
[标]发明人	ハイフエングアイシングドレロ ホリードレスラー ジドングカイ ポールライト		
发明人	ハイフエング・アイシングドレロ ホリー・ドレスラー ジドング・カイ ポール・ライト		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P7/10 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	A61P1/04 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/705 G01N2333/726 G01N2500/04 G01N2500/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/04 A61P7/10 A61P9/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/FA02 4B063/QA18 4B063/QQ96 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA04 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA15 4B065/AA26 4B065/AA41 4B065/AA50 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA071 4C084/ZA361 4C084/ZA591 4C084/ZA681 4C084/ZA831 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB021 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA27 4H045/FA74		
优先权	60/356686 2002-02-14 US 2002019574 2002-08-22 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了新颖且有用的G蛋白偶联受体，其涉及关于炎症和生理学免疫应答的信号转导。还提供了使用受体筛选可调节受体活性的分子的方法。这样的分子可以容易地用于治疗过多的炎症和与免疫学有关的疾病和病症。

組織名	CT	平均値	GAPDH CT	GAPDH平均値			差現
EAE 対照 (未免疫) 脳	34.78	34.58	19.04	19.35	15.24	15.24	0.03
	34.38		19.65				
EAE 対照 (未免疫) 心臓	35.63	35.86	22.12	22.07	13.80	13.80	0.07
	36.09		22.01				
EAE 対照 (未免疫) 肝臓	36.81	36.80	20.63	20.93	15.87	15.87	0.02
	36.78		21.22				
EAE ベイクル 脳	34.21	34.12	19.12	19.09	15.04	15.04	0.03
	34.03		19.05				
EAE ベイクル 心臓	33.01	32.64	19.13	18.66	13.98	13.98	0.06
	32.26		18.18				
EAE ベイクル 肝臓	35.37	35.27	20.86	20.70	14.57	14.57	0.04
	35.16		20.54				
EAE 発症前, d7 脳	35.06	35.10	19.94	19.99	15.12	15.12	0.03
	35.14		20.03				
EAE 発症前, d7 心臓	34.33	34.32	19.05	18.99	15.33	15.33	0.02
	34.3		18.93				
EAE 発症前, d7 肝臓	34.15	34.24	20.23	20.33	13.91	13.91	0.06
	34.33		20.43				
EAE ピーク 脳	30.75	30.73	19.96	19.93	10.80	10.80	0.56
	30.7		19.9				
EAE ピーク 心臓	32.82	32.75	18.84	19.09	13.67	13.67	0.08
	32.68		19.33				
EAE ピーク 肝臓	32.61	32.41	19.93	20.48	11.93	11.93	0.26
	32.2		21.03				
EAE 神経寛解	33.6	33.52	19.61	19.80	13.73	13.73	0.07
	33.44		19.98				
EAE 再発 脳	34.32	34.42	20.89	20.71	13.71	13.71	0.07
	34.51		20.52				
EAE (未免疫) 肺	32.04	32.11	22	22.46	9.66	9.66	1.24