

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 525624

(P2003 - 525624A)

(43)公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		48/00	4 C 0 8 4
		A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 44数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 565761(P2001 - 565761)

(86)(22)出願日 平成13年3月5日(2001.3.5)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月4日(2002.9.4)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/02462

(87)国際公開番号 W001/066597

(87)国際公開日 平成13年9月13日(2001.9.13)

(31)優先権主張番号 09/518,832

(32)優先日 平成12年3月6日(2000.3.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
スイス国、4056 バーゼル、リヒトシュト
ラーセ 35

(72)発明者 ガボール・ヤライ
イギリス、アールエイチ13・7ユーワイ、ウ
エスト・サセックス、ホーシャム、サウス
ウォーター、ザ・ブルック5番

(72)発明者 ポール・ロイ・クーパー
イギリス、ビー43・7エルエイ、パーミンガ
ム、グレイト・バー、ヒリングフォード・
アベニュー137番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 炎症関連遺伝子

(57)【要約】

(A)配列番号2のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列の機能的等価変異体を含むポリペプチド、または(B)ポリペプチド(A)をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、または(C)ポリペプチド(A)と免疫反応性である抗体、または(D)ヌクレオチド(B)と相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、または(E)(B)の少なくとも15連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブの、好中球関連炎症性疾患の診断または処置用医薬の製造における使用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A)配列番号2のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列の機能的等価変異体を含むポリペプチド、または(B)ポリペプチド(A)をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、または(C)ポリペプチド(A)と免疫反応性である抗体、または(D)ヌクレオチド(B)と相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、または(E)(B)の少なくとも15連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブの、好中球関連炎症性疾患の診断または処置用医薬の製造における使用。

【請求項2】 配列番号2の連続10アミノ酸部分と配列が同一の連続10アミノ酸部分を含むポリペプチド(A)の、請求項1に記載の使用。

【請求項3】 配列番号1のヌクレオチド配列を含むcDNAである、またはストリンジェントな条件下で配列番号1とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むDNAである、ポリヌクレオチド(B)の、請求項1に記載の使用。

【請求項4】 ポリヌクレオチド(B)が配列番号1の連続20塩基対と配列が同一の連続20塩基対ヌクレオチド部分を含む、請求項3に記載の使用。

【請求項5】 配列番号1と相補的なヌクレオチド配列を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド(D)の、請求項1に記載の使用。

【請求項6】 配列番号1の少なくとも15連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブ(E)の、請求項1に記載の使用。

【請求項7】 疾患が慢性閉塞性肺疾患、成人呼吸窮迫症候群、関節リウマチまたは炎症性大腸疾患である、請求項1から6のいずれかに記載の使用。

【請求項8】 必要とする対象に有効量の請求項1または2に記載のポリペプチド(A)、請求項1、3または4に記載のポリヌクレオチド(B)、請求項1に記載の抗体(C)、または請求項1または5に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド(D)を投与することを含む、好中球関連炎症性疾患の処置法。

【請求項9】 対象由来の遺伝サンプルを、請求項1または6に記載のポリヌクレオチドプローブ(E)と、プローブが相補的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする条件下でインキュベートし、第1反応産物を産生し、第1反応産物を、正常遺伝サンプルで得たコントロール反応産物と比較することを含み、第1

反応産物とコントロール反応産物の差異が好中球関連炎症性疾患を発症する素因を示すものである、対象における好中球関連炎症性疾患を発症する素因を検出する方法。

【請求項10】 細胞または組織由来のDNAを、ポリヌクレオチド(B)の少なくとも15連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブと、プローブがポリヌクレオチド(B)と特異的にハイブリダイズする条件下で接触させ、ハイブリダイゼーションが起こるか否かを検出することを含む、対象由来の細胞または組織における請求項1、3または4に記載のポリヌクレオチド(B)の存在を検出することを含む、対象における好中球関連炎症性疾患を診断する方法。

【請求項11】 対象由来の細胞または組織における請求項1または2に記載のポリペプチド(A)または請求項1、3または4に記載のポリヌクレオチド(B)のレベルを測定する、対象由来の細胞または組織における(A)の生物活性を測定する、または対象由来の細胞または組織における(B)の変異の存在を測定する、そして結果を健康な対象から得られたものと比較することを含む、対象が好中球関連炎症性疾患を発症しているか、または発症の恐れがあるかを測定する方法。

【請求項12】 候補物質とポリペプチド(A)を合わせ、候補物質の該(A)の活性における効果を測定することを含む、請求項1または2に記載のポリペプチド(A)の活性を調節する、好中球関連炎症性疾患の処置に使用するのに適した物質の同定法。

【請求項13】 候補物質と請求項1または2に記載のポリペプチド(A)を合わせ、結合が起きるか否かを測定することを含む、好中球関連炎症性疾患の処置に使用するのに適した物質の同定法。

【請求項14】 疾患が慢性閉塞性肺疾患、成人呼吸窮迫症候群、関節リウマチまたは炎症性大腸疾患である、請求項8から13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 請求項1、3または4に記載のポリヌクレオチド(B)のフラグメントの増幅のためのプライマーとして有用なオリゴヌクレオチド対であり、該対の各オリゴヌクレオチドは、少なくとも15ヌクレオチド長であり、該対は、ヒトゲノムDNAまたは適当なヒトcDNA標的とのポリメラーゼ連鎖反応

に使用した場合、請求項1、3または4に記載のポリヌクレオチド(B)のヌクレオチド配列を全てまたは一部含むDNAフラグメントの合成をもたらす、オリゴヌクレオチドの対。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、診断的および治療的適用におけるEX33と呼ばれる疾患関連G-プロテイン結合レセプター遺伝子、EX33によりコードされるタンパク質分子および関連分子の使用、および治療的標的としての、EX33によりコードされるタンパク質の使用に関する。

【0002】

炎症中に組織内に引き寄せられる細胞は、種々の白血球、特に好中性および好酸性顆粒球および単球のような炎症性貪食細胞を含む。好中球は、慢性気管支炎およびそれに関連する気腫を含む慢性閉塞性肺疾患(COPD)、および成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、クローン病および潰瘍性大腸炎のような炎症性大腸疾患、および関節リウマチのような好中球関連呼吸器疾患における炎症および組織破壊に関連している。

【0003】

炎症性状態における白血球の作用における重要な段階は、これらの細胞の組織中、例えば、呼吸器炎症において気道中、または関節リウマチにおいて関節、中への移動、細胞活性化およびさまざまな炎症性メディエーター、ロイコトリエン、酸素ラジカル、プロテアーゼの放出を含む。白血球移動および活性化に必要なシグナルは、しばしば7つの膜を貫通して伸びる(seven transmembrane-spanning)G-プロテイン結合レセプター(GPCR)スーパーファミリーに属するレセプターを介して伝達される。GPCR遺伝子ファミリーは、最大の既知のレセプターファミリーである。GPCRは、細胞外シグナルのトランスデューサーであり、それらは組織が幅広いシグナル伝達分子に応答することを可能にする。

【0004】

例えば、白血球移動は、血液細胞の内皮表面への停止および強い接着、および内皮を通った間質へのおよびそこから特定の微環境への移動を含む。顆粒球(および他の白血球)の組織への移動は、これらの各段階において根本的に重要である走化性因子(ケモカイン)により制御される。内皮細胞の表面に提示されるケモカインは、顆粒球および他の白血球上のそれらの同族レセプターと相互作用し、

堅い接着が、ついで、組織を通った標的微環境への移住に続く。ケモカインの同族レセプターは、GPCRのサブ-ファミリーのメンバーである。走化性に加えて、GPCRスーパー-ファミリーのメンバーは、また、炎症性状態で観察されるもののような、種々の細胞性過程の活性化を、例えば細胞内カルシウム放出またはcAMP生成と結合して、導くことができる、多くの他のシグナル伝達事象に関連している。

【0005】

異なるGPCR間のアミノ酸配列比較は、配列類似性が広範囲にわたり変化し得、GPCRの異なるサブファミリーが、しばしば明白な配列類似性を共有しないことを確認する。しかし、これら全てのレセプターは、3つの細胞内および3つの細胞外ループにより接続された7つの膜貫通型ヘリックス(TM-Iから-VII)を共通して有する。

【0006】

種々のクローニングストラテジーおよびデータベースマイニングアプローチが、この共通構造により特徴付けられる多くのGPCRのクローニングを導く。しかし、リガンドの同定は遅れており、そのタンパク質生成物が、基準として配列類似性および予測的3D構造を使用して、GPCRファミリーのメンバーである多くのGPCR遺伝子が存在するが、それに対するリガンドは知られていない。これらのレセプターは、孤児G-プロテイン結合レセプター(oGPCR)として一般に知られている。

【0007】

G-プロテイン結合レセプターは、それらが広範囲の生理学的および病理学的過程に関与しているため、治療的適用における重要な標的である。60-70%の現在四版されている医薬が、GPCRスーパーファミリーのメンバーに実際作用すると概算される。

【0008】

GPCRの同定に使用できる一つの方法は、縮重プライマーポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。この方法において、GPCR遺伝子サブ-ファミリーの二つの選択した、保存領域に対応するオリゴヌクレオチドの二つの混合物を合成し

、低ストリンジェンシーポリメラーゼ連鎖反応条件を使用したゲノムまたはcDNA鋳型のフラグメントの増幅に使用される。プライマーの混合物は、それらが関連するが、異なる配列である遺伝子フラグメントの増幅を可能にするように設計する。増幅を単離し、ゲノムおよびcDNAクローンの両方で、完全長遺伝子をクローンするのに使用できる。縮重PCRアプローチの主な利点は、それが目的の特異的遺伝子 - ファミリーのメンバーの単離を助けることである。

【0009】

好中球関連介在炎症性疾患状態で炎症性細胞に発現されるG-プロテイン結合レセプター遺伝子の同定は、炎症性状態の理解に重要な機会を提供し、そこから多くの重要な適用が発生するであろう。同定されたGPCRは、該遺伝子または該遺伝子のタンパク質産物を直接標的とした治療(小分子医薬、アンチセンス分子、抗体分子)の開発を導き得、または、このような医薬の開発が、該遺伝子のターゲティングより容易な場合、上流または下流での生化学的経路を標的とし得る。該遺伝子および配列変異体を含むポリヌクレオチド配列を使用し、好中球関連炎症性疾患状態の診断的試験を開発し得る。最後に、これらの炎症性状態に環よするGPCRのDNA配列および、これらの遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に関する情報は、組換え技術によるタンパク質の大規模製造、および天然に該タンパク質を生成する組織および細胞の同定を促進する。このような配列情報はまたGPCR遺伝子によりコードされるタンパク質と特異的反応する抗体物質または他の新規結合分子の製造を可能にし、これはタンパク質が関与するリガンド/抗リガンド結合反応の調節に使用し得る。

【0010】

したがって、一つの態様において、本発明は、(A)配列番号2のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列の機能的等価変異体、すなわち、その生物学的または他の機能的活性を保持した変異体を含むポリペプチド、または(B)ポリペプチド(A)をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド(以後、EX33と呼ぶ)、または(C)ポリペプチド(A)と免疫反応性である抗体、または(D)ヌクレオチド(B)と相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、または(E)(B)の少なくとも15連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドブ

ローブの、好中球関連炎症性疾患の診断または処置用医薬の製造における使用を提供する。

【0011】

本明細書で使用する用語は、以下の意味を有する：

“単離”は、その本来の環境から除かれた物質を意味する。

“ハイブリダイゼーション”または“ハイブリダイズ”は、ポリヌクレオチドの鎖が、塩基対形成を介してその相補鎖と結合する任意の工程を意味する。

“ストリンジェントな条件”は、20%までの塩基対ミスマッチを可能にする実験条件を意味し、典型的に65で0.1×SSC(15mM NaCl、1.5mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0)の2回、15分洗浄である。

【0012】

“相同性”または“相同”は、部分的であるか、または、配列が同一である場合、完全であり得る、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の類似の程度を意味する。

“発現ベクター”は、目的のポリペプチドをコードするセグメント、および操作が能に連結したその転写のために提供された更なるセグメントを含む、直鎖または環状DNA分子である。

【0013】

“アンチセンス”は、標的タンパク質のメッセンジャーRNA(mRNA)における、オリゴ-またはポリヌクレオチドの、その相補的配列へのハイブリダイゼーションを介したタンパク質合成の選択的阻害を意味する。アンチセンス該ねは、最初に、ZamecnikおよびStephenson(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:280-284; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:285-288)により提案され、続いて実験的ツールとしておよび推定治療分子を生成する手段のとしての両方の広い適用が発見された(Alama, A., Pharmacol. Res. 36:171-178; Dean, N.M., Biochem. Soc. Trans. 24:623-629; Bennet, C.F., J. Pharmacol. Exp. Ther. 280:988-1000; Crooke, S.T., Antisense Research and Applications, Springer)。

【0014】

本明細書で使用する“変異体”は、アミノ酸配列に関して、1個以上のアミノ

酸により変えられているアミノ酸配列を意味する、変化は、アミノ酸置換、欠失または挿入を含み得る。ヌクレオチド配列に関して、本明細書で使用する“変異体”なる用語は、1個以上のヌクレオチドにより変えられているヌクレオチド配列を言い、変化は、ヌクレオチド置換、欠失または挿入を含み得る。アミノ酸配列の機能的等価変異体は、例えば、そのアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合できる抗体を生成できる変異体であり得る。好ましいアミノ酸配列番号2の機能的等価変異体は、配列番号2と、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、そして特に95%を超えるアミノ酸配列同一性を有する。

【0015】

配列番号2のような参照配列とx%同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列の100アミノ酸当たり、100-xアミノ酸変化以外、参照配列と同一の配列を意味する。例えば、参照配列と少なくとも80%同一性を有する対象アミノ酸配列において、参照配列における20%までのアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基により置換、欠失または挿入されていてよい。アミノ酸配列間の同一性パーセントは、コンピュータープログラム、例えばBrutlag et al (Comp.App.Biosci. (1990)6:237-245)のアルゴリズムをベースにしたFASTDBプログラムを慣用的に使用して決定している。

【0016】

ポリヌクレオチド(B)はcDNA、ゲノムDNAまたはRNAであり得る。特定の実施態様において、ポリヌクレオチド(B)は、配列番号1のヌクレオチド配列を含むcDNA、またはストリンジェントな条件下で配列番号1とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むDNAである。このようなハイブリダイゼーション要求を満たすヌクレオチド配列は、1個以上のヌクレオチドの欠失、挿入または置換によりもたらされるものである。

【0017】

本発明の他の態様において、ポリヌクレオチド(B)は、配列番号1の連続20塩基対部分と配列が同一の連続20塩基対ヌクレオチド部分を含む。本発明の更なる態様において、ポリヌクレオチド(B)は、配列番号1由来の、少なくとも20、例えば少なくとも50、例えば、少なくとも100、例えば少なくとも20

0、連続塩基を有する部分を含む。本発明の更に別の態様において、ポリヌクレオチド(B)は、配列番号2由来の少なくとも10、例えば少なくとも50、例えば少なくとも100、例えば少なくとも200連続アミノ酸をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0018】

ポリヌクレオチド(B)は、GPCRのファミリーまたはサブファミリーのメンバーの中で保存されているアミノ酸配列モチーフを使用して設計された縮重プライマーを使用したPCRにより、最初にそのフラグメントを単離することにより単離し得る。縮重プライマーは、ヒト細胞、特に白血球からまたは特に貪食細胞、例えば好中性および好酸性顆粒球からまたはゲノムDNAから単離されたRNAから調製したcDNA由来のフラグメントの増幅に使用できる。単離フラグメントを次いで配列決定し、完全長クローンを、最初に、その配列およびヒト細胞、特に白血球からまたは特に貪食細胞、例えば好中性および好酸性顆粒球からまたはゲノムDNAから単離したRNAを使用して設計した遺伝子特異的プライマーを使用した5'および3' RACE(cDNA末端急速増幅)を使用した、5'および3'末端を含む重複フラグメントの単離、続いて標準法によるこれらのフラグメントの接続により得る。

【0019】

ポリヌクレオチド(B)は、最初、GPCRのファミリーまたはサブファミリーのメンバーの中で保存されているアミノ酸配列モチーフを使用して設計した、縮重プライマーを使用したPCRにより、そのフラグメントの単離により単離する。縮重プライマーは、ヒト細胞、特に白血球からまたは特に貪食細胞、例えば好中性および好酸性顆粒球からまたはゲノムDNAから単離したRNAから調製した、cDNAからのフラグメントの増幅に使用できる。単離フラグメントを次いで配列決定し、完全長クローンを、このフラグメントまたはその一部を、ヒトcDNAライブラリー、好ましくは白血球または、特に、顆粒球cDNAライブラリーまたはヒトゲノムDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして使用することにより得る。

【0020】

例えば配列番号1の配列を有する、ポリヌクレオチド(B)は、既知の方法および装置を使用した化学合成、例えば、自動固相合成によるものを含む、ヌクエオチドから調製し得る。

【0021】

ポリペプチド(A)は、前記のポリヌクレオチド配列を、転写のためのプロモーターおよび他の適当な調節要素を含む発現ベクターにクローニングし、細菌、植物、昆虫、酵母、動物またはヒト細胞に導入させ、組換え発現ベクターを含む宿主細胞を、適当な条件下で場陽することにより製造し得る。このようなポリペプチドの組換え発現のための技術は既知であり、例えば、J.Sambrook et al, Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Press, 1990に記載されている。

【0022】

本発明の他の関心は、配列番号2の連続10アミノ酸部分と配列が同一の連続10アミノ酸部分を含む。更なる態様において、ポリペプチド(A)は、配列番号2からの少なくとも10、例えば少なくとも50、例えば少なくとも100、例えば少なくとも200、連続アミノ酸を含む。

【0023】

ポリペプチド(A)は、1個以上の異種ポリペプチドとの組換え融合タンパク質として発現し得る。例えば、それは、本発明のポリヌクレオチド配列と異種ポリペプチド配列の間に位置する開裂部位を含む、ポリヒスチジンのような異種ポリペプチドとの組換え融合タンパク質として発現し得、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを、既知の技術を使用して異種部分から開裂および精製し得るようにする。ポリペプチド(A)はまた、既知の化学法、例えば、自動固相技術を使用することを含む、アミノ酸から、全体または一部合成し得る。ポリペプチド(A)は既知の標準法により精製し得る。

【0024】

抗体(C)は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。このような抗体は慣用法を使用して製造し得る。精製抗原に対するポリクローナル抗体を製造する方法は、確立されている(Cooper and Paterson in Current Protocols

in Molecular Biology, Ausubel et al. Eds., John Wiley and Sons Inc., Chapter参照)。典型的に、ウサギ、またはマウスのような宿主動物を、本発明の精製ポリペプチドまたはその免疫原性部分を抗原として免疫化し、適当な時間の後に、宿主血清を集め、ポリペプチドに対して特異的な抗体に関して試験する。精製抗原に対するモノクローナル抗体の製造法は確立されている(Chapter 11, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Eds., John Wiley and Sons Inc.参照)。ポリクローナル抗体の製造のために、血清を飽和硫酸アンモニウムまたはDEAE Sephadexで処理できる。モノクローナル抗体の製造のために、免疫化動物の脾臓またはリンパ球を除去し、不死化するか、既知の方法によりハイブリドーマを製造するのに使用する。不死化細胞により分泌された抗体は、例えば、ウェスタン・ブロット分析を使用して、望ましい特異性の抗体を分泌するクローンを決定するためにスクリーニングする。ヒト化抗体は、慣用法で製造できる。

【0025】

アンチセンスオリゴヌクレオチド(D)はDNA、DNAのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートアナログのようなDNAのアナログ、RNA、RNAのアナログ、またはペプチド核酸(PNA)であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは慣用法で、例えば自動乾燥法を使用して合成できる。

【0026】

ポリヌクレオチドプローブ(E)は、前記のポリヌクレオチド(B)またはその相補体の少なくとも15連続ヌクレオチドを含む。プローブは、cDNA、ゲノムDNAまたはRNAであり得る。通常、これは15から50ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり、これは、例えば、フルオロフォアで標識でき、検出可能シグナルを提供する。ポリヌクレオチドプローブは、ストリンジентな条件下で、配列番号1の配列を有するポリヌクレオチドフラグメントw有スルポリヌクレオチドフラグメントと選択的にハイブリダイズできる。プローブは、このようなハイブリダイゼーション条件下で、その同族配列にのみハイブリダイズする配列を有する。上記のDNAプローブは、ノーザンおよびサザン・ブロット分析、ドット・ブロットおよびスロット・ブロット分析、および蛍光イン・シテ

ユ・ハイブリダイゼーション(FISH)を含む多くのスクリーニング提要に有用である。

【0027】

本発明はまた、前記のポリヌクレオチド(B)、すなわちEX33のフラグメントのDNA増幅のためのプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドの対を含み、ここで、該対の各プライマーは、少なくとも15ヌクレオチド長であり、該対は、ヒトゲノムDNAまたは適当なヒトcDNA標的とのポリメラーゼ連鎖反応に使用した場合、EX33の配列を全てまたは一部含むDNAフラグメントの合成をもたらす。プライマー対は、好ましくはEX33のコード領域またはその一部の増幅ができる。このようなプライマー対の例は、以後、各々配列番号11-12および配列番号13-14として示す。

【0028】

好中球関連炎症性疾患におけるポリペプチド(A)の役割は、疾患のモデル、例えば、ラットまたはマウスにおけるリポポリサッカライド誘導肺炎症モデル、またはDurie et al., Clin. Immunol. Immunopathol. (1994) 73: 11-18; およびWilliams et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 9784-9788に記載のモデルを使用して測定できる。

【0029】

前記のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはプローブは、以後、集合的に本発明の薬剤と呼ぶが、好中球関連炎症性疾患の処置(予防的または対症的)または診断に使用し得る。例えば、本発明のポリペプチド(A)は、ポリペプチドを欠く、またはそうでなくても必要な哺乳類、特にヒトの処置に使用し得る;ポリヌクレオチド(B)は、EX33活性の増加が必要な、例えば、対象が変異したEX33遺伝子を有するか、欠く、遺伝子治療に使用し得る;または、例えば好中球関連炎症性疾患に関連するEX33の変異形の検出のための診断的試薬として;アンチセンスオリゴヌクレオチド(D)は、必要な場合のEX33活性を阻害し得る;抗体(C)は、EX33ポリペプチドの検出、または発現のレベルの測定に、またはEX33ポリペプチドのリガンド/抗リガンド結合活性の阻害のために使用し得る;そしてプローブ(E)は、EX

33 遺伝子の存在または不存在の検出、すなわち、遺伝的異常性の検出に使用し得る。(B)、(C)または(E)の診断的試薬としての使用は、好中球関連炎症性疾患に特に関連するEX33の低い発現または過発現の検出を含み得る

【0030】

“遺伝子治療”は、個体の幹細胞への遺伝的物質の導入に基づくヒト疾患の処置の試みを意味する。遺伝子導入は、直接、インビボで、遺伝子担持ウイルスまたは非ウイルスベクターの血液または組織への直接の投与、または間接的なエキソビボでの遺伝的物質の研究室で操作した細胞への移入、続く遺伝子含有細胞の個体へ戻す送達を介した投与により達成できる。細胞内の遺伝的物質を変えることにより、遺伝子治療は、罹患している病気異常生理学を直し得る。動物における特異的な組織および臓器系への遺伝子送達の適当なベクターおよび方法は、各々Dracopoli, N.C. et al., Current Protocols in Human Genetics. John Wiley and Sons Inc., Chapters 12 and 13に記載されている。前記のポリヌクレオチド(B)に関連して、遺伝子治療は、適当な制御エレメント下にEX33遺伝子の発現カセットを含むウイルスまたは非ウイルス遺伝子治療ベクターの、疾患個体の肺への送達を含み、それにより病気異常生理学が直り、または軽減される。

【0031】

したがって、本発明は、前記のポリペプチド(A)、ポリヌクレオチド(B)、抗体(C)またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(D)を、薬学的に許容される担体と共に含む、好中球関連炎症性疾患の処置用医薬組成物；

【0032】

必要とする対象に有効量の前記のポリペプチド(A)、ポリヌクレオチド(B)、抗体(C)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(D)を投与することを含む、好中球関連炎症性疾患の処置法；

【0033】

対象由来の遺伝サンプルを、前記のポリヌクレオチドプローブ(E)と、プロ-グプローブが相補的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする条件下でインキュベートし、第1反応産物を産生し、第1反応産物を、正常遺伝サンプルで得たコ

ントロール反応産物と比較することを含み、第1反応産物とコントロール反応産物の差異が好中球関連炎症性疾患を発症する素因を示すものである、対象における好中球関連炎症性疾患を発症する素因を検出する方法；

【0034】

細胞または組織由来のDNAを、前記のポリヌクレオチドプローブと、プローブがポリヌクレオチド(B)と特異的にハイブリダイズする条件下で接触させ、ハイブリダイゼーションが起こるか否かを検出することを含む、対象由来の細胞または組織における前記の、例えば、配列番号1を含むポリヌクレオチド(B)の存在を検出することを含む、対象における好中球関連炎症性疾患を診断する方法；

【0035】

患者から単離したDNA中の標的ヌクレオチド配列を、増幅する配列を穂俞的とする前記のプライマーの対を使用したポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、増幅配列を、多形性が存在するか否かの測定のために分析することを含む、患者におけるポリヌクレオチド(B)のヌクレオチド配列における異常を検出する方法；

【0036】

対象由来の細胞または組織における前記のポリペプチド(A)または前記のポリヌクレオチド(B)のレベルを測定する、(A)の生物活性を測定する、または(B)の多形性のような変異の存在を測定する、そして結果を健康な対象から得られたものと比較することを含む、対象が好中球関連炎症性疾患を発症しているか、または発症の恐れがあるかを測定する方法を提供する。

【0037】

“多形性”なる用語は、前記の本発明のポリヌクレオチドの配列と比較した任意の配列の差異を意味する。

【0038】

ポリヌクレオチドプローブ(E)と相補的ポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションは、インシテュ(例えばFISH)ハイブリダイゼーション、ノーザンまたはサザン・プロット分析、ドット・プロットまたはスロット・プロット分析を使用して検出し得る。異常性は、また、例えば、実施例に後記のような、配列

感受性ゲル電気泳動(CSGE)およびDNA配列決定により検出し得る。遺伝低異常性は、個体のEX33タンパク質の、正常EX33タンパク質のアミノ鎖配列と比較したアミノ酸配列における変化、あるいはタンパク質の欠失をもたらし得る。あるいは、変化はアミノ酸配列を変えないが、代わりに、遺伝子の5'-または3'-末端のいずれかでの制御要素の配列を変えることにより、または遺伝子のイントロン配列領域内の制御要素の配列を変えることにより、EX33遺伝子の発現を変え得る。変化はまた転写が処理されるまたは翻訳される方法に影響し得る。本発明はまた個体のEX33遺伝子のポリヌクレオチド配列における異常性を検出するためのキットを含む。このような検出のためのハイブリダイゼーションキットは、検出可能、例えば、化学ルミネッセンスまたは蛍光、標識をその中に包含させることにより修飾し得る、前記のプローブ(E)を含み、標識試薬、すなわち、放射活性同位体、化学ルミネッセンスまたは蛍光基をハイブリダイズ産物に包含させる試薬のような他の試薬、および緩衝液を含み得る。PCR増幅キットは、上記のようなプライマー対を、TaqポリメラーゼのようなDNAポリメラーゼと共に含み得、増幅緩衝液等のような付加的試薬を含み得る。PCR増幅キットの具体的実施態様は、CSGEおよびDNA配列決定を含む、ポリヌクレオチド変化を検出する多くの技術に特異的な付加的な試薬を含み得る。

【0039】

対象が、好中球関連炎症性疾患を発症しているか、発症の恐れがあるかを測定する方法は、対象がEX33の異常mRNAおよび/またはタンパク質レベルを有するかを、例えば、ノーザン・プロット分析、逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、イン・シテュハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウェスタン・プロット・ハイブリダイゼーションまたは免疫組織化学によって、測定することを含み得る。該方法に従い、細胞を対象から得、EX33RNAまたはタンパク質レベルを測定し、健康な対象から得たEX33mRNAまたはタンパク質のレベルと比較することを含む。EX33の異常レベルは、異常型EX33活性の指標であるようである。他の実施態様において、本方法は、EX33の少なくとも一つの活性を、例えば後記のような細胞内Ca²⁺の測定により測定し、健康な対象から得た結果と比較することを含む。

【0040】

好中球関連炎症性疾患の阻害または逆転における本発明の薬剤の効果は、疾患のモデル、例えばラットまたはマウスにおけるリポポリサッカライド誘導肺炎症モデル、または、Durie et al., Clin. Immunol. Immunopathol. (1994) 73: 11-18; and Williams et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 9784-9788に記載のモデルにおいて証明し得る。

【0041】

本発明の薬剤は、任意の適当な経路で、例えば錠剤またはカプセルの形で、例えば経口；非経腸的、例えば静脈内；局所的、例えば軟膏またはクリームで；経皮的、例えばパッチで；吸入により；または経鼻的に投与し得る。

【0042】

本発明の薬剤を含む医薬は、慣用の希釈剤または賦形剤、およびガレヌス技術において既知の技術を使用して製造し得る。したがって、経口投与形は錠剤およびカプセルを含み、吸入用組成物はエアロゾルまたは他の噴霧可能製剤または乾燥粉末製剤を含み得る。

【0043】

本発明は、(i)吸入可能な形、例えば、エアロゾルまたは他の噴霧可能組成物の、または吸入可能粒子、例えば、微細形の本発明の薬剤(A)、(B)、(C)、(D)、または(E)、(ii)吸入可能な形の本発明の薬剤を含む吸入用医薬；(iii)このような吸入可能な形の本発明の薬剤を含む、吸入デバイスと関連させた医薬製品；および(iv)吸入可能な形の本発明の薬を含む、吸入デバイスを含む。

【0044】

本発明の実行に用いる本発明の薬剤の投与量は、もちろん、例えば、処置する特定の状態、所望の効果および投与の形態に依存する。一版に、吸入における投与のための適当な一日投与量は、 $1 \mu\text{g}$ から $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であるが、経口投与の適当な一日投与量は、 0.1mg から $1000\text{mg}/\text{kg}$ 。

【0045】

前記のポリペプチド(A)は、その活性の促進剤(アゴニスト)または阻害剤(アンタゴニスト)の同定に、すなわち、好中球関連炎症性疾患の処置に有用な化合

物の同定に使用できる。したがって、本発明はまた、候補物質とポリペプチド(A)を合わせ、候補物質の該活性における影響を測定することを含む、好中球関連炎症性疾患の処置への使用に適した、ポリペプチド(A)の活性を調節する物質の同定法を提供する。ポリペプチド(A)の活性は、例えば、細胞内 Ca^{2+} またはcAMP(サイクリックAMP)レベルの測定により、または形の変化により、または適当なレポーター遺伝子アッセイにより測定し得る。本発明はまた候補物質とポリペプチド(A)を合わせ、結合が起こるか否かを測定することを含む、ポリペプチド(A)に結合する好中球関連炎症性疾患の処置への使用に適した物質の同定法も含む。

【0046】

上記のスクリーニング法は、例えば、その表面にポリペプチド(A)を発現する細胞、例えば昆虫、哺乳類または酵母細胞を調製し、ついで、得られた細胞候補物質とインキュベートして、ポリペプチド(A)の機能的活性の促進または阻害を、または候補物質へのポリペプチド(A)の結合を測定することにより行ない得る。

【0047】

本発明が適用できる好中球関連炎症性疾患は、好中球関連炎症性または閉塞性気道疾患、特に慢性気管支炎および気腫を含む慢性閉塞性肺疾患(COPD)、および成人(または急性)呼吸窮迫症候群(ARDS)、関節リウマチおよびクーロン病および潰瘍性大腸炎のような炎症性大腸疾患を含む。

【0048】

本発明を、以下の実施例により説明する。実施例で使用する略語は、以下の意味を有する：

BLAST：ベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール

BSA：ウシ血清アルブミン

cAMP：環状アデノシンーリン酸

DTT：ジチオスレイトール

EDTA：エチレン - ジアミン四酢酸

EIA：酵素面計アッセイ

EST : 発現配列タグ

FCS : ウシ胎児血清

GM-CSF : 顆粒球マクロファージ刺激因子

GPCR : G - プロテイン結合レセプター

HEPES : 4 - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸

IPTG : イソプロピル - b - D - チオガラクトピラノシド

IL1 : インターロイキン 1

MOI : 感染多重度

PBS : リン酸緩衝化食塩水

PEG : ポリエチレングリコール

PBMC : 末梢血単核細胞

PCR : ポリメラーゼ連鎖反応

PMSF : フェニルメチルスルホニルフウロリド

SDS-PAGE : ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

TNF : 腫瘍壊死因子

【0049】

実施例 1

血液(200ml)を、クエン酸ナトリウムを含む試験管に、滅菌条件下で呼吸器疾患の病歴のない正常ドナーから集める。好中球を確立された方法で精製する。PBMCを、末梢血細胞から、Ficoll Hypaque(pharmacia)遠心により分離する。主に顆粒球および赤血球である残りの細胞集団を、赤血球融解溶液で(155 mM NH_4Cl 、10 mM KHCO_3 、0.1 mM EDTA、PH 7.3)で処理する。純度を測定するために、顆粒球をHansel染料(Difco laboratories LTD)で染色し、高倍率の顕微鏡で差別化した。好酸球の汚染は2%未満であることが分かる。刺激のために、好中球を500万細胞/mlの濃度で、RPMI - 1640 + 10% FCSに再懸濁する。細胞を、5時間、50 ng/mlヒト組換えGM-CSF(R&D System)の存在下または非存在下で培養する。好中球の上皮性シグナルを介した刺激のために、ヒト一次気管支上皮細胞(Clonetics)を、70 - 80%コンフルエントまで増殖させ、TNF (100 ng/ml)およびIL -

1 (100 ng/ml)と同時に48時間刺激した。ついで、新たに単離した好中球を、上皮培養物に、または、コントロールとして、新鮮培地に直接添加する。5時間のインキュベーション後、好中球を注意深く上皮単層から洗い出し、分析のために回収する。総RNAを、製造者の記載の通りTRIzol試薬(Gibco/BRL)を使用して抽出する。1mlのTRIzolを、各500万個のペレット化好中球の再懸濁に使用する。mRNAを、MESSAGEMAKER mRNA単離キット(Gibco/BRL)を使用して、製造者が推奨する条件を使用して精製する。300 ngのmRNAを、Superscript Choice System(Gibco/BRL)を使用したcDNAの合成に使用する。一本鎖および二本鎖cDNAを、製造者により提供された条件を使用して作る。

【0050】

得られたcDNAサンプルを、GPCR遺伝子フラグメントの増幅の鋳型として使用する。

【0051】

実施例2

本実施例は、EX33 cDNAクローンの単離を記載する。

縮重オリゴヌクレオチドPCRを、プライマー(配列番号3-6)およびコプライマー、およびPowers et al., J. Exp. Med. (1997) 186:825-835により記載の条件を使用して行なう。実施例1で得た100 ngの一本鎖cDNAを、100 μl反応混合物のシードに使用し、40サイクルのPCR(95 で1分、37 で1分、および72 で1分)に、3 μMの各縮重オリゴヌクレオチドプライマー:

前向きプライマー: 1:1混合物のGAY MGI TAY YTI GCI
ATH GTI CAおよび

GAY MGI TAY YTI GCI ATH GTC CA

後向きプライマー: 1:1混合物のRMR TAI ADI AII GGR
TTI AIR CAおよび

RMR TAI ADI AII GGR TTI ACR CA

を使用して、Perkin-Elmer DNAサーマル・サイクラー(Gene Amp PCR System 240

0)中で付す。PCR反応産物を、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 臭化エチジウム含有1%アガロースゲル上で可視化する。約10ngの増幅産物を、25ng pCR2.1ベクター(TA Cloning Kit, Invitrogen)とライゲートし、ライゲーションを $50 \mu\text{l}$ One Shot(登録商標)コンピテント細胞(Invitrogen)中に挿入する。ライブラリーを、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カルベニシリンならびに100mM IPTGおよび $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ X-Galを含む寒天プレートにプレーティングする。プレートを、37°Cで一晩、ついで短く4°Cでインキュベートし、青色/白色染色が明らかに識別できるようにする。白色コロニーを、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カルベニシリンを含む200 μl のLB-ブロスに精選し、一晩インキュベートする。クローンからの挿入物を、培養物から、pCR2.1ベクターのT7およびSp6部位に対応するプライマーを使用して増幅し、1.5%アガロースゲルで電気泳動する。予測したサイズ(500 - 550 bp)の増幅挿入物を、そのヌクレオチド配列を、自動ABI310シーケンサー(Perkin-Elmer)で、M13後向きおよび前向きプライマーを使用して決定することにより分析する。得られた配列を、配列類似性探索において、BLASTアルゴリズムを使用して分析し、配列アラインメントをGC Gソフトウェアパッケージ(Wisconsin Package Version 9.1)を使用して行なう。EX33と呼ばれるクローンを、GPCR遺伝子由来の挿入物を含むとして同定する。完全長EX33遺伝子を次いでRACE(cDNA末端の急速増幅)により単離する。EX33遺伝子の5'および3'末端を、末梢血白血球から単離したcDNAを使用して得、遺伝子-特異的プライマーを、EX33クローン中の挿入物の配列を使用して設計する。プライマー配列は、配列番号7および8に示す。RACEは、Life Technologiesの5'RACEシステムキットおよび3'RACEシステムキットを、製造者の指示の通り使用して行う。増幅産物を、両方の鎖におけるそのヌクレオチド配列を、ABI310シーケンサー(Perkin-Elmer)上で、M13後向きおよび前向きプライマーならびに遺伝子特異的プライマーを使用して分析する。得られた配列を分析し、配列連続(contig)を、GC Gソフトウェアパッケージ(Wisconsin Package Version 9.1)を使用して得る。得られたcDNA配列連続を配列番号1に示す。

【0052】

実施例3

本実施例は、種々の組織および細胞タイプにおけるEX33遺伝子の細胞性発現の分布のノーザン・ブロット分析およびRT-PCRによる分析を記載する。

【0053】

ノーザン・ブロット分析に関して、種々の組織から単離した20ugの総RNAを、1%変性ホルムアルデヒドアガロースゲルで4時間電気泳動することにより分離する。RNAをHybond N膜(Amersham)に、キャピラリートランスファーにより移し、フィルターにUV架橋させる。あるいは、予め作られた複数の組織のノーザン・ブロット(Clontech)を使用する。プローブを作成するために、EX33含有プラスミド(実施例4)を、EcoRIおよびXbaIで消化させ、サブクローンの1.2kbp挿入物を、1%低融点アガロースゲルから単離する。プローブを、[γ -³²P]dATP(Amersham)の存在下の25ng DNAの無作為プライミングにより標識する。ハイブリダイゼーションを、一晚、ExpressHybハイブリダイゼーション溶液(Clontech)中で、65℃で行なう。次いで、ブロットを2×SSC、0.05%SDSで20分室温で洗浄し、次いで、20分、0.1×SSC、0.1%SDSで50℃で洗浄する。フィルターをホスホロイメージャープレートに2時間から5日間の間曝し、STORM 840 PhosphorImager(Molecular Dynamics)で可視化する。同じノーザンブロットをまたGAPDHプローブとハイブリダイズし、充填のためにコントロールする。EX33は、組織限定パターンで発現され、例えば、骨髄、肺および末梢血では豊富であるが、例えば、脳、腎臓または肝臓ではない。

【0054】

ヒト末梢血白血球の中のEX33発現を測定するために、種々の白血球を、血液から標準法により分離する。例えば、末梢血単核細胞(PBMC)を顆粒球および赤血球から、Ficoll Hypaque(Pharmacia)遠心により、実施例1に記載のように分離し、TおよびB細胞を、PBMCからMACS(時期補助細胞ソーター、Miltenyi Biotec)により単離する。RNAを、実施例1に記載のように種々の血液細胞タイプから単離する。RT-PCR分析を行ない、白血球の中のEX33の発現を測定する。EX33は優勢的に白血球の中で発現され、好中球および好

酸球のような顆粒球で強く発現されるが、TまたはBリンパ球ではない。

【0055】

実施例4

本実施例は、肺におけるEX33遺伝子の細胞性分布の、イン・シテュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学による分析を記載する。

【0056】

標識リボプローブを生成するために、pCR4-TOPOプラスミド(Invitrogen)のEcoRIおよびXbaI部位の間に1.2 kbp挿入物を含むサブクローンを構築する。このサブクローンの挿入物は、下記実施例5の挿入物と同一であり、同じ方法で製造される。この構築物中に、ベクター中のT3プロモーターを使用して、イン・シテュハイブリダイゼーション実験におけるプローブとして使用できる挿入物のアンチセンス鎖を転写する。ベクター中のT7プロモーターは、ネガティブコントロールとして使用するセンス鎖を転写するのに使用する。パラフィン包埋および凍結ハイ組織サンプルからの連続組織切片を、1.2 kb挿入物から合成した放射標識cRNAプローブとハイブリダイズする。リボプローブを、³³P-ウリジン5'-トリホスフェートと、T3(アンチセンス)およびT7(センス)RNAポリメラーゼの存在下、インビトロで転写する。プローブを次いでカラム精製し、次いで5%TBE-尿素アクリルアミドゲルでの電気泳動に浮子、サイズおよび純度を確認する。組織切片をプロテイナーゼKで消化し、プローブと約 8.0×10^8 dpm/mlで、65°Cで18時間ハイブリダイズする。スライドをRNase Aで処理し、徹底的に(stringently)2時間、 $0.1 \times$ SSC中で65°Cで洗浄する。スライドを、次いでKodak NTB-2エマルジョンで被覆し、7日間、4°Cで曝し、Kodak D-19現像液および定着液を使用して現像する。スライドをヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、Nikonマイクروسコープに接続したSony Digital Photo Cameraを使用して写す。アンチセンスプローブとのハイブリダイゼーションに加えて、別のセクションをコントロールプローブの二つのタイプとハイブリダイズする。全ての組織を、最初に、ベータ-アクチンmRNAに対するプローブとスクリーニングし、RNAがサンプル内に保存されていることを確認する。隣接連続セクションはまたアンチセンスプローブとして

の遺伝子の同じ領域由来のセンスコントロールリボプローブとハイブリダイズをする。

【0057】

像を評価し、E X 3 3 遺伝が肺胞マクロファージおよび好中球に優勢に発現されることが判明する。

E X 3 3 タンパク質の発現を、次いで、免疫組織化学により標準法を使用して試験する。実験を、上記のイン・シテュハイブリダイゼーションに関するものと類似の組織切片で、実施例7に記載のように生成したポリクローナル抗体を使用して行なう。タンパク質発現を、好中球およびマクロファージで検出し、イン・シテュハイブリダイゼーション実験の結果を確認する。

【0058】

実施例5

本実施例は、哺乳類発現系における、完全長機能的E X 3 3の、安定なトランスフェクションを使用した発現およびE X 3 3 タンパク質の天然リガンドまたは人工アゴニストの同定のためのトランスフェクト細胞の使用に関する。

【0059】

発現ベクターの構築

独特なE c o R Iを、E X 3 3 開始コドン(A T G)の5'に、P C R 増幅により以下のプライマー：

5' - C T C A G A A T T C A T C A T G T G G A A C A G C T C T G A C G C
- 3'

を使用して挿入する。他のプライマーを使用して、E X 3 3の停止コドン(T A G、逆相補：C T A)に対して3'の独特なX b a I(T C T A G A)部位に挿入する。

5' - T G G T G T C T A G A G T C A C A G T T C T A A T G G A G C C - 3'

組換増幅産物を、E c o R IおよびX b a I制限酵素で消化させ、1213bpフラグメントとしてE c o R I / X b a I消化p c D N A 3.1(+)(Invitrogen)哺乳類発現ベクターにライゲートし、E. coli DH5 細胞に形質転換する。形質転換体を、p c D N A 3.1(+)に存在するアンピシリン耐性遺伝子の存在を使

用して選択し、EX33挿入物を含むベクターを、無作為に選択したコロニーからプラスミドを単離し、プラスミドを制限消化およびアガロースゲル電気泳動により、標準法を使用して同定する。

【0060】

哺乳類細胞中のEX33の安定な発現

プラスミドベクター含有組換えEX33挿入物を、次いで、CHO-K1細胞にトランスフェクトする。10% FCSおよび2 mMグルタミン含有ダルベッコ修飾イーグル培地 / Ham's f12 (50 : 50) で増殖させたCHO細胞のコンフルエントなフラスコをトリプシン処理し、1 : 20 希釈で、6 ウェルプレートの2 ウェルに2 ml / ウェルの同じ培地中でプレーティングする。細胞を次いで24時間、37 °C で5% CO₂ で培養する。翌日、トランスフェクション混合物を調製する。1 µg プラスミドDNAを、各ウェルに関して100 µl OptiMEM無血清培地(Life Technologies)に混合する。各ウェルで10 µl リポフェクタミンを100 µl OptiMEM中に、別の試験管で希釈する。2つの溶液を混合し、15分、室温でインキュベートする。インキュベーション中、細胞をOptiMEMで洗浄して血清を除去する。0.8 ml / トランスフェクションの無血清OptiMEMを、DNA - リポソームトランスフェクション混合物に添加し、1 mlのその溶液を次いで各ウェルに添加する。コントロール細胞を同様の方法で、但しプラスミドDNAをトランスフェクション混合物から除いて処理する。細胞を次いで、5時間、37 °C で5% CO₂ でインキュベートし、次いでトランスフェクション混合物を2 ml通常増殖培地と置きかえる。24時間後、トランスフェクタントを、細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、それらをT75フラスコに1 mg / ml G418 (Life Technologies)と共に再プレーティングすることにより選択する。細胞を次いで37 °C で5% CO₂ で、コントロールフラスコの細胞が死ぬまで培地を2日毎に定期的に変えてインキュベートする。次いで、細胞を、96ウェルプレートの個々のウェルにそれらを1細胞 / ウェルの密度にプレーティングし、それらをコンフルエンスまで増殖させることにより希釈クローン化する。細胞の更なる拡張後、個々のコロニーを、RT-PCRによりおよびEX33タンパク質に対して発生させたポリ - またはモノクローナル小

唄を使用してE X 3 3の発現に関してスクリーニングする。

【0061】

天然リガンドおよびアゴニストの細胞内カルシウムアッセイを使用した同定

E X 3 3レセプタータンパク質を安定に発現する細胞系および非トランスフェクトコントロールを、T 1 6 2フラスコでコンフルエントまで増殖させ、トリプシン処理し、適当な容量、約50mlの抗生物質を含まない増殖培地に再懸濁する。細胞を30,000細胞/ウェルで、100 μ l/ウェルで96-ウェルプレートに蒔き、これは翌日のアッセイ時にコンフルエント単層の形成をさせる。24時間後、細胞を、20mM HEPESおよび2.5mMプロベネシッド含有100ml細胞培地中の細胞質性カルシウムインディケーターFluo-3-AM(4mM)と37で60時間インキュベートする。細胞を4回、20mM HEPESおよび2.5mMプロベネシッド含有PBSで洗浄し、100mlのその溶液を次いで各ウェルに添加する。天然リガンドおよび合成ライブラリー由来オンコレクションからの試験化合物を、細胞に添加し、フルオレッセントシグナルを最初の60秒間は毎秒、次の30秒間は5秒毎に読む。天然または合成アゴニストは、E X 3 3発現およびコントロール細胞における同じ化合物により生成されるシグナルのレベルの比較により同定する。

【0062】

実施例6

本実施例は、ATG開始コドン後に6ヒスチジンタグを有する完全長E X 3 3の、Spodoptera frugiperda Sf9細胞中のバキュロウイルス系を使用した発現、および得られたポリペプチドの生成に関する。

【0063】

組換えE X 3 3バキュロウイルスの構築

独特なE c o R I部位を、E X 3 3開始コドン(ATG)の5'に、PCR増幅により、以下のプライマー：

5' - CTCAGAA T T C A T C A T G T G G A A C A G C T C T G A C G C
- 3'

を使用して挿入する。他のプライマーを使用して、E X 3 3の停止コドン(TA

G、逆相補：C T A)に対して3'の独特なX b a I (T C T A G A)部位に挿入する。

5' - T G G T G T C T A G A G T C A C A G T T C T A A T G G A G C C - 3'
組換え増幅産物を、E c o R IおよびX b a I制限酵素で消化させ、1213bpフラグメントとしてE c o R I / X b a I消化pFastbac(登録商標)HTaバキュロウイルストランスファーベクター(Life Technologies)にラゲートする。この構築物において、E X 3 3 遺伝子は、E X 3 3 コード領域が6 x H i s 親和性タグ、続くT E Vプロテアーゼの認識部位および更なる7アミノ酸リンカー領域の後に置かれるため、融合タンパク質として発現される。6 x H i s タグを含むE X 3 3 融合タンパク質は、親和性生成を助け、T E Vプロテアーゼ開裂部位は、6 x H i s タグの除去に使用する。組換えE X 3 3 配列をD H 1 0 B a c 細胞(Life Technologies ; Bac to Bacバキュロウイルス発現系)により担持されるBacmid DNAに転位させる。E X 3 3 組換えB a c m i d s をD H 1 0 B a c 細胞から単離し、転位をP C R分析により確認する。

【0064】

S f 9細胞の組換えE X 3 3 Bacmid DNAでのトランスフェクションおよび組換えバキュロウイルスストックの増幅

組換えE X 3 3 Bacmid DNAを、S f 9細胞に公開されたプロトコールを使用してトランスフェクトする(Bac to Bacバキュロウイルス発現系マニュアル ; Life Technologies)。組換えバキュロウイルスを培養培地から27で3日後に培養培地から回収する。細胞上清を、5分、500 x gの遠心により浄化し、4で保つ。組換えバキュロウイルスを、S f 9細胞(SF900 SFMII培地 ; Life Technologies)を、 1×10^6 細胞/mlの密度および感染多重度(MOI)が0.01で48時間、感染させることにより増幅した。S f 9細胞を次いで1000 x gで5分間、遠心する。高力価ウイルスを含む上清を4で貯蔵する。

【0065】

組換えE X 3 3のS f 9細胞中での発現

2×10^5 および 3×10^6 細胞/mlの間の密度で、S F 9 0 0 S F M I I 培地 ; Life Technologies)中に、シェーカーフラスコ(90RPMで回転)または

スピナーフラスコ(75RPMで回転)のいずれかで維持しているSf9細胞を、増幅組換えバキュロウイルスで、 1.5×10^6 の細胞密度でMOIが2.0で60時間感染させた。続いて、感染Sf9細胞を1000×gで5分遠心し、上清を注ぎ出し、細胞ペレットを-80℃で凍結させる。

【0066】

粗融解物調製

細胞(1×10^9)を、100ml融解緩衝液(20mM HEPES pH 7.9、100mM NaCl、5%グリセロール、2mM E-メルカプトエタノール、0.5mM イミダゾール、0.1%Nonidet P-40、40pg/ml AEB SF、0.5pg/ml ロイペプチン、1pg/ml アプロチニンおよび0.7pg/ml ペプスタチンA)に再懸濁する。細胞を、氷上で15分インキュベートし、次いで39,000×gで30分、4℃で遠心する。

【0067】

金属キレート親和性クロマトグラフィー

金属キレート親和性クロマトグラフィーを、室温で、BioCADクロマトグラフィーワークステーションに接続したカラムで行なう。20ml Poros MC/M(16mmD×100mmL)カラムをNi²⁺で、使用前および各注入後に満たす。Ni²⁺で満たすために、カラムを10カラム容量(CV)の50mM EDTA pH 8、1M NaCl、続いて10CV水で洗浄する。カラムを、500ml 0.1M NiSO₄ pH 4.5-5で満たし、10CV水で洗浄し、次いで任意の非結合Ni²⁺を、5CV 0.3M NaClでの洗浄により除去する。全ての段階を20ml/分の流速で行なう。満たしたMC/Mカラムを、5CV緩衝液B(20mM HEPES pH 7.9、100mM NaCl、5%グリセロール、2mM E-メルカプトエタノール、1mM PMSF、100mM イミダゾール)で平行化し、部位を飽和させ、続いて10CV緩衝液A(0.5mM イミダゾール以外、緩衝液Bと同じ)で満たす。ラン当たり90-95mlの粗融解物を、20ml/分の流速で、カラムに充填する。続く段階を、30ml/分の流速で行なう。任意の非結合物質を12CV緩衝液Aでの洗浄により除去し、EX33は0-50%緩衝液Bの10CVにわたる勾配で

溶出する。フラクション(8ml)を勾配にわたり集める。EX33含有フラクションを合わせ、プロテアーゼ阻害剤を、上記融解緩衝液に関して記載の最終濃度まで添加する。DTTも最終濃度1mMまで添加する。合わせたフラクションを、一晩、4リットルの20mM HEPES pH 7.9、1mM DTT、0.2mM PMSFに対して4で透析する。タンパク質濃度を測定し、必要な場合、サンプルをMillipore Ultrafree-15遠心デバイス(MWカットオフ50kDa)で4で濃縮する。デバイスは、使用前に水で濯ぐ。-80で長期貯蔵に使用する緩衝液は、20mM HEPES pH 7.9、1mM DTT、~100mM NaCl、5%グリセロールである。グリセロールを4での貯蔵のためにサンプルから除くことができる。

【0068】

実施例7

本実施例は、EX33タンパク質に対するポリクローナル抗体の生成に関する

【0069】

免疫化

ウサギを、皮下部位4箇所を、500 μ g生成EX33タンパク質で以下のスケジュールにしたがって免疫化する：

【表1】

日	免疫化
0	最初の免疫化フロイド完全アジュバント中1:1
15	最初の追加免疫フロイド不完全アジュバント中1:1
45	2回目の追加免疫フロイド不完全アジュバント中1:1
55	耳動脈からの最初の試験採血
毎月	良好な抗体応答が得られるまで、フロイド不完全アジュバント中1:1の追加免疫

【0070】

試験採血(500 μ l)を取り、血清を抗体力価に関して評価する。血清を、最

大力価が得られたときに回収する。これは、血液を取り(10ml)、それを2時間、4℃で凝血させることにより行なう。血液を1000×gで5分遠心し、血清を分離する。血清を除去し、アッセイまで-20℃で貯蔵する。

【0071】

ELISAスクリーニング

Nunc-Immuno Plate Maxisorp 96ウェルプレート(Nunc, Basle, CH)を固体し自体として使用し、精製EX33タンパク質(100ng/ウェル)で4℃でコーとする。プレートを3時間、37℃で2%BSA(Sigma)および0.02%NaN₃(Sigma)含有PBSで遮断する。遮断後、プレートを一晚室温で、異なる希釈のPBSと共にインキュベートする。ポリクローナル高体温存在を、ウサギに対するビオチン標識IgG-抗体(ヤギ抗-IgG抗血清、1:25000希釈)で、40分のインキュベーション時間でチェックする。アルカリホスファターゼ接合ストレプトアビジン(Immuno Research, Dianova, CH)を、次いで1:10000の希釈で添加する。反応の展開を、ジエタノールアミンに溶解したホスフェート基質(Sigma, f.c. 1mg/mlの添加により行なう。45分後、405nmの吸光度を490nmを参照して、ELISAプレートリーダー(Biorad)で読む。

【0072】

ポリクローナル抗体の精製

5mlタンパク質A-アガロースを、クロマトグラフィーカラムに注ぎ、6カラム容量の0.1Mトリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン(Tris)緩衝液pH 7.5で洗浄する。抗-EX33抗体を含むウサギ血清を、Tris緩衝液で希釈(1/2)し、タンパク質A-アガロースを添加する。非結合タンパク質を、6容量のTris緩衝液でカラムを洗浄することにより除去する。IgGは、3カラム容量の0.1Mグリシン緩衝液pH 3.0でカラムから溶出し、1mlフラクションとして28µlの1M Trisを含む試験管に回収する。タンパク質含有に関して陽性のフラクションを、純度に関してSDS-PAGEで、還元条件下チェックする。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖に対応する50および25Kdの二つのバンドを可視化する。免疫グロブリンのみを含むフラクションをプールし、タンパク質濃度に関して再チェックし、-20℃で貯蔵する。

【0073】

実施例8

この実施例は、EX33タンパク質に対するモノクローナル抗体の生成に関する

【0074】

免疫化

雌Balb/cマウスを、腹腔内(ip)で100 μ gのEX33タンパク質で下記のスケジュールにしたがって免疫化する：

【表2】

日	免疫化
1	最初の免疫化フロイド完全アジュバントと1：1
14	最初の免疫化フロイド完全アジュバントと1：1
21	2日目の免疫化フロイド完全アジュバントと1：1
28-30	PBS中、3回の最後の塚免疫
31	マウスミエローマ細胞との融合

【0075】

血清を、抗体力価に関して、動物を融合のための脾臓細胞の調製のために殺した後、ELISA(実施例7)で評価する。抗体力価が不十分な場合、(1/1000から1/100,000)、ハイブリドーマをスクリーンするか、そうでなければ棄てる。

【0076】

ミエローマ細胞の調製

Sp2/0マウスミエローマ細胞(ATCC #CRL 1581; 20 μ g/ml 8-アザグアニン含有培養培地に維持)を、融合前に1週間、RPMI 1640(8-アザグアニン含まない)、10%(v/v)FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン(各々50IU/mlおよび50 μ g/ml)中で培養する。細胞を遠心(200 \times g、5分)で回収し、3回冷RPMI 1640で洗浄す

る。約 2.5×10^6 細胞を、96 ウェルマイクロタイタープレート当たり使用する。

【0077】

脾臓細胞懸濁液の調製

マウスを麻酔(Forene)の過投与により殺し、脾臓を解剖し、細胞ストレイナー(70 μ mメッシュ細胞ストレイナー; Becton & Dickinson, Oxford, UK, Cat. No. 2350)を通して圧縮する。細胞懸濁液をRPMI 1640で3回洗浄し(上記の通り)、計数する: 5.10^6 細胞/96 ウェルプレートが必要である。

【0078】

ミエローマ細胞および脾臓細胞の融合

脾臓およびミエローマ細胞を混合し(2:1)、遠心し(200 \times g、5分)、ペレットを37 $^{\circ}$ C水浴で暖める。予め暖めたポリエチレングリコール4000(1ml/10⁸細胞)を、1分間にわたりゆっくり添加し、次いで20mlの予め暖めた培地を2分間にわたり添加する。遠心後、ペレットを注意深く選択培地(RPMI 1640、10% FCS、1% ペニシリン - ストレプトマイシン、10% BM conditioned H1(Boehringer Mannheim, Lewes, UK; Cat. No. 1088947からの支持細胞置換)、10% HAT - 培地添加物(非融合ミエローマ細胞に対して選択するためのヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン細胞; Boehringer Mannheim, Lewes, UK; Cat. No. 644579)に再懸濁し、200 μ l/ウェルの96 ウェルマイクロタイタープレートにプレーティングする。

【0079】

5日間の後、ハイブリッド細胞のクラスターは、マイクロタイターウェルの底を倒立顕微鏡で試験することにより同定できる。10 - 14日後、培養上清を抗体の存在に関してELISA(実施例7)で試験する。陽性クローンを24ウェルアッセイプレートに拡張し、再試験する。

【0080】

陽性ハイブリドーマのクローニング

まだ陽性である拡張クローンを、限定希釈によりクローン化する。細胞を、連続的に4希釈段階で96ウェルマイクロタイタープレートで希釈する; 5、2、

1 および 0.5 細胞 / ウェル。HAT - 培地添加物を、HT - 培地添加物 (Boehringer Mannheim, Lewes, UK; Cat. No. 623 091) で置きかえる。約 1 週間後、細胞を ELISA (実施例 7) でスクリーニングする。一陽性クローンを含むこれらのウェルの細胞は、拡張される。

【0081】

モノクローナル抗体上清の製造

細胞を、培養フラスコで、標準培地 (RPMI 1640、10% (v/v) FCS および 1% ペニシリン - ストレプトマイシン) でハイブリドーマが過増殖し、死ぬまで増殖させる。残骸を遠心により除去し、抗体を ELISA (実施例 7) を使用した力価で力価測定し、その後滅菌条件下で 4℃、-20℃ または -70℃ で貯蔵する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG et al

<120> Disease-related Gene

<130> 4-31328A/HO 26

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1595

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ccatcctaag aggactcact atagggctcg agcggccgcc cgggcaggtt aactgtccac 60
cagaaaggac tgctctttgg gtgagttgaa cttcttccat tatagaaaga attgaaggct 120
gagaaactca gcctctatca tggggaacag ctctgacgcc aacttctcct gctaccatga 180
gtctgtgctg ggctatcggt atgttgagc tagctggggg gtgggtgggtg ctgtgacagg 240
caccgtgggc aatgtgctca cctactggc cttggccatc cagcccaagc tcogtaccgg 300
attcaacctg ctcatagcca acctcacact ggctgatctc ctctactgca cgctccttca 360
gcccttctct gtggacacct acctccacct gcaactgggc accggtgcca ccttctgcag 420
ggtatttggg ctctcctttt ttgcttccaa ttctgtctcc atcctgacct tctgcctcat 480
cgcaactggga cgctacctcc tcattgccc aacctaaagt ttcccccaag ttttcagctg 540
caaggggata gtgctggcac tggtagcac ctgggtgtgt ggcgtggcca gctttgctcc 600
cctctggcct atttatatcc tggtagcctg agtctgcacc tgcagctttg accgcatccg 660
aggccggcct tacaccacca tcctcatggg catctacttt gtgcttgggc tcagcagctg 720
tggcatcttc tattgcctca tcaccggcca ggtcaaacga gcagcacagg cactggacca 780
atacaagttg cgacaggcaa gcatccactc caacctgtgt gccaggactg atgaggccat 840
gcctggctgt ttccaggagc tggacagcag gttagcatca ggaggacca gtgaggggat 900
ttcatctgag ccagtcagtg ctgccaccac ccagaccctg gaaggggact catcagaagt 960
gggagaccag atcaacagca agagagctaa gcagatggca gagaaaagcc ctccagaagc 1020
atctgcaaaa gccagccaa ttaaaggagc cagaagagct ccggattctt catcggatt 1080
tgggaagggt actcgaatgt gttttgctgt gttctctctg tttgccctga gtacatccc 1140
cttcttctg ctcaacattc tggatgccag agtccaggct ccccggttgg tccacatgct 1200
tgctgccaac ctcaacctgg caaatggttg catcaacct gtgctctatg cagccatgaa 1260
ccgccaatcc cgccaagcat atggctccat tttaaaaaga gggccccgga gtttccatag 1320
gtccatttag aactgtgacc ctagtacca gaattcagga ctgtctctcc caggaccaa 1380
gtggccaggt aataggagaa taggtgaaat aacacatgtg ggcattttca caacaatctc 1440
tcccagcct cccaaatcaa gtctctccat cactgatca atgtttcagc cctagactgc 1500
ccaaggagta ttattaatta ttaataaatg aattctgtgc ttttaaaaaa aaaaaataa 1560
aaaaagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1595

```

<210> 2

<211> 396

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

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

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> modified_base
 <222> 6, 12, 15, 21
 <223> n is inosine

<400> 3
 gaymgntayy tngcnathgt nca

23

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> modified_base
 <222> 6, 12, 15
 <223> n is inosine

<400> 4
 gaymgntayy tngcnathgt cca

23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> modified_base
 <222> 6, 9, 11, 12, 18, 20
 <223> n is inosine

<400> 5
 rmrtanadna nnggrttan rca

23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> modified_base
 <222> 6, 9, 11, 12, 18
 <223> n is inosine

<400> 6
 rmrtanadna nnggrttnac rca

23

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7 gcaaagcaga ggaacacagc aaac	24
<210> 8 <211> 22 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 8 gccaaagccc agccaattaa ag	22
<210> 9 <211> 33 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 9 ctcagaattc atcatgtgga acagctctga cgc	33
<210> 10 <211> 31 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 10 tgggtgtctag agtcacagtt ctaatggagc c	31
<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 11 gactcactat agggctcgag	20
<210> 12 <211> 22 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 12 attgatcaag tgatggagag ac	22
<210> 13 <211> 19 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 13 cacactggct gatctctc	19
<210> 14 <211> 19 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 14 gggatgtagc tcagggcaa	19

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Intern. Appl. No. PCT/EP 01/02462
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K14/705 A61P11/00	C12N15/12 A61P1/00
	C12N15/11 A61P19/00	C12Q1/68 A61K38/17
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 853 125 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 15 July 1998 (1998-07-15) abstract page 3, line 10-23 page 5, line 45 -page 11, line 12 SEQ.ID.N.1 and 2	1-6, 8-13,15
X	DATABASE EMBL 'Online! EMBL:AI916192, 30 July 1999 (1999-07-30) Database accession no. AI916192 XP002179733 wi49c02.x1 NCI_CGAP_Co16 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2393570 3', mRNA sequence. EST. "National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP)". abstract	1-6, 9-11,15
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *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 *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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 October 2001		Date of mailing of the international search report 24/10/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentleeen 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tk. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/02462

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EMBL:AI392922, 5 February 1999 (1999-02-05) Database accession no. AI392922 XP002179734 tg10g11.x1 NCI_CGAP_CLL1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2108420 3', mRNA sequence. EST. "National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP)". abstract</p>	1-6, 9-11,15
A	<p>THOMAS K M ET AL: "THE INTERLEUKIN-8 RECEPTOR IS ENCODED BY A NEUTROPHIL-SPECIFIC COMPLEMENTARY DNA CLDNE F3R" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 23, 1991, pages 14839-14841, XP001024822 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1,7
A	<p>DURIE F H ET AL: "COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS AS A MODEL OF RHEUMATOID ARTHRITIS" CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 73, no. 1, October 1994 (1994-10), pages 11-18, XP001024215 ISSN: 0090-1229 cited in the application the whole document</p>	1,7
P, X	<p>DATABASE EMBL 'Online! SWALL:Q9NQS5, 1 October 2000 (2000-10-01) Database accession no. Q9NQS5 XP002179735 INFLAMMATION-RELATED G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR EX33 (ORPHAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 84). EX33 OR GPR84. Homo sapiens abstract</p>	1-6, 9-11,15
P, X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EMBL:AF237762, 8 February 2001 (2001-02-08) Database accession no. AF237762 XP002179736 Homo sapiens orphan G protein-coupled receptor 84 (GPR84) mRNA, complete cds. Wittenberger et al., J. Mol. Biol. 307(3):799-813(2001). abstract</p>	1-6, 9-11,15

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 01/02462
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>YOUSEFI SHIDA ET AL: "cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 277, no. 2, 22 October 2000 (2000-10-22), pages 401-409, XP002179732 ISSN: 0006-291X the whole document</p>	1
T	<p>YOUSEFI SHIDA ET AL: "Cloning and expression analysis of a novel G-protein-coupled receptor selectively expressed on granulocytes." JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 69, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 1045-1052, XP001031812 ISSN: 0741-5400 the whole document</p>	1-15

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 8 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim(s) 9 and 10 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/02462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0853125	A	US 5976834 A	02-11-1999
		EP 0853125 A2	15-07-1998
		JP 10243788 A	14-09-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト'(参考)	
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P	11/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P	1/00		11/16	
	11/00		19/02	
	11/16		29/00	
	19/02			1 0 1
	29/00	C 1 2 Q	1/02	
			1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 シダ・ユーセフィ
 スイス、ツェーハー - 3013ベルン、アルテンベルクシュトラッセ50番

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BA13 BB03
BB20 CB01 CB17 CB21 DA12
DA13 DA36 DA77 FB02 FB03
FB04
4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 DA02
EA04 GA11 HA12 HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ12 QQ43
QQ79 QQ91 QR08 QR32 QR56
QR62 QS25 QS34
4C084 AA02 AA06 AA13 BA01 BA08
BA22 BA23 CA53 CA56 DA45
NA14 ZA59 ZA60 ZA66 ZA96
ZB11 ZB15
4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 DD63
EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04
NA14 ZA59 ZA60 ZA66 ZA96
ZB11 ZB15

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003525624A5	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2001565761	申请日	2001-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	ガポールヤライ ポールロイクーパー シダユーセフィ		
发明人	ガポール・ヤライ ポール・ロイ・クーパー シダ・ユーセフィ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/00 A61P11/00 A61P11/16 A61P19/02 A61P29/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 A61K38/00		
CPC分类号	C07K14/705 A61P1/00 A61P11/00 A61P11/16 A61P19/00 A61P19/02 A61P29/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/00 A61P11/00 A61P11/16 A61P19/02 A61P29/00 A61P29/00.101 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045 /CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ12 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063 /QS34 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DA45 4C084/NA14 4C084/ZA59 4C084/ZA60 4C084/ZA66 4C084 /ZA96 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086 /ZA59 4C086/ZA60 4C086/ZA66 4C086/ZA96 4C086/ZB11 4C086/ZB15		
优先权	09/518832 2000-03-06 US		
其他公开文献	JP2003525624A		

摘要(译)

(A) 包含SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽, 或该氨基酸序列的功能等效变体, 或(B) 包含编码该多肽的核苷酸序列的多肽(A), 或(C) 多肽(A) 具有免疫反应性的抗体, 或(D) 核苷酸(B) 包含与其互补的核苷酸序列的反义寡核苷酸, 或(E) 包含(B) 的至少15个连续核苷酸的多核苷酸探针, 用于制造用于诊断或治疗与中性粒细胞相关的炎症疾病的药物。

