

(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2005-503143
(P2005-503143A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027		4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02		4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	Z	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/68	G O 1 N 33/15	Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 140 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2003-517219 (P2003-517219)	(71) 出願人	591011502 ワイス W y e t h アメリカ合衆国07940-0874 ニ ュージャージー州マディソン、ファイブ・ ジラルダ・ファームズ
(86) (22) 出願日	平成14年7月25日 (2002.7.25)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月26日 (2004.1.26)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/023790	(74) 代理人	100116311 弁理士 元山 忠行
(87) 国際公開番号	W02003/012041	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開日	平成15年2月13日 (2003.2.13)		
(31) 優先権主張番号	60/308, 485		
(32) 優先日	平成13年7月27日 (2001.7.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/331, 140		
(32) 優先日	平成13年11月9日 (2001.11.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K v ベータ1. 1サブユニットの非機能性N末端を含んでいるノックイントランスジェニック哺乳動物

(57) 【要約】

本発明により、電圧感受性カリウムチャネルの不完全な 1サブユニット(K v s s 1)(ここで、K v s s 1サブユニットは、K⁺のN型不活性化を付与することができるが、K v 1ファミリー サブユニットと会合し、それによりチャネルの表面発現を高める能力は保持する)を含んでいるトランスジェニック哺乳動物が提供される。好ましくは、K v s s 1サブユニットをコードしているK v s s 1.1遺伝子は、その不活性化ドメインのコドン1-70の全部または部分に変異を有する。トランスジェニック哺乳動物は、不安緩解化合物およびプロ-認識機能を同定するための精神学的および神経学的疾患に関するモデルとして有用である。本発明により、K v s s 1.1活性を調節するその能力に関して、特に、カリウムチャネルを不活性化に関して、または - サブユニットとの会合に関して試験化合物をスクリーニングおよび評価するための方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A型カリウムチャンネルの変異Kv 1.1サブユニットをコードしている内在遺伝子クラスターを含むトランスジェニック齧歯動物であって、変異Kv 1.1サブユニットが、チャンネルのN型不活性化は付与することができないが、Kv1ファミリー-サブユニットと会合する能力は保持するロック-インサブユニットである、トランスジェニック齧歯動物。

【請求項 2】

齧歯動物がマウスである、請求項 1 記載のトランスジェニック齧歯動物。

【請求項 3】

ロック-インサブユニットがホモ接合変異によりコードされている、請求項 1 記載のトランスジェニック齧歯動物。

【請求項 4】

ロック-インサブユニットが、置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、およびストップコドン変異から成る群から選択される変異によりコードされる、請求項 1 記載のトランスジェニック齧歯動物。

【請求項 5】

Y迷路によりアッセイされるように、マウスが、完全に非機能性のロック-アウトKv 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して有意に異なる学習または記憶パターンを有する、請求項 2 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 6】

マウスが、ロック-アウトKv 1.1サブユニットを有するマウスと比較して、4時間の試験間隔後に、有意に改善された学習または記憶を有する、請求項 5 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 7】

マウスが、ロック-アウトKv 1.1サブユニットを有するマウスと比較して、30分の試験間隔後に有意に損なわれた学習または記憶を有する、請求項 5 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 8】

マウスが、コンテクスチュアル恐れ条件付けによりアッセイされるように、ロック-アウトKv 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に損なわれた学習パターンを有する、請求項 2 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 9】

マウスが、コンテクスチュアル恐れ条件付けによりアッセイされるように、野生型Kv 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に損なわれた学習パターンを有する、請求項 8 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 10】

マウスが、高架ゼロ迷路によりアッセイされるように、ロック-アウトKv 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 2 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 11】

マウスが、高架ゼロ迷路によりアッセイされるように、野生型Kv 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 10 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 12】

マウスが、ストレス誘導性のコルチコステロンレベルによりアッセイされるように、ロック-アウトKv 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 2 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 13】

マウスが、ストレス誘導性のコルチコステロンレベルによりアッセイされるように、野生

10

20

30

40

50

型 K v 1.1 サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 12 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 14】

マウスが、ストレス誘導性の高体温によりアッセイされるように、ロック-アウト K v 1.1 サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 2 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 15】

マウスが、ストレス誘導性の高体温によりアッセイされるように、野生型 K v 1.1 サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 14 記載のトランスジェニックマウス。

10

【請求項 16】

マウスが、ストレス誘導性の c - f o s レベルによりアッセイされるように、ロック-アウト K v 1.1 サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 2 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 17】

マウスが、ストレス誘導性の c - f o s レベルによりアッセイされるように、野生型 K v 1.1 サブユニットを有する同じ系統のマウスと比較して、有意に低下した不安パターンを有する、請求項 16 記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 18】

ゲノムが内在 K v 1.1 サブユニット遺伝子の N 末端のコドン 1 - 70 にホモ接合ノック-イン変異を含むトランスジェニック齧歯動物であって、ノック-イン変異が置換変異であり、齧歯動物が、そのゲノムが完全に非-機能性の K v 1.1 サブユニットをコードするホモ接合ノック-アウト変異を含む第 2 の齧歯動物とは有意に異なる認識パターンを示す、トランスジェニック齧歯動物。

20

【請求項 19】

ホモ接合ノック-イン変異が、内在 K v 1.1 サブユニット遺伝子の N 末端のコドン 1 - 36 にある、請求項 18 記載のトランスジェニック齧歯動物。

【請求項 20】

置換変異が、免疫抑制性のエピトープタグを含む、請求項 19 記載のトランスジェニック齧歯動物。

30

【請求項 21】

エピトープタグが、血球凝集素エピトープタグである、請求項 20 記載のトランスジェニック齧歯動物。

【請求項 22】

齧歯動物がマウスである、請求項 18 記載のトランスジェニック齧歯動物。

【請求項 23】

ゲノムが内在 K v 1.1 サブユニット遺伝子の N 末端のコドン 1 - 36 にホモ接合ノック-イン変異を含むトランスジェニック齧歯動物であって、ノック-イン変異が、そのゲノムが完全に非-機能性の K v 1.1 サブユニットをコードするホモ接合ノック-アウト変異を含む第 2 の齧歯動物とは有意に異なる認識パターンを示す、トランスジェニック齧歯動物。

40

【請求項 24】

生殖細胞または体細胞が、齧歯動物または該齧歯動物の先祖に胎児段階で導入された組み換え活性化 K v 1.1 トランスジーン配列を含む、トランスジェニック齧歯動物であって、K v 1.1 トランスジーンが、カリウムチャネルの N 型の不活性化を付与することができないが、K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持するノック-インサブユニットをコードする、トランスジェニック齧歯動物。

【請求項 25】

以下のステップを含む、単離ノック-イン哺乳動物を作製する方法：

(1) 内在 K v 1.1 遺伝子とトランスジーン K v 1.1 の間の相同組み換えを達成する

50

こと、ここで、トランスジーン K v 1.1 は、

(a) K v 1.1 サブユニットのコドン 1-70 の全部または部分を置換している免疫反応タグをコードしている配列、

(b) 1 対の繰り返し部位が隣接する選択可能なマーカー、および、

(c) タグおよび選択可能なマーカーの両方が隣接する内在 K v 1.1 遺伝子に相同な一対の配列

を含む、

(2) さらに組み換えをなして、選択可能なマーカーを除去すること、

ここで、トランスジーン K v 1.1 は、N 型不活性化を付与することができないが、K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持する。

10

【請求項 26】

細胞が、トランスジーンに関してホモ接合である、請求項 25 記載のノック-イン哺乳動物細胞。

【請求項 27】

以下のステップを含む、単離ノック-イン哺乳動物を作製する方法：

(1) 内在 K v 1.1 遺伝子およびトランスジーン K v 1.1 の間の相同組み換えを行うこと、ここで、該トランスジーン K v 1.1 は、

(a) K v 1.1 サブユニットのコドン 1-36 の全部または部分を置換している免疫反応タグをコードしている配列、

(b) 1 対の繰り返し部位が隣接する選択可能なマーカー、および、

(c) タグおよび選択可能なマーカーの両方が隣接する内在 K v 1.1 遺伝子に相同な一対の配列

を含む、および、

(2) さらに組み換えをなして、選択可能なマーカーを除去すること、

ここで、トランスジーン K v 1.1 は、N 型不活性化を付与することができないが、K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持する。

20

【請求項 28】

A 型カリウムチャネルの変異 K v 1.1 サブユニットを発現している哺乳動物細胞であって、変異 K v 1.1 サブユニットが、チャネルの N 型不活性化は付与することができないが、K v 1 - サブユニットと会合する能力は保持するノック-インサブユニットであり、細胞が、変異 K v 1.1 サブユニットの発現をコントロールする内在核酸配列を含み、変異 K v 1.1 サブユニットが、置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、およびストップコドン変異から成る群から選択される変異によりコードされる、哺乳動物細胞。

30

【請求項 29】

ウマ、ウシ、齧歯動物、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、非 - ヒト霊長類、ヒト、ウサギ、およびハムスターから成る群から選択される、請求項 28 記載の細胞。

【請求項 30】

細胞がネズミの細胞である、請求項 28 記載の細胞。

【請求項 31】

変異が、内在核酸配列のコドン 1 - 70 の全部または部分の置換である、請求項 28 記載の細胞。

40

【請求項 32】

置換が、内在核酸配列のコドン 1 - 36 の全部または部分の置換である、請求項 28 記載の細胞。

【請求項 33】

置換が、免疫反応性エピトープタグを含む、請求項 32 記載の細胞。

【請求項 34】

細胞が、変異に関してホモ接合である、請求項 32 記載の細胞。

【請求項 35】

50

K v 1.1 遺伝子のコドン 1 - 70 に変異をコードしている核酸を含んでいる核酸構築物であって、核酸が A 型カリウムチャネルのロック-インサブユニットをコードし、およびロック-インサブユニットが、A 型カリウムチャネルの不活性化を付与できないが、K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持する核酸構築物。

【請求項 36】

変異が、置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、ストップコドン変異から成る群から選択される、請求項 35 記載の核酸構築物。

【請求項 37】

変異が置換変異である、請求項 36 記載の核酸構築物。

【請求項 38】

変異が、K v 1.1 遺伝子のコドン 1 - 70 の全部を置換している免疫反応性のエピトープタグを含む、請求項 37 記載の核酸構築物。

【請求項 39】

核酸がデオキシリボ核酸 (DNA) である、請求項 35 記載の核酸構築物。

【請求項 40】

核酸がリボ核酸 (RNA) である、請求項 35 記載の核酸構築物。

【請求項 41】

核酸構築物が哺乳動物細胞中にある、請求項 35 記載の核酸構築物。

【請求項 42】

核酸がベクター中にある、請求項 35 記載の核酸構築物。

【請求項 43】

K v 1.1 遺伝子のコドン 1 - 36 に変異をコードしている核酸を含む核酸構築物であって、核酸が A 型カリウムチャネルのロック-インサブユニットをコードし、ロック-インサブユニットが A 型カリウムチャネルの N 型不活性化を付与することができないが、K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持する、核酸構築物。

【請求項 44】

相同組み換えにより内在 K v 1.1 遺伝子の発現を破壊するための核酸構築物であって、K v 1.1 遺伝子のコドン 1 - 70 の全部または部分を置換している免疫反応性のエピトープタグ、選択可能なマーカー、およびタグと選択可能なマーカーの両方が隣接している 1 対の核酸配列を含み、該対が内在 K v 1.1 遺伝子の部分に相同である、核酸構築物。

【請求項 45】

免疫反応性のエピトープタグが血球凝集素エピトープタグである、請求項 44 記載の核酸構築物。

【請求項 46】

選択可能なマーカーが neo 遺伝子である、請求項 44 記載の核酸構築物。

【請求項 47】

構築物がベクター中に存在する、請求項 44 記載の核酸構築物。

【請求項 48】

選択可能なマーカーに、LoxP 核酸配列がさらに隣接している、請求項 44 記載の核酸構築物。

【請求項 49】

内在 K v 1.1 遺伝子の発現を相同組み換えにより破壊するための核酸構築物であって、K v 1.1 遺伝子のコドン 1 - 36 の全部または部分を置換している免疫反応性のエピトープタグ、選択可能なマーカー、およびタグと選択可能なマーカーの両方が隣接している 1 対の核酸配列を含み、該対が内在 K v 1.1 遺伝子の部分に相同である、核酸構築物。

【請求項 50】

K v 1.1 サブユニットの活性のモジュレーターに関して試験化合物を前 - スクリーニングする方法であって、以下のステップから成る方法：

10

20

30

40

50

(a) 試験化合物を変異 K v 1.1 サブユニットと接触させること；および、
 (b) 変異 K v 1.1 サブユニットの活性に検出可能な変化を提供する試験化合物の 1 つ
 を選択すること；
 ここで、変異 K v 1.1 サブユニットは、N 型不活性化を付与することができないが、
 K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持するロック-インサブユニット
 である。

【請求項 5 1】

変異 K v 1.1 サブユニットが細胞中に存在する、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

接触させることが細胞を試験化合物と接触させることを含む、請求項 5 1 記載の方法。

10

【請求項 5 3】

検出することが、変異 K v 1.1 サブユニットが K v 1 ファミリー - サブユニットと会
 合するかどうかを決定するための免疫アッセイを含む、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 4】

選択される試験化合物が、変異 K v 1.1 サブユニットに結合する、請求項 5 0 記載の
 方法。

【請求項 5 5】

試験化合物が小分子である、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 6】

試験化合物が、空間的にアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー、またはデ
 コンボリューション、「1-ビーズ1-化合物」法から、もしくはアフィニティークロマトグ
 ラフィー選択により作製される合成ライブラリーから成るライブラリーの群から選択され
 るライブラリー由来である、請求項 5 5 記載の方法。

20

【請求項 5 7】

K v 1.1 サブユニット活性のモジュレーターに関して試験化合物を前-スクリーニング
 する方法であって、次のステップを含む方法；

(a) 試験化合物を野生型 K v 1.1 サブユニットおよび変異 K v 1.1 サブユニットと
 接触させること、および、

(b) 野生型 K v 1.1 サブユニットの活性には検出可能な変化を提供するが、変異 K v
 1.1 サブユニットの活性には検出可能な変化を提供しない試験化合物の 1 つを選択す
 ること；

30

ここで、変異 K v 1.1 サブユニットは、N 型不活性化を付与することができないが、
 K v 1 ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持するロック-インサブユニットで
 ある。

【請求項 5 8】

野生型 K v 1.1 サブユニットおよび変異 K v 1.1 サブユニットが 1 つの試験サンプ
 ル中に存在する、請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 5 9】

試験サンプルが細胞を含む、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

野生型 K v 1.1 サブユニットが第 1 のサンプル中に存在し、変異 K v 1.1 サブユニ
 ヲットが第 2 の試験サンプル中に存在する、請求項 5 7 記載の方法。

40

【請求項 6 1】

試験サンプルが細胞を含む、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

接触させることが、細胞を試験化合物と接触させることを含む、請求項 5 8 または 6 0 記
 載の方法。

【請求項 6 3】

K v 1 - サブユニットも試験化合物と共に存在する、請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 6 4】

50

免疫アッセイを、検出可能な変化がKv1ファミリー -サブユニットとの会合の欠如によるかどうかを決定するために用いる、請求項63記載の方法。

【請求項65】

選択される試験化合物がKv1.1サブユニットに結合する、請求項57記載の方法。

【請求項66】

試験化合物が小分子である、請求項57記載の方法。

【請求項67】

試験化合物が、空間的にアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー、またはデコンボリューション、「1-ビーズ1-化合物」法から、またはアフィニティークロマトグラフィー選択により作製される合成ライブラリーから成るライブラリーの群から選択されるライブラリー由来である、請求項66記載の方法。

10

【請求項68】

Kv1.1サブユニットの活性を調節する試験化合物の効力を評価する方法であって、以下を含む方法；

(a)試験化合物を野生型Kv1.1サブユニットおよび変異Kv1.1サブユニットと接触させること、および、

(b)野生型Kv1.1サブユニットの活性には変化を検出するが、変異Kv1.1サブユニットの活性には変化がないことを検出すること；

ここで、変異Kv1.1サブユニットは、カリウムチャネルのN型不活性化を付与することができないが、Kv1ファミリー -サブユニットと会合するノック-インサブユニットである。

20

【請求項69】

試験化合物が野生型Kv1.1サブユニットの活性を10%以上まで低下させる、請求項68記載の方法。

【請求項70】

試験化合物が、野生型Kv1.1サブユニットの活性を50%以上まで低下させる、請求項69記載の方法。

【請求項71】

野生型Kv1.1サブユニットが第1試験サンプル中に存在し、変異Kv1.1サブユニットが第2試験サンプル中に存在し、試験サンプルが細胞を含む、請求項69記載の方法。

30

【請求項72】

野生型Kv1.1サブユニットが第1試験サンプル中に存在し、変異Kv1.1サブユニットが第2試験サンプル中に存在し、試験サンプルが組織を含む、請求項68記載の方法。

【請求項73】

野生型Kv1.1サブユニットが第1試験サンプル中に存在し、変異Kv1.1サブユニットが第2試験サンプル中に存在し、試験サンプルが齧歯動物を含む、請求項68記載の方法。

【請求項74】

接触させることが試験化合物を齧歯動物に投与することを含む、請求項73記載の方法。

40

【請求項75】

齧歯動物がマウスである、請求項74記載の方法。

【請求項76】

接触させることが、組織を試験化合物と接触させることを含む、請求項74記載の方法。

【請求項77】

接触させることが細胞を試験化合物と接触させることを含む、請求項71記載の方法。

【請求項78】

検出することが、野生型Kv1.1サブユニットがKv1ファミリー -サブユニットと会合するかどうかを決定するための免疫アッセイを含む、請求項77記載の方法。

50

【請求項 79】

(a) 試験化合物を完全に非-機能性のノック-アウト Kv 1.1 サブユニットと接触させること、および、
 (b) 第3の試験サンプルにおける完全に非機能性のノック-アウト Kv 1.1 サブユニットの活性に変化がないことを検出すること
 のステップをさらに含む、請求項 68 記載の方法。

【請求項 80】

ノック-アウト Kv 1.1 サブユニットが齧歯動物であり、検出することが行動試験を含む、請求項 79 記載の方法。

【請求項 81】

行動試験が、Y 迷路、コンテクスチュアル恐れ条件付け、および高架ゼロ迷路から成る群から選択される、請求項 78 記載の方法。

【請求項 82】

ノック-アウト Kv 1.1 サブユニットが齧歯動物に存在し、検出することが生理学的アッセイを含む、請求項 79 記載の方法。

【請求項 83】

生理学的アッセイが、ホルモンアッセイ、高体温アッセイ、および電気生理学的アッセイから成る群から選択される、請求項 82 記載の方法。

【請求項 84】

A 型カリウムチャネルを不活性化させる試験化合物の効力を評価する方法であって、以下を含む方法；

(a) 試験化合物を野生型 Kv 1.1 サブユニットおよび変異 Kv 1.1 サブユニットと接触させること、および、
 (b) 野生型 Kv 1.1 サブユニットの活性において変化を検出するが、変異 Kv 1.1 サブユニットの活性には変化がないことを検出すること、
 ここで、変異 Kv 1.1 サブユニットは、コドン 1-70 の全部または部分における変異を含むノック-イン Kv 1.1 遺伝子配列によりコードされる。

【請求項 85】

野生型 Kv 1.1 サブユニットの活性における変化がカリウムチャネルの N 型不活性化の阻害により引き起こされる、請求項 84 記載の方法。

【請求項 86】

野生型 Kv 1.1 サブユニットの活性における変化により、野生型サブユニットが変異 Kv 1.1 サブユニットと同じ活性を有するようになる、請求項 84 記載の方法。

【請求項 87】

活性を、齧歯動物を高架ゼロ迷路に供することにより測定する、請求項 84 記載の方法。

【請求項 88】

活性を、齧歯動物を環境刺激へと供し、次いで齧歯動物のコルチコステロンレベルを測定することにより測定する、請求項 84 記載の方法。

【請求項 89】

活性を、齧歯動物を環境刺激へと供し、次いで齧歯動物の $c-fos$ レベルを測定することにより測定する、請求項 84 記載の方法。

【請求項 90】

齧歯動物がマウスである、請求項 88 記載の方法。

【請求項 91】

活性を、齧歯動物から組織を採取し、次いで組織を電気生理学的試験に供することにより測定する、請求項 84 記載の方法。

【請求項 92】

活性をインビトロ結合アッセイを用いることにより測定する、請求項 84 記載の方法。

【請求項 93】

試験化合物が野生型 Kv 1.1 サブユニットに結合するが、変異 Kv 1.1 サブユニッ

10

20

30

40

50

トには結合しない、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 4】

試験化合物を完全に非機能性のノック-アウト Kv 1.1 サブユニットと接触させること、次いで該ノック-アウト Kv 1.1 サブユニットの活性に変化がないことを検出することのステップをさらに含む、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 5】

野生型 Kv 1.1 サブユニットの活性が、10%以上まで低下する、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 6】

野生型 Kv 1.1 サブユニットが、50%以上まで低下する、請求項 9 5 記載の方法。

10

【請求項 9 7】

A 型カリウムチャンネルを不活性化させる試験化合物の効力を評価する方法であって、

(a) 試験化合物を野生型 Kv 1.1 サブユニットおよび変異 Kv 1.1 サブユニットと接触させること、および、

(b) 野生型 Kv 1.1 サブユニットの活性における変化を検出するが、変異 Kv 1.1 サブユニットの活性には変化がないことを検出すること、

ここで、変異 Kv 1.1 サブユニットは、コドン 1-36 の全部または一部に変異を含むノック-イン Kv 1.1 遺伝子配列によりコードされる。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

本出願は、2001年7月27日に提出された仮出願番号60/308,485、および2001年9月9日に提出された対応する仮出願番号60/331,140からの優先権を主張し、これらの全開示を出典明示により本明細書中に組み込む。

【0002】

発明の分野

本発明は、不完全な電位感受性カリウムチャンネルベータ1サブユニット(Kv 1)(ここで、該 Kv 1 サブユニットは、チャンネルのN型の不活性化を付与することができないが、 Kv 1ファミリー - サブユニットと会合して、チャンネルの表面発現を高める能力は保持する)を含んでいるトランスジェニック哺乳動物に関する。トランスジェニック哺乳動物は、精神医学および神経学的疾患のモデルとして、および不安緩解化合物を同定するの

30

に有用である。

【0003】

本発明の背景

電位-ゲートカリウムチャンネル(Kv)は、哺乳動物における神経の興奮に寄与する。いくつかの K^+ チャンネル(A-型 K^+ チャンネル)は、その速不活性化のために、神経の発火の調節因子として作用する速不活性化因子である。脳組織における Kv チャンネルの離散した局在性により、これらのチャンネルが、発作の伝播および虚血性傷害に頻繁に関連する経路における活性ポテンシャル伝播および神経伝達物質放出のコントロールにおける必須の要素であることが示唆される(Rhodes et al. (1997) J. Neurosci. 17: 8245-8258を参照されたい)。

40

【0004】

いくつかの Kv チャンネルは、シェーカー-関連スーパーファミリーのメンバーであり、膜に埋めこまれたサブユニットおよび補助的な細胞質性サブユニットが集合して成る。

Kv 1、 Kv 2、および Kv 3 と名づけられる3つの Kv 遺伝子により、5つのサブユニットが提供される。さらに、 Kv 1 遺伝子のオールターナティブスプライシングにより、そのN-末端配列およびその発現パターンが異なる3つの組織特異的1サブユニットイソ形態、 Kv 1.1、 Kv 1.2、および Kv 1.3 が提供される。 Kv 1.2 および Kv 1.3 は心臓組織で発現されるが、 Kv 1.1 は脳組織、特に海馬CA1領域および線条において発現される。

【0005】

50

Kvチャンネルの α -サブユニットは、細孔を形成している β -サブユニットの表面発現、安定性、転写後のプロセッシング、および不活性化動態を調節するのに重要な役割を果たす。所定の β -サブユニットを有する補助Kv1.1のいずれかの同時発現により、発現されるKvチャンネルの不活性化動態が劇的に促進された(Rettig et al. (1994) Nature 369: 289-294; Majumder et al. (1995) FEBS Lett. 361, Morales et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 6272-6277; England et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6309-6313; England et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 28531-28534; 13-16; McCornmack et al. (1995) FEBS Lett. 370: 32-36; Heinemann et al. (1996) J. Physiol. (Lond.) 493: 625-633)。Kvチャンネルの不活性化は、Kv1.1サブユニットのアミノ末端における「ボール」ドメインにより付与されることがすでに示されている(Rettig、既出)。加えて、Kv1.1サブユニットは同時発現される β -サブユニットの表面発現を促進するので、Kv1.1サブユニットは、対応するKv1ファミリー β -サブユニットの折りたたみにおいてシャペロン様の機能を有することが示唆されている(Shi et al. (1996) ニューロン(Neuron) 16: 843-852; Acclili et al. (1997) J. Biol. Chem. 272: 25824-25831)。対応するKv1ファミリー β -サブユニットと会合するKv1.1サブユニットの能力は、そのアミノ末端の欠失にも関わらず保持され、結果的に、感染した哺乳動物細胞を用いる実験にて示されているように、チャンネルの不活性化を付与する能力は喪失する(Nakahira et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 7084-7089)。懸著には、全Kv1.1サブユニットの機能の完全な喪失により、ノックアウトマウスにおいては、海馬および線条ニューロンにおけるA型Kvチャンネルの活性の低下が生じる(Giese et al. (1998) 学習&記憶(Learning & Memory) 5: 257-273)。しかし、それがN-タイプの不活性化であろうと、そのシャペロン様機能であろうと、Kv1.1サブユニットの機能がどのように、動物の変化した認識、不安および運動調節に寄与するかは不明である。

10

20

30

【0006】

PCT公開文献WO00/24871号は、A型K⁺チャンネルのKv1.1サブユニットの全てを損傷しているノックアウト変異を有するトランスジェニックマウスを開示する。WO00/24871号は、しかし、Kv1.1サブユニットの一部のみが不活性化されて、機能性を保持するKv1.1サブユニットの部分が残っている変異を有するトランスジェニック哺乳動物は記載していない。特に、WO00/24871号は、N型の不活性化を付与する能力を除き、Kv1.1サブユニットの全機能部分が保持されているKv1.1サブユニットの変異を有するトランスジェニック動物は提供しない。

【0007】

Kv1.1サブユニットの別個の部分为非機能性となっている、特に、N型の不活性化が喪失しているトランスジェニック哺乳動物モデルであって、パニックおよび不安障害、認識障害、癲癇、虚血性卒中、および運動障害の治療に用い得る化合物(「ディスプレイベーター」)および治療法を同定するためのトランスジェニック哺乳動物モデルを提供することが望まれ得る。

【0008】

発明の概要

本発明は、A型カリウムチャンネルにおける変異Kv1.1サブユニットをコードする内在遺伝子クラスターを有するトランスジェニック齧歯動物であって、変異Kv1.1サブユニットがチャンネルのN型不活性化を付与することはできないが、Kv1ファミリー β -サブユニットと会合する能力は保持するノックインサブユニットである齧歯動物に関する。

40

【0009】

好ましい具体例において、トランスジェニック齧歯動物は、マウス(「KIマウス」)であり、変異ノックインKv1.1サブユニットは、ホモ接合変異によりコードされる。ノックインKv1.1サブユニットは、置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、およびストップコドン変異から成る群から選択される変異によりコードされてよく、最も好ましくは、KIマウスは、Y迷路によりアッセイされるように、Kv1.1サブユニッ

50

トが完全に非機能性であるマウス(K Oマウス)と比較して、有意に異なる学習または記憶パターンを示す。一態様において、Y迷路試験は好ましくは、K Oマウスと比較して、4時間の試験間隔後に有意に学習または記憶が改善されるが、K IマウスはK Oマウスと比較して30分の試験間隔後に有意に損なわれた学習または記憶を有することを、好ましくは示す。他の好ましい具体例では、コンテクスチュアル恐れ条件付けアッセイを用いて、K IマウスがK Oマウスおよび野生型K v 1.1サブユニットを有する同じ系統のマウス(「WTマウス」)と比較して、有意に損なわれた学習パターンを有することを示す。さらに他の好ましい具体例では、高架のゼロ迷路アッセイを用いて、K Iマウスが、K OおよびWTマウスと比較して有意に低下した不安パターンを有することを示す。さらに他の態様において、ストレス誘導性のコルチコステロンレベルに関するアッセイを用いて、K IマウスがK OおよびWTマウスと比較して有意に低下した不安パターンを有することを示す。同様に、本発明の他の態様において、ストレス誘導性の高体温に関するアッセイを用いて、K Iマウスが、K OおよびWTマウスと比較して有意に低下した不安パターンを有することを示す。

10

20

30

40

50

【0010】

本発明はさらに、そのゲノムが、内在K v 1.1サブユニット遺伝子のN末端のコドン1-70(即ち、配列番号1)、好ましくはコドン1-36においてホモ接合変異を含み、該変異が置換変異であり、齧歯動物が、そのゲノムが完全に非機能性のK v 1.1サブユニットをコードするホモ接合体変異を含む第2の齧歯動物に対して有意に異なる認識パターンを示すトランスジェニック齧歯動物に関する。好ましくは、置換変異は、免疫反応性のエピトープタグを含み、および最も好ましくは、置換変異が、血球凝集素エピトープタグである。本発明のさらなる態様において、トランスジェニック齧歯動物はマウスである。

【0011】

他の具体例において、本発明は、生殖細胞および体細胞が、該齧歯動物または該齧歯動物の先祖に胎児段階で導入された組換え活性化K v 1.1トランスジーン配列を含み、K v 1.1トランスジーンが、カリウムチャネルのN型不活性化を付与することができないがK v 1ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持する サブユニットをコードする、トランスジェニック齧歯動物に関する。

【0012】

他の態様では、本発明により、以下の工程から成る単離ノックイン哺乳動物細胞を作製する方法が提供される；(1)内在K v 1.1遺伝子およびトランスジーンK v 1.1の間の相同組換えを為すこと、ここで該トランスジーンK v 1.1は、(a)K v 1.1サブユニットのコドン1-70の全部または部分を置換する免疫活性タグをコードしている配列、(b)一對の繰り返し部位が隣接する選択可能なマーカー、および(c)該タグおよび選択可能なマーカーの両方が隣接している、内在K v 1.1遺伝子に相同な1対の配列を含む；(2)さらに組換えを為して、選択可能なマーカーを除去すること、ここで、トランスジーンK v 1.1は、N型不活性化は付与することができないがK v 1ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持する サブユニットをコードする。好ましくは、哺乳動物細胞は、トランスジーンに関してホモ接合である。最も好ましくは、免疫活性タグは、コドン1-36の全部または部分を置換する。

【0013】

さらに他の具体例では、本発明により、ノック - インK v 1.1サブユニットを有するA型カリウムチャネルを発現している哺乳動物細胞であって、ノック - インK v 1.1サブユニットが、チャネルのN型不活性化を付与することができないが、K v 1ファミリー - サブユニットと会合する能力は保持し、該細胞が、ノックインK v 1.1サブユニットの発現をコントロールする内在核酸配列を含み、そして該ノック - インK v 1.1サブユニットが、置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、およびストップコドン変異から成る群から選択される変異によりコードされる、哺乳動物細胞が提供される。好ましくは、細胞は、ウマ、ウシ、齧歯動物、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、非ヒト霊長

類、ヒト、ウサギ、およびハムスターから成る群から選択される。最も好ましくは、細胞はネズミの細胞である。他の態様において、細胞は、内在核酸配列のコドン1 - 70の全部または一部が置換されており、より好ましくはコドン1 - 36が置換されており、そして置換体が免疫活性エピトープタグを含む変異を含む。最も好ましくは、細胞は置換変異に関してホモ接合である。

【0014】

さらなる具体例において、本発明により、Kv 1.1遺伝子のコドン1 - 70において、より好ましくはコドン1 - 36において変異をコードしている核酸構築物であって、該核酸がA型カリウムチャンネルのノックインサブユニットをコードし、該核酸ノックインサブユニットがA型カリウムチャンネルのN型不活性化を付与することができないがKv1ファミリーサブユニットと会合する能力は保持する、核酸構築物が提供される。変異は、置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、およびストップコドン変異であってよいが、好ましくは置換変異である。より好ましくは、変異は、Kv 1.1遺伝子のコドン1 - 70、好ましくはコドン1 - 36の全部を置換している免疫反応性エピトープを含む。さらに、核酸構築物は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)いずれかである核酸を含む。他の態様では、核酸構築物は、哺乳動物細胞かベクターのいずれかの中にある。

10

【0015】

他の態様において、本発明により、相同組換えにより内在Kv 1.1遺伝子の発現を破壊するための核酸構築物であって、該構築物が、Kv 1.1遺伝子のコドン1 - 70の全部または一部を置換している免疫反応性のエピトープタグ、選択可能なマーカー、および、タグおよび選択可能なマーカーの両方に隣接している一対の核酸配列を含み、該対が内在Kv 1.1遺伝子の一部に対して相同である、核酸構築物が提供される。より好ましくは、免疫反応性のエピトープタグは、コドン1 - 36の全部または一部を置換する。好ましくは、免疫反応性のエピトープタグは、血球凝集素エピトープタグであり、選択可能なマーカーはneo遺伝子である。より好ましくは、選択可能なマーカーには、LoxP核酸配列がさらに隣接している。最も好ましくは、核酸構築物はベクター中にある。

20

【0016】

さらに他の具体例では、本発明により、Kv 1.1サブユニット活性のモジュレーターに関して試験化合物を前スクリーニングする方法であって、(a)試験化合物をノックインKv 1.1サブユニットと接触させること、および(b)ノックインKv 1.1サブユニットの活性に検出可能な変化を提供する試験化合物の1つを選択すること、ここで、ノックインKv 1.1サブユニットは、N型不活性化を付与し得ないが、Kv1ファミリーサブユニットと会合する能力は保持する、の工程から成る方法が提供される。1つの具体例において、ノックインKv 1.1サブユニットは試験サンプル中にあり、該試験サンプルは、細胞を含み、および接触させる工程は、該試験化合物を細胞に投与することを含む。加えて、検出する工程は、Kv 1.1サブユニットがKv1ファミリーサブユニットと会合するかどうかを決定するための、免疫アッセイを用いてよい。1の具体例では、選択される試験化合物は、Kv 1.1サブユニットに結合する。好ましくは、試験化合物は、場所がアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー、またはデコンポリューション、「1 - ピーズ1 - 化合物」法から、またはアフィニティクロマトグラフィー選択により作製される合成ライブラリーから成るライブラリーの群から選択される小分子である。

30

40

【0017】

別法として、本発明により、Kv 1.1サブユニット活性のモジュレーターに関する試験化合物を、(a)試験化合物を野生型Kv 1.1サブユニットおよびノックインKv 1.1サブユニットと接触させること、および(b)野生型Kv 1.1サブユニットの活性に検出可能な変化を提供するが、ノックインKv 1.1サブユニットの活性には検出可能な変化を提供せず、ノックインKv 1.1サブユニットがN型の不活性化を付与することができないが、Kv1ファミリーサブユニットと会合する能力は保持する

50

試験化合物の1つを選択することにより、前スクリーニングする方法が提供される。1つの具体例では、野生型およびノック-インKv 1.1サブユニットが1つの試験サンプル中に存在する。別法として、野生型Kv 1.1サブユニットが第1の試験サンプル中に存在し、ノック-インKv 1.1サブユニットが第2の試験サンプル中に存在する。試験サンプルは細胞を含んでよく、この場合、接触させる工程は、該試験化合物を細胞へ投与することを含む。1つの具体例において、Kv 1ファミリー - サブユニットが試験化合物と共に存在してよく、免疫アッセイを用いて、検出可能な変化がKv 1ファミリー - サブユニットとの会合を欠くことによるかどうかを決定してよい。1つの具体例において、選択された試験化合物はKv 1.1サブユニットに結合する。加えて、前記のごとく、試験化合物は、場所がアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー、またはデコンポリューション、「1-ピース1-化合物法」から作製された、またはアフィニティクロマトグラフィー選択によるライブラリーの群から選択される小分子であってよい。

10

【0018】

他の好ましい具体例において、本発明により、Kv 1.1サブユニットの活性を変更するための試験化合物の効力を、試験化合物を野生型Kv 1.1サブユニットおよび変異体Kv 1.1サブユニットと接触させ、次いで第2試験サンプル中の野生型Kv 1.1サブユニットの活性においては変化を検出するが、ノック-インKv 1.1サブユニットには変化がないことを検出することにより評価する方法であって、ノック-インKv 1.1サブユニットがN型の不活性化は付与することができないが、Kv 1ファミリー - サブユニットと会合するところの方法が提供される。好ましくは、試験化合物により、野生型Kv 1.1サブユニットの活性が、10%以上まで、より好ましくは50%以上まで低下する。1つの具体例では、野生型Kv 1.1サブユニットが第1試験サンプル中に存在し、ノック-インKv 1.1サブユニットが、第2試験サンプル中に存在する。好ましくは、接触化させる工程には、該試験化合物を齧歯動物に投与することが含まれ、およびより好ましくは、齧歯動物はマウスである。

20

30

【0019】

別の好ましい具体例において、接触させる工程は、試験化合物を組織または細胞と接触させることを含む。さらに好ましい具体例において、方法は、試験化合物を第3試験サンプルと接触させること、および第3試験サンプルにおける完全な非機能性のKv 1.1サブユニットの活性には変化がないことを検出することを含み、第3の試験サンプルが完全な非機能性のKv 1.1サブユニットの発現により特徴づけられるところの工程を含む。さらに、接触させる工程が、試験化合物を細胞と接触させることを含む場合、検出する工程には、野生型Kv 1.1サブユニットがKv 1ファミリー - サブユニットと会合するかどうかを決定するための免疫アッセイが含まれる。より好ましくは、ノック-アウトサブユニットは、齧歯動物にあり、この具体例における検出する工程には、Y迷路などの行動試験、コンテクスチュアル恐れ条件付け、および高架ゼ口迷路が含まれる。別法として、ノックアウトサブユニットは齧歯動物にあり、この具体例における検出の工程には、ホルモンアッセイ、高体温アッセイ、および電気生理学的アッセイなどの生理学的アッセイが含まれる。

40

【0020】

さらに他の具体例においては、本発明は、A型カリウムチャネルを不活性化する試験化合物の効力を、試験化合物を野生型Kv 1.1サブユニットおよびノック-インKv 1.1サブユニットと接触させること、次いで野生型Kv 1.1サブユニットの活性の変化およびノック-インKv 1.1サブユニットの活性の変化の不在を検出することにより評価する方法であって、ノック-インKv 1.1サブユニットが、コドン1-70、より好ましくはコドン1-36の全部または一部における変異を含むKv 1.1遺伝子配列によりコードされるものが含まれる。1つの具体例では、野生型Kv 1.1サブユニットの活性における変化は、カリウムチャネルのN型の不活性化の阻害により引き起こされる。好ましくは、野生型Kv 1.1サブユニットの活性の変化により、野生型サブユ

50

ニットは、ノック - イン Kv 1.1 サブユニットと同じ活性を有するようになる。他の好ましい具体例では、活性は、トランスジェニック齧歯動物を高架ゼロ迷路へと供することにより測定する。別法として、活性は、トランスジェニック齧歯動物を環境刺激へと供し、次いで齧歯動物のコルチコステロンレベルを測定することにより測定する。他の別の具体例において、活性は、組織をトランスジェニック齧歯動物から採取すること、次いで組織を電気 - 生理学的試験に供することにより測定する。最も好ましくは、トランスジェニック哺乳動物はマウスである。さらに他の具体例では、活性は、インビトロ結合アッセイを用いることにより測定する。さらに、他の具体例において、試験化合物は野生型 Kv 1.1 サブユニットに結合するが、ノック - イン Kv 1.1 サブユニットには結合しない。最も好ましい具体例において、方法は、試験化合物を完全に非機能性の Kv 1.1 サブユニットと接触させること、次いで完全に非機能性の Kv 1.1 サブユニットの活性に変化がないことを検出することをさらに含む。好ましくはこの具体例において、試験化合物により、野生型 Kv 1.1 サブユニットの活性が、10%以上まで、およびより好ましくは50%以上まで低下する。

10

20

30

40

50

【0021】

図面の簡単な説明

図1Aは、内在 Kv 1 遺伝子構造およびそのエキソン組成を図示したものである。5'末端の3つのエキソン(エキソン1.1、1.2、1.3)は、C末端に共通のドメイン(エキソン3-15)を有するが、二者択一的にスプライシングされ、その結果、それぞれはユニークなN-末端タンパク質配列をコードする。エキソン1.1は変異に関してターゲットされた不活性化ドメインをコードする。3つのエキソン1.1、1.2、および1.3の遺伝子上での相対順序は未知である。

【0022】

図1Bは、内在 Kv 1.1 遺伝子を変異に関してターゲットした方法を示す。ターゲティングベクター(上)を設計し、エキソン1.1の33番目のコドンの代わりに3xHATAG、および10x隣接ネオマイシンカセット(Flox-Neo)を組み込んだ。相同組換え(最初の矢印)により、変異体エキソンおよびFlox-Neoがエキソン1.1に交換する。Creレコンビナーゼにより媒介される第2の組換え(2番目の矢印)により、イントロンからFlox-Neoが除去され、1コピーのLoxP部位が残る(下)。制限部位EcoRIおよびBamHIを、「R」および「B」とそれぞれ示す。

【0023】

図1Cは、ES細胞をBamHIで消化したサザンプロットを図示したものである。図1Bからの5'プローブを用いて、野生型 Kv 1 対立遺伝子に関する~7.0kbのバンドが同定され、一方で、3xHATAG内に位置するBamHI部位から生じた更なる~1.0kbのバンドが3つのターゲットされたESクローン(51、145、および191)に同定された。

【0024】

図1Dおよび1Eは、RNaseタンパク質分析の結果を図示したものであり、ノック - イン Kv 変異体(Kv 0)mRNA(図1D)および野生型 Kv (WT)の発現パターンを示す(図1E)。3xHATAGエキソン1に対して相補的なプローブにより、ヘテロ接合およびホモ接合KI動物(それぞれ、wt/KIおよびKI/KI)において420bpの保護されたバンド、および野生型(WT)において、正常な kv 1.1 mRNAのN末端の3xHATAG配列が喪失していることにより220bpのより短い保護されたバンドを得た。正常な Kv 1.1 mRNAに相補的なプローブを用いるコンバースRPA分析により、WT mRNAから完全に保護された480bpのフラグメントが示され、一方で、3xHATAG配列に隣接している2つのフラグメント(210および140)がKI mRNAにおいて保護された。Flox-Neoカセットを有する動物は、いずれのプローブからも特定のバンドを示さず、 Kv 1.1 発現およびKO遺伝子タイプの完全な欠損を示す。

【0025】

図1Fは、種々の遺伝子タイプからのサンプルを用いるPCR分析の結果を図示したもの

である。Kv 0 KIプライマーはエキソン1.1の3'エキソンイントロン結合およびNeo-Flloxの30bp下流の部位の間のフラグメントを増幅し、それにより、ホモ接合野生型(w/w)、ホモ接合KO(o/o)、ホモ接合KI(I/I)、およびヘテロ接合KI(w/I)動物の同定が可能となる。KI対立遺伝子には、loxP繰り返し配列の存在が含まれ、そしてそれにより、WT対立遺伝子(230bp)よりさらに長い増幅された配列(264bp)を得た。

【0026】

図1Gは、WTおよび変異体マウスからの皮質、線条、海馬、小脳、中脳、および視床におけるKv 1、Kv 2、シナプシン1(コントロール)またはHAの発現を分析するために行ったウェスタンブロットを図示したものである。指定の脳領域を切り出し、特定の免疫反応に関して分析した。

10

図2A-2Bは、Y迷路におけるWT129/SvEvマウス対KOおよびKIマウスの間の個々の学習および記憶パターンを示す。図2Aは、30分、2時間、および4時間の試験間の間隔(ITI)後の、迷路の新規なアームを最初に選択するマウスの割合を示す。図2Bは、30分、2時間、および4時間のITI後の、新規なアームにおいて費やされた(2分間の)時間の割合を示す。

【0027】

図3A-3Bは、コンテクスチュアル恐れ条件付け試験における、両C57BI6(図3A)および129/SvEv(図3B)地のWT、KI、およびKOMaus間の個々の学習パターンを示す。

20

図4A-4Bは、高架ゼロ迷路のオープンゾーン部分において、C57BI6(図4A)および129/SvEv(図4B)地両方の、3つの異なるゲノタイプ、WT、KI、およびKOが費やした時間の割合を示す。

図5Aは、雄のWT(129/SvEv)マウスにおけるストレス誘導性の高体温症における、クロロジアセポキシドの種々の投与量の効果を示す。

図5Bは、野生型(WT; 129/SvEv)、Kv ノック-イン(KI)およびノックアウト(KO)マウスにおける、ストレス誘導性の高体温症に対する反応を示す。挿入図は、初期測定における体温を示す。

【0028】

図6は、Kv ノック-インマウスにおいて発作の閾値が変化していないことを示す。

30

図7は、KI、KO、および野生型マウスの頭頂皮質におけるc-fos mRNAのインサイチュハイブリダイゼーション定量を示す。

【0029】

発明の詳細な記載

本発明は、Kv 1.1遺伝子にノックイン変異(KI)を有するトランスジェニックマウスが、Kv 1.1のノックアウト変異を有するトランスジェニックマウス(KO)または野生型マウス(WT)と比較して、有意に異なる行動的表現型を示すという発見に関する。KIマウスにおけるサブユニットは、Kv-1ファミリーK⁺チャンネルを不活性化する能力を欠くが、Kv1ファミリーサブユニットと会合し、そしてそれによりチャンネルの表面発現を高める能力は保持する。3つの異なる行動規範、Y迷路試験、コンテクスチュアル恐れ条件付け、および高架ゼロ迷路において、KIマウスは、KOMausとは異なる行動パターンを一貫して示した。Y迷路の新規なアームにおいて費やされる時間により示されるように(実施例2を参照されたい)、KIマウスは、KOおよびWTマウスと比較して半時間の試験間隔(ITI)にて記憶(retention)の欠損を示したが、4時間のITIにてKOMausに対して改善された記憶を示した。コンテクスチュアル恐れ条件付け試験において、KIマウスはKOおよびWTマウスと比較して有意な欠損を示した(実施例4を参照されたい)。さらに、KIマウスは、高架ゼロ迷路(実施例4)、ストレス誘導性のコルチコステロンレベル(実施例5)およびストレス誘導性の高体温(実施例6)のような機能アッセイにおいて、KOMausと比較して異なる行動および生理学的パターンを示す。

40

【0030】

50

理論により拘束されることなく、K I 変異体は、N型チャネル不活性化の特異的な欠損を反映する、K Oとは異なる表現型を顕在化することが考えられる。行動および生理学的アッセイにおけるK I活性の結果により、不安特性が示唆され、それゆえ、パニックおよび不安障害の治療のための試験化合物をスクリーニングすることにおける、潜在的な役割が示唆される。

【0031】

本発明はそれゆえ、そのゲノムがK I変異をコードするトランスジェニック哺乳動物、特にマウス、およびその作製に用いられる核酸構築物およびターゲティング構築物に関する。加えて、K Iトランスジェニック動物により、K v 1.1活性を調節する試験化合物の効力を評価するためのポジティブなモデルが提供される。本発明は、さらに、以下に示すごとくK v 1.1活性を調節することができる試験化合物の結合アッセイ、高処理量アッセイ、および機能アッセイ(特に、行動および生理学的アッセイ)に関する。

10

【0032】

定義

本発明の理解をさらに容易にするために、多くの用語および語句を以下に定義する。

K v 1.1なる用語は、A型カリウムチャネルの1サブユニット、特にシェーカー様電圧ゲートカリウムチャネル(K v)の1.1サブユニットイソ型を意味する。K vチャネルは、典型的には、中心の水で満たされた孔の周りに集合している4つの同一のサブユニットから成る。この孔が開き、それを通じてカリウムイオンの通過が可能となるか、または細胞電位の変化に反応して閉じる、すなわち、「電圧ゲートされる」。K vチャネルおよび1.1サブユニットは、当該分野の専門家に公知である。

20

【0033】

本明細書中に用いられるように、ノック-インK v 1.1変異(「K I」)は、変異したK v 1.1遺伝子が、K⁺チャネルのN型不活性化を付与することができないが、K v 1ファミリーサブユニットと会合し、それによりチャネル表面発現は保持することができる不完全な1.1サブユニットをコードする、K v 1.1遺伝子における変異を意味する。本明細書中に用いるように、K Iサブユニットは、K I変異によりコードされる変異1.1サブユニットを意味し、K I哺乳動物は、発現されたK I変異を有する哺乳動物を意味する。好ましい具体例において、K I変異は、K v 1.1遺伝子のコドン1-70に変異を誘導することにより作製される。K v 1.1のコドン1-70は、配列番号1に示す。K v 1.1の好ましいDNAおよびアミノ酸配列は、配列番号1に示す。好ましくは、変異はコドン1-36の全部または部分が置換されている、実施例1および配列番号2の「K v 0」変異に示すような置換変異である。特に好ましい具体例において、免疫活性タグが、K v 1.1遺伝子の内在コドン1-70の全部または少なくとも1-36を置換し、-サブユニットとの同時免疫沈降を検出するのに役立つ。別法として、いずれかの外来核酸配列を内在K v 1.1遺伝子に挿入して、K I変異を作製してよい。K v 1.1ノック-イン哺乳動物、またはそれからの組織または細胞には、ヘテロ接合哺乳動物(即ち、1つの変異対立遺伝子と1つの野生型対立遺伝子)およびホモ接合変異体(即ち、2つの変異対立遺伝子)の両方が含まれる。

30

【0034】

K v 1.1ノックアウト変異(「K O」)なる用語は、変異したK v 1.1遺伝子が、カリウムチャネルのN型不活性化を付与することができず、K v 1ファミリー-サブユニットと会合もできない、またはK v 1.1遺伝子が完全に存在しないサブユニットをコードする、K v 1.1遺伝子における変異を意味する。簡単には、K O変異は、完全に非機能性のK v 1サブユニットをコードする。本明細書中に用いられるように、K Oサブユニットは、K O変異によりコードされる変異1.1サブユニットを意味し、K O哺乳動物は、発現されたK O変異を有する哺乳動物を意味する。「K v 1.1-ノックアウト」なる用語は、ヘテロ接合哺乳動物およびホモ接合変異体哺乳動物の両方、およびそれ由来の組織または細胞を意味する。K v 1.1-ノックアウト変異の例を実施例1に示すが、ここでは、ネオマイシンマーカ-をK v 1.1遺伝子のイントロンに挿入し

40

50

、そして遺伝子の機能を完全に破壊する。

【0035】

野生型 K v 1.1 (「WT」)なる用語は、完全な機能性 K v 1.1 サブユニットをコードしている天然に生じるヌクレオチドおよびアミノ酸配列であって、K v 1.1 サブユニットをコードしている遺伝子が、その世代または先祖の世代のいずれの時点でも、天然に生じる物質を欠失させるために、または外来の遺伝子物質を含めるために実験的に操作されていない K v 1.1 遺伝子を意味する。

【0036】

「遺伝的に変更された」なる用語は、細胞のゲノタイプまたは表現型および次いでその子孫を変更する誘導変異を含む遺伝子を含んでいるおよび/または発現している細胞を意味する。この用語には、挿入変異、フレームシフト変異、またはストップコドン変異を含む細胞の内在ヌクレオチドに対するいずれかの付加または破壊が含まれる。「変更した」または「変異体」、およびその種々の文法上由来する語は、導入された遺伝子変異またはそれからコードされる遺伝子産物を含むあらゆる遺伝子を意味する。本明細書中に用いられるように、変異 K v 1.1 遺伝子は、典型的には、ノック-イン K v 1.1 サブユニットまたはノックアウト K v 1.1 サブユニットのいずれかをコードする遺伝子を意味する。

10

【0037】

本発明の「非ヒト動物」なる用語は、齧歯動物、非-ヒト霊長類、ヒツジ、ウシ、反芻動物、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類などのいずれかの脊椎動物が含まれる。好ましい非ヒト哺乳動物は、ラットおよびマウスを含む齧歯目から選択され、最も好ましくは、マウスである。

20

【0038】

本明細書中に用いる「トランスジーン」なる用語は、外来遺伝子を胎児幹 (ES) 細胞、新たに受精した卵または初期胚へ導入することにより対象哺乳動物へ挿入される外来核酸配列を意味する。「外来核酸配列」なる用語は、実験操作により動物のゲノムへと導入されるあらゆる核酸配列を意味し、導入された遺伝子が天然に生じる遺伝子に対していくつかの変更(例えば、免疫活性エピトープタグ、ポイント変異、選択可能なマーカー遺伝子の存在、loxP部位の存在など)を含む限り、その哺乳動物中に見出される核酸配列を含んでよい。

30

【0039】

「ターゲティング構築物」なる用語は、変更(例えば、免疫反応性のエピトープタグ、挿入変異、ストップコドン変異、選択可能なマーカー遺伝子の存在、loxP部位の存在など)、および変更に隣接する内在 K v 1 遺伝子に相同な配列を含むオリゴヌクレオチド配列を意味する。ターゲティング構築物は、一般に、宿主細胞へと構築物を導入することができるターゲティングベクター、例えば、プラスミドにライゲートする。相同配列により、標的またはレシピエントの細胞(例えばES細胞)の染色体中の内在 K v 1 遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子への、ターゲティング構築物またはベクターの相同組換えが可能となる。ターゲティング構築物またはベクターは、1つ以上の変異を含んでよい。好ましくは、本発明のターゲティング構築物またはベクターは、ホモロジーの2つの領域が遺伝子変異に隣接し、その結果、ホモロジー領域間にあるターゲットされた遺伝子の部分の置換を生じる「置換型」である。これに対し、挿入型の構築物およびベクターは、ターゲットされた遺伝子と相同の1つの領域のみを有し、ターゲットされた遺伝子への、典型的にはカルボキシ-、またはアミノ-末端いずれかにおける隣接部分の挿入を生じる。挿入型の構築物またはベクターを本発明に用いる場合、相同領域は K v 1.1 遺伝子のアミノ末端への挿入をターゲットしなければならない。本明細書中に示すように、相同組換えにより、構築物およびベクターをターゲットして、K v 1 の不活性化ドメインを破壊し、N型の不活性化を不可能とするインテグレーションが可能となる。

40

【0040】

本明細書中に用いるように、「選択可能なマーカー」なる用語は、選択可能なマーカーを

50

発現する細胞において抗生物質または薬物に対する耐性を付与する酵素活性をコードする遺伝子を意味する。本発明の選択可能なマーカーは、好ましくは「ポジティブ」であり、ポジティブな選択可能なマーカーは、典型的には、ドミナントな選択可能なマーカー、即ち、哺乳動物細胞または細胞株 (E S 細胞を含む) に存在する場合はいつも検出することができる酵素活性をコードする遺伝子である。

【0041】

本明細書中に用いられるように、その種々の文法形態 (例えば、「調節された」、「調節」、「調節している」など) において、「調節活性」なる用語は、正常なタンパク質活性 (例えば、野生型 K v 1.1 活性) の刺激、強化、阻害、および/または緩解が含まれる。該用語は、タンパク質の発現レベルのアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションは包含しない。

10

【0042】

WT、KI、またはKOサブユニットに関連して用いられる「活性」なる用語は、その標準的な機能を行う特定のサブユニットの能力を意味し、即ち、標準的なWTサブユニット活性は、Kv1ファミリーサブユニットとの会合およびカリウムチャネルの不活性化の両方であり、標準的なKIサブユニット活性は、典型的にはKv1ファミリーサブユニットと会合するが、チャネルは不活性化せず、および標準的なKOサブユニット活性は、完全にカリウムチャネルを会合または不活性化することができない。「活性における検出可能な変化」、または「活性の変化を検出する」は、それゆえ、以下に記載する結合アッセイおよび機能アッセイにより測定されるような、特定のサブユニットの標準的な機能からの逸脱である。本発明の結合アッセイは、典型的には、結合およびそれゆえ活性の変化を検出するための放射能標識を用い、機能アッセイは、行動または生理学における統計学的に有意な逸脱を用いて、サブユニット活性における変化を検出する。

20

【0043】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」なる用語は本明細書中交換して用いられ、2つまたはそれ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似物、またはペプチドミメティクスのポリマーを意味する。サブユニットは、ペプチド結合または他の結合、例えば、エステル、エーテルなどにより結合してよい。本明細書中に用いられるように、「アミノ酸」なる用語は、グリシンおよび両DまたはL光学異性体、およびアミノ酸類似体、およびペプチドミメティクスを含む、天然および/または非天然いずれかまたは合成アミノ酸を含む。3つまたはそれ以上のアミノ酸のペプチドは、一般に、オリゴペプチドと呼ばれる。3つ以上またはそれ以上のアミノ酸のペプチド鎖は、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。

30

【0044】

本明細書中に用いられるように、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」なる用語は、交換して用いられ、あらゆる長さの、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドいずれかのヌクレオチドまたはその類似体のポリマー形態を含む。ポリヌクレオチドは、いずれかの三次元構造を持ち、公知または未知のいずれかの機能をなし得る。以下は、ポリヌクレオチドの無制限の例である：遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いずれかの配列の単離DNA、いずれかの配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの変更されたヌクレオチドを含んでよい。もし存在するならば、ヌクレオチド構造の変更は、ポリマーの重合の前後に為されてよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断されてよい。ポリヌクレオチドは、ポリマー化後に、標識成分との結合によりさらに変更されてよい。該用語には、二本鎖および一本鎖分子の両方がさらに含まれる。他が特定または必要とされない限り、ポリヌクレオチドである本発明のあらゆる態様は、二本鎖形態、および二本鎖形態を作ることが公知または予測される、2つの相補的な一本鎖形態のそれぞれを包含する。

40

50

【0045】

「抗体」には、抗原上に存在するエピトープと結合することができる免疫グロブリンが含まれる。本明細書中で用いるように、該用語は、モノクローナルおよびポリクローナル抗体などの完全な免疫グロブリン分子のみならず、所望の特異性の抗原認識部位を含む抗-イディオタイプ抗体、変異体、フラグメント、融合タンパク質、二特異性抗体、ヒト化タンパク質、およびその変更を包含する。

【0046】

本明細書中に用いるように、「結合パートナー」または「捕捉剤」または「結合対」のメンバーなる用語は、他の分子に特異的に結合して、抗体-抗原、レクチン-カルボヒドレート、核酸-核酸、ビオチン-アビジンなどの結合複合体を形成する分子を意味する。

10

【0047】

本明細書中に用いるように、生物分子(例えば、小分子、タンパク質、核酸、抗体など)に関して「結合する」または「特異的に結合する」なる用語は、分子の異種集団(例えば、タンパク質および他の生物分子)における生物分子の存在を決定する結合反応を意味する。つまり、指定の条件下に(例えば、抗体の場合、免疫アッセイ条件、または核酸の場合、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件)、特異的リガンドまたは抗体は、その特定の「ターゲット」分子に結合し、サンプル中に存在する他の分子には有意量では結合しない。

【0048】

試験化合物が変異したKv 1.1サブユニットの活性を擬似する試験化合物の能力に関して用いる場合の「ミミック」または「擬似」なる用語は、変異Kv 1.1遺伝子を発現している哺乳動物、即ち、KIまたはKO変異体において観察されるものと実質上同様の効果(例えば、行動、電気生理学的、生化学的)を生じる化合物の能力を意味する。

20

【0049】

「試験化合物」なる用語は、本明細書中に記載するアッセイの1つまたはそれ以上においてスクリーンされるべき物質を意味する。該物質は、実質上、いずれかの化学化合物である。それは、単一の単離化合物として存在し得、または化学(例えば、コンビナトリアル)ライブラリーのメンバーであり得る。最も好ましい具体例において、試験化合物は、小分子である。

【0050】

「小分子」なる用語は、医薬に一般に用いられる有機分子に匹敵するサイズの分子を意味する。該用語は、生物学的巨大分子(例えば、タンパク質、核酸など)は除外するが、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導體、構造類似体、またはその組み合わせを含む。好ましい小分子は、約5000Daまで、より好ましくは2000Daまで、および最も好ましくは約1000Daまでのサイズの範囲である。加えて、小分子は、多くの化学クラスを含んでよいが、好ましくは、タンパク質相互作用が可能な官能基を有する有機分子、アミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボニル基である。典型的な小分子化合物には、1つまたはそれ以上の前記の官能基で置換された、環式炭素または複素環構造および/または芳香族または多芳香族構造が含まれる。

30

【0051】

本明細書中に用いるように、「試験サンプル」なる用語は、制限するものではないが、細胞サンプル、組織サンプル、および/または全動物を含む、本発明のアッセイに適したあらゆるサンプルを意味する。好ましくは、試験サンプルは、生物体または生物体の成分(例えば、細胞、組織、体液)から得られる生物学的サンプルである。

40

本発明の種々の態様を、以下のサブセクションにおいて、さらに詳細に記載する。以下のサブセクションにより、本発明をさらに詳細に以下に記載する。サブセクションの使用は、本発明を制限するものではなく、サブセクションは、本発明のあらゆる態様に適用してよい。

【0052】

1. トランスジェニックKv 1.1ノック-イン哺乳動物の作製

50

A. ターゲティング構築物の設計

本発明のノック-イントランスジーンは、好ましくは、Kv 1.1 遺伝子の一部のみ、詳細には、K⁺チャンネルの速不活性化を可能とするアミノ末端における「ボール」ドメインを不活性化する外来DNA配列を含む。変異は、内在Kv 1.1 遺伝子へと置換または挿入される置換変異、挿入変異、フレームシフト変異、またはストップコドン変異であってよい。そのようなトランスジーンは、機能的に破壊されるべき内在Kv 1.1 遺伝子のいくつかの部分と同一である少なくとも1つのDNA配列を、好ましくは含む。Kv 1.1 対立遺伝子のコドン1-70(配列番号1)の全部または部分における変異の存在により、不活性化ドメインの発現が機能的に破壊される(図1Aを参照されたい)。

【0053】

好ましくは、変異により、転写または翻訳の開始の干渉によるか、またはKv 1.1 タンパク質の不活性化ドメインの転写または翻訳のプレマチュアな終結によるかのいずれかにより、機能的破壊を生じる。より好ましくは、トランスジーンは置換型変異であるが、これは、それらが内在Kv 1.1 遺伝子において構築物の安定性を増し、そして第2の組換えおよび転換の見込みを減らすからである。

【0054】

好ましい具体例において、トランスジーンを作製するために用いる核酸構築物(「ターゲティング構築物」)は、免疫反応性エピトープタグおよび/または選択可能なマーカーをコードしている発現カセットの、Kv 1.1 遺伝子産物をコードしているDNA配列へのライゲーションにより作製される。ターゲティング構築物は、内在Kv 1.1 遺伝子の少なくとも一部に相同な発現カセットに隣接している少なくとも一つの配列部分をさらに含む。アミノ末端に隣接する相同配列の存在により、Kv 1.1 遺伝子の不活性化ドメインの挿入変異が可能となる。最も好ましい具体例においてはしかし、ターゲティング構築物は、内在Kv 1.1 に相同な一対の配列が隣接する免疫反応性のエピトープタグおよび選択可能なマーカーの両方を含む(実施例1を参照されたい)。一対の配列は、コドン1-70をコードする内在Kv 1.1 配列、チャンネルの不活性化に必要とされる不活性化ドメインに、好ましくは相同である。

【0055】

別法として、カセットを、カセットの切り出しにより、非機能性の転換を生じるフレームシフト変異を誘導するような位置に、さらに挿入する。さらに別の具体例においては、カセットにより、転写または翻訳をプレマチュアに終結させるためのストップコドンを提供してよい。これらの別の態様を用いて、本発明のトランスジェニック哺乳動物を開発することが可能であるが、これらの方法による内在配列への統合の成功の検出には、サザンハイブリダイゼーションおよびPCR分析を拡張使用することが必要である。それゆえ、ノック-インKv 1サブユニットをトラッキングおよび単離するのを容易にする免疫反応エピトープタグを組み込むことが好ましい。

【0056】

免疫反応性のエピトープ-タグをターゲティング構築物に融合して、抗-タグ抗体が選択的に結合することができるエピトープタグを提供してよい。エピトープタグは、Kv 1.1 遺伝子のコドン1-70、およびより好ましくはコドン1-36に対応するターゲティング構築物のアミノ末端に好ましくは挿入する。転写および翻訳後、ノック-インKv 1サブユニットにおけるそのようなエピトープタグ形態の存在は、タグサブユニットに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供により、Kv 1サブユニットを、エピトープタグに結合する抗-タグ抗体または他のタイプのアフィニティマトリックスを用いるアフィニティ精製により、容易に精製することが可能となる。別法として、ターゲティング構築物を、免疫グロブリン、または免疫グロブリンの特定の領域、IgG分子のFc領域などをコードしている核酸配列と融合して、外来エピトープタグへの特異的結合を可能としてよい。

【0057】

種々のエピトープタグおよびそのそれぞれの抗体は、当該分野で周知である。例には、ポ

10

20

30

40

50

リ - ヒスチジン (poly-his) またはポリ - ヒスチジン - グリシン (poly-his-gly) タグ ; f l u H A タグポリペプチドおよびその抗体 1 2 C A 5 ; c-myc タグ、 およびそれに対する 8 F 9、 3 C 7、 6 E 1 0、 G 4、 B 7、 および 9 E 1 0 抗体 ; および単胞ヘルペスウイルス糖タンパク質 D (g D) タグおよびその抗体が含まれる。他のエピトープタグには、 F l a g - ペプチド、 K T 3 エピトープペプチド、 チューブリンエピトープペプチド ; および T 7 遺伝子 1 0 タンパク質ペプチドタグが含まれる。

【 0 0 5 8 】

好ましい「ポジティブな」選択可能マーカーには、哺乳動物における薬物 G 4 1 8 に対する耐性を付与する細菌アミノグリコシド 3 ' ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (「neo」)、抗生物質ヒグロマイシンに対する耐性を付与する細菌ヒグロマイシン G ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h y g)、マイコフェノール酸の存在下に増殖する能力を付与する細菌キサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (g p t 遺伝子とも呼ばれる) ならびに h p r t 遺伝子、 n D t I I 遺伝子、または、アミノ酸またはヌクレオシド相同物に対する抵抗性を付与する他の遺伝子、または抗生物質などが含まれる。トランスジーン (例えば、 neo R) におけるポジティブな選択可能なマーカーをコードしている DNA は、一般に、E S 細胞におけるその独立の転写を可能とする発現調節配列に作動可能に連結する。さらに、適当な選択培地中で増殖させた場合に細胞に対して発現が細胞毒性であるところの酵素活性をコードする「ネガティブ」な選択可能なマーカーをさらに用いてよい。例えば、H S V - t k 遺伝子をネガティブな選択可能なマーカーとして用いる。ガンシクロピアまたはアシクロピアの存在下で増殖した細胞における H S V - t k 遺伝子の発現は、細胞毒性である ; つまり、ガンシクロピアまたはアシクロピアを含んでいる選択培地中での細胞の増殖により、機能性 H S V - T K 酵素を発現することができる細胞に対して選択する。ポジティブおよびネガティブな選択可能なマーカーの両方を用いる例において、活性 H P R T 酵素を発現する細胞は、所定のヌクレオシド類似体 (6 - チオグアニン、8 - アザプリン、など) の存在下に増殖することができないが、H A T (ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン) を追加した培地中で増殖することができる。逆に、活性 H P R T 酵素を発現できない細胞は、H A T G を含む培地中で増殖できないが、6 - チオグアニンなどの類似体に対して耐性である。

【 0 0 5 9 】

B. 相同組換え

好ましくは、本発明は、特定の DNA 配列 (トランスジーン) の、哺乳動物細胞の天然に生じる K v 1 . 1 配列への統合のコントロール部位へ相同組換えを利用し、およびそれによりその遺伝子の正常な機能を破壊する。相同組換えは、当該分野において周知である。該して、相同組換えは、有糸分裂中に起こる天然のプロセスであって、それにより、同一または実質上類似する (即ち「相同の」) 配列を有する 2 つの核酸分子が、相同配列に隣接する、またはその間の DNA 配列を本質的に「スイッチし」、その結果、分子に最初に存在するそれぞれの 1 領域が他の分子の領域へと、ライゲートされる。

【 0 0 6 0 】

相同組換えの方法を操作して、当該分野の専門家に周知の方法により、特定の遺伝子をターゲットすることができる。ほとんどの方法は、ポジティブまたはネガティブいずれか、またはその両方の選択可能なマーカーを利用して、形質転換された細胞を同定および単離する。さらに、トリメチルソラレンまたは UV 光などの刺激剤を用いることにより、DNA 分子間の組換えの頻度を増すことができる。

【 0 0 6 1 】

好ましい具体例において、ターゲティング構築物は、免疫反応性エピトープタグおよび / または選択可能なマーカーを含む発現カセットを含み、発現カセットには、内在 K v 1 . 1 遺伝子の部分に相同な少なくとも 1 つの配列が隣接する。好ましくは、内在 K v 1 遺伝子のターゲットされる領域 (即ち、コドン 1 - 7 0、特に 1 - 3 6 をコードしている不活性化ドメイン) の全部または一部に対応する核酸配列へと免疫反応性エピトープがライゲートするように、ターゲティング構築物を設計する。免疫反応性エピトープタグによ

10

20

30

40

50

り、ウェスタンブロットまたは免疫アッセイによるさらなる同定および単離が可能となる。別法として、または免疫反応性のエピトープタグに加えて、neoなどのポジティブな選択可能なマーカーを、カセットの発現により抗生物質耐性が得られる(neoにより抗生物質G418に対する耐性が提供される)ように、内在Kv 1の不活性化ドメインに対応する配列へと、またはその付近へと挿入してよい。最も好ましい具体例において、発現カセットは、免疫反応性のエピトープタグおよび選択可能なマーカーの両方を含む。さらに、ターゲティング構築物は、発現カセットの両サイドに隣接し、そのアミノ末端にて内在Kv 1.1の部分に対して相同である第1および第2の配列の対をさらに含む。

【0062】

内在遺伝子のこれらの第1および第2相同配列は、ES細胞における特定のKv 1対立遺伝子に対してトランスジーンを標的する。相同組換えによるターゲティングの好ましい例において、相同配列間に存在する核酸領域が、ES細胞の1つの対立遺伝子におけるターゲットされた外来遺伝子へと特異的に統合するか、またはその部分を置換する。その結果、ターゲットされたKv 1対立遺伝子の1コピーがトランスジーンでの相同組換えにより破壊される。その後のG418での選択により、相同組換えによりゲノムへと統合されたトランスジーンを含んでいるトランスフェクトされたES細胞を選択する。さらに、コードされるKv 1サブユニットへ挿入されるトランスジーンを検出を、免疫活性エピトープタグに対する抗体を用いるアフィニティ結合により行ってよい。

10

【0063】

本発明の最も好ましい具体例において、トランスジェニック動物の細胞へ導入され、そして発現される抗生物質耐性遺伝子を有することが望ましく、即ち、抗生物質耐性遺伝子は、隣接する遺伝子、またはターゲットされた遺伝子において、離れた部分においてさえ、有害な効果、「隣接効果」を有し得る。それゆえ、最も好ましい具体例においては、一度構築物がKv 1.1遺伝子との相同組換えを被ったならば、抗生物質耐性遺伝子が切り出されることを可能とする、1またはそれ以上の耐性遺伝子をノックイン構築物に含める。

20

【0064】

この最も好ましい具体例では、抗生物質耐性選択可能マーカーには、LoxP部位などの繰り返し組換え部位が隣接する。ゲノムDNAにおける、LoxPなどの直接的な繰り返しの存在により、Cre-リコンビナーゼなどのリコンビナーゼタンパク質が介入しているDNA(neo遺伝子)を切り出し、ターゲットされた位置において単一のLoxP部位のみを残すことが可能となる。このLoxP部位の存在は、あるとしても、めったに発現に影響を及ぼさない。この具体例において、選択可能なマーカーをイントロンへと挿入し、ターゲティング構築物の内在遺伝子への統合の成功を同定するためにのみ用いる。一度トランスフェクトされたら、Cre-リコンビナーゼは、ES細胞またはトランスジェニックマウスの特定の組織において発現され、neoマーカーを効果的に除去することができる。Westphal et al. Proc Natl Acad Sci(1996) 93:5860。

30

【0065】

前記のごとく、Kv 1不活性化ドメインの変異は、実施例1に示すように、エキソン1.1の部分、最も好ましくはコドン1-36、および特に1-15に変異を作製することにより為されてよい。コドン7におけるシステイン残基の、セリン残基以外のいずれかの他のコドン(ミスセンス、ストップコドンなど)への変換により、不活性化ドメインが破壊される。変異は、内在エキソン1.1配列の部分に、免疫反応性のエピトープタグ、選択可能なマーカー、ストップコドンのいずれかを置換する、または挿入することにより、または別法として、フレームシフト変異を起すことにより、為されてよい。最も好ましい具体例では、しかし、免疫反応性のエピトープタグのみがアミノ末端を破壊し、最終的なターゲット遺伝子に残る。選択可能なマーカーは、形質転換後に切り出される。好ましくは、エピトープタグを細胞の両方の対立遺伝子中のKv 1.1遺伝子の不活性化ドメインに統合するが、生じるそのような現象の頻度は低い(単一変異現象の頻度の二乗)。それゆえ、ヘテロ接合動物の交差交配を行って、両方の対立遺伝子におけるノック-インKv

40

50

1.1を有するホモ接合体動物を作製してよい。

【0066】

好ましくは、DNA分子は二本鎖だが、一本鎖DNA分子を、本発明に用いてもよい。加えて、DNA分子を細胞に、DNAまたはRNAのいずれかとして導入してよく、これを次いでリバーストランスクリプターゼによりまたは他の手段によりDNAへ変換してよい。例として、本発明を実施するための最良の様式を、実施例1に示す。

【0067】

C.細胞の形質転換

本発明のノック-イン哺乳動物を作製するために、生殖細胞を含む胎児の全細胞タイプを生じることができる全能細胞、例えば胎児幹(「ES」)細胞へ、前記ターゲティング構築物を導入することにより、細胞を形質転換する。多くのES細胞を本発明に用いてよい。マウスからのES細胞が、ネズミ胚盤胞由来の細胞を培養することにより単離されている(Evans et al. (1981) Nature 292: 154-156; Bradley et al. (1984) Nature 309: 255-258; Gossler et al. (1986) Proc. Acad. Sci USA 83: 9065-9069; および Robertson et al. (1986) Nature 322: 445-448)。好ましくはしかし、ES細胞の一次単離物を用いる。一次単離物は、CCE細胞株などの胎児から、またはそれ由来のES細胞のクローナル単離から直接得てよい(Schwartzberg et al. (1989) Science 212: 799-803)。一次単離物は、哺乳動物へ分化するのにより有効であり、および特に、クローナル選択されたES細胞は、CCE先祖細胞株よりもトランスジェニック動物を産生するのに約10倍、より有効である。クローンとして単離されたES細胞株のいくつかの例には、AB1(hp r t +)およびAB2.1(hp r t -)が含まれる。

10

20

【0068】

好ましくは、ES細胞を一次胎児G418R繊維芽細胞および/またはSTO細胞などの間質細胞にて培養する。繊維芽細胞および/または間質細胞は、異常なES細胞のクローナル過剰増殖を妨げる。最も好ましくは、細胞を分化阻害因子(「DIF」)、白血球阻害因子(「LIF」)などの存在下に培養し、プレマチュアな分化を防ぐ。他の公知のDIFには、オンコスタチン エム(Oncostatin M)、可溶性IL-6レセプターを有するインターロイキン(IL-6)、および毛様体神経組織栄養因子(CNTF)、T-LIF(米国特許第5,849,991号)、および所定のサイトカインが含まれる。さらに、発現可能なDIFで間質細胞を形質転換することができ、この際、ES細胞を次いで培養してよい。

30

【0069】

哺乳動物宿主および宿主細胞へ外来核酸を導入する方法は当該分野で周知であり、および宿主細胞によって変化する。方法には、エレクトロポレーション、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム共沈、プロトプラストまたはスフェロプラスト融合、リポフェクション、マイクロ-インフェクションまたはウイルス感染が含まれる。トランスフェクトES細胞を次いで、胚盤胞段階胎児における割腔へと導入し、トランスジェニック哺乳動物の生殖株へ貢献することができる。

【0070】

加えて、ES細胞の割腔への導入前に、前記のような種々の選択プロトコル(例えば、neo選択可能マーカー)を用いて、トランスジーンを導入したトランスフェクトES細胞を選択してよい。別法として、サザンハイブリダイゼーションまたはPCRを用いて、トランスジーンの統合を決定することができる。

40

【0071】

1.マイクロインジェクション

加えて、別法が、トランスジーンを含んでいるトランスジェニック哺乳動物の作製に関して当該分野で公知である。発生の種々の段階における胎児細胞を、対応している種々の方法に従い、用いることができる。接合体を用いる場合、マイクロ-インジェクションが、米国特許第4,873,191号に記載されているように好ましい方法であり、その内容は本明細書中、出典明示により組み込まれる。マウスにおいて、1-2ピコリットル(pl)のDNA溶液の注入を、雄の前核が、約20マイクロメートルの直径に達する場合になすことが

50

できる。さらに、最初の分裂の前に接合体を注入して、それにより、トランスジェニック動物の全体細胞および生殖細胞への構築物の導入を保証することが可能である (Brinstei, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4438-4442)。生じたトランスジェニック哺乳動物は、将来の子孫へ外来 DNA を伝達することができる。さらにこの具体例において、構築物を自己複製しているプラスミドまたはウイルスへとまず導入することは、必ずしも必要でない。

【0072】

2. レトロウイルストランスフェクション

他の具体例において、レトロウイルス感染を用いて、非 - ヒト哺乳動物へトランスジーンを導入する。レトロウイルス感染の方法は、インビトロで胚盤胞段階へと培養された胎児を用い、感染のための割球をターゲットする (Jaenich (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260-1264)。酵素処理により、胚盤胞の透明帯を除去し、トランスジーンを有している複製欠損レトロウイルスによる感染を促す (Van der Putten, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6248-6152)。トランスフェクト割球を次いで、ウイルス産生細胞の単層上にて培養する。加えて、ウイルスまたはウイルス - 産生細胞を、割腔へと注入することができる (Jahner et al. (1982) Nature, 298: 623-628)。この具体例において、生じるトランスジェニック哺乳動物は、細胞のサブセットのみがトランスジーンに組み込まれているので、トランスジーンに関してモザイクである。加えて、トランスジーンのレトロウイルス挿入は、ゲノムの異なる座にて生じ得、これは、子孫において分離する。この方法のわずかな変法においては、妊娠中期の胎児の子宮内レトロウイルス感染により生殖細胞へトランスジーンを導入し、それにより、トランスジーンのより包括的な感染を可能とする (Jahner et al. (1982) 既出)。

【0073】

3. ES細胞への電気穿孔法

最も好ましい具体例では、ターゲッティング構築物を含んでいるトランスジーンを ES 細胞へと、電気穿孔により導入する (Toneguzzo et al., (1988) 核酸 Res., 16: 5515-5532; Quillet et al. (1988) J. Immunol. 141: 17-20; Machy et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8027-8031)。細胞を次いで培養し、前記のようにトランスジーンを効果的に統合した細胞に関して選択する (例えば、G 4 1 8 培地における neo)。別法として、トランスジーンは放射能標識したヌクレオチドにより、または PCR 増幅法によるなど、選択可能なマーカー配列の発現を必要としない検出に関する他のアッセイにより検出してよい。

【0074】

4. 他の非 - ヒトトランスジェニック哺乳動物

マウスに加え、本発明に用いてよい多くの他の天然またはトランスジェニック哺乳動物が存在することが、当業者には理解される。ネズミモデルに関して同様、これらの動物の接合体または ES 細胞を、トランスジーンを誘導するための胎児ターゲットとして用いてよい。各場合に、哺乳動物に特徴的な所望の欠損 K v サブユニット表現型を有するトランスジェニック非 - ヒト哺乳動物が形成される。

【0075】

マイクロインジェクションによるトランスジェニック哺乳動物の開発が、マウスにおいて最もよく行われている一方で、ウサギ、ヒツジ、ウシ、およびブタを含む接合体のマイクロ注入により他のトランスジェニック哺乳動物を作製することが可能である (Jaenisch (1988) Science 240: 1468-1474; Hammer et al. (1986) J. Anim. Sci., 63: 269; Hammer et al. (1985) Nature 315: 680; Wagner et al. (1984) 動物繁殖学 (Theriogenology) 21: 29)。最も好ましくはしかし、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、約 10 - 30% のマイクロインジェクション成功率を有するマウスまたはラットである。加えて、他の非 - ヒト哺乳動物 ES 細胞を用いるレトロウイルス媒介法または電気穿孔法も用いてよい。ES 細胞株のマウスおよびブタのための誘導は、当該分野で報告されている (Robertson, 胎児由来の幹細胞系統 (Embryo-Derived Stem Cell Lines), In: 悪性奇形腫および胎

10

20

30

40

50

児幹細胞(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells): 実際的なアプローチ(A Practical Approach) (E. J. Robertson, ed.), IRL Press, Oxford (1987); PCT公開第W0/90/03432; PCT公開第94/26884)。加えて、ES細胞株は、齧歯動物、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、魚、ブタ、ウシ、霊長類、およびヒトなどの哺乳動物由来またはそれから単離された細胞が好ましいが、あらゆる種(例えば、ニワトリなど)から誘導または単離してよい。本発明の最も好ましい具体例において、ネズミのES細胞を用いる。

【0076】

当該分野で周知のように、他の非 - ヒト哺乳動物のKv 1.1対立変種の形質転換には、これらの種に関するKv 1.1遺伝子配列が必要である。ネズミのKv 1.1遺伝子配列は、Genbankに受託番号第AF033003として寄託されており、一方、ラットのKv 1.1配列は、Genbankに受託番号第X70662として寄託されている。他の非 - ヒト哺乳動物におけるKv 1.1遺伝子の構造および機能は当該分野で周知であり、公に入手可能である。さらに、所定の種に関する所望のKv 1.1配列は、公知のKv 1.1配列からのプローブを用いることにより、ハイブリダイゼーションまたは当該分野で周知の他のこのような方法により、容易に得ることができる。ターゲット哺乳動物のゲノムライブラリーは、適当なプローブ、および常套法により配列決定される遺伝子の残る部分との低ストリンジェンシーを用いてスクリーニングしてよい(例えば、サザンブロット)。

【0077】

一度、所望の種に関するターゲットKv 1.1配列が得られたら、ターゲット構築物を前記のごとく(種々の置換変異、挿入変異、ストップコドン変異、またはフレーム - シフト変異)設計して、Kv 1.1のボールドメインの不活性化を引き起こすことができる。次いで、前記および以下の実施例1に記載する方法を用いて、当業者は、ターゲットインゲクターを種のES細胞または接合体へ導入し、それにより本発明のトランスジェニック哺乳動物を作製し得る。

【0078】

II. インビトロ結合アッセイ

A. 前スクリーニングアッセイ

本発明の一つの具体例において、ロック - インKv 1.1サブユニット(不活性化ドメインの置換、挿入、ストップコドンまたはフレームシフト変異を組み込む)は、Kv 1.1サブユニットの活性を調節する能力に関して試験化合物を前スクリーニングするのに有用である。これらの具体例において、ロック - インKv 1.1サブユニットは、正常のKv 1.1サブユニットの特定の機能、即ち、Kv1ファミリーサブユニットと会合するか、またはカリウムチャンネルを不活性化するか、いずれかのKv 1.1サブユニットの能力を干渉する化合物を同定するのに、特に有用である。1つの前スクリーニング態様において、試験化合物をロック - インKv 1.1サブユニットと接触させ、次いで、ロック - インKv 1.1サブユニットの能力に検出可能な変化を提供することができる試験化合物を選択する。最も好ましくは、検出可能な変化は、ロック - インKv 1.1サブユニットに対する試験化合物の結合の検出である。加えて、免疫アッセイを用いて、ロック - インKv 1.1サブユニットがKv - ファミリーサブユニットと会合するかどうか、または試験化合物の1つが会合を妨げるかどうかを決定してよい。この具体例において、結合アッセイを用いて、Kv 1.1に対する結合においてKv1ファミリーサブユニットに勝る選択性を有する試験化合物またはその逆の化合物を、前スクリーニングすることができる。

【0079】

別法として、比較手段において結合アッセイを用いて、試験化合物を、野生型(「WT」)Kv 1.1サブユニットに結合するが、変異ロック - イン(「KI」)Kv 1.1サブユニットには結合しないその能力に関して前スクリーニングし、それにより、チャンネルの不活性化を阻害することにおける潜在的な候補物を同定する。これらの前スクリーニング結合アッセイのそれぞれを、更なる結合アッセイ、および以下に記載する複合機能アッセイを行う前に用いてよい。

【0080】

固定した、または固定していないターゲット結合タンパク質(KI、WT、KO Kv 1.1、およびKv 1.1)を用いる結合アッセイが、当業者に周知であり、試験化合物をスクリーニングするのに用いてよい。精製細胞に基くまたはタンパク質に基く(細胞フリーの)スクリーニングアッセイを用いて、そのような化合物を同定してよい。例えば、変異Kv 1.1(KI)サブユニットを精製形態にてキャリアにて固定してよく、変異Kv 1.1サブユニットに対する結合を、潜在的な阻害化合物の存在および不在下に測定してよく、競合結合アッセイを、Kv 1ファミリーサブユニットの存在下に測定してよい。逆に、Kv 1ファミリーサブユニットをキャリアに固定してよく、および試験化合物を変異KIKv 1.1の存在下に供してよい。

10

【0081】

インビトロ結合アッセイを、種々の有用な競合分析のために操作して、Kv 1.1サブユニット活性のさらなるモジュレーターを明らかにし得る。1つの好ましい比較法において、精製野生型Kv 1.1サブユニット(「WT」)をキャリアに固定してよく、WT Kv 1.1に対する結合を試験化合物の存在および不在下に測定し、次いで同様に精製形態にてキャリア上に固定し、試験化合物との接触に供したロック-インKv 1.1と比較してよい。WTおよびKIKv 1.1サブユニットの両方が同じ試験サンプル中に存在してよく、または別法として、別の試験サンプル中に存在してよい。この具体例は、KIKv 1.1サブユニットの活性を擬似することができる化合物を同定するのに有用であり得る。WTへは有効に結合するが、KIには結合しない試験化合物を次いでさらなる結合アッセイ、ついで以下に記載するような機能アッセイに、不安疾患に関する潜在的な治療剤としての使用のために供してよい。KOサブユニットは、さらにWTおよびKIゲノタイプに対するコントロールとして用いてもよい。適当な結合アッセイは、別に、WT、KI、またはKOKv 1.1サブユニットの精製ポリペプチド形態を用いてよく、または前記ゲノタイプにそれぞれを発現していることにより特徴づけられる細胞を用いてよい。

20

最も好ましくは、大量の試験化合物を同時にスクリーニングし得、対象のWT、KI、またはKOKv 1サブユニットとの結合活性に関して互いに評価し得る前スクリーニングアッセイを設計してよい。

【0082】

30

B. 高処理量スクリーニング

好ましくは、本発明の前スクリーニングアッセイは、「高処理量」様相に従う。伝統的な研究法は、いくつかの所望の特性(調節性、阻害性、など)を有する「リード化合物」の研究、リード化合物を修正して変種を作製すること、および変種の効能を評価することを含む。他方、高処理量スクリーニングにより、より迅速な薬物開発が可能となり、試験化合物を作製するための好ましい方法となる。

【0083】

1つの好ましい具体例では、高処理量スクリーニング法には、所望の活性を潜在的に有する多数の試験化合物を含んでいるライブラリーを提供することを含む。そのような「コンビナトリアルケミカルライブラリー」を次いで、前記のごとく1またはそれ以上のアッセイにおいてスクリーニングして、所望の特徴的な活性を示すこれらのライブラリーメンバー(特に、化学種またはサブクラス)を同定する。同定される化合物を次いで常套の「リード化合物」として用いることができ、またはそれ自体、潜在的または実際の治療として用いることができる。

40

【0084】

1. 潜在的なKv 1.1モジュレーターのためのコンビナトリアルケミカルライブラリー
コンビナトリアルケミカルライブラリーは、試薬などの多くのケミカル「ビルディングブロック」を組み合わせることによる化学合成または生物学的合成のいずれかにより作製される、種々の化学化合物のコレクションである。例えば、ポリペプチドライブラリーなどの鎖状コンビナトリアルケミカルライブラリーを、所定の化合物の長さ(即ち、ポリペ

50

チド化合物のアミノ酸の数)に関してそれぞれ可能な方法にて、アミノ酸と呼ばれるケミカルビルディングブロックのセットを組み合わせるにより作製する。数百万の化学化合物を、ケミカルビルディングブロックのそのようなコンビナトリアル混合により合成することができる。好ましくは、ライブラリーを、候補の小分子に関してスクリーニングする。そのようなライブラリーの例には、空間的にアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー、またはデコンボリューション、「1 - ビーズ 1 - 化合物」法から、またはアフィニティマトグラフィ選択により作製される合成ライブラリーが含まれる。

【 0 0 8 5 】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの調製およびスクリーニングは、周知である。例には、制限されるものではないが、ペプチドライブラリー(例えば、米国特許第5,010,175号を参照されたい。)が、含まれる。ペプチド合成は、本発明に関して用いることが想定され、および意図される唯一の手段である。ケミカルディバーシティライブラリーを作製するための他の化学物質を用いることもできる。そのような化学物質には、制限されるものではないが、ペプチド(PCT公開第91/19735号)、コードされるペプチド(PCT公開第93/20242号)、ランダムバイオ - オリゴマー(PCT公開第92/00091号)、ベンゾジアゼピン(米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチドなどのダイバーソマー(Hobbs et al. (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913)、ピニロガスポリペプチド(Hagihara et al. (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568)、
- D - グルコーススキャホールディングを有する非ペプチダルペプチドミメティクス(Hirschmann et al. (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218)、小化合物ライブラリーの
の相同有機合成(Chen et al. (1994) J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661)、オリゴカルバメート(Cho et al. (1993) Science 261: 1303)、および/またはペプチジルホスホネート(Campbell et al. (1994) J. Org. Chem. 59: 658)が含まれる。一般には、Gordon et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1385)、核酸ライブラリー(例えば、Strategene Corp.を参照されたい)、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5,539,083号を参照されたい)、抗体ライブラリー(例えば、Vaughn et al. (1996) Nature Biotechnology, 14(3): 309-314、およびPCT/US96/10287を参照されたい)、カルボヒドレートライブラリー(例えば、米国特許5,593,853号を参照されたい)、および小有機分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum (1993) C&EN, Jan 18, page 33; イソプレノイド、米国特許第5,569,588号; チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号、ピロリジン、米国特許第5,525,735号および5,519,134号; モルホリノ化合物、米国特許第5,506,337号; ベンゾジアゼピン、米国特許第5,288,514号など)が含まれる。

【 0 0 8 6 】

コンビナトリアルライブラリーの調製のための装置は、市場入手可能である(例えば、357 MPS, 390 MPS, Advantec Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MAを参照されたい。)

【 0 0 8 7 】

多くの周知のロボットシステムが、液相ケミストリーのために開発されている。これらのシステムには、Takeda Chemical Industries, LTD (Osaka, Japan)により開発された自動合成装置などの自動ワークステーション、および化学者によりなされる手動合成操作を真似るロボットアームを用いる多くのロボットシステム(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.)が含まれる。前記装置のいずれも、本発明を用いる使用に適する。前記のように作動することができる、これらの装置に対する変更物(存在する場合)の性質および器具は、関連する分野の当業者には、明らであろう。

【 0 0 8 8 】

加えて、多くのコンビナトリアルライブラリー自体が市場入手可能である(例えば、ComGenex, Princeton, N. Y.; Asinex, Moscow, RU; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd., Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia,

MD, etcを参照されたい。)。

【 0 0 8 9 】

2 .ケミカルライブラリーの高処理量アッセイ

前記のように、K v 1 . 1 ポリペプチドの結合特異性および/または活性を調節する試験化合物に関する前スクリーニングアッセイを、好ましくは高処理量スクリーニングに用いる。より好ましくは、前 - スクリーニングアッセイは、K v B 1 . 1 ポリペプチドの特徴的な活性の阻害を検出することができる。特定の核酸またはタンパク質産物の存在、不在、または定量に関する高処理量アッセイは、当業者に周知である。

【 0 0 9 0 】

結合アッセイは同様に周知である。つまり、例えば、米国特許第5,559,410号は、タンパク質に関する高処理量スクリーニング法を開示し、米国特許第5,585,639号は、核酸の結合に関する高処理量スクリーニング法を開示するが、米国特許第5,576,220号および5,541,061号は、リガンド/抗体結合に関する高処理量のスクリーニング法を開示する。

10

【 0 0 9 1 】

前 - スクリーニングアッセイに用いるための高処理量スクリーニングシステムはすべて、市場入手可能である(例えば、Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, etc.を参照されたい)。これらのシステムは、典型的には、全サンプルおよび試薬のピペティング、液体ディスペンシング、時期を設定したインキュベーション、およびアッセイに適したディテクターにおけるマイクロプレートの最終的な記録を含む全操作を自動化する。これらの遠心分離システムにより、高処理量および迅速スタートアップ、ならびに高精度の融通性およびカスタマイゼーションが提供される。それぞれの高処理量システムに関する詳細なプロトコルは、そのようなシステムの製造業者により提供される。つまり、例えば、Zymark Corpは、遺伝子の転写、リガンドの結合などの調節を検出するためのスクリーニングシステムを開示する技術的公報を提供する。

20

【 0 0 9 2 】

C .試験化合物の効力を評価するためのアッセイ

一度、多くの試験化合物が同定されたら、インビトロ結合アッセイおよび機能アッセイを用いて、K v 1 . 1 の活性を調節するためのそのような試験化合物の効力をさらに評価してよい。

30

インビトロ結合アッセイを用いて、比較評価のための試験化合物の結合能力を定量および測定してよい。K v 1 . 1 サブユニットの会合における試験化合物の効力を評価することを指向する具体例において、第1の結合混合物を、ロック - インK v 1 . 1 サブユニット、またはそのフラグメント、およびK v 1 サブユニットを合わせることで形成し、次いで第1結合混合物における結合の量を測定する。第2の結合混合物を、ロック - インK v 1 . 1 サブユニット、K v 1 サブユニット、および試験化合物を合わせることで作り、次いで、第2の結合混合物中の結合の量を測定する。第1および第2の結合混合物中の結合の量を比較する。試験化合物は、第2の結合混合物との結合において、第1の結合混合物と比較して低下が認められる場合に、K v 1 サブユニットとK v 1 . 1 の会合を防ぐことができると考えられる。より好ましくは、アッセイにより、試験化合物がロック - インK v 1 サブユニットまたはそのフラグメントの結合活性を、好ましくは10%以上まで、より好ましくは約50%またはそれ以上まで低下させる程度を定量する。任意に、添加剤を添加して、その1およびK v 1 サブユニット、すなわち、2サブユニットとの相互作用を試験してよい。結合混合物の形成および最適化は、当業者の水準内にある。そのような結合混合物を、結合を高めるまたは最適化させるのに必要なバッファーおよび塩と接触させてよく、さらなる対照アッセイを、本発明のスクリーニングアッセイに含めてよい。

40

【 0 0 9 3 】

他方、野生型K v 1 . 1 サブユニットおよびロック - インK v 1 . 1 サブユニットと試験化合物を接触させ、次いで野生型K v 1 . 1 サブユニットにおいて変化を、およびノ

50

ック - イン K_v 1.1 サブユニットの活性に変化のないことを検出することより、カリウムチャンネルの不活性化を阻害するための試験化合物の能力を評価してよい。この後者の具体例において、有効な試験化合物により、WT K_v 1.1 活性が、好ましくは10%以上、より好ましくは約50%以上まで低下する(一方で、KI 活性およびKO 活性は低下しない)。この後者の具体例において、野生型 K_v 1.1 活性を、サブユニット結合能のファンクションとして測定し、一方、以下に記載する他の機能アッセイを、チャンネルの不活性化を阻害することにおける試験化合物の効力を特異的に評価するのに用いてよい。これらの方法により、治療薬として適し得る K_v 1 サブユニットに関して阻害活性を有する試験化合物を同定することができる。野生型およびノック - イン K_v 1.1 サブユニットを1の試験サンプル中に合わせてよく、または別法として、野生型 K_v 1.1 が第1試験サンプル中に存在し、ノック - イン K_v 1.1 が第2試験サンプル中に存在するように提供してよい。さらに、試験サンプルは、細胞、組織、またはトランスジェニック哺乳動物を含んでよい。

10

【0094】

ウェスタンブロットおよび免疫アッセイなどの結合アッセイを用いて、存在する K_v 1 ポリペプチドの量を決定してよい。 K_v 1 サブユニットの検出および/または定量的ための標準的な分析法には、電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高分散クロマトグラフィーなど、または種々の免疫学的方法、液体またはゲル沈降反応、免疫分散(シングルまたはダブル)、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロットティングなどが含まれる。一つの好ましい具体例では、サブユニット K_v 1.1 ポリペプチドは、当該分野で周知の電気泳動タンパク質分離(例えば、1 - または2 - 次元電気泳動)において検出/定量される。ウェスタンブロット(免疫ブロット)分析を用いて K_v 1 ポリペプチドの存在を検出および定量する場合、試験サンプル中のポリペプチドを分子量に基づくゲル電気泳動により分離し、適当な支持体(例えば、ニトロセルロースまたはナイロンフィルター)に移し、ポリペプチドをターゲットするのに特異的な抗体とサンプル中でインキュベートする。当該分野でよく知られるように、ターゲットポリペプチド(K_v 1.1 または K_v 1 サブユニット)を、直接それ自体を標識するか、または標識された抗体(例えば、標識されたウサギの抗 - マウス抗体)を用いて、その後、検出してよい。

20

30

【0095】

好ましい具体例において、免疫アッセイを用いて K_v 1 サブユニットの存在を検出する。本明細書中に用いるように、免疫アッセイは、分析物(例えば、ターゲットポリペプチド)に特異的に結合する抗体を用いるアッセイである。免疫アッセイは、対象の K_v 1 分析物を単離、標的、および定量するための他の物理学的または化学的特性の使用とは異なり、本発明のポリペプチドの抗体に対する特異的結合の検出により特徴付けられる。周知の多くの免疫学的結合アッセイのいずれか(例えば、米国特許第4,366,241号;4,376,110号;4,517,288号;および4,837,168号を参照されたい)が、本明細書中に記載するポリペプチドの検出または定量に十分に適する。免疫学的結合アッセイ(またはイムノアッセイ)は、分析物(対象WT、KI、またはKO K_v 1.1 ポリペプチド)に特異的に結合し、またはしばしば分析物を固定する「捕捉剤」を、典型的に用いる。好ましい具体例において、捕捉剤は抗体である。最も好ましい具体例において、免疫アッセイを用いて、対象の K_v 1.1 サブユニット(WT、KI、またはKO)が K_v 1 サブユニットと会合するかどうかを、以下の実施例1に記載するように決定する。

40

【0096】

該して、ターゲットサブユニット(WT、KI、KO、または K_v 1 -)は、単離されたサンプル受容領域を有する不溶性支持体(例えば、マイクロタイタープレート、アレイ、ビーズ、膜など)に固定してよい。別法として、 K_v 1 タンパク質を含んでいる細胞をアッセイに用いることができる。不溶性の支持体は、ターゲットサブユニットを結合し、次いで溶解性の物質から容易に分離できる、および他の点では、スクリーニングの全方法

50

と適合し得る、いずれかの物質から作製されてよい。そのような支持体の表面は、固体、多孔性、またはいずれかの簡便な形であってよく、典型的には、ガラス、プラスチック(例えば、ポリスチレン)、ポリサッカライド、ナイロン、またはニトロセルロース、テフロン(登録商標)などであってよい。マイクロタイタープレートおよびアレイは、多数のアッセイを少量の試薬およびサンプルを用いて同時に行うことができるので、特に簡便である。ターゲットサブユニットを結合する特定の様式は、それが、本発明の試薬および全方法と適合可能であり、ターゲットサブユニットの活性を維持し、非拡散性である限り重要ではない。結合の好ましい方法には、抗体(タンパク質を支持体に結合する場合、リガンド結合部位または活性化配列のいずれかを配置的にはブロックしない)、「スティック」またはイオン性支持体への直接結合、化学的架橋、表面におけるタンパク質の合成または試薬などが含まれる。タンパク質または試薬の結合の後、過剰な非結合性物質を洗浄により除去する。サンプル受容領域を次いで、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、または他の無害のタンパク質または他の部分とのインキュベーションによりブロックしてよい。

【0097】

前記のように、好ましい具体例においては、ターゲットKv 1(WT、KI、またはKO)タンパク質を支持体に結合し、次いで試験化合物をアッセイに添加する。別法として、試験化合物を支持体に結合し、Kv 1タンパク質を添加する。治療剤として潜在的に重要な新規試験化合物には、ケミカルライブラリー、ペプチド類似物などのスクリーンにおいて同定される特異的抗体および非天然の結合試薬が含まれる。ヒトの細胞に対して低毒性を有する試薬に関するスクリーニングアッセイが、特に重要である。標識インビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合に関する免疫アッセイ、リン酸化アッセイなどを含む広範な種々のアッセイを用いて、試験化合物の効能を同定および評価してよい。

【0098】

Kv 1タンパク質に対する試験化合物の結合の測定は、多くの方法により行ってよい。特定の具体例において、試験化合物を標識し、次いで結合を直接測定する。例えば、これは、Kv 1タンパク質の全部または部分を支持体に結合させ、標識された候補試薬(例えば、蛍光標識)を添加し、過剰の試薬を洗浄し、次いで標識が固体支持体に存在するかどうかを測定することにより行ってよい。種々のブロッキングおよび洗浄ステップを、当該分野で公知のごとく、用いてよい。

【0099】

「標識された」は、本明細書中、化合物を、検出可能なシグナルを提供する分子または化合物、例えば、ラジオアイソトープ、蛍光剤、酵素、抗体、磁気粒子などの粒子、化学蛍光剤、ピオチンおよびストレプトアビジンなど、ディゴキシンおよび抗ディゴキシンなどで直接または間接的に標識することを意味する。特異的結合メンバーに関しては、相補的メンバーを、検出を提供する分子で、通常通り、公知の方法に従い標識する。標識は、直接または間接的に、検出可能なシグナルを提供することができる。最も好ましい具体例では、標識は、前記のような免疫反応性のエピトープタグである。

【0100】

いくつかの具体例においては、成分の1つのみを標識する。例えば、タンパク質(またはタンパク質性候補物質)を、チロシン部位にて、^{1 2 5}Iまたはフルオロフォアを用いて標識してよい。別法として、1以上の成分を、異なる標識で、例えば、タンパク質のために^{1 2 5}Iおよび候補物質のためにフルオロフォアを用いて標識してよい。

【0101】

好ましい具体例において、試験化合物の結合を、比較結合アッセイの使用により測定する。この具体例では、競争物質は、ターゲットKv 1サブユニットに結合することが公知の結合部分であり、即ち、競争物質は、Kv 1.1サブユニットである。1の具体例において、試験化合物は標識する。試験化合物または競争物質のいずれかまたはその両方を、結合を可能とするのに十分な時間、タンパク質へまず添加する。インキュベーションは

、 1 および 1.1 の結合のために、最適の活性を促進するあらゆる温度、典型的には、4 および 37 の間で行ってよい。インキュベーション期間は、最適の活性に関して選択するが、迅速な高処理量スクリーニングを促進するために最適化してよい。典型的には、10分～1時間が十分である。過剰の試薬を一般に除去し、または洗浄する。第2の成分を次いで添加し、標識された成分の存在または不在を検出し、結合を示す。好ましい具体例では、競争物質(即ち、Kv 1.1)をまず添加し、次いで試験化合物を添加する。競争物質の置換が、試験化合物が対象のKv 1タンパク質に結合していること、それゆえ、それに対して結合できること、および典型的には、対象のKv 1タンパク質の活性を潜在的に調節していることの指標である。この具体例において、成分のいずれかを標識することができる。つまり、例えば、競争物質を標識する場合、洗浄溶液中の標識の存在は、試薬による置換を示す。別法として、試験化合物を標識する場合、支持体における標識の存在は置換を示す。

10

【0102】

別の具体例において、試験化合物をまず、インキュベーションおよび洗浄しながら添加し、次いで競争物質(即ち、Kv 1.1サブユニット)を添加する。競争物質による結合の不在は、試験化合物が高アフィニティでKv 1タンパク質に結合することを示し得る。つまり、試験化合物を標識した場合、支持体植えの標識の存在は、競争物質の結合の欠如と合わせて、試験化合物がKv 1タンパク質に結合できることを示す。

【0103】

1つの好ましい具体例において、方法は、対象Kv 1サブユニットの活性を調節することができる試験化合物を評価するためのディファレンシャルスクリーニングを含む。この具体例において、方法は、試験化合物、Kv 1タンパク質、および競争物質を含む。競争物質の結合を両サンプルに関して測定し、2つのサンプル間の結合の変化または違いが、Kv 1タンパク質に結合することができる、および潜在的にその活性を調節することができる試験化合物の存在を示す。つまり、競争物質の結合が第1サンプルに対して第2サンプルにおいて異なる場合、試験化合物はKv 1タンパク質に結合することができる。

20

【0104】

別法として、好ましい具体例は、WT Kv 1タンパク質に結合するが、KIまたはKO Kv 1サブユニットには結合することができない、またはKIには結合することができるが、KOには結合することができない試験化合物の能力を評価するためのディファレンシャルスクリーニングを用いる。Kv 1タンパク質の構造をモデル化してよく、合理的薬物設計に用いて、その部位と相互作用する試薬を合成する。Kv 1活性に影響を及ぼす試験化合物を、タンパク質の活性を高めるか、または減じるかいずれかの能力に関して化合物をスクリーニングすることにより同定してもよい。

30

【0105】

完全に非機能性のKv 1.1サブユニット(KO)などのポジティブ対照およびネガティブ対照を、アッセイに用いてよい。好ましくは、全対照および試験サンプルは少なくとも3組にて行い、統計学的に有意な結果を得る。全サンプルのインキュベーションは、タンパク質に対する試薬の結合に十分な時間である。インキュベーション後、全サンプルを、非特異的結合物質から洗浄除去し、結合した、一般に標識した試験化合物の量を測定する。例えば、放射能標識を用いる場合、サンプルを、シンチレーションカウンターにてカウントして、結合した化合物の量を決定してよい。

40

【0106】

種々の他の試薬をスクリーニングアッセイに含めてよい。これらには、最適のタンパク質タンパク質結合を促進し、および/または非特異的またはバックグラウンドの相互作用を低下させるのに用いられてよい塩、中性のタンパク質、例えばアルブミン、界面活性剤などが含まれる。これ以外に、アッセイの効能を改善する試薬、例えば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗微生物物質などを用いてよい。成分の混合物は、必要な結合を提供するあらゆる順序で添加してよい。

50

【0107】

本発明の所定の態様においては、方法は、疾患におけるKv 1.1および/またはA型K⁺チャネルの活性を変化させる試験化合物をデータベースに入力すること/記録することをさらに含んでよい。

【0108】

前記免疫アッセイにおける使用のための抗体は、市場入手可能であり、または用意に調製することができる。抗Kv 1.1抗体は、Veh et al. (1995) Eur. J. Neurosci. 7: 2189-2205によりすでに記載されている。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体(抗Kv 1.1抗体)のいずれかを、本発明の免疫アッセイに用いてよい。当業者には、ポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体の精製および/または濃縮のための免疫学の分野で一般的な種々の方法が理解されるであろう。例えば、Coligan, et al.(1991) Unit 9, 免疫学における現在のプロトコル(Current Protocols in Immunology), Wiley Interscienceを参照されたい。

10

【0109】

本発明の好ましい具体例において、免疫アッセイは、モノクローナル抗体(「mAb's」)を用いる。モノクローナル抗体の調製に関しては、マウスまたはラットの免疫化が好ましい。本明細書中に用いる「抗体」なる用語は、完全な分子、ならびにエピトープ決定因子に結合することができるFabおよびF(ab')²、および/または一本鎖抗体(例えば、scFv)などのそのフラグメントが含まれる。mAb'sを分泌しているハイブリドーマの産生のために用いられる一般的な方法は、周知である。mAb'sの特異性の確認は、比較的通常のスクリーニング法(酵素結合免疫吸着アッセイ、または「ELISA」、BiaCoreなど)を用いて行い、目的のmAbの結合特異性および/または親和性を測定することができる。

20

【0110】

加えて、抗体フラグメントおよびヒト抗体を産生することができる。一本鎖抗体(scFvまたは他)などの抗体フラグメントは、ファージディスプレイ法を用いて産生/選択することができる。ヒト抗体を、事前の免疫化を用いずに、ファージ上に巨大および種々のV-遺伝子レパートリーを示すことにより産生し、ハプテン、ポリサッカライド、セルフトタンパク質、細胞表面抗原などに対する無数の抗体を含むライブラリーを作製することができる。

30

【0111】

I I I .機能アッセイ

1つの具体例では、本発明により、Kv 1.1の活性およびそれゆえ、不安に関連するタスクにおけるパフォーマンスを調節する物質をスクリーニングする方法が提供される。方法は、当該化合物の存在下でのKv 1.1遺伝子産物(例えば、Kv 1.1サブユニットタンパク質)の活性レベルを検出すること、および/またはKIまたはKO遺伝子産物などの対照に対する活性レベルを比較することを含む。特に、KIトランスジェニック哺乳動物をポジティブ対照として用いて、潜在的な不安緩解化合物を同定してよい。そのようなアプローチの例は、以下に記載する。

【0112】

A .行動アッセイ

1の具体例において、Kv 1.1活性のモジュレーターを、試験認識能力、不安またはストレス反応に対する種々の行動アッセイを用いて、アッセイすることができる。そのようなアッセイには、試験化合物をWT、KI、またはKO哺乳動物に投与し、次いで哺乳動物の行動における試験化合物の効力を評価することが含まれる。好ましい行動アッセイは、認識、海馬関連タスクを測定する。そのようなアッセイには、制限されるものではないが、コンテクスチュアル条件付け(Kim and Fanselow (1992) Science, 256: 675; および Phillips and LeDoux Behav. Neurosci., 106: 274を参照されたい)、空間的学習(Morris et al. (1982) Nature, 297: 681を参照されたい)、ローターロッドアッセイ、条件付け味覚嫌悪、社会的認識、および食品の好みの社会伝達(Bunsey and Eichenbaum (1995

40

50

), 海馬(Hippocampus), 5: 546)が含まれ、そのいくつかを以下の実施例に示す。不安を測定する好ましい行動アッセイには、高架ゼロ迷路、衝突アッセイ、および恐れを増す刺激アッセイが含まれる。

【0113】

特定の時点での行動は、哺乳動物の特定の生理学的状態(例えば、摂食管理、生殖情況、睡眠の量など)に依存し得るので、そのようなアッセイは、ポジティブおよびネガティブコントロールの両方を用いて好ましくは行う。ネガティブコントロールは、「試験」哺乳動物と同じ方法だが、試験化合物の投与を用いず(または有意に低投与量の投与を用いて)処理された哺乳動物である。好ましい具体例において、ポジティブコントロールには、Kv 1.1ノックイン変異を有する哺乳動物、最も好ましくはマウスが含まれる。KI Kv 1.1哺乳動物の特徴的な行動に類似する不安の低下を誘導する試験化合物、または試験化合物の組み合わせが、Kv 1.1活性を調節することができる物質である。

10

【0114】

B.生理学的アッセイ

1.ホルモンアッセイ

本発明の他の具体例では、ホルモンアッセイを用いて、ストレスに対する動物の反応を評価してよく、またはストレスを低下させることにおける試験化合物の効力を評価してよい。この具体例では、試験化合物を、コルチコステロンまたはc-fos活性化などのストレス関連性のホルモンインジケータの呈示を試験することにより、効能に関してアッセイする。マウスの副腎からのコルチコステロンの分泌は、一般に、信頼できるストレスの内分泌ホールマークと考えられる。動物は、ストレスに対してこのホルモンを分泌し、血漿におけるコルチコステロン反応を、ストレスの発生後5分以内に検出することができる。この反応は、しばしば、低下した不安レベルを示す動物において、分泌の大きさまたは時間のいずれかが変化することが多い。動物は、典型的には、環境刺激により誘発される穏やかな形態のストレスに供する。足のショック、水泳の強制、および抑制が、齧歯動物において実施されている一般的な環境ストレスのいくつかである。

20

【0115】

このアッセイの1つの好ましい具体例において、KI、KO、およびWT哺乳動物を、環境ストレスに供し、そのストレス関連性のホルモンのレベルを、ストレス後の異なる時間間隔にて測定する。最も好ましくは、ホルモンは、血漿コルチコステロンであり、測定は、ストレス発生後、0、30、60、および90分の時間間隔にて行う。他の好ましい具体例では、c-fosの活性化は、インサイチュハイブリダイゼーションにより測定してよく、そのレベルを、以下の実施例8に示すように、デジタル化および定量してよい。

30

【0116】

前記ホルモンアッセイをさらに、試験化合物を含めるべく変更してよい。最も好ましい具体例において、対象動物に試験化合物を投与し、試験化合物を代謝するのに十分な時間後、動物を環境ストレスに供する。ホルモンレベルの測定を次いで行い、動物が、WT、KI、またはKOKv 1.1哺乳動物の特徴的な態様と一致するホルモンパターンを有するかどうかを測定する。最も好ましくは、WT哺乳動物における投与により、非処置のKI哺乳動物と一致するホルモンパターンを生じる試験化合物を探索する。以下の実施例5に記載するように、トランスジェニックKIマウスは、低下した不安パターンを示唆するコルチコステロンレベルを有する。

40

【0117】

2.高体温アッセイ

他のアッセイを用いて、ストレスに対する動物の反応を評価、およびストレスを低下させる試験化合物の能力を評価してよい。Borsini et al. (1989)およびVan der Heyden et al. (1997)のごとく、ストレス誘導性の高体温をWT、KI、およびKOMウスと合わせて用いて、その不安態様を評価することができる。Borsini et al. 精神薬理学(Psychopharmacology) (1989) 98: 207-211およびVan Der Heyden. (1997) 生理学および行動(Ph

50

ysiology and Behavior) 62 : 463-470。動物を典型的に、穏やかな形態の環境ストレスに供し、典型的には、特徴のプローブを動物の温度を測定するために用いる。前記のホルモンレベルに関して同様、環境ストレスに対する動物の高体温の程度は、動物の不安の指標である。

【0118】

前記実施例6に示すように、KI、KO、およびWTトランスジェニック哺乳動物を環境ストレスに供し、高体温の程度を測定する。クロロジアゼポキシドのような不安緩解剤を、動物の反応が実際に、不安緩解反応に一致するかどうかを確認するための比較実験にさらに用いてよい。高体温アッセイをさらに、試験化合物の効力を評価するために変更してもよく、この場合、対象動物に試験化合物を投与し、試験化合物を代謝するのに十分な時間後、環境ストレスへと次いで供する。高体温の程度を次いで測定して、動物が、WT、KI、またはKOKv 1.1哺乳動物の特徴的な特徴と一致する高体温のパターンを有するかどうかを決定する。最も好ましくは、試験化合物のWT哺乳動物への投与により、非処置のKI哺乳動物と一致する高体温のパターンが生じる。以下の実施例6に記載するように、ストレス誘導性の高体温は、クロロジアゼポキシドを用いて投与したWTマウスにおける同様の程度へとKIマウスにおいて平坦化され、それゆえ、低下した不安パターンおよび従って、不安緩解特性がさらに示唆される。

10

【0119】

3.電気 生理学的アッセイ

Kv 1.1活性は、当該分野で公知の種々の電気生理学的方法により容易に測定することができる。Gieseおよびその同業者による研究により説明されるように、Kv 1.1活性のノックアウトにより、反復性の発火中のスパイクの拡張と海馬CA1ニューロンの緩慢な後過分極(sAHP)の低下の両方が生じる。つまり、WT、KI、またはKO動物に試験化合物を投与し、次いで、試験するか、またはその組織を試験して、その電気生理学的反応を比較することができる。最も好ましくは、海馬の電気生理学的記録をなし、より好ましくは海馬CA1ニューロンの記録をなす。そのような記録は、インピボで行うことができるが、好ましい具体例では、そのような記録は、海馬薄片調製物からなす。そのような調製物を作製する、またはそれらから記録する方法は、本明細書中に出典明示により組み込むPCT公開第W000/24871号に示されるように、当業者に周知である。好ましくは、WT哺乳動物におけるその投与により、KI哺乳動物のものと一致する電気生理学的パターンを生じる試験化合物を探索する。

20

30

【0120】

加えて、異種A型K⁺チャンネルは、異種発現系において発現させることができ、ノックインKv 1.1および対応するKv1ファミリーサブユニットを発現している細胞を、電気生理学的に測定することができる。好ましくは、細胞は、ノック-インKv 1.1およびKv1 またはそのそれぞれのRNAを含んでいるベクターで形質転換したツメガエル属卵母細胞またはHEK細胞である。これらの細胞を試験化合物と接触させ、次いで試験化合物のA型チャンネル伝導における効果を、全細胞電圧クランプ、電流クランプにより、および/またはパッチクランプを用いて、測定および比較することができる。タンパク質発現および電気生理学的記録に関するこれらの方法は、当業者に全て周知である。

40

【0121】

4.ポジティブコントロールとしてのノック-インKv 1.1哺乳動物

前記のごとく、本発明のKv 1.1ノック-イン哺乳動物は、広範な種々のコンテキストにおいて、特にポジティブ不安コントロールとして有用である。不安などの高レベルの機能は、突発的な神経ネットワークの特性であり、それ自体、高度復元(例えば、シングルシナプス)モデルにおいて、アッセイすることができない。行動試験には、例えば、無傷の生きている哺乳動物が必要である。同様に、ネットワークに関連する特性(例えば、CA1活性パターン)には、機能性の神経ネットワークが必要である。

【0122】

つまり、潜在的なモジュレーター(例えば、試験化合物)のそのようなシステムにおける効

50

果の評価が、ポジティブコントロールの使用により、大いに促進される。本文脈において、Kv 1.1ノック-イン哺乳動物の行動により、試験化合物を用いて処置した「正常な」哺乳動物の行動を評価するための良好な参照物が提供される。ホルモンレベルまたは高体温などの他の生理学的な指標も、KI動物との比較により評価されてよい。同様に、試験化合物で処置した神経学的調製物のパフォーマンス(例えば、海馬切片調製物の電気生理学的反応)を、Kv 1.1ノック-イン哺乳動物から得た神経学的調製物のパフォーマンスと比較して、試験化合物が、Kv 1.1ダウン-レギュレーション擬似様式で電気生理学的反応を変化させる能力を評価することができる。

【0123】

KI変異体をさらに、早老または促進された脳の退化(アルツハイマー病に伴うことが見出されているものなど)を示す他のマウスモデルと交雑させて、Kv 1.1ノック-インが、これらの哺乳動物モデルにおける関連する行動疾患を変更するかどうかを決定してもよい。

10

【0124】

IV.スクリーニングキット

1態様において、本発明により、本明細書中に記載するアッセイを行うためのキットが提供される。キットは、好ましくは、Kv 1.1ノック-イン哺乳動物またはKv 1.1ノック-イン哺乳動物由来の細胞または組織を含む。キットはさらに、本明細書中に記載するアッセイ法における使用のための適当なバッファおよび他の溶液およびスタンダードを含むことができる。

20

加えて、キットは、本発明の方法の実施のための指示(すなわち、プロトコル)を含んでいる説明資料を含んでよい。説明資料は、典型的には、記載または印刷されたものを含むが、それらはそのようなものに制限されない。そのような指示を保存することができ、最終の使用者にそれらを伝達することができるあらゆる媒体が、本発明により意図される。そのような媒体には、制限されるものではないが、電氣的貯蔵媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CD ROM)などが含まれる。そのような媒体は、そのような説明資料を提供するインターネットのサイトへのアドレスを含んでよい。

【0125】

実施例

以下の実施例を、他を詳細に記載する場合を除いて当業者に周知かつ常套の標準的な方法を用いて行う。以下の実施例は例としてのみ示し、いずれにせよ、本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきでない。

30

【0126】

実施例 1

速不活性化に必要なN末端を欠くKv 1.1ノック-インマウスの作製

Kv1-ファミリーK⁺チャンネルを不活性化する能力を欠くが、Kv1ファミリー-サブユニットと会合し、それによりチャンネル表面発現を高める能力は保持する変異体Kv 1.1遺伝子を有する遺伝子変更マウスを開発した。Kv 1遺伝子ノックアウトと異なり、ノック-インマウスはN型不活性化を付与する能力を除いて、Kv 1.1の全機能特性を保持する。

40

【0127】

A.Kv 1.1-ターゲットES細胞の作製

図1Aは、免疫反応性エプタグの導入の前の内在マウスKv 1遺伝子構造およびエキソン組成を示す。3つのKv 遺伝子(Kv 1.1、1.2、および1.3)それぞれは、C末端にエキソドメイン3-15を共通して持つが、別に、5'末端にてスプライシングされて、ユニークなN-末端タンパク質配列(エキソン1.1、1.2、および1.2)をコードする。図1Bに示すようなKv 1.1ターゲッティング構築物を設計するために、ゲノミックBacクロンを、Genban受託番号No. X70662によりコードされるラットのKv 1.1タンパク質のN末端の90個のアミノ酸をコードしているDNAフラグメ

50

ント(Research Genetics, Bethesda, MD)を用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、129/SvEvマウスから単離した。BamHIをマップし、次いで7.2 KbのBamHIフラグメントを単離した。Kv 1.1タンパク質の始めの35個のアミノ酸をコードしているエキソン1.1aを含んでいる1.2 KbのEcoRIフラグメントを、血液凝集素エピトプタグ(配列番号2)、PCR法をオーバーラップさせることによる3xHAと置き換え、チャンネル不活性化に関して機能的に無効なタンパク質を生じた。LoxP配列が隣接するネオマイシン耐性カセットを、エキソン1.1aの下流のイントロン100bp内に、EcoRI部位にて挿入した。この変更EcoRIフラグメントを配列決定し、1.5 KbのEcoRIおよび4.2 RI/BamHIフラグメントとライゲートバックし、ターゲティングベクターを作製した。

10

【0128】

R1胎児幹(ES)細胞(Nagy et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8424-8428)をBamHI-鎖状Kv 1.1ターゲティングベクターで電気穿孔した。細胞をG418により選択し、次いで200個のコロニーをサザンブロット分析のために突いた。以下に記載するゲノミックサザン分析により、相同組換えを被って、neoFlloxPと共に3xHAタグを組み込む3クローンを得た。

【0129】

キメラマウスを、C57BI6マウス胚盤胞への注入により3xHAおよびneoFlloxP対立遺伝子を有するESクローン#145および#191から作製した。各クローンからの80-90%のオス着色毛皮キメラを選択し、129/SvEv野生型雌とさらに交配し、129/SvEv地のF1ヘテロ接合体を得た。これらの子孫を交雑して、分析のためのF2ホモ接合体を得た。neoFlloxPの重要なイントロン内における挿入により、KvB1遺伝子による転写が偶然的に抑制され、こうしてこの対立遺伝子を、Kvb1に関するノックアウトとする。動物のサブセットを5世代C57/bI6にて異系勾配した後、ホモ接合体合成のために血縁交配(sib-mated)させた。全実験は、他を示さない限り129/SvEv地またはN5-C57/bI6地の両方で行った。

20

【0130】

B.Kv 1.1に関するN末端ヌル変異-(Kv o)を有するノック-インマウスの誘導雌のヘテロ接合体Kv o-neoFlloxPマウスからの前核を回収し、Cre-リコンビナーゼをコードしているプラスミドでマイクロインジェクトした。子宮内組換えを、子孫においてNeo-Flloxカセットを切り出し、イントロン内にKv 1.1のN末端の3xHA変異(Kv o)およびLox-P配列のシングルコピーを残すことを目的として行った。擬似妊娠させた雌へのマイクロインジェクトした前核の卵管輸送後、新生子犬を、Creにより媒介されるneoFlloxPカセットの切り出しの証拠に関して分析した。ゲノミックDNAのPCR分析により、3xHAタグを有するほぼ100%の子孫がインビボでの切り出しを被ったことが明らかとなった。

30

【0131】

C.ゲノミックサザンブロット分析

ESクローンからのゲノムDNAを、3時間37°CにてのプロテイナーゼK消化により調製した。イソプロパノール中での沈殿後、DNAをTEに再懸濁し、BamHIにて制限消化した。DNAフラグメントを0.8%のアガロースゲル上に溶解し、次いでナイロン膜へと一晚移した。ターゲット構築物の上流の300bpのBamHI/EcoRIフラグメントをP³²dCTPにて放射能標識し、プローブとして用いた。3xHA配列内の内部BamHIの存在により、野生型Kv 1対立遺伝子由来の7.2 Kbの代わりに1.2 KbにハイブリダイズしているバンドとしてターゲットされるES細胞の同定が可能となる。neoFlloxPの存在を次いで、neo選択カセットに対して指向されるプローブ(TK-ネオマイシンミニジーン)を用いて確認した。図1Cにより、BamHI/EcoRIプローブにより、野生型Kv 1対立遺伝子に関する~7.2 Kbのバンド、および3つのターゲットされたES細胞(191、145、51)に関する~1.0 Kbの追加のバンドが同定されたことが示される。

40

50

【0132】

D.Kv o (KI)およびKv neo Flox (KO)のPCR分析
 一对のプライマー(Kv neo プライマー)を用いて、マウスゲノム内でのNeo - Flox P 配列の存在を特異的に検出した。エキソン1.1の3'エキソンイントロン結合に対応するフォワードプライマー1(配列番号3; 5'TTGAAAGTGACTTAACTCAGCGC)およびNeo 配列に特異的なリバースプライマー1(配列番号4; 5'GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC)を用いて、Kv Neo - Flox 対立遺伝子を有する動物由来の400bpのフラグメントを増幅した。両ホモ接合体およびヘテロ接合体KO動物を、この分析により確認した。

【0133】

フォワードプライマー1、およびneo Flox インサクションの30bp下流に対応しているリバースプライマー2(配列番号5; 5'GGCCACATCTTAAAGATCGCAC)を用いる第2の対のプライマー(Kv o KI プライマー)を用いて、WT、Kv o KI またはKv o KO 対立遺伝子を有する子孫の接合体の特徴を区別した。c - fos に特異的なさらなるプライマー対を内部ポジティブコントロール(配列番号6; fos F プライマー: 5'AGGAGGGAGCTGACAGATACACTCC および配列番号7; fos R プライマー: 5'CAAGGATGGCTTGGGCTCAGGGTCGT)として用いた。94、54、および72 にてそれぞれ30、30、および60秒間の30サイクルのPCR増幅を、尾の生検からのゲノムDNA(プロテイナーゼKにて消化された尾の1:200希釈)を用いて行った。4%アガロースゲル(NuSieve 3:1, BMA, Rockland, ME)を用いて、生じたバンドを溶解した。図1Eに示すように、Kv o KI プライマーは、野生型Kv 1.1 対立遺伝子から230bpのフラグメントを増幅したが、Lox - P 配列の1コピーのために、Kv o KI 対立遺伝子からは260bpのフラグメントを増幅した。Kv o KO 対立遺伝子は、典型的には、2つのプライマー間に介入しているneo - Flox P 配列のサイズ(1.4Kbのインサートサイズ)のために増幅しないが、Kv neo プライマーを用いてポジティブにスコアする。

【0134】

E. RNase 保護アッセイ

野生型Kv エキソン1.1および3xHA - Ex1に相補的なRNAプローブを、T7 RNAポリメラーゼをP³CTPの存在下に用いるインビトロ転写により合成した。Kv o (KI)、Kv o Neo - Flox (KO)およびKv 1.1野生型動物由来のトータル海马RNA(5μg)をハイブリダイズさせ、RNase - 抵抗性バンドを6%PAGE上に、製造業者の指示(RPAIIIキット、Ambion, Austin, TX)に従い溶解した。図1Dおよび1Eにより、変異Kv o (図1D)対WT Kv 1.1(図1E)に対して割り当てられる2つのプローブのエキソン構造、およびそれぞれのプローブに対するハイブリダイゼーションから生じるRPAゲルを示す。3xHAプローブにより、WTにおいて、正常なKv 1.1 mRNAのN末端の失われた3xHA配列から生じる220bpのより短い保護されたバンドが明らかとなった。同プローブは、ヘテロ接合体(WT/KI)およびホモ接合体(KI/KI)動物の両方に420bpのバンドを生じた。逆に、正常なKv 1.1 mRNAに対するプローブは、WT mRNAからの480bpの完全に保護されたフラグメントを示し、一方、3xHA配列に隣接している2つのフラグメント(210 および140)が、KI mRNAにおいて保護された。

【0135】

これらのデータ両方により、KI動物において3xHA変異(Kv o)をコードしているmRNAの発現が確認された。重要なことに、Flox - neoカセット(n+/n+)を有する動物は、いずれのプローブからも特異的なバンドを示さなかった。つまり、Kv + Neo動物は、Kv 1.1発現が完全に欠損しており、Kv 1.1に関してKOであった。

【0136】

F. ウェスタンブロット分析

Kv 1 およびKv 2 に関する抗体を、すでに記載されているように用いた(Phodes et 50

al., 1997, J. 神経科学 (Neuroscience) 17: 7084-9)。抗 - H A ポリクローナル抗体 (BMB, Germany) を 1 : 2 0 0 0 にて用いた。抗 - シナプシンポリクローナル抗体 (Chemicon, Temecula, CA) は、1 : 5 0 0 0 にて用いた。K v o (K I)、K v o N e o - f l o x (K O) または野生型 K b 1.1 に関するマウスのホモ接合体から脳領域を切り出し、トライトン x 1 0 0 および 1 x 完全プロテアーゼインヒビターカクテル (BMB, Germany) を含んでいるトライトン溶解バッファー中でホモジェナイズした。タンパク質サンプルを S D S - P A G E 上に溶解し、ニトロセルロース紙に移した。ウェスタンブロット上の免疫活性バンドを、フィルム (ハイパーフィルム、Amersham) 上での化学蛍光暴露により検出した。

【0137】

ウェスタンブロット分析により、ホモ接合 K I 動物が、内在 K v 1 発現により予測される解剖領域において、野生型 mRNA に匹敵するレベルで、K v o mRNA およびタンパク質を発現することを示した。皮質、線条、海馬、小脳、中脳、および視床からの脳領域を切り出し、図 1 G に示すように、特異的免疫反応に関して分析した。各組織からのタンパク質抽出物 (~ 2 0 μ g / レーン) を、ポジティブコントロールとしてのラットの脳の膜 (R B M) と共に流した。正常な 1 2 9 / S v E v マウスからの野生型 (W T) 組織を、K v 1、K v 2、シナプシン 1 および H A に関してアッセイした。K v o - n e o f l o x P (K O) 動物からの組織を、H A アッセイを行わないことを除いて、W T サンプルにおけると同様にアッセイした。K v o 動物からの組織を、特に H A 発現のみに関してアッセイした。内在 K v 1 タンパク質が、W T の全脳領域において同定され、より高レベルが海馬および線条において認められた。K v o 変異体タンパク質発現は、K v o K I 動物の海馬および線条における高まった H A 免疫活性により示されるように、内在 K v 1 の発現パターンを密接に擬似した。

【0138】

ウェスタンブロット分析により、H A タグの存在が確認され、さらに、K v 1 に対する抗体を用いる場合、K v o K O マウスにおける K v 1 の発現の欠損も立証された。これらの K O マウスにおいて、W T 動物と比較した場合、K v 2 発現において明らかな変化はなく、効果において代償的な変化がないことを示唆する。加えて、Nakahira らは、K v 1 N - 末端の不在が、K v 1 ファミリー サブユニットとの会合に有害な影響を与えないことを示している (Nakahira et al., J Biol Chem (1996) 271: 7084-7089)。Rhodes et al, J. Neurosci. (1996) 16: 4846-4860 にすでに開示されているような同時免疫沈降のための抗体の使用により、K I マウスにおいて、K v 1 ファミリー サブユニットとの H A - タグ K b o の正確な会合が明らかになった (データは示していない)。

【0139】

実施例 2

遺伝変更マウスにおける空間学習における N 末端を欠く K v 1.1 サブユニットの効果 K v 1.1 サブユニットにおける N 末端の重要性を、トランスジェニックノック-インマウスの表現型を、ノック-アウトマウスおよび野生型マウス (1 2 9 / S v E v) (「W T」) 両方の表現型と比較することにより決定した。マウスを、前記実施例 1 に記載するように発生させ、ここで、ノック-インマウス (「K I」) の K v 1.1 は、機能性 N 末端を欠いたが、それ以外には、-サブユニットと会合することができた。ノックアウトマウス (「K O」) は、K v 1.1 が完全に不活性化され、したがって N 末端および -サブユニットと会合する能力の両方を欠いた変異を有した。

【0140】

空間学習は、Y 迷路パラダイムにて試験することができる、海馬に依存する認識能力である (Dellu et al., 「自動化された記録を用いる 2 つのトライアル記憶タスク: 若いラットおよび年取ったラットにおける試験」 Brain Res. (1992) 588: 132-139)。Y 迷路ノベルティ法は、Y 迷路における場所探査に基づく 2 つのトライアルの認識タスクである。各実験は、トライアル間間隔 (I T I) により分けられる 2 つの 5 分間の探査期間からなる。最初の探査期間中、Y 迷路の 1 つのアームを閉鎖し、対象を 5 分間、迷路の 2 つのアーム

10

20

30

40

50

を探索させる。迷路上にのせたカメラにより行動を記録し、データをコンピューターにより分析する。トライアル1を、30分から4時間にわたるITIにより行い、その間は、動物を飼育檻の中に入れる。第2の探索期間中は、Y迷路の全アームを開放し、齧歯動物を元の出発アームにおき、5分間迷路を探索させた。まず新しいアームにエンターしている対象の割合、新規なおよび新規でないアームへエントリーしたものの数、およびトライアルの最初の2分間の間に各アームにて費やされた時間を記録する。齧歯動物は、新規なアームにエンターし、そして探索する自然な傾向を有する(Dellu et al., Brain Res. (1992) 588: 132-139)。

【0141】

129 / S v E v 地の8 - 10週齢のWT、KI、およびKOマウス(n = 28 - 30)を、異なるITIを用いるY迷路2トライアル位置認識法にて試験した。全3つのWT、KI、およびKO群は、記憶トライアル中、試験した全てのITI(30分、2時間、および4時間)にて、新規でないアームよりも新規なアームにおいて、有意に多くの時間を過ごした。しかし、図2Aに示すように、KOおよびWTマウスは、一貫して、30分のITIにて、KIマウスよりもより頻繁に新規なアームを最初に選択した。これに対して、WTマウスのみが、4時間のITIまでに、新規なアームを一貫して最初に選択した。このパターンにより、KIおよびKOマウスの間で、30分のITIにて認識における有意な差が示され、これは4時間のITIまでに消滅する。加えて、図2Bに示すように、KOおよびWTマウスは、30分のITIにおいてKIマウス(NA: 13.9 ± 3.4秒、p < 0.05)よりも新規なアームにおいて有意に多くの時間(NA: 25.4 ± 3.5秒)を過ごした。逆に、KIおよびWTマウスは、4時間のITIにて、KOマウスよりも新規なアームにおいてより多くの時間(有意性、p = 0.055に接近する)を過ごした。KIマウスは、30分のITIにて記憶の欠損を有したが、4時間のITIにてKOマウスよりも良好な記憶を有したことにより、記憶学習タスクにおけるKv 1.1サブユニットの複雑な役割が示唆される。

【0142】

実施例3

遺伝的に変更されたマウスにおける侵害受容および生理学的反応性

129 / S v E v 地のWT、KI、およびKOマウスを、視覚および侵害受容刺激に対する感受性における差に関して、さらに評価した。WT、KI、およびKOマウスを、視覚に対する反応性、触覚、熱および化学的刺戟に対する反応性に関して、遺伝子型当たり8 - 10匹の群にて試験した。

【0143】

1. 視覚的断崖試験

KIおよびKOマウスを、視覚的断崖試験において、遺伝子型当たり8 - 10匹の群にて試験して、その視覚の深さの認識における差を分析した(キツネ、動物の行動(Fox, Animal Behavior) (1965) 13(2): 232-233)。装置は、天井が開いた大きい方の箱(2' x 2' x 2' 8")内に含まれる黒と白(1" x 1" 平方)の市松模様の箱(1' x 2' x 2')であった。黒と白の市松模様の床を、内部の箱の天井を横切って、側面を下り、低い方の床に沿って伸ばした。透明のプレキシグラスシート(2' x 2')が市松模様の内部の箱の天井を覆い、そして、断崖を完全に覆った。箱の中央にて、4" x 2.5" x 1"のプラットフォームで断崖を安全な側から分けた。

【0144】

マウスを実験の日まで群にて飼育した。マウスを中央のプラットフォームに置き、プラットフォームから降りる潜伏時間ならびにマウスが降りる側を記録した。マウスが3分以内にプラットフォームを降りなかった場合、「選択なし」のスコアを記載し、3分間の最大潜伏時間を記録した。各動物は1のトライアルを受けた。

全KIおよびKOマウスは、視覚断崖タスクにおいて100%の精度を有し、群間の視覚における差はなかった。

【0145】

2.フォン フレイ フィラメント(von Frey Filaments)を用いる触覚試験

WT、KI、およびKOマウスを、フォン フレイ モノフィラメントを用いて、触覚反応性における差に関して、遺伝子型当たり8 - 10匹の群にて試験した(Chaplan et al., 「ラットの足における触覚異痛の定量評価」、J. Neurosci. Methods, (1994) 53: 55-63)。

動物を高架網格子に乗せ、足の裏の表面を、一連のフォン フレイ モノフィラメントで刺激した。フォン フレイ フィラメントを必要に応じて連続した上昇または下降順序にて後足の足の裏の中央に適用し、反応の閾値へとできるかぎり接近させた。閾値は、刺激に対して鋭敏な引っ込み反応を引き起こす最小の力により示した。つまり、引っ込み反応により、次の弱い刺激を与え、引っ込みの欠如により、次の強い刺激を与える。50%の閾値の内挿を、各遺伝子型に関して計測した。

【0146】

3.熱および化学試験

129/SvEv地のWT、KI、およびKOマウスを、アカゲザルにてすでに行われたこれまでの試験からの試験を用いることにより、熱および化学刺激に対する反応の差に関して、遺伝子型当たり8 - 10匹の群にて試験した(Negus et al., J Pharmacol Exp Ther 266: 1355-1363, 1993; Brandt et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 296(3): 939-946, 2001)。

温水を用いて、遺伝子型操作により生じる侵害受容反応における差を評価した。温水尾 - 引っ込み操作では、齧歯動物を穏やかに拘束し、尾の末(3cm)の末端を、42、46、50、54、または58へと温めた水を含んでいる熱ボトルに入れた。動物が水から尾を上げる潜伏時間を記録し、侵害受容の基準として用いた。動物が尾を20秒以内に上げなかった場合、実験者が尾を上げ、最大の潜伏時間を記録した。

【0147】

各実験セッションは、各温度における平均ベースライン尾-引っ込み潜伏時間を測定することにより開始した。これらの潜伏時間を用いて、熱刺激に対するその感受性における潜在的な差に関して遺伝子型を評価した。

ベースライン温度測定に従い、カプサイシンクリーム(0.075mg%濃度)を、全長の尾に塗った。10分後、尾を湿った布でぬぐって過剰のクリームを除去し、温度効果曲線を、5分後に再度決定した。この方法により、マウスにおいて強い熱 - 過剰反応を生じることが示された。

【0148】

熱-効果曲線を、各実験条件に関して作製した。加えて、尾 - 引っ込み潜伏時間の半最大増加を生じる温度(すなわち、 T_{10})を、各温度-効果曲線から算定した。 T_{10} は、温度 - 効果曲線において10秒を越す点と10秒未満の点の間に引かれた線からの内挿により決定した。熱感覚過敏性は、温度 - 効果曲線における左の方向のシフトおよび T_{10} 値の低下と定義された。データを、分散分析(ANOVA)により分析し、有意な主要効果をさらに、post-hoc対応t - 試験により分析した。

KI、KI、およびKOマウスは、触覚(フォンフレイ フィラメント)、熱(温水尾引っ込み)、および化学(カプサイシン)刺激に対して同様の反応を有した。これらのデータにより、 $Kv_{1.1}$ に関連する Kv - チャネルが急性の侵害受容刺激に対する感受性に関与しないことがさらに示唆される。

【0149】

実施例4

N - 末端を欠く $Kv_{1.1}$ サブユニットを発現しているマウスは、損なわれたコンテクスチュアル恐れ条件付けを示す。

これまでの研究により、完全に非-機能性の $Kv_{1.1}$ ノックアウトマウスが低下したK - 電流不活性化、およびいくつかの海馬 - 形成依存性認識タスクにおける損なわれたパフォーマンスを示し、全体的な形態または行動に変化はなかった(Giese et al. (1998) 学習 & 記憶(Learning & Memory) 5: 257-273)。つまり、KOマウスに関して認められる表

10

20

30

40

50

現型は、1)速不活性化する、および/または2)適切にK-チャンネルを発現する能力の欠損の結果である可能性がある。

群飼育した成体のオスのマウスを12時間光/暗サイクル下に、食餌および水に自由に摂取できるようにして維持した。129/SvEvおよびC57/Bi6地両方の、8-16週齢のWT、KI、およびKOマウスを、遺伝子型当たり15-20匹の群へと分けた。

【0150】

A. コンテクスチュアル恐れ条件付け

マウスを、試験前30-60分間、実験室に慣れさせた。マウスを次いで、格子の床、白色ノイズ(64dB)、ハウスライト、およびトーン(75dB)またはクリックジェネレーターを備えた弱音化檻(Med. Associates)内に入れ、再び、短期間(2分間)チャンバーへと慣らせた。習慣化期間の後、トーンまたは一連のクリックの形態の条件付け刺激(CS)を、30秒間与え、次いで短いショック(2秒間)を与えた(格子の床を通して授与、1.0mAmp、非条件付け刺激、US)。2分間のITIの後、動物をUSおよびCSに再び曝した。2番目の対のショックの30秒後、マウスを操作チャンバーから取り出した。約18時間後、マウスを操作チャンバーに戻し、「コンテクスト」(すなわち、同じ環境、照射、CS以外の聴覚刺激)に対するフリージング行動に関して観察した。この観察期間後、動物をその檻に、30-60分間戻した。この猶予時間後、マウスを新たな操作チャンバーに入れ、再びフリージング行動に関して観察した。この観察期間の終わりに、CSを開始し、フリージング反応を記録した。これら3つの条件のそれぞれにおけるフリージングを、3分間、129/SvEv地の動物において、および5分間C57Bi6においてモニターした。10分の間隔にて、観察者は、動物がフリージング(呼吸を除く全ての動きの欠如)するかしないかをスコアした。条件のそれぞれにおいてフリージングしている割合を各動物に関して記録した。データを、2-ウェイANOVA(処置×実験条件)を用いて分析し、post-hoc比較を、フィッシャーの最小有意差試験を用いてなした。

【0151】

すでに示した試験を繰り返して、高レベルのフリージング(より高いコンテクスチュアル条件づけ)を示したKOおよびWT動物の間で、差は認められなかった。しかし、図3Aおよび3Bに示されるように、KI動物は、両KOおよびWTコントロール動物と比較して、マウス系統の地とは無関係に、有意に損なわれたレベルのフリージング(損なわれたコンテクスチュアル条件付け)を示した。

【0152】

B. 高架ゼロ迷路

マウスを少なくとも30分間、控室に慣れさせた。ゼロ迷路は、4つの等しいクアドラントに分けられた黒のPerspexサークルから成った(2つは閉まっており、2つは開いている)。閉まっているクアドラントは、迷路から伸びている白色のPerspex壁(内壁=20cm、外壁=30cm)を有する。開いているクアドラントは、迷路の縁から3mm上に伸びる透明のPerspexリップを有する。迷路は、60cmの外部直径および5cmの幅であり、床から55cm高架させた。個々の動物を、閉まったクアドラント中に頭と前足を入れて、ゼロ迷路に入れた。実験を、赤色光条件下、1つの白色光を迷路の上の天井に当てて行った(C57/Bi6、15ワット、4lux、129SvEv 42ワット、20lux)。マウスの行動を次いで4分間、EthovisionProビデオトラッキングシステムを用いて記録した。

【0153】

開いているおよび閉まっているクアドラントにて過ごした時間の量、およびそれらへのエントリーの数、ならびに移動したトータルの距離を、EthovisionProソフトウェア(Noldus Information Technology, Inc.)により記録した。データを、1-ウェイANOVAにより分析し、post-hoc比較を、フィッシャーの最小有意差試験を用いてなした。

【0154】

10

20

30

40

50

コンテクスチュアル恐れ条件付け試験同様、KOおよびKI動物は、高架ゼロ迷路において異なるパターンの行動を示した。図4Aは特に、C57BI6地のKI変異に関してホモ接合のマウスが、KOまたはWTマウスと比較して、オープンゾーンにおいて、有意に多くの時間($p < 0.05$)を過ごしたことを示し、低下した不安活性と一致する特性を示す。図4Bは、129/SvEv地マウスにおいて、KO動物が、両WTおよびKI動物に比べて、オープンゾーンにおいて増加した時間を過ごしたことを示す。C57BI6対129/SvEv地のマウス間の異なる特性は、129/SvEvマウスにおいては探索のレベルが一般的に低く、それらが最初に入れられたクアドラント(閉まったクアドラント)に留まる傾向があることによるものであり得る。比較により、図4Aおよび4Bに示すように、WTを含む全C57BI6マウスは、129/SvEvマウスよりもより多く、環境を探索し、オープンゾーンにおいて5-20%多くの時間過ごした。

10

これらのデータにより、実施例2のY迷路試験と合わせて、KOMウスにおいて観察される表現型が、単にK-チャンネルの速不活性化の欠損によるものではなく、K-チャンネル発現における変化または他のK-チャンネルサブユニットが関与する代償メカニズムを反映している可能性があることを示唆する。

【0155】

実施例5

ストレス誘導性のコルチコステロンレベルにより示される、不安におけるロック-インKv1.1サブユニットの効果

KI遺伝子型が異なる不安特性を示すかどうかを確認するために、129/SvEv地のWT、KI、およびKOMウスを環境ストレスに供し、次いでKalman et al., 精神神経内分泌学(Psychoneuroendocrinology) (1994) 28 (5): 349-360のプロトコルに従い、コルチコステロンレベルにおける変化に関して測定した。この実験において、狭い、通気したチューブ内での拘束を、環境ストレスとして用いた。WT、KI、およびKOMウスを通気チューブ内に入れ、移動を1時間拘束した。血漿コルチコステロンレベルを、ストレス中0、30、60分間、およびさらに処置の開始後90分(拘束後30分)にて測定し、血漿におけるコルチコステロン反応の程度および持続を確認した。予備結果は、KI動物が、この処置中のコルチコステロンの有意に低下したレベルを示したことを示す(データは示していない)($p < 0.05$)。

20

【0156】

実施例6

ストレス誘導性の高体温を測定することにより示される、不安におけるロック-インKv1.1サブユニットの効果

Borsini et al (1989)およびVan der Heyden et al. (1997)の方法のごとく、ストレス誘導性の高体温をさらなる手段として用いて、KIマウスの不安特性を評価した(Borsini et al. 精神薬理学(Psychopharmacology) (1989) 98: 207-211、およびVan Der Heyden, 生理学および行動(Physiology and Behavior) (1997) 62: 463-470)。このモデルは、ストレス誘導性の高体温を防ぐ不安緩解物質の効果に感受性があると報告されている。

30

【0157】

群飼育した成体の雄のマウスを12時間、光/暗サイクル下に、食餌および水を自由に摂取できるようにして維持した。129/SvEv地の8-11週齢のWT、KI、およびKOMウスを、遺伝子型当たり10匹の群に分けた。

40

マウスを試験室に、試験前少なくとも1時間慣れさせた。マウスをコントロールブラシーボビヒクル(ブラシーボ)または不安緩解クロルジアゼポキシド(5または10mg/kg)にて腹腔内処理した。注射の60分後、最初の体の中心の温度基準(T1)を、潤滑剤を差したサーミスタープローブ2cmを、光抑制下に維持したマウスの直腸へ挿入することにより、測定した。この具体例において、直腸プローブを環境ストレスとして用いた。温度を、最も精密な0.1℃まで、デジタル化サーモメーター(Yellow Springs Instruments YSI 2100 Tele-thermometer)を用いて記録した。第2の測定(T2)を、最初の直腸プローブの10分後になした。図5Aに示すように、ビヒクルを注入したコントロールマウス

50

は、この操作において約 0.7 - 0.8 の体温の上昇を示した。データを 1 - ウェイ A N O V A により分析した後、最小有意差試験 (< 0.05) により分析した。

【0158】

図 5 A は、不安緩解性クロルジアゼポキシドにより、対照ピヒクルと比較して、ストレス誘導性の高体温が予防されたことを示す。特に、10 mg / kg のクロルジアゼポキシドの投与レベルにより、記録される温度の低下が誘導された。さらに、図 5 B に示すように、彼ら自身の飼育室にて行った以外は同じ操作に供した非処置の K I マウス ($n = 25$) は、10 mg / kg のクロルジアゼポキシドで処置したマウスに匹敵する不安緩解様反応を示した。これに対して、非処置の K O ($n = 16$) および W T マウス ($n = 20$) は、対照マウスと同じ、または同様の期待される高体温を示した。ベースライン (T 1) 温度に関して、差は認められなかった。これらのデータにより、K I 動物によりモデル化されるように、K v 1 カリウムチャネルの不活性化の低下により不安緩解効果が生じるといふさらなる証拠が提供される。

【0159】

実施例 7

K v 1 マウスにおける発作の閾値

マウスをハロタン麻酔下にて手術を行い、外頸静脈にカニューレ (PE 10 チュービング) をインプラントした。動物に、発作閾値を伝導する前少なくとも 48 時間、回復させた。発作閾値を、0.34 ml / 分の流速で静脈内に送達したペンチレンテトラゾール (P T Z ; ヘパリン処理した塩水中 5 mg / ml) の投与により決定した。マウスは拘束しなかったが、観察のための小さなチャンパーに閉じ込めた。最初の痙攣までの潜伏時間、慢性の発作 (前足をパドリングさせて、後ろ足で立つことと定義される)、および緊張性の発作 (完全な後足の伸張として定義される) を、各対象に関して記録した。発作の潜伏時間に関するデータを、図 6 に示すように行動エンドポイントのそれぞれに関して送達された mg / kg P T X へと変換した。

P T Z の静脈内での融解に対する感受性は、マウスの 3 つの遺伝子系統 ($n = 10 - 12$) の間で同一であった。それぞれの反応を誘発する最小の注入投与量を図 6 にプロットした。

【0160】

実施例 8

c - f o s 活性化を測定するストレス評価

野生型、K I、および K O マウスを、狭い檻 (1 つの末端に穴を開けた 50 ml チューブ) の中に入れ、移動を 1 時間拘束した。動物を、5 連日間、1 日 1 時間拘束し、その直後に屠殺し、新鮮な凍結脳をインサイチュハイブリダイゼーション組織化学のために加工した。c - f o s の C 末端領域を P C R - クローン化し、P³³ U T P (配列番号 8、フォワードプライマー 5' AGGAGGGAGCTGACAGATCACTTC ; 配列番号 9、リバースプライマー GTCTGCTGCATAGAAGGAACCGG) の存在下に、c D N A リボプローブを合成した。c - f o s m R N A レベルは、非ストレスコントロール c - f o s に対して全 3 群において増加した。頭頂皮質における m R N A シグナルを図 7 に示すごとくデジタル化し、次いで定量した。K I 動物は、c - f o s m R N A レベルにおいて 27% の低下を示した (A N O V A により $p < .05$; 群当たり $n = 7$) 。

【0161】

本明細書中に記載する実施例および態様は、説明の目的のためにのみ本明細書に記載し、それに照らして種々の変更または変化が当業者には示唆され、本出願の意図および範囲および補正した請求項の範囲内に含まれるべきである。本明細書中に引用する全文献、特許、および特許出願は、本明細書中に、その全容をあらゆる目的のために組み込む。

【図面の簡単な説明】

【0162】

【図 1】 図 1 A は、内在 K v 1 遺伝子構造およびそのエキソン組成の図示である。図 1 B は、内在 K v 1.1 遺伝子が変異に関してターゲットされた方法を示す。図 1 C は、

10

20

30

40

50

ES細胞をBamHIで消化したサザンブロットの図示である。図1Dおよび1Eは、RNaseタンパク質分析の結果を図示したものであり、ノック-インKv変異体(Kv0)mRNA(図1D)および野生型Kv(WT)の発現パターンを示す(図1E)。図1Fは、種々の遺伝子タイプからのサンプルを用いるPCR分析の結果を図示したものである。図1Gは、WTおよび変異体マウスからの皮質、線条、海馬、小脳、中脳、および視床におけるKv1、Kv2、シナプシン1(コントロール)またはHAの発現を分析するために行ったウェスタンブロットに関する図示である。

【図2】図2A-2Bは、Y迷路におけるWT129/SvEvマウス対KOおよびKIマウスの間の異なる学習および記憶パターンを示す。図2Aは、30分、2時間、および4時間の試験間の間隔(ITI)後の、迷路の新規なアームを最初に選択するマウスの割合を示す。図2Bは、30分、2時間、および4時間のITI後の新規なアームにおいて費やされた(2分間の)時間の割合を示す。

10

【図3】図3A-3Bは、両C57BI6(図3A)および129/SvEv(図3B)地におけるコンテクスチュアル恐れ条件付け試験におけるWT、KI、およびKOMausの間の異なる学習パターンを示す。

【図4】図4A-4Bは、C57BI6(図4A)および129/SvEv(図4B)地の両方における、高架ゼロ迷路のオープンゾーン部分において3つの異なるゲノタイプ、WT、KI、およびKOが費やした時間の割合を示す。

【図5】図5Aは、雄のWT(129/SvEv)マウスにおけるストレス誘導性の高体温症におけるクロロジアセポキシドの種々の投与量の効果を示す。図5Bは、野生型(WT; 129/SvEv)、Kvノック-イン(KI)およびノックアウト(KO)マウスにおけるストレス誘導性の高体温症に対する反応を示す。挿入図は、初期測定における体温を示す。

20

【図6】図6は、Kvノック-インマウスにおいて発作の閾値が変化していないことを示す。

【図7】図7は、KI、KO、および野生型マウスの頭頂皮質におけるc-fos mRNAのインサイチュハイブリダイゼーション定量を示す。

【 図 2 A 】

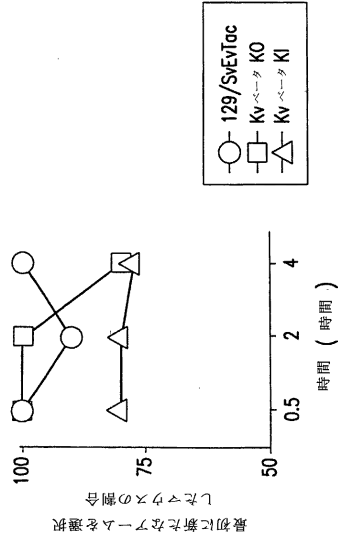


FIG.2A

【 図 2 B 】

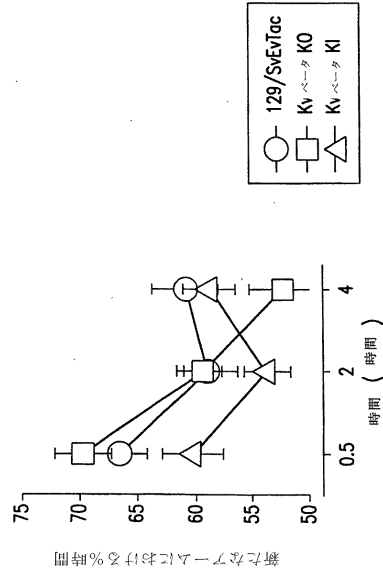


FIG.2B

【 図 3 A 】

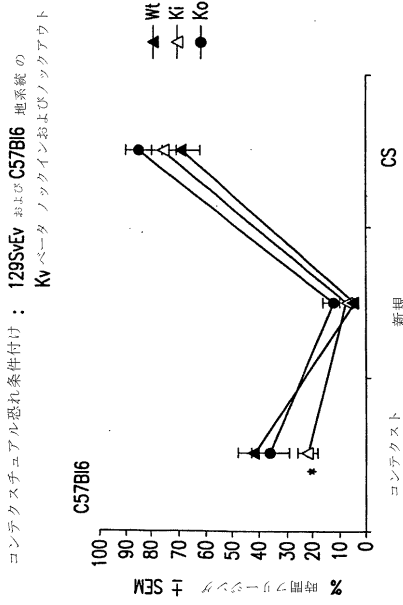


FIG.3A

【 図 3 B 】

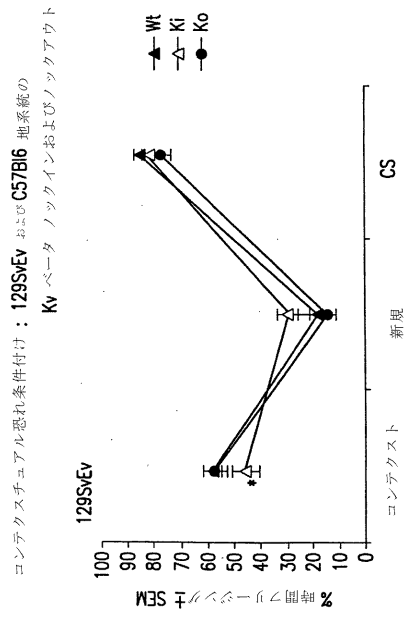


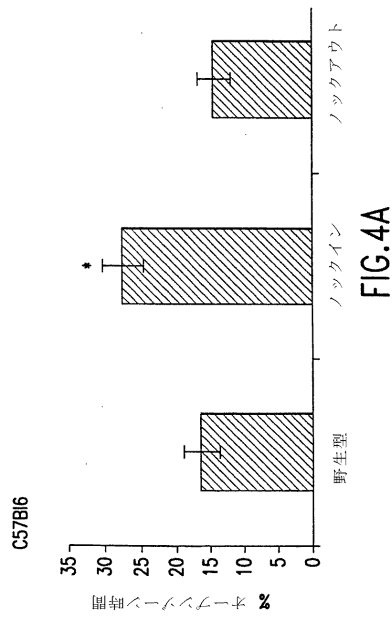
FIG.3B

コンテクトスチミュアル恐れ条件付け : 129SvEv および C57Bl6 地系統の Kv ベータ ノックインおよびノックアウト

コンテクトスチミュアル恐れ条件付け : 129SvEv および C57Bl6 地系統の Kv ベータ ノックインおよびノックアウト

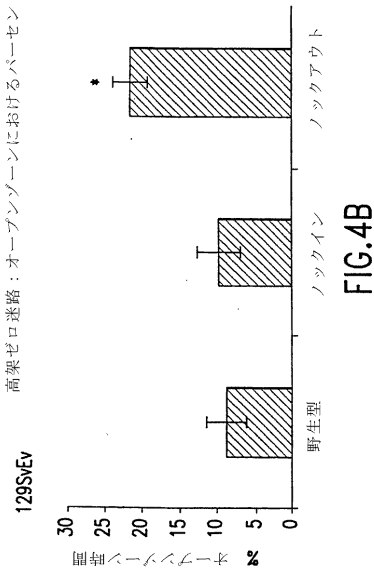
【 図 4 A 】

Kv ベーターノックアウトおよびノックインマウスにおける
高架ゼロ迷路：オープンゾーンにおけるパーセント時間



【 図 4 B 】

Kv ベーターノックアウトおよびノックインマウスにおける
高架ゼロ迷路：オープンゾーンにおけるパーセント時間



【 図 5 A 】

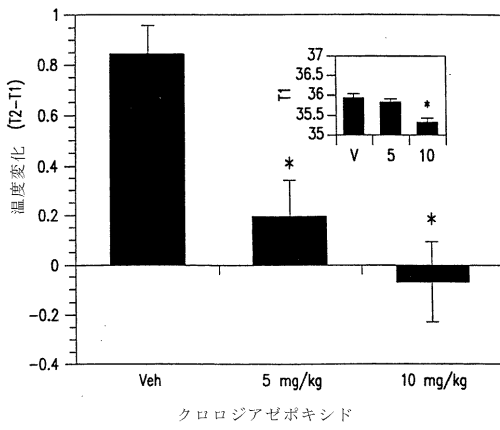


FIG.5A

【 図 5 B 】

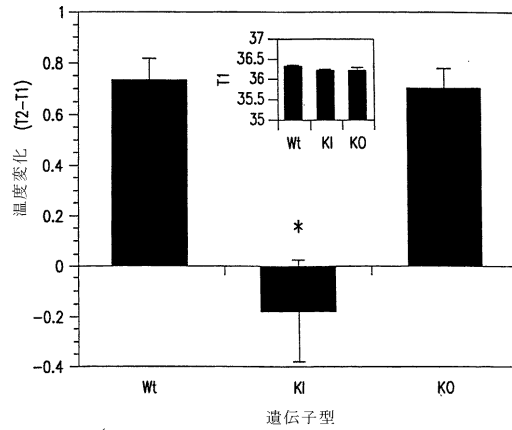


FIG.5B

【 図 6 】

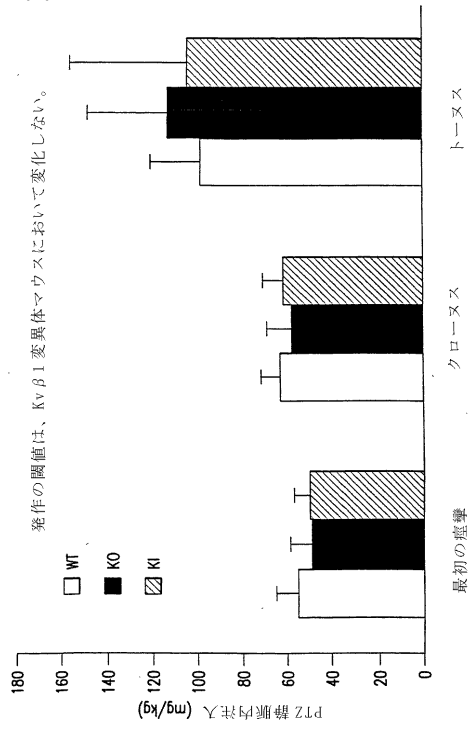


FIG.6

【 図 7 】

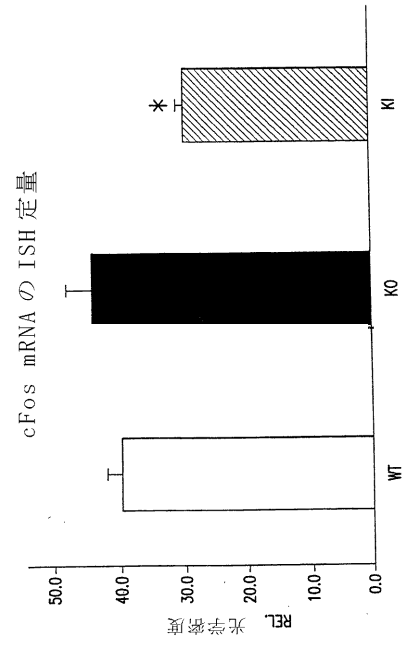


FIG.7

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012041 A2

- (51) International Patent Classification²: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US02/23790
- (22) International Filing Date: 25 July 2002 (25.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/308,485 27 July 2001 (27.07.2001) US
60/331,140 9 November 2001 (09.11.2001) US
- (71) Applicant: WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940-0874 (US).
- (72) Inventors: KWAK, Seung, Poon; 38C Chicopee Drive, Princeton, NJ 08540 (US). RHODES, Kenneth, James; 808 Atkinson Circle, Hillsborough, NJ 08844 (US). MARQUIS, Karen, Lowell; 269 Rock Run Road, Yardley, PA 19067 (US). COMERY, Thomas, Anthony; 219 Flowers Avenue, Langhorne, PA 19047 (US). ASKEW, Roger; 11 High Ridge Road, Boxford, MA 01921 (US). BRANDT, Michael, Richard; 16 Lenape Road, Flemington, NJ 08822 (US). ROSENZWEIG-LIPSON, Sharon, Joy; 25 Bosko Drive, East Brunswick, NJ 08816 (US).
- (74) Agents: BRAZIL, Bill, T. et al.; Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940-0874 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/012041 A2

(54) Title: KNOCK IN TRANSGENIC MAMMAL CONTAINING A NON-FUNCTIONAL N-TERMINUS OF K_v BETA 1.1 SUBUNIT(57) Abstract: This invention provides a transgenic mammal containing a defective beta 1 subunit (Kvss1) of a voltage sensitive potassium channel, where the Kvss1 subunit is unable to confer N-type inactivation of the K⁺ but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits and thereby enhance channel surface expression. Preferably the Kvss1.1 gene encoding Kvss1 subunit has a mutation in all or a portion of codons 1-70 of its inactivation domain. The transgenic mammal is useful as a model for psychiatric and neurological disorders to identify anxiolytic compounds and pro-cognitive functions. The invention also provides for methods for screening and evaluating test compounds for their ability to modulate Kvss1.1 activity, specifically for inactivation of a potassium channel or for co-association with α -subunits.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

**KNOCK IN TRANSGENIC MAMMAL CONTAINING A
NON-FUNCTIONAL N-TERMINUS OF K_v BETA 1.1 SUBUNIT**

5 This application claims priority from copending provisional application serial number 60/308,485, filed on July 27, 2001, and copending provisional application serial number 60/331,140, filed on November 09, 2001, the entire disclosure of which are hereby incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

10 This invention is directed to a transgenic mammal containing a defective voltage sensitive potassium channel beta 1 subunit (Kv β 1), wherein the Kv β 1 subunit is unable to confer N-type inactivation of the channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits and thereby enhance channel surface expression. The transgenic mammal is useful as a model for psychiatric and
15 neurological disorders and to identify anxiolytic compounds.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Voltage-gated potassium channels (Kv) contribute to nervous excitability in mammals. Some K⁺ channels (A-type K⁺ channels) are fast-inactivators which act as regulators for neuronal firing due to their fast inactivation. The discrete localization of
20 Kv channels in brain tissue suggests that these channels are essential elements in the control of action potential propagation and neurotransmitter release in pathways frequently associated with seizure propagation and ischemic insult (see Rhodes *et al.* (1997) *J. Neurosci.* 17: 8245-8258).

25 Some Kv channels are members of the Shaker-related superfamily, and are assembled from membrane-integrated α subunits and auxiliary cytoplasmic β subunits. Three Kv β genes, termed Kv β 1, Kv β 2 and Kv β 3 provide five β subunits. Moreover, alternative splicing of the Kv β 1 gene provides three tissue-specific β 1 subunit isoforms, Kv β 1.1, Kv β 1.2 and Kv β 1.3, which differ in their N-terminal

WO 03/012041

PCT/US02/23790

sequences and in their expression patterns. Kv β 1.2 and Kv β 1.3 are expressed in heart tissue, while Kv β 1.1 is expressed in the brain tissue, particularly in the hippocampal CA1 region and striatum.

5 The β -subunits of the Kv channels play important roles in regulating the surface expression, stability, post-translational processing, and inactivation kinetics of the pore-forming α -subunits. Co-expression of any of the auxiliary Kv β 1 subunits with certain α subunits have resulted in a dramatic acceleration of the inactivation kinetics of the expressed Kv channels (Rettig *et al.* (1994) *Nature* 369: 289-294; Majumder *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 361, Morales *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 6272-6277; England *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6309-6313; England *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 28531-28534;; 13-16; McCormack *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 370: 32-36; Heinemann *et al.* (1996) *J. Physiol. (Lond.)* 493: 625-633). It has previously been shown that inactivation of Kv channels is conferred by a "ball" domain in the amino-termini of Kv β 1 subunits (Rettig, *supra*). In addition, it has been suggested that the Kv β 1.1 subunits have a chaperone-like function on the folding of corresponding Kv1 family α -subunits, since they promote surface expression of coexpressed α subunits (Shi *et al.* (1996) *Neuron* 16: 843-852; Accili *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 25824-25831). The ability of the Kv β 1 subunits to co-associate with corresponding Kv1 family α -subunits is retained despite deletion of their amino-termini and consequently, there is a loss of the ability to confer channel inactivation, as shown in experiments with transfected mammalian cells (Nakahira *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 7084-7089). Significantly, complete loss of function of the entire Kv β 1.1 subunits leads to a reduction of A-type Kv channel activity in hippocampal and striatal neurons of knock-out mice (Giese *et al.* (1998) *Learning & Memory* 5:257-273). It is unclear however, how the functionality of Kv β 1.1 subunits, whether it be N-type inactivation or their chaperone-like function, contributes to altered cognition, anxiety and motor control of an animal.

PCT publication WO 00/24871 discloses a transgenic mouse having a knock-out mutation disabling the whole of the Kv β 1.1 subunit of the A-type K⁺ channel. WO 00/24871 does not describe however, a transgenic mammal having a mutation wherein only a portion of the Kv β 1.1 subunit has been inactivated to leave portions of the Kv β 1.1 subunit which retain functionality. In particular, WO 00/24871 does not

WO 03/012041

PCT/US02/23790

provide a transgenic animal having a mutation of the Kv β 1.1 subunit wherein all functional properties of β 1.1 subunit are retained except the ability to confer N-type inactivation.

5 It would be desirable to provide a transgenic mammalian model wherein distinct portions of the Kv β 1.1 subunit have been rendered non-functional, in particular, wherein N-type inactivation has been lost, so as to identify compounds ("disinactivators") and therapies which may be useful in the treatment of panic and anxiety disorders, cognitive disorders, epilepsy, ischemic stroke and movement disorders.

10

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to a transgenic rodent having an endogenous gene cluster which encodes a mutated Kv β 1.1 subunit in an A-type potassium channel, wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is a knock-in subunit which is unable to confer N-type inactivation of the channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits.

15 In a preferred embodiment, the transgenic rodent is a mouse ("KI mouse") and the mutated knock-in Kv β 1.1 subunit is encoded by a homozygous mutation. The knock-in Kv β 1.1 subunit may be encoded by a mutation selected from the group consisting of replacement mutations, insertion mutations, frameshift mutations and stop codon mutations, most preferably the KI mouse manifests a significantly different learning or memory pattern as compared to a mouse wherein the Kv β 1.1 subunit is completely non-functional ("KO mouse"), as assayed by a Y maze. In one aspect, the Y maze test will preferably indicate that the KI mouse has significantly improved learning or memory after a 4 hour inter-trial interval as compared to the KO mouse, but that the KI mouse has significantly impaired learning or memory after a 20 30 minute inter-trial as compared to a KO mouse. In another preferred embodiment, a contextual fear conditioning assay is used to indicate that the KI mouse has a significantly impaired learning pattern as compared to a KO mouse and to a mouse of the same strain having a wild-type Kv β 1.1 subunit ("WT mouse"). In yet another preferred embodiment, an elevated zero maze assay is used to indicate that the KI mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a KO and a WT mouse. In still another aspect, an assay for stress-induced corticosterone levels is

WO 03/012041

PCT/US02/23790

used to indicate that the KI mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a KO and a WT mouse. Similarly, in another aspect of the invention, an assay for stress-induced hyperthermia is used to indicate that the KI mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a KO and a WT mouse.

5 The present invention is also directed to a transgenic rodent whose genome comprises a homozygous mutation in codons 1-70 (i.e., SEQ ID NO:1) of the N-terminus of an endogenous Kv β 1.1 subunit gene, preferably codons 1-36, where said mutation is a replacement mutation and the rodent exhibits significantly different cognitive patterns over a second rodent whose genome comprises a homozygous
10 mutation which encodes a completely non-functional Kv β 1.1 subunit. Preferably, the replacement mutation comprises an immunoreactive epitope tag, and most preferably, the replacement mutation is a hemagglutinin epitope tag. In a further aspect of the invention, the transgenic rodent is a mouse.

In another embodiment, the present invention is directed to a transgenic
15 rodent whose germ cells and somatic cells contain a recombinant activated Kv β 1.1 transgene sequence introduced into said rodent, or an ancestor of said rodent, at an embryonic stage, where the Kv β 1.1 transgene encodes a β subunit which is unable to confer N-type inactivation of a potassium channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits.

20 In another aspect, the present invention provides a method of making an isolated knock-in mammalian cell comprising the steps of (1) effecting homologous recombination between an endogenous Kv β 1.1 gene and a transgene Kv β 1.1, wherein said transgene Kv β 1.1 comprises (a) a sequence encoding an immunoreactive tag substituting all or a portion of codons 1-70 of the Kv β 1.1 subunit,
25 (b) a selectable marker flanked by a pair of repeat sites, and (c) a pair of sequences homologous to the endogenous Kv β 1.1 gene flanking both the tag and the selectable marker; and, (2) effecting further recombination to remove the selectable marker, wherein the transgene Kv β 1.1 encodes a β subunit which is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits.
30 Preferably, the mammalian cell is homozygous for the transgene. Most preferably, the immunoreactive tag substitutes all or a portion of codons 1-36.

In yet another embodiment, the present invention provides a mammalian cell expressing an A-type potassium channel having a knock-in Kv β 1.1 subunit wherein

WO 03/012041

PCT/US02/23790

the knock-in Kv β 1.1 subunit is unable to confer N-type inactivation of the channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits, where said cell comprises an endogenous nucleic acid sequence which controls expression of the knock-in Kv β 1.1 subunit and said knock-in Kv β 1.1 subunit is encoded by a mutation
5 selected from the group consisting of a replacement mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, and a stop codon mutation. Preferably, the cell is selected from the group consisting of a horse, bovine, rodent, cat, dog, pig, goat, sheep, non-human primate, human, rabbit and hamster. Most preferably, the cell is a murine cell. In another aspect, the cell comprises a mutation in which all or a portion of
10 codons 1-70 in the endogenous nucleic acid sequence are replaced, more preferably codons 1-36 are replaced, and the replacement comprises an immunoreactive epitope tag. Most preferably, the cell is homozygous for the replacement mutation.

In a further embodiment, the present invention provides a nucleic acid construct encoding a mutation in codons 1-70 of a Kv β 1.1 gene, more preferably in
15 codons 1-36; wherein said nucleic acid encodes a knock-in subunit of an A-type potassium channel and said nucleic acid knock-in subunit is unable to confer N-type inactivation of the A-type potassium channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits. The mutation may be a replacement mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, and a stop codon mutation, but is
20 preferably a replacement mutation. Most preferably, the mutation comprises an immunoreactive epitope tag replacing all of codons 1-70, particularly codons 1-36, of the Kv β 1.1 gene. Furthermore, the nucleic acid construct comprises nucleic acid which is either deoxyribonucleic acid (DNA) or is ribonucleic acid (RNA). In another aspect, the nucleic acid construct is in either a mammalian cell or a vector.

In another aspect, the present invention provides a nucleic acid construct for
25 disrupting expression of an endogenous Kv β 1.1 gene *via* homologous recombination, where said construct comprises an immunoreactive epitope tag replacing all, or a portion of, codons 1-70 of the Kv β 1.1 gene, a selectable marker and a pair of nucleic acid sequences flanking both the tag and the selectable marker,
30 where the pair is homologous to a portion of the endogenous Kv β 1.1 gene. More preferably, the immunoreactive epitope tag replaces all or a portion of codons 1-36. Preferably, the immunoreactive epitope tag is a hemagglutinin epitope tag or the selectable marker is a *neo* gene. More preferably, the selectable marker is further

WO 03/012041

PCT/US02/23790

flanked by Lox P nucleic acid sequences. Most preferably, the nucleic acid construct is in a vector.

In yet another embodiment, the present invention provides a method of pre-screening test compounds for modulators of Kv β 1.1 subunit activity, comprising the steps of (a) contacting test compounds with a knock-in Kv β 1.1 subunit; and (b) selecting one of the test compounds which provides a detectable change in the activity of the knock-in Kv β 1.1 subunit, where the knock-in Kv β 1.1 subunit is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits. In one embodiment, the knock-in Kv β 1.1 subunit is in a test sample, said test sample comprises a cell, and the step of contacting comprises administering said test compound to the cell. In addition, the step of detecting may comprise using an immunoassay to determine whether the Kv β 1.1 subunit co-associates with Kv1 family α -subunits. In one embodiment, the selected test compound binds to the Kv β 1.1 subunit. Preferably, the test compounds are small molecules selected from a group of libraries consisting of spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries or synthetic libraries made from deconvolution, "one-bead one-compound" methods or by affinity chromatography selection.

Alternatively, the present invention provides a method of pre-screening test compounds for modulators of Kv β 1.1 subunit activity by (a) contacting the test compounds with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a knock-in Kv β 1.1 subunit; and (b) selecting one of the test compounds which provides a detectable change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no detectable change in the activity of the knock-in Kv β 1.1 subunit, where the knock-in Kv β 1.1 subunit is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits. In one embodiment, the wild-type and knock-in Kv β 1.1 subunits are in one test sample. Alternatively, the wild-type Kv β 1.1 subunit is in a first test sample and the knock-in Kv β 1.1 subunit is in a second test sample. The test samples may comprise cells, in which case, the step of contacting comprises administering said test compound to the cells. In one embodiment, a Kv1 family α -subunit is also present with the test compounds and an immunoassay may be used to determine whether the detectable change is due to a lack of co-association with Kv1 family α -subunits. In one embodiment, the selected test compound binds to the Kv β 1.1 subunit. In addition, as

WO 03/012041

PCT/US02/23790

described above, the test compounds may be small molecules selected from a group of libraries consisting of spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries or synthetic libraries made from deconvolution, "one-bead one-compound methods" or by affinity chromatography selection.

5 In another preferred embodiment, the present invention provides a method of assessing the efficacy of a test compound for modulating the activity of a Kv β 1.1 subunit by contacting the test compound with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a mutant Kv β 1.1 subunit, and detecting a change in activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no change in activity of the knock-in Kv β 1.1 subunit in the second test
10 sample, where the knock-in Kv β 1.1 subunit is unable to confer N-type inactivation of a potassium channel but co-associates with Kv1 family α - subunits. Preferably, the test compound reduces the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit by greater than 10%, more preferably by greater than 50%. In one embodiment, the wild-type Kv β 1.1 subunit is in a first test sample and the knock-in Kv β 1.1 subunit is in a second
15 test sample. The test sample may comprise either a cell, a tissue or a transgenic rodent. Preferably, the step of contacting comprises administering said test compound to the rodent, and more preferably, the rodent is a mouse.

In alternative preferred embodiments, the step of contacting comprises contacting the test compound with a tissue or a cell. In a further preferred
20 embodiment, the method comprises the step of contacting the test compound with a third test sample and detecting no change in activity of the completely non-functional Kv β 1.1 subunit in the third test sample, where the third test sample is characterized by expression of a completely non-functional Kv β 1.1 subunit. Moreover, where the step of contacting comprises contacting the test compound with a cell, the step of
25 detecting comprises an immunoassay to determine whether the wild-type Kv β 1.1 subunit co-associates with Kv1 family α -subunits. More preferably, the knock-out subunit is in a rodent and the step of detecting in this embodiment comprises a behavioral test such as a Y maze, contextual fear conditioning and an elevated zero maze. Alternatively, the knock-out subunit is in a rodent, and the step of detecting in
30 this embodiment comprises a physiological assay such as a hormonal assay, a hyperthermia assay and an electro-physiological assay.

In still another embodiment, the present invention includes a method of assessing the efficacy of a test compound for inactivating A-type potassium channels

WO 03/012041

PCT/US02/23790

by contacting a test compound with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a knock-in Kv β 1.1 subunit and detecting a change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no change in the activity of the knock-in Kv β 1.1 subunit, where the knock-in Kv β 1.1 subunit is encoded by a Kv β 1.1 gene sequence comprising a mutation in all, or a portion of, codons 1-70, more preferably codons 1-36. In one embodiment, the change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit is caused by inhibition of N-type inactivation of the potassium channels. Preferably, the change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit causes the wild-type subunit to have the same activity as the knock-in Kv β 1.1 subunit. In another preferred embodiment, the activity is measured by subjecting a transgenic rodent to an elevated zero maze. Alternatively, the activity is measured by subjecting a transgenic rodent to an environmental stimulus and then measuring the corticosterone levels of the rodent. In another alternative embodiment, the activity is measured by taking tissue from a transgenic rodent and subjecting the tissue to electro-physiological tests. Most preferably, the transgenic mammal is a mouse. In yet another alternative embodiment, the activity is measured by using *in vitro* binding assays. Moreover, in another embodiment, the test compound binds to the wild-type Kv β 1.1 subunit but does not bind to the knock-in Kv β 1.1 subunit. In a most preferred embodiment, the method further comprises contacting the test compound to a completely non-functional Kv β 1.1 subunit and detecting no change in the activity of the completely non-functional Kv β 1.1 subunit. Preferably in this embodiment, the test compound reduces the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit by greater than 10%, and more preferably by greater than 50%.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1A is a schematic representation of endogenous Kv β 1 gene structure and its exonic organization. The three exons at the 5' end (exon 1.1, 1.2, 1.3) share common domains (exons 3-15) at the C-terminus but are alternately spliced so each encodes unique N-terminal protein sequences. Exon 1.1 encodes the inactivation domain that was targeted for mutation. The relative order of the three exons 1.1, 1.2 and 1.3 on the gene is uncertain.

Figure 1B illustrates the strategy by which the endogenous Kv β 1.1 gene was targeted for mutation. The targeting vector (top) was designed to incorporate a 3x HA tag in place of the 33rd codon of exon 1.1 and a lox-flanked neomycin cassette

WO 03/012041

PCT/US02/23790

(Flox-Neo). Through homologous recombination (first arrow), the mutant exon and Flox-Neo is exchanged in place of exon 1.1. A second recombination mediated by Cre- recombinase (second arrow) removes the Flox-Neo from the intron, leaving behind one copy of the LoxP site (bottom). The restriction sites EcoRI and Bam HI are represented by "R" and "B", respectively.

5
10
Figure 1C is a diagrammatic representation of a Southern blot in which ES cells were digested with Bam HI. The 5' probe from Figure 1B was used to identify a ~7.0 kb band for the wild-type Kv β 1 allele, while an additional ~1.0 kb band, resulting from the BamHI site located within 3x HA, was identified in the three targeted ES clones (51, 145 and 191).

15
20
Figure 1D and 1E are a diagrammatic representation of the results of RNase protection analysis, indicating the expression pattern of knock-in Kv β mutant (Kv β o) mRNA (Figure 1D) and wildtype Kv β (WT) (Figure 1E). A probe complementary to 3xHA exon 1 generated a protected band of 420 bp in heterozygous and homozygous KI animals (wt/KI and KI/KI respectively) and a shorter protected band of 220 bp in wildtype (WT), due to a missing 3xHA sequence at the N-terminus of normal kv β 1.1 mRNA. Converse RPA analysis, using a probe complementary to normal Kv β 1.1 mRNA, demonstrated a fully protected fragment of 480 bp from WT mRNA, while two fragments (210 and 140) flanking the 3xHA sequence were protected in KI mRNA. Animals bearing the Flox-Neo cassette did not show specific bands from either probes, indicating complete deficiency of Kv β 1.1 expression and a KO genotype.

25
30
Figure 1F is a diagrammatic representation of the results of PCR analysis using samples from various genotypes. Kv β o KI primers amplify a fragment between the 3'exon-intron boundary of exon 1.1 and a site 30 bp downstream of Neo-Flox, and thereby permits identification of homozygous wild-type (w/w), homozygous KO (o/o), homozygous KI (l/l) and heterozygous KI (w/l) animals. The KI allele includes the presence of a loxP repeat sequence and therefore provides a longer amplified sequence (264bp) than the WT allele (230bp).

Figure 1G is a diagrammatic representation of a Western blot conducted to analyze expression of Kv β 1, Kv β 2, synapsin1 (control) or HA in cortex, striatum, hippocampus, cerebellum, midbrain and thalamus from WT and mutant mice. Brain regions as indicated were dissected and analyzed for specific immuno reactivities.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

5 Figures 2A-2B illustrate different learning and memory patterns among WT 129/SvEv mice versus KO and KI mice in the Y maze (Example 2). Figure 2A illustrates the percentage of mice which first choose the novel arm of the maze after inter-trial intervals (ITIs) of 30 min, 2 hr and 4 hr. Figure 2B illustrates the percentage of time (of a 2 minute period) spent in the novel arm, after ITIs of 30 min, 2 hr and 4 hr.

Figures 3A-3B illustrate different learning patterns between WT, KI and KO mice in both C57Bl6 (Figure 3A) and 129/SvEv (Figure 3B) backgrounds in the Contextual Fear Conditioning test.

10 Figures 4A-4B illustrates the percentage of time spent by the three different genotypes, WT, KI and KO, in both C57Bl6 (Figure 4A) and 129/SvEv (Figure 4B) backgrounds, in the open zone portion of the elevated zero maze.

15 Figure 5A illustrates the effect of varying dosages of chlordiazepoxide on stress-induced hyperthermia in male WT (129/SvEv) mice. Inset shows body temperature on the initial measurement.

Figure 5B illustrates the reactions to stress-induced hyperthermia in wildtype (WT; 129/SvEv), Kv β knock-in (KI) and knockout (KO) mice. Inset shows body temperature on the initial measurement.

Figure 6 illustrates that seizure threshold is unchanged in Kv β knock-in mice.

20 Figure 7 illustrates *in-situ* hybridization quantitation of *c-fos* mRNA in the parietal cortex of KI, KO and wild-type mice.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

25 The present invention is directed to the discovery that transgenic mice bearing a knock-in mutation (KI) in the Kv β 1.1 gene manifest significantly different behavioral phenotypes compared to transgenic mice bearing a knockout mutation (KO) of Kv β 1.1 or wild-type mice (WT). The β -subunits of KI mice lack the ability to inactivate Kv1-family K⁺ channels but retain the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits and thereby enhance channel surface expression. In three different 30 behavioral paradigms, the Y maze test, contextual fear conditioning and the elevated zero maze, KI mice consistently registered different behavioral patterns from KO mice. As indicated by the time spent in the novel arm of the Y maze (see Example 2), KI mice manifested retention deficits at the half hour inter-trial interval (ITI) as

WO 03/012041

PCT/US02/23790

5 compared to KO and WT mice, but displayed improved retention over KO mice at the four hour ITI. In the contextual fear conditioning test, KI mice demonstrated significant impairments as compared to KO and WT mice (see Example 4). Furthermore, KI mice displayed different behavior and physiological patterns as compared to KO mice in functional assays such as the elevated zero maze (Example 4), stress-induced corticosterone levels (Example 5) and stress-induced hyperthermia (Example 6).

10 Without being bound by theory, it is believed that the KI mutation elicits a distinct phenotype from KO that reflects the specific deficit of N-type channel inactivation. The results of KI activity in behavioral and physiological assays suggest an anxiolytic profile, and therefore a potential role in screening test compounds for the treatment of panic and anxiety disorders.

15 The present invention is therefore directed to transgenic mammals, particularly mice, whose genome encodes the KI mutation and to the nucleic acid constructs and targeting constructs used in the generation thereof. In addition, the KI transgenic animals provide a positive model for evaluating the efficacy of test compounds that modulate Kv β 1.1 activity. The present invention is also directed to binding assays, high-throughput assays and functional assays (particularly behavioral and physiological assays) for test compounds capable of modulating
20 Kv β 1.1 activity, as shown below.

DEFINITIONS

To facilitate an understanding of the present invention, a number of terms and phrases are defined below:

25 The term Kv β 1.1 refers to a β 1 subunit of an A-type potassium channel, in particular the β 1.1 subunit isoform of a shaker-like voltage-gated potassium channel (Kv). The Kv channel is typically made up of four identical subunits, which join together around a central water-filled pore. This pore is opened to allow the passage of potassium ions through it, or closed in response to changes in cell potential; hence, "voltage-gated". The Kv channels and the β 1.1 subunit are known to those of
30 skill in the art.

As used herein, a knock-in Kv β 1.1 mutation ("KI") refers to a mutation in a Kv β 1.1 gene, whereby the mutated Kv β 1.1 gene encodes a defective β 1.1 subunit

WO 03/012041

PCT/US02/23790

which is unable to confer N-type inactivation of K⁺ channels but is able to co-associate with Kv1 family α - subunits and thereby enhance channel surface expression. As used herein, a KI subunit refers to the mutated β 1.1 subunits encoded by the KI mutation, and a KI mammal refers to a mammal having an expressed KI mutation. In preferred embodiments, a KI mutation is generated by inducing a mutation in codons 1-70 of the Kv β 1.1 gene. Codons 1-70 of Kv β 1.1 are provided in SEQ ID NO: 1. The preferred DNA and amino acid sequence range of Kv β 1.1 is shown in SEQ ID NO: 1. Preferably, the mutation is a replacement mutation in which all, or a portion of, codons 1-36 are replaced, as shown in the "Kv β _o" mutation of Example 1 and SEQ ID NO:2. In particularly preferred embodiments, an immunoreactive tag substitutes all of endogenous codons 1-70, or at least 1-36, of the Kv β 1.1 gene and aids in detecting co-immuno-precipitation with an α -subunit. Alternatively, any foreign nucleic acid sequence may be inserted into the endogenous Kv β 1.1 gene to produce the KI mutation. A Kv β 1.1 knock-in mammal, or the tissues or cells therefrom, includes both the heterozygote mammal (*i.e.*, one mutated allele and one wild-type allele) and the homozygous mutant (*i.e.*, two mutated alleles).

A Kv β 1.1 knockout mutation ("KO") refers to a mutation in a Kv β 1.1 gene, whereby the mutated Kv β 1.1 gene encodes a β -subunit which is unable to either confer N-type inactivation of the potassium channel or to co-associate with Kv1 family α -subunits, or wherein the Kv β 1.1 gene is completely absent. In short, the KO mutation encodes a completely non-functional Kv β 1 subunit. As used herein, a KO subunit refers to the mutated β 1.1 subunits encoded by the KO mutation, and a KO mammal refers to a mammal having an expressed KO mutation. The term "Kv β 1.1-knockout" refers to both the heterozygote mammal and the homozygous mutant mammal, and the tissues or cells therefrom. An example of a Kv β 1.1-knockout mutation is shown in Example 1, wherein a neomycin marker is inserted into an intron of the Kv β 1.1 gene and completely disrupts functionality of the gene.

The term wild-type Kv β 1.1 ("WT") refers to a Kv β 1.1 gene having naturally-occurring nucleotide and amino acid sequences encoding a completely functional Kv β 1.1 subunit, where the gene encoding the Kv β 1.1 subunit has not at any time, in

WO 03/012041

PCT/US02/23790

immediate or ancestor generations, been experimentally manipulated to either delete naturally-occurring material or to include foreign genetic material.

5 The term "genetically modified" refers to a cell containing and/or expressing a gene comprising an induced mutation which in turn modifies the genotype and phenotype of the cell, and subsequently, its progeny. This term includes any addition or disruption to a cell's endogenous nucleotides, including an insertion mutation, a frameshift mutation or a stop codon mutation. The terms "mutated" or "mutant" and their various grammatical derivatives refers to any gene comprising an induced mutation, or to a gene product encoded therefrom. As used herein, a mutated
10 Kv β 1.1 gene will typically refer to a gene which encodes either a knock-in Kv β 1.1 subunit or a knock-out Kv β 1.1 subunit.

The term "non-human mammals" of the invention includes any vertebrates such as rodents, non-human primates, ovines, bovines, ruminants, lagomorphs, porcines, caprines, equines, canines, felines, aves, etc. Preferred non-human
15 mammals are selected from the order Rodentia which includes rats and mice, most preferably mice.

The term "transgene" as used herein refers to a foreign nucleic acid sequence that is placed into a subject mammal by introducing the foreign sequence into embryonic stem (ES) cells, newly fertilized eggs or early embryos. The term
20 "foreign nucleic acid sequence" refers to any nucleic acid sequence which is introduced into the genome of an animal by experimental manipulations and may include nucleic acid sequences found in that mammal so long as the introduced gene contains some modification (e.g., an immunoreactive epitope tag, a point mutation, the presence of a selectable marker gene, the presence of a loxP site, etc.) relative
25 to the naturally-occurring gene.

The term "targeting construct" refers to an oligonucleotide sequence comprising a modification (e.g., an immunoreactive epitope tag, an insertion mutation, a stop codon mutation, the presence of a selectable marker gene, the presence of a loxP site, etc), and a sequence(s) homologous to the endogenous
30 Kv β 1 gene which flanks the modification. The targeting construct is generally ligated into a targeting vector, e.g., a plasmid, which is capable of introducing the construct into a host cell. The homologous sequence(s) permits the homologous recombination of the targeting construct or vector into at least one allele of the

WO 03/012041

PCT/US02/23790

endogenous Kv β 1 gene in the chromosomes of the target or recipient cell (e.g., ES cells). The targeting construct or vector may contain more than one modification. Preferably, the targeting constructs and vectors of the present invention are of the "replacement-type," where two regions of homology flank the gene modifications and result in the replacement of the portion of the targeted gene lying between the homologous regions. Insertion-type constructs and vectors by contrast, have only one region of homology with the targeted gene and results in the insertion of the adjacent portion into the targeted gene, typically at either the carboxy- or amino-terminus. If insertion-type constructs or vectors are used in the present invention, then the homologous region must target for insertion into the amino-terminus of the Kv β 1.1 gene. As demonstrated herein, homologous recombination permits the integration of targeting constructs and vectors to disrupt the inactivation domain of Kv β 1, resulting in the inability to confer N-type inactivation.

As used herein, the term "selectable marker" refers to a gene which encodes an enzymatic activity that confers resistance to an antibiotic or drug upon the cell in which the selectable marker is expressed. Selectable markers of the invention are preferably "positive"; positive selectable markers are typically dominant selectable markers, i.e. genes which encode an enzymatic activity which can be detected whenever present in a mammalian cell or cell line (including ES cells).

As used herein, the term "modulating activity", in its various grammatical forms (e.g., "modulated," "modulation," "modulating," etc.) includes, the stimulation, potentiation, inhibition and/or relief of inhibition of normal protein activity (e.g. wild-type Kv β 1.1 activity). The term does not encompass the up-regulation or down-regulation of expression levels of the protein.

The term "activity" as used in relation to a WT, KI or KO subunit, refers to the particular subunit's ability to carry on its normative functions, i.e., normative WT subunit activity is both co-association with Kv1 family α subunits and inactivation of potassium channels, normative KI subunit activity is typically co-association with Kv1 family α subunits but no channel inactivation, and normative KO subunit activity is a complete inability to co-associate or inactivate potassium channels. A "detectable change in activity" or "detecting a change in activity" is therefore a deviation from the normative function of the particular subunit, as determined by the binding assays and functional assays described below. The binding assays of the invention typically use

WO 03/012041

PCT/US02/23790

radiolabeling to detect binding, and therefore changes in activity, whereas the functional assays will use statistically significant deviations in behavior or physiology to detect changes in subunit activity.

5 The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of two or more subunit amino acids, amino acid analogs, or peptidomimetics. The subunit may be linked by peptide bonds or other bonds, *e.g.*, ester, ether, *etc.* As used herein the term "amino acid" includes either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and amino acid analogs and peptidomimetics. A peptide of three or
10 more amino acids is commonly referred to as an oligopeptide. Peptide chains of greater than three or more amino acids are referred to as a polypeptide or a protein.

As used herein, the terms "polynucleotide" and "oligonucleotide" are used interchangeably, and include polymeric forms of nucleotides of any length, either deoxyribonucleotides or ribonucleotides, or analogs thereof. Polynucleotides may
15 have any three-dimensional structure, and may perform any function, known or unknown. The following are non-limiting examples of polynucleotides: a gene or gene fragment, exons, introns, messenger RNA (mRNA), transfer RNA, ribosomal RNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides, branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence,
20 nucleic acid probes, and primers. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and nucleotide analogs. If present, modifications to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as
25 by conjugation with a labeling component. The term also includes both double- and single-stranded molecules. Unless otherwise specified or required, any embodiment of this invention that is a polynucleotide encompasses both the double-stranded form and each of two complementary single-stranded forms known or predicted to make up the double-stranded form.

30 An "antibody" includes an immunoglobulin molecule capable of binding an epitope present on an antigen. As used herein, the term encompasses not only intact immunoglobulin molecules such as monoclonal and polyclonal antibodies, but also anti-idiotypic antibodies, mutants, fragments, fusion proteins, bi-specific

WO 03/012041

PCT/US02/23790

antibodies, humanized proteins, and modifications of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity.

5 As used herein, the terms "binding partner," or "capture agent," or a member of a "binding pair" refers to molecules that specifically bind other molecules to form a binding complex such as antibody-antigen, lectin-carbohydrate, nucleic acid-nucleic acid, biotin-avidin, *etc.*

10 As used herein, the term "binds" or "specifically binds," in relation to a biomolecule (*e.g.*, small molecule, protein, nucleic acid, antibody, *etc.*), refers to a binding reaction which is determinative of the presence of the biomolecule in a heterogeneous population of molecules (*e.g.*, proteins and other biologics). Thus, under designated conditions (*e.g.*, immunoassay conditions in the case of an antibody or stringent hybridization conditions in the case of a nucleic acid), the specified ligand or antibody binds to its particular "target" molecule and does not bind in a significant amount to other molecules present in the sample.

15 The terms "mimic" or "imitate" when used in reference to the ability of a test compound to imitate the activity of a mutated Kv β 1.1 subunit, refers to the ability of the compound to produce effects (*e.g.* behavioral, electro-physiological, biochemical) substantially similar to those observed in mammals expressing a mutated Kv β 1.1 gene, *i.e.* KI or KO mutations.

20 The term "test compound" refers to an agent that is to be screened in one or more of the assays described herein. The agent can be virtually any chemical compound. It can exist as a single isolated compound or can be a member of a chemical (*e.g.*, combinatorial) library. In a most preferred embodiment, the test compound is a small molecule.

25 The term "small molecule" refers to a molecule of a size comparable to organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (*e.g.*, proteins, nucleic acids, *etc.*), but includes peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof. Preferred small molecules range in size up to about 5000 Da, more preferably up to 2000 Da, and most preferably up to about 1000 Da. In addition, the small molecules may include numerous chemical classes, but are preferably organic molecules having functional groups which enable protein interaction, such as amines, carbonyls, hydroxyl or carboxyl groups. Typical small

30

WO 03/012041

PCT/US02/23790

molecule compounds will include cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups.

5 As used herein, a "test sample" refers to any sample suitable for the assays of the invention, including but not limited to cell samples, tissue samples and/or whole animals. Preferably the test sample is a biological sample obtained from an organism or from components (*e.g.*, cells, tissue, fluid) of an organism.

10 Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections. The subsections below describe in more detail the present invention. The use of subsections is not meant to limit the invention; subsections may apply to any aspect of the invention.

I. Generation of Transgenic Kv β 1.1 Knock-in Mammals.

A. Design of the Targeting Construct

15 The knock-in transgenes of the present invention preferably include foreign DNA sequences which inactivate only a portion of the Kv β 1.1 gene, in particular the "ball" domain in the amino-terminus which enables rapid inactivation of the K⁺ channel. The mutation may be a replacement mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, or a stop codon mutation which is substituted or inserted into the endogenous Kv β 1.1 gene. Such transgenes preferably contain at least one DNA
20 sequence that is identical to some portion of the endogenous Kv β 1.1 gene to be functionally disrupted. The presence of the mutation in all or a portion of codons 1-70 (SEQ ID NO:1) of a Kv β 1.1 allele functionally disrupts the expression of the inactivation domain (*see e.g.*, Fig. 1A).

25 Preferably, the mutation results in functional disruption either by interference in initiation of transcription or translation, or by premature termination of transcription or translation of the inactivation domain of the Kv β 1.1 protein. More preferably, the transgenes are replacement-type mutations because they increase the stability of the construct in the endogenous Kv β 1.1 gene and reduce the likelihood of secondary
30 recombination and reversion.

In a preferred embodiment, the nucleic acid constructs (the "targeting constructs") used to generate the transgenes are produced by ligation of an expression cassette encoding an immunoreactive epitope tag and/or a selectable

WO 03/012041

PCT/US02/23790

marker into the DNA sequence encoding the Kv β 1.1 gene products. The targeting constructs further comprise at least one sequence portion flanking the expression cassette which is homologous to at least a part of the endogenous Kv β 1.1 gene. The presence of one homologous sequence adjacent to the amino-terminus will enable an insertion mutation in the inactivation domain of the Kv β 1.1 gene. In a most preferred embodiment however, the targeting construct comprises both an immunoreactive epitope tag and a selectable marker which are both in turn flanked by a pair of sequences homologous to endogenous Kv β 1.1 (see e.g., Example 1). The pair of sequences are preferably homologous to endogenous Kv β 1.1 sequences which encode codons 1-70, the inactivation domain required for channel inactivation.

Alternatively, the cassette is also inserted in a location such that splicing out of the cassette introduces a frameshift mutation resulting in non-functional reversions. In a further alternative embodiment, the cassette may provide a stop codon to prematurely terminate transcription or translation. While it is possible to use these alternative embodiments to develop the transgenic mammals of the present invention, detection of successful integration into the endogenous sequences by these methods requires extensive use of Southern hybridization and PCR analysis. It is therefore preferable to incorporate an immunoreactive epitope tag which allows for ease in tracking and isolating the knock-in Kv β 1 subunit.

Immunoreactive epitope tags may be fused into the targeting construct to provide an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is preferably placed in the amino-terminus of the targeting construct, corresponding to codons 1-70 of the Kv β 1.1 gene, and more preferably to codons 1-36. After transcription and translation, the presence of such epitope-tagged forms in a knock-in Kv β 1 subunit can be detected using an antibody against the tag subunit. Also, provision of the epitope tag enables the Kv β 1 subunit to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Alternatively, the targeting construct may be fused with a nucleic acid sequence encoding an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin, such as the Fc region of an IgG molecule, to allow specific binding to an extraneous epitope tag.

Various epitope tags and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags;

WO 03/012041

PCT/US02/23790

the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody. Other epitope tags include the Flag-peptide; the KT3 epitope peptide; tubulin epitope peptide; and the T7 gene 10 protein peptide tag.

5 Preferred "positive" selectable markers include the bacterial aminoglycoside 3' phosphotransferase gene (*neo*) which confers resistance to the drug G418 in mammalian cells, the bacterial hygromycin G phosphotransferase gene (*hyg*) which confers resistance to the antibiotic hygromycin, the bacterial xanthine-guanine 10 phosphoribosyl transferase gene (also referred to as the *gpt* gene) which confers the ability to grow in the presence of mycophenolic acid, as well as the *hprt* gene, the *ndtII* gene, or other genes which confer resistance to amino acid or nucleoside analogues; or antibiotics, etc. The DNA encoding the positive selectable marker in the transgene (e.g. *neo^r*) is generally linked to an expression regulation sequence 15 that allows for its independent transcription in ES cells. Moreover, "negative" selectable markers may also be used, which encode an enzymatic activity whose expression is cytotoxic to the cell when grown in an appropriate selective medium. For example, the HSV-tk gene is used as a negative selectable marker. Expression of the HSV-tk gene in cells grown in the presence of gancyclovir or acyclovir is 20 cytotoxic; thus growth of cells in selective medium containing gancyclovir or acyclovir selects against cells capable of expressing a functional HSV-TK enzyme. In an example using both positive and negative selectable markers, cells which express an active HPRT enzyme are unable to grow in the presence of certain nucleoside analogues (such as 6-thioguanine, 8-azapurine, etc.), but are able to grow in media 25 supplemented with HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). Conversely, cells which fail to express an active HPRT enzyme are unable to grow in media containing HATG, but are resistant to analogues such as 6-thioguanine, etc.

B. Homologous recombination

30 Preferably, the present invention utilizes homologous recombination to control the site of integration of a specific DNA sequence (transgene) into the naturally-occurring $Kv\beta 1.1$ sequence of a mammalian cell and thereby disrupt normal functionality of that gene. Homologous recombination is well-known in the art. In

WO 03/012041

PCT/US02/23790

summary, homologous recombination is a natural process that occurs during mitosis whereby two nucleic acid molecules having identical or substantially similar (*i.e.* "homologous") sequences essentially "switch" the DNA sequences adjacent to or in-between the homologous sequences, such that one region of each initially present molecule is now ligated to a region of the other molecule.

5 The process of homologous recombination can be manipulated to target specific genes by methods well known to those skilled in the art. Most techniques utilize selectable markers, either positive or negative or both, to identify and isolate transformed cells. Moreover, it is possible to increase the frequency of
10 recombination between DNA molecules by using stimulatory agents such as trimethylpsoralen or UV light.

In a preferred embodiment, the targeting construct comprises an expression cassette, which in turn comprises an immunoreactive epitope tag and/or a selectable marker, and the expression cassette is flanked by at least one sequence which is
15 homologous to a portion of the endogenous Kv β 1.1 gene. Preferably, the targeting construct is designed such that an immunoreactive epitope tag is ligated into a nucleic acid sequence corresponding to all or a portion of the targeted region (*i.e.* the inactivation domain encoding codons 1-70, particularly 1-36) of the endogenous Kv β 1 gene. The immunoreactive epitope tag permits for subsequent identification
20 and isolation by Western blot or immunoassay. Alternatively, or in addition to the immunoreactive epitope tag, a positive selectable marker such as *neo* may be inserted into or near a sequence corresponding to the inactivation domain of endogenous Kv β 1 such that expression of the cassette provides antibiotic resistance (*neo* provides resistance to the antibiotic G418). In the most preferred embodiment,
25 the expression cassette comprises both an immunoreactive epitope tag and a selectable marker. Moreover, the targeting construct further comprises a pair of first and second sequences which flank both sides of the expression cassette and are homologous to portions of endogenous Kv β 1.1 at its amino-terminus.

These first and second homologous sequences of the endogenous gene
30 target the transgene to the specific Kv β 1 allele in the ES cell. In a successful example of targeting by homologous recombination, the nucleic acid region lying between the homologous sequences is specifically integrated into, and replaces a portion of, the targeted endogenous gene in one allele of the ES cell. Consequently,

WO 03/012041

PCT/US02/23790

one copy of the targeted Kv β 1 allele is disrupted by homologous recombination with the transgene. Selection with G418 thereafter selects for transfected ES cells containing the transgene integrated into the genome by homologous recombination. Moreover, detection of the transgene as incorporated into the encoded Kv β 1 subunit may be performed by affinity binding with an antibody to the immunoreactive epitope tag.

In the most preferred embodiment of the invention, it is not desirable to have an expressed antibiotic resistance gene incorporated into the cells of a transgenic animal, *i.e.* the antibiotic resistance gene may have deleterious effects, "neighborhood effects" on the neighboring genes, or on the targeted gene, even at long distances. Therefore, in a most preferred embodiment, one or more genetic elements are included in the knock-in construct that permit the antibiotic resistance gene to be excised once the construct has undergone homologous recombination with the endogenous Kv β 1.1 gene.

In this most preferred embodiment, the antibiotic resistant selectable marker is flanked by repeat recombination sites, such as LoxP sites. The presence of direct repeats such as loxP in genomic DNA enables a recombinase protein such as Cre-recombinase to excise the intervening DNA (the *neo* gene), leaving only a single LoxP site in the targeted locus. The presence of this LoxP site rarely, if ever, affects expression. In this embodiment, the selectable marker is inserted into an intron and is only used to identify the successful integration of targeting construct into the endogenous gene. Once transfected, Cre-recombinase can be expressed in ES cells or in specific tissues of transgenic mice to efficiently remove the *neo* marker. Westphal et al. *Proc Natl Acad Sci* (1996) 93:5860.

As mentioned above, mutation of the Kv β 1 inactivation domain may be performed by generating a mutation in a portion of exon 1.1, as illustrated in Example 1, most preferably in codons 1-36, and in particular 1-15. It has further been noted that conversion of the cysteine residue at codon 7 to any other codon except a serine residue (missense, stop codon, *etc.*), will disrupt the inactivation domain. The mutation may be performed by replacing part of, or inserting into, the endogenous exon 1.1 sequence either an immunoreactive epitope tag, a selectable marker, a stop codon or alternatively, by causing a frameshift mutation. In the most preferred embodiment however, only the immunoreactive epitope tag disrupts the amino-

WO 03/012041

PCT/US02/23790

terminus and remains in the final targeted gene. The selectable marker is excised after transformation. Preferably, the epitope tag is integrated into the inactivation domains of the Kv β 1.1 gene in both alleles of the cell, but the frequency of such an event occurring is low (the square of the frequency of a single mutational event).

- 5 Therefore, cross-breeding of heterozygous animals may be performed to produce homozygous animals with the knock-in Kv β 1.1 in both alleles.

- Preferably, the DNA molecules are double stranded, but single stranded DNA molecules may also be used in the invention. In addition, the DNA molecules may be introduced to the cell as either DNA or RNA, which may in turn be converted to
10 DNA by reverse transcriptase or by other means. An illustrative best mode for conducting the invention is provided in Example 1.

C. Transformation of cells.

- To produce the knock-in mammals of the invention, cells are transformed by
15 introducing the targeting construct described above into totipotent cells, such as embryonal stem ("ES") cells, which are capable of giving rise to all cell types of an embryo, including germ cells. A number of ES cells may be used in the present invention. ES cells from mice have been isolated by culturing cells derived from murine blastocysts (Evans *et al.* (1981) *Nature* 292:154-156; Bradley *et al.* (1984)
20 *Nature* 309:255-258; Gossler *et al.* (1986) *Proc. Acad. Sci USA* 83:9065-9069; and Robertson *et al.* (1986) *Nature* 322:445-448). Preferably, however, primary isolates of ES cells are used. Primary isolates may be obtained directly from embryos such as the CCE cell line, or from clonal isolation of ES cells therefrom (Schwartzberg *et al.* (1989) *Science* 212: 799-803). It is generally understood that primary isolates are
25 more efficient for differentiating into a mammal, and in particular, clonally-selected ES cells are approximately 10-fold more effective in producing transgenic mammals than the CCE progenitor cell line. Some examples of clonally-isolated ES cell lines include AB1 (*hprt*) and AB2.1 (*hprt*).

- Preferably, the ES cells are cultured on stromal cells such as primary
30 embryonic G418 R fibroblast cells and/or STO cells. Fibroblast and/or stromal cells prevent clonal overgrowth of abnormal ES cells. Most preferably, the cells are cultured in the presence of a differentiation- inhibiting factor ("DIF"), such as leukocyte inhibiting factor ("LIF"), to prevent premature differentiation. Other known

WO 03/012041

PCT/US02/23790

DIF's include Oncostatin M, interleukin 6 (IL-6) with soluble IL-6 receptor (sIL-6R) , and ciliary neurotrophic factor (CNTF), T-LIF (U.S. Patent No. 5,849,991) and certain cytokines. Furthermore, it is possible to transform stromal cells, with an expressible DIF, upon which ES cells may then be cultured.

5 The methods of introducing exogenous nucleic acid into mammalian hosts and host cells are well known in the art, and vary depending on the host cell. Techniques include electroporation, DEAE-dextran-mediated transfection, calcium phosphate co-precipitation, protoplast or spheroplast fusion, lipofection, micro-injection or viral infection. The transfected ES cells can then be introduced into a
10 blastocoel in a blastocyst stage embryo and contribute to the germ line of the transgenic mammal.

In addition, prior to introduction of the ES cells into the blastocoel, various selection protocols (*e.g.*, *neo* selectable marker) as described above may be used to select for transfected ES cells which have incorporated the transgene. Alternatively,
15 southern hybridization or PCR can be used to determine integration of the transgene.

1. Microinjection

In addition, alternative methods are known in the art for the generation of transgenic mammals containing the transgene. Embryonal cells at various stages of
20 development can be used, according to correspondingly different techniques. Where the zygote is used, micro-injection is the preferred technique as described in U.S. Patent No. 4,873,191, the contents of which are herein incorporated by reference. In the mouse, injection of 1-2 picoliters (pl) of DNA solution can be made when the male pronucleus reaches a diameter of approximately 20 micrometers. Furthermore,
25 it is possible to inject the zygote prior to first cleavage, thereby ensuring incorporation of the construct into all somatic and germ cells of the transgenic animal (Brinster, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4438-4442). The resulting transgenic mammal will be capable of transmitting the foreign DNA to future offspring. Moreover, in this embodiment it is not necessary to first introduce the targeting
30 construct into a self-replicating plasmid or virus.

2. Retroviral Transformation

In another embodiment, retroviral infection is used to introduce a transgene into a non-human mammal. The technique of retroviral infection uses embryos which have been cultured *in vitro* to the blastocyst stage, and targets the blastomeres for infection (Jaenich (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1260-1264). Enzymatic treatment removes the zona pellucida of the blastocysts and facilitates infection via a replication-defective retrovirus carrying the transgene (Van der Putten, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-6152). The transfected blastomeres are then cultured on a monolayer of virus-producing cells. In addition, virus or virus-producing cells can be injected into the blastocoel (Jahner *et al.* (1982) *Nature*, 298: 623-628). In this embodiment, the resulting transgenic mammals will be mosaic for the transgene, since only a subset of the cells will have incorporated the transgene. In addition, retroviral insertion of the transgene may occur at different positions in the genome which generally will segregate in the offspring. In slight variation of this technique, it is also possible to introduce the transgenes into the germline via intrauterine retroviral infection of the midgestation embryo and thereby generate more comprehensive integration of the transgene (Jahner *et al.* (1982) *supra*).

3. Electroporation into ES Cells

In a most preferred embodiment, the transgene containing the targeting construct is introduced to the ES cell by electroporation (Toneguzzo *et al.*, (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16: 5515-5532; Quillet *et al.* (1988) *J. Immunol.*, 141: 17-20; Machy *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8027-8031). The cells are then cultured and selected for cells which have successfully integrated the transgene, as described above (*e.g.*, *neo* in G418 medium). Alternatively, the transgene may be detected by radiolabelled nucleotides, or by other assays of detection which do not require the expression of the selectable marker sequence, such as by PCR amplification techniques.

4. Other Non-Human Transgenic Mammals

One of skill in the art will recognize that there are a number of other natural or transgenic mammals, in addition to mice, which may be used in the invention. As with the murine model, the zygotes or ES cells of these animals may be used as

WO 03/012041

PCT/US02/23790

embryonic targets for introducing the transgenes. In each instance, a transgenic non-human mammal is formed having the desirable defective Kv β subunit phenotype that is characteristic to the mammal.

5 While the development of transgenic mammals by micro-injection has been greatest in mice, it is possible to generate other transgenic mammals by micro-injection of zygotes as well, including rabbits, sheep, cattle, and pigs (Jaenisch (1988) *Science* 240: 1468-1474; Hammer *et al.* (1986) *J. Anima1. Sci.*, 63: 269 ; Hammer *et al.* (1985) *Nature* 315: 680; Wagner *et al.* (1984) *Theriogenology* 21:29). Most preferably, however, the transgenic mammal of the present invention is a mouse or a rat, which has a micro-injection success rate of approximately 10-30%. In addition, retroviral-mediated methods or electroporation techniques using other non-human mammalian ES cells may be used. The derivation of ES cell lines for mice and pigs have previously been reported in the art (Robertson, Embryo-Derived Stem Cell Lines, In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach (E. J. Robertson, ed.), IRL Press, Oxford (1987); PCT Publication No. WO/90/03432; PCT Publication No. 94/26884). In addition, ES cell lines may be derived or isolated from any species (for example, chicken, *etc.*), although cells derived or isolated from mammals such as rodents, rabbits, sheep, goats, fish, pigs, cattle, primates and humans are preferred. In the most preferred embodiment of the invention, murine ES cells are used.

15 As is well-appreciated in the art, transformation of the Kv β 1.1 allele of other non-human mammals requires the Kv β 1.1 gene sequence for that species. Murine Kv β 1.1 gene sequence is on deposit at Genbank as Accession No. AF033003; while rat Kv β 1.1 sequence is on deposit at Genbank as Accession No. X70662. The structure and function of the Kv β 1.1 gene in other non-human mammals is also well-known in the art and is publicly available. Moreover, the desired Kv β 1.1 sequence for a given species can be readily obtained by using probes from known Kv β 1.1 sequences, by hybridization or other such techniques well-known in the art. The genome library of the target mammal may be screened (*i.e.*, a Southern Blot) using 25 low stringency with appropriate probes, and the remaining portions of the gene sequenced by routine methods.

30 Once the target Kv β 1.1 sequence for the desired species is obtained, a target construct can be designed as described above (using various replacement

WO 03/012041

PCT/US02/23790

mutations, insertion mutations, stop codon mutations or frame-shift mutations), to cause inactivation of the ball domain of Kv β 1.1. Then, using methods as described above and in Example 1 below, one skilled in the art may proceed to introduce the targeting vector to an ES cell or zygote of the species and thereby generate a transgenic mammal of the invention.

II. *In vitro* Binding Assays

A. Pre-Screening Assays

In one embodiment of the present invention, the knock-in Kv β 1.1 subunit (incorporating the replacement, insertion, stop codon or frame-shift mutation of the inactivation domain) is useful for pre-screening test compounds for the ability to modulate activity of a Kv β 1.1 subunit. In these embodiments, the knock-in Kv β 1.1 subunit is particularly useful for identifying compounds that interfere with a specified functionality of the normal Kv β 1.1 subunit, *i.e.*, the ability of the Kv β 1.1 subunit to either co-associate with Kv1 family α subunits or its ability to inactivate the potassium channel. In one pre-screening embodiment, the test compounds are contacted with a knock-in Kv β 1.1 subunit and a test compound is selected which is capable of providing a detectable change in the activity of the knock-in Kv β 1.1 subunit. Most likely, the detectable change will be detection of binding of the test compound to the knock-in Kv β 1.1 subunit. In addition, an immunoassay may be used to determine whether the knock-in Kv β 1.1 subunit co-associates with a Kv1 family α subunit, or whether one of the test compounds prevents co-association. In this embodiment, the binding assays can be used to pre-screen for test compounds which have a preference in binding to Kv β 1.1 over Kv1 family α subunits, or vice versa.

Alternatively, using the binding assays in a comparative approach, test compounds are pre-screened for their ability to bind to a wild-type ("WT") Kv β 1.1 subunit but not to a mutated knock-in ("KI") Kv β 1.1 subunit, thereby identifying potential candidates for inhibiting channel inactivation. Each of these pre-screening binding assays may be used prior to performing the additional binding assays and complex functional assays described below.

Binding assays using the target binding protein (KI, WT, KO Kv β 1.1 and Kv1 α) immobilized or not, are well known in the art and may be used for screening test compounds. Purified cell-based or protein based (cell free) screening assays may

WO 03/012041

PCT/US02/23790

be used to identify such compounds. For example, a mutated Kv β 1.1 (KI) subunit may be immobilized in purified form on a carrier and binding to the mutated Kv β 1.1 subunit may be measured in the presence and absence of potential inhibiting compounds, competitive binding may be measured in the presence of Kv1 family α subunits. Conversely, the Kv1 family α subunits may be immobilized on a carrier and subjected to test compounds in the presence of a mutated KI Kv β 1.1.

The *in vitro* binding assays may be manipulated for a variety of useful comparative analyses to reveal additional modulators of Kv β 1.1 subunit activity. In one preferred comparative approach, a purified wild-type Kv β 1.1 subunit ("WT") may be immobilized on the carrier and binding to the WT Kv β 1.1 may be measured in the presence and in the absence of test compounds, and then compared to a knock-in Kv β 1.1 which is also immobilized in purified form on a carrier and subjected to contact with test compounds. Both WT and KI Kv β 1.1 subunits may be present in the same test sample, or alternatively, may be in separate test samples. This embodiment may be useful for identifying compounds capable of mimicking the activity of a KI Kv β 1.1 subunit. Test compounds which bind successfully to the WT but not the KI may then be subjected to additional binding assays and functional assays as described below, for use as a potential therapeutic agent for anxiety disorders. The KO subunit may further be used as a control against the WT and KI genotypes. A suitable binding assay may alternately employ purified polypeptide forms of WT, KI or KO Kv β 1.1 subunits, or may employ cells characterized by expressing each of the above genotypes.

Most preferably, the pre-screening assays are designed such that a large volume of test compounds may be simultaneously screened and evaluated against each other for binding activity with the subject WT, KI or KO Kv β 1 subunits.

B. High-throughput screening

Preferably, the pre-screening assays of this invention are amenable to "high-throughput" modalities. Traditional research methodologies entailed the study of a "lead compound" having some desirable property (modulatory, inhibitory, *etc.*) then modifying the lead compound to create variants and evaluating the efficacies of the variants. High-throughput screening on the other hand, enables for more rapid

WO 03/012041

PCT/US02/23790

drug discovery and has become the preferred method for generating test compounds.

In one preferred embodiment, high throughput screening methods involve providing a library containing a large number of test compounds potentially having the desired activity. Such "combinatorial chemical libraries" are then screened in one or more assays, as described herein, to identify those library members (a particular chemical species or subclasses) that display a desired characteristic activity. The compounds which are identified can then serve as conventional "lead compounds" or can themselves be used as potential or actual therapeutics.

10

1. Combinatorial chemical libraries for potential Kv β 1.1 modulators

A combinatorial chemical library is a collection of diverse chemical compounds generated by either chemical synthesis or biological synthesis by combining a number of chemical "building blocks", such as reagents. For example, a linear combinatorial chemical library such as a polypeptide library is formed by combining a set of chemical building blocks called amino acids in every possible way for a given compound length (*i.e.*, the number of amino acids in a polypeptide compound). Millions of chemical compounds can be synthesized through such combinatorial mixing of chemical building blocks. Preferably, libraries are screened for candidate small molecules. Examples of such libraries include spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries or synthetic libraries made from deconvolution, "one-bead one-compound" methods or by affinity chromatography selection.

Preparation and screening of combinatorial chemical libraries is well known. Examples include, but are not limited to, peptide libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,010,175). Peptide synthesis is by no means the only approach envisioned and intended for use with the present invention. Other chemistries for generating chemical diversity libraries can also be used. Such chemistries include, but are not limited to: peptides (PCT Publication WO 91/19735), encoded peptides (PCT Publication WO 93/20242), random bio-oligomers (PCT Publication WO 92/00091), benzodiazepines (U.S. Patent 5,288,514), diversomers such as hydantoin, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs *et al.* (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:

WO 03/012041

PCT/US02/23790

6909-6913), vinylogous polypeptides (Hagihara *et al.* (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568), nonpeptidal peptidomimetics with a Beta- D- Glucose scaffolding (Hirschmann *et al.* (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218), analogous organic syntheses of small compound libraries (Chen *et al.* (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661), oligocarbamates (Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303), and/or peptidyl phosphonates (Campbell *et al.* (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658). *See, generally*, Gordon *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1385, nucleic acid libraries (*see, e.g.*, Strategene Corp.), peptide nucleic acid libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,539,083) antibody libraries (*see, e.g.*, Vaughn *et al.* (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314, and PCT/US96/10287), carbohydrate libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,593,853), and small organic molecule libraries (*see, e.g.*, benzodiazepines, Baum (1993) *C&EN*, Jan 18, page 33; isoprenoids, U.S. Patent 5,569,588; thiazolidinones and metathiazanones, U.S. Patent 5,549,974, pyrrolidines, U.S. Patents 5,525,735 and 5,519,134; morpholino compounds, U.S. Patent 5,506,337; benzodiazepines, U.S. Patent 5,288,514; and the like).

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

A number of well known robotic systems have also been developed for solution phase chemistries. These systems include automated workstations like the automated synthesis apparatus developed by Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan) and many robotic systems utilizing robotic arms (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.) which mimic the manual synthetic operations performed by a chemist. Any of the above devices are suitable for use with the present invention. The nature and implementation of modifications to these devices (if any) so that they can operate as discussed herein will be apparent to persons skilled in the relevant art.

In addition, numerous combinatorial libraries are themselves commercially available (*see, e.g.*, ComGenex, Princeton, N.J.; Asinex, Moscow, RU; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd., Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD, *etc.*).

2. High-throughput assays of chemical libraries

As mentioned above, the pre-screening assays for test compounds that modulate the binding specificity and/or activity of Kv β 1.1 polypeptides are preferably amenable to high-throughput screening. More preferably, the pre-screening assays are capable of detecting inhibition of the characteristic activity of the KvB1.1 polypeptide. High throughput assays for the presence, absence, or quantification of particular nucleic acids or protein products are well known to those of skill in the art.

Binding assays are similarly well known. Thus, for example, U.S. Patent 5,559,410 discloses high throughput screening methods for proteins, U.S. Patent 5,585,639 discloses high throughput screening methods for nucleic acid binding (*i.e.*, in arrays), while U.S. Patents 5,576,220 and 5,541,061 disclose high throughput methods of screening for ligand/antibody binding.

The high throughput screening systems for use in the pre-screening assays are all commercially available (*see, e.g.*, Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, *etc.*). These systems typically automate entire procedures including all sample and reagent pipetting, liquid dispensing, timed incubations, and final readings of the microplate in detector(s) appropriate for the assay. These configurable systems provide high throughput and rapid start up as well as a high degree of flexibility and customization. The manufacturers of such systems provide detailed protocols for each high throughput system. Thus, for example, Zymark Corp. provides technical bulletins describing screening systems for detecting the modulation of gene transcription, ligand binding, and the like.

C. Assays for Assessing Efficacy of a Test Compound

Once a number of test compounds have been identified, *in vitro* binding assays and functional assays may be used to further assess the efficacies of such test compounds for modulating the activity of Kv β 1.1.

In vitro binding assays may be used to quantify and measure the binding capabilities of the test compound for comparative evaluation. In an embodiment directed to assessing the test compound's effect on Kv β 1.1 subunit co-association, a first binding mixture is formed by combining a knock-in Kv β 1.1 subunit, or fragments thereof, and a Kv1 α subunit, and then the amount of binding in the first binding

WO 03/012041

PCT/US02/23790

- mixture is measured. A second binding mixture is also formed by combining knock-in Kv β 1.1 subunit, a Kv1 α subunit and the test compound and then the amount of binding in the second binding mixture is measured. The amounts of binding in the first and second binding mixtures are compared. A test compound is considered to be capable of preventing co-association of Kv β 1.1 with Kv1 α subunits if there is a decrease in binding with the second binding mixture as compared to the first binding mixture. More preferably, the assay will quantify the degree to which the test compound reduces the binding activity of a knock-in Kv β 1 subunit or its fragments, preferably by greater than 10%, more preferably greater than about 50% or more.
- 5
- 10 Optionally, additional agents may be added to study their interaction with the β 1 and Kv1 α subunits, *i.e.*, β 2 subunits. The formulation and optimization of binding mixtures is within the level of skill in the art. Such binding mixtures may also contain buffers and salts necessary to enhance or optimize binding, and additional control assays may be included in the screening assay of the invention.
- 15 On the other hand, one may assess the efficacy of a test compound for inhibiting inactivation of potassium channels by contacting the test compound with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a knock-in Kv β 1.1 subunit, and detecting a change in the wild-type Kv β 1.1 subunit but no change in the activity of the knock-in Kv β 1.1 subunit. In this latter embodiment, an effective test compound will reduce WT
- 20 Kv β 1.1 activity by preferably greater than 10%, more preferably greater than about 50% (whereas KI activity and KO activity are not reduced). In this latter embodiment, wild type Kv β 1.1 activity is measured as a function of the subunit's binding capabilities, whereas other functional assays described below may be used to specifically assess the test compound's efficacy on inhibiting channel inactivation.
- 25 By these means, test compounds having inhibitory activity for Kv β 1 subunits which may be suitable as therapeutic agents can be identified. The wild-type and knock-in Kv β 1.1 subunits may be combined in one test sample, or may alternately be provided such that the wild-type Kv β 1.1 is in a first test sample and the knock-in Kv β 1.1 is in a second test sample. Furthermore, the test samples may comprise cells, tissues or
- 30 transgenic mammals.

Binding assays, such as Western blots and immunoassays, may be used to determine the amount of Kv β 1 polypeptide present. Standard analytic methods for detection and/or quantification of Kv β 1 subunits include electrophoresis, capillary

WO 03/012041

PCT/US02/23790

electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC), hyperdiffusion chromatography, and the like, or various immunological methods such as fluid or gel precipitation reactions, immunodiffusion (single or double), immunoelectrophoresis, radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), immunofluorescent assays, western blotting, and the like. In one preferred embodiment, the subject Kv β 1.1 polypeptide(s) is detected/quantified in an electrophoretic protein separation (e.g., a 1- or 2-dimensional electrophoresis), which is well-known in the art. Where Western blot (immunoblot) analysis is used to detect and quantify the presence of Kv β 1 polypeptide(s), the polypeptide(s) in the test sample is separated by gel electrophoresis on the basis of molecular weight, transferred to an appropriate support, (e.g., nitrocellulose or nylon filter), and incubated in the sample with the antibodies specific to the target polypeptide(s). As is well-appreciated in the art, the target polypeptides (β 1.1 or Kv1 α subunits) may be directly labeled themselves, or may subsequently be detected using labeled antibodies (e.g., labeled sheep anti-mouse antibodies).

In a preferred embodiment, immunoassays are used to detect the presence of the Kv β 1 subunit. As used herein, an immunoassay is an assay that utilizes an antibody to specifically bind to the analyte (e.g., the target polypeptide(s)). The immunoassay is thus characterized by detection of specific binding of a polypeptide of this invention to an antibody as opposed to the use of other physical or chemical properties to isolate, target, and quantify the subject Kv β 1 analyte. Any of a number of well recognized immunological binding assays (see, e.g., U.S. Patents 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; and 4,837,168) are well suited to detection or quantification of the polypeptide(s) identified herein. Immunological binding assays (or immunoassays) typically utilize a "capture agent" to specifically bind to and often immobilize the analyte (the subject WT, KI or KO Kv β 1.1 polypeptide). In preferred embodiments, the capture agent is an antibody. In a most preferred embodiment, immunoassays are used to determine whether the subject Kv β 1.1 subunit (WT, KI or KO) is co-associating with the Kv1 α subunits, as described in Example 1 below.

Generally, the target subunits (WT, KI, KO or Kv1 α -) may be immobilized on an insoluble support having isolated sample receiving areas (e.g., a microtiter plate, an array, beads, membranes, etc.). Alternatively, cells comprising the Kv β 1 proteins

WO 03/012041

PCT/US02/23790

can be used in the assays. The insoluble supports may be made of any material to which the target subunits can be bound and readily separated from soluble material, and which are otherwise compatible with the overall method of screening. The surface of such supports may be solid, porous or of any convenient shape and are typically made of glass, plastic (*e.g.*, polystyrene), polysaccharides, nylon or nitrocellulose, Teflon[®], *etc.* Microtiter plates and arrays are especially convenient because a large number of assays can be carried out simultaneously using small amounts of reagents and samples. The particular manner of binding the target subunit is not crucial so long as it is compatible with the reagents and overall methods of the invention, maintains the activity of the target subunit and is nondiffusible. Preferred methods of binding include the use of antibodies (which do not sterically block either the ligand binding site or activation sequence when the protein is bound to the support), direct binding to "stick" or ionic supports, chemical crosslinking, synthesis of the protein or agent on the surface, *etc.* Following binding of the protein or agent, excess unbound materials are removed by washing. The sample receiving areas may then be blocked through incubation with bovine serum albumin (BSA), casein or other innocuous protein or other moiety.

As mentioned above, in a preferred embodiment, a target Kv β 1 (WT, KI or KO) protein is bound to the support, and the test compound is added to the assay. Alternatively, the test compound may be bound to the support and the Kv β 1 protein added. Novel test compounds of potential interest as therapeutic agents include specific antibodies and non-natural binding agents identified in screens of chemical libraries, peptide analogs, *etc.* Of particular interest are screening assays for agents that have a low toxicity for human cells. A wide variety of assays may be used to identify and assess the efficacies of test compounds, including labeled *in vitro* protein-protein binding assays, electrophoretic mobility shift assays, immunoassays for protein binding, phosphorylation assays and the like.

The determination of the binding of the test compound to the Kv β 1 protein may be done in a number of ways. In a preferred embodiment, the test compound is labeled, and binding determined directly. For example, this may be done by attaching all or a portion of the Kv β 1 protein to a solid support, adding a labeled candidate agent (for example, a fluorescent label), washing off excess reagent, and

WO 03/012041

PCT/US02/23790

determining whether the label is present on the solid support. Various blocking and washing steps may be utilized as is known in the art.

By "labeled" it is herein meant that the compound is either directly or indirectly labeled with a molecule or compound which provides a detectable signal, e.g. radioisotope, fluorescers, enzyme, antibodies, particles such as magnetic particles, chemiluminescers, or specific binding molecules, etc. Specific binding molecules include pairs, such as biotin and streptavidin, digoxin and antidigoxin, etc. For the specific binding members, the complementary member would normally be labeled with a molecule which provides for detection, in accordance with known procedures, as outlined above. The label can directly or indirectly provide a detectable signal. In a most preferred embodiment, the label is the immunoreactive epitope tag, as previously discussed.

In some embodiments, only one of the components is labeled. For example, the proteins (or proteinaceous candidate agents) may be labeled at tyrosine positions using ^{125}I , or with fluorophores. Alternatively, more than one component may be labeled with different labels for example, using ^{125}I for the proteins and a fluorophor for the candidate agents.

In a preferred embodiment, the binding of the test compound is determined through the use of competitive binding assays. In this embodiment, the competitor is a binding moiety known to bind to the target Kv β 1 subunit, i.e. the competitor is an Kv α 1.1 subunit. In one embodiment, the test compound is labeled. Either the test compound, or the competitor, or both, is added first to the protein for a time sufficient to allow binding. Incubation may be performed at any temperature which facilitates optimal activity, typically between 4 and 37°C for binding of β 1 and α 1.1. Incubation periods are selected for optimum activity, but may also be optimized to facilitate rapid high throughput screening. Typically between 10 minutes and 1 hour will be sufficient. Excess reagent is generally removed or washed away. The second component is then added, and the presence or absence of the labeled component is followed, to indicate binding. In a preferred embodiment, the competitor (i.e., Kv α 1.1) is added first, followed by the test compound. Displacement of the competitor is an indication that the test compound is binding to the subject Kv β 1 protein and thus capable of binding to, and potentially modulating, the activity of the subject Kv β 1 protein. In this embodiment, either component can be labeled. Thus,

WO 03/012041

PCT/US02/23790

for example, if the competitor is labeled, the presence of label in the wash solution indicates displacement by the agent. Alternatively, if the test compound is labeled, the presence of the label on the support indicates displacement.

5 In an alternative embodiment, the test compound is added first, with incubation and washing, followed by the competitor (*i.e.*, Kv α 1.1 subunit). The absence of binding by the competitor may indicate that the test compound is bound to the Kv β 1 protein with a higher affinity. Thus, if the test compound is labeled, the presence of the label on the support, coupled with a lack of competitor binding, may indicate that the test compound is capable of binding to the Kv β 1 protein.

10 In one preferred embodiment, the methods comprise differential screening to assess test compounds that are capable of modulating the activity of the subject Kv β 1 subunits. In this embodiment, the methods comprise combining a Kv β 1 protein and a competitor in a first sample. A second sample comprises a test compound, a Kv β 1 protein and a competitor. The binding of the competitor is determined for both
15 samples, and a change, or difference in binding between the two samples indicates the presence of a test compound capable of binding to the Kv β 1 protein and potentially modulating its activity. That is, if the binding of the competitor is different in the second sample relative to the first sample, the test compound is capable of binding to the Kv β 1 protein.

20 Alternatively, a preferred embodiment utilizes differential screening to assess the efficacies of test compounds that bind to the WT Kv β 1 protein, but cannot bind to KI or KO Kv β 1 subunits, or which can bind to KI but not KO. The structure of the Kv β 1 protein may be modeled, and used in rational drug design to synthesize agents that interact with that site. Test compounds that affect Kv β 1 activity are also
25 identified by screening compounds for the ability to either enhance or reduce the activity of the protein.

Positive controls and negative controls may be used in the assays, such as a completely non-functional Kv β 1.1 subunit (KO). Preferably all control and test samples are performed in at least triplicate to obtain statistically significant results.
30 Incubation of all samples is for a time sufficient for the binding of the agent to the protein. Following incubation, all samples are washed free of non-specifically bound material and the amount of bound, generally labeled, test compound is determined.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

For example, where a radiolabel is employed, the samples may be counted in a scintillation counter to determine the amount of bound compound.

5 A variety of other reagents may be included in the screening assays. These include reagents like salts, neutral proteins, *e.g.*, albumin, detergents, *etc.*, which may be used to facilitate optimal protein-protein binding and/or reduce non-specific or background interactions. Also reagents that otherwise improve the efficiency of the assay, such as protease inhibitors, nuclease inhibitors, anti-microbial agents, *etc.*, may be used. The mixture of components may be added in any order that provides for the requisite binding.

10 In certain embodiments of this invention, the methods may further involve entering/recording test compounds that alter activity of Kv β 1.1 and/or an A-type K⁺ channel in a database.

Antibodies for use in the above-mentioned immunoassays are commercially available or can be easily prepared. Anti- Kv β 1.1 antibodies have been previously described by Veh *et al.* (1995) *Eur. J. Neurosci.* 7: 2189-2205. Either polyclonal or monoclonal antibodies (anti-Kv β 1.1 antibodies) may be used in the immunoassays of the invention. Those of skill in the art will know of various techniques common in the immunology arts for purification and/or concentration of polyclonal antibodies, as well as monoclonal antibodies. See, for example, Coligan, *et al.* (1991) Unit 9, *Current*
20 *Protocols in Immunology, Wiley Interscience*).

In the preferred embodiments of the invention, the immunoassays employ monoclonal antibodies ("mAb's"). For preparation of monoclonal antibodies, immunization of a mouse or rat is preferred. The term "antibody" as used in this invention includes intact molecules as well as fragments thereof, such as, Fab and F(ab)², and/or single-chain antibodies (*e.g.* scFv) which are capable of binding an epitopic determinant. The general method used for production of hybridomas secreting mAbs is well known. Confirmation of specificity among mAb's can be accomplished using relatively routine screening techniques (such as the enzyme-linked immunosorbent assay, or "ELISA", BiaCore, *etc.*) to determine the
25 binding specificity and/or avidity of the mAb of interest.
30

In addition, antibody fragments and human antibodies can be produced. Antibody fragments such as single chain antibodies (scFv or others), can be produced/selected using phage display technology. Human antibodies can be

WO 03/012041

PCT/US02/23790

produced without prior immunization by displaying very large and diverse V-gene repertoires on phage, to generate libraries with innumerable antibodies against haptens, polysaccharides, self proteins, cell surface antigens, etc.

5 **III. Functional Assays**

In one embodiment, this invention provides methods of screening for agents that modulate Kv β 1.1 activity and hence performance in anxiety related tasks. The methods involve detecting the activity level of a Kv β 1.1 gene product (e.g. Kv β 1.1 subunit protein) in the presence of the compound(s) in question and/or comparing
10 the activity level to controls such as KI or KO gene products. In particular, KI transgenic mammals may be used as a positive control to identify potential anxiolytic compounds. Examples of such approaches are described below.

A. Behavioral Assays

15 In one embodiment, modulators of Kv β 1.1 activity can be assayed using any of a variety of behavioral assays to test cognitive abilities, anxiety or stress responses. Such assays involve administering the test compound(s) to a WT, KI or KO mammal and then evaluating the effect of the test compound on the behavior of the mammal. Preferred behavioral assays measure cognitive, hippocampus-related
20 tasks. Such assays include, but are not limited to contextual conditioning (see, e.g., Kim and Fanselow (1992) *Science*, 256: 675; and Phillips and LeDoux *Behav. Neurosci.*, 106: 274), spatial learning (see, e.g., Morris et al. (1982) *Nature*, 297: 681), rotor rod assay, conditioned taste aversion, social recognition, and the social transmission of food preferences (Bunsey and Eichenbaum (1995), *Hippocampus*, 5:
25 546), some of which are illustrated in the examples below. Preferred behavioral assays that measure anxiety include elevated zero maze, conflict assays and fear-potentiated startle assay.

Since behavior at a particular time can depend on the particular physiological state of the mammal (e.g. feeding regimen, reproductive state, amount of sleep, etc.)
30 such assays are preferably performed with both positive and negative controls. The negative control will be a mammal that has been treated in the same manner as the "test" mammal, but without administration of the test compound (or with administration of a significantly lower dose). In a preferred embodiment, a positive

WO 03/012041

PCT/US02/23790

control will include a mammal having a Kv β 1.1 knock-in mutation, most preferably a mouse. A test compound, or combination of test compounds, that induces a reduction of anxiety similar to characteristic behavior of the KI Kv β 1.1 mammal will be an agent capable of modulating Kv β 1.1 activity.

5

B. Physiological Assays**1. Hormonal Assays**

In another embodiment of this invention, hormonal assays may be used to evaluate an animal's response to stress and to assess the efficacy of a test compound in reducing stress. In this embodiment, a test compound is assessed for efficacy by studying the production of stress-related hormonal indicators such as corticosterone or *c-fos* activation. Corticosterone secretion from the adrenal glands in mice is generally considered a reliable endocrine hallmark of stress. Animals secrete this hormone in response to stress such that corticosterone response in plasma can be detected within 5 minutes after onset of stress. This response is often altered in either magnitude or time of secretion in animals that exhibit reduced anxiety levels. Animals are typically subjected to a mild form of stress invoked by environmental stimuli. Foot-shock, forced swim, and restraint are some of the common environmental stresses that have been practiced in rodents.

In one preferred embodiment of this assay, KI, KO and WT mammals are subjected to an environmental stress and the levels of their stress-related hormones are measured at different time intervals after stress. Most preferably, the hormone is plasma corticosterone and measurements are performed at time intervals of 0, 30, 60 and 90 minutes after onset of stress. In another preferred embodiment, activation of *c-fos* may be measured via *in-situ* hybridization, the levels of which may be digitized and quantitated, as explained in Example 8 below.

The above hormonal assays may furthermore be modified to include test compounds. In a most preferred embodiment, the subject animal is administered a test compound and after sufficient time to metabolize the test compound, the animal is subjected to an environmental stress. Measurement of the hormone level is then performed to determine whether the animal has a hormonal pattern that is consistent with the characteristic profile of a WT, KI or KO Kv β 1.1 mammal. Most preferably, test compounds are sought in which administration in a WT mammal produces a

WO 03/012041

PCT/US02/23790

hormonal pattern consistent with an untreated KI mammal. As described in Example 5 below, transgenic KI mice have corticosterone levels which suggest a reduced anxiety pattern.

5 **2. Hyperthermia Assays**

Other assays may be used to evaluate an animal's response to stress and to assess the efficacy of a test compound for reducing stress. Stress-induced hyperthermia, as per the methods of Borsini *et al.* (1989) and Van der Heyden *et al.* (1997), can be used in conjunction with WT, KI and KO mice to evaluate their anxiety profile. Borsini *et al. Psychopharmacology* (1989) 98: 207-211, and Van Der Heyden, (1997) *Physiology and Behavior* 62: 463-470. The animals are typically subjected to a mild form of environmental stress, typically a rectal probe is used for measuring the animal's temperature. As with the hormonal levels described above, the degree of an animal's hyperthermia in response to the environmental stress is an indication of the animal's anxiety.

As illustrated in Example 6 below, KI, KO and WT transgenic mammals are subjected to an environmental stress and the degree of hyperthermia is measured. Known anxiolytics, such as chlordiazepoxide, may also be used for comparative exercise to confirm whether the animal's responses are indeed consistent with an anxiolytic response. The hyperthermia assay may also be modified to assess the efficacies of test compounds, where the subject animal is administered a test compound and after sufficient time to metabolize the test compound, is subsequently subjected to an environmental stress. The degree of hyperthermia is then measured to determine whether the animal has a pattern of hyperthermia that is consistent with the characteristic profile of a WT, KI or KO Kv β 1.1 mammal. Most preferably, administration of the test compound to a WT mammal produces a pattern of hyperthermia consistent with an untreated KI mammal. As described in Example 6 below, stress-induced hyperthermia is blunted in KI mice to a similar magnitude in WT mice administered with chlordiazepoxide, providing further suggestion of a reduced anxiety pattern and therefore, an anxiolytic profile.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

3. Electro-Physiological Assays

Kv β 1.1 activity can be readily measured by a variety of electro-physiological methods known in the art. As explained in work by Giese and colleagues, knockout of Kv β 1.1 activity results in both spike broadening during repetitive firing and a decrease in the slow after hyperpolarization (sAHP) of hippocampal CA1 neurons. Thus, the WT, KI or KO animals can be administered a test compound and then tested, or their tissue can be tested, to compare their electro-physiological response. Most preferably, an electrophysiological recording of the hippocampus is made, and more preferably a recording of the hippocampal CA1 neurons is made. Such a recording can be performed *in vivo*, however, in a preferred embodiment such recordings are made from hippocampal slice preparations. Methods of making and recording from such preparations are well known to those of skill in the art, as indicated in PCT Publication No. WO 00/24871 which is herein incorporated by reference. Preferably, test compounds are sought in which their administration in a WT mammal produces an electro-physiological pattern consistent with that of a KI mammal.

In addition, heterologous A-type K⁺ channels can be expressed in heterologous expression systems such that cells expressing knock-in Kv β 1.1 and corresponding Kv1 family α subunits can be measured electrophysiologically. Preferably the cells are *Xenopus* oocytes or HEK cells transfected with vector(s) containing the knock-in Kv β 1.1 and Kv1 α or their respective RNAs. These cells can be contacted with test compound(s) and the effect of the test compound(s) on the A-type channel conductance can be measured and compared by whole-cell voltage clamp, current clamp, and/or with a patch-clamp technique. These methods for protein expression and electrophysiological recording are all well known to those skilled in the art.

4. Knock-in Kv β 1.1 Mammals as Positive Controls

As indicated above, the Kv β 1.1 knock-in mammals of this invention are useful in a wide variety of contexts, particularly as positive anxiolytic controls. High-level functions such as anxiety, are emergent neural network properties and as such cannot be assayed in highly reductionist (*e.g.* single synapse) models. Behavioral

WO 03/012041

PCT/US02/23790

studies, for example, require an intact living mammal. Similarly, network-related properties (e.g. CA1 activity patterns) require a functional neural network.

Thus, evaluating the effects of potential modulators (e.g. test compounds) on such systems is greatly facilitated by the use of positive controls. In the present context, the behavior of a Kv β 1.1 knock-in mammal provides a good reference for evaluating the behavior of a "normal" mammal treated with a test compound. Other physiological indicators such as hormonal levels or hyperthermia may also be evaluated by comparison to a KI animal. Similarly the performance of a neurological preparation (e.g. the electrophysiological response of a hippocampal slice preparation) treated with a test compound can be compared to the performance of a neurological preparation obtained from a Kv β 1.1 knock-in mammal to evaluate the ability of the test compound(s) to alter electrophysiological response in a manner that mimics Kv β 1.1 down-regulation.

The KI mutants may also be crossed to other mouse models that show accelerated aging or accelerated brain degeneration (such as that found associated with Alzheimer's) to determine if the Kv β 1.1 knock-in modifies associated behavior disorders in these mammal models.

IV. Screening Kits

In one embodiment this invention provides kits for performing the assays described herein. The kits preferably include a Kv β 1.1 knock-in mammal or a cell or tissue derived from a Kv β 1.1 knock-in mammal. The kit can additionally include appropriate buffers and other solutions and standards for use in the assay methods described herein.

In addition, the kits may include instructional materials containing directions (i.e., protocols) for the practice of the methods of this invention. While the instructional materials typically comprise written or printed materials they are not limited to such. Any medium capable of storing such instructions and communicating them to an end user is contemplated by this invention. Such media include, but are not limited to electronic storage media (e.g., magnetic discs, tapes, cartridges, chips), optical media (e.g., CD ROM), and the like. Such media may include addresses to internet sites that provide such instructional materials.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

EXAMPLES

The following examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. The following examples are presented for illustrative purpose, and should not be construed in any way limiting the scope of this invention.

Example 1**Generation of Kv β 1.1 Knock-In Mice Lacking the N-Terminus Necessary for Rapid Inactivation**

Genetically-modified mice bearing a mutant Kv β 1.1 gene were developed that lack the ability to inactivate Kv1-family K⁺ channels but retain the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits and thereby enhance channel surface expression. Unlike Kv β 1 gene knockouts, knock-in mice should retain all functional properties of Kv β 1.1 except the ability to confer N-type inactivation.

A. Generation of Kv β 1.1-targeted ES cells

Figure 1A indicates the endogenous mouse Kv β 1 gene structure and exonic organization prior to introduction of an immunoreactive epitope tag. The three Kv β genes (Kv β 1.1, 1.2 and 1.3) each share exon domains 3-15 at the C-terminus, but are alternately spliced at the 5' end to encode unique N-terminal protein sequences (exons 1.1, 1.2 and 1.2). For designing the Kv β 1.1 targeting construct as shown in Figure 1B, a genomic Bac clone was isolated from the 129/SvEv mouse strain by screening the genomic library using a DNA fragment encoding the N-terminal 90 amino acids of rat Kv β 1.1 protein (Research Genetics, Bethesda, MD) encoded by Genbank Accession No. X70662. The Bac clone was mapped and a 7.2 Kb BamHI fragment was isolated. A 1.2 Kb EcoRI fragment containing exon 1.1a encoding the first 35 amino acids of Kv β 1.1 protein was replaced by a hemagglutinin epitope tag (SEQ ID NO: 2), 3x HA by overlapping PCR strategy, resulting in a protein that is functionally null for channel inactivation (KvBo). A neomycin-resistance cassette flanked by LoxP sequence was inserted within an intron 100 bp downstream of exon 1.1a at the EcoRI site. This modified EcoRI fragment was sequence-verified and

WO 03/012041

PCT/US02/23790

ligated back with 1.5 Kb EcoRI and 4.2 RI/BamHI fragments to form the targeting vector.

R1 embryonic stem (ES) cells (Nagy *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8424-8428) were electroporated with a BamHI-linearized Kv β 1.1 targeting vector.

- 5 The cells were selected by G418 and 200 colonies were picked for Southern Blot analysis. Genomic Southern analysis described below yielded 3 clones that underwent homologous recombination to incorporate the 3x HA tag along with neoFloxP.

- 10 Chimeric mice were generated from ES clones #145 and #191 bearing the 3x HA and neoFloxP allele by injection into C57Bl6 mouse blastocysts. Male coat-color chimeras of 80-90% from each clone were selected to breed further with 129/SvEv wild-type females to obtain F1 heterozygotes on 129/SvEv background. These offsprings were intercrossed to generate F2 homozygotes for analysis. Inclusion of neoFloxP within a critical intron fortuitously suppressed transcription through the
- 15 Kv β 1 gene, thus rendering this allele as Knockout for Kv β 1. A subset of animals was out-bred onto C57/bl6 strain for 5 generations prior to being sib-mated for homozygote synthesis. All experiments unless otherwise stated were conducted either in 129/SvEv background or in N5-C57/bl6 background.

- 20 **B. Derivation of Knock-In Mice Bearing the N-terminal Null Mutation for Kv β 1.1-(Kv β o)**

- Pronuclei from female heterozygous Kv β o-neoFloxP mice were collected and microinjected with a plasmid encoding Cre-recombinase. *In utero* recombination was aimed to excise the Neo-Flox cassette in offsprings, leaving behind the 3xHA mutation at the N-terminal of Kv β 1.1 (Kv β o) and a single copy of Lox-P sequence
- 25 within the intron. Following oviduct transfer of the microinjected pronuclei into pseudopregnant females, newborn pups were analyzed for evidence of Cre-mediated excision of the neoFloxP cassette. PCR analysis of genomic DNA revealed that nearly 100% of the offsprings bearing the 3x HA tag underwent *in vivo*
- 30 excision.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

C. Genomic Southern Blot Analysis

Genomic DNA from ES clones were prepared by Proteinase K digest for 3 hours at 37°C. Following precipitation in isopropanol, DNA were resuspended in TE and restriction digested with BamHI. DNA fragments were resolved on a 0.8% agarose gel and transferred onto nylon membranes overnight. A 300 bp BamHI/EcoRI fragment upstream of the targeting construct was radiolabeled with P^{32} dCTP and used as probe. Presence of an internal BamHI within the 3X HA sequence permits identification of a targeted ES cell as a band hybridizing at 1.2 Kb instead of the 7.2 Kb that is derived from the wild-type Kv β 1 allele. Presence of neoFloxF was subsequently confirmed using a probe directed to neo selection cassette (TK-neomycin minigene). Figure 1C indicates the BamHI/EcoRI probe identified a ~7.0 Kb band for the wild type Kv β 1 allele, and additional ~1.0 Kb bands for the three targeted ES cells (191, 145, 51).

D. PCR analysis of Kv β 0 (KI) and Kv β neo Flox (KO)

A pair of primers (Kv β neo primers) were used to specifically detect the presence of Neo-FloxP sequence within the mice genome. Forward primer 1 (SEQ ID NO: 3; 5' TTGAAAGTGACTTAACTCAGCGC) corresponding to the 3' exon-intron boundary of exon 1.1, and reverse primer 1 (SEQ ID NO: 4; 5' GCTGACCGCTTCCCTCGTCTTAC) specific to the Neo-sequence, were used to amplify a 400 bp fragment from animals bearing the Kv β Neo-Flox alleles. Both homozygous and heterozygous KO animals were confirmed by this analysis.

A second pair of primers (Kv β KI primers) employing forward primer 1 and reverse primer 2 (SEQ ID NO: 5; 5'GGCCACATCTTAAAGATCGCAC) corresponding to 30 bp downstream of neoFlox insertion, were used to distinguish the zygosity of offsprings bearing the WT, Kv β KI or the Kv β KO allele. An additional primer pair specific to *c-fos* was used as internal positive control (SEQ ID NO: 6; fosF primer: 5' ; AGGAGGGAGCTGACAGATACACTCC and SEQ ID NO: 7; fosR primer: 5'CAAGGATGGCTTGGGCTCAGGGTCGT). PCR amplification proceeded using genomic DNA from tail biopsies (1:200 dilution of tail digested in Proteinase K) for 30 cycles at 94°C, 54°C and 72°C for 30, 30 and 60 seconds, respectively. A 4% agarose gel (NuSieve 3:1, BMA, Rockland, ME) was employed to resolve the resultant bands. As shown in Figure 1E, the Kv β KI primers amplify a

WO 03/012041

PCT/US02/23790

230 bp fragment from the wild-type Kv β 1.1 allele but amplify a 260 bp fragment from the Kv β KI allele due to one copy of Lox-P sequence. The Kv β KO allele does not typically amplify due to the size of neo-FloxP sequence (1.4 Kb insert size) intervening between the two primers but scores positively using the Kv β neo primers.

5

E. RNase Protection Assay

RNA probe complementary to wild-type Kv β exon 1.1 and 3x HA-Ex1 were synthesized by *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase in the presence of P³²CTP. Total hippocampal RNA (5 μ g) from Kv β (KI), Kv β Neo-Flox (KO), and Kv β 1.1 wild-type animals were hybridized and Rnase-resistant bands were resolved on 6% PAGE following the manufacturer's instructions (RPAIII kit, Ambion, Austin, TX). Figure 1D and 1E provide a diagrammatic illustration of the exonic structure of the two probes as directed to mutated Kv β (Figure 1D) versus WT Kv β 1.1 (Figure 1E), and the RPA gel resulting from hybridization to the respective probes. The 3x-HA probe revealed a shorter protected band of 220 bp in WT resulting from the missing 3x-HA sequence at the N-terminus of normal Kv β 1.1 mRNA. The same probe generated a 420 bp band in both heterozygote (WT/KI) and homozygote (KI/KI) animals. Conversely, the probe to normal Kv β 1.1 mRNA indicated a fully protected fragment of 480 bp from WT mRNA, while two fragments (210 and 140) flanking the 3x HA sequence were protected in KI mRNA.

These data together confirmed the expression of mRNA encoding the 3x-HA mutation (Kv β) in KI animals. Importantly, animals bearing the Flox-neo cassette (n+/n+) did not demonstrate specific bands from either probes. Thus the Kv β +Neo animals were completely deficient in Kv β 1.1 expression and were KO for Kv β 1.1.

25

F. Western blot Analysis

Antibodies for Kv β 1 and Kv β 2 were used as described previously (Rhodes *et al.*, 1997, J. Neuroscience 17:7084-9). Anti-HA polyclonal antibody (BMB, Germany) was used at 1:2000. Anti-Synapsin polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA) was used at 1:5000. Brain regions from mice homozygous for Kv β (KI), Kv β Neo-flox (KO), or wild-type Kv β 1.1 were dissected and homogenized in Triton lysis buffer containing Triton X100 and 1x complete protease inhibitor cocktail (BMB, Germany).

30

WO 03/012041

PCT/US02/23790

Protein samples were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose paper. Immunoreactive bands on the Western blot were detected by chemiluminescent exposure on film (Hyperfilm, Amersham).

Western Blot analysis indicated that the homozygous KI animals expressed Kv β 0 mRNA and protein in anatomical regions predicted by endogenous Kv β 1 expression and at levels comparable to wildtype mRNA. Brain regions from the cortex, striatum, hippocampus, cerebellum, midbrain and thalamus were dissected and analyzed for specific immuno-reactivities, as shown in Figure 1G. Protein extracts (~20 μ g/lane) from each tissue were run along with rat brain membrane (RBM) as positive control. Wild-type (WT) tissues from normal 129/SvEv mice were assayed for Kv β 1, Kv β 2, Synapsin 1 and HA. Tissues from Kv β 0-neofloxP (KO) animals were assayed as in WT samples, except HA assay was not performed. Tissue from Kv β 0 animals were assayed specifically for HA expression only. Endogenous Kv β 1 protein was identified in all brain areas of WT, with higher levels observed in the hippocampus and striatum. Kv β 0 mutant protein expression closely mimicked the expression pattern of endogenous Kv β 1, as indicated by enhanced HA immunoreactivity in the hippocampus and striatum of Kv β 0 KI animals.

Western blot analysis confirmed the presence of the HA tag and also demonstrated a lack of expression of Kv β 1 in Kv β 0 KO mice when using antibodies to Kv β 1. In these KO mice, there were no apparent changes in Kv β 2 expression when compared to WT animals, implying that no compensatory changes were in effect. In addition, Nakahira *et al.* have shown the absence of the Kv β 1 N-terminus does not adversely affect association with Kv1 family α - subunits (Nakahira *et al.*, *J Biol Chem* (1996) 271:7084-7089). Use of antibody for co-immunoprecipitation as previously described in Rhodes *et al.*, *J. Neurosci.* (1996) 16: 4846-4860, revealed correct association of HA-tagged Kv β 0 with Kv1 family α subunits in KI mice (data not shown).

Example 2

30 Effects of Kv β 1.1 Subunits Lacking N-Terminus on Spatial Learning in Genetically Modified Mice

The significance of the N-terminus in Kv β 1.1 subunits was determined by comparing the phenotype of transgenic knock-in mice to the phenotypes of both

WO 03/012041

PCT/US02/23790

knock-out mice and wild-type mice (129/SvEv) ("WT"). Mice were developed as described in Example 1 above, wherein the Kv β 1.1 of knock-in mice ("KI") lacked a functional N-terminus, but were otherwise capable of associating with α -subunits. The knock-out mice ("KO") had mutations in which Kv β 1.1 was completely inactivated and thus lacked both the N-terminus and the ability to coassociate with α -subunits.

Spatial learning is a hippocampus-dependent cognitive skill that can be tested in a Y maze paradigm (Dellu *et al.*, "A two trial memory task with automated recording: study in young and aged rats" *Brain Res.* (1992) 588: 132-139). The Y-maze novelty procedure is a two-trial recognition task, based on place exploration in a Y-maze. Each experiment consists of two, 5-minute exploration periods separated by an inter-trial interval (ITI). During the first exploration period, one arm of the Y-maze is occluded and the subject is allowed 5 minutes to explore the two arms of the maze. A camera mounted above the maze, records activity, and the data are analyzed by a computer. Trial 1 is followed by an ITI ranging from 30 minutes to 4 hours, during which the animal is placed in a holding cage. During the second exploration period, all arms of the Y-maze are open, the rodent is placed in the original start arm and allowed 5 minutes to explore the maze. The percent of subjects entering the novel arm first, the number of entries into the novel and non-novel arm and the time spent in each arm during the first 2-minutes of the trial are recorded. Rodents have a natural tendency to enter and explore the novel arm (Dellu *et al.*, *Brain Res.* (1992) 588: 132-139).

8-10 week old WT, KI and KO mice (n=28-30) in 129/SvEv background were tested in the Y-maze two trial place recognition procedure using different ITIs. All three WT, KI and KO groups spent significantly more time in the novel arm than in the non-novel arm during the retention trial at all ITIs tested (30 minutes, 2 hours and 4 hours). However, as shown in Figure 2A, KO and WT mice consistently made a first choice of novel more frequently than KI mice at the 30 minute ITI. In contrast, only WT mice made a consistent first choice of the novel arm by the 4 hour ITI. This pattern suggest significant differences in recognition between the KI and KO mice at the 30 minute ITI that disappear by the 4 hour ITI. In addition, as indicated in Figure 2B, KO and WT mice spent significantly more time in the novel arm (NA: 25.4 \pm 3.5 seconds) than KI mice at the 30 minute ITI (NA: 13.9 \pm 3.4 seconds, p<0.05).

WO 03/012041

PCT/US02/23790

Conversely, KI and WT mice spent more time (approaching significance, $p=0.055$) in the novel arm than KO mice at the 4 hour ITI. That KI mice had retention deficits at the 30 minute ITI but better retention than KO mice at the 4 hour ITI suggests a complex role of Kv β 1.1 subunits in spatial learning tasks.

5

Example 3

Nociception and Physiological Responsiveness in Genetically Modified Mice

WT, KI and KO mice in 129/SvEv background were also assessed for differences in sensitivities to visual and nociceptive stimuli. WT, KI and KO mice were tested in groups of 8-10 per genotype for responsiveness to visual, tactile, thermal and chemical stimuli.

1. Visual Cliff Test

KI and KO mice were tested in groups of 8-10 per genotype in a visual cliff test to analyze differences in their visual depth perception (Fox, *Animal Behavior* (1965) 13(2): 232-233). The apparatus was a black and white (1" x 1" squares) checkered box (1' x 2' x 2') contained within a larger box (2' x 2' x 2'8") having an open top. The black and white checkered flooring extended across the top of the inner box, down the side and along the lower floor. A clear Plexiglass sheet (2' x 2')

covered the top of the checkered inner box and completely covered the cliff. In the center of the box, a 4" x 2.5" x 1" platform divided the cliff side from the safe side. Mice were housed in groups until the day of experiment. The mouse was placed on the center platform and the latency of stepping off the platform as well as the side onto which the mouse stepped were recorded. If the mouse did not step off the platform within 3 minutes, a "no choice" score was noted and a maximum latency of 3 minutes was recorded. Each animal received one trial.

All KI and KO mice had 100% accuracy in the visual cliff task, suggesting that there were no differences in vision between groups.

2. Tactile Test using von Frey Filaments

WT, KI and KO mice were tested in groups of 8-10 per genotype for differences in tactile responsiveness using von Frey monofilaments (Chaplan *et al.*,

WO 03/012041

PCT/US02/23790

"Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw," *J. Neurosci. Methods*, (1994) 53: 55-63).

Animals were placed on an elevated wire grid and the plantar surface of the paw was stimulated with a series of von Frey monofilaments. Von Frey filaments were applied to the mid-plantar hindpaw in sequential ascending or descending order, as necessary, to hover as closely as possible to the threshold of responses. The threshold was indicated by the lowest force that evoked a brisk withdrawal response to the stimuli. Thus, a withdrawal response led to the presentation of the next weaker stimulus, and a lack of withdrawal led to the presentation of the next stronger stimulus. Interpolation of the 50% threshold was calculated for each genotype.

3. Thermal and Chemical Test

WT, KI and KO mice in 129/SvEv background were tested in groups of 8-10 per genotype for differences in responsiveness to thermal and chemical stimuli by adapting tests from previous studies performed in rhesus monkeys (Negus *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1355-1363, 1993; Brandt *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296(3): 939-946, 2001).

Warm water was used to assess differences in nociceptive responses produced by genetic manipulation. In the warm-water tail-withdrawal procedure, the rodent was gently restrained and the terminal (3 cm) end of the tail was placed into a thermos bottle containing water warmed to 42, 46, 50, 54 or 58 °C. The latency for the animal to remove the tail from the water was recorded and used as a measure of nociception. If the animal did not remove the tail within 20 seconds, the experimenter removed the tail and a maximum latency was recorded.

Each experimental session began by determining mean baseline tail-withdrawal latencies in each temperature. These latencies were used to assess genotypes for potential differences in their sensitivity to the thermal stimuli.

Following baseline temperature determinations, capsaicin cream (0.075mg % concentration) was applied to the entire length of the tail. Following 10 minutes, the tail was wiped with a damp cloth to remove excess cream and the temperature effect curve was redetermined 5 minutes later. This procedure has been shown to produce robust thermal-hypersensitive in mice.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

Temperature-effect curves were generated for each experimental condition. In addition, the temperature that produced a half maximal increase in the tail-withdrawal latency (*i.e.*, T_{10}) was calculated from each temperature-effect curve. The T_{10} was determined by interpolation from a line drawn between the point above and the point below 10 seconds on the temperature-effect curve. Thermal hypersensitivity was defined as a leftward shift in the temperature-effect curve and a decrease in the T_{10} value. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and significant main effects were analyzed further by post-hoc paired t-tests.

WT, KI and KO mice had similar responses to tactile (VonFrey filaments), thermal (warm water tail withdrawal) and chemical (capsaicin) stimuli. These data also suggest that Kv-channels associating with Kv β 1.1 are not involved in sensitivity to acute nociceptive stimuli.

Example 4

15 Mice Expressing Kv β 1.1 Subunits Lacking N-Terminus Display Impaired Contextual Fear Conditioning and Different Profiles on the Elevated Zero Maze

Previous work demonstrated that completely non-functional Kv β 1.1 knockout mice display decreased K-current inactivation and impaired performance in some hippocampal-formation dependent cognitive tasks, with no change in gross morphology or behavior (Giese *et al.* (1998) *Learning & Memory* 5:257-273). Thus 20 the observed phenotype of the KO mice may be a result of the loss of the ability to 1) rapidly inactivate and/or 2) properly express the K-channel.

Group housed adult male mice were maintained under 12 hour light/dark cycle, with *ad lib* access to food and water. WT, KI and KO mice in both 129/SvEv 25 and C57/Bl6 background, aged 8-16 weeks, were separated into groups of 15-20 per genotype.

A. Contextual Fear Conditioning

Mice were allowed to habituate to the lab for 30-60 minutes prior to testing. 30 Mice were then placed within a sound-attenuated enclosure (Med. Associates) equipped with a grid floor, white noise (64dB), house lights, and tone (75dB) or click generator, and were again allowed to habituate to the chamber for a brief period (2 minutes). Following the habituation period, a conditioning stimulus (CS) in the form

WO 03/012041

PCT/US02/23790

of tone or a series of clicks, was presented for 30 seconds followed by a brief shock (2 seconds) (administered through a grid floor, 1.0 mAmp, unconditional stimulus, US). Following a 2 minute ITI, the animals were exposed to US and CS again. Thirty seconds after the second pairing of shocks, the mice were removed from the operant chambers. Approximately 18 hours later the mice were returned to the operant chambers and were observed for freezing behavior in response to the 'context' (i.e. the same environment, lighting, auditory stimuli other than CS). Following this observation period the animals were returned to their cages for 30-60 minutes. Following this delay, the mice were placed within a novel operant chamber and observed again for freezing behaviors. At the end of this observation period the CS was turned on and the freezing response was recorded. Freezing in each of these three conditions was monitored for 3 minutes in the 129/SvEv background animals and for 5 minutes in the C57Bl6. At 10 second intervals the observer scored whether the animal is freezing (lack of all movement except respiration) or not. Percent freezing in each of the conditions was recorded for each animal. Data was analyzed using a two-way ANOVA (treatment x experimental condition) and *post-hoc* comparisons were made using Fisher's Least significant difference test.

Replicating previously published work, no differences were observed between the KO and WT animals which both expressed high levels of freezing (better contextual conditioning). As shown in Figures 3A and 3B however, KI animals displayed significantly impaired levels of freezing (impaired contextual conditioning) compared to both KO and WT control animals, independent of the background mouse strain ($p < 0.05$).

25 **B. Elevated Zero Maze**

Mice were allowed to habituate to an anteroom for at least 30 minutes. The zero maze consisted of a black Perspex circle divided into four equal quadrants (2 closed and 2 open). The closed quadrants have white Perspex walls extending up from the maze (inner wall = 20 cm; outer wall = 30 cm). The open quadrants have a clear Perspex lip that extends 3 mm up from the edge of the maze. The maze had an outer diameter of 60 cm and passages 5 cm in width, and was raised 55 cm off the floor. An individual animal was placed on the zero maze with head and forepaws in a closed quadrant. Experiments were run under red light conditions with one white

WO 03/012041

PCT/US02/23790

light directed at the ceiling above the maze (C57/Bl6, 15 watt, 4 lux, 129SvEv 42 watts, 20 lux). The mouse's behavior was then recorded for 4 minutes using the EthovisionPro video tracking system.

5 The amount of time spent in, and number of entries into, the open and closed quadrants as well as the total distance traveled was recorded by EthovisionPro software (Noldus Information Technology, Inc.). Data was analyzed with a one-way ANOVA and *post-hoc* comparisons were made using Fisher's Least significance difference test.

10 As in the contextual fear conditioning tests, KO and KI animals displayed different patterns of behavior in the elevated zero maze. Figure 4A in particular indicates that mice homozygous for KI mutation in the C57Bl6 background spent significantly more time ($p < 0.05$) in the open zone as compared to KO or WT mice, suggesting a profile consistent with reduced anxiolytic activity. Figure 4B illustrates that in 129/SvEv background animals, KO animals spent increased time in the open zone relative to both WT and KI animals. The different profiles between C57Bl6 15 versus 129/SvEv background mice may be due to a generally lower level of exploration that is characteristic of 129/SvEv mice, which tend to remain in the quadrants in which they are first placed (closed quadrant). By comparison, as shown in Figures 4A and 4B, all C57Bl6 mice, including WT, explore the environment to a 20 greater extent and spent 5-20% more time in the open zone than 129/SvEv mice.

These data suggest, in combination with the Y maze studies of Example 2, that the phenotype observed in the KO mice is not due solely to the loss of the rapid inactivation of the K-channel and may reflect changes in K-channel expression or compensatory mechanisms involving other K-channel subunits.

25

Example 5

Effect of Knock-In Kv β 1.1 Subunits on Anxiety as Indicated by Stress-Induced Corticosterone Levels

30 To confirm whether the KI genotype provided a distinct anxiety profile, WT, KI and KO mice of 129/SvEv background were subjected to an environmental stress and then measured for changes in corticosterone levels as per the protocol of Kalman *et al.*, *Psychoneuroendocrinology* (1994) 28(5): 349-360. In this experiment, restraint in a narrow, ventilated tube served as the environmental stress. WT, KI and

WO 03/012041

PCT/US02/23790

KO mice were placed within the ventilated tube such that mobility was restrained for a period of 1 hour. Plasma corticosterone levels were measured at 0, 30, 60 minutes during stress, and additionally at 90 minutes after the onset of treatment (30 minutes post-restraint) to ascertain both the magnitude and the duration of corticosterone response in plasma. Preliminary results suggested that KI animals exhibited significantly reduced levels of corticosterone during this treatment (data not shown) (p<0.05).

Example 6

10 **Effect of Knock-In Kv β 1.1 Subunits on Anxiety as Indicated by Measuring Stress-Induced Hyperthermia**

Stress-induced hyperthermia, as per methods of Borsini *et al* (1989) and Van der Heyden *et al.* (1997) was used as an additional tool to evaluate the anxiolytic profile of a KI mouse (Borsini *et al.*, *Psychopharmacology* (1989) 98: 207-211, and 15 Van Der Heyden, *Physiology and Behavior* (1997) 62: 463-470). This model has been reported to be sensitive to the effects of anxiolytics that prevent stress-induced hyperthermia.

Group housed adult male mice were maintained under 12 hour light/dark cycle, with *ad lib* access to food and water. WT, KI and KO mice aged 8-11 weeks in 20 129/SvEv background were separated into groups of 10 per genotype.

Mice were allowed to habituate to the test room at least 1 hour prior to testing. Mice were treated intraperitoneally with a control placebo vehicle (a placebo) or the anxiolytic chlordiazepoxide (5 or 10 mg/kg). Sixty minutes after injection, an initial core body temperature measurement (T1) was measured by inserting a 25 lubricated thermistor probe 2 cm into the rectum of the mouse which was held under light restraint. In this experiment, the rectal probe served as the environmental stress. The temperature was read to the nearest 0.1 degree C using a digital thermometer (Yellow Springs Instruments YSI 2100 Tele-thermometer). A second measurement (T2) was made 10 minutes later after the initial rectal probe. As 30 indicated in Figure 5A, control mice injected with the vehicle showed an increase in body temperature of approximately 0.7 - 0.8°C in this procedure. Data was analyzed by one-way ANOVA followed by least significant difference tests (p<0.05).

WO 03/012041

PCT/US02/23790

Figure 5A illustrates that the anxiolytic chlordiazepoxide prevented the stress-induced hyperthermia as compared to the control vehicle. In particular, the dosage level of 10 mg/kg chlordiazepoxide induced a drop in recorded temperature. Furthermore, as shown in Figure 5B, untreated KI mice (n=25), subjected to the same procedure but in their own housing room, exhibited an anxiolytic-like response that was comparable to the mice treated with 10 mg/kg chlordiazepoxide. By contrast, untreated KO (n=16) and WT mice (n=20) displayed the same or expected hyperthermia as the control mice. No difference was observed in baseline (T1) temperature. These data provide further evidence that reduction of the inactivation of the Kv1 potassium channel, as modeled by the KI animal, would produce an anxiolytic effect.

Example 7

Seizure Threshold In Kv β 1 Mice

Mice underwent surgery under halothane anesthesia to implant a cannula (PE 10 tubing) into the external jugular vein. Animals were allowed to recover for at least 48 hours before seizure thresholds were conducted. Seizure thresholds were determined by administration of pentylentetrazol (PTZ; 5 mg/ml in heparinized saline) delivered intravenously at a flow rate of 0.34 ml/minute. Mice were unrestrained but confined to a small chamber for observation. The latencies to the first twitch, clonic seizure (defined as rearing with forelimb padding), and tonic seizure (defined as full hindlimb extension) were recorded for each subject. Data on seizure latency were converted to mg/kg PTZ delivered for each of the behavioral endpoints as shown in Figure 6.

Sensitivity to intravenous fusion of PTZ was identical among the three genetic strains of mice (n=10-12). Minimum infusion dose to elicit each of the responses shown in Figure 6 were plotted.

Example 8

Stress Assessment Measuring *c-fos* Activation

Wild-type, KI and KO mice were placed within a narrow enclosure (50 ml tube vented at one end) such that mobility was restrained for a period of 1 hour. Animals were restrained for 1 hour per day for 5 consecutive days and sacrificed immediately

WO 03/012041

PCT/US02/23790

thereafter; fresh-frozen brains were processed for *in-situ* hybridization histochemistry. The C-terminal region of *c-fos* was PCR-cloned and used to synthesize a cDNA riboprobe in the presence of P³²UTP (SEQ ID NO: 8, forward primer 5' AGGAGGGAGCTGACAGATCACTTC; SEQ ID NO: 9, reverse primer 5' GTCTGCTGCATAGAAGGAACCGG). *c-fos* mRNA levels were increased in all three groups over unstressed controls *c-fos*. mRNA signal in the parietal cortex was digitized and quantitated as shown in Figure 7. KI animals exhibited a 27% reduction in *c-fos* mRNA levels ($p < .05$ by ANOVA; $n=7$ per group).

10 It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in
15 their entirety for all purposes.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

What is claimed is:

1. A transgenic rodent, said rodent comprising an endogenous gene cluster
5 encoding a mutated Kv β 1.1 subunit of an A-type potassium channel, wherein
the mutated Kv β 1.1 subunit is a knock-in subunit which is unable to confer N-
type inactivation of the channel but retains the ability to co-associate with Kv1
family α - subunits.
2. The transgenic rodent of claim 1, wherein said rodent is a mouse.
- 10 3. The transgenic rodent of claim 1, wherein said knock-in subunit is encoded by
a homozygous mutation.
4. The transgenic rodent of claim 1, wherein said knock-in subunit is encoded by
15 a mutation selected from the group consisting of replacement mutations,
insertion mutations, frameshift mutations, and stop codon mutations.
5. The transgenic mouse of claim 2, wherein said mouse has a significantly
20 different learning or memory pattern as compared to a mouse of the same
strain having a completely non-functional knock-out Kv β 1.1 subunit, as
assayed by a Y maze.
6. The transgenic mouse of claim 5, wherein said mouse has significantly
25 improved learning or memory after a 4 hour inter-trial interval as compared to
the mouse having a knock-out Kv β 1.1 subunit.
7. The transgenic mouse of claim 5, wherein said mouse has significantly
30 impaired learning or memory after a 30 minute inter-trial as compared to the
mouse having a knock-out Kv β 1.1 subunit.
8. The transgenic mouse of claim 2, wherein said mouse has a significantly
impaired learning pattern as compared to a mouse of the same strain having
a knock-out Kv β 1.1 subunit, as assayed by contextual fear conditioning.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

9. The transgenic mouse of claim 8, wherein said mouse has a significantly impaired learning pattern as compared to a mouse of the same strain having a wild-type Kv β 1.1 subunit, as assayed by contextual fear conditioning.
- 5
10. The transgenic mouse of claim 2, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a knock-out Kv β 1.1 subunit, as assayed by the elevated zero maze.
- 10
11. The transgenic mouse of claim 10, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a wild-type Kv β 1.1 subunit, as assayed by the elevated zero maze.
12. The transgenic mouse of claim 2, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a knock-out Kv β 1.1 subunit, as assayed by stress-induced corticosterone levels.
- 15
13. The transgenic mouse of claim 12, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a wild-type Kv β 1.1 subunit, as assayed by stress-induced corticosterone levels.
- 20
14. The transgenic mouse of claim 2, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a knock-out Kv β 1.1 subunit, as assayed by stress-induced hyperthermia.
- 25
15. The transgenic mouse of claim 14, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a wild-type Kv β 1.1 subunit, as assayed by stress-induced hyperthermia.
- 30
16. The transgenic mouse of claim 2, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a knock-out Kv β 1.1 subunit, as assayed by stress-induced *c-fos* levels.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

17. The transgenic mouse of claim 16, wherein said mouse has a significantly reduced anxiety pattern as compared to a mouse of the same strain having a wild-type Kv β 1.1 subunit, as assayed by stress-induced *c-fos* levels.
- 5 18. A transgenic rodent whose genome comprises a homozygous knock-in mutation in codons 1-70 of the N-terminus of an endogenous Kv β 1.1 subunit gene, wherein the knock-in mutation is a replacement mutation and the rodent exhibits significantly different cognitive patterns over a second rodent whose genome comprises a homozygous knock-out mutation which encodes a completely non-functional Kv β 1.1 subunit.
- 10
19. The transgenic rodent of claim 18, wherein the homozygous knock-in mutation is in codons 1-36 of the N-terminus of an endogenous Kv β 1.1 subunit gene.
- 15
20. The transgenic rodent of claim 19, wherein the replacement mutation comprises an immunoreactive epitope tag.
21. The transgenic rodent of claim 20, wherein the epitope tag is a hemagglutinin epitope tag.
- 20
22. The transgenic rodent of claim 18, wherein the rodent is a mouse.
23. A transgenic rodent whose genome comprises a homozygous knock-in mutation in codons 1-36 of the N-terminus of an endogenous Kv β 1.1 subunit gene, wherein the knock-in mutation is a replacement mutation and the rodent exhibits significantly different cognitive patterns over a second rodent whose genome comprises a homozygous knock-out mutation which encodes a completely non-functional Kv β 1.1 subunit.
- 25
24. A transgenic rodent all of whose germ cells and somatic cells contain a recombinant activated Kv β 1.1 transgene sequence introduced into said rodent or an ancestor of said rodent, at an embryonic stage, wherein the
- 30

WO 03/012041

PCT/US02/23790

Kv β 1.1 transgene encodes a knock-in β subunit which is unable to confer N-type inactivation of a potassium channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits.

- 5 25. A method of making an isolated knock-in mammalian cell comprising the steps of:
- (1) effecting homologous recombination between an endogenous Kv β 1.1 gene and a transgene Kv β 1.1, wherein said transgene Kv β 1.1 comprises
- 10 (a) a sequence encoding an immunoreactive tag substituting all or a portion of codons 1-70 of the Kv β 1.1 subunit,
- (b) a selectable marker flanked by a pair of repeat sites, and
- (c) a pair of sequences homologous to the endogenous Kv β 1.1 gene flanking both the tag and the selectable marker; and,
- 15 (2) effecting further recombination to remove the selectable marker, wherein the transgene Kv β 1.1 encodes a knock-in β subunit which is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits.
- 20 26. The knock-in mammalian cell of claim 25, wherein the cell is homozygous for the transgene.
27. A method of making an isolated knock-in mammalian cell comprising the steps of:
- 25 (1) effecting homologous recombination between an endogenous Kv β 1.1 gene and a transgene Kv β 1.1, wherein said transgene Kv β 1.1 comprises
- (a) a sequence encoding an immunoreactive tag substituting all or a portion of codons 1-36 of the Kv β 1.1 subunit,
- 30 (b) a selectable marker flanked by a pair of repeat sites, and
- (c) a pair of sequences homologous to the endogenous Kv β 1.1 gene flanking both the tag and the selectable marker; and,
- (2) effecting further recombination to remove the selectable marker,

WO 03/012041

PCT/US02/23790

wherein the transgene Kv β 1.1 encodes a knock-in β subunit which is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits.

- 5 28. A mammalian cell expressing a mutated Kv β 1.1 subunit of an A-type potassium channel, wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is a knock-in subunit which is unable to confer N-type inactivation of the channel but retains the ability to co-associate with Kv1 α - subunits, wherein said cell comprises an endogenous nucleic acid sequence which controls expression of the mutated
- 10 Kv β 1.1 subunit and said mutated Kv β 1.1 subunit is encoded by a mutation selected from the group consisting of a replacement mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, and a stop codon mutation.
29. The cell of claim 28, wherein said mammalian cell is selected from the group consisting of a horse, a bovine, a rodent, a cat, a dog, a pig, a goat, a sheep, a non-human primate, a human, a rabbit and a hamster.
- 15 30. The cell of claim 28, wherein said cell is a murine cell.
- 20 31. The cell of claim 28, wherein said mutation is a replacement of all, or a portion of, codons 1-70 in the endogenous nucleic acid sequence.
32. The cell of claim 28, wherein said mutation is a replacement of all, or a portion of, codons 1-36 in the endogenous nucleic acid sequence.
- 25 33. The cell of claim 32, wherein said replacement comprises an immunoreactive epitope tag.
34. The cell of claim 32, wherein said cell is homozygous for the mutation.
- 30 35. A nucleic acid construct comprising a nucleic acid encoding a mutation in codons 1-70 of a Kv β 1.1 gene; wherein said nucleic acid encodes a knock-in subunit of an A-type potassium channel and said knock-in subunit is unable

WO 03/012041

PCT/US02/23790

- to confer N-type inactivation of the A-type potassium channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits.
36. The nucleic acid construct of claim 35, wherein said mutation is selected from the group consisting of a replacement mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, and a stop codon mutation.
37. The nucleic acid construct of claim 36, wherein said mutation is a replacement mutation.
38. The nucleic acid construct of claim 37, wherein said mutation comprises an immunoreactive epitope tag replacing all of codons 1-70 of the Kv β 1.1 gene.
39. The nucleic acid construct of claim 35, wherein said nucleic acid is a deoxyribonucleic acid (DNA).
40. The nucleic acid construct of claim 35, wherein said nucleic acid is a ribonucleic acid (RNA).
41. The nucleic acid construct of claim 35, wherein said nucleic acid construct is in a mammalian cell.
42. The nucleic acid construct of claim 35, wherein said nucleic acid is in a vector.
43. A nucleic acid construct comprising a nucleic acid encoding a mutation in codons 1-36 of a Kv β 1.1 gene; wherein said nucleic acid encodes a knock-in subunit of an A-type potassium channel and said knock-in subunit is unable to confer N-type inactivation of the A-type potassium channel but retains the ability to co-associate with Kv1 family α - subunits.
44. A nucleic acid construct for disrupting expression of an endogenous Kv β 1.1 gene via homologous recombination, said construct comprising an

WO 03/012041

PCT/US02/23790

- immunoreactive epitope tag replacing all, or a portion of, codons 1-70 of the Kv β 1.1 gene, a selectable marker and a pair of nucleic acid sequences flanking both the tag and the selectable marker, wherein said pair is homologous to a portion of the endogenous Kv β 1.1 gene.
- 5
45. The nucleic acid construct of claim 44, wherein said immunoreactive epitope tag is a hemagglutinin epitope tag.
46. The nucleic acid construct of claim 44, wherein said selectable marker is a *neo* gene.
- 10
47. The nucleic acid construct of claim 44, wherein said construct is present in a vector.
- 15
48. The nucleic acid construct of claim 44, wherein said selectable marker is further flanked by Lox P nucleic acid sequences.
49. A nucleic acid construct for disrupting expression of an endogenous Kv β 1.1 gene via homologous recombination, said construct comprising an immunoreactive epitope tag replacing all, or a portion of, codons 1-36 of the Kv β 1.1 gene, a selectable marker and a pair of nucleic acid sequences flanking both the tag and the selectable marker, wherein said pair is homologous to a portion of the endogenous Kv β 1.1 gene.
- 20
50. A method of pre-screening test compounds for modulators of Kv β 1.1 subunit activity, comprising the steps of
- (a) contacting test compounds with a mutated Kv β 1.1 subunit; and
- (b) selecting one of the test compounds which provides a detectable change in the activity of the mutated Kv β 1.1 subunit,
- 25
- 30 wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is a knock-in subunit which is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

51. The method of claim 50, wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is in a cell.
52. The method of claim 51, wherein said contacting comprises contacting the cell with said test compounds.
- 5
53. The method of claim 50, wherein said detecting comprises an immunoassay to determine whether the mutated Kv β 1.1 subunit co-associates with Kv1 family α -subunits.
- 10 54. The method of claim 50, wherein the selected test compound binds to the mutated Kv β 1.1 subunit.
55. The method of claim 50, wherein the test compounds are small molecules.
- 15 56. The method of claim 55, wherein the test compounds are from a library selected from a group of libraries consisting of spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries or synthetic libraries made from deconvolution, "one-bead one-compound" methods or by affinity chromatography selection.
- 20 57. A method of pre-screening test compounds for modulators of Kv β 1.1 subunit activity, comprising the steps of
- (a) contacting the test compounds with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a mutated Kv β 1.1 subunit; and
- 25 (b) selecting one of the test compounds which provides a detectable change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no detectable change in the activity of the mutated Kv β 1.1 subunit,
- wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is a knock-in subunit which is unable to confer N-type inactivation but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits.
- 30 58. The method of claim 57, wherein the wild-type Kv β 1.1 subunit and mutated Kv β 1.1 subunit are in one test sample.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

59. The method of claim 58, wherein the test samples comprise cells.
60. The method of claim 57, wherein the wild-type Kv β 1.1 subunit is in a first test
5 sample, and the mutated Kv β 1.1 subunit is in a second test sample.
61. The method of claim 60, wherein the test samples comprise cells.
62. The method of claims 58 or 60, wherein said contacting comprises contacting
10 the cells with said test compound.
63. The method of claim 57, wherein a Kv1 α -subunit is also present with the test
compounds.
- 15 64. The method of claim 63, wherein an immunoassay is used to determine
whether the detectable change is due to a lack of co-association with Kv1
family α -subunits.
65. The method of claim 57, wherein the selected test compound binds to the
20 Kv β 1.1 subunit.
66. The method of claim 57, wherein the test compounds are small molecules.
67. The method of claim 66, wherein the test compounds are from a library
25 selected from a group of libraries consisting of spatially addressable parallel
solid phase or solution phase libraries or synthetic libraries made from
deconvolution, "one-bead one-compound" methods or by affinity
chromatography selection.
- 30 68. A method of assessing the efficacy of a test compound for modulating the
activity of a Kv β 1.1 subunit, said method comprising:
(a) contacting the test compound with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a
mutated Kv β 1.1 subunit; and

WO 03/012041

PCT/US02/23790

- (b) detecting a change in activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no change in activity of the mutated Kv β 1.1 subunit,
wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is a knock-in subunit which is unable to confer N-type inactivation of a potassium channel but co-associates with Kv1 family α - subunits.
- 5
69. The method of claim 68, wherein the test compound reduces activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit by greater than 10%.
- 10 70. The method of claim 69, wherein the test compound reduces activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit by greater than 50%.
71. The method of claim 69, wherein the wild-type Kv β 1.1 subunit is in a first test sample and the mutated Kv β 1.1 subunit is in a second test sample and said test samples comprise cells.
- 15
72. The method of claim 68, wherein the wild-type Kv β 1.1 subunit is in a first test sample and the mutated Kv β 1.1 subunit is in a second test sample and said test samples comprise tissue.
- 20
73. The method of claim 68, wherein the wild-type Kv β 1.1 subunit is in a first test sample and the mutated Kv β 1.1 subunit is in a second test sample and said test samples comprise rodents.
- 25 74. The method of claim 73, wherein said contacting comprises administering said test compound to the rodent.
75. The method of claim 74, wherein said rodent is a mouse.
- 30 76. The method of claim 74, wherein said contacting comprises contacting the tissue with said test compound.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

77. The method of claim 71, wherein said contacting comprises contacting a cell with said test compound.
78. The method of claim 77, wherein said detecting comprises an immunoassay to determine whether the wild-type Kv β 1.1 subunit co-associates with Kv1 family α -subunits.
79. The method of claim 68, further comprising the step of
- (a) contacting the test compound with a completely non-functional knock-out Kv β 1.1 subunit; and
- (b) detecting no change in activity of the completely non-functional knock-out Kv β 1.1 subunit in the third test sample.
80. The method of claim 79, wherein the knock-out Kv β 1.1 subunit is in a rodent and said detecting comprises a behavioral test.
81. The method of claim 78, wherein said behavioral test is selected from the group consisting of a Y maze, contextual fear conditioning and an elevated zero maze.
82. The method of claim 79, wherein the knock-out Kv β 1.1 subunit is in a rodent and said detecting comprises a physiological assay.
83. The method of claim 82, wherein said physiological assay is selected from the group consisting of a hormonal assay, hyperthermia assay and an electro-physiological assay.
84. A method of assessing the efficacy of a test compound for inactivating A-type potassium channels, said method comprising:
- (a) contacting a test compound with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a mutated Kv β 1.1 subunit; and
- (b) detecting a change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no change in the activity of the mutated Kv β 1.1 subunit;

WO 03/012041

PCT/US02/23790

wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is encoded by a knock-in Kv β 1.1 gene sequence comprising a mutation in all or a portion of codons 1-70.

- 5 85. The method of claim 84, wherein the change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit is caused by inhibition of N-type inactivation of the potassium channels.
- 10 86. The method of claim 84, wherein the change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit causes the wild-type subunit to have the same activity as the mutated Kv β 1.1 subunit.
87. The method of claim 84, wherein the activity is measured by subjecting a rodent to an elevated zero maze.
- 15 88. The method of claim 84, wherein the activity is measured by subjecting a rodent to an environmental stimulus and then measuring the corticosterone levels of the rodent.
- 20 89. The method of claim 84, wherein the activity is measured by subjecting a rodent to an environmental stimulus and then measuring the *c-fos* levels of the rodent.
90. The method of claim 88, wherein the rodent is a mouse.
- 25 91. The method of claim 84, wherein the activity is measured by taking tissue from a rodent and subjecting the tissue to electro-physiological tests.
92. The method of claim 84, wherein the activity is measured by using *in vitro* binding assays.
- 30 93. The method of claim 84, wherein the test compound binds to the wild-type Kv β 1.1 subunit but does not bind to the mutated Kv β 1.1 subunit.

WO 03/012041

PCT/US02/23790

94. The method of claim 84, wherein the method further comprises the step of contacting the test compound to a completely non-functional knock-out Kv β 1.1 subunit and detecting no change in the activity of the knock-out Kv β 1.1 subunit.
- 5
95. The method of claim 84, wherein the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit is reduced by greater than 10%.
96. The method of claim 95, wherein the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit is reduced by greater than 50%.
- 10
97. A method of assessing the efficacy of a test compound for inactivating A-type potassium channels, said method comprising:
- 15
- (a) contacting a test compound with a wild-type Kv β 1.1 subunit and a mutated Kv β 1.1 subunit; and
- (b) detecting a change in the activity of the wild-type Kv β 1.1 subunit but no change in the activity of the mutated Kv β 1.1 subunit, wherein the mutated Kv β 1.1 subunit is encoded by a knock-in Kv β 1.1 gene sequence comprising a mutation in all or a portion of codons 1-36.

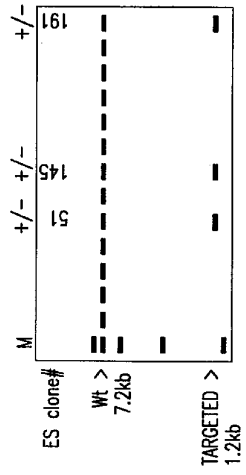


FIG.1C

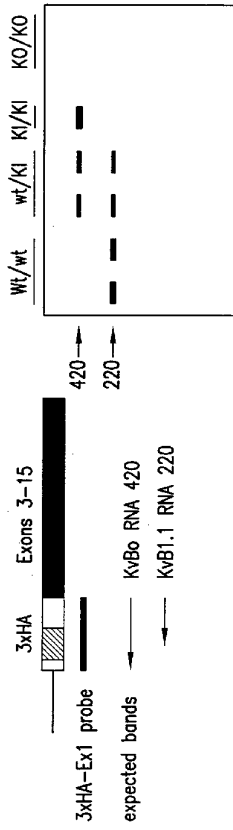


FIG. 1D

3/15

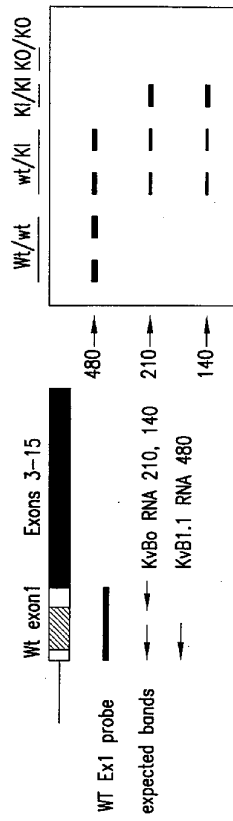


FIG. 1E

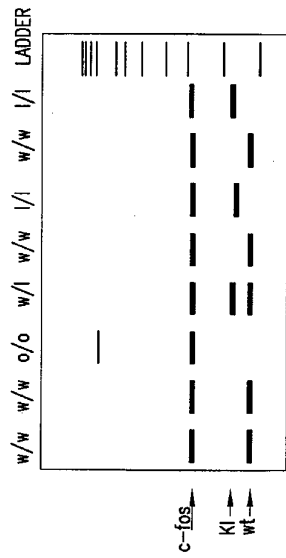


FIG.1F

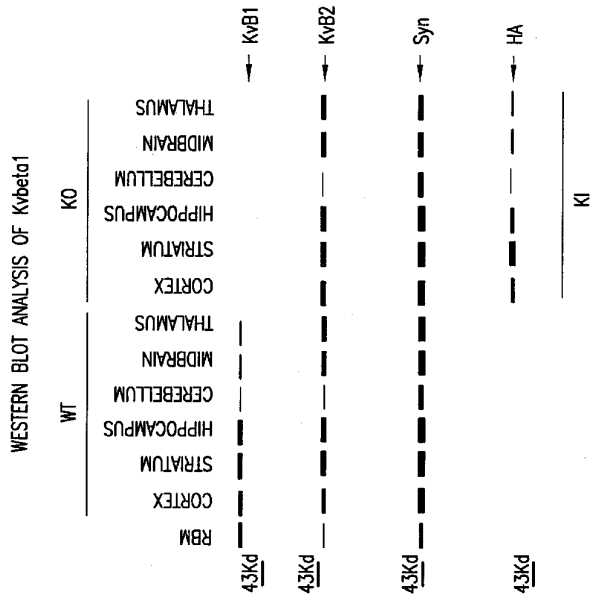


FIG.1G

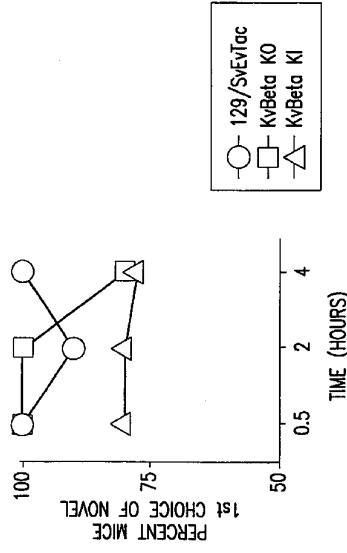


FIG.2A

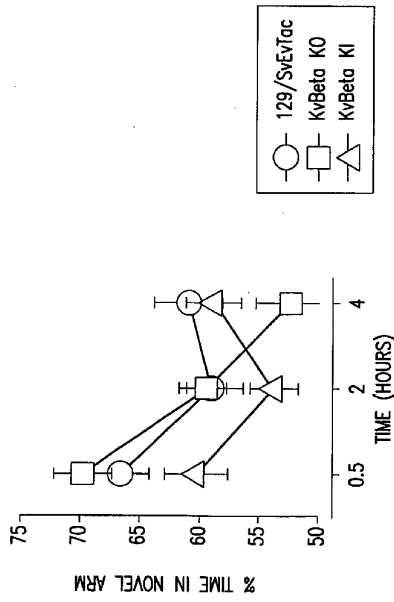


FIG.2B

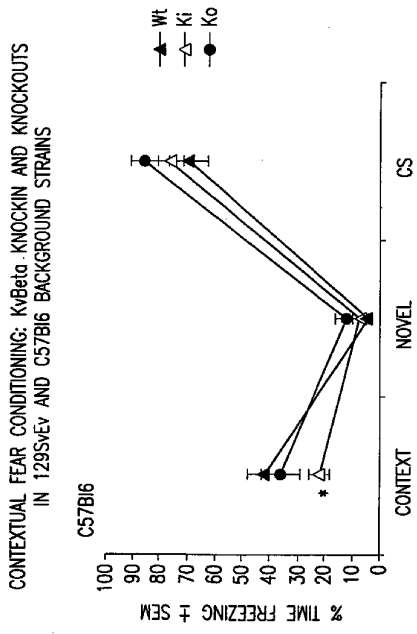


FIG.3A

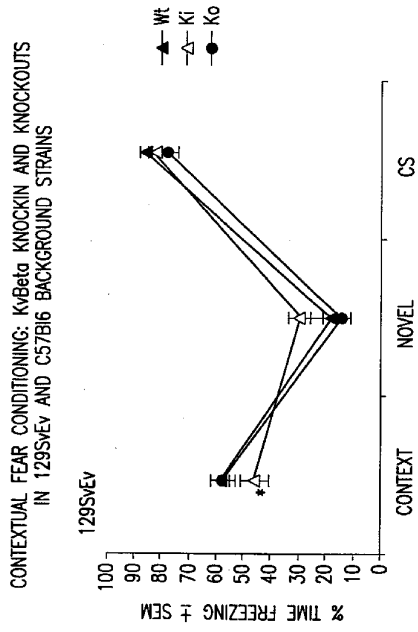


FIG.3B

ELEVATED ZERO MAZE IN THE KvBeta
KNOCKOUT AND KNOCKIN MICE:
PERCENT TIME IN OPEN ZONES

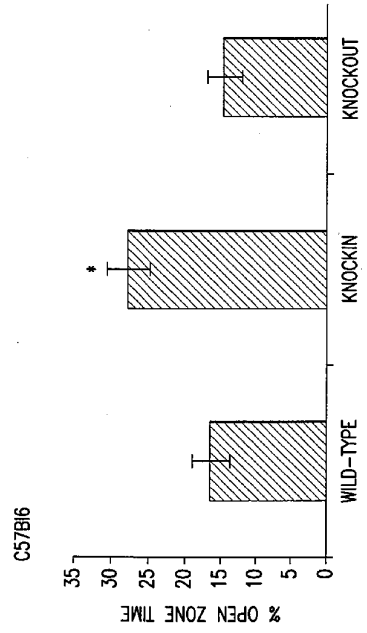


FIG. 4A

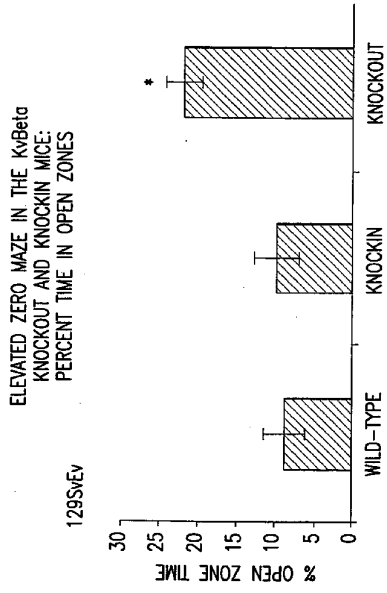


FIG.4B

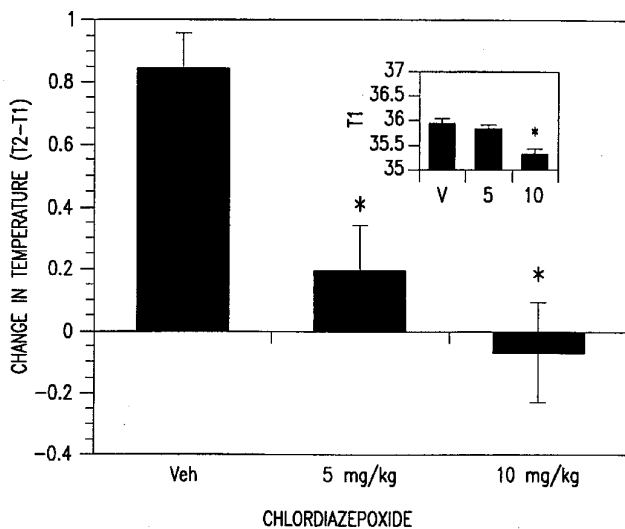


FIG.5A

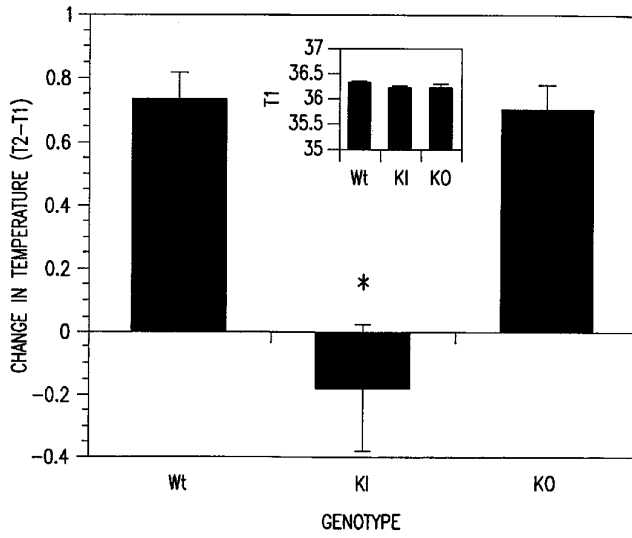


FIG.5B

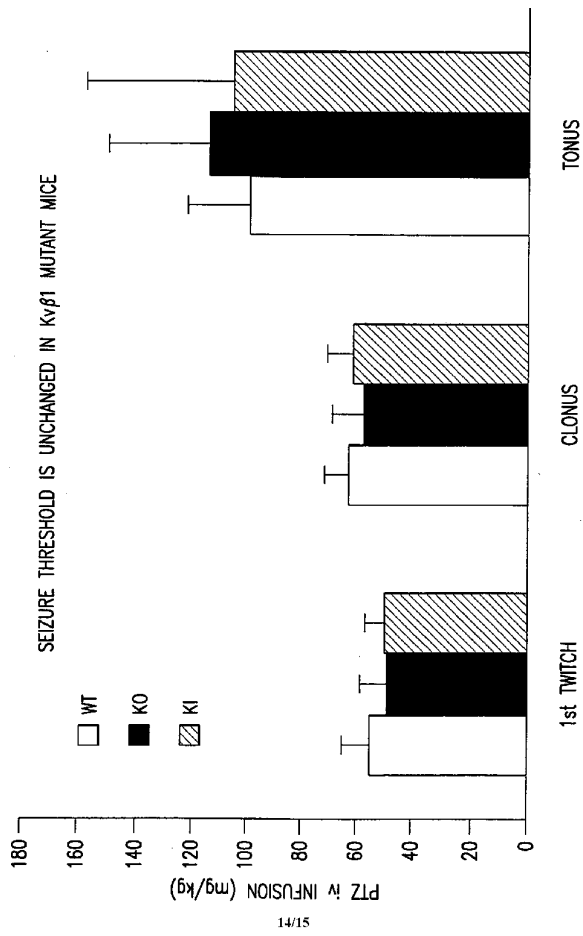


FIG.6

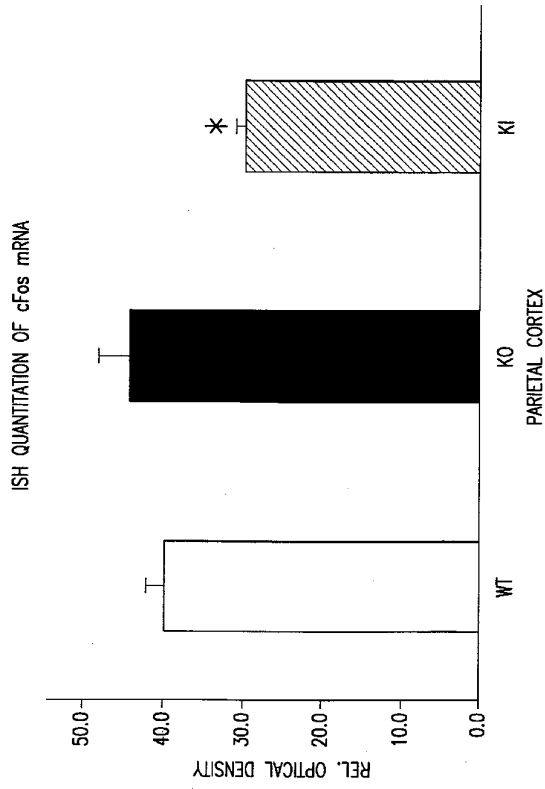


FIG.7

WO 03/012041

PCT/US02/23790

AM100651.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> KNOCK IN TRANSGENIC MAMMAL CONTAINING A NON-FUNCTIONAL N-TERMI
NUS OF Kv BETA 1.1 SUBUNIT

<130> AM100651

<150> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 210

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1
atggaagctt ccatagcctg cacagagcac aatttgaaga gtcgaaatgg tgaggaccga
60
cttctgagca agcagagctc caccgcccc aatgtggtga acgcagcccg ggccaaattc
120
cgcaactgtc ctatcatcgc tcgcagcctg gggaccttca cccctcagca tcacatttct
180
ctcaaagagt ccaccgcaaa gcagactggc
210

<210> 2

<211> 210

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2
atggtatttt acccatagca tgttctcgac tatgcgggct atccctatga cgtccgggac
60
tatgcaggat cctatccata tgacgttcca gattacgctg ctccagtgcg ggccaaattc
120
cgcaactgtc ctatcatcgc tcgcagcctg gggaccttca cccctcagca tcacatttct
180
ctcaaagagt ccaccgcaaa gcagactggc
210

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

WO 03/012041

PCT/US02/23790

AM100651.txt
ttgaaagtga cttaaactcag cgc
23

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 4
gctgaccgct tcctcgtgct ttac
24

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 5
ggccacatct taaagatcgc ac
22

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 6
aggaggagc tgacagatc actcc
25

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 7
caaggatggc ttgggctcag ggtcgt
26

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 8
aggaggagc tgacagatca cttc
24

<210> 9
<211> 23
<212> DNA

WO 03/012041

PCT/US02/23790

AM100651.txt
<213> Artificial
<400> 9
gtctgctgca tagaaggaac cgg
23

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/012041 A3

- (51) International Patent Classification: **C07H 21/04**,
C12N 15/63, 5/00, 15/09, 15/00, A01K 67/00, 67/33
- (21) International Application Number:
PCT/US2002/023790
- (22) International Filing Date: 25 July 2002 (25.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/308,485 27 July 2001 (27.07.2001) US
60/531,140 9 November 2001 (09.11.2001) US
- (71) Applicant: **WYETH** [US/US]; Five Giraldi Farms, Madison, NJ 07940-0874 (US).
- (72) Inventors: **KWAK, Seung, Poon**; 38C Chicopee Drive, Princeton, NJ 08540 (US). **RHODES, Kenneth, James**; 808 Atkinson Circle, Hillsborough, NJ 08844 (US). **MARQUIS, Karen, Lowell**; 269 Rock Run Road, Yardley, PA 19067 (US). **COMERY, Thomas, Anthony**; 219 Flowers Avenue, Langhorne, PA 19047 (US). **ASKREW, Roger**; 11 High Ridge Road, Bosford, MA 01921 (US). **BRANDT, Michael, Richard**; 16 Lenape Road, Flemington, NJ 08822 (US). **ROSENZWEIG-LIPSON, Sharon, Joy**; 25 Bosko Drive, East Brunswick, NJ 08816 (US).
- (74) Agents: **BRAZIL, Bill, T. et al.**; Wyeth, Patent Law Department, Five Giraldi Farms, Madison, NJ 07940-0874 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
12 February 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 2003/012041 A3

(54) Title: KNOCK IN TRANSGENIC MAMMAL CONTAINING A NON-FUNCTIONAL N-TERMINUS OF K_v BETA 1.1 SUBUNIT(57) Abstract: This invention provides a transgenic mammal containing a defective beta 1 subunit (Kvss1) of a voltage sensitive potassium channel, where the Kvss1 subunit is unable to confer N-type inactivation of the K⁺ but retains the ability to co-associate with Kv1 family α -subunits and thereby enhance channel surface expression. Preferably the Kvss1.1 gene encoding Kvss1 subunit has a mutation in all or a portion of codons 1-70 of its inactivation domain. The transgenic mammal is useful as a model for psychiatric and neurological disorders to identify anxiolytic compounds and pro-cognitive functions. The invention also provides for methods for screening and evaluating test compounds for their ability to modulate Kvss1.1 activity, specifically for inactivation of a potassium channel or for co-association with α -subunits.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/23790
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C12N 15/03; 5/00; 15/09; 15/00; A01K 67/00, 67/33 US CL : 800/18, 21; 435/320.1, 325, 455, 463; 536/23.1 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. : 800/18, 21; 435/320.1, 325, 455, 463; 536/23.1 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, CAPLUS, BIOSIS, PCTFUL, USPATFUL, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US 6,365,370 B1 (DUBIN et al) 02 April 2002 (02.04.2002), see the entire document.	1-49
Y	WO 00/24871 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 04 May 2000 (04.05.2000), see the entire document.	1-49
A, &E	US 2003/0024001 A1 (KWAKet al) 30 January 2003 (30.01.2003), see the entire document.	1-49
Y	PONIED, O. et al. Functional and molecular aspects of voltage-gated K ⁺ channel beta subunits. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, 1999 30 April 1999, Vol. 868, pages 544-55, see the entire document.	1-49
<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	
B 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	*Z* 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 26 November 2003 (26.11.2003)	Date of mailing of the international search report 18 DEC 2003	
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)305-5230	Authorized officer Kari R. Stunka Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/US02/23790	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This International report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-49
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/23790

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-49, drawn to a transgenic rodent comprising an endogenous gene cluster encoding a mutated kvB1.1 subunit of A-type potassium channel and a method of making the rodent, a mammalian cell comprising an endogenous gene cluster encoding a mutated kvB1.1 subunit of A-type potassium channel and a nucleic acid construct comprising a mutation in codons 1-70 of kvB1.1 gene.

Group II, claim(s) 50-72, drawn to a method of screening test compounds that modulate the activity of kvB1.1 subunit.

Group III, claim(s) 68-72, 79-80, 82-86 and 92-97, drawn to a method of screening the efficacy of a test compound to modulate the activity of kvB1.1 subunit by contacting a test compound with a wild type subunit and a mutant subunit *in vitro*.

Group IV, claim(s) 73-81, 81 and 87-91, drawn to a method of screening the efficacy of a test compound to modulate the activity of kvB1.1 subunit by contacting a test compound with a wild type subunit and a mutant subunit *in vivo* in a rodent.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of the groups I and II lack the same special technical feature because invention of group I is drawn to a transgenic rodent comprising a mutation in kvB1.1 gene, a mammalian cell comprising the mutant and methods of making the cell and a nucleic acid construct comprising the mutation, whereas the invention of group II is drawn to an *in vitro* method of screening for compounds that modulate kvB1.1. The invention of group I uses a nucleic acid construct whereas the invention group II uses a protein which have different physical and chemical structure, function and utilities.

The invention of the group III lacks the same special technical feature as that of groups II because it requires a wild type kvB1.1 subunit whereas the method of groups II does not.

The inventions of the groups IV lacks the same technical feature as that of group III because it is an *in vivo* method and requires a rodent for practicing the method whereas the method of group III is an *in vitro* method which requires proteins *in vitro*.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ソン・ボン・クワック

アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州プリンストン、チコピー・ドライブ 3 8 シー番

(72) 発明者 ケネス・ジェイムズ・ローズ

アメリカ合衆国 0 8 8 4 4 ニュージャージー州ヒルズバーロウ、アトキンソン・サークル 8 0 8 番

(72) 発明者 カレン・ラベル・マーキス

アメリカ合衆国 1 9 0 6 7 ペンシルベニア州ヤードリー、ロック・ラン・ロード 2 6 9 番

(72) 発明者 トーマス・アンソニー・コメリー

アメリカ合衆国 1 9 0 4 7 ペンシルベニア州ラングホーン、フラワーズ・アベニュー 2 1 9 番

(72) 発明者 ロジャー・アスキュー

アメリカ合衆国 0 1 9 2 1 マサチューセッツ州ボックスフォード、ハイ・リッジ・ロード 1 1 番

(72) 発明者 マイケル・リチャード・ブランド

アメリカ合衆国 0 8 8 2 2 ニュージャージー州フレミントン、レネイプ・ロード 1 6 番

(72) 発明者 シャロン・ジョイ・ローゼンツウェイク - リブソン

アメリカ合衆国 0 8 8 1 6 ニュージャージー州イースト・ブランズウィック、ボスコ・ドライブ 2 5 番

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 AA40 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA03 CA20 DA02 EA10 GA11 GA12
 GA27 HA20
 4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QQ91 QR48 QR77
 QR80 QS36
 4B065 AA91X AA91Y AC14 AC20 BA02 BA03 BA04 BA25 CA24 CA43
 CA44 CA46

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005503143A5	公开(公告)日	2005-10-27
申请号	JP2003517219	申请日	2002-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	ソンプンクワック ケネスジェイムズローズ カレンラベルマーキス トーマスアンソニーコメリー ロジャーアスキュー マイケルリチャードブラント シャロンジョイローゼンツウエイグリプソン		
发明人	ソン・ボン・クワック ケネス・ジェイムズ・ローズ カレン・ラベル・マーキス トーマス・アンソニー・コメリー ロジャー・アスキュー マイケル・リチャード・ブラント シャロン・ジョイ・ローゼンツウエイグ-リプソン		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/705 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K67/0275 A01K67/0276 A01K2217/072 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/03 A01K2267/0356 C07K14/705 C07K2319/42 C12N2800/30 G01N2333/705 G01N2500/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA10 4B024/GA11 4B024/GA12 4B024/GA27 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS36 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA04 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	田中，三夫 富田健二		
优先权	60/308485 2001-07-27 US 60/331140 2001-11-09 US		
其他公开文献	JP2005503143A		

摘要(译)

根据本发明，电压敏感性钾通道的不完全 β 1亚基 (Kvss1)，其中Kvss1亚基可赋予K⁺的N型失活。它保留了与Kv1家族 α 亚基结合的能力，从而增强了通道的表面表达提供了一种转基因非人哺乳动物。优选地，编码Kvss1亚基的Kvss1.1基因在其灭活结构域的密码子1-70的全部或部分中具有突变。转基因哺乳动物可用作心理和神经疾病的模型，以鉴定抗焦虑化合物和促认知功能。根据本发明，Kvss 1.1活性，特别是用于筛选和评价用于灭活钾通道或与 α -亚基结合的测试化合物。

