

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 211889

(P2001 - 211889A)

(43)公開日 平成13年8月7日(2001.8.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 38/00				N
		39/395		48/00
		48/00	A 6 1 P 1/04	
				11/00

審査請求 有 請求項の数 57 O L (全179数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 329359(P2000 - 329359)

(22)出願日 平成12年10月27日(2000.10.27)

(31)優先権主張番号 9925641:4

(32)優先日 平成11年10月29日(1999.10.29)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(31)優先権主張番号 0009973:9

(32)優先日 平成12年4月20日(2000.4.20)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 593141953

ファイザー・インク

アメリカ合衆国・ニューヨーク州・ニュー
ヨーク・イースト・42nd・ストリート・
235

(72)発明者 ビート ピーター

イギリス国,シーティー13 9エヌジェイ,ケ
ント,サンドウィッチ,ラムズゲイト ロー
ド,ファイザー リミテッド

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチド

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 Gタンパク質共役型受容体に関する新規なポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の提供。

【解決手段】 ポリペプチド配列は、1つ又はそれ以上の：(a) ヒト由来の特定配列のポリヌクレオチド配列から翻訳される推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにその変異体、断片、相同体、類似体及び誘導体；(b) ヒト由来の特定のポリペプチド、並びにその変異体、断片、相同体、類似体及び誘導体；又は(c) NCIMB 41073の c D N A によりコードされるポリペプチド、並びにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1つ又はそれ以上の下記：

- (a) 配列番号2で記述されるようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号1のヌクレオチド配列を包含するポリヌクレオチド；
- (c) NCIMB 41073中に含入されるDNAにより発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (d) (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含するポリヌクレオチド；
- (e) (a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドとハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を包含するポリヌクレオチド；
- (f) (a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドに対する相補体；あるいは
- (g) (a)～(f)のいずれかのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド断片を包含する単離および/または精製ポリヌクレオチド。

【請求項2】 (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも75%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項3】 (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項4】 (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項6】 (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する請求項1のポリヌクレオチド。

【請求項7】 Gタンパク質共役型受容体(GPCR)をコードする前記請求項のいずれかのポリヌクレオチド。

【請求項8】 前記請求項のいずれかのポリヌクレオチドの少なくとも15連続ヌクレオチドを包含するポリヌクレオチドプローブまたはプライマー。

【請求項9】 前記請求項のいずれかのポリヌクレオチドを包含するベクター。

【請求項10】 請求項9のベクターで形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞。

【請求項11】 哺乳類、昆虫、真菌、細菌または酵母菌細胞である請求項10の形質転換化/トランスフェクト化宿主細胞。

【請求項12】 請求項1～8のいずれかのポリヌクレオチドの転写RNA生成物。

【請求項13】 請求項12のRNA生成物に関してア

ンチセンスであり、それとハイブリダイズし得るRNA分子またはその断片。

【請求項14】 請求項1～8のいずれかのポリヌクレオチドと結合し得るリボザイムまたはジンクフィンガータンパク質。

【請求項15】 前記ポリペプチドまたは断片の発現に十分な条件下で請求項10または請求項11の形質転換化/トランスフェクト化宿主細胞を培養することを包含するポリペプチドまたはその断片の産生方法。

【請求項16】 前記ポリペプチドまたは断片が前記細胞の表面で発現される請求項15の方法。

【請求項17】 培養からポリペプチドまたは断片を回収することをさらに含む請求項15または請求項16の方法。

【請求項18】 ポリペプチドまたはその断片を発現し得る細胞の産生方法であって、請求項9のベクターで細胞を形質転換またはトランスフェクトすることを包含する方法。

【請求項19】 請求項18の方法により産生される細胞。

【請求項20】 請求項19の細胞の膜調製物。

【請求項21】 請求項15～18のいずれかの方法により産生されるポリペプチドまたはその断片。

【請求項22】 以下の：

(a) 配列番号1におけるポリヌクレオチド配列から翻訳される推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体；

(b) 配列番号2のポリペプチド、ならびにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体；または

(c) NCIMB 41073のcDNAによりコードされるポリペプチド、ならびにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体を包含するポリペプチド。

【請求項23】 請求項22のポリペプチドに対する抗体。

【請求項24】 請求項22のポリペプチドを調節する化合物。

【請求項25】 請求項22のポリペプチドに拮抗するかまたは選択的に拮抗する請求項24の化合物。

【請求項26】 請求項22のポリペプチドを作動する請求項24の化合物。

【請求項27】 請求項23の抗体または請求項24～26のいずれかの化合物、および1つ又はそれ以上の製薬上許容可能な担体、希釈剤、アジュバントまたは賦形剤を包含する製剤組成物。

【請求項28】 請求項22のポリペプチドと結合し、それを調節する化合物の同定方法であって、前記ポリペプチドを候補化合物と接触させて、調節が生じたか否かを確定することを包含する方法。

【請求項29】 以下の：

(a) 化合物を、それらの表面で請求項22のポリペ

チドを発現する細胞と接触させ、前記ポリペプチドが化合物の前記ポリペプチドとの結合に应答して検出可能信号を提供し得る二次構成成分に会合され、前記接触がポリペプチドの化合物との結合を可能にするのに十分な条件下で生じ；そして(b)前記二次構成成分により生成される信号を検出することによりポリペプチド結合し得る化合物を同定する工程を包含する請求項28の方法。

【請求項30】 以下の：

(a)(i)請求項22のポリペプチドと結合することが知られている検出可能一次構成成分および(ii)化合物を、それらの表面で請求項22のポリペプチドを発現する細胞と接触させ、前記ポリペプチドが化合物の前記ポリペプチドとの結合に应答して検出可能信号を提供し得る二次構成成分に会合され、前記接触がポリペプチドの化合物との結合を可能にするのに十分な条件下で生じ；そして(b)一次構成成分のポリペプチドとの相互作用から生成される信号の非存在または存在を検出することにより一次構成成分がポリペプチドと結合するか否かを確定する工程を包含する請求項29の方法。

【請求項31】 前記化合物が請求項22のポリペプチドと結合し、そして拮抗するかまたは選択的に拮抗する請求項28～30のいずれかの方法。

【請求項32】 前記化合物が請求項22のポリペプチドと結合し、そして作動する請求項28～30のいずれかの方法。

【請求項33】 製剤として用いるための請求項23の抗体、請求項24～26のいずれかの化合物、または請求項27の組成物。

【請求項34】 請求項22のポリペプチドの調整の必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における請求項24～26のいずれかの化合物の使用。

【請求項35】 請求項22のポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における請求項34の使用。

【請求項36】 請求項22のポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における請求項34の使用。

【請求項37】 治療的有効量の請求項24～26のいずれかの化合物を包含する請求項22のポリペプチドを調節する必要性を有する患者の治療のための医薬組成物。

【請求項38】 請求項22のポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のためである請求項37の医薬組成物。

【請求項39】 請求項22のポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のためである請求項37の医薬組成物。

【請求項40】 前記化合物がポリペプチドであり、そして治療的有効量の化合物が前記の化合物をコードするDNAを患者に提供し、前記化合物をin vivoで発現す

ることにより投与される請求項37～39のいずれかの医薬組成物。

【請求項41】 請求項22のポリペプチドを調整する必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における請求項23の抗体の使用。

【請求項42】 請求項22のポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における請求項41の使用。

【請求項43】 請求項22のポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における請求項41の使用。

【請求項44】 治療的有効量の請求項23の抗体を包含する請求項22のポリペプチドを調節する必要性を有する患者の治療のための医薬組成物。

【請求項45】 請求項22のポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のためである請求項44の医薬組成物。

【請求項46】 請求項22のポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のためである請求項44の医薬組成物。

【請求項47】 アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患(vasculitic granulomatous diseases)、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療のための医薬の製造における、請求項24～26のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項48】 前記アレルギー失調が外因性喘息であり、前記免疫学的疾患が内因性喘息であり、前記肺疾患がCOPDであり、そして前記炎症疾患が炎症性腸疾患である、請求項47に記載の使用。

【請求項49】 アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療のための医薬の製造における、請求項23に記載の抗体の使用。

【請求項50】 前記アレルギー失調が外因性喘息であり、前記免疫学的疾患が内因性喘息であり、前記肺疾患がCOPDであり、そして前記炎症疾患が炎症性腸疾患である、請求項49に記載の使用。

【請求項51】 請求項24～26のいずれか1項に記載の化合物の治療的有効量を含む、患者における、アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患(vasculitic granulomatous diseases)、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療のための医薬組成物。

【請求項52】 前記アレルギー失調が外因性喘息であり、前記免疫学的疾患が内因性喘息であり、前記肺疾患がCOPDであり、そして前記炎症疾患が炎症性腸疾患である、請求項51に記載の医薬組成物。

【請求項53】 請求項23に記載の抗体の治療的有効

量を含む、患者における、アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療のための医薬組成物。

【請求項54】 前記アレルギー失調が外因性喘息であり、前記免疫学的疾患が内因性喘息であり、前記肺疾患がCOPDであり、そして前記炎症疾患が炎症性腸疾患である、請求項53に記載の医薬組成物。

【請求項55】 哺乳動物の血液由来の、エオシン好性白血球の濃縮のための請求項23に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項56】 前記血液がヒトの血液である、請求項55に記載の医薬組成物。

【請求項57】 請求項22のポリペプチドを発現、過剰発現、不十分発現し、あるいはその標的化挿入または欠失を示すようex vivoまたはin vivoで遺伝子工学処理される細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】 [技術分野] 本発明は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)として知られているタンパク質の種類に属する新規のポリペプチドをコードする新規のポリヌクレオチド配列に関する。本発明は、特に、ポリペプチドの製造方法およびその使用にも関する。

【0002】 [発明の背景] 細胞および組織は、広範な種々の細胞外情報分子の特異的細胞表面受容体との相互作用により、これらの分子に応答する。このような種類の受容体は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)として知られており、これらは一連の7つの疎水性膜貫通セグメントを含有することを特徴とする。細胞外配位子のその受容体との結合時に、細胞内信号は、受容体が活性化されたことによって順次多数の異なる細胞内事象をもたらす異なる種三量体Gタンパク質との相互作用により開始される。例えば、いくつかのGPCRはアデニルシクラーゼ活性に影響を及ぼし、一方、その他のGPCRはホスホリパーゼCを介して作用する。

【0003】 GPCRスーパーファミリーの成員は、広範な種々の配位子、例えば小分子アミン(例えばセロトニン、ドーパミン、アセチルコリン)、脂質由来メディエーター(例えば、LpA)、アミノ酸誘導体(例えばグルタメート)および神経伝達物質ペプチドおよびホルモン(例えばニューロキニン、ガラニン、グルカゴン、ガストリン)に反応する。GPCRは広範囲の配位子により活性化されるが、しかし、個々のGPCRは小さく且つ非常に特異的なレパートリーの配位子を有するという事に留意すべきである。新規のGPCRの一次構造の分析に基づいて、ここでそれらを特定のサブファミリーに分類し、それにより考え得る配位子の範囲を狭め得る。

【0004】 多くの場合、GPCRの内因性配位子は相対的に小さく、合成類似体によりそれらを模倣させ得る

か、または遮断させ得る。例えば、プラゾシン、ドキサゾシン、シメチジン、ラニチジンのような薬剤は、すべて、それらのそれぞれの標的GPCRの有効な拮抗薬である。したがって、GPCRの調整が治療的コンセンサスを有し得る場合、新規のGPCRおよびそれらの関連作用薬および拮抗薬を提供する必要性が引き続き存在する。

【0005】 [発明の要約] 広範な局面において、本発明は、新規のアミノ酸配列に関する。この点で、特定の新規のアミノ酸配列が単離されており、そして、本発明は、その配列、ならびにその新規の変異体、断片、誘導体および相同体を網羅すると理解されるべきである。

【0006】 別の広範な局面では、本発明は、新規の核酸配列に関する。この点では、特定の新規の核酸配列が単離されており、そして、本発明は、その配列、ならびにその新規の変異体、断片、誘導体および相同体を網羅すると理解されるべきである。したがって、要するに、本発明のいくつかの局面は、以下の：

1. 新規アミノ酸、
2. 新規ヌクレオチド配列、
3. 前記の新規配列を用いる検定、
4. 前記の検定の使用により同定される化合物/組成物、
5. 前記の新規配列を包含するかまたは発現する発現系、
6. 前記の新規配列を基礎にした治療方法、
7. 前記の新規配列を基礎にした製剤組成物に関する。

【0007】 本発明のアミノ酸配列および/または本発明のヌクレオチド配列に関するその他の局面としては、本発明の配列を包含するかまたは発現し得る構築物；本発明の配列を包含するかまたは発現し得るベクター；本発明の配列を包含するかまたは発現し得るプラスミド；本発明の配列を包含するかまたは発現し得る構築物/ベクター/プラスミドでトランスフェクトされるかまたはウイルス的形質導入される細胞；本発明の配列を包含するかまたは発現し得る組織；本発明の配列を包含するかまたは発現し得る器官；本発明の配列を包含するかまたは発現し得る形質転換宿主；ならびに本発明の配列を包含するか発現し得る形質転換生物体が挙げられる。本発明は、同一物の移入方法を含めた微生物中での発現といったような同一物の発現方法も包含する。

【0008】 参照を容易にするために、本発明の局面を適切な項目見出しを付けて、ここで考察する。しかしながら、各項での教示内容は、必ずしも各々の特定の項に限定されない。以下の注釈において、「本発明のヌクレオチド配列」および「本発明のアミノ酸配列」に対する参照は、それぞれ、本明細書中に示されたかまたは考察されたいずれか1つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を、あるいは本明細書中に示されたかまたは考察された

いずれか1つまたはそれ以上のアミノ酸配列を指す。さらに、そして本明細書中で用いる場合、「アミノ酸配列」とはペプチドまたはタンパク質配列を指し、ならびにそれらの一部を指し得る。さらに、「本発明のアミノ酸配列」という用語は、「本発明のポリペプチド配列」という語句と同義語である。さらに、「本発明のヌクレオチド配列」という用語は、「本発明のポリヌクレオチド配列」という語句と同義語である。

【0009】本発明の局面の詳述本発明の一局面によれば、1つ又はそれ以上の以下の：

(a) 配列番号2で記述されるようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1のヌクレオチド配列を包含するポリヌクレオチド；

(c) NCIMB 41073中に含入されるDNAにより発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(d) (a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含するポリヌクレオチド；

(e) (a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドとハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を包含するポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドに対する相補体；あるいは

(g) (a)～(f)のいずれかのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド断片を包含する単離および/または精製ポリヌクレオチドが提供される。

【0010】好ましくは、ポリヌクレオチドは、(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも75%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する。さらに好ましくは、ポリヌクレオチドは、(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する。さらに好ましくは、ポリヌクレオチドは、(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する。さらに好ましくは、ポリヌクレオチドは、(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する。さらに好ましくは、ポリヌクレオチドは、(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する。最も好ましくは、ポリヌクレオチドは、(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも98%の同一性を有するヌクレオチド配列を包含する。

【0011】前記のポリヌクレオチドは、好ましくは、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)をコードする。本発明は、前記のポリヌクレオチドの少なくとも15連続ヌクレオチドを包含するポリヌクレオチドプローブまたはプライマーも提供する。本発明はさらに、前記のポリヌクレオチドを包含するベクターを提供する。

【0012】本発明のさらに別の局面によれば、前記のベクターで形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞を提供する。好ましくは、宿主細胞は哺乳類、昆虫、真菌、細菌または酵母菌細胞である。本発明のさらに別の局面によれば、前記のポリヌクレオチドの転写RNA生成物が提供される。RNA生成物に関してアンチセンスであり、それとハイブリダイズし得るRNA分子またはその断片も提供される。

【0013】前記のポリヌクレオチドと結合し得るリボザイムまたはジンクフィンガータンパク質がさらに提供される。本発明のさらに別の局面によれば、前記のポリペプチドまたは断片の発現に十分な条件下で前記の宿主細胞を培養することを包含するポリペプチドまたはその断片の産生方法が提供される。好ましくは、前記のポリペプチドまたは断片は前記の細胞の表面で発現される。方法は、好ましくは、培養からポリペプチドまたは断片を回収することをさらに含む。

【0014】ポリペプチドまたはその断片を発現し得る細胞の産生方法であって、前記のベクターで細胞を形質転換またはトランスフェクトすることを包含する方法も、本発明により提供される。本発明のさらに別の実施態様によれば、前記の方法により産生される細胞が提供される。前記の細胞の膜調製物も提供される。

【0015】本発明の別の局面によれば、以下の：

(a) 配列番号1におけるポリヌクレオチド配列から翻訳される推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体；

(b) 配列番号2のポリペプチド、ならびにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体；または

(c) NCIMB 41073のcDNAによりコードされるポリペプチド、ならびにその変異体、断片、相同体、類似体および誘導体を包含するポリペプチドが提供される。

【0016】前記のポリペプチドに対する抗体も、本発明により提供される。本発明はさらに、前記のポリペプチドを調整する化合物を提供する。好ましくは、化合物は、ポリペプチドに拮抗するかまたは選択的に拮抗する。あるいは、化合物は、ポリペプチドを作動する。前記の抗体または化合物、および1つ又はそれ以上の製薬上許容可能な担体、希釈剤、アジュバントまたは賦形剤を包含する医薬組成物も、本発明により提供される。

【0017】本発明の別の局面によれば、前記のポリペプチドと結合し、それを調節する化合物の同定方法であって、前記のポリペプチドを候補化合物と接触させて、調整が生じたか否かを確定することを包含する方法が提供される。好ましくは、前記の方法は、以下の：

(a) 化合物を、それらの表面で前記のポリペプチドを発現する細胞と接触させ、前記のポリペプチドが化合物の前記ポリペプチドとの結合に应答して検出可能信号を提供し得る二次構成成分に会合され、前記の接触がポリペプチドの化合物との結合を可能にするのに十分な条件

下で生じ；そして（b）前記の二次構成成分により生成される信号を検出することによりポリペプチド結合し得る化合物を同定する工程を包含する。

【0018】あるいは、前記の方法は、以下の：

（a）（i）前記のポリペプチドと結合することが知られている検出可能一次構成成分および（ii）化合物を、それらの表面で前記のポリペプチドを発現する細胞と接触させ、前記のポリペプチドが化合物の前記ポリペプチドとの結合に反応して検出可能信号を提供し得る二次構成成分に会合され、前記の接触がポリペプチドの化合物との結合を可能にするのに十分な条件下で生じ；そして（b）一次構成成分のポリペプチドとの相互作用から生成される信号の非存在または存在を検出することにより一次構成成分がポリペプチドと結合するか否かを確定する工程を包含する。

【0019】前記の方法のいずれかにより同定される化合物は、好ましくは、（i）前記のポリペプチドと結合し、そして拮抗するかまたは選択的に拮抗し、あるいは（ii）前記のポリペプチドと結合し、そして作動する。GPCRは信号伝達に関与するので、本発明のポリペプチドのモジュレーター（例えば作動薬または拮抗薬）は、信号伝達工程における干渉に用途を見出し得る。

【0020】したがって、本発明のさらに別の実施態様によれば、製剤として用いるための前記の抗体、化合物または組成物が提供される。本発明のポリペプチドを調整し得るこのような抗体、化合物および組成物は、したがって、信号伝達の局面に関する治療領域に用途を見出す。治療的に有用な領域としては、肥満、糖尿病および代謝疾患、神経学的疾患、精神療法、泌尿非尿生殖器疾患、生殖および性医学、炎症、癌、組織修復、皮膚科学、皮膚色素沈着、光老化、薄弱性、骨粗鬆症、心臓血管性疾患、胃腸疾患、抗感染、アレルギーおよび呼吸器疾患、感覚器官障害、睡眠障害および毛髪損失が挙げられるが、これらに限定されない。

【0021】上記抗体、化合物、及び組成物による治療のために好ましい症状は、アレルギー失調、例えば、外因性喘息、鼻炎（アレルギー性及び慢性）、オンコセルカ（onchocercal）皮膚炎、アトピー性皮膚炎、薬物反応、及びNERDS（小節、好酸球増多症、リウマチ、皮膚炎、及び腫脹）；脈管肉芽腫性疾患、例えば、一時的脈管炎、チャークーストラウス症候群、多発性動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、及び好酸球性肉芽腫性前立腺炎；免疫学的失調、例えば、自己免疫反応（多発性硬化症）、移植片拒絶、及び内因性喘息；間隙性その他の肺疾患、例えば、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease.（COPD））、エオシン好性胸膜滲出、一過性肺エオシン好性浸潤（Loffler）、組織球増殖症、慢性エオシン好性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アルペルギルス症、サルコイド -

シス、特発性肺線維症、及び局所性好酸球増多症；感染性寄生性疾患、例えば、トキソカラ症、フィラリア症、住血吸虫症、旋毛虫症、ストロンギロイデス属、回虫症、及びエキノコックス症／胞虫症；他の感染性疾患、例えば、急性コクシジオイデス真菌症、ネコ引っかき病、無熱性結核症、及び乳幼児におけるクラミジア肺炎；新形成性及び骨髄増殖性疾患、例えば、気管支原性癌腫、高エオシン好性症候群、T細胞リンパ腫及びホジキン病；炎症性症状、例えば、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性結腸炎、クローン病）及び洞炎；並びに小児脂肪便症、閉塞性肝臓疾患及び疱疹状皮膚炎、である。上記抗体、化合物、及び組成物による治療のために特に好ましいのは、喘息（外因性及び内因性）、COPD、及び炎症性腸疾患である。したがって、前記のポリペプチドの調整の必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における前記の化合物の使用も提供される。好ましくは、治療は、ポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者のためである。あるいは、治療は、ポリペプチドを作動する必要性を有する患者のためである。本発明のさらに別の局面によれば、治療の有効量の前記の化合物を患者に投与することを包含する前記のポリペプチドを調整する必要性を有する患者の治療方法が提供される。好ましくは、前記の方法は、ポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のためである。あるいは、前記の方法は、ポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のためである。

【0022】好ましくは、前記の化合物はポリペプチドであり、そして治療的有效量の化合物が、前記の化合物をコードするDNAを患者に提供し、前記化合物をin vivoで発現することにより投与される。前記のポリペプチドを調整する必要性を有する患者の治療のための薬剤の製造における前記の抗体の使用も、本発明により提供される。好ましくは、前記の方法は、前記のポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のためである。あるいは、前記の方法は、前記のポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のためである。

【0023】治療的有效量の前記の抗体を患者に投与することを包含する前記のポリペプチドを調節する必要性を有する患者の治療方法が、さらに本発明により提供される。好ましくは、前記の方法は、ポリペプチドを拮抗しまたは選択的に拮抗する必要性を有する患者の治療のためである。あるいは、前記の方法は、ポリペプチドを作動する必要性を有する患者の治療のためである。

【0024】本発明の他の局面に従えば、アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患（vasculitic granulomatous diseases）、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療のための医薬の製造における、上記化合物の使用が提

供される。好ましくは、上記アレルギー失調は外因性喘息であり、上記免疫学的疾患は内因性喘息であり、上記肺疾患はCOPDであり、そして上記炎症疾患は炎症性腸疾患である。また、アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療のための医薬の製造における、上記抗体の使用も提供される。好ましくは、上記アレルギー失調は外因性喘息であり、上記免疫学的疾患は内因性喘息であり、上記肺疾患はCOPDであり、そして上記炎症疾患は炎症性腸疾患である。本発明のさらに他の局面に従えば、上記化合物の治療的有効量を患者に投与することを含む、患者における、アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患 (vasculitic granulomatous diseases)、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療方法が提供される。好ましくは、上記アレルギー失調は外因性喘息であり、上記免疫学的疾患は内因性喘息であり、上記肺疾患はCOPDであり、そして上記炎症疾患は炎症性腸疾患である。本発明のさらなる局面に従えば、上記抗体の治療的有効量を患者に投与することを含む、患者における、アレルギー失調、脈管肉芽腫性疾患、免疫学的疾患、間隙性その他の肺疾患、感染疾患、炎症疾患、並びに新形成及び骨髄増殖性の疾患の治療方法も提供される。好ましくは、上記アレルギー失調は外因性喘息であり、上記免疫学的疾患は内因性喘息であり、上記肺疾患はCOPDであり、そして上記炎症疾患は炎症性腸疾患である。また、哺乳動物の血液、好ましくはヒト血液由来の、エオシン好性白血球の濃縮又は単離のための上記抗体の使用も、本発明により提供される。本発明のさらに別の局面によれば、本発明のポリペプチドを発現、過剰発現、不十分発現し、あるいはその標的化挿入または欠失を示すよう *ex vivo* または *in vivo* で遺伝子工学処理される細胞が提供される。

PF1-013ポリペプチド

前記で説明したように、本発明は、内部ではPF1-013と呼ばれてきた新規のGPCRに、そして同一物をコードするヌクレオチド配列に関する。本発明は、疾患の診断および治療における新規の核酸およびアミノ酸配列の使用にも関する。本発明は、GPCRを調整し得る薬剤に関して評価および/またはスクリーニングするための新規の核酸およびアミノ酸配列の使用に関する。本発明はさらに、GPCRを調整し得る薬剤に関して評価および/またはスクリーニングするための新規の核酸およびアミノ酸配列を包含または発現する遺伝子工学処理化宿主細胞に関する。

【0025】PF1-013ポリペプチドは、天然形態と同一であり得る - この局面に関しては、好ましくはPF1-013ポリペプチドは非ネイティブアミノ酸配列 (即ち、それはその天然環境中には存在しない) である - か、あるいは

はその変異体、相同体、断片または誘導体である。さらに、あるいは代替的方法では、PF1-013ポリペプチドは単離PF1-013ポリペプチドおよび/または精製PF1-013ポリペプチドである。PF1-013ポリペプチドは、天然であるか否かにかかわらず、あらゆる適切な供給源から入手可能であるかまたはそれにより生成され得るし、あるいはそれは合成、半合成または組換え体であり得る。

【0026】PF1-013コード配列は、天然形態と同一であり得る - この局面に関しては、好ましくはPF1-013コード配列は非ネイティブヌクレオチド配列 (即ち、それはその天然環境中には存在しない) である - か、あるいはその変異体、相同体、断片または誘導体である。さらに、あるいは代替的方法では、PF1-013コード配列は単離PF1-013コード配列および/または精製PF1-013コード配列である。PF1-013コード配列は、天然であるか否かにかかわらず、あらゆる適切な供給源から入手可能であるかまたはそれにより生成され得るし、あるいはそれは合成、半合成または組換え体であり得る。

【0027】PF1-013ポリペプチドおよびスクリーニング

PF1-013ポリペプチドおよび/またはそのコード配列および/またはそれとハイブリダイズし得る配列は、異なるGPCR間の薬剤候補の選択性を検査するために有用である。PF1-013はヒスタミン受容体ととってもよく似ており、PF1-013はその配位子が小アミンであると思われる新規のGPCRをコードする、ということが (本明細書中で) 実証されている。

【0028】新規のPF1-013受容体を調節する薬剤は、したがって、信号伝達工程を調整すると思われる。したがって、PF1-013受容体のモジュレーターは、信号伝達と関連した多数の異なる障害の治療に有用であると考えられ、それらの例としては、肥満、糖尿病および代謝疾患、神経学的疾患、精神療法、泌尿生殖器疾患、生殖および性医学、炎症、癌、組織修復、皮膚科学、皮膚色素沈着、光老化、薄弱性、骨粗鬆症、心臓血管性疾患、胃腸疾患、抗感染、アレルギーおよび呼吸器疾患、感覚器官障害、睡眠障害および毛髪損失が最も考えられるが、これらに限定されない。上記医薬による治療のために好ましい症状は、アレルギー失調、例えば、外因性喘息、鼻炎 (アレルギー性及び慢性)、オンコセルカ (onchocercal) 皮膚炎、アトピー性皮膚炎、薬物反応、及びNERDS (小節、好酸球増多症、リウマチ、皮膚炎、及び腫脹); 脈管肉芽腫性疾患、例えば、一時的脈管炎、チャージェストラウス症候群、多発性動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、及び好酸球性肉芽腫性前立腺炎; 免疫学的失調、例えば、自己免疫反応 (多発性硬化症)、移植片拒絶、及び内因性喘息; 間隙性その他の肺疾患、例えば、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease. (COPD)), エオシン好性胸膜滲出、一過性肺エオシン好性浸潤 (Loffler)、組織球増

殖症、慢性エオシン好性肺炎、過敏性肺臓炎、アレルギー性気管支肺アルペルギルス症、サルコイド-シス、特発性肺線維症、及び局所性好酸球増多症；感染性寄生性疾患、例えば、トキソカラ症、フィラリア症、住血吸虫症、旋毛虫症、ストロンギロイデス属、回虫症、及びエキノコックス症/胞虫症；他の感染性疾患、例えば、急性コクシジオイデス真菌症、ネコ引っかき病、無熱性結核症、及び乳幼児におけるクラミジア肺炎；新形成性及び骨髄増殖性疾患、例えば、気管支原性癌腫、高エオシン好性症候群、T細胞リンパ腫及びホジキン病；炎症性10 症状、例えば、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性結腸炎、クローン病）及び洞炎；並びに小児脂肪便症、閉塞性肝臓疾患及び疱疹状皮膚炎、である。上記医薬による治療のために特に好ましいのは、喘息（外因性及び内因性）、COPD、及び炎症性腸疾患である。

【0029】したがって、PFI-013ポリペプチドおよび/またはそのコード配列および/またはそれとハイブリダイズし得る配列は、信号伝達に関連した疾患の治療のための薬剤候補をスクリーニングするのに有用であり得る。さらに、PFI-013ポリペプチドおよび/またはその10 コード配列および/またはそれとハイブリダイズし得る配列は、前記のような疾患の治療のための薬剤候補をスクリーニングするのに有用であり得る、と考えられる。

【0030】PFI-013ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはPFI-013ポリペプチドそれ自体のいずれかまたは両方を用いて、GPCR活性に影響し得る作用物質をスクリーニングし得る。特に、PFI-013受容体それ自体をコードするヌクレオチド配列を用いて、GPCR活性を拮抗し得る作用物質をスクリーニングし得る。さらに、PFI-013ポリペプチドをコードするヌクレ10 オチド配列またはPFI-013ポリペプチドそれ自体を用いて、GPCR活性に選択的に影響する、例えばPFI-013受容体を選択的に拮抗する作用物質をスクリーニングし得る。

【0031】本発明のポリペプチド

「ポリペプチド」-これは「タンパク質」という用語と互換性がある-という用語は、一本鎖ポリペプチド分子ならびに個々の構成成分ポリペプチドが共有または非共有的手段により連結される多ポリペプチド複合体を含む。好ましくは、本発明のポリペプチドは一本鎖ポリ10 ペプチドである。

【0032】本発明のポリペプチドは、実質的に単離形態であり得る。ポリペプチドはポリペプチドの意図された目的を妨げない担体または稀釈剤と混合され得るが、依然として実質的に単離されたときみなされる、と理解される。本発明のポリペプチドは、実質的に精製形態でもあり、この場合、それは一般に、調製物中の90%より多い、例えば95%、98%または99%のポリペプチドが本発明のポリペプチドである調製物中のポリペプチドを包含する。本発明のポリペプチドは、例えばヒスチジン残基13

の付加により修飾されて、それらの精製を補佐し得る。

【0033】本発明のポリペプチドは、合成的手段（例えば、Geysen et al., 1996に記載されているような）により、または下記のように組換え的に産生され得る。好ましい実施態様では、本発明のアミノ酸配列は、それ自体、それがその天然環境にある場合、そして同じく天然環境にあるそのネイティブヌクレオチドコード配列によりそれが発現された場合、そしてそのヌクレオチド配列が同じくその天然環境にあるそのネイティブプロモーターの制御下にある場合には、本発明のネイティブPFI-013受容体を包含しない。参照を容易にするために、この好ましい実施態様を、「非ネイティブアミノ酸配列」と我々は呼んでいる。

【0034】本発明のポリペプチドのためのアミノ酸配列に関して「変異体」、「相同体」、「断片」、「類似体」または「誘導体」という用語は、結果的に生じるポリペプチドがGPCR活性を有し、好ましくは、添付の配列番号2に示されたポリペプチドと同様に少なくとも生物学的に活性であるという条件で、その配列からのまたは配列への1つ（またはそれ以上）のアミノ酸のあらゆる置換、変異、修飾、交替、欠失または付加を含む。特に、「相同体」という用語は、構造および/または機能に関する相同を包含する。配列相同性に関しては、配列番号2に示された配列との少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の相同が認められる。最も好ましくは、配列番号2で示された配列との少なくとも98%の相同が存在する。

【0035】典型的には、本発明の変異体、相同体または断片に関しては、作製され得るアミノ酸置換の種類は、アミノ酸配列の疎水性/親水性を保持すべきである。アミノ酸置換は、例えば1、2または3~10、20または30置換から作製され得るが、但し、修飾化配列は本発明のGPCRとして作用する能力を保持する。アミノ酸置換は、非天然類似体の使用を含み得る。

【0036】本発明のアミノ酸配列は、適切な発現系において同一物をコードするヌクレオチド配列の発現により産生され得る。さらに、または代替的に、タンパク質それ自体は、PFI-013の全部または一部を合成するための化学的方法を用いて、産生され得る。例えば、ペプチドは固相技法により合成され、樹脂から切断されて、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製され得る（例えば、Creighton (1983) Proteins Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, NY, USA)。合成ペプチドの組成物は、アミノ酸分析またはシーケンシングにより確認され得る（例えばエドマン分解法）。

【0037】直接ペプチド合成は、種々の固相技法（Roberge JY et al Science Vol 269, 1995, 202-204）を用14

いて実施され得るし、そして自動合成は、例えばA B I 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を用いて、メーカーの使用説明書にしたがって成し遂げられ得る。さらに、PFI-013またはその任意の部分のアミノ酸配列は、直接合成中に変えられ得るし、および/またはその他のサブユニットまたはその任意の部分からの配列を用いる化学的方法を用いて併合されて、変異体ペプチドを産生し得る。

【0038】本発明の別の実施態様では、PFI-013天然、修飾化または組換えアミノ酸配列は異種配列と結紮されて、融合タンパク質をコードし得る。例えば、PFI-013GPCR活性を有する化合物およびペプチド作動薬および拮抗薬に関してライブラリーをスクリーニングするためには、市販の抗体により認識される異種エピトープを発現するキメラPFI-013タンパク質をコードすることが有用であり得る。融合タンパク質はさらに、PFI-013が開裂され、そして異種部分から精製され得るよう

に、PFI-013配列と異種タンパク質配列との間に位置する開裂部位を含有するよう工学処理され得る。
【0039】PFI-013は、タンパク質精製を促進するために付加された1つ又はそれ以上の付加的ポリペプチドドメインを有する組換えタンパク質としても発現され得る。このような精製促進ドメインとしては、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール(Porath J, Protein Expr Purif Vol 3 1992 p263-281)、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、FLAG延長/アフィニティー精製系に利用されるドメイン(Immunex Corp, Seattle, WA, USA)が挙げられるが、これらに限定されない。精製ドメインとPFI-013との間の開裂可能リンカー配列、例えばX A因子またはエンテロキナーゼ(Invitrogen, San Diego, CA, USA)の含入は、精製を促進するのに有用である。

【0040】PFI-013の特定のアミノ酸配列は、配列番号2で示される。しかしながら、本発明は、その特定のアミノ酸配列との少なくとも70%の同一性(好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%の同一性)を有するアミノ酸配列を含むその他のGPCRをコードするアミノ酸配列を包含する。

【0041】本発明のポリペプチドは、本発明のアミノ酸配列およびその変異体の断片も含む。適切な断片は、少なくとも5、例えば少なくとも10、12、15または20アミノ酸のサイズである。本発明のポリペプチドはさらに、1つ又はそれ以上の(例えば、少なくとも2、3、5または10)置換、欠失または挿入、例えば保存性置換を含有するよう修飾され得る。これらの局面は、後の項で考察される。

【0042】本発明のヌクレオチド配列「ヌクレオチド配列」という用語は、本明細書中で用いる場合、オリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列、ならびにその変異体、相同体、断片、類似体および誘導体(例えばその一部)を指す。ヌクレオチド配列は、センス鎖を表わそうとまたはアンチセンス鎖を表わそうと、二本鎖または一本鎖であり得るゲノムまたは合成または組換え起源のものであり得るDNAまたはRNAであり得る。

【0043】好ましくは、「ヌクレオチド配列」という用語は、DNAを意味する。さらに好ましくは、「ヌクレオチド配列」という用語は、組換えDNA技術の使用により調製されたDNA(即ち、組換えDNA)を意味する。好ましい実施態様では、本発明のヌクレオチド配列は、それ自体、それが同じくその天然環境にあるそのネイティブプロモーターの制御下にある場合にその天然環境中で本発明のネイティブヌクレオチドコード配列を包含しない。参照を容易にするために、この好ましい実施態様を「非ネイティブヌクレオチド配列」と我々は呼んでいる。

【0044】本発明のヌクレオチド配列は、その中に合成または修飾化ヌクレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドに対する多数の異なる種類の修飾が当業界で知られている。これらの例としては、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート主鎖、分子の3'および/または5'末端でのアクリジンまたはポリリジンの付加が挙げられる。本発明の目的のために、本明細書中に記載されたヌクレオチド配列は、当業界で利用可能なあらゆる方法により修飾され得る、と理解されるべきである。このような修飾は、本発明のヌクレオチド配列のin vivo活性または寿命を増強するために実行され得る。

【0045】本発明は、本明細書中に示された配列と相補的であるヌクレオチド配列、あるいはそのあらゆる変異体、相同体、類似体、断片または誘導体も包含する。配列がその断片と相補的である場合には、その配列は他の生物体等における同様のコード配列を同定するためのプローブとして用いられ得る。本発明は、本明細書中に示された配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列、あるいはそのあらゆる変異体、相同体、類似体、断片または誘導体も包含する。

【0046】本明細書中に示された配列と相補的である配列とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列、あるいはそのあらゆる変異体、相同体、類似体、断片または誘導体も包含する。「変異体」という用語は、本明細書中に示されたヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る配列と相補的である配列も包含する。

【0047】好ましくは、「変異体」という用語は、緊縮条件(例えば、65 および0.1 xSSC {1 x SSC=0.15 M NaCl, 0.015 M $\text{Na}_3\text{クエン酸塩}$, pH7.0})下で本明細書中に示されたヌクレオチド配列とハイブリダイズ

し得る配列と相補的である配列を包含する。本発明は、本発明のヌクレオチド配列（本明細書中に示されたものの相補配列を含む）とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列にも関する。

【0048】本発明は、本発明のヌクレオチド配列（本明細書中に示されたものの相補配列を含む）とハイブリダイズし得る配列と相補的であるヌクレオチド配列にも関する。中間～最大緊縮の条件下で本発明に示されたヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るポリヌクレオチド配列も、本発明の範囲内である。

【0049】好ましい局面では、本発明は本発明のヌクレオチド配列、またはその相補体と緊縮条件（例えば、65 および0.1 x SSC）下でハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を包含する。代表的な核酸は、PFI-013タンパク質をコードし、そして配列番号1で示されるDNA配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列として二者択一的に特性化され得る。好ましいのは、高緊縮条件下で配列番号1で示される配列またはその相補体とハイブリダイズするPFI-013をコードするような配列である。

【0050】本発明は、緊縮条件下で、配列番号1で示される配列またはその相補体の断片とハイブリダイズし得る核酸配列を提供するのが有益である。好ましくは、断片は、15～50塩基長である。それは約25塩基長であると有益である。本発明の好ましいポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に関して「変異体」、「相同体」、「類似体」、「誘導體」または「断片」という用語は、結果的に生じるヌクレオチド配列がPFI-013受容体活性を有し、好ましくは、配列番号1で示された配列によりコードされるポリペプチドと同様に少なくとも生物学的に活性であるという条件で、その配列からのまたは配列への1つ（またはそれ以上）の核酸のあらゆる置換、変異、修飾、交替、欠失または付加を含む。特に、「相同体」という用語は、結果的に生じるヌクレオチド配列がPFI-013 PCRと同様の活性を有するポリペプチドをコードし得るという条件で、構造および/または機能に関する相同を包含する。配列相同性に関しては、配列番号2で示された配列との少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の相同が認められる。最も好ましくは、配列番号2で示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列との少なくとも98%の相同が存在する。配列相同性に関しては、配列番号1で示されたヌクレオチド配列との少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の相同が認められる。最も好ましくは、配列番号1で示されたヌクレオチド配列との少なくとも98

%の相同が存在する。

【0051】前記のように、本発明は、PFI-013をコードするDNA配列（好ましくはcDNA配列）に関する。特に、本発明はPFI-013をコードするcDNA配列に関する。本発明は、配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を包含するDNAセグメントにも関する。

【0052】本発明は、前記のDNA配列またはその対立遺伝子変異を組み入れられた宿主細胞中での発現により産生されるポリペプチドにも関する。本発明は、配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を包含するDNAを提供することにも関する。本発明は、配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を包含する非ネイティブDNAにも関する。

【0053】本発明の非常に好ましい局面は、配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を包含する組換えDNAに関する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む。一連の異なるポリヌクレオチドは遺伝暗号の縮重の結果として所定のアミノ酸配列をコードする、と理解される。

【0054】本明細書中に記述されたアミノ酸配列の知識により、本発明のポリペプチドをコードするcDNAおよび/またはゲノムクローンのような部分および全長核酸配列を考案し得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中に示されたアミノ酸配列をコードする配列を標的化しよう意図されたプライマーを用いる縮重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて得られる。プライマーは、典型的には、多縮重位置を含有する。しかしながら、縮重を最小限にするために、1つのトリプレットだけによりコードされるメチオニンのようなアミノ酸を含有する本明細書中に示されたアミノ酸配列の領域をコードする配列が選択される。さらに、その核酸がPCR法のための鋳型DNAとして用いられる生物体中でのコドン使用法を考慮するよう配列が選択される。PCRは、既知の配列に対する単一配列（非縮重）プライマーを用いた配列のクローニングのために用いられるものより低い緊縮条件で用いられる。

【0055】本発明のポリペプチド断片をコードするPCRにより得られる核酸配列は、次に、ハイブリダイゼーションライブラリースクリーニング技法を用いてより大きい配列を得るために用いられ得る。例えば、PCRクローンは、放射性原子で比しされ、その他の種、好ましくはその他の哺乳類種からのcDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングするために用いられ得る。ハイブリダイゼーション条件は、典型的には、中～高緊縮（例えば、0.03 M塩化ナトリウムおよび0.03Mクエン酸ナトリウム、約50～60）の条件である。

【0056】全部または一部のアミノ酸配列をコードする縮重核酸プローブも、他の種、好ましくは他の哺乳類

種からのcDNAおよび/またはゲノムライブラリーをプローブするために用いられる。しかしながら、さらなるスクリーニング操作で用いるための単一配列を最初に得るためにPCR法を実行するのが好ましい。本発明によれば、PFI-013、ポリペプチドの断片、融合タンパク質またはその機能的等価物をコードするポリヌクレオチド配列を用いて、適切な宿主細胞中でのPFI-013の発現を指図する組換えDNA分子を生成し得る。遺伝暗号の固有の縮重のために、実質的に同一のまたは機能的に等価のアミノ酸配列をコードするその他のDNA配列を用いて、PFI-013をクローン化し、発現し得る。当業者に理解されるように、非天然コドンを保有するPFI-013コードヌクレオチド配列を産生するのが有益であり得る。特定の原核生物または真核生物宿主に選ばれるコドン(Murray E et al. (1989) Nuc Acids Res 17:477-508)は、例えばPFI-013発現の速度を増大するよう、または望ましい特性、例えば天然配列から産生される転写体より長い半減期を有する組換えRNA転写体を産生するよう選択され得る。

【0057】前記の技法を用いて得られる本発明のポリヌクレオチド配列は、前記の技法を用いてさらに別の相同配列および変異体を得るために用いられ得る。それらはさらに、ポリヌクレオチド配列が発現されている特定の宿主細胞に関するコドン選択を最適化するために、種々の宿主細胞系における本発明のポリペプチドの発現において用いるために修飾され得る。その他の配列変化は、制限酵素認識部位を導入するために、またはポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの特性または機能を変えるために、望まれ得る。

【0058】本発明に従って用いられ得るPFI-013ポリヌクレオチド配列の変更としては、同一のまたは機能的等価のPFI-013をコードするポリヌクレオチドを生じる異なるヌクレオチド残基の欠失、挿入または置換が挙げられる。タンパク質は、サイレント変化を生じ、機能的等価PFI-013をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入または置換も有する。意図的アミノ酸置換は、PFI-013の生物学的活性が保持される限りは、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性における類似性を基礎にして成され得る。例えば、負荷電アミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ；正荷電アミノ酸としてはリジンおよびアルギニンが挙げられ；そして同様の親水性値を有する非荷電極性ヘッド基を有するアミノ酸としてはロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。

【0059】PFI-013の対立遺伝子は本発明の範囲内に含まれる。本明細書中で用いる場合、「対立遺伝子」または「対立遺伝子配列」とは、PFI-013の代替の形態である。対立遺伝子は、突然変異、即ち核酸配列における

変化に起因し、一般に、その構造または機能が変更されることもされないこともあるmRNAまたはポリペプチドの変更を生じる。あらゆる所定の遺伝子は、全く対立遺伝子形態を有さないか、1つまたは多数の対立遺伝子形態を有し得る。対立遺伝子を生じる共通の突然変異的变化は、一般に、アミノ酸の欠失、付加または置換の結果である。これらの種類の変化の各々は、単独で、またはその他のものと所定の配列内で1回またはそれ以上組み合わされて、起こり得る。

【0060】本発明のヌクレオチド配列は、種々の理由、例えば遺伝子生成物のクローニング、プロセッシングおよび/または発現を修飾する変更(これらに限定されない)のためにPFI-013コード配列を変えるために工学処理され得る。例えば、突然変異は、当業界で周知の技法、例えば新制限部位を挿入するための、グリコシル化パターンを変更するための、またはコドン選択を変えるための特定部位の突然変異誘発を用いて導入され得る。

【0061】本発明のポリヌクレオチドは、プライマー、例えばPCRプライマー、代替的増幅反応のためのプライマー、例えば放射性または非放射性標識を用いた慣用的手段により明示標識を用いて標識されるプローブを製造するために用いられ得るか、あるいはポリヌクレオチドは、ベクター中でクローン化される。このようなプライマー、プローブまたはその他の断片は、少なくとも15、好ましくは少なくとも20、例えば少なくとも25、30または40ヌクレオチド長であり、そして本明細書中で用いられるような本発明のポリヌクレオチドという用語によっても包含され得る。

【0062】本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーは、明示標識を保有し得る。適切な標識としては、放射性同位体、例えば³²Pまたは³⁵S、酵素標識、あるいはその他のタンパク質、例えばビオチンが挙げられる。このような標識は、本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーに付加され、そして当業界で既知の技法を用いて検出され得る。

【0063】本発明のポリヌクレオチド、例えばDNAポリヌクレオチドおよびプライマーは、組換え的に、合成的にまたは当業者が利用可能なあらゆる手段により生成され得る。それらは、標準技法によりクローン化もされ得る。概して、プライマーは、一度に一ヌクレオチドでの所望の核酸配列の段階的製造を含めた合成的手段により産生される。自動技法を用いてこれを成し遂げるための技術は、当業界で容易に利用可能である。

【0064】組換え手段を用いて、例えばPCRクローニング技術を用いて、より長いポリヌクレオチドが一般に生成される。これは、クローン化されるのが望ましいヌクレオチド配列の領域に対するプライマー対(例えば、約15~30ヌクレオチドの)を作製して、プライマーを真核生物または原核生物細胞から得られたmRNAま

たはcDNAと接触させて、所望の領域の増幅を成し遂げる条件下でポリメラーゼ連鎖反応を実行し、増幅断片を単離して(例えば、アガロースゲル上で反応混合物を精製することにより)、そして増幅DNAを回収する。プライマーは、増幅DNAが適切なクローニングベクター中にクローン化され得るように、適切な制限酵素認識部位を含有するよう設計され得る。

【0065】DNA分子は修飾されて、細胞内安定性および半減期を増大し得る。考え得る修飾としては、分子の5'および/または3'末端のフランキング配列の付加、あるいは分子の主鎖内のホスホジエステラーゼ結合よりむしろホスホチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられるが、これらに限定されない。前記のように、本発明は、配列番号1で示される配列の全部または一部、あるいはその対立遺伝子変異とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列にも関する。これらのヌクレオチド配列は、PFI-013発現を修飾するためのアンチセンス技法に用いられ得る。あるいは、これらの配列(またはその一部)は、プローブとして、あるいはPCRプライマーとして用いられる場合にはこのような配列の全部または一部を増幅するために用いられ得る。

【0066】組換えDNA配列の他に、ゲノム配列は、薬剤発見の場面で有益でもある。その翻訳化タンパク質を阻害するというよりむしろ、特定のアイソフォームのmRNA転写を阻害することが有益であり得る。これは、スプライス変異体が存在する場合に、そしてそれらの異なるスプライス変異体が異なるプロモーターから転写され得る場合に、PFI-013に関して言える。

【0067】本発明の別の有用性は、DNA配列は、一旦分かれば、アイソフォームまたはスプライス変異体を特異的に検出するための検定を設計するのに必要な情報を提供することである。アイソフォーム特異的PCRプライマー対は、アイソフォームまたはスプライス変異体の特定のDNA配列の知識に完全によっている検定の単なる一例である。このような検定は、各アイソフォームの組織分布および生物学的関連性を特定の疾患状態にアクセスするためのアイソフォームに関するmRNAの検出を可能にする。特異的PFI-013アイソフォームが特定の疾患状態と関連することが示された場合には、本発明は、アイソフォームmRNAの存在を検出するための診断検定の設計に有益である。

【0068】生物学的標本中のPFI-013受容体をコードするヌクレオチド配列の異常レベルは、染色体異常、例えば核酸の欠失または突然変異を反映し得る。したがって、PFI-013受容体をコードするヌクレオチド配列は、PFI-013をコードする遺伝子における欠失、突然変異または染色体転座のような染色体異常を検出するために診断的に用いられ得る。PFI-013遺伝子発現はこのような疾患状態で変更され得るか、またはPFI-013をコードする遺伝子の領域に存在する染色体異常が認められ得る。

【0069】本発明の代替的实施態様では、PFI-013のコード配列は、当業界で周知の化学的方法を用いて、全体的にまたは部分的に、合成され得る(Caruthers M H et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23, Horn T et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232参照)。

天然

本明細書中で用いる場合、「天然」とは、天然に見出されるアミノ酸配列を有するPFI-013を指す。

【0070】単離/精製

本明細書中で用いる場合、「単離」および「精製」という用語は、それらの天然環境から取り出され、そしてそれらが天然に会合される少なくとも1つのその他の構成成分から単離または精製される核酸またはアミノ酸配列を指す。

生物学的に活性

本明細書中で用いる場合、「生物学的に活性」とは、天然PFI-013の同様の構造的機能(しかし必ずしも同程度とは限らない)、および/または同様の調節機能(しかし必ずしも同程度とは限らない)、および/または同様の生化学的機能(しかし必ずしも同程度とは限らない)、および/または免疫学的活性(しかし必ずしも同程度とは限らない)を有する本発明のPFI-013 - 例えば組換えPFI-013 - を指す。特に、本発明のPFI-013はGPCRとして作用する能力を有し、これは本発明のPFI-013ポリペプチドの特徴的活性の1つである。

【0071】免疫学的活性

本明細書中で用いる場合、「免疫学的活性」は、適切な動物または細胞中での特異的免疫応答を誘導する、そして特異的抗体と結合する天然、組換えまたは合成PFI-005あるいはそのあらゆるオリゴペプチドの能力と定義される。

誘導体

「誘導体」という用語は、アミノ酸配列に関連して本明細書中で用いられる場合、PFI-013の化学的修飾を含む。このような修飾の例は、アルキル、アシルまたはアミノ基による水素の置換である。

【0072】類似体

「類似体」という用語は、アミノ酸配列(またはそのコード配列)と関連して本明細書中で用いられる場合、PFI-013またはそのコード配列の化学的修飾を含む。このような修飾の例は、非天然アミノ酸残基(例えば、D-アミノ酸、 β -アラニン、ヒドロキシプロリン)または非天然ヌクレオチド(例えば、イノシン、デメチル-シチジン)による天然アミノ酸残基または天然ヌクレオチドの置換である。

【0073】欠失

本明細書中で用いる場合、「欠失」は、それぞれ1つ又はそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が存在しないヌクレオチドまたはアミノ酸配列における変化と定義される。

挿入/付加

本明細書中で用いる場合、「挿入」または「付加」は、天然PFI-013と比較した場合に、それぞれ1つ又はそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の付加を生じたヌクレオチドまたはアミノ酸配列における変化である。

【0074】置換

本明細書中で用いる場合、「置換」は、それぞれ異なるヌクレオチドまたはアミノ酸による1つ又はそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の取り換えに起因する。

相同体

本発明のヌクレオチド配列および本発明のアミノ酸配列に関する「相同体」という用語は、配列の対立遺伝子変異と同義語であり得る。

【0075】特に、「相同性」という用語は、本明細書中で用いる場合、「同一性」という用語と同一とみなす。ここで、本発明のヌクレオチド配列および本発明のアミノ酸配列に関する配列相同性は、他の配列がヌクレオチドおよびアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するか否かを見るための、いずれか1つまたはそれ以上の配列の別の配列との簡単な「眼球」比較（即ち厳密な比較）により確定され得る。相対的配列相同性（即ち配列同一性）は、2またはそれ以上の配列間の相同性パーセンテージ（%）を算出し得る市販のコンピュータープログラムによっても確定され得る。このようなコンピュータープログラムの典型例は、FASTAまたはBLASTである。配列整列を作るための他の方法は、コンピュータープログラムClustalw(Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J., Nucleic Acid Research, Vol.22(22);4673-4680(1994))を使用することである。

【0076】相同性パーセンテージ（%）は、連続配列全面に亘って算出され、即ち、ある配列は他の配列と一列に並べられ、ある配列中の各アミノ酸が他の配列中の対応するアミノ酸と、同時に一残基ずつ、直接比較される。これは、「非ギャップ化」アラインメントと呼ばれる。典型的には、このような非ギャップ化アラインメントは、相対的に短数の残基（例えば、50未満の連続アミノ酸）全面のみで実行される。

【0077】これは非常に簡単且つ着実な方法であるが、しかし例えば、そうでなければ同一対の配列において、一挿入または欠失がその後のアミノ酸残基をアラインメントから取り除かせ、したがって全体的アラインメントが実行される場合に、相同性%の大きい低減を引き起こす可能性がある、ということ考慮に入れることができない。その結果、ほとんどの配列比較方法は、全体的相同スコアを不当に不利な立場に置くことなく、考え得る挿入および欠失を考慮に入れる最適アラインメントを生成するよう意図される。これは、局所相同性を最大にしようとして配列アラインメント中に「ギャップ」を挿入することにより、成し遂げられる。

【0078】しかしながら、これらのより複雑な方法

は、同一数の同一アミノ酸に関して、できるだけ少数のギャップを有する配列アラインメント - 2つの比較配列間のより高い関連性を反映する - が多数のギャップを有するものより高いスコアを達成するように、アラインメント中に生じる各ギャップに「ギャップペナルティー」を割り当てる。ギャップの存在に関して相対的に高いコストを、そしてギャップ中の各々のその後の残基に関してより小さいペナルティを負荷する「擬似ギャップコスト」が、典型的には、用いられる。高ギャップペナルティは、もちろん、より少数のギャップを有する最適アラインメントを生成する。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティを修正させる。しかしながら、配列比較のためにこのようなソフトウェアを用いる場合、デフォルト値を用いるのが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（下記参照）を用いる場合、アミノ酸配列に関するデフォルトギャップペナルティは、ギャップに関しては-12そして各延長に関しては-4である。

【0079】したがって、最大相同性%の算出は、先ず、ギャップペナルティを考慮に入れた最適アラインメントの生成を要する。このようなアラインメントを実行するための適切なコンピュータープログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387）である。配列比較を実施し得るその他のソフトウェアの例としては、BLASTパッケージ（Ausubel et al., 1999同書 - 第18章参照）、FASTA（Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410）および比較道具のGENEWORKSセットが挙げられるが、これらに限定されない。BLASTとFASTAはともに、オフラインおよびオンライン探索として利用可能である（Ausubel et al., 1999同書, pp7-58~7-60参照）。しかしながら、いくつかの用途に関しては、GCG Bestfitプログラムを用いるのが好ましい。

【0080】最終相同性%は、いくつかの場合には、同一性に換算して測定され得るが、しかしアラインメント工程それ自体は、典型的には、オールオアナッシング対比較を基礎にしているわけではない。その代わりに、化学的類似性または進化距離を基礎にした各対方式比較にスコアを割り当てる基準化類似性スコアマトリックスが一般に用いられる。一般的に用いられるこのようなマトリックスの例は、BLOSUM62マトリックス - BLAST組のプログラムに関するデフォルトマトリックス - である。GCG Wisconsinプログラムは一般に、公開デフォルト値、または供給される場合には慣習的記号比較のいずれかを用いる（さらなる詳細に関しては、ユーザーマニュアル参照）。GCGパッケージに関しては公開デフォルト値を用いるのが、あるいは他のソフトウェアの場合には、BLOSUM62のようなデフォルトマトリックスを用いるのが好ましい。

【0081】ソフトウェアが最適アラインメントを生成したならば、相同性%、好ましくは配列同一性%を算出できる。ソフトウェアは、典型的には、配列比較の一部としてこれをおこない、数値結果を生じる。前記のように、いくつかの用途に関しては、配列相同性（または同一性）は、あらゆる適切な相同性算法を用いて、例えばデフォルトパラメーターを用いて、確定され得る。配列データベースの類似性探索における基本的論点の考察に関しては、Altschul et al., (1994) Nature Genetics 6:119-129を参照していただきたい。いくつかの用途に

*www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html.に詳細に説明されている。「実質的相同性」は、BLASTにより査定される場合には、少なくとも約e-7、好ましくは少なくとも約e-9、最も好ましくはe-10またはそれ以下のEXPECT値と適合する配列と一致するのが有益である。BLAST探索におけるEXPECTに関するデフォルト閾値は、通常は10である。

【0082】配列同一性を確定する場合にはギャップペナルティが用いられるべきであり、その場合、好ましくは以下のパラメーターが用いられる：

【0083】

【表1】

BLAST用	
ギャップ開放	5
ギャップ延長	2

【0084】

【表2】

CLUSTAL用	DNA	タンパク質	
ワードサイズ	2	1	Kトリプル
ギャップペナルティ	10	10	
ギャップ延長	0.1	0.1	

【0085】2つの配列間の同一性および類似性を確定するためのその他のコンピュータープログラム法としては、GCGプログラムパッケージ (Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387) およびFASTA (Atschul et al., 1990, J MolecBiol, 403-410) が挙げられるが、これらに限定されない。

プロフィール・ヒドゥンMARKOVモデル

ヒドゥンMarkovモデル (hidden Markov models (HMMs)) を使用して確率論的な方法で配列のファミリーのプロフィールをモデル化することができる (Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A. and Mitchison, G.(1998), Biological Sequence Analysis : Probabilistic models of proteins and nucleic acids ; Cambridge University Press, Cambridge, UK.; Eddy, S.R.(1998), Profile hidden Markovmodels ; Bioinformatics, 14 : 755-763). HMMsは会話認識における使用のために元々開発され、そしてそれ以来、一定レンジの信号処理適用のために使用されてきた。信号は、有限セットからの要素の配列としてモデル化される。会話認識においては、このセットは、言語を作る音から成り、そしてその目的は、それらの音がどの言葉を表すかを演繹する。特定のファミリーからのタンパク質配列は、同じ方法において考えられることができる。上記配列は、20アミノ酸のセットからの一連の要素であり、そしてその要求は、上記配列がどのタンパク質ファミリーを表すかを決定することである。

【0086】プロフィールHMMsは、既知のファミリー・メンバーの多配列整列から行われることができる。この整列における各位置は、“マッチ”、“挿入”又は“欠

失”である状態に対応する。それ故、全整列は、トランジション確率に結び付けられる相互連結状態の線状鎖、又は通路として考えられることができる。これらの状態は、(置換データと共に上記整列内に見られる残基のレンジ、及び上記開始整列内の制限されたデータに関して正すための偽カウント (pseudocount) ”法に基づいて)異なる確率をもって、アミノ酸残基を“放出 (emit) ”する。上記モデルにマッチングする特定の配列の確率は、状態間のトランジション確率と、上記アミノ酸配列についての放出確率との組合せとして計算されることができる。

【0087】一旦、既知のファミリー・メンバーの良好な整列が得られれば、HMMsは、(プロフィールに比較して)僅かな手動介入をもって構築されることができ、そして遠い同族体を検出するためのより敏感な方法である。Pfamデータベースは、多くのタンパク質ファミリーのためのプロフィールHMMsのライブラリーである (Bate man, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Finn, R.D. and Sonhammer, E.L.L.(1999), Pfam 3.1 : 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins, Nucleic Acids Research, 27 : 260-262)。それは、注意深く編集された種整列と反復手順により自動作製されたモデルから構築されたモデルを含む。上記方法の完全な自動化は、作られるエラーが速く増幅されるであろうという欠点をもつ。

【0088】ポリペプチド変異体および誘導体本発明のアミノ酸配列に関して「変異体」または「誘導体」という語は、結果的に生じるアミノ酸配列がPF1-01

3活性を有し、好ましくは、配列番号2に示されたポリペプチドと少なくとも同一の活性を有するという条件で、その配列からのまたは配列への1つ(またはそれ以上)のアミノ酸のあらゆる置換、変異、修飾、交替、欠失または付加を含む。

【0089】本発明の配列は、本発明で用いるために修飾され得る。典型的には、配列のPFI-013活性を保持する修飾が成される。アミノ酸置換は、例えば1、2または3~10、20または30置換から作製され得るが、但し、修

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
		KR
芳香族		HFVY

【0092】前記のように、本発明のタンパク質は典型的には、例えば前記のような組換え手段により、および/または固相合成のような当業者に周知の技法を用いる合成手段により、製造される。このような配列の変異体および誘導体としては融合タンパク質が挙げられるが、この場合、融合タンパク質は、別のアミノ酸配列に(直接または間接的に)結合される本発明のアミノ酸配列を少なくとも包含する。これらの他のアミノ酸配列 - 時として融合タンパク質相手と呼ばれる - は、典型的には有利な機能 - 例えば本発明のアミノ酸配列の抽出および精製を助けるための - を付与する。融合タンパク質相手の例としては、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST)、6xHis、GAL4 (DNA結合および/または転写活性ドメイン) および - ガラクトシダーゼが挙げられる。融合タンパク質相手と本発明のタンパク質配列との間に、後者の除去を可能にするために、タンパク質分解的開裂部位を含有するのも便利である。好ましくは、融合タンパク質相手は、本発明のタンパク質の機能を妨げない。

【0093】ポリヌクレオチド変異体および誘導体本発明のヌクレオチド配列に関して「変異体」または「誘導体」という用語は、結果的に生じるヌクレオチド配列がPFI-013活性を有し、好ましくは、配列番号2に示された配列と少なくとも同一の活性を有するポリペプチドをコードするという条件で、その配列からのまたは配列への1つ(またはそれ以上)の核酸のあらゆる置換、変異、修飾、交替、欠失または付加を含む。

【0094】前記のように、配列相同性に関しては、配列番号1に示されたヌクレオチド配列との少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の相同が認められる。最も好ましくは、配列番号1で示されたヌクレオチド配列との少なくとも98%の相

飾化配列はPFI-005活性を保持する。アミノ酸置換は、例えば治療的投与ポリペプチドの血漿半減期を増大するための、非天然類似体の使用を含み得る。

【0090】保存的置換は、例えば以下の表に従って成され得る。第二列の、そして好ましくは第三列の同一行における同一ブロック中のアミノ酸は、互いに置換され得る：

【0091】

【表3】

同が存在する。ヌクレオチド相同性比較は、前記と同様に実行され得る。いくつかの用途に関しては、好ましい配列比較プログラムは、前記のGCG Wiscnsin Bestfitプログラムである。デフォルトスコアリングマトリックスは、各同一ヌクレオチドに関しては10の適正値を、そして各不適正に関しては-9の値を有する。各ヌクレオチドに関して、デフォルトギャップ作製ペナルティは-50、そしてデフォルトギャップ延長ペナルティは-3である。

【0095】本明細書中で用いる場合、「変異体」、「相同体」、「断片」および「誘導体」という用語は、配列の対立遺伝子変異を包含する。「変異体」という用語は、本明細書中に示されたヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る配列と相補的である配列も包含する。

ハイブリダイゼーション
「ハイブリダイゼーション」という用語は、本明細書中で用いる場合、「核酸の鎖が塩基対を介して相補鎖と連結する方法」(Coombs J(1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, NY, USA)、ならびにDieffenbach CW and GS Dveksler (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, USA)に記載されているようなPCR技法で実行されるような増幅方法を含む。

【0096】ハイブリダイゼーション条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego, CA, USA)に教示されているような核酸結合複合体の融点(Tm)を基礎にし、以下で説明されるような限定「緊縮」を付与する。ハイブリダイゼーションの緊縮は、ポリ核酸ハイブリッドが安定である条件を示す。このような条件は、当業者には明らかである。当業者には既知であるように、ハイブリッドの安定性は、配列相同性の1%の低減につき約1~1.5 低減するハイブリッドの融点(Tm)に反映される。概して、ハ

イブリッドの安定性は、ナトリウムイオン濃度および温度の一関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応は、より高い緊縮の条件下で実行され、その後種々の緊縮の洗浄が成される。

【0097】本明細書中で用いる場合、高緊縮とは、1 MN a⁺で65~68 で安定ハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す。最大緊縮は、典型的には、約T_m-5 (プローブのT_mより5 低い温度)で起こる。高緊縮は、プローブのT_mより約5 ~10 低い温度で起こる。高緊縮条件は、例えば、6 x SSC、5 x Denhardt液、1%SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、0.1N a⁺ピロリン酸塩および非特異的競合物としての0.1 mg/ml変性サケ精子DNAを含有する水性溶液中でのハイブリダイゼーションにより提供され得る。ハイブリダイゼーション後、高緊縮洗浄が数工程で成され、最終洗浄(約30分間)は0.2~0.1 x SDS、0.1% SDS中でハイブリダイゼーション温度で成される。

【0098】中等度または中間緊縮は、典型的には、プローブのT_mより約10 ~20 低い温度で起こる。低緊縮は、典型的には、プローブのT_mより約20 ~25 低い温度で起こる。当業者に理解されるように、最大緊縮ハイブリダイゼーションは同一ポリヌクレオチド配列を同定または検出するために用いられ得るが、一方、中間(または低)緊縮ハイブリダイゼーションは同様または関連ポリヌクレオチド配列を同定または検出するために用いられ得る。

【0099】中等度緊縮とは、前記の溶液中での、しかし約60~62 でのハイブリダイゼーションと等価の条件を指す。その場合、最終洗浄は、1 x SSC、0.1% SDS中でハイブリダイゼーション温度で実行される。低緊縮とは、前記の溶液中での、しかし約50~52 でのハイブリダイゼーションと等価の条件を指す。その場合、最終洗浄は、2 x SSC、0.1% SDS中でハイブリダイゼーション温度で実行される。

【0100】これらの条件は、種々の緩衝液、例えばホルムアミドベースの緩衝液および温度を用いて適合されそして繰り返される、と理解される。Denhardt溶液およびSSCは、その他の適切なハイブリダイゼーション緩衝液(例えば、Sambrook, et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USAまたはAusubel, et al., eds. (1990) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.参照)と同様に、当業者には周知である。最適ハイブリダイゼーション条件は、プローブの長さおよびGC含量もある役割を演じるので、経験的に確定されねばならない。

【0101】本明細書中に示されたヌクレオチド配列またはそれらの相補体と選択的にハイブリダイズし得る本発明のポリヌクレオチドは、一般に、少なくとも20、好

ましくは少なくとも25または30、例えば少なくとも40、60または100あるいはそれ以上の連続ヌクレオチドの領域の全面において本明細書中に示された対応するヌクレオチド配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%相同である。

【0102】「選択的にハイブリダイズ可能」という用語は、プローブとして用いられるポリヌクレオチドが、本発明の標的ポリヌクレオチドがバックグラウンドより有意に上のレベルでプローブとハイブリダイズすることが見出される条件下で用いられることを意味する。バックグラウンドハイブリダイゼーションは、例えばスクリーニング中のcDNAまたはゲノムDNAライブラリー中に存在する他のポリヌクレオチドのために起こり得る。この場合、バックグラウンドは、標的DNAを用いて観察される特異的相互作用の強度の10倍未満、好ましくは100倍未満である、プローブとライブラリーの非特異的DNA成分との間の相互作用により生成される信号のレベルを暗示する。相互作用の強度は、例えば、プローブを、例えば³²Pで放射能標識することにより測定され得る。

【0103】好ましい局面では、本発明は、緊縮条件(例えば、65 および0.1 x SSC {1 xSSC=0.15 MN aCl、0.015 MN a₃クエン酸塩、pH7.0})下で本発明のヌクレオチド配列のいずれかが1つまたはそれ以上とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を包含する。本発明のポリヌクレオチドが二本鎖である場合、二本の両方の鎖は、別々に、または組合せて、本発明に包含される。ポリヌクレオチドが一本鎖である場合には、そのポリヌクレオチドの相補的配列も本発明の範囲内に含まれると理解されるべきである。

【0104】本発明の配列と100%相同であるというわけではないが、しかし本発明の範囲内であるポリヌクレオチドは、多数の方法で得られる。本明細書中に記載された配列のその他の変異体は、例えば一連の個体、例えば異なる集団からの個体から作製されるDNAライブラリーをプロービングすることにより得られる。さらに、その他のウイルス/細菌、または細胞相同体、特に哺乳類細胞(例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、齧歯類および霊長類細胞)に見出される細胞相同体を得られ、このような相同体およびその断片は、概して、配列番号1で示される配列と選択的にハイブリダイズし得る。このような配列は、その他の動物種から作製されるcDNAライブラリー、またはそれから得られるゲノムDNAライブラリーをプロービングし、そしてこのようなライブラリーを、中~高緊縮の条件下で配列番号1で示される配列の全部または一部を包含するプローブでプロービングすることにより得られる。同様の考え方は、本発明

のポリペプチドまたはヌクレオチド配列の種相同体および対立遺伝子変異種を得るために適用する。

【0105】変異体および株/種相同体は、本発明の配列ないの保存アミノ酸配列をコードする変異体および相同体ないの配列を標的化するように意図されたプライマーを用いる縮重PCRを用いても得られる。保存配列は、例えば、いくつかの変異体/相同体からのアミノ酸配列を並べることにより予測され得る。配列アラインメントは、当業界で既知のコンピューターソフトウェアを用いて実行され得る。例えば、GCG Wisconsin PileUpプログラムが広範に用いられる。

【0106】縮重PCRに用いられるプライマーは1つ又はそれ以上の縮重位置を含有し、既知の配列に対する単一配列プライマーを有する配列をクローニングするために用いられるものより低い緊縮条件で用いられる。あるいは、このようなポリヌクレオチドは、特性化配列の特定部位の突然変異誘発により得られる。これは、例えばポリヌクレオチド配列が発現されている特定の宿主細胞に関するコドン選択を最適化するための配列にサイレントコドン変化が必要とされる場合に有用であり得る。その他の配列変化は、制限酵素認識部位を導入するために、またはポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの特性または機能を変えるために、望まれ得る。

【0107】本発明のポリヌクレオチドは、プライマー、例えば例えばPCRプライマー、代替的増幅反応のためのプライマー、例えば放射性または非放射性標識を用いた慣用的手段により明示標識を用いて標識されるプローブを製造するために用いられ得るか、あるいはポリヌクレオチドは、ベクター中でクローニングされる。このようなプライマー、プローブまたはその他の断片は、少なくとも15、好ましくは少なくとも20、例えば少なくとも25、30または40ヌクレオチド長であり、そして本明細書中で用いられるような本発明のポリヌクレオチドという用語によっても包含され得る。

【0108】本発明のポリヌクレオチド、例えばDNAポリヌクレオチドおよびプローブは、組換え的に、合成的にまたは当業者が利用可能なあらゆる手段により生成され得る。それらは、標準技法によりクローニングもされ得る。概して、プライマーは、一度にヌクレオチドでの所望の核酸配列の段階的製造を含めた合成的手段により産生される。自動技法を用いてこれを成し遂げるための技術は、当業界で容易に利用可能である。

【0109】組換え手段を用いて、例えばPCRクローニング技術を用いて、より長いポリヌクレオチドが一般に生成される。これは、クローニングされるのが望ましい配列の領域に側面を接するプライマー対(例えば、約15~30ヌクレオチドの)を作製して、プライマーを動物またはヒト細胞から得られたmRNAまたはcDNAと接触させて、所望の領域の増幅を成し遂げる条件下でポリメラーゼ連鎖反応を実行し、増幅断片を単離して(例え

ば、アガロースゲル上で反応混合物を精製することにより)、そして増幅DNAを回収する。プライマーは、増幅DNAが適切なクローニングベクター中にクローニングされ得るように、適切な制限酵素認識部位を含有するように設計され得る。

【0110】調節配列

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、例えば選定宿主細胞によりコード配列の発現を提供し得る調節配列と操作可能的に連結される。例として、本発明は、このような調節配列と操作可能的に連結される本発明のポリヌクレオチドを包含するベクターを包含する。即ちベクターは発現ベクターである。

【0111】「操作可能的に連結される」という用語

は、記載された構成成分がそれらの意図された方法で機能させられ得る関係である並置状態を指す。コード配列と「操作可能的に連結される」調節配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるような方法で結紮される。「調節配列」という用語は、プロモーターおよびエンハンサーならびにその他の発現調節信号を含む。

【0112】「プロモーター」という用語は、当業界で普通の意味で、例えばRNAポリメラーゼ結合部位の意味で用いられる。本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現増強は、異種調節領域、例えば発現を、そして所望により選定発現宿主からの当該タンパク質の分泌レベルを増強するのに、および/または本発明のポリペプチドの発現の誘導性制御を提供するのに役立つプロモーター、分泌リーダーおよびターミネーター領域の選択によっても成し遂げられ得る。

【0113】好ましくは、本発明のヌクレオチド配列は、少なくとも1つのプロモーターと操作可能的に連結され得る。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子由来のプロモーターの他に、他のプロモーターを用いて、本発明のポリペプチドの発現を指図し得る。プロモーターは、所望の発現宿主中での本発明のポリペプチドの発現を指図する場合にその有効性に関して選択され得る。

【0114】別の実施態様では、構成的プロモーターは、本発明の所望のポリペプチドの発現を指図するために選択され得る。このような発現構築物は、それが誘導基質を含有する培地上の発現宿主を培養する必要性をなくするため、付加的利点を提供し得る。適切なプロモーターの例は、哺乳類計におけるLTR、SV40およびCMV;細菌系における大腸菌lacまたはtrp;昆虫系におけるバキュロウイルスポリヘドロンプロモーター(polh)ならびに真核生物および原核生物細胞またはそれレアのウイルスにおける発現を制御することが知られているその他のプロモーターである。

【0115】真菌発現宿主中で用いるために好ましい強力な構成性および/または誘導性プロモーターの例は、キシラナーゼ(xlnA)、フィターゼ、ATP-シンセタ

ーゼ、サブユニット9 (oliC)、トリオースホスフェートイソメラーゼ (tpi)、アルコールデヒドロゲナーゼ (AdhA)、 - アミラーゼ (amy)、アミログルコシダーゼ (AG - glaA遺伝子から)、アセトアミダーゼ (amdS) およびグリセルアルデヒド - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (gpd) プロモーターに関する真菌遺伝子から得られるものである。

【0116】強力な酵母菌プロモーターの例は、アルコールデヒドロゲナーゼ、ラクターゼ、3 - ホスホグリセレートキナーゼおよびトリオースホスフェートイソメラーゼに関する遺伝子から得られるものである。強力な細菌プロモーターの例は、 - アミラーゼおよびSP02プロモーターならびに細胞外プロテアーゼ遺伝子からのプロモーターである。

【0117】ハイブリッドプロモーターも、発現構築物の誘導性調節を改良するために用いられ得る。プロモーターは、適切な宿主中での発現を保証し、または増大するための特徴を付加的に含み得る。例えば、特徴は、Pr ibnowボックスまたはTATAボックスのような保存領域であり得る。プロモーターは、本発明のヌクレオチド配列の発現のレベルに影響を及ぼすために (例えば、保持し、増強し、または低減するために) 他の配列を含有することさえある。例えば、適切なその他の配列としては、Sh1 - イントロンまたはADHイントロンが挙げられる。その他の配列としては、誘導性要素 - 例えば温度、化学物質、光またはストレス誘導性要素が挙げられる。さらに、転写または翻訳を増強するための適切な要素が存在し得る。後者の素子の例は、TMV 5' シグナル配列 (Sleat, Gene 217 [1987]217-225; およびDawson, Plant Mol. Biol. 23 [1993]97参照) である。

【0118】発現ベクターは、発現を増幅するためにプロモーターに作用する配列も含有する。例えば、SV40、CMVおよびポリオーマシス作用要素 (エンハンサー) ならびに選択可能マーカースは、選択のための表現型特質 (例えば、哺乳類細胞に関してはジヒドロフォレートレダクターゼまたはネオマイシン耐性、または大腸菌に関してはアンピシリン/テトラサイクリン耐性) を提供し得る。適切なプロモーターおよび選択マーカースを含有する適切なベクターの選択は、当業者のレベル内で十分である。

【0119】構築物

「構築物」 - 例えば「接合体」、「カセット」および「ハイブリッド」という用語と同義語である - という用語は、プロモーターと直接または間接的に結合した本発明のヌクレオチド配列を含む。間接結合の例は、本発明のプロモーターおよびヌクレオチド配列に介在する適切なスペーサー基、例えばイントロン配列、例えばSh1 - イントロンまたはADHイントロンの提供である。同じことは、直接または間接的結合を含む本発明に関して「融合化」という用語に対しても言える。各々の場合、用語

は、それらがその天然環境とともに存在する場合、普通では野生型遺伝子プロモーターと会合するタンパク質をコードするヌクレオチド配列の天然の組合せを包含しない。

【0120】構築物は、例えば哺乳類、酵母菌、昆虫、真菌または細菌細胞中での遺伝子構築物の選択を可能にするマーカースを含有または発現することさえある。例えば、G418、ヒグロマイシン、プレオマイシン、カナマイシンおよびゲンタマイシンに対する抗生物質耐性を提供するもののような、用いられ得る種々のマーカースが存在する。

【0121】好ましくは、本発明の構築物は、プロモーターと操作可能に連結される本発明のヌクレオチド配列を少なくとも包含する。

ベクター

「ベクター」という用語は、発現ベクターおよび形質転換ベクターならびにシャトルベクターを含む。

【0122】「発現ベクター」という用語は、in vivo またはin vitro発現が可能な構築物を意味する。「形質転換ベクター」という用語は、ある実体から別の実体に移入され得る構築物を意味する - これは同一種であるかまたは異なる種であり得る。構築物がある種から別の種に - 例えばウイルスベクター、例えばMMLVまたはFIVからヒトまたは哺乳類一次細胞または細胞系統に移入され得る場合には、形質転換ベクターは時として「シャトルベクター」と呼ばれる。

【0123】非常に種々の発現系が、異なる宿主中で用いられ得る。例えば、エピソーム、染色体およびウイルス由来系 (例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、パポウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルス由来のベクター)。DNA配列は、種々の技法によりベクター中に挿入され得る。概して、DNA配列は、当業界で既知の手法により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入され、当業者の範囲内であるとみなされる。発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を指図する適切な制御配列 (即ち、プロモーター) と操作可能に連結される。

【0124】本発明のベクターは、下記のように適切な宿主中に形質転換されて、本発明のポリペプチドの発現を提供し得る。したがって、さらに別の局面では、本発明は、本発明のポリペプチドの製造方法であって、ポリペプチドをコードするコード配列のベクターによる発現を提供するための条件下で前記のように発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を培養し、そして発現ポリペプチドを回収する方法を提供する。

【0125】ベクターは、例えば複製の起源を、任意にポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターを、そして任意にプロモーターのレギュレーターを備えたプラス

ミド、ウイルスまたはバクテリオファージ（ファージ）ベクターであり得る。本発明のベクターは、1つ又はそれ以上の選択可能マーカー遺伝子を含有し得る。工業微生物のための最も適切な選択系は、宿主生物中での突然変異を必要としない選択マーカーの群により構成されるものである。真菌選択マーカーの例は、アセトアミダーゼ（amdS）、ATP-シンターゼ、サブユニット9（oliC）、オロチジン-5'-ホスフェート-デカルボキシラーゼ（pvrA）、フレオマイシンおよびベノミル耐性（benA）に関する遺伝子である。非真菌選択マーカーの例は、細菌G418耐性遺伝子（これは哺乳類細胞、酵母菌でも用いられ得るが、しかし糸状真菌では用いられない）、アンピシリン耐性遺伝子（大腸菌）、ネオマイシン耐性遺伝子（哺乳類細胞）ならびに - グルクロニダーゼ（GUS）をコードする大腸菌uidA遺伝子である。

【0126】ベクターは、例えばRNAの産生のためにin vitroで用いられ得るし、または宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換するために用いられ得る。したがって、本発明のポリヌクレオチドは、組換えベクター（典型的には、複製可能ベクター）、例えばクローニン

【0127】本発明は、PFI-013のモジュレーター（例えば、拮抗薬または作動薬）の同定のためのスクリーニング方法におけるPFI-013ポリペプチドあるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体を発現する遺伝子工学処理宿主細胞の使用にも関する。このような遺伝子工学処理宿主細胞は、PFI-013活性を調整し得るペプチドライブラリーまたは有機分子をスクリーニングするために用いられ得る。抗体、ペプチドまたは小有機分子のようなPFI-013ポリペプチドのモジュレーター（例えば拮抗薬）は、例えばPFI-013に関連した疾患の治療のための製剤組成物のための基礎を提供する。このようなモジュレーター（例えば、拮抗薬）は、このような疾患の治療のために、単独で、またはその他の療法と組合せて投与され得る。

【0128】本発明は、PFI-013タンパク質のin vivoまたはin vitro産生のための、あるいはPFI-013発現または活性に影響を及ぼし得る作用物質に関してスクリーニングするためのPFI-013をコードするポリヌクレオチド配列、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体を包含する発現ベクターおよび宿主細胞にも関

する。

【0129】組織

「組織」という用語は、本明細書中で用いる場合、組織それ自体および器官を含む。

宿主細胞

「宿主細胞」- 本発明に関して - という用語は、本発明の組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列および/またはそれから得られる生成物を包含し得るが、この場合、プロモーターは、宿主細胞中に存在する場合には、本発明のヌクレオチド配列の発現を可能にする。

【0130】したがって、本発明のさらに別の実施態様は、本発明のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞を提供する。好ましくは、前記のポリヌクレオチドは、前記のポリヌクレオチドの複製および発現のためにベクター中に保有される。細胞は、前記のベクターと適合性であるよう選択され、そして、例えば原核細胞（例えば、細菌細胞）または真核細胞（即ち、哺乳類、真菌、昆虫および酵母菌細胞）であり得る。

【0131】宿主細胞中へのポリヌクレオチドの導入は、Sambrook, et al., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USAに記載されたような方法により実行され得る。これらの方法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション、電気穿孔、トランスフェクション、マイクロインジェクション、形質導入、切傷負荷および弾道導入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】代表的宿主の例としては、細菌細胞（例えば大腸菌、ストレプトミセス属）；真菌細胞、例えば酵母菌細胞およびアスペルギルス属；昆虫細胞、例えばシヨウジョウバエS2およびSpodoptera SF9細胞；動物細胞、例えばCHO、COS、HEK、HeLaおよび3T3細胞が挙げられる。適切な宿主の選択は、当業者の範囲内とみなされる。

【0133】本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの性質、および/または発現タンパク質のさらなるプロセッシングの望ましさによって、真核生物宿主、例えば酵母菌またはその他の真菌が選ばれ得る。概して、酵母菌細胞が、それらの操作容易性のために、真菌細胞の中で選ばれる。しかしながら、いくつかのタンパク質は、酵母菌からは不十分に発現または分泌され、あるいはいくつかの場合には、適正にプロセッシングされない（例えば、酵母菌における高グリコシル化）。これらの場合、異なる真菌宿主生物が選択されるべきである。

【0134】本発明の範囲内の適切な発現宿主の例は、真菌、例えばアスペルギルス種（例えば、欧州特許出願第0184438号および第0284603号に記載されているもの）

およびトリコデルマ種；細菌、例えば大腸菌種、ストレプトミセス種およびシュードモナス種；ならびに酵母菌、例えばKluyveromyces種（例えば、欧州特許出願第096430号および第0301670号に記載されているもの）およびサッカロミセス種である。例として、典型的発現宿主は、黒色アスペルギルス*Aspergillus niger*、*Aspergillus niger* var. *tubigenis*、*Aspergillus niger* var. *awamori*、*Aspergillus aculeatis*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus oryzae*、トリコデルマ属の*Trichoderma reesei*、クルイベロミセス属の*Kluyveromyces lactis*、シゾサッカロミセス属の*Shizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*およびビール酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*から選択され得る。

【0135】適切な宿主細胞 - 例えば哺乳類、酵母菌、昆虫および真菌宿主細胞 - の使用は、本発明の組換え発現生成物に最適生物活性を付与する必要がある場合に、翻訳後修飾（例えば、ミリスチル化、グリコシル化、切頭化、*lipidation*、ならびにチロシン、セリンまたはトレオニンリン酸化）を提供し得る。

生物体

「生物体」という用語は、本発明に関しては、本発明の組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列および/またはそれから得られる生成物を包含し得る、ヒト以外のあらゆる生物を含み、この場合、プロモーターは、生物体中に存在する場合、本発明のヌクレオチド配列の発現を可能にし得る。生物体の例としては、真菌、酵母菌または原生動物が挙げられ得る。

【0136】「トランスジェニック生物」という用語は、本発明に関しては、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列および/またはそれから得られる生成物を包含し得る、ヒト以外のあらゆる生物を含み、この場合、プロモーターは、生物体内の本発明のヌクレオチド配列の発現を可能にし得る。好ましくは、ヌクレオチド配列は生物体のゲノム中に組み入れられる。

【0137】「トランスジェニック生物」という用語は、それが同じくその天然環境にあるそのネイティブプロモーターの制御下にある場合にその天然環境中で本発明のネイティブヌクレオチドコード配列を包含しない。さらに、本発明は、それがその天然環境中にある場合、そしてそれが同じくその天然環境中にあるそのネイティブヌクレオチドコード配列により発現されている場合、そしてそれが同じくその天然環境にあるそのネイティブプロモーターの制御下にそのヌクレオチド配列がある場合に、本発明のネイティブタンパク質を包含しない。

【0138】したがって、本発明のトランスジェニック生物は、本発明のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列、本発明の構築物（それらの組合せを含む）、本発明のベクター、本発明のプラスミド、本発明の細胞および本発明の組織またはそれらの生成物のいずれか1つまたはその組合せを包含する生物を含む。形質転換細胞また

は生物は、細胞または生物から容易に回収可能である許容可能量の所望の化合物を調製し得る。

【0139】宿主細胞/宿主生物の形質転換

前記のように、宿主生物は原核生物または真核生物であり得る。適切な原核生物宿主の例は大腸菌である。原核生物宿主の形質転換に関する教示は、当業界で十分実証されている（例えば、Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) およびAusubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley & Sons, Inc.) 参照)。

【0140】好ましい実施態様では、形質転換宿主は哺乳類細胞または、例えば昆虫細胞であり、この場合、前記の宿主細胞中へのポリヌクレオチドの導入は、例えば、Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) に記載されたような方法により実行され得る。これらの方法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション、電気穿孔、トランスフェクション、マイクロインジェクション、形質導入、切傷負荷および弾道導入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】別の実施態様では、トランスジェニック生物は酵母菌であり得る。この点で、酵母菌は、異種遺伝子発現のためのビヒクルとしても広範に用いられ得る。ビール酵母菌種は、異種遺伝子発現のための使用を含めた、工業的使用の長い歴史を有する。ビール酵母菌中での異種遺伝子の発現は、Goodey等 (1987, *Yeast Biotechnology*, D R Berry et al, eds, pp401-429, Allen and Unwin, London) およびKing等 (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, E F Walton and GT Yarranton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow) により再検討されている。

【0142】いくつかの理由のために、ビール酵母菌は異種遺伝子発現に十分適している。第一に、それはヒトに対して非病原性であり、ある種の内毒素を生成できない。第二に、それは、種々の目的のための何百年もの商業的開発後の安全使用の長い歴史を有する。これは、広範な公共的許容可能性をもたらした。第三に、広範な商業的使用および生物体に向けられた探究は、ビール酵母菌の遺伝学および生理学ならびに大規模発酵特徴についての多くの知識をもたらした。

【0143】ビール酵母菌における異種遺伝子発現および遺伝子生成物の分泌の原理の再検討は、E HinchcliffeとE Kenny ("Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", 1993, *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition

n, Academic Press Ltd.) により示されている。それらの保持のために宿主ゲノムによる組換えを必要とする組込みベクターおよび自己複製プラスミドベクターを含めた、いくつかの種類の酵母菌ベクターが利用可能である。

【0144】トランスジェニックサッカロミセスを調製するために、発現構築物は、酵母菌中での発現を意図された構築物中に本発明のヌクレオチド配列を挿入することにより調製される。異種発現のために用いられる数種類の構築物が開発されてきた。構築物は、本発明のヌクレオチド配列と融合された酵母菌中で活性なプロモーターを含有し、通常は、酵母菌起源のプロモーター、例えばGAL1プロモーターが用いられる。普通は、酵母菌起源のシグナル配列、例えばSUC2シグナルペプチドをコードする配列が用いられる。酵母菌中で活性なターミネーターが発現系を終了する。

【0145】酵母菌の形質転換のために、いくつかの形質転換プロトコルが開発されてきた。例えば、本発明のトランスジェニックサッカロミセスは、Hinnen等(1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 75:1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275:104) および Ito, H等(1983, J. Bacteriology 153:163-168) の教示にしたがって調製され得る。

【0146】形質転換酵母菌細胞は、種々の選択マーカーを用いて選択される。形質転換のために用いられるマーカーの中でもとりわけ、多数の栄養要求性マーカー、例えばLEU2、HIS4およびTRP1、そして優勢な抗生物質耐性マーカー、例えばアミノグリコシド抗生物質マーカー、例えばG418である。したがって、本発明は、配列番号1で示されるヌクレオチド配列、あるいはそれらの誘導体、相同体、変異体、類似体または断片を用いて宿主細胞を形質転換する方法も提供する。

【0147】PFI-013ヌクレオチドコード配列で形質転換される宿主細胞は、細胞培養からコード化タンパク質(細胞膜中)の発現および回収に適した条件下で培養され得る。組換え細胞により産生されるタンパク質は、用いられる配列および/またはベクターによって、細胞表面で発現され、分泌され、あるいは細胞内に含有され得る。当業者に理解されるように、PFI-013コード配列を含有する発現ベクターは一般に、細胞膜内での発現を可能にする。その他の組換え構築は、タンパク質精製/同定を促すポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列にPFI-005コード配列を接合し得る(Kroll DJ et al. (1993) DNA Cell Biol Vol 12 P441-53, 前記の融合タンパク質を含有するベクターの考察も参照)。

【0148】遺伝子工学処理または遺伝子修飾「遺伝子修飾」される細胞、好ましくは動物細胞は、遺伝子工学により細胞中に、または前駆細胞中に導入される修飾に関してヘテロ接合性またはホモ接合性である。修飾を導入するために利用可能な遺伝子工学の標準的方

法としては、相同組換え、ウイルスベクター遺伝子トラッピング、放射線照射、化学的突然変異誘発、およびアンチセンスRNAをコードするヌクレオチド配列の単独でのまたは触媒リボザイムと組合せたトランスジェニック発現が挙げられる。遺伝子修飾のための好ましい方法は、相同的組換えおよびウイルスベクター遺伝子トラッピングであって、これらはともに、遺伝子座に外来核酸配列を挿入することにより、内因性遺伝子を修飾する。遺伝子に対して外来性である核酸配列は、遺伝子中で非天然である外因性配列である。外来DNAのこの挿入は、PFI-013遺伝子のあらゆる領域で、例えばエンハンサー、プロモーター、レギュレーター領域、非コード領域、コード領域、イントロンまたはエキソンで起こり得る。遺伝子工学の最も好ましい方法は、外来核酸配列が標的化方式で、単独で、または内因性遺伝子配列の一部の欠失と組合せて挿入される相同的組換えである。

【0149】機能的崩壊

「機能的に崩壊される」PFI-013遺伝子とは、崩壊化遺伝子によりコードされるPFI-013ポリペプチドの細胞活性が、通常では野生型バージョンのPFI-013遺伝子を発現する細胞中で低減されるように、遺伝子修飾されるPFI-013遺伝子を意味する。遺伝子修飾が細胞中のPFI-013遺伝子のすべての野生型コピーを有効に排除する場合には(例えば、遺伝子修飾細胞、好ましくは動物細胞がPFI-013遺伝子崩壊に関してホモ接合性であり、または元々存在するPFI-013遺伝子の野生型コピーだけが直ちに崩壊される)、遺伝子修飾は、野生型PFI-013遺伝子を発現する適切な対照細胞と比較した場合、PFI-013ポリペプチド活性の低減(即ち、受容体発現の低減)を引き起こす。PFI-013ポリペプチド活性のこの低減(即ち、受容体発現の低減)は、PFI-013遺伝子発現の低減(即ち、PFI-013mRNAレベルが有効に低減され、PFI-013ポリペプチドのレベル低下を生じる)に、および/または、野生型ポリペプチドと比較した場合に、機能または安定性低減を伴う突然変異化ポリペプチドを崩壊PFI-013遺伝子がコードすることに起因する。好ましくは、遺伝子修飾細胞中のPFI-013ポリペプチドの活性(即ち受容体発現の低下)は、野生型レベルの50%またはそれ以下に、さらに好ましくは25%またはそれ以下に、さらに好ましくは10%またはそれ以下に低減される。最も好ましくは、PFI-013遺伝子崩壊は、ゼロ突然変異をもたらす。

【0150】遺伝子修飾化動物細胞

機能的崩壊PFI-013遺伝子を含有する「遺伝子修飾動物細胞」とは、機能的崩壊化PFI-013遺伝子を含有するために遺伝子工学処理により作製されるヒト細胞を含めた動物細胞、ならびに崩壊化PFI-013遺伝子を受け継ぐ娘細胞を意味する。これらの細胞は、当業界で既知のあらゆる標準的方法にしたがって培養中で遺伝子修飾され得る。培養中の細胞を遺伝子修飾するための代替物とし

て、PFI-013遺伝子崩壊を含有する遺伝子修飾化非ヒト哺乳類から、非ヒト哺乳類細胞が単離され得る。本発明の動物細胞は、一次細胞または組織調製物、ならびに培養適合化、腫瘍形成性、または形質転換化細胞株から得られる。これらの細胞および細胞株は、例えば、内皮細胞、上皮細胞、島細胞、ニューロンおよびその他の神経組織由来細胞、中皮細胞、骨細胞、リンパ球、軟骨細胞、造血細胞、免疫細胞、主要な腺または器官（例えば、肝臓、肺、心臓、胃、膵臓、腎臓および皮膚）の細胞、筋細胞（骨格筋、平滑筋および真菌からの細胞を含む）、外分泌または内分泌細胞、繊維芽細胞ならびに胚およびその他の分化全能性または多能性幹細胞（例えば、胚幹（ES）細胞、ES様細胞および胚原基系列（EG）細胞、ならびにその他の幹細胞、例えば前駆細胞および組織由来幹細胞）から得られる。好ましい遺伝子修飾化細胞は、ES細胞であり、さらに好ましくはマウスまたはラットES細胞、最も好ましくはヒトES細胞である。

【0151】PFI-013遺伝子を用いた相同組換えのために標的化ベクターにおいて用いられる「相同領域」とは、PFI-013遺伝子の一部、または当業界で既知の標準低緊縮条件下で相同領域とPFI-013遺伝子配列との間にハイブリダイゼーションを起こさせるのに十分な程度にPFI-013遺伝子と側面を接する配列に関する（即ち相補的）（例えば、Current Protocols in Human Genetics, unit 4.1, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000に記載されている）。

【0152】「ES細胞」または「ES様細胞」とは、無限自己再生を、ならびに3つの胚原基層のすべてを代表する細胞型への分化を可能にする胚から、始原幹細胞からまたは奇形癌から得られる多能性幹細胞を意味する。「低減」とは、統計学的有意の減少（即ち、 $p < 0.01$ ）を意味する。本発明の遺伝子修飾化動物細胞、例えばヒト細胞は、PFI-013遺伝子を機能的に崩壊する修飾に関してヘテロ接合またはホモ接合性である。動物細胞は、培養中の遺伝子工学処理により誘導され、あるいは非ヒト哺乳類細胞の場合には、細胞は遺伝子修飾化非ヒト哺乳類から単離され得る。

【0153】PFI-013遺伝子座は、当業界で既知の遺伝子修飾のためのいくつかの技法の一つにより機能的に崩壊され、その例としては、化学的突然変異誘発（Rinchi, Trends in Genetics 7:15-21, 1991, Russell, Environmental & Molecular Mutagenesis 23 (Suppl. 24) 23-29, 1994）、放射線照射（Russell, 同上）、PFI-005遺伝子アンチセンスRNAの、単独での、または触媒的RNAリボザイム配列と組合せたトランスジェニック発現（Luyckx et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96:12174-79, 1999; Sokol et al., Transgenic Research 5:363-71, 1996; Efrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2051-55, 1994; Larsson et al., Nucleic Acids Re

search 22:2242-48, 1994）、ならびに下記でさらに考察されるように、PFI-013遺伝子座への外来核酸配列の挿入によるPFI-013遺伝子の崩壊が挙げられる。好ましくは、外来配列は、相同的組換えにより、またはウイルスベクターの挿入により挿入される。最も好ましくは、PFI-013遺伝子崩壊の方法は、相同的組換えであり、内因性PFI-013遺伝子配列の一部の欠失を含む。

【0154】外来配列の組込みは、1つ又はそれ以上の以下のメカニズムによりPFI-013遺伝子を機能的に崩壊する：PFI-013遺伝子転写または翻訳工程をさまたげることにより（例えば、プロモーター認識を妨げることにより、または転写終止部位または翻訳終止コドンにPFI-013遺伝子に導入することにより）；あるいは正常受容体機能を有するPFI-013ポリペプチドをもはやコードしないようにPFI-013遺伝子コード配列をゆがめることによる（例えば、PFI-013遺伝子コード配列中に外来コード配列を挿入することにより、フレームシフト突然変異またはアミノ酸（単数または複数）置換を導入することにより、あるいは二重交差事象の場合には、機能性受容体タンパク質の発現に必要なPFI-013遺伝子コード配列の一部を欠失することによる）。

【0155】細胞のゲノム中のPFI-013遺伝子座に外来配列を挿入するために、当業界で既知の標準的方法、例えば電気穿孔、リン酸カルシウム沈降法、レトロウイルス感染、マイクロインジェクション、biolistics、リボソームトランスフェクション、DEAE-デキストラントランスフェクションまたはトランスフェリンフェクションにより、外来DNA配列が細胞中に導入される（例えば、Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982; Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161-65, 1984; Chu et al., Nucleic Acids Res. 15: 1311-26, 1987; Thomas and Capecchi, Cell 51:503-12, 1987; Baum et al., Biotechniques 17:1058-62, 1994; Biewenga et al., J. Neuroscience Methods 71:67-75, 1997; Zhanget al., Biotechniques 15: 868-72, 1993; Ray and Gage, Biotechniques 13:598-603, 1992; Linney et al., Dev. Biol. (Orlando) 213:207-16, 1999; Zimmer and Gruss, Nature 338:150-153, 1989; およびRobertson et al., Nature 323:445-48, 1986参照）。細胞中への外来DNAの導入のための好ましい方法は、電気穿孔である。

【0156】相同的組換え

相同的組換えの方法は、PFI-013遺伝子を含有する細胞中にPFI-013遺伝子ターゲティングベクターを導入することにより崩壊のためにPFI-013遺伝子を標的化することによる。崩壊のためにPFI-013遺伝子を標的化するベクターの能力は、PFI-013遺伝子と相同であるベクター中のヌクレオチド配列を用いることに起因する。この相同領域は、ベクターとPFI-013遺伝子の内因性配列との間のハイブリダイゼーションを促す。ハイブリダイゼーション

時に、ターゲティングベクターとゲノム配列との間の交差事象の確率は、大いに増大する。この交差事象は、PFI-013遺伝子座へのベクター配列の組込みおよびPFI-013遺伝子の機能的崩壊を引き起こす。

【0157】ターゲティングのために用いられるベクターの構築に関する一般原理は、Bradley等 (Biotechnology, 10:534, 1992) に再検討されている。2つの異なる例示的型のベクター：挿入ベクターまたは組換えベクターを用いて、相同的組換えによりDNAを挿入し得る。挿入ベクターは、二本鎖化切れ目とのPFI-013遺伝子相同性の領域を含有する環状DNAである。相同領域と内因性PFI-013遺伝子との間のハイブリダイゼーション後、二本鎖化切れ目での1回交差事象が、交差の部位での内因性遺伝子中への全ベクター配列の挿入を生じる。

【0158】相同的組換えに用いるためのさらに好ましいベクターは交替ベクターであり、これは環状というよりむしろ共線的である。PFI-013遺伝子への交替ベクター組込みは、二重交差事象、即ちターゲティングベクターとPFI-013遺伝子との間のハイブリダイゼーションの2つの部位での交差を必要とする。この二重交差事象は、PFI-013遺伝子中への交差の2つの部位間に挟まれるベクター配列の組込、ならびに交差の2つの部位間に元々またがって存在した対応する内因性PFI-013遺伝子配列の欠失を引き起こす (例えば、Thomas and Capecchi et al., Cell 51:503-12, 1987; Mansour et al., Nature 336:348-52, 1988; Mansour et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7688-7692, 1990; およびMansour, GATA 7: 219-227, 1990参照)。

【0159】ターゲティングベクター中の相同の領域は、一般に少なくとも100ヌクレオチド長である。最も好ましくは、相同領域は、少なくとも1~5キロベース (Kb) 長である。相同領域に必要とされる最小長または最小度の関連性は実証されていないけれども、相同的組換えのためのターゲティング効率は、一般に、ターゲティングベクターとPFI-013遺伝子座との間の関連性の長さおよび程度に対応する。交替ベクターが用いられる場合には、そして内因性PFI-013遺伝子の一部が相同的組換え時に欠失される場合には、付加的に考えられることは、内因性PFI-013遺伝子の欠失部分のサイズである。内因性PFI-013遺伝子のこの部分が1 Kb長より長い場合には、組換えの効率を増強することが推奨される。相同的組換えに有効な配列の選択および使用に関するさらなる指針は、文献に記載されている (例えば、Deng and Capecchi, Mol. Cell. Biol. 12: 3365-3371, 1992; Bollag et al., Annu. Rev. Genet. 23:199-225, 1989; およびWaldman and Liskay, Mol. Cell. Biol. 8:5350-5357, 1988参照)。

【0160】広範な種々のクローニングベクターは、PFI-013遺伝子ターゲティングベクターの構築におけるベクター主鎖として用いられ得る。それらの例として

は、pBluescript関連プラスミド (例えば、Bluescript KS+11)、pQE70、pQE60、pQE-9、Pd10、ファージスクリプト、phiPFI-002174、pBKファジミド、pNH8A、pNH16a、pNH18Z、Pnh46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540およびpRIT5、PWLNEQ、PsV2CAT、pPFI-002T1、pSG (Strataene)、pSVK3、PBPV、PMSGおよびpSVL、pBR322およびpBR322 - ベースのベクター、pBM9、pBR325、pKH47、pBR328、pHC79、ファージCharon 28、pKB11、pKSV-10、pK19関連プラスミド、pUCプラスミドおよびpGEMシリーズのプラスミドが挙げられる。これらのベクターは、種々の商業的供給元 (例えば、Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Qiagen, Valencia, CA; Stratagene, La Jolla, CA; Promega, Madison, WI; およびNew England Biolabs, Beverly, MA) から入手可能である。しかしながら、あらゆるその他のベクター、例えばプラスミド、ウイルスまたはその一部は、それらが所望の宿主中で複製可能且つ生存可能である限り、用いられ得る。ベクターは、そのゲノムが修飾される宿主中でそれを複製させ得る配列も包含する。このようなベクターの使用は、組換えが起こり、ターゲティングの効率を増大する間の相互作用期間を延長し得る (Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Unit9. 16, 図9.16.1参照)。

【0161】前記のターゲティングベクターを増殖させるために用いられる特定の宿主は重要ではない。例としては、大腸菌K12 RR1 (Bolivar et al., Gene 2:95, 1977)、大腸菌K12 HB101 (ATCC No. 33694)、大腸菌M21 (ATCC No. 336780)、大腸菌DH1 (ATCC No. 33849)、大腸菌DH5 株および大腸菌STBL2株が挙げられる。あるいは、*C. cerevisiae*のような宿主が用いられ得る。前記の宿主は市販されている (例えば、Stratagene, La Jolla, CA; およびLife Technologies, Rockville, MD)。

【0162】ターゲティングベクターを作製するために、PFI-013遺伝子ターゲティング構築物が前記のベクター主鎖に付加される。前記のPFI-013遺伝子ターゲティング構築物は、少なくとも1つのPFI-013遺伝子相同領域を有する。PFI-013遺伝子相同領域を作製するために、PFI-013遺伝子関連配列がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プライマーを生成するための基礎として用いられる。これらのプライマーは、高忠実度PCR増幅によりPFI-005配列の所望の領域を増幅するために用いられる (Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19: 4967, 1991; Eckert and Kunkel 1:17, 1991; および米国特許第4,683,202号)。ゲノム配列は、ゲノムクローンライブラリーから、またはゲノムDNAの調製から、好ましくはPFI-013遺伝子崩壊のために標的化されるべき動物種から得られる。

【0163】好ましくは、前記のターゲティング構築物は、陽性マーカートンパク質をコードする外因性ヌク

レオチド配列も含む。ベクター組込後の陽性マーカーの安定発現は、細胞生存可能性を危うくすることなく、細胞に同定可能特性を付与する。したがって、交替ベクターの場合、マーカー遺伝子は、二重交差事象後にPFI-013遺伝子中に組み込まれるように、2つのフランキンク相同領域間に置かれる。

【0164】陽性マーカータンパク質は選択可能タンパク質であるのが好ましい。細胞中でのこのようなタンパク質の安定発現は、選択可能発現型特徴を付与し、即ち、その特徴はそうでなければ致死的な条件下での細胞の生存を増強する。したがって、選択可能条件を課することにより、生存可能性に基づいて、ベクター配列をうまく組み込んでいなかったその他の細胞からの陽性選択可能マーカーを安定的に発現する細胞の単離が可能になる。陽性選択可能マーカータンパク質（および選択性を有するそれらの作用物質）の例としては、Neo (G418またはカノマイシン)、Hyg (ヒグロマイシン)、HisD (ヒスチジノール)、Gpt (キサンチン)、Ble (ブレオマイシン) およびHprt (ヒポキサンチン) が挙げられる（例えば、Capecchi and Thomas, 米国特許第5,464,764号およびCapecchi, Science 244:1288-92, 1989参照）。選択可能マーカーの代替物としても用いられ得るその他の陽性マーカーとしては、レポータータンパク質、例えば - ガラクトシダーゼ、ホタルルシフェラーゼまたはグリーン蛍光タンパク質（例えば、Current Protocols in Cytometry, Unit 9.5 およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Unit 9.6, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000）が挙げられる。

【0165】前記の陽性選択計画は、PFI-013遺伝子座での標的化相同的組換えによりベクターを組込んだ細胞と、任意の染色体位置へのベクター配列の無作為非相同的組込とを識別しない。したがって、相同的組換えのために交替ベクターを用いる場合、陰性選択可能マーカータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことも好ましい。陰性選択可能マーカーの発現は、ある種の作用物質にさらされた場合に、マーカーを発現する細胞に生存可能性を失わせる（即ち、マーカータンパク質はある種の選択可能条件下では細胞に対して致死的になる）。陰性選択可能マーカー（および致死性を有するそれらの作用物質）の例としては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ガンシクロビルまたは1, 2 - デオキシ - 2 - フルオロ - d - アラビノフランシル - 5 - ヨードウラシル）、Hprt（6 - チオグアニンまたは6 - チオキサンチン）、ならびにジフテリア毒素、リシン毒素およびシトシンデアミナーゼ（5 - フルオロシトシン）が挙げられる。

【0166】陰性選択可能マーカーをコードするヌクレオチド配列は、交替ベクターの2つの相同領域の外側に置かれる。この位置決定が示されたとすると、組込が無作為非相同的組換えにより起こる場合、細胞は陰性選択

可能マーカーを組み込み、そして安定的に発現するだけである。ターゲティング構築物中のPFI-013遺伝子と相同性を有する2つの領域との間の相同的組換えは、組込みから陰性選択可能マーカーをコードする配列を排除する。したがって、陰性条件を課することにより、無作為非相同的組換えによりターゲティングベクターを組み込んだ細胞は生存可能性を失う。

【0167】一連の陽性および陰性選択工程は、相同的組換えによりベクター組込を受けた、したがって潜在的崩壊化PFI-013遺伝子を有する細胞だけをより効率よく選択するよう意図され得るため、陽性および陰性選択可能マーカーの前記の組合せが好ましい。陽性 - 陰性選択計画、選択可能マーカーおよびターゲティング構築物のさらに別の例は、例えば、米国特許第5,464,764号、W 094/06908、ならびにValancius and Smithies, Mol. Cell Biol. 11: 1402, 1991に記載されている。

【0168】マーカータンパク質がベクター組込時に安定的に発現されるために、ターゲティングベクターは、マーカーコード配列がベクター組込時に操作可能的に内因性PFI-013遺伝子プロモーターに連結されるよう設計され得る。次に、マーカーの発現は、通常はPFI-013遺伝子を発現する細胞中のPFI-013遺伝子プロモーターにより駆動される。あるいは、ベクターのターゲティング構築物中の各マーカーは、PFI-013遺伝子プロモーターとは無関係に発現を駆動するそれ自身のプロモーターを含有し得る。この後者の計画は、典型的にはPFI-013遺伝子を発現しない細胞中でのマーカーの発現を可能にするという利点を有する（Smith and Berg, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49:171, 1984; Sedivy and Sharp, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:227, 1989; Thomas and Capecchi, Cell 51:503, 1987）。

【0169】マーカー遺伝子発現を駆動するために用いられ得る外因性プロモーターとしては、細胞特異性または段階特異性プロモーター、構成性プロモーターおよび誘導性または調節性プロモーターが挙げられる。これらのプロモーターの例としては、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター/エンハンサー、SV40プロモーター、PGKプロモーター、PMC1 - ネオ、メタロチオネインプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、鳥 グロビンプロモーター、ヒストンプロモーター（例えば、マウスヒストンH3-614）、アクチンプロモーター、ニューロン特異的エノラーゼ、筋肉アクチンプロモーターおよびカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない（一般に、Sambrook, et al., Molecular Cloning, Vols I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989およびCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000; Stratagene, La Jolla, CA

参照)。

【0170】細胞が標的化PFI-013遺伝子座にベクター配列を組み込んだか否かを確証するために、所望のベクター組込事象に特異的なプライマーまたはゲノムプローブをPCRまたはサザンプロットと組合せて用いて、PFI-013遺伝子座への所望のベクター組込の存在を同定し得る(Erllich et al., Science 252:1643-51, 1991; Zimmer and Gruss, Nature 338:150, 1989; Mouellic et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:4712, 1990; およびShesely et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:4294, 1991)。

【0171】遺伝子トラッピング

PFI-013遺伝子を機能的に崩壊するためにPFI-013遺伝子座に外来核酸配列を挿入するために利用可能なもう一つの方法は、遺伝子トラッピングである。この方法は、無作為方式で遺伝子中に遺伝子トラップベクターコード配列を挿入するためにmRNAにエキソンをスプライスするすべての哺乳類細胞中に存在する細胞機構を利用する。一旦挿入されれば、遺伝子トラップベクターは、トラップ化PFI-013遺伝子を機能的に崩壊し得る突然変異を生じる。相対的組換えに対比して、突然変異誘発のためのこの系は、非常に無作為な突然変異を作り出す。したがって、機能的崩壊化PFI-013遺伝子を含む遺伝子修飾化細胞を得るためには、この特定の突然変異を含む細胞は、種々の遺伝子における無作為突然変異を含む細胞のプールから同定され、そして選択されなければならない。

【0172】遺伝子トラッピング系およびベクターは、遺伝子修飾ネズミ細胞およびその他の種類の細胞での使用に関して記載されている(例えば、Allen et al., Nature 333:852-55, 1988; Bellen et al., Genes Dev. 3: 1288-1300, 1989; Bier et al., Genes Dev. 3: 1273-1287, 1989; Bonnerot et al., J. Virol. 66:4982-91, 1992; Brenner et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 5517-21, 1989; Chang et al., Virology 193:737-47, 1993; Friedrich and Soriano, Methods Enzymol. 225: 681-701, 1993; Friedrich and Soriano, Genes Dev. 5:1513-23, 1991; Goff, Methods Enzymol. 152:469-81, 1987; Gossler et al., Science 244:463-65, 1989; Hope, Develop. 113:399-408, 1991; Kerr et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2: 767-776, 1989; Reddy et al., J. Virol. 65:1507-1515, 1991; Reddy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6721-25, 1992; Skarnes et al., Genes Dev. 6:903-918, 1992; von Melchner and Ruley, J. Virol. 63:3227-3233, 1989; およびYoshida et al., Transgen, Res. 4:277-87, 1995参照)。

【0173】プロモータートラップ(5'トラップ)ベクターは、5'~3'の順序で、スプライス受容体そしてその後エキソンを含有するが、これは、典型的には

翻訳開始コドンおよび開放読み取り枠(ORF)および/または内部リボソーム侵入部位により特性化される。概して、これらのプロモータートラップベクターはプロモーターまたは操作可能的連結スプライス供与配列を含有しない。その結果、宿主細胞の細胞ゲノム中への組込後、プロモータートラップベクター配列は、上流遺伝子の正常スプライシングを妨げ、末端エキソンとして作用する。ベクターコード配列の発現は、適正な読み取り枠内の崩壊遺伝子のイントロン中に組み込まれるベクターによって行われる。このような場合、細胞スプライシング機構は、ベクターコード配列の上流のトラップ化遺伝子からエキソンをスプライスする(Zambrowicz et al., W09/50426)。

【0174】前記のプロモータートラップベクターと同様の効果を生じるための代替的方法是、プロモータートラップベクターのスプライス受容体と翻訳開始コドンまたはポリアデニル化配列との間の領域に存在するか、そうでなければそこに工学処理される入れ子式の一組の終止コドンを組み入れるベクターである。コード配列は、宿主細胞ゲノム内の組込の部位とは大いに無関係な方式で発現されるように、別々のリボソーム侵入部位(IRES)を含有するよう工学処理され得る。典型的には、IRESは入れ子式の一組の終止コドンとともに用いられるが、しかし必ずというわけではない。

【0175】別の種類の遺伝子トラッピング計画は、3'遺伝子トラップベクターを用いる。この種類のベクターは、有効な組合せで、隣接コード配列の発現を媒介するプロモーター領域、コード領域、およびコード配列エキソンの3'末端を限定するスプライス供与配列を含有する。宿主細胞ゲノムへの組込後、ベクタープロモーターにより発現される転写体は、組込遺伝子トラップベクター配列の下流に位置するトラップ遺伝子からスプライス受容配列にスプライスされる。したがって、ベクターの組込は、3'遺伝子トラップカセットのコード配列およびあらゆる下流細胞エキソン、例えば末端エキソンおよびそのポリアデニル化信号を包含する融合転写体の発現を生じる。このようなベクターが遺伝子に組み込まれた場合、細胞スプライシング機構は、トラップ化遺伝子の3'エキソンの上流のベクターコード配列をスプライスする。このようなベクターの利点は、3'遺伝子トラップベクターの発現が遺伝子トラップカセット内のプロモーターにより駆動され、宿主細胞中で通常は発現される遺伝子への組込を必要としないことである(Zambrowicz et al., W09/50426)。3'遺伝子トラップベクター中に組み入れられ得る転写プロモーターおよびエンハンサーの例としては、ターゲティングベクターに関して前記したものが挙げられる。

【0176】プロモーターまたは3'遺伝子トラップベクターのための構造的構成成分として用いられるウイルスベクター主鎖は、標的細胞のゲノムに挿入され得る広

範囲のベクターから選択され得る。適切な種鎖ベクターとしては、単純ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、仮性狂犬病ウイルス、 γ -ヘルペスウイルスベクター等が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクター、特に非複製性細胞を修飾するのに適したウイルスベクターの徹底的再検討、ならびに外因性ポリヌクレオチド配列の発現を伴うこのようなベクターの使用方法は、*Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*, Eds. Caplitt and Loewy, Academic Press, San Diego, 1995に見出される。

【0177】好ましくは、レトロウイルスベクターは、遺伝子トラッピングのために用いられる。これらのベクターは、米国特許第5,449,614号に記載されているものと同様のレトロウイルスパッケージング細胞株とともに用いられ得る。遺伝子修飾のための標的細胞として非ネズミ哺乳類細胞が用いられる場合、適切なベクターをパッケージするために両親和性または汎親和性パッケージング細胞株が用いられ得る (Ory et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 93:11400-11406, 1996)。前記の3'遺伝子トラップベクターを作製するために適合され得る代表的レトロウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,521,076号に記載されている。

【0178】遺伝子トラッピングベクターは、相同的組換えに用いられるターゲティングベクターに関して前記で考察した1つ又はそれ以上の陽性マーカー遺伝子を含有し得る。ターゲティングベクターにおけるそれらの使用と同様に、これらの陽性マーカーは、細胞ゲノムにベクターを組み込まれた細胞を同定し、選択するために遺伝子トラッピングベクターに用いられる。マーカー遺伝子は、ベクターが標的細胞ゲノムに組み込まれた場所とは無関係な方式でマーカーが発現されるように、別々のリボソーム侵入部位 (IRES) を含有するよう工学処理され得る。

【0179】遺伝子トラップベクターがかなり無作為的方式で感染宿主細胞のゲノム中に組み込むとすると、崩壊PFI-013遺伝子を有する遺伝子修飾化細胞は、無作為ベクター組込を受けた細胞の集団から同定されねばならない。好ましくは、細胞の集団における遺伝子修飾は、細胞のゲノムに見出される本質的にすべての遺伝子における突然変異を集団が示すよう、十分な無作為性および頻度を有して、崩壊PFI-005遺伝子を有する細胞が集団から同定されるようにする (Zambrowicz et al., W09/50426; Sands et al., W098/14614参照)。

【0180】崩壊PFI-013遺伝子を含有する個々の突然変異体細胞株は、例えば、PFI-013遺伝子配列中の集団を同定するための逆転写およびPCR (RT-PCR) を用いて、突然変異化細胞の集団中で同定される。この方法は、プールクローンにより能率的にされ得る。例え

ば、崩壊PFI-013遺伝子を含有する個々のクローンを見出すために、遺伝子トラップベクター中でアンカー化されたプライマーとPFI-013遺伝子配列中に置かれた他方のプライマーを用いて、RT-PCRが実行される。陽性RT-PCR結果は、ベクター配列がPFI-013遺伝子転写体中でコード化されることを示すが、これは、PFI-013遺伝子が遺伝子トラップ組込事象により崩壊されていたことを示す (例えば、Sands et al. W098/14614参照)。

【0181】時間的、空間的および誘導性遺伝子崩壊内因性PFI-013遺伝子の機能的崩壊は、特定の発生または細胞周期段階 (時間的) で、または特定の細胞型 (空間的) で起こり得る。PFI-013遺伝子崩壊は、ある条件が存在する場合には、誘導性でもあり得る。組換え酵素切り出し系、例えばCre-Lox系を用いて、特定の発生段階で、特定の組織または細胞型において、あるいは特定の環境条件下で、PFI-013遺伝子を活性化または不活性化し得る。一般に、Cre-Lox技法を用いる方法は、Torres and Kuhn, *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, Oxford University Press, 1997に記載されているようにして実行される。Cre-Lox系に関して記載されたのと同様の方法は、FLP-FRT系を利用して、用いられ得る。相同的組換えまたはウイルス挿入により遺伝子を条件付きで崩壊するための組換え酵素切り出し系の使用に関する別の指針は、例えば米国特許第5,626,159号、米国特許第5,527,695号、米国特許第5,434,066号、W098/29533、Orban et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:6861-65, 1992; O'Gorman et al., *Science* 251:1351-55, 1991;ならびにAkagi et al., *Nucleic Acids Res.* 25:1766-73, 1997に提示されている。1つより多い組換え酵素系を用いて、動物細胞を遺伝子修飾し得る。

【0182】時間的、空間的または誘導性方式で、組換え酵素系、例えばCre-Lox系を用いてPFI-013遺伝子を崩壊するために相同的組換えを用いる場合、PFI-013遺伝子コード領域の一部は、loxP部位が側面に接するPFI-013遺伝子コード領域を包含するターゲティング構築物に置き換えられる。この遺伝子修飾を保有する動物細胞は、機能的loxPフラック化PFI-013遺伝子を含有する。PFI-013遺伝子崩壊の時間的、空間的または誘導性局面は、それぞれ所望の空間的調節化、時間的調節化または誘導性プロモーターの制御下で動物細胞中で発現される付加的トランスジーン、Cre組換え酵素トランスジーン の発現パターンにより引き起こされる。Cre組換え酵素は、組換えのためのloxP部位を標的にする。したがって、Cre発現が活性化されると、loxP部位は、サンドイッチ化PFI-013遺伝子コード配列を切り出すために組換えを施されて、PFI-013遺伝子の機能的崩壊を生じる (Rajewskiet al., *J. Clin. Invest.* 98:600-03, 1996; St.-Onge et al., *Nucleic Acids Res.* 24:3875-77, 199

6; Agah et al., J. Clin. Invest. 100:169-79, 1997; Brocard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1455-9-63, 1997; Feil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10887-90, 1996; およびKuehn et al., Science 269:1427-29, 1995)。

【0183】Cre組換え酵素トランスジーンおよびlox p - フランク化PFI-013遺伝子の両方を含有する細胞は、標準トランスジェニック技法により生成され得る。PFI-013遺伝子を時間的、空間的または条件付きに崩壊するための組換え酵素系特異的プロモーターの使用に関する 10 さらに別の指針は、例えば、Sauer, Meth. Enz. 225:890-900, 1993; Gu et al., Science 265:103-06, 1994; Araki et al., J. Biochem. 122:977-82, 1997; Dymecki, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:6191-96, 1996およびMeyers et al., Nature Genetics 18: 136-41, 1998に見出される。

【0184】PFI-013遺伝子の誘導性崩壊は、テトラサイクリン応答性バイナリー系を用いることによって成し遂げられ得る (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-51, 1992)。この系は、内因性PF 1-013遺伝子調節素子、ならびにテトラサイクリン制御可能レプレッサー (TetR) を発現するトランスジーン中にTetプロモーターを導入するために細胞を遺伝子修飾することを包含する。このような細胞では、テトラサイクリンの投与はTetRを活性化し、これが順次、PFI-013 20 遺伝子発現を阻害し、したがってPFI-013遺伝子を機能的に崩壊する (St.-Onge et al., Nucleic Acids Res. 24:3875-77, 1996、米国特許第5,922,927号)。

【0185】PFI-013遺伝子の時間的、空間的および誘導性崩壊のための前記の系は、例えば、W098/29533に記載されているような遺伝子修飾の方法として遺伝子トラッピングを用いる場合にも適合され得る。 30

遺伝子修飾動物細胞の作製

遺伝子修飾のための前記の方法を用いて、動物から得られる事実上あらゆる種類の体細胞または幹細胞中のPFI-013遺伝子を機能的に崩壊し得る。本発明の遺伝子修飾化動物細胞としては、哺乳類細胞、例えばヒト細胞およびトリ細胞が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞は、あらゆる動物細胞株、例えば培養適 40 化、腫瘍形成性、または形質転換化細胞株を遺伝子工学処理することから得られるか、またはそれらは所望のPFI-013遺伝子修飾を保有する遺伝子修飾化非ヒト哺乳類から単離され得る。

【0186】細胞は、崩壊化PFI-013遺伝子に関してヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る。PFI-013遺伝子崩壊に関してホモ接合性である細胞 (PFI-013/-) を得るためには、両方の対立遺伝子の直接連続ターゲット 50 イングが実行され得る。この方法は、陽性選択可能マーカーを再循環することにより促進され得る。この計画によれば、陽性選択可能マーカーをコードするヌクレオチ

ド配列は、Cre-Lox P系を用いて、一方の対立遺伝子の崩壊後に除去される。したがって、その後の回のターゲットに同一ベクターを用いて、2回目のPFI-013 遺伝子の対立遺伝子を崩壊し得る (Abuin and Bradley, Mol. Cell. Biol. 16: 1851-56, 1996; Sedivy et al., T.I.G. 15:88-90, 1990; Cruz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7170-74, 1991; Mortensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:7036-40, 1991; te Riele et al., Nature (London) 348:649-651, 1990)。

【0187】PFI-013/-であるES細胞を得るための代替的戦略は、PFI-013遺伝子崩壊に関してヘテロ接合性である細胞 (PFI-013+/-) の集団からの細胞のホモ接合体化である。その方法は、選択可能薬剤耐性マーカーを発現するPFI-013+/-標的化クローンが非常に高濃度に対して選択される計画を用いる。この選択は、薬剤耐性マーカーをコードする配列の2つのコピーを発現する細胞を好み、したがってPFI-013遺伝子崩壊に関してホモ接合性である (Mortensen et al., Mol. Cell. Bio. 12:2 391-95, 1992)。

【0188】所望の細胞または細胞株の遺伝子修飾後、PFI-013遺伝子座は、当業界で既知の標準PCRによるPCR分析またはサザンプロット法により修飾の部位として確認され得る (例えば、米国特許第4,683,202号およびErllich et al., Science 252:1643, 1991参照)。PFI-013遺伝子の機能的崩壊のさらなる立証は、PFI-013遺伝子メッセンジャーRNA (mRNA) レベル および/またはPFI-013ポリペプチドレベルがPFI-013遺伝子を正常に発現する細胞中で低減される場合にも、成 50 され得る。PFI-013遺伝子mRNAレベルの測定値は、逆転写酵素媒介性ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、サザンプロット分析、またはin-situハイブリダイゼーションにより得られる。細胞により生成されるPFI-013ポリペプチドレベルの定量は、例えば当業界で既知の標準イムノアッセイ法により成され得る。このようなイムノアッセイとしては、ラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合イムノソルベント検定)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射能測定検定、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散検定、in-situイムノアッセイ (コロイド金、酵素または放射性同位元素標識を使用)、ウエスタンプロット、二次元ゲル分析、沈降反応、免疫蛍光検定、プロテインA検定および免疫電気泳動検定といった技術を用いる競合的および非競合的検定系が挙げられるが、これらに限定されない。

【0189】好ましい遺伝子修飾化動物細胞は、胚幹 (ES) 細胞およびES様細胞である。これらの細胞は、種々の種、例えばマウス (Evans et al., Nature 1 29:154-156, 1981; Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7634-7638, 1981)、ブタおよびヒツジ (Notanni et al., J. Reprod. Fert. Suppl., 43:255-260,

1991; Campbell et al., Nature 380:64-68, 1996) ならびにヒトを含めた霊長類 (Thomson et al., 米国特許第5,843,780号、Thomson et al., Science 282:1145-1147, 1995; および Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844-7848, 1995) の予備移植胚および芽細胞から得られる。

【0190】これらの種類の細胞は、多能性である。即ち、適正条件下では、それらは、3つの胚原基層：外胚葉、中胚葉および内胚葉のすべてから得られる広範な種々の細胞型に分化する。培養条件により、ES細胞の標本は、幹細胞として無限に培養され、単一標本内の広範な種々の異なる細胞型への分化を可能にし、あるいは特定の細胞型、例えばマクロファージ様細胞、ニューロン細胞、心筋細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨格筋細胞、ケラチノサイトおよび造血細胞、例えば好酸球、マスト細胞、赤芽球前駆細胞または巨核細胞への分化を指図される。分化指図は、例えば以下に記載されているような培養条件に特定の増殖因子またはマトリックス構成成分を含めることにより成し遂げられる：Keller et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7:862-69, 1995; Li et al., Curr. Biol. 8:971, 1998; Klug et al., J. Clin. Invest. 98:216-24, 1996; Lieschke et al., Exp. Hematol. 23:328-34, 1995; Yamane et al., Blood 90:3516-23, 1997; 及び Hirashima et al., Blood 93:1253-63, 1999。

【0191】遺伝子修飾のために用いられる特定の胚幹細胞株は、重要ではない。ネズミES細胞株の例としては、A B - 1 (McMahon and Bradley, Cell 62:1073-85, 1990)、E 1 4 (Hooper et al., Nature 326:292-95, 1987)、D 3 (Doetschman et al., J. Embriol. Exp. Morph. 87:27-45, 1985)、C C E (Robertson et al., Nature 323:445-48, 1986)、R W 4 (Genome Systems, St. Louis, MO) および D B A / 1 I a c J (Roach et al., Exp. Cell Res. 221:520-25, 1995) が挙げられる。

【0192】ポリペプチドの産生
本発明によれば、本発明のポリペプチドの産生は、本発明の1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドで形質転換された真核生物または原核生物発現宿主の慣用的栄養発酵培地中での培養により実行され得る。適切な培地の選択は、発現宿主の選定を基礎にし、および/または発現構築物の調節要件を基礎にし得る。このような培地は、当業者には周知である。培地は、所望により、汚染している可能性のある他微生物より形質転換化発現宿主を好む付加的構成成分を含有し得る。

【0193】したがって、本発明は、PFI-013活性を有するポリペプチドの製造方法であって、(a) 配列番号1で示されるヌクレオチド配列、あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片で宿主細胞を形質転換し、そして(b) 前記ポリペプチドの発現に適した条

件下で形質転換化宿主細胞を培養する工程から成る方法も提供する。

【0194】本発明は、PFI-013活性を有するポリペプチドの製造方法であって、(a) 前記ポリペプチドの発現に適した条件下で、配列番号1で示されるヌクレオチド配列、あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片で形質転換された宿主細胞を培養し、そして(b) 宿主細胞培養から前記のポリペプチドを回収する工程から成る方法にも関する。

【0195】本発明は、PFI-013活性を有するポリペプチドの製造方法であって、(a) 配列番号1で示されるヌクレオチド配列、あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片で宿主細胞を形質転換し、(b) 前記のポリペプチドの発現に適した条件下で形質転換化宿主細胞を培養し、そして(c) 宿主細胞培養から前記のポリペプチドを回収する工程から成る方法にも関する。

【0196】リボザイム
リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒し得る酵素性RNA分子である。リボザイム作用のメカニズムは、相補的標的RNAとのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後の核酸分子内分解性切断を包含する。PFI-013にRNA配列の核酸分子内分解性切断を特異的且つ有効に触媒する工学処理化ハンマーヘッドモチーフリボザイム分子は、本発明の範囲内である。

【0197】考え得るあらゆるRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、以下の配列：GUA、GUUおよびGUCを含むリボザイム切断部位に関して標的分子を走査することにより、最初に同定される。一旦同定されれば、切断部位を含有する標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列は、オリゴヌクレオチド配列を操作不可能にさせ得る二次構造特徴に関して評価され得る。候補標的の適切性は、リボヌクレアーゼ防御検定を用いた相補的オリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーションに対する許容可能性を検査することによっても評価され得る。

【0198】本発明のアンチセンスRNAおよびDNA分子ならびにリボザイムはともに、RNA分子の合成に関して当業界で既知のあらゆる方法により調製され得る。これらの例としては、オリゴヌクレオチドを化学的に合成するための技術、例えば固相ホスホラミダイト化学合成が挙げられる。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のin vitroまたはin vivo転写により生成され得る。このようなDNA配列は、T7またはSP6のような適切なRNAポリメラーゼプロモーターを有する広範な種々のベクター中に組み入れられ得る。

【0199】検出
PFI-013ポリヌクレオチドコード配列の存在は、配列番号1で示される配列のプロンプ、一部または断片を用い

たDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅により検出され得る。核酸増幅ベースの検定は、PFI-013DNAまたはRNAを含有する形質転換体を検出するためのPFI-013コード配列をベースにしたオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用を包含する。本明細書中で用いる場合、「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」とは、プローブまたはアンプリマーとして用いられ得る、少なくとも約10ヌクレオチド、そして60ヌクレオチドという多くの、好ましくは約15~30ヌクレオチドの、さらに好ましくは約20~25ヌクレオチドの核酸配列を指す。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号1で示されるヌクレオチド配列の3'領域から得られる。

【0200】例えば、タンパク質に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いることによりPFI-013ポリペプチドの発現を検出し、測定するための種々のプロトコールは、当業界で既知である。例としては、酵素結合イムノソルベント検定(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および蛍光活性化細胞分類(FACS)が挙げられる。PFI-013ポリペプチド上の2つの非干渉性エピトープに反応性のモノクローナル抗体を用いる二部位モノクローナルベースイムノアッセイが好ましいが、しかし競合的結合検定も用いられ得る。これらのおよびその他の検定は、特に、Hampton R et al. (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, USA) およびMaddox DE et al. (1983, J. Exp. Med. 15, 8:1211)に記載されている。

【0201】広範な種々の標識および接合技術は当業者には既知であって、種々の核酸およびアミノ酸検定に用いられ得る。PFI-013ポリヌクレオチド配列を検定するための標識化ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを生成するための手段としては、標識化ヌクレオチドを用いたオリゴラベリング、ニックトランスレーション、末端ラベリングまたはPCR増幅が挙げられる。あるいは、PFI-013コード配列またはそのあらゆる部分は、mRNAプローブの生成のためにベクター中にクローン化され得る。このようなベクターは当業界で既知であり、市販されており、そして適切なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3またはSP6および標識化ヌクレオチドの付加により、RNAプローブをin vitroで合成するために用いられ得る。

【0202】多数の会社、例えば、Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA)、Promega (Madison, WI, USA) およびUS Biochemical Corporation (Cleveland, OH, USA) が、これらの手法のための市販キットおよびプロトコールを供給する。適切なレポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光物質、化学発光物質または色原性作用物質、ならびに基質、補助因子、阻害剤、磁気粒子などが挙げられる。このような標識の使

用を教示する特許としては、米国特許出願第3817837号、米国特許出願第3850752号、米国特許出願第3939350号、米国特許出願第3996345号、米国特許出願第4277437号、米国特許出願第4275149号および米国特許出願第4366241号が挙げられる。組換え免疫グロブリンも、米国特許出願第4816567号に示されているようにして産生され得る。

【0203】特定の分子の発現を定量するためのもう一つの方法としては、放射能標識(Melby PC et al., 1993, J. Immunol. Methods Vol. 159 P235-44) またはビオチニル化(Duplax C et al., 1993, Anal. Biochem. Vol. 229 P36)ヌクレオチド、対照核酸の同時増幅、ならびに実験結果が挿入される標準曲線が挙げられる。多標本の定量は、当該オリゴマーが種々の稀釈液中に存在し、分光測光的または熱量測定的応答が迅速な定量を提供するELISAフォーマットで検定を実行することにより、スピードアップされ得る。

【0204】マーカー遺伝子発現の存在/非存在は当該遺伝子が存在することも示唆するが、しかし、その存在および発現は、確認される必要がある。例えば、PFI-013コード配列がマーカー遺伝子配列内に挿入された場合、PFI-013コード領域を含有する組換え細胞は、マーカー遺伝子機能の非存在により同定され得る。あるいは、マーカー遺伝子は、単一プロモーターの制御下でPFI-013コード配列と並列に置かれ得る。誘導または選択に応答するマーカー遺伝子の発現は、通常は、同様にPFI-013の発現を示す。

【0205】あるいは、PFI-013に関するコード配列を含有し、PFI-013コード領域を発現する宿主細胞は、当業者に既知の種々の手法により同定され得る。これらの手法としては、核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための膜ベースの、溶液ベースの、またはチップベースの技法を含む、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション、およびタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術が挙げられるが、これらに限定されない。

【0206】抗体
本発明のアミノ酸配列は、アミノ酸配列に対する抗体を生成する - 例えば、標準技法の使用により - ためにも用いられ得る。当業界で周知の手法が、PFI-013ポリペプチドに対する抗体の産生のために用いられ得る。このような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fab発現ライブラリーにより産生される単数または複数のFab断片が挙げられるが、これらに限定されない。中和抗体、すなわち、PFI-013ポリペプチドの生物学的活性に拮抗する抗体が診断及び治療のために特に好ましい。

【0207】抗体産生のためには、種々の宿主、例えばヤギ、ウサギ、ラット、マウス等が、PFI-013ポリペプチドまたはそのあらゆる部分、変異体、相同体、断片、

類似体または誘導体、あるいは免疫原特性を保持するオリゴペプチドを用いた注射により免疫感作され得る。宿主種によって、免疫応答を増大するために種々のアジュバントが用いられ得る。このようなアジュバントとしては、フロイントアジュバント、無機ゲル、例えば水酸化アルミニウム、ならびに界面活性物質、例えばリソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、カギアナカサガイヘモシアニンおよびジニトロフェノールが挙げられるが、これらに限定されない。BCG (Bacilli Calmette-Guerin) および

10 コリネバクテリウム属のCorynebacterium parvumも用い得るおそらくは有用なヒトアジュバントである。
 【0208】アミノ酸配列に対するモノクローナル抗体は、培養中の連続細胞株による抗体分子の産生を提供するあらゆる技法を用いて調製され得る。これらの例としては、KoehlerとMilstein (1975, Nature Vol.256 P495-497) により初めて記載されたハイブリドーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kosbor et al. (1983) Immunol. Today Vol.4 p72; Cote et al. (1983) Proceedings of the National Academy of Science (USA) Vol. 20 1.80 p2026-2030) およびEBV - ハイブリドーマ技法 (Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc. pp.77-96) が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、「キメラ抗体」の産生のために開発された技法、適切な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングが用いられ得る (Morrison et al. (1984) Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) Vol 81 p6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature Vol312 p604-608; Ta 30 keda et al. (1985) Nature Vol 314 p452-454)。あるいは、一本鎖抗体の製造に関して記載された技法 (米国特許出願第4946779号) は、ポリペプチド特異的一本鎖抗体を製造するために適合され得る。

【0209】抗体は、Orlandi et al. (1989, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) Vol. 86 p3833-3837) およびWinter G and Milstein C (1991; Nature Vol349 p293-299) に開示されているように、リンパ球集団におけるin vivo産生を誘導することにより、またはの高特異的結合試薬の組換え免疫グロブ 40 リンライブラリーまたはパネルのスクリーニングによっても産生され得る。

【0210】PFI-013に関する特異的結合部位を含有する抗体断片も生成され得る。例えば、このような断片としては、抗体分子のペプシン消化により産生され得るF (ab')₂断片、およびF (ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成され得るFab断片が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、Fab発現ライブラリーは、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な同定を可能にする 50

ために構築され得る (Huse WD et al., (1989) Science Vol 256 p1275-1281)。

【0211】代替的技法は、例えばファージが非常に種々の相補性決定領域(CDR)を有するその被膜上にscFv断片を発現するファージ表示ライブラリーのスクリーニングを包含する。この技法は、当業界で周知である。PFI-013特異的抗体は、PFI-013受容体の発現に関連した症状および疾患の診断に有用である。競合的結合のための種々のプロトコールまたは確立された特異性を有するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いたイムノラジオメトリックアッセイは、当業界で周知である。このようなイムノアッセイは、典型的には、PFI-013ポリペプチドとその特異的抗体 (または同様のPFI-013結合分子) との間の複合体の形成、ならびに複合体形成の測定を包含する。特定のPFI-013タンパク質上の2つの非干渉性エピトープに反応性のモノクローナル抗体を用いた二部位モノクローナルベースイムノアッセイが好ましいが、しかし競合的結合検定も用いられ得る。これらの検定は、Maddox DE et al. (1983, Journal of Experimental Medicine Vol 158 P1211) に記載されている。

【0212】抗PFI-013抗体は、異常信号伝達を含めた障害、またはPFI-013受容体の異常発現を特徴とするその他の障害または疾患の診断に有用である。PFI-013に関する診断検定としては、ヒト体液、細胞、組織、あるいはこのような組織の切片または抽出物中のPFI-013ポリペプチドを検出するために抗体および標識を用いる方法が挙げられる。本発明のポリペプチドおよび抗体は、修飾を伴って、または伴わずに用いられ得る。しばしば、ポリペプチドおよび抗体は、受容体分子を用いて、共有的にまたは非共有的に、それらを接合することにより標識される。広範な種々の受容体分子は、当業者に既知である。

【0213】抗体は、以下の(a)本発明の抗体を提供し、(b)抗体-抗原複合体の形成を可能にする条件下で前記の抗体とともに生物学的標本をインキュベートし、そして(c)前記の抗体を包含する抗体-抗原複合体が形成されたか否かを確定する工程を包含する方法により、生物学的標本中に存在する本発明のポリペプチドを検出する方法に用いられ得る。

【0214】本発明の抗体は、固体支持体に結合されるか、および/または適切な試薬、対照、使用説明書等とともに適切な容器中のキットに包装され得る。

検定/同定方法

本発明は、細胞 (例えばヒト細胞) 中のPFI-013の存在を検出するための検定方法であって、(a)配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異から確定されるようなPFI-013特異的であるPCRプライマー対を用いて、このような細胞からのRNA (例えば総RNA) で逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

CR)を実施し、そして(b)例えばアガロースゲル電気泳動により適切にサイジングされたPCR断片の出現を検定する工程からなる方法にも関する。

【0215】本発明のポリペプチドを用いてポリペプチドのモジュレーター(拮抗薬または作動薬)に関してスクリーニングし得る多数の検定がある。このような検定の例としては、以下のものが挙げられる:

機能検定 - その拮抗薬を同定するための受容体のスクリーニング方法の一例は、cAMPまたはアデニレートシクラーゼ蓄積に及ぼす抑制または刺激作用をモニタリングすることである。このような検定は、細胞表面発現のために本発明の受容体で哺乳類細胞をトランスフェクトすることを包含する。次に細胞は、推定上の拮抗薬に曝露され、cAMP蓄積の量が測定される。推定拮抗薬が受容体と結合すると、受容体媒介性cAMPまたはアデニレートシクラーゼ活性のレベルは増大または低減する。

【0216】蛍光測光的画像形成平板読取器(Fluor)を用いた機能検定 - スクリーニングのために用いられる技法は、受容体活性化により引き起こされる細胞内カルシウムまたは細胞外pH変化を測定する系における本発明の受容体を発現する細胞(例えば、トランスフェクト化HEK293細胞)の使用を含む。この技法では、本発明の受容体を発現する細胞は、二次メッセンジャー応答、例えば信号伝達、カルシウムレベルの変化またはpH変化を引き起こす化合物(例えば、小分子、ペプチド、脂質、ヌクレオチドまたは糖タンパク質)と接触され得る。これらの変化は、考え得る化合物が受容体を活性化するかまたは阻害するかを確定するために用いられる。

【0217】配位子結合検定 - この種類の検定は、酵母化合物の結合を検査し得るが、この場合、本発明の受容体を含有する細胞との付着が、候補化合物と直接または間接的に会合した標識により、または標識化競合物との競合を包含する検定で検出される。化合物が受容体を活性化するかまたは阻害するかを確定するスクリーニングを実行するための標準検定は、当業者には十分理解される。

【0218】したがって、本発明は、PFI-013の活性および/またはその発現に影響を及ぼす(例えば拮抗し、作動しまたはそうでなければ修飾する)作用物質(例えば、化合物、その他の物質またはそれを包含する組成物)を同定する方法であって、PFI-013またはそれをコードするヌクレオチド配列を作用物質と接触させて、次にPFI-013の活性および/またはその発現を測定する工程を包含する方法にも関する。

【0219】本発明は、PFI-013の活性および/またはその発現に選択的に影響を及ぼす(例えば拮抗し、作動しまたはそうでなければ修飾する)作用物質(例えば、化合物、その他の物質またはそれを包含する組成物)を

同定する方法であって、PFI-013またはそれをコードするヌクレオチド配列を作用物質と接触させて、次にPFI-013の活性および/またはその発現を測定する工程を包含する方法にも関する。

【0220】本発明は、PFI-013の活性および/またはその発現に影響を及ぼす(例えば拮抗し、作動しまたはそうでなければ修飾する)作用物質(例えば、化合物、その他の物質またはそれを包含する組成物)を同定する方法であって、(a)配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を包含する組換えDNAを組み入れられた細胞系、あるいは(b)天然に選択的にPFI-005を発現する細胞集団または細胞株中で、作用物質の存在下で、または作用物質の付加後に、PFI-013の活性および/またはその発現を測定する工程を包含する方法にも関する。好ましくは、PFI-013の活性は、前記の検定方法により確定される。

【0221】本発明は、PFI-013の活性および/またはその発現に選択的に影響を及ぼす(例えば拮抗し、作動しまたはそうでなければ修飾する)作用物質(例えば、化合物、その他の物質またはそれを包含する組成物)を同定する方法であって、(a)配列番号1で示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を包含する組換えDNAを組み入れられた細胞系、あるいは(b)天然に選択的にPFI-013を発現する細胞集団または細胞株中で、作用物質の存在下で、または作用物質の付加後に、PFI-013の活性および/またはその発現を測定する工程を包含する方法にも関する。好ましくは、PFI-013の活性は、前記の検定方法により確定される。

【0222】本発明は、PFI-013(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)活性またはそれをコードするヌクレオチド配列(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)の発現の調整(好ましくは特異的調整)のための作用物質のスクリーニング方法であって、(a)候補作用物質を提供し、(b)適切な条件下で調整を可能にするのに十分な時間、PFI-013(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)またはそれをコードするヌクレオチド配列(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)を候補作用物質と併合し、そして(c)候補作用物質がPFI-013(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)活性またはそれをコードするヌクレオチド配列(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)の発現を調整したか否かを検証するために、PFI-013(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)またはそれをコードするヌクレオチド配列(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)に対する候補作用物質の調整を検出する工程を包含する方法にも関する。

【0223】本発明は、PFI-013(あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片)またはそれを

コードするヌクレオチド配列（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）との特異的結合親和性に関して作用物質をスクリーニングする方法であって、（a）候補作用物質を提供し、（b）適切な条件下で結合を可能にするのに十分な時間、PFI-013（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）またはそれをコードするヌクレオチド配列（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）を候補作用物質と併合し、そして（c）候補作用物質がPFI-013（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）活性またはそれをコードするヌクレオチド配列（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）と結合したか否かを確証するために、PFI-013（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）またはそれをコードするヌクレオチド配列（あるいはその誘導体、相同体、変異体、類似体または断片）との候補作用物質の結合を検出する工程を包含する方法にも関する。

【0224】したがって、本発明のある種の実施態様では、PFI-013あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体、および/またはPFI-013あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体を発現する細胞株を用いて、PFI-013活性のモジュレーター（例えば、拮抗薬または作動薬）として作用する抗体、ペプチドまたはその他の作用物質、例えば有機または無機分子に関して、あるいはその発現に関してスクリーニングし、それにより受容体を調整し得る治療薬を同定し得る。あるいは、組換え的に発現されたPFI-013あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体、もしくはPFI-013あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体を発現する細胞株を用いた組合せ化学により作製されるペプチドライブラリーまたは有機ライブラリーのスクリーニングは、受容体を調整することにより機能する治療薬の同定に有用である。合成化合物、天然生成物、ならびに考え得る生物学的に活性な物質のその他の供給源は、当業者にはルーチンであると思われる多数の方法で、スクリーニングされ得る。例えば、PFI-013のN-末端領域をコードするヌクレオチド配列は、PFI-013活性のアロステリックモジュレーター（作動薬または拮抗薬）のスクリーニングのために用いられ得る細胞株中で発現され得る。

【0225】PFI-013ポリペプチド、その免疫原性断片またはそのオリゴペプチドは、種々の薬剤スクリーニング技法のいずれかにおいて、治療化合物をスクリーニングするために用いられ得る。このような検定に用いられるポリペプチドは、溶液中に遊離され、固体支持体に添付され、細胞表面に保持され、または細胞内に置かれる。PFI-013ポリペプチドと検査される作用物質との間の結合複合体の形成は、測定され得る。

【0226】したがって、本発明は、PFI-013のまたはP

FI-013の、あるいはその一部の、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体の発現の調整（好ましくは特異的調整、例えば特異的結合親和性）のための1つまたは複数の化合物のスクリーニング方法であって、1つ又は複数の化合物を提供し；適切な条件下で調整を可能にするのに十分な時間、PFI-013またはそれをコードするヌクレオチド配列、あるいはその一部、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体を1つまたは複数の各々の化合物と併合し；そしてPFI-013あるいはその一部、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導体の、複数の各々の化合物との結合を検出して、それによりPFI-013またはそれをコードするヌクレオチド配列を調整する単数または複数の化合物を同定する方法に関する。このような検定においては、複数の化合物は、当業者に既知の組合せ化学技法により製造され得る。

【0227】薬剤スクリーニングのための別の技法は、PFI-013ポリペプチドとの適切な結合親和性を有する化合物の高スループットスクリーニング（HTS）を提供し、Geysen, WO 84/03564（1984年9月13日公開）に詳細に記載されている方法を基礎にする。要するに、多数の異なる小ペプチド被験化合物が固体基質、例えばプラスチックピンまたは何らかのその他の表面に合成される。ペプチド被験化合物をPFI-013断片と反応させ、洗浄する。次に、例えば、当業界で周知の方法を適切に適合させることにより、結合PFI-013を検出する。精製PFI-013は、前記の薬剤スクリーニング法に用いるために、プレート上に直接被覆され得る。あるいは、非中和抗体を用いてペプチドを捕獲し、それを固体支持体上に固定化し得る。

【0228】本発明は、PFI-013ポリペプチドを結合し得る中和抗体が、PFI-013を結合するために被験化合物と特異的に競合する競合的薬剤スクリーニング検定の使用も意図する。このようにして、抗体を用いて、1つ又はそれ以上の抗原決定基をPFI-013と共有する任意のペプチドの存在を検出し得る。本発明の検定方法は、高スループットスクリーン（HTS）であり得る。この点で、W084/03564の教示は、本発明のPFI-013に関して適合され得る。

【0229】米国特許出願第5738985号の教示も、本発明の検定方法に適合され得る。

作用物質

本発明は、本発明の検定方法および同定方法により同定される1つ又はそれ以上の作用物質も提供する。本発明の作用物質は、例えば有機化合物または無機化合物であり得る。作用物質は、例えば配列番号1で示される配列の全部または一部に対するアンチセンスであるヌクレオチド配列であり得る。

【0230】本発明はさらに、薬剤として用いるための、本発明の作用物質（あるいは製薬上許容可能なその

塩、または製薬上許容可能なその溶媒和物)または前記のいずれかを含有する製剤組成物を提供する。本発明は、PFI-013活性に影響を及ぼす(例えば、そのGPCR活性を拮抗し、調整し、または作動する)作用物質の使用にも関する。

【0231】診断用

本発明は、PFI-013ポリヌクレオチド配列の検出のための診断用組成物も提供する。診断用組成物は、配列番号1で示される配列、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体またはその誘導體、あるいは配列番号1で示されるヌクレオチド配列の全部または一部、あるいはその対立遺伝子変異とハイブリダイズし得る配列を包含し得る。

【0232】疾患の診断のための基礎を提供するために、PFI-013ポリペプチド発現からの正常または標準値が確定される必要がある。これは、動物またはヒトの正常被験者から採取した体液または細胞抽出物を、当業界で周知の複合体形成に適した条件下でPFI-013ポリペプチドに対する抗体と併合することにより成し遂げられる。標準複合体形成の量は、それを陽性対照の稀釈シリーズと比較することにより定量され得るが、この場合、既知量の抗体が既知濃度の精製PFI-013ポリペプチドと併合される。次に、正常標本から得られた標準値を、PFI-013ポリペプチド発現に関連する障害または疾患に罹患した可能性のある被験者からの標本から得られた値と比較する。標準値と被験者基との間の偏差は、疾患状態の存在を確定する。

【0233】PFI-013ポリヌクレオチド、あるいはその任意の一部は、診断および/または治療用化合物に関する基礎を提供し得る。診断目的のために、PFI-013ポリヌクレオチド配列を用いて、PFI-013活性が関連し得る症状、障害または疾患における遺伝子発現を検出し、定量し得る。PFI-013コードポリヌクレオチド配列は、PFI-013の発現に起因する疾患の診断のために用い得る。例えば、PFI-013をコードするポリヌクレオチド配列は、PFI-013発現における異常を検出するために、生検または剖検からの組織、あるいは生物学的流体、例えば血清、滑液または腫瘍剖検のハイブリダイゼーションまたはPCR検定に用いられ得る。このような定性的または定量的方法の形態としては、サザンまたはノーザン分析、ドットプロットまたはその他の膜ベースの技法; PCR技法; 浸漬、ピンまたはチップ技法; ならびにELISAまたはその他の多標本フォーマット技法が挙げられる。これらの技法はすべて、当業界で周知であって、実際、多数の市販の診断キットの基礎である。

【0234】このような検定は、特定の療法的治療レジムの効力を評価するために適合させ得るし、動物試験に、臨床試験にまたは個々の患者の治療のモニタリングに用いられ得る。疾患の診断のための基礎を提供するために、PFI-013発現に関する正常または標準値が確定さ

れる必要がある。これは、動物またはヒトの正常被験者から採取した体液または細胞抽出物を、ハイブリダイゼーションまたは増幅に適した条件下でPFI-013またはその一部と併合することにより成し遂げられる。標準ハイブリダイゼーションは、正常被験者に関して得られた値を、既知量の精製PFI-013が用いられる同一実験で実行された陽性対照の稀釈シリーズと比較することにより定量され得る。正常標本から得られた標準値を、PFI-013コード配列の発現に関連する障害または疾患に罹患した可能性のある被験者からの標本から得られた値と比較する。標準値と被験者基との間の偏差は、疾患状態の存在を確定する。疾患が確定された場合、既存の治療薬が投与され、治療プロフィールまたは値が生成される。最後に、定期的ペースで検定を反復して、その値が正常または標準パターンに向かって進行するか逆戻りするかを評価し得る。成功例の治療プロフィールを用いて、数日間または数ヶ月間の治療効果を示し得る。

【0235】したがって、本発明は、例えば、疾患状態におけるPFI-013レベルを検出し、定量するために診断的に用いられる抗PFI-013抗体を産生するための、PFI-013ポリペプチド、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導體の使用に関する。本発明はさらに、陽性対照および抗PFI-013抗体として用いられ得る精製PFI-013を包含する細胞および組織中のPFI-013の検出のための診断検定およびキットに関する。このような抗体は、PFI-013タンパク質の発現または欠失、あるいはその変異体、相同体、断片、類似体または誘導體の発現に関連したあらゆる疾患状態または症状を検出するために、溶液ベース、膜ベースまたは組織ベースの技法に用いられ得る。あるいは、本発明は、PFI-013をコードする核酸配列内の突然変異を測定し、又は患者から得られたサンプル中のPFI-013の量を測定することを含む、PFI-013の過小発現に関する疾患又はその疾患に対する感受性を、患者において診断するための方法を提供する。宿主から得られたサンプル中のPFI-013の存在について分析することを含む診断方法も提供される。

【0236】プローブ

本発明の別の局面は、PFI-013コード領域をコードする、ゲノム配列を含めたポリヌクレオチド配列、または密接に関連した分子、例えば対立遺伝子を検出し得る核酸ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブの提供である。プローブの特異性、即ち、それが高保存、保存または非保存領域またはドメインのいずれから得られるか、そしてハイブリダイゼーションまたは増幅の緊縮度(高、中または低)は、プローブが天然PFI-013コード配列だけを同定するか、あるいは関連配列を同定するかを確定する。関連核酸配列の欠失に関するプローブは、PFI-013ポリヌクレオチドの保存または高保存ヌクレオチド領域、例えば3'領域から選択され、このようなプローブは、縮重プローブのプール中で用いられる。同一

核酸配列の検出のためには、あるいは最大特異性が望ましい場合には、核酸プローブは非保存ヌクレオチド領域またはPFI-013ポリヌクレオチドの独特の領域から選択される。本明細書中で用いる場合、「非保存ヌクレオチド領域」とは、本明細書中に開示されたPFI-013コード配列に独特であり、そして関連配列では生じないヌクレオチド領域を指す。

【0237】米国特許出願第4683195号、米国特許出願第4800195号および米国特許出願第4965188号に記載されているようなPCRは、PFI-013配列を基礎にしたオリゴヌクレオチドに関する付加的用途を提供する。このようなオリゴマーは一般に、キメラ合成されるが、しかしそれらは酵素的に生成され、または組換え体供給源から生成され得る。オリゴマーは一般に、特定の遺伝子または条件の同定のために最適化された条件下で用いられる、一方はセンス配向(5' 3')を有し、もう一方はアンチセンス配向(3' 5')である2つのヌクレオチド配列を包含する。入れ子式の組のオリゴマーかあるいはオリゴマーの縮重プールでもある、同一の2つのオリゴマーは、密接に関連したDNAまたはRNA配列の検出および/または定量のために、低緊縮条件で用いられ得る。

【0238】PFI-013に関する核酸配列は、内因性ゲノム配列をマッピングするために、前記と同様のハイブリダイゼーションプローブを生成するためにも用いられ得る。配列は、周知の技法を用いて、特定の染色体に、または染色体の特定の領域にマッピングされ得る。これらの例としては、染色体スプレッドとのin-situハイブリダイゼーション(Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City, USA)、フローソーテッド染色体調製、または人工染色体構築、例えば、酵母菌人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌PI構築、または単一染色体cDNAライブラリーの構築が挙げられる。

【0239】染色体調製物のin-situハイブリダイゼーションおよび物理的マッピング技法、例えば確立された染色体マーカーを用いた連鎖分析は、遺伝子地図を拡張するには有益でない。遺伝子地図の例は、Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f)に見出され得る。しばしば、別の哺乳類種の染色体上の遺伝子の配置は、特定のヒト染色体の数または腕が分からない場合でも、関連マーカーを明示し得る。新規の配列は、物理的マッピングにより、染色体腕またはその一部に割り当てられ得る。これは、位置クローニングまたはその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探索している研究者に有益な情報を提供する。疾病または症候、例えば毛細血管拡張性運動失調(AT)が遺伝子連鎖により特定のゲノム領域、例えばAT-11q22-23(Gatti et al (1988) Nature 336:577-580)に大まかに局限されると、その領

域に対するあらゆる配列マッピングはさらなる研究のための関連または調節遺伝子を示し得る。本発明のヌクレオチド配列は、正常、キャリアまたは罹患個体間の翻訳、逆位等による染色体位置の差を検出するために用いられ得る。

【0240】製剤

本発明は、PFI-013活性のためにそれを必要とする個体を治療するための製剤組成物であって、前記の活性を調整する(例えば拮抗するかまたは作動する)治療の有効量の作用物質、ならびに製薬上許容可能な担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを包含する組成物も提供する。

【0241】したがって、本発明は、本発明の作用物質(本発明のヌクレオチド配列の発現パターンまたはその発現生成物の活性を調整し得る作用物質、および/または本発明の検定により同定される作用物質)を包含する製剤組成物も包含する。これに関して、そして特にヒト治療に関しては、本発明の薬剤が単独で投与され得る場合でも、それらは一般に、意図された投与経路および標準製薬実施に関して選択される製剤担体、アジュバント、賦形剤または希釈剤との混和物で投与される。

【0242】例として、本発明の製剤組成物中では、本発明の作用物質は、あらゆる適切な単数または複数の結合剤、滑剤、沈澱防止剤、コーティング剤または可溶化剤と混和され得る。概して、本発明の作用物質の治療的に有効な毎日の経口または静脈内用量は、治療される被験者の体重1kg当たり0.01~50mg、好ましくは0.1~20mg/kgの範囲であると思われる。本発明の作用物質は、0.001~10mg/kg/時間の範囲であると思われる用量で、静脈内注入によっても投与され得る。

【0243】したがって、本発明は、PFI-013活性による、それを必要とする個体を治療するための方法であって、有効量の本発明の製剤組成物を前記の個体に投与することを包含する方法も提供する。典型的には、医者は、個々の患者に最も適した実際投与量を確定する。それは、特定の患者の年齢、体重、性別および応答に伴って変わる。前記の投与量は、平均的な場合の例である。もちろん、より高い用量がよい、あるいはより低い用量がよいといった個々の場合があり得るが、これらは本発明の範囲内である。

【0244】適切な場合には、製剤組成物は、吸入により、座薬またはペッサリーの形態で、皮膚パッチの使用により、ローション、溶液、クリーム、軟膏または散粉の形態で局所的に、賦形剤、例えばデンプンまたはラクトースを含有する錠剤の形態で、あるいは単独または賦形剤との混和物でカプセルまたは小卵中に、あるいは風味剤または着色剤を含有するエリキシル、溶液または懸濁液の形態で経口的に、投与され得るし、あるいはそれらは非経口的に、例えば洞内、静脈内、筋内、または皮下的に注入され得る。非経口投与に関しては、組成物

は、多くの物質、例えば血液と等張の溶液を作るのに十分な塩または単糖を含有し得る滅菌水性溶液の形態で最良に用いられ得る。頬または舌下投与のためには、組成物は、慣用的頬で処方され得る錠剤または舐剤の形態で投与され得る。

【0245】被験者（例えば患者）への経口、非経口、頬および舌下投与のためには、本発明の作用物質の1日投与レベルは、典型的には10~500 mg（1回または何回かに分けた用量）であり得る。したがって、そして例として、錠剤またはカプセルは、5~100 mgの、単一であるいは適切な場合には2つまたはそれ以上を同時に投与するための作用物質を含有し得る。持放射性処方物で本発明の作用物質を投与することもできる。

【0246】いくつかの用途においては、一般にヒトでは、本発明の作用物質の経口投与が好ましい経路であり、最も便利であり、そしていくつかの場合には、他の投与経路、例えば洞内（i.c.）投与に関連した欠点を回避し得る。受容者が経口投与後の嚥下障害または薬剤吸収障害に罹患している状況では、薬剤は、非経口的、舌下または頬に投与し得る。

【0247】獣医学的使用のためには、本発明の作用物質は、典型的には、通常獣医学業務にしたがって適切に許容可能な処方物として投与され、獣医師は、特定の動物に最も適した投与レジメンおよび経路を確定する。しかしながら、ヒト治療の場合と同様に、獣医学的処置のために作用物質単独で投与することができる。典型的には、製剤組成物 - ヒトまたは動物用途のためであり得る - 製薬上許容可能な稀釈剤、担体、賦形剤またはアジュバントのいずれか1つまたはそれ以上を包含する。製薬上許容可能な担体、賦形剤、アジュバントまたは稀釈剤の選定は、意図される投与経路および標準製薬実施に関して選択され得る。前記のように、製剤組成物は、担体、賦形剤、アジュバントまたは稀釈剤として、またはその他に、あらゆる適切な単数または複数の結合剤、滑剤、沈澱防止剤、コーティング剤または可溶化剤と混和され得る。

【0248】本発明のいくつかの実施態様では、製剤組成物は、1つ又はそれ以上の：本発明の検定によりスクリーニングされた作用物質；その誘導体、断片、相同体、類似体または変異体、あるいは配列番号1で示されるヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る配列を含めた配列番号1または配列番号2と相互作用し得る作用物質を包含する。

【0249】PFI-013mRNAを脱安定化し、またはPFI-013の翻訳を阻害するよう機能する、オリゴヌクレオチド配列、アンチセンスRNAおよびDNA分子、ならびにリボザイムは、本発明の範囲内に含まれる。PFI-013アンチセンス分子は、例えばPFI-013活性の増大に関連した種々の異常症状の治療のための基礎を提供し得る。

【0250】レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペ

スまたはワクシニアウイルスから、あるいは種々の細菌プラスミドから得られる発現ベクターは、標的化細胞集団への組換えPFI-013センスまたはアンチセンス分子のデリバリーのために用いられ得る。当業者に周知の方法を用いて、PFI-013を含有する組換えベクターを構築し得る。あるいは、組換えPFI-013は、リボソーム中で標的細胞にデリバリーされ得る。

【0251】全長cDNAおよび/またはその調節要素は、遺伝子機能のセンス (Youssoufian H and HF Lodish (1993) Mol Cell Biol. 13:98-104) またはアンチセンス (Eguchi et al (1991) Annu Rev Biochem. 60:631-652) 研究における道具としてPFI-005を研究者が用い得るようにする。cDNAから設計されたオリゴヌクレオチド、またはゲノムDNAから得られた制御配列は、発現を阻害するためにin vitroまたはin vivoで用いられ得る。このような技法は、目下当業界で周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそれより大きい断片は、コードまたは制御領域に沿った種々の位置から設計され得る。20ヌクレオチド長であり得る適切なオリゴヌクレオチドは、ヒトライブラリーからPFI-013配列または密接に関連した分子を単離するために用いられ得る。

【0252】さらに、PFI-013発現は、PFI-013活性を遮断するのが好ましい条件で高レベルのPFI-013断片を発現する発現ベクターを用いて細胞または組織をトランスフェクトすることにより、調整され得る。このような構築物は、非翻訳可能センスまたはアンチセンス配列で細胞を見たし得る。DNA中への組込の非存在下でも、このようなベクターは、ベクターのすべてのコピーが内因性ヌクレアーゼにより無力化されるまで、RNA分子を転写し続け得る。このような一過性発現は、非複製ベクターにより1ヶ月またはそれ以上持続し、そして適切な複製要素がベクター系の一部である場合には、それより長いことさえある。

【0253】遺伝子発現の修飾は、PFI-013遺伝子の制御領域、例えばプロモーター、エンハンサーおよびイントロンに対するアンチセンス配列を設計することにより得られ得る。転写開始部位、例えばリーダー配列の-10~+10領域から得られるオリゴヌクレオチドが好ましい。アンチセンスRNAおよびDNA分子は、転写体がリボソームと結合できないようにすることにより、mRNAの翻訳を遮断するよう設計され得る。同様に、「三重らせん」塩基対合としても知られているHogebloom塩基対合を用いて、阻害は成し遂げられ得る。三重らせん対合は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開く二重らせんの能力を危うくする。

【0254】したがって、本発明は、本発明の作用物質（または製薬上許容可能なその塩、または製薬上許容可能なその溶媒和物）を、製薬上許容可能な稀釈剤、アジュバント、賦形剤または担体とともに包含する製剤組成

物を提供する。製剤組成物は、獣医学的（即ち動物）用途のためまたはヒト用途のためであり得る。

【0255】したがって、本発明は、製薬上許容可能な希釈剤、担体、賦形剤またはアジュバント（その組合せを含む）との混和物中のPFI-013タンパク質（アンチセンス核酸配列を含む）の有効量のモジュレーター（例えば、拮抗薬または作動薬）を包含する製剤組成物にも関する。本発明は、PFI-013ポリヌクレオチド配列の全部または一部、PFI-013アンチセンス分子、PFI-013生物活性を有するPFI-013ポリペプチド、タンパク質、ペプチドまたは有機モジュレーター、例えば拮抗薬（抗体を含む）または作動薬、を単独で、または少なくとも1つのその他の作用物質、例えば安定化合物と組合せて包含し得る、そしてあらゆる滅菌性、生物適合性の製剤担体、例えば食塩水、緩衝食塩水、デキストロースおよび水（これらに限定されない）中で投与され得る製剤組成物に関する。

【0256】一般的方法参照

概して、本明細書で述べた技法は、当業界で周知であり、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989) および Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. に対して特に参照が成される。PCRは、米国特許出願第4683195号、米国特許出願第4800195号および米国特許出願第4965188号に記載されている。

【0257】寄託

ブダペスト条約にしたがって、認可保管所であるNational Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) (23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, AB2 1RY, United Kingdom) に、2000年8月23日に、以下の標本を寄託した。

【0258】NCIMB 番号NCIMB 41073は、大腸菌Pfi-013である。寄託者は、Pfizer Central Research, Pfizer Limited, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, United Kingdomであった。当業者は、アンピシリンを含有するルリアプロス中で、前記の大腸菌クローン（NCIMB 41073）を容易に増殖し、そしてSambrook, et al., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USAに記載されたアルカリ溶解法を用いてクロソンのプラスミドDNAを単離し得る。Sanger等（Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) (Dec. 1977), 74 (12):5463-5467）により記載され、蛍光検出に関してApplied Biosystems (Applied Biosystems社の文献参照)により修正されたチェインターミネーター法を次に用いてDNAをシーケンシングし、PFI-013を同定し得た。

【0259】本発明は、寄託物から誘導可能および/または発現可能な配列、ならびにそれを包含する実施態様も包含する。本発明は、寄託物から誘導可能および/ま

たは発現可能な部分配列、ならびにそれを包含する実施態様も包含するが、この場合、その部分配列は活性ポリペプチドをコードする。本発明は、寄託物から誘導可能および/または発現可能な配列を包含するタンパク質、ならびにそれを包含する実施態様も包含する。寄託物から誘導可能および/または発現可能な部分配列を包含するタンパク質、ならびにそれを包含する実施態様も包含するが、この場合、それらの部分配列は、活性ポリペプチドをコードする。

【0260】実施例への序論、ならびに配列表

ここでは、添付の配列表を参照しながら、実施例のみにより、本発明を説明する。配列番号1は、PFI-013をコードするヌクレオチド配列を示す。ATG翻訳開始コドンは最初の下線を引かれた3文字により示される。終止コドンは最後の下線を引かれた3文字により示される。

【0261】配列番号2は、PFI-013をコードする対応のアミノ酸配列を示す。配列番号3～10は、実施例全体で用いられる種々のプライマーを示す。本発明のGPCRをコードするポリヌクレオチドをクローン化し、種々の生物情報道具を用いて、DNAおよびアミノ酸配列を分析した。本明細書中に記載した配列によりコードされるGPCRは、PFI-013と呼ばれた。

【0262】実施例

実施例1

IL-5により刺激されたエオシン好性白血球からのcDNAライブラリーから得られた配列であるが、部分配列としてのものを用いた発現配列タグ(EST)データベース内で、PFI-013をまず同定した。公のゲノム・データベースの検索は、完全長PFI-013配列の同定、及びとりわけ、BLASTアルゴリズムを使用した、ヒスタミンH3レセプターに対するそのホモロジーの決定を導いた。

【0263】実施例2

生物情動的試験(Bioinformatics study) PFI-013がGPCRファミリーの一員である、ということを確認するために、多数の生物情動的アプローチを実施した(図1参照)。

(a) Swissprotに対するBLAST探索

BLAST算法(Basic Local Alignment Search Tool (Altschul SF (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; Altschul, SF et al (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, SF et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402))を用いて、Swissprotに対してPFI-013を探索し、最も近いタンパク質適合を同定した。この場合、トップヒットは以下の通りであった:

AF140538-01 PRI AAD38151.1ホモ・サピエンス・ヒスタミンH3レセプターmRNA、完全コーディング配列(CDS)

これらの結果は、PFI-013がGPCRファミリーの一員であることを示す。

【0264】(b) ヒト・ヒスタミンH3レセプターとのPFI-013のClustal W整列

これらの結果を、図2に示す。

(c) PFI-013のための遺伝子とヒト・ヒスタミンH3レセプターのための遺伝子のゲノム構造

図3に示すように、PFI-013のための遺伝子とヒスタミンH3レセプターのための遺伝子はひじょうに似た構造をもつ。図3は、エオシン好性白血球CDNAライブラリー内のESTとして元来同定された配列の部分を示す*

有意な整列を作り出す配列

値				
AF140538	GPCR0022	11	ヒスタミン H3 レセプター	
— 268	7e-74 GO			
A1AB HUMAN	GPCR0007	8	アルファ-1B アドレナリン	
— 145	8e-37 GO			
			作動性レセプター	
5H1D HUMAN	GPCR0025	12	5-ヒドロキシトリプタミン	
— 136	4e-34 GO			
			1D レセプター (5-HT...	
5H1F HUMAN	GPCR0027	12	5-ヒドロキシトリプタミン	
— 134	2e-33 GO			
			1F レセプター (5-HT...	
5H1B HUMAN	GPCR0024	12	5-ヒドロキシトリプタミン	
— 132	6e-33 GO			
			1B レセプター (5-HT...	
A1AD HUMAN	GPCR0008	8	アルファ-1D アドレナリン	
— 132	1e-32 GO			
			作動性レセプター	
D3DR HUMAN	GPCR0016	10	D(3) ドーパミン・レ	

これらの結果は、PFI-013がヒスタミンH3受容体に最も似ていることを実証し、H3受容体はCR000313がその配位子がアミンであるように新規のGPCRをコードすることを示唆する。

【0266】実施例3 ACM5 HUMAN GPCR0005 6

PFI-013の単離 ン・ 109 6e-26 GO
全RNAを、製造者の推奨に従ってQiagen RNeasy Maxima kitを使用して、Dr Baumgartner (1998)から得た、1 x 10⁸ のAML14.3D10細胞から抽出したmRNAを、製造者の推奨に従って

*す。

【0265】(d) 非冗長性ヒトGPCRデータベースに対するBLAST検索

この受容体に対する作動薬の種類を同定するために、GenbankおよびGeneseq Patentデータベースからの配列を主に包含する非冗長性ヒトGPCRデータベースに対して、PFI-013を探索した。トップテンヒットは以下の通りであった：

等級 E
(bits)

*に従って、Qiagen oligotex mRNA精製キットを使用していることを実証し、H3受容体はCR000313がその配位子がアミンであるように新規のGPCRをコードすることを示唆する。

【0266】実施例3 ACM5 HUMAN GPCR0005 6
ムスカリン性アセチルコリン受容体 (Display Systems Biotech) を使用し、1 μgのAML14.3D10mRNAをcDNAに逆転写した。PFI-013特異的プライマー (PFI-013前進及びPFI-013後進) を、AML14.3D10cDNAからPFI-013コーディング領域を増幅する

PCRミックス：	
PFI-013プライマー	1 μl (1 μM最終濃度)
AML14.3D10cDNA	2 μl (cDNA保存物の1/10)
dNTPs (キットに従う濃度)	1 μl
Elongase Polymerase(LTI, Inc.)	1 μl

【0267】PCRプライマー-B(Elongaseキットからの前進プライマー (= PFI-013前進) :

DMSO	5 μl
dH ₂ O	30 μl

5' - ACCATGCCAGATACTAATAGCACAATC - 3' (配列番号3)
後退プライマー (= PFI-013後退) :

5' - TTAAGAAGATACTGACCGACTGTG - 3' (配列番号4)

逆転写プライマー :

5' - GGGCAAGATAAAGGGCAGACCAGAT - 3' (配列番号5)

PCRサイクル :

(1) 94 1分間

(2) 60 1.5分間

(3) 68 3分間

ステップ(1) ~ (3) をさらに34サイクルについて繰返した。

(4) 68 10分間

(5) 4 浸漬

上記PFI-013生成物を、製造者の指示に従って、QIAGEN*

PCRプライマー :

PFI-013F:5' - TCCTTCTCCCAATCAGATTCTG
TAGC - 3' (配列番号6)

PFI-013B:5' - GTATCCATTGTGCACAAGCGC
- 3' (配列番号7)

PCRミックス :

PFI-013プライマー

)

PFI-013プラスミド

dNTPs (キットに従う濃度)

Advantage Polymerase(Clontech)

*en ゲル抽出キットを使用してゲル抽出した。得られた生成物を、製造者の指示に従って、ベクター p c DNA 3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) にTAクローン化した (Invitrogen TA クローニング法)。得られた挿入物を、製造者のプロトコールに従ってABI DNA配列決定法を使用して両ストランドに対して、配列確認した。

【0268】実施例4

PFI-013の組織分布

(a) ノーザン・プロット

(i) プローブ作製

PFI-013遺伝子の3'末端に向かう261 bpの断片を、以下のプライマーを使用してPCR増幅した。

5 μ l 各 (1 μ M最終濃度

1 μ l (50ng)

1 μ l

1

【0269】PCRサイクル :

(1) 94 1分間

(2) 68 1.5分間

ステップ(1) と (2) をさらに29サイクルについて繰返した。

(3) 68 10分間

(4) 4 浸漬

上記PCR反応を、1倍TAEバッファー (Tris - 酢酸 - EDTAバッファー、Ph8.3; Sigma) 中で処理した0.8%アガロース・ゲルを通して電気泳動にかけた。得られたバンドを、50 μ l 容の10mM Tris-Cl pH8.0 中で、製造者の推奨に従ってQiaquick (商標) ゲル抽出キット (Qiagen) を使用して上記ゲルから切除した。5 μ l の上記精製PCR生成物を、製造者の推奨に従って、Amersham Random Prime Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して³²P - dCTPで標識し、そしてその後、Chromaspin Spin + TE - 30カラム (clontech) を使用して精製した。

【0270】(ii) ハイブリダイゼーション

Human & Human II Multiple組織ノーザン・プロット (MTNs - Clontech) を、25mlのExpress Hyb溶液 (Clontech) と1時間68 で事前ハイブリダイズさせた。上記PFI-013プローブを、事前に加熱された (68) Express Hyb溶液のさらに25mlに添加した。上記事前ハイブリダイゼーション溶液を、上記膜からデカンテーション

し、そして上記ハイブリダイゼーション溶液を上記膜にこの膜を16時間68 でインキュベートした。からのものこの膜を68 で0.5倍SSPE/0.1%SDSで2回洗浄しそして次に-80 で1週間Bio MAX オートラジオグラフィック・フィルム (Kodak) に露出させた。結果を図4に示す。PFI-013mRNA発現の最高レベルを、脾臓、精巣、及び結腸内で検出可能な発現をもって末梢白血球 (PBLs) 中で観察した。

【0271】(b) Taqman (商標) 定量的PCR分析標準的な曲線反応を、PFI-013コーディング配列を含有する、p c DNA 3.1の0.55 μ g / μ l プラスミド溶液を使用して、PFI-013 発現を定量するために使用した。このプラスミド溶液を、対数ステップにおいて 10^{-12} まで順次希釈した。標準曲線を、2 ~ 200,000コピー/ウェルについて上記希釈を使用して設定した。300 nMの各プライマー (PFI-013F-taq (配列番号8) とPFI-013R-taq (配列番号9)) と150 nMのPFI-013CP (配列番号10) を、2倍のTaq Man (商標) Universal PCR Master Mix (Applied Bio Systems) と共に使用した。Multiple Tissue cDNA (MTC (商標)) Panels, Human I and Human II (Clontech) からのcDNA 1ngを、鋳型として使用した。この反応を、25 μ l 反応容量及び3連における各点をもって、シングル・リポーター、リアルタイム定量として、Taq Man (商標) 7700 Sequence Detection

System上で走らせた。PCR条件は：50 2分間、95 10分間、次に95 15秒間、60 1分間の、40サイクルであった。結果を配列検出ソフトウェアにより分析した。ベースライン、すなわち、蛍光の読みについてのバックグラウンド、を3~12サイクルに設定した。結果ファイルをExcel (Microsoft) にエクスポートし、そして標準曲線を、上記結果ファイルからの検出パラメーターを用いて再生した。結果を、組織cDNA 1ng当りのPFI-013転写産物のコピー数として表した。誤差バーは、標準偏差を表す(図5参照)。

【0272】使用したPCRプライマー：

PFI-013F-taq:5' - AATATTTTATTGGAGCCTGTGGAA - 3' (配列番号8)

PFI-013R-taq:5' - GGAAGAGACAGCAGTCAGTCCA - 3' (配列番号9)

PFI-013CP: 5' - FAM-ACACAAAGGATATCAGCGAAAGGCAAGCC - TAMRA - 3' (配列番号10)

結果を図5に示す。この定量的PCR結果は以下の点でノーザン・プロットのデータを裏付ける：最高レベルの発現が末梢白血球(P.B.白血球)において、その次に、脾臓と精巣において、観察され；低いレベルの発現が残りのサンプル中で検出された。

【0273】実施例5

リガンド - 結合性アッセイ

2×10^8 CHO-K1細胞を、製造者の推奨に従って、Lipofectamine Plus (Gibco - BRL) を使用して、pcDNA 3.1/V5-His-TOPO-PFI-013でトランスフェクトさせ、又は擬似トランスフェクトさせた。トランスフェクション後48時間インキュベートした後、粗膜調製物を以下のように作った：上記細胞をスクレーピングにより収穫し、20mlの氷冷アッセイ・バッファー(50mM Tris-HCl (pH7.4))中に再懸濁させ、ホモジェナイズし、そして得られた懸濁液を30分間、4,20,000gで遠心分離にかけた。上清をデカンテーションし、ペレットを3mlのアッセイ・バッファー中に再懸濁させ、そして再ホモジェナイズした(50mM Tris-HCl pH7.4)。タンパク質濃度を、製造者の推奨に従って、Bradford's アッセイ (Biorad) を通して測定した。

【0274】次に、200 μ gのタンパク質を含有する上記膜調製物のアリコート、30において2時間、各種濃度の³H-ヒスタミン(例えば、0.72~1500nM; Amersham Pharmacia Biotech から得られた³H-ヒスタミン)とともにインキュベートした。インキュベーションを終結させるために、サンプルを、(Filtermat 結合を減少させるためにアッセイ・バッファー中のPEI (ポリエチレンジアミン; Sigma)の0.3% (v/v) 溶液中に前もって(1時間)浸漬されていた)Wallac Filtermat s (Perkin Elmer) 上に、Brandell 細胞収穫装置を使用して素速く濾過した。直ちに、この Filtermat / ウェル

を、ウェル当り2mlのアッセイ・バッファーで素速く続けて4回洗浄した。Filtermatsを電子レンジを使用して乾燥させ、そしてMeltilex シンチラント (Perkin Elmer)を、Wallac Meltilex ヒート・シーラーを使用してFiltermats上に融かした。Filtermats上の結合放射能を、Wallacベータプレート・シンチレーション・カウンターを使用して測定した。上記データを、PFI-013トランスフェクト細胞からの膜に結合した放射能と擬似トランスフェクトされた細胞からのものとの間の差として表した。図6に示す予備的データは、ヒスタミンがPFI-013に結合するが、比較的低いアフィニティーをもっていることを示唆している。

【0275】実施例6

PFI-013のヒスタミン及びヒスタミン・アゴニスト活性化についての機能的細胞 - ベースのアッセイ

蛍光イメージング・プレート・リーダー (Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR (商標)) 技術を、

細胞ベースのアッセイにおいて、ヒスタミン又はヒスタミン・アゴニストによるPFI-013の活性化を検出するための手段として使用した。マウスG15遺伝子を発現する 5×10^6 ヒト胚腎 (Human Embryonic Kidney (HEK)) 293細胞(以下、“293細胞”という)を、製造者のプロトコールに従って、Lipofectamine Plus (商標) 試薬 (Gibco BRL) を使用して、7.5 μ gの、(pcDNA4HISmaxB (Invitrogen) プラスミド内に含まれる) PFI-013ベクター、又はベクター単独で、一時的にトランスフェクトさせた。PFI-013cDNAは、標準的な分子生物学の技術を使用して(例えば、Sambrook, et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USAに従って) pcDNA3.1/V5-His-TOPOからPFI-013cDNAを切除し、そしてこのcDNAをpcDNA4HISmaxBに挿入し、そしてT4DNAリガーゼを使用して上記断片を結合するために、制限部位KpnIとNotIを使用してpcDNA4HISmaxB内にクローン化されていた；

【0276】pcDNA4HISmaxBを使用した。なぜなら、それは、標準的pcDNA3.1ベクターを上廻って、遺伝子転写レベルをアップ・レギュレートする要素を含んでいるからである。トランスフェクションから24時間後、上記細胞を、トリプシン/EDTA溶液(LTI)を使用して上記フラスコから脱着させ、そして 5×10^4 細胞/ウェルの濃度で、黒い側をもつ、ポリ-D-リジン - 処理、96ウェル・プレート (Becton Dickinson) 内に接種した。このプレートを一夜、細胞が上記ウェルの底に接着するように放置した。培地を上記細胞から除去し、そして100 μ l温(37 $^{\circ}$)染料ローディング溶液(1倍のプロベネシド (Probenecid) を含有する11mlのダルベッコ修飾イーグル培地に添加された、20 μ l DMSO + DMSO中20%のプルロン酸中50 μ g Fluor

3 (Molecular probes)) で置き替えた (100倍プロベネシド - 0.71g のプロベネシドは、プレート当り、5ml の 1M NaOH と 5ml ダルベッコ・ホスフェート緩衝液化生理食塩水 (PBS) 中に溶解され; プロベネシド (Molecular Devices) は、アニオン輸送タンパク質の活性を阻害し、こうして染料ローディングを改善する)。次に、プレートを 37 で 1 時間インキュベートした。その後、プレートをウェル当り 250 μ l の洗浄バッファで 4 回洗浄した (5ml の 100倍プロベネシド保存液 + 495ml PBS, pH 7.4)。このプレートを、FLIPR (商標) 装置内での処理前 30 分間、37 / 5% CO₂ インキュベーターに戻した。

【0277】この FLIPR (商標) 処理は、2 分間にわたる全てのサンプルについての蛍光の読みを含んでおり; この時間の間、蛍光ベースラインは 10 秒間測定された。所望量の化合物 (すなわち、ヒスタミン又はヒスタミン・アゴニスト) を次に自動的に上記ウェルに移し、そして蛍光を残りの時間、連続的にモニターした。全ての化合物を洗浄バッファ中で希釈した。

(a) FLIPR (商標) 細胞 - ベース・アッセイにおける PFI-013 のヒスタミン活性化

先に詳述した方法を使用して、PFI-013 の機能的活性化についての効果を調べた。図 7 は、PFI-013 トランスフェクト 293 細胞 (図 7A) 又はベクターだけでトランスフェクトされた 293 細胞 (図 7B) についての、2 連 (行 B と C) における、10pM まで低下する対数濃度において順次希釈された (列 2 ~ 8) 10 μ M ヒスタミン・ジヒドロクロリドの作用を表す。残りのウェルは、化合物を含まないバッファを含有していた。ヒスタミンによる PFI-013 の特異的活性化は、10 μ M 濃度において見られた。

(b) FLIPR (商標) 細胞ベースのアッセイにおける各種ヒスタミン作動性化合物による PFI-013 活性化の分析

先に詳述した方法を使用して、PFI-013 の機能的活性化に対するヒスタミン作動性化合物の効果を調べた。

【0278】図 8 は、PFI-013 トランスフェクトされた 293 細胞 (図 8A) 又はベクターだけでトランスフェクトされた 293 細胞 (図 8B) に対する、2 連で (行 G と H) 10 μ M (行 A と B) から 0.5 μ M まで低く、順番に希釈された各種ヒスタミン作動性化合物 (列 2 ~ 10) の作用を表す。残りのウェルは、化合物を含まないバッファを含有していた。結果は、効果の等級オーダーにおいて、N - -メチル・ヒスタミン (列 6) > ヒスタミン (列 4) > R - -メチル・ヒスタミン (列 5) = ヒスタミン - 1 - メチル (列 8) により活性化される。テストされた残りの化合物 (ディマプリット (Dimaprit)、L - ヒスチジン、イメティット (Imetit)、ノスカピン (noscipine)、及びクロベンプロピット (clobenpropit)、それぞれ、列 2, 3, 7, 9、と 10) に

いては、PFI-013 の活性化は上記アッセイにおいて検出されることができなかった。

【0279】実施例 7

エオシン好性白血球走化性試験

エオシン好性白血球を、上述のように末梢血液から単離した (Hansel, TT., De Vries IJ., Iff T., Rihs S., Wandzilak M., Betz S., Blaser K. and Walker C. (1991), An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Imm. Meth.* 145:105-10)。走化性を、48 - ウェル Boyden チャンバー (Neuro Probe Inc., Cabin John, MD, USA) を使用して計測した。アゴニストを、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) を含有する RPMI 培地 (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) 中で希釈し、そして上記走化性チャンバーの底壁に添加した。5 μ m PVP・不含ポリカーボネート・フィルターを、(Neuro Probe Inc., Cabin John, MD, USA) の壁を分離するために使用した。エオシン好性白血球を、1ml 当り 2.5×10^6 細胞の濃度において RPMI / BSA 培地中に再懸濁させた。次に、この細胞懸濁液 50 μ l を、上記チャンバーに添加した。チャンバーを 37 で 5% CO₂ 加湿雰囲気中で 45 分間インキュベートした。このインキュベーション期間の後、上記フィルターを除去し、その上側をスクレーピングして、非転移性細胞を取り除き、そして上記フィルターを Diff-Quik 染色を用いて染色した (Dade Behring AG, Dudingen, Switzerland)。転移性細胞の数 (フィルターの底) を光学顕微鏡によりカウントした。次に 3 つの高力場の平均を測定した。転移性細胞の数を、アゴニストを含有しないウェル内の高力場当りの細胞数から、上記の数を引くことにより計算した。全ての化合物を Sigma - RBI から購入した。

【0280】(a) ヒト・エオシン好性白血球の走化性に対する、ヒスタミン・レセプター・サブタイプ選択的アゴニストの効果

ヒスタミンに対するエオシン好性白血球の走化性応答に関係するヒスタミン・レセプター・サブタイプを特徴付けるための実験を行った。方法は先に詳細したものであった。テストされた化合物は: ヒスタミン・ジヒドロクロリド (非選択的ヒスタミン・レセプター・アゴニスト)、ヒスタミン遊離塩基、HTMT ジマレート (ヒスタミン H1 アゴニスト)、ディマプリット (Dimaprit) (ヒスタミン H2 アゴニスト)、及びイメティット (Imetit) (ヒスタミン H3 アゴニスト) であった。エオタキシン (Eotaxin) が、エオシン好性白血球の走化性のためのポジティブ・コントロールとして含まれた。プリマミド (Burimamide) が、上記試験に含まれた。なぜなら、先の Raible et al. は、単離されたヒト・エオシン好性白血球内での細胞内 Ca²⁺ 生成に対する上記化合物の部分的アゴニスト効果について記載していたから

である (Raible D.G. et al (1994) Pharmacological Characterisation of a novel histamine receptor on human eosinophils, Am J Respir Crit Care Med, 149, PP 1506-1511)。結果を図9に示す。非選択的ヒスタミン・レセプター・アゴニスト、ヒスタミン・ジヒドロクロリドだけが、インビトロ・アッセイにおいて、単離されたヒト・エオシン好性白血球からの、有意な走化性応答を誘導した。H2アゴニスト、ディマプリット、及びH3アゴニスト、イメティットとプリマミドは、走化性活性を全く示さなかったが、H1アゴニスト、HTMT 10は、テストされた最高濃度(1 μ M)においてのみ、ひじょうに弱い走化性応答を示した。

(b)ヒト・エオシン好性ヒスタミン誘導走行性に対する、ヒスタミン・レセプター・サブタイプ選択的アンタゴニストの効果

【0281】アンタゴニスト実験を、ヒスタミンに対するエオシン好性白血球の走化性に関係するヒスタミン・レセプター・サブタイプをさらに特徴付けるために行った。方法は先に詳述したものであった。但し、IL-5を走化性試験のために上記エオシン好性白血球をプライム 20 するために使用した。なぜなら、これは、ヒスタミンに対する走化性応答を高めることが示されていたからである(図10参照)。アンタゴニストを、10 μ Mの単一濃度で使用した。テストされたアンタゴニストは、メピラミン・マレエート(mepyramine maleate)(ヒスタミンH1アンタゴニスト)、シメチジン(cimetidine)(ヒ

スタミンH2アンタゴニスト)、チオペラミド(thio p eramide)(ヒスタミンH3アンタゴニスト)、及びクロベンプロピット(clobenpropit)(ヒスタミンH3アンタゴニスト)であった。図10Bに示す結果は、2つのH3アンタゴニスト、チオペラミドとクロベンプロピットが、ヒスタミン・ジヒドロクロリドに対する単離ヒト・エオシン好性白血球の走化性応答の低下に対する最高の効果をもっていたことを示している。

【0282】(c)単離されたヒト・エオシン好性白血球のインビトロ走化性を阻害するためのヒスタミンH3レセプター・アンタゴニストのIC₅₀の測定
単離されたヒト・エオシン好性白血球のインビトロ走化性を阻害するための両チオペラミドとクロベンプロピット(ヒスタミンH3アンタゴニスト)のIC₅₀を測定するために、さらなる実験を行った。方法は、10 μ M, 1 μ M、及び0.1 μ Mの濃度においてチオペラミドとクロベンプロピットを使用した、先のようなものであった(アゴニストとして、ヒスタミンを30nMにおいて使用した)。図12に示す予備的結果は、クロベンプロピットとチオペラミドが、それぞれ、1.5 μ Mと0.83 μ MにIC₅₀ 50 をもって、ヒト・エオシン好性白血球のヒスタミン誘導走化性をアンタゴナイズすることを示している。前記は例としてのみ示したものであって、詳細の修正は、本発明の範囲を逸脱しない限り成され得る。

【0283】

【表4】

82
SEQUENCE LISTING

(which forms part of the description)

SEQ ID NO: 1

Nucleotide sequence coding for PFI-013

ATGCCAGATACTAATAGCACAAATCAATTTATCCTAAGCACTCGTGTACTTTAGCA
 TTTTTTATGTCCTTAGTAGCTTTTGCCTATAATGCTAGGAAATGCTTTGGTCATTTTA
 GCTTTTGTGGTGGACAAAACCTTAGACATCGAAGTAGTTATTTTTTTCTTAACCTG
 GCCATCTCTGACTTCTTTGTGGGTGTGATCTCCATTCCTTTGTACATCCCTCACAGG
 CTGTTTGAATGGGATTTTGGAAAGGAATCTGTGTATTTTGGCTCACTACTGACTAT
 CTGTTATGTACAGCATCTGTATATAACATGTCTTCATCAGCTATGATCGATACCTG
 TCAGTCTCAAAATGCTGTGTCTTATAGAACTCAACATACTGGGGTCTTGAAGATTGTT
 ACTCTGATGATGGCCGTTTGGGTGCTGGCCTTCTTAGTGAATGGGCCAATGATTCTA
 GTTTCAGACTCTTGAAGGATGAAGGTAGTGAATGTGAACCTGGATTTTTTTCGGAA
 TGGTACATCCTTGCCATCACATCATTCTTGGAAATCGTGATCCCAGTCATCTTAGTC
 GCTTATTTCAACATGAATATTTATTGGAGCCTGTGGAGCGTGATCATCTCAGTAGG
 TGCCAAAGCCATCCTGGACTGACTGCTGTCTCTTCCAACATCTGTGGACACTCATT
 AGAGGTAGACTATCTTCAAGGAGATCTCTTTCTGCATCGACAGAAGTTCCTGCATCC
 TTTCAATCAGAGAGACAGAGGAGAAAGAGTAGTCTCATGTTTTTCTCAAGAACCAAG
 ATGAATAGCAATACAATTGCTTCCAAAATGGGTTCCTTCTCCCAATCAGATTCTGTA
 GCTCTTCAACAAAGGGAACATGTTGAACCTGCTTAGAGCCAGGAGATTAGCCAAAGTCA
 CTGGCCATTCTTAGGGGTTTTTGTGTTTGGCTGGGCTCCATATCTCTGTTCACA
 ATTGTCTTTCAATTTTATTCCTCAGCAACAGGTCCTAAATCAGTTTGGTATAGAATT
 GCATTTGGCTTCAGTGGTTCAATTCCTTTGTCAATCCTCTTTTGTATCCATTGTGT
 CACAAGCGCTTTCAAAGGCTTCTTGAAAATATTTGTATAAAAAGCAACCTCTA
 CCATCACAAACACAGTCCGGTCAGTATCTTCTTAA

【0284】

【表5】

SEQ ID NO: 2

83

Amino acid sequence coding for PFI-013

MPDTNSTINLSLSTRVTLAFEMSLVAFAIMLGNALVILAFVVDKDLRHRSSYFFLNL
AISDFFVGVISIPLYIPIHTLEWDFGKEICVFWLTDOYLLCTASVYNIVLISYDRYL
SVSNVAVSYRTQHTGVLKIVTLMVAVWVLAFLVNGPMILVSESWKDEGSECEPGFFSE
WYILAITSELEFVIPVILVAYFNMNIYWSLWKRDLHLSRCQSHFGLTAVSSNICGHSF
RGRLSRRRSLASSTVPAFHSERQRKSSLMFSSRTKMNSNTIASKMGSFSQSDSV
ALHQREHVELLRARLAKSLAILLGVFAVCWAPYSLFTIVLSFYSSATGPKSVWYRI
AFWLQWFNSFVNPLLYPLCHRFQKAFKIFCIKKQPLPSQHSRSVSS*

SEQ ID NO: 3

ACCATGCCAGATACTAATAGCACAAATC

SEQ ID NO: 4

TTAAGAAAGATACTGACCGACTGTG

SEQ ID NO: 5

GGGCAAGATAAAGGGCAGACCAGAT

【0285】

【表6】

SEQ ID NO: 6

【0286】

TCCTTCTCCCAATCAGATTCTGTAGC

【配列表】

SEQ ID NO: 7

GTATCCATTGTGTCACAAGCGC

SEQ ID NO: 8

AATATTTTATTGGAGCCTGTGGAA

SEQ ID NO: 9

GGAAGAGACAGCAGTCAGTCCA

SEQ ID NO: 10

ACACAAAGGATATCAGCGAAAGGCAAGCC

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Limited (EP (GB) on
ly), Pfizer Inc. (EP except GB / US / JP

)

<120> Novel Polypeptide

<130> PCS10373APME

<140> B007084

<141> 2000-10-27

<150> 9925641.4

<151> 1999-10-29

<150> 0009973.9

<151> 2000-04-20

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Versi

on 4.0

<210> 1

<211> 1173

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgccagata ctaatgacac aatcaattta tcac

taagca ctcgtgttac tttagcattt 60

tttatgtcct tagtagcttt tgctataatg ctag

gaaatg ctttggatcat tttagctttt 120

gtggtggaca aaaaccttag acatcgaagt agtt

atTTTT ttcttaactt ggccatctct 180

tcttatagaa ctcaacatac tggggtcttg aaga
 ttgtta ctctgatggg gcccgtttg 420
 gtgctggcct tcttagtgaa tgggccaatg attc
 tagttt cagagtcttg gaaggatgaa 480
 ggtagtgaat gtgaacctgg attttttcg gaat
 ggtaca tccttgccat cacatcattc 540
 ttggaattcg tgatcccagt catcttagtc gctt
 atttca acatgaatat ttattggagc 600
 ctgtggaagc gtgatcatct cagtaggtgc caaa
 gccatc ctggactgac tgctgtctct 660
 tccaacatct gtggacactc attcagaggt agac
 tatctt caaggagatc tctttctgca 720
 tcgacagaag ttcctgcatc ctttcattca gaga
 gacaga ggagaaagag tagtctcatg 780
 ttttctcaa gaaccaagat gaatagcaat acaa
 ttgctt ccaaaatggg ttccttctcc 840
 caatcagatt ctgtagctct tcaccaagag gaac
 atgttg aactgcttag agccaggaga 900
 ttagccaagt cactggccat tctcttaggg gttt
 ttgctg tttgctgggc tccatattct 960
 ctgttcacaa ttgtcctttc atttatttcc tcag
 caacag gtccataatc agtttggtat 1020
 agaattgcat tttggcttca gtggttcaat tctt
 ttgtca atcctctttt gtatccattg 1080
 tgtcacaagc gctttcaaaa ggctttcttg aaaa
 tatttt gtataaaaaa gcaacctcta 1140
 ccatcacaac acagtcgggc agtatcttct taa
 1173

<210> 2

<211> 390

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Asp Thr Asn Ser Thr Ile Asn Leu

Ser Leu Ser Thr Arg Val

1 5 10 15

Thr Leu Ala Phe Phe Met Ser Leu Val Ala

Phe Ala Ile Met Leu Gly

20 25 30

Asn Ala Leu Val Ile Leu Ala Phe Val Val

Asp Lys Asn Leu Arg His

35 40 45

Arg Ser Ser Tyr Phe Phe Leu Asn Leu Ala

Ile Ser Asp Phe Phe Val

50 55 60

Gly Val Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Ile Pro

His Thr Leu Phe Glu Trp

65 70 75 80

Asp Phe Gly Lys Glu Ile Cys Val Phe Trp

Leu Thr Thr Asp Tyr Leu

85 90 95

Leu Cys Thr Ala Ser Val Tyr Asn Ile Val

245 250 255
 Ser Ser Leu Met Phe Ser Ser Arg Thr Lys
 Met Asn Ser Asn Thr Ile
 260 265 270
 Ala Ser Lys Met Gly Ser Phe Ser Gln Ser
 Asp Ser Val Ala Leu His
 275 280 285
 Gln Arg Glu His Val Glu Leu Leu Arg Ala
 Arg Arg Leu Ala Lys Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ile Leu Leu Gly Val Phe Ala Val
 Cys Trp Ala Pro Tyr Ser
 305 310 315 3
 20
 Leu Phe Thr Ile Val Leu Ser Phe Tyr Ser
 Ser Ala Thr Gly Pro Lys
 325 330 335
 Ser Val Trp Tyr Arg Ile Ala Phe Trp Leu
 Gln Trp Phe Asn Ser Phe
 340 345 350
 Val Asn Pro Leu Leu Tyr Pro Leu Cys His
 Lys Arg Phe Gln Lys Ala
 355 360 365
 Phe Leu Lys Ile Phe Cys Ile Lys Lys Gln
 Pro Leu Pro Ser Gln His
 370 375 380
 Ser Arg Ser Val Ser Ser
 385 390
 <210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 accatgccag atactaatag cacaatc
 27
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 ttaagaagat actgaccgac tgtg
 24
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 gggcaagata aagggcagac cagat
 25
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 8
aatattttat tggagcctgt ggaa
                                24

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9
ggaagagaca gcagtcagtc ca
                                22

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

【図面の簡単な説明】400> 10

【図1】PFI-013の生物情報分析に関する模式図を示す (db = データベース)。 29

【図2】ヒト・ヒスタミンH3レセプターとのPFI-013のClustal W整列を示す(アミノ酸残基の間の垂直線(1)は同一であることを示し;アミノ酸残基の間のコロ印(:)は保存的置換を示す)。

【図3】PFI-013遺伝子とヒト・ヒスタミンH3レセプター遺伝子のゲノム構造を概略的に示す(“直方形ブロック” = エクソン; = イントロン; 上記“直方形ブロック”の真下の数字は(1)ヒトH3ダイアグラムについて、アミノ酸残基、そして(2)PFI-013ダイアグラムについての、コンティグ内の塩基対、を示す)。

【図4】図4は、PFI-013mRNAの組織分布を示す、ノーザン・プロットを示す。

【図5】図5は、Tagman(商標)による各種組織からのmRNAの定量的PCR分析の結果を示す(PB白血球 = 末梢血白血球; Sm. Intetine = 小腸; Skel. Muscle = 骨格筋)。

【図6】図6は、PFI-013トランスフェクトされた細胞の膜及び擬似トランスフェクトされた細胞の膜に結合した放射性³H-ヒスタミンにおける差異として表された、フィルター・リガンド結合性アッセイの結果を示す(CPM = 放射能のカウント数/分; [Ligand] = nMにおける³H-ヒスタミンの濃度)。

【図7】(図7は、蛍光-ベースの機能アッセイ(FLI PR(商標))におけるヒスタミンによるPFI-013発現性HEK293細胞の活性化を示す。図7Aは、PFI-013発現構築物によりトランスフェクトされた(G15を発現する)HEK293細胞に対するヒスタミンの効果を 30示す、細胞-ベースのアッセイを示す。図7Bは、同一の細胞ベースのアッセイを示すが、ベクターだけによりトランスフェクトされた(G15を発現する)HEK29

3細胞に対するヒスタミンの効果を示す。四角形内のピークは、対応ウェル内の細胞内カルシウム濃度における一時的増加を示し、そしてそれ故、対応の処理から生じる細胞による機能的応答を示す。

【図8】図8は、蛍光-ベースの機能的アッセイ(FLI PR(商標))における各種ヒスタミン・アゴニスト(ヒスタミン作動性リガンド)によるPFI-013発現性HEK293細胞の活性化を示す。図8Aは、PFI-013発現構築物によりトランスフェクトされた(G15を発現する)HEK293細胞に対するヒスタミンの効果を示す、細胞ベースのアッセイを示す。図8Bは、同一の細胞ベースのアッセイを示すが、ベクターだけによりトランスフェクトされた(G15を発現する)HEK293細胞に対するヒスタミン・アゴニストの効果を示す。四角形内のピークは、対応のウェル内の細胞内カルシウム濃度における一時的増加を示し、そしてそれ故、対応の処理から生じた細胞による機能的応答を示す。

【図9】図9は、各種ヒスタミン・レセプター・サブタイプ選択的アゴニストを用いた、ヒト・エオシン好性白血球の走化性アッセイの結果を示す。

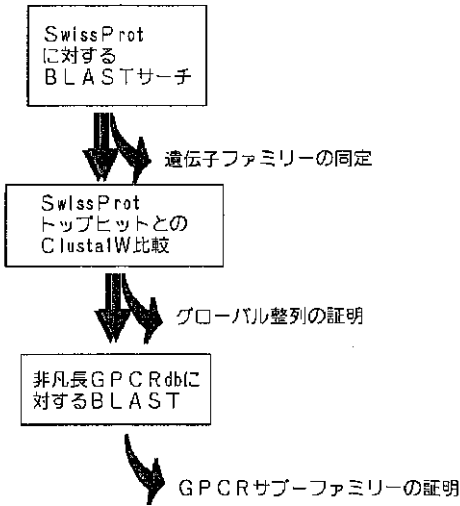
【図10】図10~12は、ヒスタミン誘導ヒト・エオシン好性白血球の走化性に対する各種ヒスタミン・レセプター・サブタイプ選択的アンタゴニストの効果を示す。図10は、ヒスタミン誘導エオシン好性白血球走化性及びエオシン好性白血球のインターロイキン-5(IL-5)前処理の増強効果を示す。

【図11】図11は、各種ヒスタミン・アンタゴニスト(CPD = 化合物)によるヒスタミン誘導走化性の阻害を示す。

【図12】図12は、ヒスタミン誘導エオシン好性白血球の走化性に対する2つのヒスタミン・アンタゴニストの投与量-応答曲線を示す。

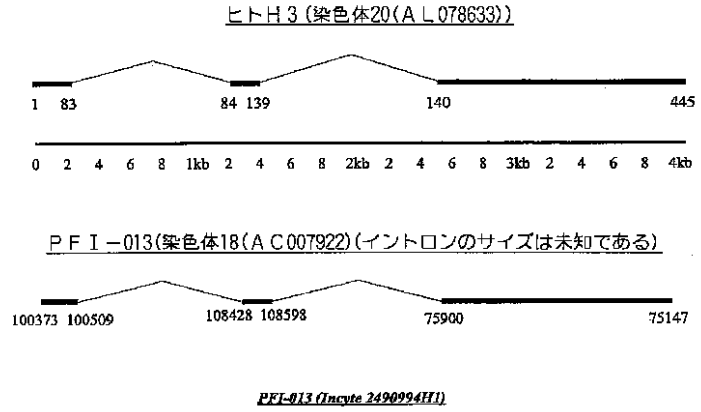
【図1】

図1

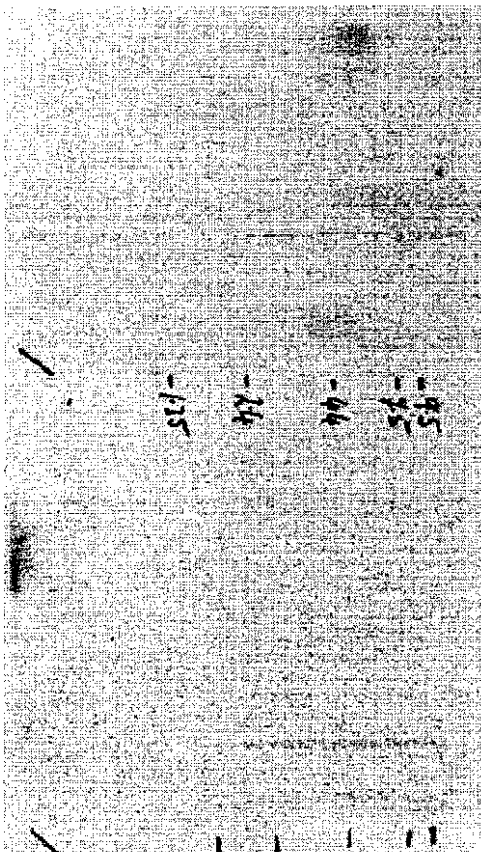


【図3】

図3



【図4】



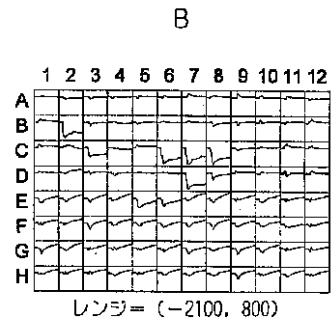
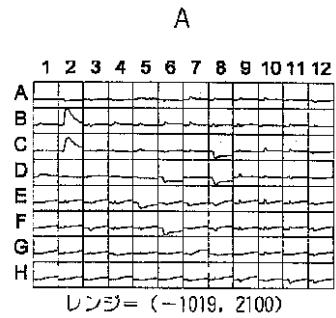
PBLs
 結腸
 小腸
 卵巢
 精巣
 胎盤
 胸腺
 脾臓

脾臓
 腎臓
 骨格筋
 肝臓
 肺
 胎盤
 脳
 心臓

【図7】

図7

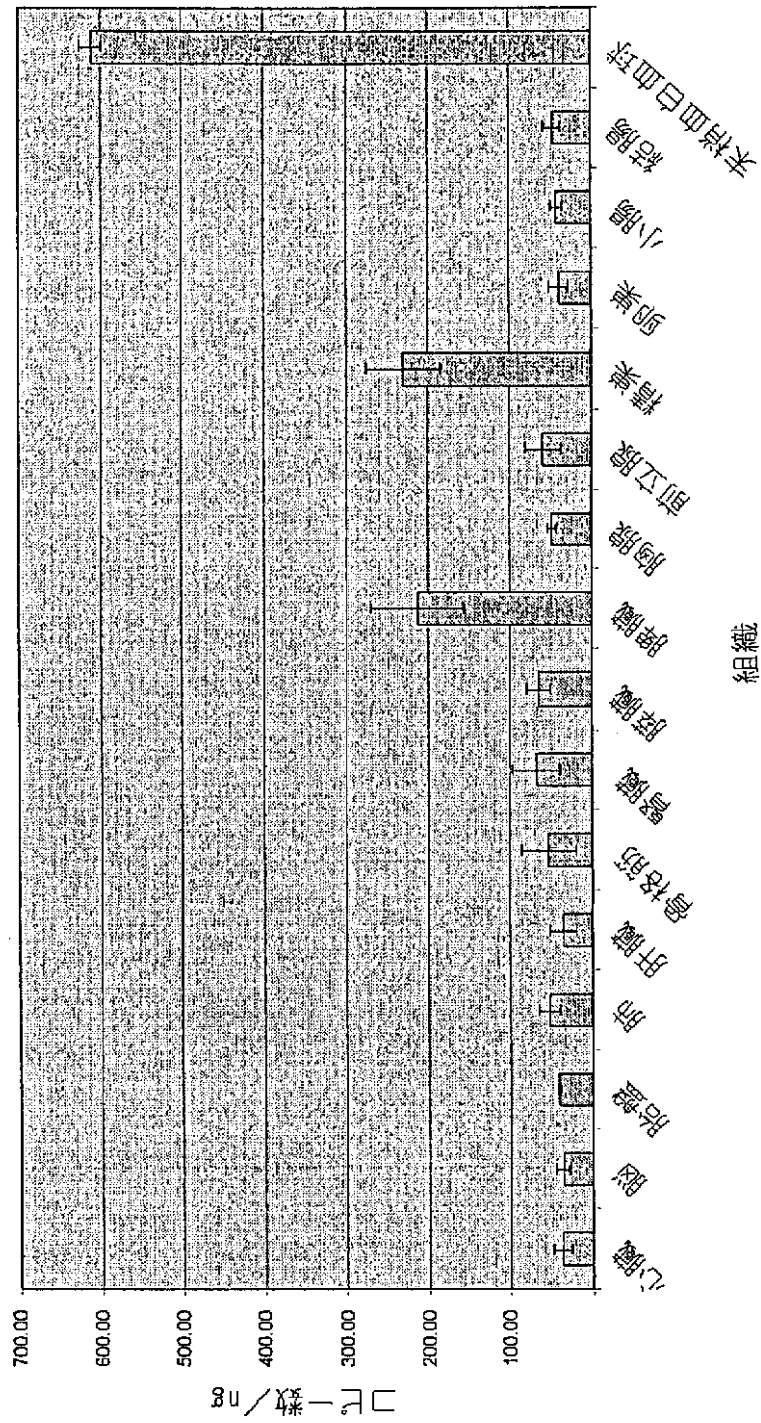
図4



【図5】

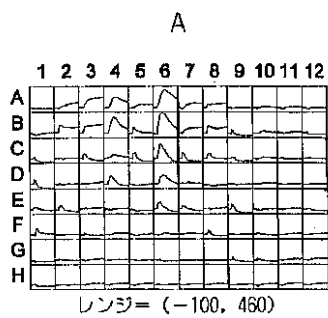
図 5

PFI-013発現パターン

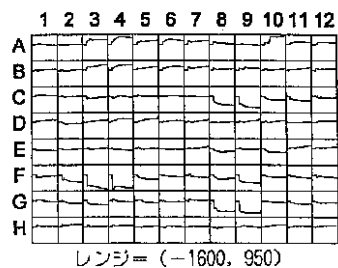


【図8】

図8

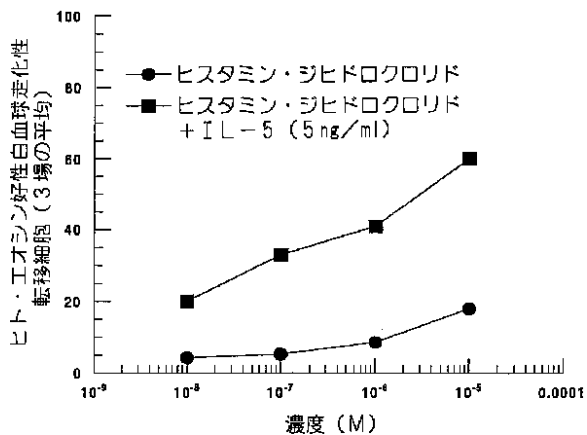


B



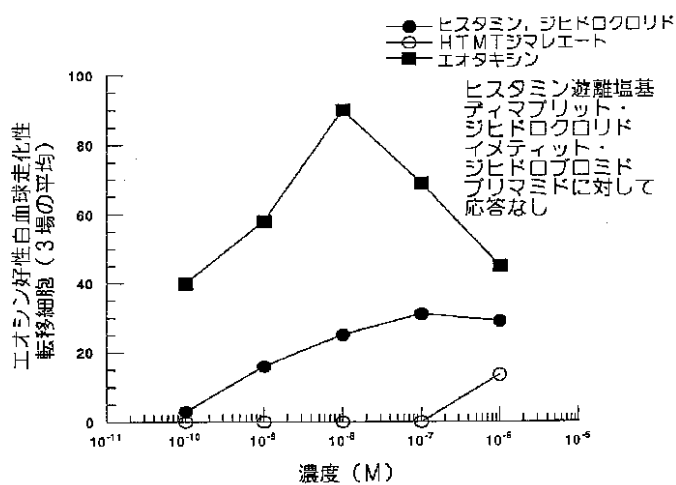
【図10】

図10



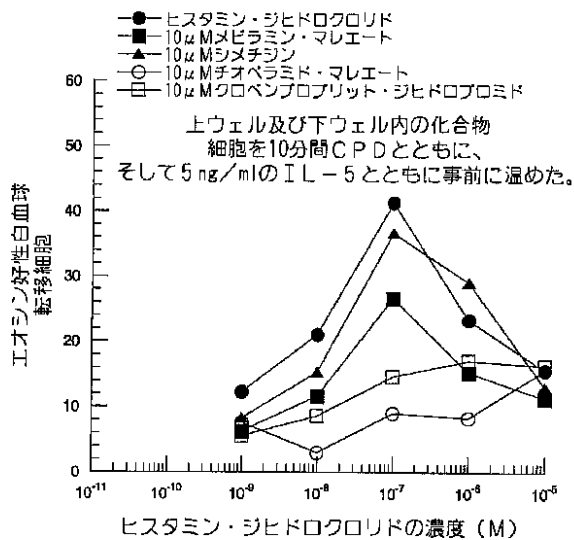
【図9】

図9

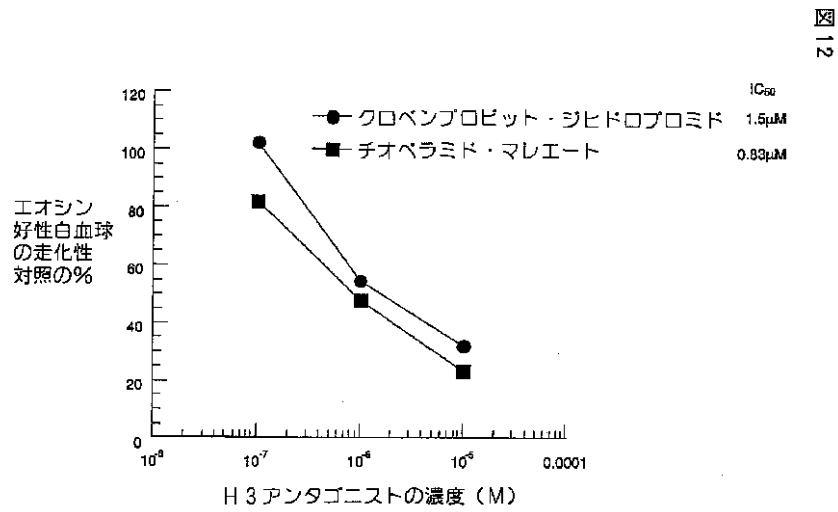


【図11】

図11



【図12】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 P 1/04		A 6 1 P 11/06	
	11/00	29/00	
	11/06	31/00	
	29/00	35/00	
	31/00	37/02	
	35/00	37/08	
	37/02	C 0 7 K 14/00	
	37/08	14/705	
C 0 7 K 14/00		16/28	
	14/705	C 1 2 N 1/15	
	16/28	1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
	1/19	9/00	
	1/21	C 1 2 P 21/02	C
	5/10	C 1 2 Q 1/02	
	9/00	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02		33/50	Z
C 1 2 Q 1/02		33/53	D
G 0 1 N 33/15		C 1 2 P 21/08	
	33/50	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 マーク アンソニー オレイリー
 イギリス国, シーティ-13 9エヌジェ
 イ, ケント, サンドウィッチ, ラムズゲイ
 ト ロード, ファイザー グローバル リ
 サーチ アンド ディベロップメント

【外国語明細書】

1. Claims

1. An isolated and/or purified polynucleotide comprising one or more of:
 - (a) a polynucleotide encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2;
 - (b) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1;
 - (c) a polynucleotide encoding the polypeptide expressed by the DNA contained in NCIMB 41073;
 - (d) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 70% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c);
 - (e) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is capable of hybridising to the polynucleotide of any one of (a) to (d);
 - (f) a complement to the polynucleotide of any one of (a) to (e); or
 - (g) a polynucleotide fragment of the polynucleotide of any one of (a) to (f).
2. The polynucleotide of claim 1, comprising a nucleotide sequence that has at least 75% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c).
3. The polynucleotide of claim 1, comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c).
4. The polynucleotide of claim 1, comprising a nucleotide sequence that has at least 85% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c).
5. The polynucleotide of claim 1, comprising a nucleotide sequence that has at least 90% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c).
6. The polynucleotide of claim 1, comprising a nucleotide sequence that has at least 95% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c).
7. The polynucleotide of any one of the preceding claims which encodes a G-protein coupled receptor (GPCR).

8. A polynucleotide probe or primer comprising at least 15 contiguous nucleotides of the polynucleotide of any one of the preceding claims.
9. A vector comprising the polynucleotide of any one of the preceding claims.
10. A host cell transformed or transfected with the vector of claim 9.
11. The transformed/transfected host cell of claim 10 which is a mammalian, insect, fungal, bacterial or yeast cell.
12. The transcribed RNA product of the polynucleotide of any one of claims 1 to 8.
13. An RNA molecule or a fragment thereof which is antisense in relation to the RNA product of claim 12 and is capable of hybridising thereto.
14. A ribozyme or zinc finger protein capable of binding to the polynucleotide of any one of claims 1 to 8.
15. A process for producing a polypeptide or fragment thereof comprising culturing the transformed/transfected host cell of claim 10 or claim 11 under conditions sufficient for the expression of said polypeptide or fragment.
16. The process of claim 15, wherein said polypeptide or fragment is expressed at the surface of said cell.
17. The process of claim 15 or claim 16 which further includes recovering the polypeptide or fragment from the culture.
18. A process for producing cells capable of expressing a polypeptide or fragment thereof comprising transforming or transfecting cells with the vector of claim 9.

19. Cells produced by the process of claim 18.
20. A membrane preparation of the cells of claim 19.
21. A polypeptide or a fragment thereof produced by the process of any one of claims 15 to 18.
22. A polypeptide comprising:
 - (a) a polypeptide having the deduced amino acid sequence translated from the polynucleotide sequence in SEQ ID NO: 1 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof;
 - (b) a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; or
 - (c) a polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41073 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof.
23. An antibody against the polypeptide of claim 22.
24. A compound which modulates the polypeptide of claim 22.
25. A compound according to claim 24 which antagonises or selectively antagonises the polypeptide of claim 22.
26. A compound according to claim 24 which agonises the polypeptide of claim 22.
27. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 23 or the compound of any one of claims 24 to 26 and one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents, adjuvants or excipients.

28. A method for identifying a compound which binds to and modulates the polypeptide of claim 22 comprising contacting said polypeptide with a candidate compound and determining whether modulation occurs.
29. A method according to claim 28, which comprises:
- (a) contacting a compound with cells expressing the polypeptide of claim 22 on their surface, said polypeptide being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said polypeptide; said contacting being under conditions sufficient to permit binding of compounds to the polypeptide; and
 - (b) identifying a compound capable of polypeptide binding by detecting the signal produced by said second component.
30. A method according to claim 29, which comprises:
- (a) contacting (i) a detectable first component known to bind to the polypeptide of claim 22 and (ii) a compound, with cells expressing the polypeptide of claim 22 on their cell surface, said polypeptide being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said polypeptide; said contacting being under conditions sufficient to permit binding of compounds to the polypeptide; and
 - (b) determining whether the first component binds to the polypeptide by detecting the absence or otherwise of a signal generated from the interaction of the first component with the polypeptide.
31. A method according to any one of claims 28 to 30, wherein said compound binds to and antagonises or selectively antagonises the polypeptide of claim 22.

32. A method according to any one of claims 28 to 30, wherein said compound binds to and agonises the polypeptide of claim 22.
33. The antibody of claim 23, the compound of any one of claims 24 to 26, or the composition of claim 27 for use as a pharmaceutical.
34. Use of the compound of any one of claims 24 to 26 in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide of claim 22.
35. Use according to claim 34, in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide of claim 22.
36. Use according to claim 34, in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide of claim 22.
37. A pharmaceutical composition for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide of claim 22 comprising a therapeutically effective amount of the compound of any one of claims 24 to 26.
38. The pharmaceutical composition according to claim 37, wherein it is for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide of claim 22.
39. The pharmaceutical composition according to claim 37, wherein it is for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide of claim 22.
40. The pharmaceutical composition according to any one of claims 37 to 39, wherein said compound is a polypeptide and a therapeutically effective amount of the compound is administered by providing to the patient DNA encoding said compound and expressing said compound *in vivo*.

41. Use of the antibody of claim 23 in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide of claim 22.
42. Use according to claim 41, in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide of claim 22.
43. Use according to claim 41, in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide of claim 22.
44. A pharmaceutical composition for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide of claim 22, comprising a therapeutically effective amount of the antibody of claim 23.
45. The pharmaceutical composition according to claim 44, wherein it is for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide of claim 22.
46. The pharmaceutical composition according to claim 44, wherein it is for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide of claim 22.
47. Use of the compound of any one of claims 24 to 26 in the manufacture of a medicament for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases.
48. Use according to claim 47, wherein said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.

49. Use of the antibody according to claim 23 in the manufacture of a medicament for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases.
50. Use according to claim 49, wherein said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.
51. A pharmaceutical composition for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases, in a patient comprising a therapeutically effective amount of the compound of any one of claims 24 to 26.
52. The pharmaceutical composition according to claim 51, wherein said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.
53. A pharmaceutical composition for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases, in a patient comprising a therapeutically effective amount of the antibody of claim 23.
54. The pharmaceutical composition according to claim 53, wherein said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.
55. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to claim 23 for the enrichment of eosinophils from mammalian blood.

56. The pharmaceutical composition according to claim 55, wherein said blood is human blood.
57. Cells genetically engineered *ex vivo* or *in vivo* to express, overexpress, underexpress or to exhibit targeted insertion or deletion of the polypeptide of claim 22.

2. Detailed Description of the Invention

Technical field

The present invention relates to a novel polynucleotide sequence which encodes a novel polypeptide belonging to the class of proteins known as G-protein coupled receptors (GPCRs). The present invention also relates, *inter alia*, to processes for producing the polypeptide and its uses.

Background of the invention

Cells and tissues respond to a wide variety of extracellular signalling molecules through the interaction of these molecules with specific cell-surface receptors. One such class of receptors are known as G-protein coupled receptors (GPCRs) and these are characterised by containing a series of 7 hydrophobic transmembrane segments. Upon binding an extracellular ligand to its receptor, intracellular signals are initiated via interactions with heterotrimeric G proteins which, in turn, can lead to a number of different intracellular events depending upon which receptor has been activated. For example some GPCRs influence adenylyl cyclase activity whereas others act via phospholipase C.

Members of the GPCR superfamily respond to a wide variety of ligands including small molecule amines (such as serotonin, dopamine, acetylcholine), lipid-derived mediators (such as LpA), amino acid derivatives (such as glutamate) and neurotransmitter peptides and hormones (such as neurokinin, galanin, glucagon, gastrin). Although GPCRs are activated by a broad range of ligands, it should be noted that individual GPCRs have a small and very specific repertoire of ligands. Based upon an analysis of the primary structure of a novel GPCR, it is now possible to classify them into specific sub-families, thereby narrowing the range of potential ligands.

In many cases, the endogenous ligands of GPCRs are relatively small, enabling them to be mimicked or blocked by synthetic analogues. For example drugs such as prazosin, doxazosin, cimetidine, ranitidine are all effective antagonists of their respective target GPCRs.

Thus, as the modulation of GPCRs can have therapeutic consequences, there is a continued need to provide new GPCRs and their associated agonists and antagonists.

Summary aspects of the invention

In a broad aspect, the present invention relates to novel amino acid sequences. In this regard, a specific novel amino acid sequence has been isolated and it is to be understood that the invention covers that sequence as well as novel variants, fragments, derivatives and homologues thereof.

In another broad aspect, the present invention relates to novel nucleic acid sequences. In this regard, a specific novel nucleic acid sequence has been isolated and it is to be understood that the invention covers that sequence as well as novel variants, fragments, derivatives and homologues thereof.

Thus, in brief, some aspects of the present invention relate to:

1. Novel amino acids.
2. Novel nucleotide sequences.
3. Assays using said novel sequences.
4. Compounds/compositions identified by use of said assays.
5. Expression systems comprising or expressing said novel sequences.
6. Methods of treatment based on said novel sequences.
7. Pharmaceutical compositions based on said novel sequences.

Other aspects concerning the amino acid sequence of the present invention and/or the nucleotide sequence of the present invention include: a construct comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a vector comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a plasmid comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a cell transfected or virally-transduced with a construct/vector/plasmid comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a tissue comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; an organ comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a transformed host comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; and a transformed organism comprising or capable of expressing the sequences of the present invention. The present invention also encompasses methods of expressing the same, such as expression in a micro-organism; including methods for transferring the same.

For ease of reference, aspects of the present invention are now discussed under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

In the following commentary references to "nucleotide sequence of the present invention" and "amino acid sequence of the present invention" refer respectively to any one or more of the nucleotide sequences presented or discussed herein and to any one or more of the amino acid sequences presented or discussed herein. Also, and as used herein, "amino acid sequence" refers to peptide or protein sequences and may refer to portions thereof. In addition, the term "amino acid sequence of the present invention" is synonymous with the phrase "polypeptide sequence of the present invention". Also, the term "nucleotide sequence of the present invention" is synonymous with the phrase "polynucleotide sequence of the present invention".

Detailed aspects of the invention

According to one aspect of the present invention, there is provided an isolated and/or purified polynucleotide comprising one or more of:

- (a) a polynucleotide encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2;
- (b) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1;
- (c) a polynucleotide encoding the polypeptide expressed by the DNA contained in NCIMB 41073;
- (d) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 70% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c);
- (e) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is capable of hybridising to the polynucleotide of any one of (a) to (d);
- (f) a complement to the polynucleotide of any one of (a) to (e); or
- (g) a polynucleotide fragment of the polynucleotide of any one of (a) to (f).

Preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 75% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c). More preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 80% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c). Even more preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 85% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c). Yet more preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 90% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c). More preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 95% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c). Most preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 98% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c).

The polynucleotide described above preferably encodes a G-protein coupled receptor (GPCR).

The present invention also provides a polynucleotide probe or primer comprising at least 15 contiguous nucleotides of the polynucleotide described above.

The present invention yet further provides a vector comprising the polynucleotide described above.

According to a further aspect of the present invention, there is provided a host cell transformed or transfected with the vector described above. Preferably, the host cell is a mammalian, insect, fungal, bacterial or yeast cell.

According to a further aspect of the present invention, there is provided the transcribed RNA product of the polynucleotide described above. There is also provided an RNA molecule or a fragment thereof which is antisense in relation to the RNA product and is capable of hybridising thereto.

There is yet further provided a ribozyme or zinc finger protein capable of binding to the polynucleotide described above.

According to yet a further aspect of the present invention, there is provided a process for producing a polypeptide or fragment thereof comprising culturing said host cell under conditions sufficient for the expression of said polypeptide or fragment. Preferably, said polypeptide or fragment is expressed at the surface of said cell. The process preferably further includes recovering the polypeptide or fragment from the culture.

There is also provided by the present invention a process for producing cells capable of expressing a polypeptide or fragment thereof comprising transforming or transfecting cells with the vector described above.

According to a further embodiment of the present invention, there are provided cells produced by the process described above. There is also provided a membrane preparation of said cells.

According to another aspect of the present invention, there is provided a polypeptide comprising:

- (a) a polypeptide having the deduced amino acid sequence translated from the polynucleotide sequence in SEQ ID NO: 1 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof;
- (b) a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; or
- (c) a polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41073 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof.

There is also provided by the present invention an antibody against the polypeptide described above.

The present invention yet further provides a compound, which modulates the polypeptide described above. Preferably, the compound antagonises or selectively antagonises the polypeptide. Alternatively, the compound agonises the polypeptide.

Also provided by the present invention is a pharmaceutical composition comprising the antibody or compound described above and one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents, adjuvants or excipients.

According to another aspect of the present invention, there is provided a method for identifying a compound, which binds to and modulates the polypeptide described above comprising contacting said polypeptide with a candidate compound and determining whether modulation occurs.

Preferably, said method comprises:

- (a) contacting a compound with cells expressing the polypeptide described above on their cell surface, said polypeptide being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to

the binding of a compound to said polypeptide; said contacting being under conditions sufficient to permit binding of compounds to the polypeptide; and

- (b) identifying a compound capable of polypeptide binding by detecting the signal produced by said second component.

Alternatively, said method comprises:

- (a) contacting (i) a detectable first component known to bind to the polypeptide described above and (ii) a compound, with cells expressing the above polypeptide on their cell surface, said polypeptide being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said polypeptide; said contacting being under conditions sufficient to permit binding of compounds to the polypeptide; and
- (b) determining whether the first component binds to the polypeptide by detecting the absence or otherwise of a signal generated from the interaction of the first component with the polypeptide.

The compound identified by any of the above methods preferably binds to and (i) antagonises or selectively antagonises the polypeptide described above, or (ii) agonises the polypeptide described above.

As GPCRs are involved in signal transduction, modulators (e.g. agonists or antagonists) of the polypeptide of the present invention can find use in interfering in the signal transduction process.

Therefore, according to yet another embodiment of the present invention, there is provided the antibody, compound or composition described above for use as a pharmaceutical.

Such antibodies, compounds and compositions, which can modulate the polypeptide of the present invention, can therefore find use in the therapeutic areas which concern aspects of signal transduction. Therapeutically usefully areas include, but are not limited to, obesity, diabetes and metabolic disease, neurological disease, psychotherapeutics, urogenital disease, reproduction and sexual medicine, inflammation, cancer, tissue repair, dermatology, skin pigmentation, photoageing, frailty, osteoporosis, cardiovascular disease, gastrointestinal disease, antiinfection, allergy and respiratory disease, sensory organ disorders, sleep disorders and hairloss.

Preferred conditions for treatment with such antibodies, compounds and compositions are allergic disorders such as extrinsic asthma, rhinitis (allergic and chronic), onchocercal dermatitis, atopic dermatitis, drug reactions, and NERDS (nodules, eosinophilia, rheumatism, dermatitis and swelling); vasculitic granulomatous diseases such as temporal vasculitis, Churg-Strauss syndrome, polyarteritis, Wegner's granulomatosis, and eosinophilic granulomatous prostatitis; immunological disorders such as autoimmune reactions (e.g. multiple sclerosis), graft rejection, and intrinsic asthma; interstitial and other pulmonary diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), eosinophilic pleural effusions, transient pulmonary eosinophilic infiltrates (Loffler), histiocytosis, chronic eosinophilic pneumonia, hypersensitivity pneumonitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, and topical eosinophilia; infectious parasitic diseases such as toxocariasis, filariasis, schistosomiasis, trichinosis, strongyloides, ascariasis, and echinococcosis/cysticercosis; other infectious diseases such as acute coccidioidomycosis, cat scratch disease, afebrile tuberculosis, and chlamydial pneumonia at infancy; neoplastic and myeloproliferative diseases such as bronchogenic carcinoma, hypereosinophilic syndrome, T-cell lymphomas and Hodgkin's disease; inflammatory conditions such as inflammatory bowel diseases (e.g. ulcerative colitis, Crohn's disease) and sinusitis; as well as coeliac disease, obstructive hepatic disease and dermatitis herpetiformis.

Especially preferred for treatment with such antibodies, compounds and compositions are asthma (both extrinsic and intrinsic), COPD, and inflammatory bowel diseases.

Accordingly, there is also provided the use of the compound described above in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above. Preferably, the treatment is for a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide. Alternatively, the treatment is for a patient having need to agonise the polypeptide.

According to yet a further aspect of the invention, there is provided a method for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the above-described compound. Preferably, said method is for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide. Alternatively, said method is for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide.

Preferably, said compound is a polypeptide and a therapeutically effective amount of the compound is administered by providing to the patient DNA encoding said compound and expressing said compound *in vivo*.

There is also provided by the present invention use of the antibody described above in the manufacture of a medicament for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above. Preferably, said method is for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide. Alternatively, said method is for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide.

Yet further provided by the present invention is a method for the treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody described above. Preferably, said method is for the treatment of a patient having need to antagonise or selectively antagonise the polypeptide. Alternatively, said method is for the treatment of a patient having need to agonise the polypeptide.

According to another aspect of the present invention, there is provided use of the above described compound in the manufacture of a medicament for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases. Preferably, said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.

There is also provided by the present invention use of the antibody described above in the manufacture of a medicament for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases. Preferably, said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.

According to yet another aspect of the present invention, there is provided a method for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases, in a patient comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the compound described above. Preferably, said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.

According to further aspect of the present invention, there is also provided a method for the treatment of allergic disorders, vasculitic granulomatous diseases, immunological disorders, interstitial and other pulmonary diseases, infectious diseases, inflammatory diseases, and neoplastic and myeloproliferative diseases, in a patient comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody described above. Preferably, said allergic disorder is extrinsic asthma, said immunological

disorder is intrinsic asthma, said pulmonary disease is COPD and said inflammatory diseases are inflammatory bowel diseases.

There is also provided by the present invention the use of the above-mentioned antibody for the enrichment or isolation of eosinophils from mammalian, preferably human blood.

According to a further aspect of the present invention, there are also provided cells genetically engineered *ex vivo* or *in vivo* to express, overexpress, underexpress or to exhibit targeted insertion or deletion of the polypeptide of the present invention.

PFI-013 POLYPEPTIDE

As explained above, the present invention relates to a novel GPCR - which has been internally designated PFI-013 - and to a nucleotide sequence encoding same. The present invention also relates to the use of the novel nucleic acid and amino acid sequences in the diagnosis and treatment of disease. The present invention also relates to the use of the novel nucleic acid and amino acid sequences to evaluate and/or to screen for agents that can modulate the GPCR. The present invention further relates to genetically engineered host cells that comprise or express the novel nucleic acid and amino acid sequences to evaluate and/or to screen for agents that can modulate the GPCR.

The PFI-013 polypeptide may be the same as the naturally occurring form - for this aspect, preferably the PFI-013 polypeptide is the non-native amino acid sequence (i.e. it is not present in its natural environment) - or is a variant, homologue, fragment or derivative thereof. In addition, or in the alternative, the PFI-013 polypeptide is isolated PFI-013 polypeptide and/or purified PFI-013 polypeptide. The PFI-013 polypeptide can be obtainable from or produced by any suitable source, whether natural or not, or it may be synthetic, semi-synthetic or recombinant.

The PFI-013 coding sequence may be the same as the naturally occurring form - for this aspect, preferably the PFI-013 coding sequence is the non-native nucleotide sequence (i.e. it is not present in its natural environment) - or is a variant, homologue, fragment or derivative thereof. In addition, or in the alternative, the PFI-013 coding sequence is an isolated PFI-013 coding sequence and/or a purified PFI-013 coding sequence. The PFI-013 coding sequence can be obtainable from or produced by any suitable source, whether natural or not, or it may be synthetic, semi-synthetic or recombinant.

PFI-013 POLYPEPTIDE AND SCREENING

The PFI-013 polypeptide and/or its coding sequence and/or a sequence capable of hybridising thereto is/are useful for testing the selectivity of drug candidates between different GPCRs.

It has been demonstrated (herein) that PFI-013 is most closely similar to histamine receptors and that PFI-013 encodes a novel GPCR whose ligand is likely to be a small amine.

Drugs that modulate the novel PFI-013 receptor will therefore be likely to modulate signal transduction processes. It is therefore likely that modulators of the PFI-013 receptor may be useful for the treatment of many different disorders associated with signal transduction that will most likely include, but is not limited to, obesity, diabetes and metabolic disease, neurological disease, psychotherapeutics, urogenital disease, reproduction and sexual medicine, inflammation, cancer, tissue repair, dermatology, skin pigmentation, photoageing, frailty, osteoporosis, cardiovascular disease, gastrointestinal disease, antiinfection, allergy and respiratory disease, sensory organ disorders, sleep disorders and hairloss.

Preferred conditions for treatment with such drugs are allergic disorders such as extrinsic asthma, rhinitis (allergic and chronic), onchocercal dermatitis, atopic dermatitis, drug reactions, and NERDS (nodules, eosinophilia, rheumatism, dermatitis and swelling); vasculitic granulomatous diseases such as temporal vasculitis, Churg-

Strauss syndrome, polyarteritis, Wegner's granulomatosis, and eosinophilic granulomatous prostatitis; immunological disorders such as autoimmune reactions (e.g. multiple sclerosis), graft rejection, and intrinsic asthma; interstitial and other pulmonary diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), eosinophilic pleural effusions, transient pulmonary eosinophilic infiltrates (Löffler), histiocytosis, chronic eosinophilic pneumonia, hypersensitivity pneumonitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, and topical eosinophilia; infectious parasitic diseases such as toxocariasis, filariasis, schistosomiasis, trichinosis, strongyloides, ascariasis, and echinococcosis/cysticercosis; other infectious diseases such as acute coccidioidomycosis, cat scratch disease, afebrile tuberculosis, and chlamydial pneumonia at infancy; neoplastic and myeloproliferative diseases such as bronchogenic carcinoma, hypereosinophilic syndrome, T-cell lymphomas and Hodgkin's disease; inflammatory conditions such as inflammatory bowel diseases (e.g. ulcerative colitis, Crohn's disease) and sinusitis; as well as coeliac disease, obstructive hepatic disease and dermatitis herpetiformis.

Especially preferred conditions for treatment with such drugs are asthma (both extrinsic and intrinsic), COPD, and inflammatory bowel diseases.

Thus, the PFI-013 polypeptide and/or its coding sequence and/or a sequence capable of hybridising thereto may be useful for screening drug candidates for the treatment of diseases associated with signal transduction. In addition, it is believed that PFI-013 polypeptide and/or its coding sequence and/or a sequence capable of hybridising thereto may be useful for screening drug candidates for the treatment of diseases such as those described above.

Either or both of the nucleotide sequences coding for the PFI-013 polypeptide or the PFI-013 polypeptide itself may be used to screen for agents that can affect GPCR activity. In particular, the nucleotide sequence coding for the PFI-013 receptor itself may be used to screen for agents that can antagonise GPCR activity. In addition, the nucleotide sequence coding for PFI-013 polypeptide or the PFI-13 polypeptide itself may be used to

screen for agents that selectively affect GPCR activity, such as selectively antagonise the PFI-013 receptor.

POLYPEPTIDE OF THE PRESENT INVENTION

The term "polypeptide" - which is interchangeable with the term "protein" - includes single-chain polypeptide molecules as well as multiple-polypeptide complexes where individual constituent polypeptides are linked by covalent or non-covalent means.

Preferably, the polypeptide of the present invention is a single-chain polypeptide.

Polypeptides of the present invention may be in a substantially isolated form. It will be understood that the polypeptide may be mixed with carriers or diluents which will not interfere with the intended purpose of the polypeptide and still be regarded as substantially isolated. A polypeptide of the present invention may also be in a substantially purified form, in which case it will generally comprise the polypeptide in a preparation in which more than 90%, e.g. 95%, 98% or 99% of the polypeptide in the preparation is a polypeptide of the present invention. Polypeptides of the present invention may be modified for example by the addition of histidine residues to assist their purification.

Polypeptides of the present invention may be produced by synthetic means (e.g. as described by Geysen *et al.*, 1996) or recombinantly, as described below.

In a preferred embodiment, the amino acid sequence *per se* of the present invention does not cover the native PFI-013 receptor according to the present invention when it is in its natural environment and when it has been expressed by its native nucleotide coding sequence which is also in its natural environment and when that nucleotide sequence is under the control of its native promoter which is also in its natural environment. For ease of reference, we have called this preferred embodiment the "non-native amino acid sequence".

The terms "variant", "homologue", "fragment", "analogue" or "derivative" in relation to the amino acid sequence for the polypeptide of the present invention include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) amino acid from or to the sequence providing the resultant polypeptide has GPCR activity, preferably being at least as biologically active as the polypeptide shown in attached SEQ ID NO: 2. In particular, the term "homologue" covers homology with respect to structure and/or function. With respect to sequence homology, there is at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95% homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 2. Most preferably there is at least 98% homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 2.

Typically, for the variant, homologue or fragment of the present invention, the types of amino acid substitutions that could be made should maintain the hydrophobicity/hydrophilicity of the amino acid sequence. Amino acid substitutions may be made, for example from 1, 2 or 3 to 10, 20 or 30 substitutions provided that the modified sequence retains the ability to act as a GPCR in accordance with the present invention. Amino acid substitutions may include the use of non-naturally occurring analogues.

The amino acid sequence of the present invention may be produced by expression of a nucleotide sequence coding for same in a suitable expression system.

In addition, or in the alternative, the protein itself could be produced using chemical methods to synthesize a PFI-013 polypeptide, in whole or in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g. Creighton (1983) *Proteins Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, NY, USA). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g. the Edman degradation procedure).

Direct peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (Roberge JY *et al* Science Vol 269 1995 202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Additionally, the amino acid sequence of PFI-013, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with a sequence from other subunits, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

In another embodiment of the invention, a PFI-013 natural, modified or recombinant amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of libraries for compounds and peptide agonists and antagonists of PFI-013 GPCR activity, it may be useful to encode a chimeric PFI-013 protein expressing a heterologous epitope that is recognised by a commercially available antibody. A fusion protein may also be engineered to contain a cleavage site located between a PFI-013 sequence and the heterologous protein sequence, so that the PFI-013 may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

PFI-013 may also be expressed as a recombinant protein with one or more additional polypeptide domains added to facilitate protein purification. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilised metals (Porath J, Protein Expr Purif Vol 3 1992 p263-281), protein A domains that allow purification on immobilised immunoglobulin, and the domain utilised in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp, Seattle, WA, USA). The inclusion of a cleavable linker sequence such as Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA, USA) between the purification domain and PFI-013 is useful to facilitate purification.

A specific amino acid sequence of PFI-013 is shown in SEQ ID NO: 2. However, the present invention encompasses amino acid sequences encoding other GPCRs which would include amino acid sequences having at least 70% identity (preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least

90%, more preferably at least 95%, most preferably at least 98% identity) to that specific amino acid sequence.

Polypeptides of the present invention also include fragments of the present amino acid sequence and variants thereof. Suitable fragments will be at least 5, e.g. at least 10, 12, 15 or 20 amino acids in size.

Polypeptides of the present invention may also be modified to contain one or more (e.g. at least 2, 3, 5, or 10) substitutions, deletions or insertions, including conserved substitutions. These aspects are discussed in a later section.

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE PRESENT INVENTION

The term "nucleotide sequence" as used herein refers to an oligonucleotide sequence or polynucleotide sequence, and variants, homologues, fragments, analogues and derivatives thereof (such as portions thereof). The nucleotide sequence may be DNA or RNA which may be of genomic or synthetic or recombinant origin which may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand.

Preferably, the term "nucleotide sequence" means DNA.

More preferably, the term "nucleotide sequence" means DNA prepared by use of recombinant DNA techniques (i.e. recombinant DNA).

In a preferred embodiment, the nucleotide sequence *per se* of the present invention does not cover the native nucleotide coding sequence according to the present invention in its natural environment when it is under the control of its native promoter which is also in its natural environment. For ease of reference, we have called this preferred embodiment the "non-native nucleotide sequence".

The nucleotide sequences of the present invention may include within them synthetic or modified nucleotides. A number of different types of modification to oligonucleotides

are known in the art. These include methylphosphonate and phosphorothioate backbones, addition of acridine or polylysine chains at the 3' and/or 5' ends of the molecule. For the purposes of the present invention, it is to be understood that the nucleotide sequences described herein may be modified by any method available in the art. Such modifications may be carried out in to enhance the *in vivo* activity or life span of nucleotide sequences of the present invention.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are complementary to the sequences presented herein, or any variant, homologue, analogue, fragment or derivative thereof. If the sequence is complementary to a fragment thereof then that sequence can be used a probe to identify similar coding sequences in other organisms, etc.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising to the sequences presented herein, or any variant, homologue, analogue, fragment or derivative thereof.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising to the sequences that are complementary to the sequences presented herein, or any variant, homologue, analogue, fragment or derivative thereof.

The term "variant" also encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising to the nucleotide sequences presented herein.

Preferably, the term "variant" encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC (1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₂ citrate pH 7.0)) to the nucleotide sequences presented herein.

The present invention also relates to nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequences of the present invention (including complementary sequences of those presented herein).

The present invention also relates to nucleotide sequences that are complementary to sequences that can hybridise to the nucleotide sequences of the present invention (including complementary sequences of those presented herein).

Also included within the scope of the present invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridising to the nucleotide sequences presented herein under conditions of intermediate to maximal stringency.

In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequence of the present invention, or the complement thereof, under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC).

Exemplary nucleic acids can alternatively be characterised as those nucleotide sequences which encode a PFI-013 protein and hybridise to the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1. Preferred are such sequences encoding PFI-013 which hybridise under high-stringency conditions to the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or the complement thereof.

Advantageously, the invention provides nucleic acid sequences which are capable of hybridising, under stringent conditions, to a fragment of the sequence shown in the SEQ ID NO: 1 or the complement thereof. Preferably, the fragment is between 15 and 50 bases in length. Advantageously, it is about 25 bases in length.

The terms "variant", "homologue", "analogue", "derivative" or "fragment" in relation to the nucleotide sequence coding for the preferred polypeptide of the present invention include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence codes for or is capable of coding for an polypeptide having PFI-013 receptor activity, preferably being at least as biologically active as the polypeptide encoded by the sequence shown in SEQ ID NO: 1. In particular, the term "homologue" covers homology with respect to structure and/or function providing the resultant nucleotide sequence codes for or is capable of coding for a polypeptide having activity as

a PFI-013 GPCR. With respect to sequence homology, preferably there is at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95% homology to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. Most preferably there is at least 98% homology to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. With respect to sequence homology, there is at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95% homology to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1. Most preferably there is at least 98% homology to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

As indicated, the present invention relates to a DNA sequence (preferably a cDNA sequence) encoding PFI-013. In particular, the present invention relates to cDNA sequences encoding PFI-013.

The present invention also relates to DNA segments comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or allelic variations thereof.

The present invention also relates to polypeptides produced by expression in a host cell into which has been incorporated the foregoing DNA sequences or allelic variations thereof.

The present invention also relates provides DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or allelic variations thereof.

The present invention also relates to non-native DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or allelic variations thereof.

A highly preferred aspect of the present invention relates to recombinant DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or allelic variations thereof.

Polynucleotides of the present invention include nucleic acid sequences encoding the polypeptides of the present invention. It will be appreciated that a range of different polynucleotides encode a given amino acid sequence as a consequence of the degeneracy of the genetic code.

By knowledge of the amino acid sequences set out herein it is possible to devise partial and full-length nucleic acid sequences such as cDNA and/or genomic clones that encode the polypeptides of the present invention. For example, polynucleotides of the present invention may be obtained using degenerate polymerase chain reaction (PCR) which will use primers designed to target sequences encoding the amino acid sequences presented herein. The primers will typically contain multiple degenerate positions. However, to minimise degeneracy, sequences will be chosen that encode regions of the amino acid sequences presented herein containing amino acids such as methionine which are coded for by only one triplet. In addition, sequences will be chosen to take into account codon usage in the organism whose nucleic acid is used as the template DNA for the PCR procedure. PCR will be used at stringency conditions lower than those used for cloning sequences with single sequence (non-degenerate) primers against known sequences.

Nucleic acid sequences obtained by PCR that encode polypeptide fragments of the present invention may then be used to obtain larger sequences using hybridisation library screening techniques. For example a PCR clone may be labelled with radioactive atoms and used to screen a cDNA or genomic library from other species, preferably other mammalian species. Hybridisation conditions will typically be conditions of medium to high stringency (for example 0.03M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at from about 50°C to about 60°C).

Degenerate nucleic acid probes encoding all or part of the amino acid sequence may also be used to probe cDNA and/or genomic libraries from other species, preferably other mammalian species. However, it is preferred to carry out PCR techniques initially to obtain a single sequence for use in further screening procedures.

In accordance with the present invention, polynucleotide sequences which encode PFI-013, fragments of the polypeptide, fusion proteins or functional equivalents thereof, may be used to generate recombinant DNA molecules that direct the expression of PFI-013 in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence, may be used to clone and express PFI-013. As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce PFI-013-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. Codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host (Murray E *et al* (1989) *Nuc Acids Res* 17:477-508) can be selected, for example, to increase the rate of PFI-013 expression or to produce recombinant RNA transcripts having desirable properties, such as a longer half-life, than transcripts produced from naturally occurring sequence.

Polynucleotide sequences of the present invention obtained using the techniques described above may be used to obtain further homologous sequences and variants using the techniques described above. They may also be modified for use in expressing the polypeptides of the present invention in a variety of host cells systems, for example to optimise codon preferences for a particular host cell in which the polynucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the property or function of the polypeptides encoded by the polynucleotides.

Altered PFI-013 polynucleotide sequences which may be used in accordance with the invention include deletions, insertions or substitutions of different nucleotide residues resulting in a polynucleotide that encodes the same or a functionally equivalent PFI-013. The protein may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent PFI-013. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the biological activity of PFI-013 is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar

head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

Included within the scope of the present invention are alleles of PFI-013. As used herein, an "allele" or "allelic sequence" is an alternative form of PFI-013. Alleles result from a mutation, i.e. a change in the nucleic acid sequence, and generally produce altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given gene may have none, one or many allelic forms. Common mutational changes which give rise to alleles are generally ascribed to deletions, additions or substitutions of amino acids. Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

The nucleotide sequences of the present invention may be engineered in order to alter a PFI-013 coding sequence for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing and/or expression of the gene product. For example, mutations may be introduced using techniques which are well known in the art, e.g. site-directed mutagenesis to insert new restriction sites, to alter glycosylation patterns or to change codon preference.

Polynucleotides of the present invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the polynucleotides may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term polynucleotides of the present invention as used herein.

Polynucleotides or primers of the present invention may carry a revealing label. Suitable labels include radioisotopes such as ^{32}P or ^{35}S , enzyme labels, or other protein labels such as biotin. Such labels may be added to polynucleotides or primers of the present invention and may be detected using by techniques known in the art.

Polynucleotides such as a DNA polynucleotide and primers according to the present invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step-wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

Longer polynucleotides will generally be produced using recombinant means, for example using PCR cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15-30 nucleotides) to a region of the nucleotide sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from a eukaryotic or prokaryotic cell, performing a polymerase chain reaction under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

DNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences of the 5' and/or 3' ends of the molecule or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the backbone of the molecule.

As mentioned earlier, the present invention also relates to nucleotide sequences that are capable of hybridising to all or part of the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or an allelic variation thereof. These nucleotide sequences may be used in antisense techniques to modify PFI-013 expression. Alternatively, these sequences (or portions thereof) can be used as a probe, or for amplifying all or part of such sequence when used as a PCR primer.

In addition to the recombinant DNA sequences, genomic sequences are also of utility in the context of drug discovery. It may be valuable to inhibit the mRNA transcription of a particular isoform rather than to inhibit its translated protein. This may be true with PFI-

013, if there are splice variants and wherein those different splice variants may be transcribed from different promoters.

Another utility of the invention is that the DNA sequences, once known, give the information needed to design assays to specifically detect isoforms or splice variants. Isoform-specific PCR primer pairs are but one example of an assay that depends completely on the knowledge of the specific DNA sequence of the isoform or splice variant. Such an assay allows detection of mRNA for the isoform to assess the tissue distribution and biological relevance of each isoform to a particular disease state. It also allows identification of cell lines that may naturally express only one isoform - a discovery that might obviate the need to express recombinant genes. If specific PFI-013 isoforms are shown to be associated with a particular disease state, the invention would be valuable in the design of diagnostic assays to detect the presence of isoform mRNA.

An abnormal level of nucleotide sequences encoding a PFI-013 receptor in a biological sample may reflect a chromosomal aberration, such as a nucleic acid deletion or mutation. Accordingly, nucleotide sequences encoding a PFI-013 receptor provide the basis for probes which can be used diagnostically to detect chromosomal aberrations such as deletions, mutations or chromosomal translocations in the gene encoding PFI-013. PFI-013 gene expression may be altered in such disease states or there may be a chromosomal aberration present in the region of the gene encoding PFI-013.

In an alternative embodiment of the invention, the coding sequence of PFI-013 could be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers MH *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23, Horn T *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

NATURALLY OCCURRING

As used herein "naturally occurring" refers to a PFI-013 with an amino acid sequence found in nature.

ISOLATED/PURIFIED

As used herein, the terms "isolated" and "purified" refer to molecules, either nucleic or amino acid sequences, that are removed from their natural environment and isolated or separated from at least one other component with which they are naturally associated.

BIOLOGICALLY ACTIVE

As used herein "biologically active" refers to a PFI-013 according to the present invention - such as a recombinant PFI-013- having a similar structural function (but not necessarily to the same degree), and/or similar regulatory function (but not necessarily to the same degree), and/or similar biochemical function (but not necessarily to the same degree) and/or immunological activity (but not necessarily to the same degree) of the naturally occurring PFI-013. Specifically, a PFI-013 of the present invention has the ability to act as a GPCR, which is one of the characteristic activities of the PFI-013 polypeptide of the present invention.

IMMUNOLOGICAL ACTIVITY

As used herein, "immunological activity" is defined as the capability of the natural, recombinant or synthetic PFI-013 or any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

DERIVATIVE

The term "derivative" as used herein in relation to the amino acid sequence includes chemical modification of a PFI-013. Illustrative of such modifications would be replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, or amino group.

ANALOGUE

The term "analogue" as used herein in relation to the amino acid sequence (or the coding sequence thereof) includes chemical modification of a PFI-013 or the coding sequence thereof. Illustrative of such modifications would be replacement of natural amino acid residues or natural nucleotides with non-natural amino acid residues (e.g. D-amino acids, beta-alanine, hydroxyproline) or non-natural nucleotides (e.g. inosine, demethyl-cytidine).

DELETION

As used herein a "deletion" is defined as a change in either nucleotide or amino acid sequence in which one or more nucleotides or amino acid residues, respectively, are absent.

INSERTION/ADDITION

As used herein an "insertion" or "addition" is a change in a nucleotide or amino acid sequence which has resulted in the addition of one or more nucleotides or amino acid residues, respectively, as compared to the naturally occurring PFI-013.

SUBSTITUTION

As used herein "substitution" results from the replacement of one or more nucleotides or amino acids by different nucleotides or amino acids, respectively.

HOMOLOGUE

The term "homologue" with respect to the nucleotide sequence of the present invention and the amino acid sequence of the present invention may be synonymous with allelic variations of the sequences.

In particular, the term "homology" as used herein may be equated with the term "identity". Here, sequence homology with respect to the nucleotide sequence of the present invention and the amino acid sequence of the present invention can be determined by a simple "eyeball" comparison (i.e. a strict comparison) of any one or more of the sequences with another sequence to see if that other sequence has at least 70% identity to the nucleotide and amino acid sequences. Relative sequence homology (i.e. sequence identity) can also be determined by commercially available computer programs that can calculate percentage (%) homology between two or more sequences. Typical examples of such computer programs are FASTA or BLAST.

An alternative method for producing sequence alignments is to use the computer program ClustalW (Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J., *Nucleic Acid Research*, Vol. 22 (22); 4673-4680 (1994)).

Percentage (%) homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues (for example less than 50 contiguous amino acids).

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

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment

with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap creation and -4 for each extension. Alternative default gap penalties for amino acid sequences is -8 for a gap creation and -2 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software that can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - Chapter 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for off-line and on-line searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However, for some applications it is preferred to use the GCG Bestfit program.

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

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

As indicated, for some applications, sequence homology (or identity) may be determined using any suitable homology algorithm, using for example default parameters. For a discussion of basic issues in similarity searching of sequence databases, see Altschul *et al.* (1994) *Nature Genetics* 6:119-129. For some applications, the BLAST algorithm is employed, with parameters set to default values. The BLAST algorithm is described in detail at http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html. Advantageously, "substantial homology", when assessed by BLAST, equates to sequences which match with an EXPECT value of at least about e^{-7} , preferably at least about e^{-9} and most preferably e^{-10} or lower. The default threshold for EXPECT in BLAST searching is usually 10.

Should Gap Penalties be used when determining sequence identity, then preferably the following parameters are used:

FOR BLAST	
GAP OPEN	5
GAP EXTENSION	2

FOR CLUSTAL	DNA	PROTEIN	
WORD SIZE	2	1	K triple
GAP PENALTY	10	10	
GAP EXTENSION	0.1	0.1	

Other computer program methods to determine identity and similarity between the two sequences include but are not limited to the GCG program package (Devereux *et al.*,

1984 *Nucleic Acids Research* 12: 387) and FASTA (Altschul *et al.* 1990 *J Molec Biol* 403-410).

PROFILE HIDDEN MARKOV MODELS

The profile of a family of sequences can be modelled in a probabilistic way using hidden Markov models (HMMs) (Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A. and Mitchison, G. (1998), *Biological Sequence Analysis: Probabilistic models of proteins and nucleic acids*; Cambridge University Press, Cambridge, UK.; Eddy, S.R. (1998), Profile hidden Markov models; *Bioinformatics*, 14: 755-763). HMMs were originally developed for use in speech recognition and have since been used for a range of signal processing applications. A signal is modelled as a sequence of elements from a finite set. In speech recognition this set consists of the sounds that make up the language and the aim is to deduce what words the sounds represent. A protein sequence from a particular family can be thought of in the same way. The sequence is a series of elements from the set of 20 amino acids and the requirement is to determine what protein family the sequence could represent.

Profile HMMs can be constructed from a multiple sequence alignment of known family members. Each position in the alignment corresponds to a state, where states are "match", "insert" or "delete". The whole alignment can therefore be thought of as a linear chain, or path, of interconnecting states connected by transition probabilities. These states "emit" amino acid residues with different probabilities (based on the range of residues seen in the alignment together with substitution data and "pseudocount" methods - to correct for limited data in the initial alignment). The probability of a particular sequence matching the model can be calculated as a combination of the transition probabilities between states and the emission probabilities for that amino acid sequence.

Once a good alignment of known family members has been obtained, HMMs can be constructed with little manual intervention (compared with profiles) and are a more sensitive method for detecting remote homologues. The Pfam database is a library of

profile HMMs for many protein families (Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Finn, R.D. and Sonhammer, E.L.L. (1999), Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins, *Nucleic Acids Research*, 27: 260-262). It contains models constructed from carefully edited seed alignments and models automatically generated by an iterative procedure. This complete automation of the process has the disadvantage that any errors that are made will be rapidly propagated.

POLYPEPTIDE VARIANTS AND DERIVATIVES

The terms "variant" or "derivative" in relation to the amino acid sequences of the present invention includes any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) amino acids from or to the sequence providing the resultant amino acid sequence has PFI-013 activity, preferably having at least the same activity as the polypeptide presented in SEQ ID NO: 2.

The sequences of the present invention may be modified for use in the present invention. Typically, modifications are made that maintain the PFI-013 activity of the sequence. Amino acid substitutions may be made, for example from 1, 2 or 3 to 10, 20 or 30 substitutions provided that the modified sequence retains PFI-013 activity. Amino acid substitutions may include the use of non-naturally occurring analogues, for example to increase blood plasma half-life of a therapeutically administered polypeptide.

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other.

ALIPHATIC	Non-polar	GAP
		ILV
	Polar - uncharged	CSTM
		NQ
	Polar - charged	DE
KR		
AROMATIC		HFVY

As indicated above, proteins of the invention are typically made by recombinant means, for example as described herein, and/or by using synthetic means using techniques well known to the skilled person such as solid phase synthesis. Variants and derivatives of such sequences include fusion proteins, wherein the fusion proteins comprise at least the amino acid sequence of the present invention being linked (directly or indirectly) to another amino acid sequence. These other amino acid sequences - which are sometimes referred to as fusion protein partners - will typically impart a favourable functionality - such as to aid extraction and purification of the amino acid sequence of the present invention. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β -galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence of the present invention so as to allow removal of the latter. Preferably the fusion protein partner will not hinder the function of the protein of the present invention.

POLYNUCLEOTIDE VARIANTS AND DERIVATIVES

The terms "variant" or "derivative" in relation to the nucleotide sequence of the present invention include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence codes for a polypeptide having PFI-013 activity, preferably having at least the same activity as the sequence presented in SEQ ID NO: 2.

As indicated above, with respect to sequence homology, there is at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95% homology to the nucleotide sequence shown in

SEQ ID NO: 1. Most preferably there is at least 98% homology to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1. Nucleotide homology comparisons may be conducted as described above. For some applications, a preferred sequence comparison program is the GCG Wisconsin Bestfit program described above. The default scoring matrix has a match value of 10 for each identical nucleotide and -9 for each mismatch. The default gap creation penalty is -50 and the default gap extension penalty is -3 for each nucleotide.

As used herein, the terms "variant", "homologue", "fragment" and "derivative" embrace allelic variations of the sequences.

The term "variant" also encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising to the nucleotide sequences presented herein.

HYBRIDISATION

The term "hybridisation" as used herein shall include "the process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" (Coombs J (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, NY, USA) as well as the process of amplification as carried out in PCR technologies as described in Dieffenbach CW and GS Dveksler (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, USA).

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

Stringency of hybridisation refers to conditions under which polynucleic acids hybrids are stable. Such conditions are evident to those of ordinary skill in the field. As known to those of skill in the art, the stability of hybrids is reflected in the melting temperature (T_m) of the hybrid which decreases approximately 1 to 1.5°C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion

concentration and temperature. Typically, the hybridisation reaction is performed under conditions of higher stringency, followed by washes of varying stringency.

As used herein, high stringency refers to conditions that permit hybridisation of only those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 1 M Na⁺ at 65-68°C.

Maximum stringency typically occurs at about T_m-5°C (5°C below the T_m of the probe).

High stringency occurs at about 5°C to 10°C below the T_m of the probe. High stringency conditions can be provided, for example, by hybridisation in an aqueous solution containing 5x SSC, 5x Denhardt's, 1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1 Na⁺ pyrophosphate and 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA as non-specific competitor. Following hybridisation, high stringency washing may be done in several steps, with a final wash (about 30 min) at the hybridisation temperature in 0.2-0.1x SSC, 0.1% SDS.

Moderate, or intermediate, stringency typically occurs at about 10°C to 20°C below the T_m of the probe.

Low stringency typically occurs at about 20°C to 25°C below the T_m of the probe.

As will be understood by those of skill in the art, a maximum stringency hybridisation can be used to identify or detect identical polynucleotide sequences while an intermediate (or low) stringency hybridisation can be used to identify or detect similar or related polynucleotide sequences.

Moderate stringency refers to conditions equivalent to hybridisation in the above-described solution but at about 60-62°C. In that case the final wash is performed at the hybridisation temperature in 1x SSC, 0.1% SDS.

Low stringency refers to conditions equivalent to hybridisation in the above-described solution at about 50-52°C. In that case, the final wash is performed at the hybridisation temperature in 2x SSC, 0.1% SDS.

It is understood that these conditions may be adapted and duplicated using a variety of buffers, e.g. formamide-based buffers, and temperatures. Denhardt's solution and SSC are well known to those of skill in the art as are other suitable hybridisation buffers (see, e.g., Sambrook, *et al.*, eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA or Ausubel, *et al.*, eds. (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.). Optimal hybridisation conditions have to be determined empirically, as the length and the GC content of the probe also play a role.

Polynucleotides of the invention capable of selectively hybridising to the nucleotide sequences presented herein, or to their complement, will be generally at least 70%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95%, most preferably at least 98% homologous to the corresponding nucleotide sequences presented herein over a region of at least 20, preferably at least 25 or 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides.

The term "selectively hybridisable" means that the polynucleotide used as a probe is used under conditions where a target polynucleotide of the invention is found to hybridize to the probe at a level significantly above background. The background hybridization may occur because of other polynucleotides present, for example, in the cDNA or genomic DNA library being screened. In this event, background implies a level of signal generated by interaction between the probe and a non-specific DNA member of the library which is less than 10-fold, preferably less than 100-fold as intense as the specific interaction observed with the target DNA. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with ³²P.

In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to any one or more of the nucleotide sequences of the present invention under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₂ Citrate pH 7.0}).

Where the polynucleotide of the present invention is double-stranded, both strands of the duplex, either individually or in combination, are encompassed by the present invention. Where the polynucleotide is single-stranded, it is to be understood that the complementary sequence of that polynucleotide is also included within the scope of the present invention.

Polynucleotides which are not 100% homologous to the sequences of the present invention but fall within the scope of the invention can be obtained in a number of ways. Other variants of the sequences described herein may be obtained, for example, by probing DNA libraries made from a range of individuals, for example individuals from different populations. In addition, other viral/bacterial, or cellular homologues particularly cellular homologues found in mammalian cells (e.g. bovine, ovine, porcine, equine, rodent and primate cells), may be obtained and such homologues and fragments thereof in general will be capable of selectively hybridising to the sequence shown in SEQ ID NO: 1. Such sequences may be obtained by probing cDNA libraries made from, or genomic DNA libraries derived from, other animal species, and probing such libraries with probes comprising all or part of the sequence shown in SEQ ID NO: 1 under conditions of medium to high stringency. Similar considerations apply to obtaining species homologues and allelic variants of the polypeptide or nucleotide sequences of the invention.

Variants and strain/species homologues may also be obtained using degenerate PCR which will use primers designed to target sequences within the variants and homologues encoding conserved amino acid sequences within the sequences of the present invention. Conserved sequences can be predicted, for example, by aligning the amino acid sequences from several variants/homologues. Sequence alignments can be performed using computer software known in the art. For example the GCG Wisconsin PileUp or ClustalW program is widely used.

The primers used in degenerate PCR will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions lower than those used for cloning sequences with single sequence primers against known sequences.

Alternatively, such polynucleotides may be obtained by site-directed mutagenesis of characterised sequences. This may be useful where, for example, silent codon changes are required to sequences to optimise codon preferences for a particular host cell in which the polynucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the property or function of the polypeptides encoded by the polynucleotides.

Polynucleotides of the invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the polynucleotides may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term polynucleotides of the invention as used herein.

Polynucleotides such as DNA polynucleotides and probes according to the invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

Longer polynucleotides will generally be produced using recombinant means, for example using PCR cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal or human cell, performing a polymerase chain reaction under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the

reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

REGULATORY SEQUENCES

Preferably, the polynucleotide of the present invention is operably linked to a regulatory sequence which is capable of providing for the expression of the coding sequence, such as by the chosen host cell. By way of example, the present invention covers a vector comprising the polynucleotide of the present invention operably linked to such a regulatory sequence, i.e. the vector is an expression vector.

The term "operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A regulatory sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under condition compatible with the control sequences.

The term "regulatory sequences" includes promoters and enhancers and other expression regulation signals.

The term "promoter" is used in the normal sense of the art, e.g. an RNA polymerase binding site.

Enhanced expression of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention may also be achieved by the selection of heterologous regulatory regions, e.g. promoter, secretion leader and terminator regions, which serve to increase expression and, if desired, secretion levels of the protein of interest from the chosen expression host and/or to provide for the inducible control of the expression of the polypeptide of the present invention.

Preferably, the nucleotide sequence of the present invention may be operably linked to at least a promoter.

Aside from the promoter native to the gene encoding the polypeptide of the present invention, other promoters may be used to direct expression of the polypeptide of the present invention. The promoter may be selected for its efficiency in directing the expression of the polypeptide of the present invention in the desired expression host.

In another embodiment, a constitutive promoter may be selected to direct the expression of the desired polypeptide of the present invention. Such an expression construct may provide additional advantages since it circumvents the need to culture the expression hosts on a medium containing an inducing substrate.

Examples of suitable promoters would be LTR, SV40 and CMV in mammalian systems; *E. coli lac* or *trp* in bacterial systems; baculovirus polyhedron promoter (*polh*) in insect systems and other promoters that are known to control expression in eukaryotic and prokaryotic cells or their viruses.

Examples of strong constitutive and/or inducible promoters which are preferred for use in fungal expression hosts are those which are obtainable from the fungal genes for xylanase (*xlnA*), phytase, ATP-synthetase, subunit 9 (*oliC*), triose phosphate isomerase (*tpi*), alcohol dehydrogenase (*AdhA*), α -amylase (*amy*), amyloglucosidase (AG - from the *glaA* gene), acetamidase (*amdS*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) promoters.

Examples of strong yeast promoters are those obtainable from the genes for alcohol dehydrogenase, lactase, 3-phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase.

Examples of strong bacterial promoters are the α -amylase and *SP02* promoters as well as promoters from extracellular protease genes.

Hybrid promoters may also be used to improve inducible regulation of the expression construct.

The promoter can additionally include features to ensure or to increase expression in a suitable host. For example, the features can be conserved regions such as a Pribnow Box or a TATA box. The promoter may even contain other sequences to affect (such as to maintain, enhance or decrease) the levels of expression of the nucleotide sequence of the present invention. For example, suitable other sequences include the Sh1-intron or an ADH intron. Other sequences include inducible elements - such as temperature, chemical, light or stress inducible elements. Also, suitable elements to enhance transcription or translation may be present. An example of the latter element is the TMV 5' signal sequence (see Sleat, *Gene* 217 [1987] 217-225; and Dawson, *Plant Mol. Biol.* 23 [1993] 97).

The expression vector may also contain sequences which act on the promoter to amplify expression. For example, the SV40, CMV, and polyoma cis-acting elements (enhancer) and a selectable marker can provide a phenotypic trait for selection (e.g. dihydrofolate reductase or neomycin resistance for mammalian cells or ampicillin/tetracyclin resistance for *E. coli*). Selection of the appropriate vector containing the appropriate promoter and selection marker is well within the level of those skilled in the art.

CONSTRUCTS

The term "construct" - which is synonymous with terms such as "conjugate", "cassette" and "hybrid" - includes the nucleotide sequence according to the present invention directly or indirectly attached to a promoter. An example of an indirect attachment is the provision of a suitable spacer group such as an intron sequence, such as the Sh1-intron or the ADH intron, intermediate the promoter and the nucleotide sequence of the present invention. The same is true for the term "fused" in relation to the present invention which includes direct or indirect attachment. In each case, the terms do not cover the natural combination of the nucleotide sequence coding for the protein ordinarily associated with the wild-type gene promoter and when they are both in their natural environment.

The construct may even contain or express a marker which allows for the selection of the genetic construct in, for example, mammalian, yeast, insect, fungal or bacterial cells. Various markers exist which may be used, such as, for example, those that provide for antibiotic resistance to G418, hygromycin, bleomycin, kanamycin and gentamycin.

Preferably the construct of the present invention comprises at least the nucleotide sequence of the present invention operably linked to a promoter.

VECTORS

The term "vector" includes expression vectors and transformation vectors and shuttle vectors.

The term "expression vector" means a construct capable of *in vivo* or *in vitro* expression.

The term "transformation vector" means a construct capable of being transferred from one entity to another entity - which may be of the same species or may be of a different species. If the construct is capable of being transferred from one species to another - such as from a viral vector such as MMLV or FIV to a human or mammalian primary cell or cell line, then the transformation vector is sometimes referred to as a "shuttle vector".

A large variety of expression systems may be used in different hosts. For example, episomal, chromosomal and virus-derived systems (e.g. vectors derived from bacterial plasmids, bacteriophage, papova virus such as SV40, vaccinia virus, adenovirus, and retrovirus).

The DNA sequence can be inserted into the vector by a variety of techniques. In general the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site by procedures known in the art and deemed to be within the scope of those skilled in the art. The DNA sequence in the expression vector is linked operatively to appropriate control sequences that direct mRNA synthesis (i.e. the promoter).

The vectors of the present invention may be transformed into a suitable host cell as described below to provide for expression of a polypeptide of the present invention. Thus, in a further aspect, the invention provides a process for preparing polypeptides according to the present invention which comprises cultivating a host cell transformed or transfected with an expression vector as described above under conditions to provide for expression by the vector of a coding sequence encoding the polypeptides, and recovering the expressed polypeptides.

The vectors may be, for example, plasmid, virus or bacteriophage (phage) vectors provided with an origin of replication, optionally a promoter for the expression of the polynucleotide and optionally a regulator of the promoter.

The vectors of the present invention may contain one or more selectable marker genes. The most suitable selection systems for industrial micro-organisms are those formed by the group of selection markers which do not require a mutation in the host organism. Examples of fungal selection markers are the genes for acetamidase (*amidS*), ATP synthetase, subunit 9 (*oliC*), orotidine-5'-phosphate-decarboxylase (*pvvA*), phleomycin and benomyl resistance (*benA*). Examples of non-fungal selection markers are the bacterial G418 resistance gene (this may also be used in mammalian cells, yeast, but not in filamentous fungi), the ampicillin resistance gene (*E. coli*), the neomycin resistance gene (mammalian cells) and the *E. coli uidA* gene, coding for β -glucuronidase (GUS).

Vectors may be used *in vitro*, for example for the production of RNA or used to transfect or transform a host cell.

Thus, polynucleotides of the present invention can be incorporated into a recombinant vector (typically a replicable vector), for example a cloning or expression vector. The vector may be used to replicate the nucleic acid in a compatible host cell. Thus, in a further embodiment, the invention provides a method of making polynucleotides of the present invention by introducing a polynucleotide of the present invention into a replicable vector, introducing the vector into a compatible host cell, and growing the

host cell under conditions which bring about replication of the vector. The vector may be recovered from the host cell. Suitable host cells are described below in connection with expression vectors.

The present invention also relates to the use of genetically engineered host cells expressing a PFI-013 polypeptide or variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof in screening methods for the identification of modulators (e.g. antagonists or agonists) of PFI-013. Such genetically engineered host cells could be used to screen peptide libraries or organic molecules capable of modulating PFI-013 activity. Modulators (e.g. antagonists) of the PFI-013 polypeptide, such as antibodies, peptides or small organic molecules will provide the basis for pharmaceutical compositions for the treatment of diseases associated with, for example, PFI-013. Such modulators (e.g. antagonists) can be administered alone or in combination with other therapeutics for the treatment of such diseases.

The present invention also relates to expression vectors and host cells comprising polynucleotide sequences encoding PFI-013 or a variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof for the *in vivo* or *in vitro* production of PFI-013 protein or to screen for agents that can affect PFI-013 expression or activity.

TISSUE

The term "tissue" as used herein includes tissue *per se* and organ.

HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention - includes any cell that could comprise the nucleotide sequence coding for the recombinant protein according to the present invention and/or products obtained therefrom, wherein a promoter can allow expression of the nucleotide sequence according to the present invention when present in the host cell.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of said polynucleotide. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may, for example, be prokaryotic (for example, bacterial cells), or eukaryotic (i.e. mammalian, fungal, insect and yeast cells).

Introduction of polynucleotides into host cells can be effected by methods as described in Sambrook, *et al.*, eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. These methods include, but are not limited to, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran-mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transfection, microinjection, transduction, scrape loading, and ballistic introduction.

Examples of representative hosts include, bacterial cells (e.g. *E. coli*, *Streptomyces*); fungal cells such as yeast cells and *Aspergillus*; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* SF9 cells; animal cells such as CHO, COS, HEK, HeLa, and 3T3 cells. The selection of the appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly expressed or secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Escherichia* species, *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as

those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigenis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as mammalian, yeast, insect and fungal host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lipidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism, except man, that could comprise the nucleotide sequence coding for the recombinant protein according to the present invention and/or products obtained therefrom, wherein a promoter can allow expression of the nucleotide sequence according to the present invention when present in the organism. Examples of organisms may include a fungus, yeast or protozoan.

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism, except man, that comprises the nucleotide sequence coding for the protein according to the present invention and/or products obtained therefrom, wherein the promoter can allow expression of the nucleotide sequence according to the present invention within the organism. Preferably the nucleotide sequence is incorporated in the genome of the organism.

The term "transgenic organism" does not cover the native nucleotide coding sequence according to the present invention in its natural environment when it is under the control of its native promoter which is also in its natural environment. In addition, the present invention does not cover the native protein according to the present invention when it is in

its natural environment and when it has been expressed by its native nucleotide coding sequence which is also in its natural environment and when that nucleotide sequence is under the control of its native promoter which is also in its natural environment.

Therefore, the transgenic organism of the present invention includes an organism comprising any one of, or combinations of, the nucleotide sequence coding for the amino acid sequence according to the present invention, constructs according to the present invention (including combinations thereof), vectors according to the present invention, plasmids according to the present invention, cells according to the present invention, and tissues according to the present invention or the products thereof. The transformed cell or organism could prepare acceptable quantities of the desired compound which would be easily retrievable from the cell or organism.

TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. An example of a suitable prokaryotic host is *E. coli*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts are well documented in the art, for example see Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) and Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.).

In a preferred embodiment, the transformed host is a mammalian cell or, for example, an insect cell, wherein introduction of polynucleotides into said host cells can be effected by methods as described in, for example, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA). These methods include, but are not limited to, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran-mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transvection, microinjection, transduction, scrape loading, and ballistic introduction.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey *et al.* (1987, *Yeast Biotechnology*, D R Berry *et al.*, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King *et al.* (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe and E Kenny ("Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", 1993, *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

In order to prepare the transgenic *Saccharomyces*, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence

encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic *Saccharomyces* according to the present invention can be prepared by following the teachings of Hinnen *et al.* (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 75: 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275:104); and Ito, H *et al.* (1983, J. Bacteriology 153:163-168).

The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, e.g. G418.

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof.

Host cells transformed with a PFI-013 nucleotide coding sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein (in cell membranes) from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be expressed on the cell surface, secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing PFI-013 coding sequences will generally enable expression in the cell membrane. Other recombinant constructions may join PFI-013 coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate protein purification/identification (Kroll DJ *et al.* (1993) DNA Cell Biol Vol 12 p441-53, see also above discussion of vectors containing fusion proteins).

GENETICALLY ENGINEERED or GENETICALLY MODIFIED

A cell, preferably an animal cell, that is "genetically modified" is heterozygous or homozygous for a modification that is introduced into the cell, or into a progenitor cell, by genetic engineering. The standard methods of genetic engineering that are available for introducing the modification include homologous recombination, viral vector gene trapping, irradiation, chemical mutagenesis, and the transgenic expression of a nucleotide sequence encoding antisense RNA alone or in combination with catalytic ribozymes. Preferred methods for genetic modification are homologous recombination and viral vector gene trapping which both modify an endogenous gene by inserting a foreign nucleic acid sequence into the gene locus. A nucleic acid sequence that is foreign to the gene is an exogenous sequence that is non-naturally occurring in the gene. This insertion of foreign DNA can occur within any region of the PFI-013 gene, e.g., in an enhancer, promoter, regulator region, non-coding region, coding region, intron, or exon. The most preferred method of genetic engineering is homologous recombination, in which the foreign nucleic acid sequence is inserted in a targeted manner either alone or in combination with a deletion of a portion of the endogenous gene sequence.

FUNCTIONALLY DISRUPTED

By a PFI-013 gene that is "functionally disrupted" is meant a PFI-013 gene that is genetically modified such that the cellular activity of the PFI-013 polypeptide encoded by the disrupted gene is decreased in cells that normally express the wild-type version of the PFI-013 gene. When the genetic modification effectively eliminates all wild-type copies of the PFI-013 gene in a cell (e.g., the genetically modified cell, preferably an animal cell, is homozygous for the PFI-013 gene disruption or the only wild-type copy of PFI-013 gene originally present is now disrupted), then the genetic modification results in a reduction in PFI-013 polypeptide activity (i.e. reduced receptor expression) as compared to an appropriate control cell that expresses the wild-type PFI-013 gene. This reduction in PFI-013 polypeptide activity (i.e. reduced receptor expression) results from either reduced PFI-013 gene expression (i.e., PFI-013 mRNA levels are effectively reduced and produce reduced levels of PFI-013 polypeptide) and/or because the

disrupted PFI-013 gene encodes a mutated polypeptide with reduced function or stability as compared to a wild-type PFI-013 polypeptide. Preferably, the activity (i.e. reduced receptor expression) of PFI-013 polypeptide in the genetically modified cell is reduced to 50% or less of wild-type levels, more preferably, to 25% or less, and, even more preferably, to 10% or less of wild-type levels. Most preferably, the PFI-013 gene disruption results in a null mutation.

GENETICALLY MODIFIED ANIMAL CELL

By a "genetically modified animal cell" containing a functionally disrupted PFI-013 gene is meant an animal cell, including a human cell, created by genetic engineering to contain a functionally disrupted PFI-013 gene, as well as daughter cells that inherit the disrupted PFI-013 gene. These cells may be genetically modified in culture according to any standard method known in the art. As an alternative to genetically modifying the cells in culture, non-human mammalian cells may also be isolated from a genetically modified, non-human mammal that contains a PFI-013 gene disruption. The animal cells of the invention may be obtained from primary cell or tissue preparations as well as culture-adapted, tumorigenic, or transformed cell lines. These cells and cell lines are derived, for example, from endothelial cells, epithelial cells, islets, neurons and other neural tissue-derived cells, mesothelial cells, osteocytes, lymphocytes, chondrocytes, hematopoietic cells, immune cells, cells of the major glands or organs (e.g., liver, lung, heart, stomach, pancreas, kidney, and skin), muscle cells (including cells from skeletal muscle, smooth muscle, and cardiac muscle), exocrine or endocrine cells, fibroblasts, and embryonic and other totipotent or pluripotent stem cells (e.g., embryonic stem (ES) cells, ES-like cells, and embryonic germline (EG) cells, and other stem cells, such as progenitor cells and tissue-derived stem cells). The preferred genetically modified cells are ES cells, more preferably, mouse or rat ES cells, and, most preferably, human ES cells.

A "homology region" used in a targeting vector for homologous recombination with a PFI-013 gene is related (i.e., complementary) to a portion of the PFI-013 gene or a sequence flanking the PFI-013 gene to a degree sufficient to allow hybridization to

occur between the homology region and the PFI-013 gene sequence under standard low-stringency conditions known in the art (e.g., as described in *Current Protocols in Human Genetics*, unit 4.1, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000).

By an "ES cell" or an "ES-like cell" is meant a pluripotent stem cell derived from an embryo, from a primordial germ cell, or from a teratocarcinoma, that is capable of indefinite self renewal as well as differentiation into cell types that are representative of all three embryonic germ layers.

By "reduced" is meant a statistically significant decrease (i.e., $p < 0.1$).

The genetically modified animal cells, including human cells, of the invention are heterozygous or homozygous for a modification that functionally disrupts the PFI-013 gene. The animal cells may be derived by genetically engineering cells in culture, or, in the case of non-human mammalian cells, the cells may be isolated from genetically modified, non-human mammals.

The PFI-013 gene locus is functionally disrupted by one of the several techniques for genetic modification known in the art, including chemical mutagenesis (Rinchik, *Trends in Genetics* 7: 15-21, 1991; Russell, *Environmental & Molecular Mutagenesis* 23 (Suppl. 24) 23-29, 1994), irradiation (Russell, *supra*), transgenic expression of PFI-013 gene antisense RNA, either alone or in combination with a catalytic RNA ribozyme sequence (Luyckx *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12174-79, 1999; Sokol *et al.*, *Transgenic Research* 5: 363-71, 1996; Efrat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2051-55, 1994; Larsson *et al.*, *Nucleic Acids Research* 22: 2242-48, 1994) and, as further discussed below, the disruption of the PFI-013 gene by the insertion of a foreign nucleic acid sequence into the PFI-013 gene locus. Preferably, the foreign sequence is inserted by homologous recombination or by the insertion of a viral vector. Most preferably, the method of PFI-013 gene disruption is homologous recombination and includes a deletion of a portion of the endogenous PFI-013 gene sequence.

The integration of the foreign sequence functionally disrupts the PFI-013 gene through one or more of the following mechanisms: by interfering with the PFI-013 gene transcription or translation process (e.g., by interfering with promoter recognition, or by introducing a transcription termination site or a translational stop codon into the PFI-013 gene); or by distorting the PFI-013 gene coding sequence such that it no longer encodes a PFI-013 polypeptide with normal receptor function (e.g., by inserting a foreign coding sequence into the PFI-013 gene coding sequence, by introducing a frameshift mutation or amino acid(s) substitution, or, in the case of a double crossover event, by deleting a portion of the PFI-013 gene coding sequence that is required for expression of a functional receptor protein).

To insert a foreign sequence into a PFI-013 gene locus in the genome of a cell, the foreign DNA sequence is introduced into the cell according to a standard method known in the art such as electroporation, calcium-phosphate precipitation, retroviral infection, microinjection, biolistics, liposome transfection, DEAE-dextran transfection, or transferrinfection (see, e.g., Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1: 841-845, 1982; Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81: 7161-65, 1984; Chu *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 15: 1311-26, 1987; Thomas and Capecchi, *Cell* 51: 503-12, 1987; Baum *et al.*, *Biotechniques* 17: 1058-62, 1994; Biewenga *et al.*, *J. Neuroscience Methods* 71: 67-75, 1997; Zhang *et al.*, *Biotechniques* 15: 868-72, 1993; Ray and Gage, *Biotechniques* 13: 598-603, 1992; Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3: 1803-14, 1983; Nickoloff *et al.*, *Mol. Biotech.* 10: 93-101, 1998; Linney *et al.*, *Dev. Biol. (Orlando)* 213: 207-16, 1999; Zimmer and Gruss, *Nature* 338: 150-153, 1989; and Robertson *et al.*, *Nature* 323: 445-48, 1986). The preferred method for introducing foreign DNA into a cell is electroporation.

Homologous recombination

The method of homologous recombination targets the PFI-013 gene for disruption by introducing a PFI-013 gene targeting vector into a cell containing a PFI-013 gene. The ability of the vector to target the PFI-013 gene for disruption stems from using a nucleotide sequence in the vector that is homologous to the PFI-013 gene. This homology region facilitates hybridization between the vector and the endogenous

sequence of the PFI-013 gene. Upon hybridization, the probability of a crossover event between the targeting vector and genomic sequences greatly increases. This crossover event results in the integration of the vector sequence into the PFI-013 gene locus and the functional disruption of the PFI-013 gene.

General principles regarding the construction of vectors used for targeting are reviewed in Bradley *et al.* (Biotechnol. 10: 534, 1992). Two different exemplary types of vector can be used to insert DNA by homologous recombination: an insertion vector or a replacement vector. An insertion vector is circular DNA which contains a region of PFI-013 gene homology with a double stranded break. Following hybridization between the homology region and the endogenous PFI-013 gene, a single crossover event at the double stranded break results in the insertion of the entire vector sequence into the endogenous gene at the site of crossover.

The more preferred vector to use for homologous recombination is a replacement vector, which is colinear rather than circular. Replacement vector integration into the PFI-013 gene requires a double crossover event, i.e. crossing over at two sites of hybridization between the targeting vector and the PFI-013 gene. This double crossover event results in the integration of vector sequence that is sandwiched between the two sites of crossover into the PFI-013 gene and the deletion of the corresponding endogenous PFI-013 gene sequence that originally spanned between the two sites of crossover (see, e.g., Thomas and Capecchi *et al.*, Cell 51: 503-12, 1987; Mansour *et al.*, Nature 336: 348-52, 1988; Mansour *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7688-7692, 1990; and Mansour, GATA 7: 219-227, 1990).

A region of homology in a targeting vector is generally at least 100 nucleotides in length. Most preferably, the homology region is at least 1-5 kilobases (Kb) in length. Although there is no demonstrated minimum length or minimum degree of relatedness required for a homology region, targeting efficiency for homologous recombination generally corresponds with the length and the degree of relatedness between the targeting vector and the PFI-013 gene locus. In the case where a replacement vector is used, and a portion of the endogenous PFI-013 gene is deleted upon homologous

recombination, an additional consideration is the size of the deleted portion of the endogenous PFI-013 gene. If this portion of the endogenous PFI-013 gene is greater than 1 Kb in length, then a targeting cassette with regions of homology that are longer than 1 Kb is recommended to enhance the efficiency of recombination. Further guidance regarding the selection and use of sequences effective for homologous recombination is described in the literature (see, e.g., Deng and Capecchi, *Mol. Cell. Biol.* 12: 3365-3371, 1992; Bollag *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* 23: 199-225, 1989; and Waldman and Liskay, *Mol. Cell. Biol.* 8: 5350-5357, 1988).

A wide variety of cloning vectors may be used as vector backbones in the construction of PFI-013 gene targeting vectors, including pBluescript-related plasmids (e.g., Bluescript KS+11), pQE70, pQE60, pQE-9, pBS, pD10, phagescript, phiX174, pBK Phagemid, pNH8A, pNH16a, pNH18Z, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, and pRIT5 PWLNEO, pSV2CAT, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, PBPV, PMSG, and pSVL, pBR322 and pBR322-based vectors, pBM9, pBR325, pKH47, pBR328, pHc79, phage Charon 28, pKB11, pKSV-10, pK19 related plasmids, pUC plasmids, and the pGEM series of plasmids. These vectors are available from a variety of commercial sources (e.g., Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Qiagen, Valencia, CA; Stratagene, La Jolla, CA; Promega, Madison, WI; and New England Biolabs, Beverly, MA). However, any other vectors, e.g. plasmids, viruses, or parts thereof, may be used as long as they are replicable and viable in the desired host. The vector may also comprise sequences which enable it to replicate in the host whose genome is to be modified. The use of such a vector can expand the interaction period during which recombination can occur, increasing the efficiency of targeting (see *Molecular Biology*, ed. Ausubel *et al.*, Unit 9.16, Fig. 9.16.1).

The specific host employed for propagating the targeting vectors described above is not critical. Examples include *E. coli* K12 RR1 (Bolivar *et al.*, *Gene* 2: 95, 1977), *E. coli* K12 HB101 (ATCC No. 33694), *E. coli* MM21 (ATCC No. 336780), *E. coli* DH1 (ATCC No. 33849), *E. coli* strain DH5 α , and *E. coli* STBL2. Alternatively, hosts such as *Saccharomyces cerevisiae* can be used. The above-mentioned hosts are available commercially (e.g., Stratagene, La Jolla, CA; and Life Technologies, Rockville, MD).

To create the targeting vector, a PFI-013 gene targeting construct is added to an above-described vector backbone. The PFI-013 gene targeting constructs described above have at least one PFI-013 gene homology region. To make the PFI-013 gene homology regions, a PFI-013 gene-related sequence is used as a basis for producing polymerase chain reaction (PCR) primers. These primers are used to amplify the desired region of the PFI-013 sequence by high fidelity PCR amplification (Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19: 4967, 1991; Eckert and Kunkel 1: 17, 1991; and U.S. Pat. No. 4,683,202). The genomic sequence is obtained from a genomic clone library or from a preparation of genomic DNA, preferably from the animal species that is to be targeted for PFI-013 gene disruption.

Preferably, the targeting constructs described above also include an exogenous nucleotide sequence encoding a positive marker protein. The stable expression of a positive marker after vector integration confers an identifiable characteristic on the cell without compromising cell viability. Therefore, in the case of a replacement vector, the marker gene is positioned between two flanking homology regions so that it integrates into the PFI-013 gene following the double crossover event.

It is preferred that the positive marker protein is a selectable protein; the stable expression of such a protein in a cell confers a selectable phenotypic characteristic, i.e., the characteristic enhances the survival of the cell under otherwise lethal conditions. Thus, by imposing the selectable condition, one can isolate cells that stably express the positive selectable marker from other cells that have not successfully integrated the vector sequence on the basis of viability. Examples of positive selectable marker proteins (and their agents of selection) include Neo (G418 or kanamycin), Hyg (hygromycin), HisD (histidinol), Gpt (xanthine), Ble (bleomycin), and Hprt (hypoxanthine) (see, e.g., Capecchi and Thomas, U.S. Pat. No. 5,464,764, and Capecchi, Science 244: 1288-92, 1989). Other positive markers that may also be used as an alternative to a selectable marker include reporter proteins such as β -galactosidase, firefly luciferase, or green fluorescent protein (see, e.g., Current Protocols in Cytometry,

Unit 9.5, and Current Protocols in Molecular Biology, Unit 9.6, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000).

The above-described positive selection scheme does not distinguish between cells that have integrated the vector by targeted homologous recombination at the PFI-013 gene locus versus random, non-homologous integration of vector sequence into any chromosomal position. Therefore, when using a replacement vector for homologous recombination, it is also preferred to include a nucleotide sequence encoding a negative selectable marker protein. Expression of a negative selectable marker causes a cell expressing the marker to lose viability when exposed to a certain agent (i.e., the marker protein becomes lethal to the cell under certain selectable conditions). Examples of negative selectable markers (and their agents of lethality) include herpes simplex virus thymidine kinase (gancyclovir or 1,2-deoxy-2-fluoro- α -D-arabinofuransyl-5-iodouracil), Hprt (6-thioguanine or 6-thioxanthine), and diphtheria toxin, ricin toxin, and cytosine deaminase (5-fluorocytosine).

The nucleotide sequence encoding the negative selectable marker is positioned outside of the two homology regions of the replacement vector. Given this positioning, cells will only integrate and stably express the negative selectable marker if integration occurs by random, non-homologous recombination; homologous recombination between the PFI-013 gene and the two regions of homology in the targeting construct excludes the sequence encoding the negative selectable marker from integration. Thus, by imposing the negative condition, cells that have integrated the targeting vector by random, non-homologous recombination lose viability.

The above-described combination of positive and negative selectable markers is preferred because a series of positive and negative selection steps can be designed to more efficiently select only those cells that have undergone vector integration by homologous recombination, and, therefore, have a potentially disrupted PFI-013 gene. Further examples of positive-negative selection schemes, selectable markers, and targeting constructs are described, for example, in U.S. Pat. No. 5,464,764, WO 94/06908, and Valancius and Smithies, Mol. Cell. Biol. 11: 1402, 1991.

In order for a marker protein to be stably expressed upon vector integration, the targeting vector may be designed so that the marker coding sequence is operably linked to the endogenous PFI-013 gene promoter upon vector integration. Expression of the marker is then driven by the PFI-013 gene promoter in cells that normally express PFI-013 gene. Alternatively, each marker in the targeting construct of the vector may contain its own promoter that drives expression independent of the PFI-013 gene promoter. This latter scheme has the advantage of allowing for expression of markers in cells that do not typically express the PFI-013 gene (Smith and Berg, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49: 171, 1984; Sedivy and Sharp, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 227: 1989; Thomas and Capecchi, Cell 51: 503, 1987).

Exogenous promoters that can be used to drive marker gene expression include cell-specific or stage-specific promoters, constitutive promoters, and inducible or regulatable promoters. Non-limiting examples of these promoters include the herpes simplex thymidine kinase promoter, cytomegalovirus (CMV) promoter/enhancer, SV40 promoters, PGK promoter, PMCI-neo, metallothionein promoter, adenovirus late promoter, vaccinia virus 7.5K promoter, avian beta globin promoter, histone promoters (e.g., mouse histone H3-614), beta actin promoter, neuron-specific enolase, muscle actin promoter, and the cauliflower mosaic virus 35S promoter (see generally, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, and *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000; Stratagene, La Jolla, CA).

To confirm whether cells have integrated the vector sequence into the targeted PFI-013 gene locus, primers or genomic probes that are specific for the desired vector integration event can be used in combination with PCR or Southern blot analysis to identify the presence of the desired vector integration into the PFI-013 gene locus (Erllich *et al.*, Science 252: 1643-51, 1991; Zimmer and Gruss, Nature 338: 150, 1989; Mouellic *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 4712, 1990; and Shesely *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 4294, 1991).

Gene trapping

Another method available for inserting a foreign nucleic acid sequence into the PFI-013 gene locus to functionally disrupt the PFI-013 gene is gene trapping. This method takes advantage of the cellular machinery present in all mammalian cells that splices exons into mRNA to insert a gene trap vector coding sequence into a gene in a random fashion. Once inserted, the gene trap vector creates a mutation that may functionally disrupt the trapped PFI-013 gene. In contrast to homologous recombination, this system for mutagenesis creates largely random mutations. Thus, to obtain a genetically modified cell that contains a functionally disrupted PFI-013 gene, cells containing this particular mutation must be identified and selected from a pool of cells that contain random mutations in a variety of genes.

Gene trapping systems and vectors have been described for use in genetically modifying murine cells and other cell types (see, e.g., Allen *et al.*, *Nature* 333: 852-55, 1988; Bellen *et al.*, *Genes Dev.* 3: 1288-1300, 1989; Bier *et al.*, *Genes Dev.* 3: 1273-1287, 1989; Bonnerot *et al.*, *J. Virol.* 66: 4982-91, 1992; Brenner *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 5517-21, 1989; Chang *et al.*, *Virology* 193: 737-47, 1993; Friedrich and Soriano, *Methods Enzymol.* 225: 681-701, 1993; Friedrich and Soriano, *Genes Dev.* 5: 1513-23, 1991; Goff, *Methods Enzymol.* 152: 469-81, 1987; Gossler *et al.*, *Science* 244: 463-65, 1989; Hope, *Develop.* 113: 399-408, 1991; Kerr *et al.*, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2: 767-776, 1989; Reddy *et al.*, *J. Virol.* 65: 1507-1515, 1991; Reddy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6721-25, 1992; Skarnes *et al.*, *Genes Dev.* 6: 903-918, 1992; von Melchner and Ruley, *J. Virol.* 63: 3227-3233, 1989; and Yoshida *et al.*, *Transgen. Res.* 4: 277-87, 1995).

Promoter trap (5' trap) vectors contain, in 5' to 3' order, a splice acceptor sequence followed by an exon, which is typically characterized by a translation initiation codon and open reading frame (ORF) and/or an internal ribosome entry site. In general, these promoter trap vectors do not contain promoters or operably linked splice donor sequences. Consequently, after integration into the cellular genome of the host cell, the promoter trap vector sequence intercepts the normal splicing of the upstream gene and

acts as a terminal exon. Expression of the vector coding sequence is dependent upon the vector integrating into an intron of the disrupted gene in the proper reading frame. In such a case, the cellular splicing machinery splices exons from the trapped gene upstream of the vector coding sequence (Zambrowicz *et al.*, WO 99/50426).

An alternative method for producing an effect similar to the above-described promoter trap vector is a vector that incorporates a nested set of stop codons present in, or otherwise engineered into, the region between the splice acceptor of the promoter trap vector and the translation initiation codon or polyadenylation sequence. The coding sequence can also be engineered to contain an independent ribosome entry site (IRES) so that the coding sequence will be expressed in a manner largely independent of the site of integration within the host cell genome. Typically, but not necessarily, an IRES is used in conjunction with a nested set of stop codons.

Another type of gene trapping scheme uses a 3' gene trap vector. This type of vector contains, in operative combination, a promoter region, which mediates expression of an adjoining coding sequence, the coding sequence, and a splice donor sequence that defines the 3' end of the coding sequence exon. After integration into a host cell genome, the transcript expressed by the vector promoter is spliced to a splice acceptor sequence from the trapped gene that is located downstream of the integrated gene trap vector sequence. Thus, the integration of the vector results in the expression of a fusion transcript comprising the coding sequence of the 3' gene trap cassette and any downstream cellular exons, including the terminal exon and its polyadenylation signal. When such vectors integrate into a gene, the cellular splicing machinery splices the vector coding sequence upstream of the 3' exons of the trapped gene. One advantage of such vectors is that the expression of the 3' gene trap vectors is driven by a promoter within the gene trap cassette and does not require integration into a gene that is normally expressed in the host cell (Zambrowicz *et al.*, WO 99/50426). Examples of transcriptional promoters and enhancers that may be incorporated into the 3' gene trap vector include those discussed above with respect to targeting vectors.

The viral vector backbone used as the structural component for the promoter or 3' gene trap vector may be selected from a wide range of vectors that can be inserted into the genome of a target cell. Suitable backbone vectors include, but are not limited to, herpes simplex virus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, pseudorabies virus, alpha-herpes virus vectors, and the like. A thorough review of viral vectors, in particular, viral vectors suitable for modifying non-replicating cells and how to use such vectors in conjunction with the expression of an exogenous polynucleotide sequence, can be found in *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*, Eds. Caplitt and Loewy, Academic Press, San Diego, 1995.

Preferably, retroviral vectors are used for gene trapping. These vectors can be used in conjunction with retroviral packaging cell lines such as those described in U.S. Patent No. 5,449,614. Where non-murine mammalian cells are used as target cells for genetic modification, amphotropic or pantropic packaging cell lines can be used to package suitable vectors (Ory *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93: 11400-11406, 1996). Representative retroviral vectors that can be adapted to create the presently described 3' gene trap vectors are described, for example, in U.S. Pat. No. 5,521,076.

The gene trapping vectors may contain one or more of the positive marker genes discussed above with respect to targeting vectors used for homologous recombination. Similar to their use in targeting vectors, these positive markers are used in gene trapping vectors to identify and select cells that have integrated the vector into the cell genome. The marker gene may be engineered to contain an independent ribosome entry site (IRES) so that the marker will be expressed in a manner largely independent of the location in which the vector has integrated into the target cell genome.

Given that gene trap vectors will integrate into the genome of infected host cells in a fairly random manner, a genetically modified cell having a disrupted PFI-013 gene must be identified from a population of cells that have undergone random vector integration. Preferably, the genetic modifications in the population of cells are of sufficient randomness and frequency such that the population represents mutations in essentially

every gene found in the cell's genome, making it likely that a cell with a disrupted PFI-013 gene will be identified from the population (see Zambrowicz *et al.*, WO 99/50426; Sands *et al.*, WO 98/14614).

Individual mutant cell lines containing a disrupted PFI-013 gene are identified in a population of mutated cells using, for example, reverse transcription and PCR (RT-PCR) to identify a mutation in a PFI-013 gene sequence. This process can be streamlined by pooling clones. For example, to find an individual clone containing a disrupted PFI-013 gene, RT-PCR is performed using one primer anchored in the gene trap vector and the other primer located in the PFI-013 gene sequence. A positive RT-PCR result indicates that the vector sequence is encoded in the PFI-013 gene transcript, indicating that PFI-013 gene has been disrupted by a gene trap integration event (see, e.g., Sands *et al.*, WO 98/14614).

Temporal, spatial, and inducible gene disruptions

A functional disruption of the endogenous PFI-013 gene can occur at specific developmental or cell cycle stages (temporal disruption) or in specific cell types (spatial disruption). The PFI-013 gene disruption can also be inducible when certain conditions are present. A recombinase excision system, such as a Cre-Lox system, may be used to activate or inactivate the PFI-013 gene at a specific developmental stage, in a particular tissue or cell type, or under particular environmental conditions. Generally, methods utilizing Cre-Lox technology are carried out as described by Torres and Kuhn, *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, Oxford University Press, 1997. Methodology similar to that described for the Cre-Lox system can also be employed utilizing the FLP-FRT system. Further guidance regarding the use of recombinase excision systems for conditionally disrupting genes by homologous recombination or viral insertion is provided, for example, in U.S. Pat. No. 5,626,159, U.S. Pat. No. 5,527,695, U.S. Pat. No. 5,434,066, WO 98/29533, Orban *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 6861-65, 1992; O'Gorman *et al.*, Science 251: 1351-55, 1991; Sauer *et al.*, Nucleic Acids Research 17: 147-61, 1989; Barinaga, Science 265: 26-28, 1994; and

Akagi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 1766-73, 1997. More than one recombinase system can be used to genetically modify an animal cell.

When using homologous recombination to disrupt the PFI-013 gene in a temporal, spatial, or inducible fashion, using a recombinase system such as the Cre-Lox system, a portion of the PFI-013 gene coding region is replaced by a targeting construct comprising the PFI-013 gene coding region flanked by loxP sites. Animal cells carrying this genetic modification contain a functional, loxP-flanked PFI-013 gene. The temporal, spatial, or inducible aspect of the PFI-013 gene disruption is caused by the expression pattern of an additional transgene, a Cre recombinase transgene, that is expressed in the animal cell under the control of the desired spatially-regulated, temporally-regulated, or inducible promoter, respectively. A Cre recombinase targets the loxP sites for recombination. Therefore, when Cre expression is activated, the LoxP sites undergo recombination to excise the sandwiched PFI-013 gene coding sequence, resulting in a functional disruption of the PFI-013 gene (Rajewski *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98: 600-03, 1996; St.-Onge *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24: 3875-77, 1996; Agah *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100: 169-79, 1997; Brocard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14559-63, 1997; Feil *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10887-90, 1996; and Kühn *et al.*, *Science* 269: 1427-29, 1995).

A cell containing both a Cre recombinase transgene and loxP-flanked PFI-013 gene can be generated through standard transgenic techniques. Further guidance regarding the use of recombinase systems specific promoters to temporally, spatially, or conditionally disrupt the PFI-013 gene is found, for example, in Sauer, *Meth. Enz.* 225: 890-900, 1993, Gu *et al.*, *Science* 265: 103-06, 1994, Araki *et al.*, *J. Biochem.* 122: 977-82, 1997, Dymecki, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6191-96, 1996, and Meyers *et al.*, *Nature Genetics* 18: 136-41, 1998.

An inducible disruption of the PFI-013 gene can also be achieved by using a tetracycline responsive binary system (Gossen and Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-51, 1992). This system involves genetically modifying a cell to introduce a Tet promoter into the endogenous PFI-013 gene regulatory element and a transgene

expressing a tetracycline-controllable repressor (TetR). In such a cell, the administration of tetracycline activates the TetR which, in turn, inhibits PFI-013 gene expression and, therefore, functionally disrupts the PFI-013 gene (St.-Onge *et al.*, Nucleic Acids Res. 24: 3875-77, 1996, U.S. Patent No. 5,922,927).

The above-described systems for temporal, spatial, and inducible disruptions of the PFI-013 gene can also be adopted when using gene trapping as the method of genetic modification, for example, as described, for example, in WO 98/29533.

Creating genetically modified animal cells

The above-described methods for genetic modification can be used to functionally disrupt a PFI-013 gene in virtually any type of somatic or stem cell derived from an animal. Genetically modified animal cells of the invention include, but are not limited to, mammalian cells, including human cells, and avian cells. These cells may be derived from genetically engineering any animal cell line, such as culture-adapted, tumorigenic, or transformed cell lines, or they may be isolated from a genetically modified, non-human mammal carrying the desired PFI-013 genetic modification.

The cells may be heterozygous or homozygous for the disrupted PFI-013 gene. To obtain cells that are homozygous for the PFI-013 gene disruption (PFI-013^{-/-}), direct, sequential targeting of both alleles can be performed. This process can be facilitated by recycling a positive selectable marker. According to this scheme the nucleotide sequence encoding the positive selectable marker is removed following the disruption of one allele using the Cre-Lox P system. Thus, the same vector can be used in a subsequent round of targeting to disrupt the second PFI-013 gene allele (Abuin and Bradley, Mol. Cell. Biol. 16: 1851-56, 1996; Sedivy *et al.*, T.I.G. 15: 88-90, 1999; Cruz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7170-74, 1991; Mortensen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7036-40, 1991; te Riele *et al.*, Nature (London) 348: 649-651, 1990).

An alternative strategy for obtaining ES cells that are PFI-013^{-/-} is the homogenization of cells from a population of cells that is heterozygous for the PFI-013 gene disruption (PFI-013^{+/-}). The method uses a scheme in which PFI-013^{+/-}-targeted clones that express a selectable drug resistance marker are selected against a very high drug concentration; this selection favours cells that express two copies of the sequence encoding the drug resistance marker and are, therefore, homozygous for the PFI-013 gene disruption (Mortensen *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 12: 2391-95, 1992).

Following the genetic modification of the desired cell or cell line, the PFI-013 gene locus can be confirmed as the site of modification by PCR analysis according to standard PCR or Southern blotting methods known in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,683,202; and Erlich *et al.*, *Science* 252: 1643, 1991). Further verification of the functional disruption of the PFI-013 gene may also be made if PFI-013 gene messenger RNA (mRNA) levels and/or PFI-013 polypeptide levels are reduced in cells that normally express the PFI-013 gene. Measures of PFI-013 gene mRNA levels may be obtained by using reverse transcriptase mediated polymerase chain reaction (RT-PCR), Northern blot analysis, or *in situ* hybridization. The quantification of PFI-013 polypeptide levels produced by the cells can be made, for example, by standard immunoassay methods known in the art. Such immunoassays include but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzymatic, or radioisotope labels, for example), Western blots, 2-dimensional gel analysis, precipitation reactions, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays.

Preferred genetically modified animal cells are embryonic stem (ES) cells and ES-like cells. These cells are derived from the preimplantation embryos and blastocysts of various species, such as mice (Evans *et al.*, *Nature* 129:154-156, 1981; Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78: 7634-7638, 1981), pigs and sheep (Notianni *et al.*, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43: 255-260, 1991; Campbell *et al.*, *Nature* 380: 64-68, 1996) and

primates, including humans (Thomson *et al.*, U.S. Patent No. 5,843,780, Thomson *et al.*, Science 282: 1145-1147, 1995; and Thomson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844-7848, 1995).

These types of cells are pluripotent. That is, under proper conditions, they differentiate into a wide variety of cell types derived from all three embryonic germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm. Depending upon the culture conditions, a sample of ES cells can be cultured indefinitely as stem cells, allowed to differentiate into a wide variety of different cell types within a single sample, or directed to differentiate into a specific cell type, such as macrophage-like cells, neuronal cells, cardiomyocytes, adipocytes, smooth muscle cells, endothelial cells, skeletal muscle cells, keratinocytes, and hematopoietic cells, such as eosinophils, mast cells, erythroid progenitor cells, or megakaryocytes. Directed differentiation is accomplished by including specific growth factors or matrix components in the culture conditions, as further described, for example, in Keller *et al.*, Curr. Opin. Cell Biol. 7: 862-69, 1995, Li *et al.*, Curr. Biol. 8: 971, 1998, Klug *et al.*, J. Clin. Invest. 98: 216-24, 1996, Lieschke *et al.*, Exp. Hematol. 23: 328-34, 1995, Yamane *et al.*, Blood 90: 3516-23, 1997, and Hirashima *et al.*, Blood 93: 1253-63, 1999.

The particular embryonic stem cell line that is used for genetic modification is not critical; exemplary murine ES cell lines include AB-1 (McMahon and Bradley, Cell 62:1073-85, 1990), E14 (Hooper *et al.*, Nature 326: 292-95, 1987), D3 (Doetschman *et al.*, J. Embryol. Exp. Morph. 87: 27-45, 1985), CCE (Robertson *et al.*, Nature 323: 445-48, 1986), RW4 (Genome Systems, St. Louis, MO), and DBA/1lacJ (Roach *et al.*, Exp. Cell Res. 221: 520-25, 1995).

PRODUCTION OF THE POLYPEPTIDE

According to the present invention, the production of the polypeptide of the present invention can be effected by the culturing of eukaryotic or prokaryotic expression hosts, which have been transformed with one or more polynucleotides of the present invention, in a conventional nutrient fermentation medium. The selection of the appropriate

medium may be based on the choice of expression hosts and/or based on the regulatory requirements of the expression construct. Such media are well-known to those skilled in the art. The medium may, if desired, contain additional components favouring the transformed expression hosts over other potentially contaminating micro-organisms.

Thus, the present invention also provides a method for producing a polypeptide having PFI-013 activity, the method comprising the steps of (a) transforming a host cell with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof; and (b) culturing the transformed host cell under conditions suitable for the expression of said polypeptide.

The present invention also relates to a method for producing a polypeptide having PFI-013 activity, the method comprising the steps of (a) culturing a host cell that has been transformed with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof under conditions suitable for the expression of said polypeptide; and (b) recovering said polypeptide from the host cell culture.

The present invention also relates to a method for producing a polypeptide having PFI-013 activity, the method comprising the steps of (a) transforming a host cell with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof; (b) culturing the transformed host cell under conditions suitable for the expression of said polypeptide; and (c) recovering said polypeptide from the host cell culture.

RIBOZYMES

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalysing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridisation of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Within the scope of the invention are engineered hammerhead motif

ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyse endonucleolytic cleavage of PFI-013 RNA sequences.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide sequence inoperable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing accessibility to hybridisation with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

Both antisense RNA and DNA molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of RNA molecules. These include techniques for chemically synthesising oligonucleotides such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* or *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly can be introduced into cell lines, cells or tissues.

DETECTION

The presence of the PFI-013 polynucleotide coding sequence can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation or amplification using probes, portions or fragments of the sequence presented in SEQ ID NO: 1. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides or oligomers based on the PFI-013 coding sequence to detect transformants containing PFI-013 DNA or RNA. As used herein "oligonucleotides" or "oligomers" may refer to a nucleic acid sequence of at least about 10 nucleotides and as many as about 60 nucleotides, preferably about 15 to 30 nucleotides, and more preferably about 20 to 25 nucleotides which can be used as a

probe or amplifier. Preferably, oligonucleotides are derived from the 3' region of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of PFI-013 polypeptide, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a PFI-013 polypeptide is preferred, but a competitive binding assay may also be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al.* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, USA) and Maddox DE *et al.* (1983, J Exp Med 15 8:1211).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labelled hybridisation or PCR probes for detecting PFI-013 polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification using a labelled nucleotide. Alternatively, the PFI-013 coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

A number of companies such as Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA), Promega (Madison, WI, USA), and US Biochemical Corporation (Cleveland, OH, USA) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabelling (Melby PC *et al.*, 1993, *J. Immunol Methods* Vol 159 p235-44) or biotinylating (Duplaa C *et al.*, 1993, *Anal Biochem* Vol 229 p36) nucleotides, co-amplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the PFI-013 coding sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing PFI-013 coding regions can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a PFI-013 coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of PFI-013 as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for PFI-013 and express PFI-013 coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

ANTIBODIES

The amino acid sequence of the present invention can also be used to generate antibodies - such as by use of standard techniques - against the amino acid sequence.

Procedures well known in the art may be used for the production of antibodies to PFI-013 polypeptides. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal,

monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab expression library. Neutralising antibodies, i.e. those which antagonise biological activity of PFI-013 polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, etc. may be immunised by injection with the PFI-013 polypeptide or any portion, variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof or oligopeptide which retains immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed.

Monoclonal antibodies to the amino acid sequence may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975, *Nature* Vol 256 p495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al.* (1983) *Immunol Today* Vol 4 p72; Cote *et al.* (1983) *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* Vol 80 p2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss Inc, pp. 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al.* (1984) *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* Vol 81 p6851-6855; Neuberger *et al.* (1984) *Nature* Vol 312 p604-608; Takeda *et al.* (1985) *Nature* Vol 314 p452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US-A-4946779) can be adapted to produce polypeptide-specific single chain antibodies.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al.* (1989, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) Vol 86 p 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature Vol 349 p293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for PFI-013 may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulphide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al.* (1989) Science Vol 256 p1275-1281).

An alternative technique involves screening phage display libraries where, for example the phage express scFv fragments on the surface of their coat with a large variety of complementarity determining regions (CDRs). This technique is well known in the art.

PFI-013-specific antibodies are useful for the diagnosis of conditions and diseases associated with expression of the PFI-013 receptor. A variety of protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the formation of complexes between PFI-013 polypeptide and its specific antibody (or similar PFI-013-binding molecule) and the measurement of complex formation. A two-site, monoclonal based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two, non-interfering epitopes on a specific PFI-013 protein is preferred, but a competitive binding assay may also be employed. These assays are described in Maddox DE *et al.* (1983, Journal of Experimental Medicine Vol 158 p1211).

Anti-PFI-013 antibodies are useful for the diagnosis of disorders involving abnormal signal transduction or other disorders or diseases characterised by abnormal expression

of a PFI-013 receptor. Diagnostic assays for PFI-013 include methods utilising the antibody and a label to detect a PFI-013 polypeptide in human body fluids, cells, tissues or sections or extracts of such tissues. The polypeptides and antibodies of the present invention may be used with or without modification. Frequently, the polypeptides and antibodies will be labelled by joining them, either covalently or noncovalently, with a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules are known to those of skill in the art.

Antibodies may be used in method of detecting polypeptides of the invention present in biological samples by a method which comprises: (a) providing an antibody of the invention; (b) incubating a biological sample with said antibody under conditions which allow for the formation of an antibody-antigen complex; and (c) determining whether antibody-antigen complex comprising said antibody is formed.

Antibodies of the invention may also be used for the enrichment or isolation of eosinophils from mammalian, preferably human blood. In a preferred embodiment of this aspect of the invention, the antibodies are bound to a solid support, e.g. magnetic beads, incubated with the peripheral blood leukocytes, then the beads with bound eosinophils are removed from the unbound cells using a magnet. Other similar methods for use of antibodies for isolation of specific cells from a mixture of cell types are well known to the person skilled in the art.

Antibodies of the invention may be bound to a solid support and/or packaged into kits in a suitable container along with suitable reagents, controls, instructions and the like.

ASSAYS/IDENTIFICATION METHODS

The present invention also relates to an assay method for detecting the presence of PFI-013 in cells (such as human cells) comprising: (a) performing a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on RNA (such as total RNA) from such cells using a pair of PCR primers that are specific for PFI-013, as determined from the DNA sequence

shown in SEQ ID NO: 1 or an allelic variation thereof; and (b) assaying the appearance of an appropriately sized PCR fragment - such as by agarose gel electrophoresis.

There are numerous assays in which the polypeptide of the present invention can be used to screen for modulators (e.g. antagonists or agonists) of the polypeptide. Examples of such assays include:

Functional Assay - One example of a method for screening receptors to identify modulators thereof is to monitor the inhibitory or stimulatory effect on cAMP or adenylate cyclase accumulation. Such an assay involves transfecting a mammalian cell with the receptor of the present invention for cell surface expression. The cell is then exposed to a putative modulator and the amount of cAMP accumulation is measured. If the putative modulator binds the receptor and has a functional effect, the levels of receptor-mediated cAMP or adenylate cyclase activity will either increase or decrease.

Functional Assay using a Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR®) - A technique used for screening and includes the use of cells that express the receptor of the present invention (for example, transfected HEK293 cells) in a system that measures intracellular calcium or extracellular pH changes caused by receptor activation. In this technique, cells expressing the receptor of the invention may be contacted with compounds (e.g. small molecules, peptides, lipids, nucleotides or glycoproteins) that cause a second messenger response, e.g. signal transduction, change in calcium levels or pH changes. These changes are used to determine whether the potential compound activates or inhibits the receptor.

Ligand Binding Assay - This type of assay may test binding of a candidate compound, where adherence to the cells containing the receptor of the present invention is detected by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound or in an assay involving competition with a labelled competitor. Standard assays for conducting screens that determine if the compound activates or inhibits the receptor are well understood by those skilled in the art.

The present invention therefore also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that affect (such as antagonise, agonise or otherwise modify) the activity of PFI-013 and/or the expression thereof, the method comprising contacting PFI-013 or the nucleotide sequence coding for the same with the agent and then measuring the activity of PFI-013 and/or the expression thereof.

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that selectively affect (such as antagonise, agonise or otherwise modify) the activity of PFI-013 and/or the expression thereof, the method comprising contacting PFI-013 or the nucleotide sequence coding for the same with the agent and then measuring the activity of PFI-013 and/or the expression thereof.

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that affect (such as antagonise, agonise or otherwise modify) the activity of PFI-013 and/or the expression thereof, the method comprising measuring the activity of PFI-013 and/or the expression thereof in the presence of the agent or after the addition of the agent in: (a) a cell line into which has been incorporated recombinant DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or an allelic variation thereof, or (b) a cell population or cell line that naturally selectively expresses PFI-013. Preferably, the activity of PFI-013 is determined by the assay methods described above.

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that selectively affect (such as antagonise, agonise or otherwise modify) the activity of PFI-013 and/or the expression thereof, the method comprising measuring the activity of PFI-013 and/or the expression thereof in the presence of the agent or after the addition of the agent in: (a) a cell line into which has been incorporated recombinant DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or an allelic variation thereof, or (b) a cell population or cell line that

naturally selectively expresses PFI-013. Preferably, the activity of PFI-013 is determined by the assay methods described above.

The present invention also relates to a method of screening an agent for modulation (preferably for specific modulation) of PFI-013 (or a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) activity or the expression of the nucleotide sequence coding for the same (including a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof), the method comprising the steps of: (a) providing a candidate agent; (b) combining PFI-013 (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) with the candidate agent for a time sufficient to allow modulation under suitable conditions; and (c) detecting modulation of the candidate agent to PFI-013 (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) in order to ascertain if the candidate agent modulates PFI-013 (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) activity or the expression of the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof).

The present invention also relates to a method of screening an agent for specific binding affinity with PFI-013 (or a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (including a derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof), the method comprising the steps of: (a) providing a candidate agent; (b) combining PFI-013 (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) with the candidate agent for a time sufficient to allow binding under suitable conditions; and (c) detecting binding of the candidate agent to PFI-013 (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof) in order to ascertain if the candidate agent binds to PFI-013 (or the derivative, homologue, variant, analogue or

fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant, analogue or fragment thereof).

Thus, in certain embodiments of the present invention, PFI-013 or a variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof and/or a cell line that expresses the PFI-013 or variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof may be used to screen for antibodies, peptides, or other agents, such as organic or inorganic molecules, that act as modulators (e.g. antagonists or agonists) of PFI-013 activity or for the expression thereof, thereby identifying a therapeutic agent capable of modulating the receptor. Alternatively, screening of peptide libraries or organic libraries made by combinatorial chemistry with recombinantly expressed PFI-013 or a variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof or cell lines expressing PFI-013 or a variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof may be useful for identification of therapeutic agents that function by modulating the receptor. Synthetic compounds, natural products, and other sources of potentially biologically active materials can be screened in a number of ways deemed to be routine to those of skill in the art. For example, nucleotide sequences encoding the N-terminal region of PFI-013 may be expressed in a cell line, which can be used for screening of allosteric modulators, either agonists or antagonists, of PFI-013 activity.

A PFI-013 polypeptide, its immunogenic fragments or oligopeptides thereof can be used for screening therapeutic compounds in any of a variety of drug screening techniques. The polypeptide employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The formation of binding complexes between a PFI-013 polypeptide and the agent being tested may be measured.

Accordingly, the present invention relates to a method for screening one or a plurality of compounds for modulation (preferably specific modulation, such as specific binding affinity) of PFI-013 or the expression thereof, or a portion thereof or variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof, comprising providing one or a plurality of compounds; combining a PFI-013 or a nucleotide sequence coding for the same or a portion thereof or variant, homologue, fragment, analogue or derivative

thereof with the or each of a plurality of compounds for a time sufficient to allow modulation under suitable conditions; and detecting binding of a PFI-013, or portion thereof or variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof, to each of the plurality of compounds, thereby identifying the compound or compounds which modulate a PFI-013 or a nucleotide sequence coding for the same. In such an assay, the plurality of compounds may be produced by combinatorial chemistry techniques known to those of skill in the art.

Another technique for drug screening provides for high throughput screening (HTS) of compounds having suitable binding affinity to the PFI-013 polypeptides and is based upon the method described in detail in Geysen, WO 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with PFI-013 fragments and washed. A bound PFI-013 is then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified PFI-013 can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a PFI-013 polypeptide specifically compete with a test compound for binding a PFI-013. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with a PFI-013.

The assay method of the present invention may be a high throughput screen (HTS). In this regard, the teachings of WO 84/03564 may be adapted for the PFI-013 of the present invention.

The teachings of US-A-5738985 may also be adapted for the assay method of the present invention.

AGENTS

The present invention also provides one or more agents identified by the assays methods and identification methods of the present invention.

The agent of the present invention can be, for example, an organic compound or an inorganic compound. The agent can be, for example, a nucleotide sequence that is antisense to all or part of the sequence shown in SEQ ID NO: 1.

The invention further provides an agent of the present invention (or even a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a pharmaceutically acceptable solvate thereof) or a pharmaceutical composition containing any of the foregoing, for use as a medicament.

The present invention also relates to the use of an agent to affect PFI-013 activity (such as to antagonise, modulate or agonise its GPCR activity).

DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition for the detection of PFI-013 polynucleotide sequences. The diagnostic composition may comprise the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or a variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or an allelic variation thereof.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a PFI-013 polypeptide expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with antibody to a PFI-013 polypeptide under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified PFI-

013 polypeptide. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to a PFI-013 polypeptide expression. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A PFI-013 polynucleotide, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, PFI-013 polynucleotide sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which PFI-013 activity may be implicated.

PFI-013-encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of diseases resulting from expression of PFI-013. For example, polynucleotide sequences encoding PFI-013 may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, such as serum, synovial fluid or tumour biopsy, to detect abnormalities in PFI-013 expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and ELISA or other multiple sample format technologies. All of these techniques are well known in the art and are, in fact, the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for PFI-013 expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with PFI-013 or a portion thereof, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified PFI-013 is used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the PFI-013 coding sequence. Deviation between standard and subject values

establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Thus, the present invention relates to the use of a PFI-013 polypeptide, or variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof, to produce anti-PFI-013 antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify PFI-013 levels in disease states.

The present invention further relates to diagnostic assays and kits for the detection of PFI-013 in cells and tissues comprising a purified PFI-013 which may be used as a positive control, and anti-PFI-013 antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of PFI-013 protein or expression of deletions or a variant, homologue, fragment, analogue or derivative thereof.

Alternatively, the present invention provides a process for diagnosing in a patient a disease or a susceptibility to a disease related to an under-expression of PFI-013 comprising: determining a mutation in the nucleic acid sequence encoding PFI-013, or the amount of the PFI-013 in a sample derived from a patient. There is also provided a diagnostic process comprising analysing for the presence of PFI-013 in a sample derived from a host.

PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding PFI-013 coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e. whether it is derived from a highly

conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring PFI-013 coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly conserved nucleotide regions of PFI-013 polynucleotides, such as the 3' region, and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of PFI-013 polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to the PFI-013 coding sequence disclosed herein and does not occur in related sequences.

PCR, as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon the PFI-013 sequence. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'→3') and one with antisense (3'←5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for PFI-013 can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al.* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City, USA), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions or single chromosome cDNA libraries.

In situ hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in *Science* (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome, such as ataxia telangiectasia (AT), has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region, for example, AT to 11q22-23 (Gatti *et al* (1988) *Nature* 336:577-580), any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

PHARMACEUTICALS

The present invention also provides a pharmaceutical composition for treating an individual in need of the same due to PFI-013 activity, the composition comprising a therapeutically effective amount of an agent that modulates (such as antagonises or agonises) said activity and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient or adjuvant.

Thus, the present invention also covers pharmaceutical compositions comprising the agents of the present invention (an agent capable of modulating the expression pattern of the nucleotide sequence of the present invention or the activity of the expression product thereof and/or an agent identified by an assay according to the present invention). In this regard, and in particular for human therapy, even though the agents of the present invention can be administered alone, they will generally be administered in admixture with a pharmaceutical carrier, adjuvant, excipient or diluent selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.

By way of example, in the pharmaceutical compositions of the present invention, the agents of the present invention may be admixed with any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), or solubilising agent(s).

In general, a therapeutically effective daily oral or intravenous dose of the agents of the present invention is likely to range from 0.01 to 50 mg/kg body weight of the subject to be treated, preferably 0.1 to 20 mg/kg. The agents of the present invention may also be administered by intravenous infusion, at a dose which is likely to range from 0.001-10 mg/kg/hr.

Thus, the present invention also provides a method of treating an individual in need of the same due to PFI-013 activity comprising administering to said individual an effective amount of the pharmaceutical composition of the present invention.

Typically, the physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual patient and it will vary with the age, weight, sex and response of the particular patient. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited, and such are within the scope of this invention.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intracavernosally, intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual

administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

For oral, parenteral, buccal and sublingual administration to subjects (such as patients), the daily dosage level of the agents of the present invention may typically be from 10 to 500 mg (in single or divided doses). Thus, and by way of example, tablets or capsules may contain from 5 to 100 mg of active agent for administration singly, or two or more at a time, as appropriate. It is also possible to administer the agents of the present invention in sustained release formulations.

In some applications, generally in humans, oral administration of the agents of the present invention is the preferred route, being the most convenient and can in some cases avoid disadvantages associated with other routes of administration - such as those associated with intracavernosal (i.c.) administration. In circumstances where the recipient suffers from a swallowing disorder or from impairment of drug absorption after oral administration, the drug may be administered parenterally, sublingually or buccally.

For veterinary use, the agent of the present invention is typically administered as a suitably acceptable formulation in accordance with normal veterinary practice and the veterinary surgeon will determine the dosing regimen and route of administration which will be most appropriate for a particular animal. However, as with human treatments, it may be possible to administer the agent alone for veterinary treatments.

Typically, the pharmaceutical compositions - which may be for human or animal usage - will comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, excipient or adjuvant. The choice of pharmaceutical carrier, excipient, adjuvant or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. As indicated above, the pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient, adjuvant or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s) or solubilising agent(s).

In some embodiments of the present invention, the pharmaceutical compositions will comprise one or more of: an agent that has been screened by an assay of the present invention; an agent that is capable of interacting with SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2 including derivatives, fragments, homologues, analogues or variants thereof or sequences capable of hybridising to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1.

Included in the scope of the invention are oligonucleotide sequences, antisense RNA and DNA molecules and ribozymes, which function to destabilise PFI-013 mRNA or inhibit translation of PFI-013.

A PFI-013 antisense molecule may provide the basis for treatment of various abnormal conditions related to, for example, increased PFI-013 activity.

Expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used for delivery of recombinant PFI-013 sense or antisense molecules to the targeted cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors containing PFI-013. Alternatively, recombinant PFI-013 can be delivered to target cells in liposomes.

The full length cDNA sequence and/or its regulatory elements enable researchers to use PFI-013 as a tool in sense (Yousoufian H and HF Lodish (1993) *Mol Cell Biol* 13:98-104) or antisense (Eguchi *et al* (1991) *Annu Rev Biochem* 60:631-652) investigations of gene function. Oligonucleotides, designed from the cDNA or control sequences obtained from the genomic DNA can be used *in vitro* or *in vivo* to inhibit expression. Such technology is now well known in the art, and sense or antisense oligonucleotides or larger fragments can be designed from various locations along the coding or control regions. Appropriate oligonucleotides, which can be 20 nucleotides in length, may be used to isolate PFI-013 sequences or closely related molecules from human libraries.

Additionally, PFI-013 expression can be modulated by transfecting a cell or tissue with expression vectors which express high levels of a PFI-013 fragment in conditions where it would be preferable to block PFI-013 activity. Such constructs can flood cells with

untranslatable sense or antisense sequences. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until all copies of the vector are disabled by endogenous nucleases. Such transient expression may last for a month or more with a non-replicating vector and even longer if appropriate replication elements are part of the vector system.

Modifications of gene expression can be obtained by designing antisense sequences to the control regions of the PFI-013 gene, such as the promoters, enhancers, and introns.

Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g. between -10 and +10 regions of the leader sequence, are preferred. Antisense RNA and DNA molecules may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes. Similarly, inhibition can be achieved using Hogeboom base-pairing methodology, also known as "triple helix" base-pairing. Triple helix pairing compromises the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules.

Thus the invention provides a pharmaceutical composition comprising an agent of the present invention (or even a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a pharmaceutically acceptable solvate thereof) together with a pharmaceutically acceptable diluent, adjuvant, excipient or carrier.

The pharmaceutical composition could be for veterinary (i.e. animal) usage or for human usage.

Thus, the present invention therefore also relates to pharmaceutical compositions comprising effective amounts of modulators (e.g. antagonists or agonists) of PFI-013 protein (including antisense nucleic acid sequences) in admixture with a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, excipient or adjuvant (including combinations thereof).

The present invention relates to pharmaceutical compositions which may comprise all or portions of PFI-013 polynucleotide sequences, PFI-013 antisense molecules, PFI-013 polypeptides, protein, peptide or organic modulators of PFI-013 bioactivity, such as antagonists (including antibodies) or agonists, alone or in combination with at least one other agent, such as stabilising compound, and may be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water.

GENERAL METHODOLOGY REFERENCES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

DEPOSITS

The following sample was deposited in accordance with the Budapest Treaty at the recognised depositary The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) at 23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, AB2 1RY, United Kingdom on 23 August 2000:

NCIMB number NCIMB 41073 is *Escherichia coli* Pfi-013.

The depositor was Pfizer Central Research, Pfizer Limited, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, United Kingdom.

One skilled in the art could readily grow the above-mentioned *E. coli* clone (NCIMB 41073) in Luria Broth containing ampicillin and isolate the plasmid DNA of the clone using the alkali lysis method as described in Sambrook, *et al.*, eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY,

USA. The di-deoxy termination method as described by Sanger *et al.* (Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) (Dec. 1977), 74(12):5463-5467) and modified by Applied Biosystems (see Applied Biosystems manufacturer's literature) for fluorescent detection could then be used to sequence the DNA and identify PFI-013.

The present invention also encompasses sequences derivable and/or expressible from that deposit and embodiments comprising the same. The present invention also encompasses partial sequences derivable and/or expressible from that deposit and embodiments comprising the same, wherein those partial sequences code for active polypeptides. The present invention also encompasses proteins comprising sequences derivable and/or expressible from that deposit and embodiments comprising the same. The present invention also encompasses proteins comprising partial sequences derivable and/or expressible from that deposit and embodiments comprising the same, wherein those partial sequences code for active polypeptides.

INTRODUCTION TO THE EXAMPLES SECTION, ~~THE FIGURES~~ AND THE SEQUENCE LISTING

The present invention will now be described, by way of example only, with reference to the accompanying ~~Figures and~~ Sequence Listing in which:-

SEQ ID NO: 1 shows the nucleotide sequence coding for PFI-013. The ATG translation initiation codon is indicated by the first three letters. The stop codon is indicated by the last three letters.

SEQ ID NO: 2 shows the corresponding amino acid sequence coding for PFI-013.

SEQ ID NOS: 3-10 show the PCR primers used in the Examples.

The polynucleotide which encodes the GPCR of the present invention was cloned and the DNA and amino acid sequences analysed using various bioinformatic tools. The GPCR encoded by the sequences described herein has been termed PFI-013.

Experimental section

Example 1

IDENTIFICATION OF PFI-013

PFI-013 was first identified in an expressed sequence tag (EST) database with sequences derived from a cDNA library from eosinophils stimulated with IL-5, but only as a partial sequence. Searching of the public genomic databases led to the identification of the full length PFI-013 sequence and the determination of its homology to histamine H3 receptors using, *inter alia*, the BLAST algorithm.

Example 2

BIOINFORMATIC STUDIES

In order to confirm that PFI-013 was a member of the GPCR family, a number of bioinformatics approaches were performed (see Figure 1).

(a) BLAST Search against Swissprot

PFI-013 was searched against Swissprot using the BLAST algorithm (Basic Local Alignment Search Tool (Altschul SF (1993) J.Mol. Evol. 36:290-300; Altschul, SF *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, SF *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402)) to identify the closest protein match. In this case the top hit was to:

AF140538-01 PRI AAD38151.1 Homo sapiens histamine H3 receptor mRNA, complete coding sequence (CDS).

These results indicate that PFI-013 is a member of the GPCR family.

(b) ClustalW Alignment of PFI-013 with human histamine H3 receptor

These results are shown in Figure 2.

(c) Genomic organisation of the genes for PFI-013 and human histamine H3 receptors

The genes for PFI-013 and histamine H3 receptors have a very similar structure, as shown in Figure 3. Figure 3 also shows the part of the sequence originally identified as the EST in the eosinophil cDNA library.

(d) BLAST search against a non-redundant human GPCR database

PFI-013 was searched against a non-redundant human GPCR database comprising mainly sequences from Genbank and Geneseq Patents databases in order to identify the class of agonist for this receptor. The top ten hits are shown below:

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
AF140533	GPCR0022	11 Histamine H3 receptor	258	7e-74 GO
ALAB_HUMAN	GPCR0007	8 Alpha-1B adrenergic receptor	145	8e-37 GO
SH1D_HUMAN	GPCR0025	12 5-hydroxytryptamine 1D receptor (5-HT...	136	4e-34 GO
SH1F_HUMAN	GPCR0027	12 5-hydroxytryptamine 1F receptor (5-HT...	134	2e-33 GO
SH1B_HUMAN	GPCR0024	12 5-hydroxytryptamine 1B receptor (5-HT...	132	6e-33 GO
ALAD_HUMAN	GPCR0008	8 Alpha-1D adrenergic receptor	132	1e-32 GO
D3DR_HUMAN	GPCR0016	10 D(3) dopamine receptor	127	2e-31 GO
ACM3_HUMAN	GPCR0003	6 Muscarinic acetylcholine receptor M3	118	2e-28 GO
ACM5_HUMAN	GPCR0005	6 Muscarinic acetylcholine receptor M5	109	6e-26 GO
ACM2_HUMAN	GPCR0002	6 Muscarinic acetylcholine receptor M2	106	5e-25 GO

(E Value = statistical likelihood of the hit occurring by chance)

These results demonstrate that PFI-013 is most similar to histamine receptors, and they suggest that PFI-013 encodes a novel GPCR whose ligand is likely to be an amine.

Example 3**ISOLATION OF PFI-013**

Total RNA was extracted from 1×10^5 AML14.3D10 cells, obtained from Dr. C.C. Paul, VA Medical Center, Dayton, Ohio, USA (Baumann, M.A. & Paul, C. C. (1998) Stem Cells 16: 16-24), using the Qiagen RNeasy Maxi kit according to manufacturer's recommendations. mRNA was subsequently isolated from the aforementioned total RNA using a Qiagen oligotex mRNA purification kit, according to the manufacturer's recommendations. 1 μ g of AML14.3D10 mRNA was reverse transcribed to cDNA using Display Thermo-RT® (Display Systems Biotech) according to the supplied protocol utilising a PFI-013 gene specific primer PFI-013-rt (SEQ ID NO: 5). PFI-013 specific primers (PFI-013 forward and PFI-013 reverse; SEQ ID NOS: 3 and 4, respectively) were employed in a PCR to amplify the PFI-013 coding region from the AML14.3D10 cDNA, where the conditions were as follows:-

PCR mix:

PFI-013 primers	1 μ l (1 μ M final concentration)
AML14.3D10 cDNA	2 μ l ($1/10^6$ of cDNA stock)
dNTPs (concentration as per kit)	1 μ l
Elongase Polymerase (LTI, Inc.)	1 μ l
Buffer B (from Elongase kit)	10 μ l
DMSO	5 μ l
dH ₂ O	30 μ l

PCR primers:

Forward Primer (= PFI-013 forward):

5'- ACCATGCCAGATACTAATAGCACAATC-3' (SEQ ID NO: 3)

Reverse Primer (= PFI-013 reverse):

5'-TTAAGAAGATACTGACCGACTGTG-3' (SEQ ID NO: 4)

Reverse Transcription Primer:

5'-GGGCAAGATAAAGGGCAGACCAGAT-3' (SEQ ID NO: 5)

PCR cycle:

(1) 94°C 1min

(2) 60°C 1.5 mins

(3) 68°C 3 mins

Steps (1) through to (3) were repeated for a further 34 cycles.

(4) 68°C 10 mins

(5) 4°C soak.

The PFI-013 PCR product was gel extracted using the QIAgen gel extraction kit, according to the manufacturer's instructions. The resultant product was TA cloned (Invitrogen TA cloning methodology) into the vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The resulting insert was subsequently sequence-verified on both strands using ABI DNA sequencing methodology as per the manufacturer's protocol.

Example 4

TISSUE DISTRIBUTION OF PFI-013

(a) Northern blot

(i) Probe production

A 261 bp fragment towards the 3' end of PFI-013 gene was PCR amplified using the following primers:

PCR primers:

PFI-013F: 5'-TCCTTCTCCCAATCAGATTCTGTAGC-3' (SEQ ID NO: 6)

PFI-013B: 5'-GTATCCATTGTGTCACAAGCGC-3' (SEQ ID NO: 7)

PCR mix:

PFI-013 primers	5 μ l each (1 μ M final concentration)
PFI-013 plasmid	1 μ l (50 ng)
dNTPs (concentration as per kit)	1 μ l
Advantage Polymerase (Clontech)	1 μ l
Buffer N (from Invitrogen optimiser kit)	10 μ l
dH ₂ O	28 μ l

PCR cycle:

(1) 94°C 1min

(2) 68°C 1.5 mins

Steps (1) and (2) were repeated for a further 29 cycles.

(3) 68°C 10 mins

(4) 4°C soak.

The PCR reaction was electrophoresed through a 0.8% agarose gel processed in x1 TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA buffer, pH8.3; Sigma). The resulting band was excised from the gel using a Qiaquick® Gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations, in a 50 μ l volume of 10 mM Tris-Cl pH8.0. 5 μ l of the purified PCR product was labelled with ³²P-dCTP using Amersham Random Prime Kit (Amersham Pharmacia Biotech), according to the manufacturer's recommendations, and subsequently purified using a Chromaspin Spin + TE-30 column (Clontech).

(ii) *Hybridisation*

Human & Human II Multiple tissue Northern Blots (MTNs – Clontech) were pre-hybridised at 68°C for 1hr with 25 ml of Express Hyb solution (Clontech). The PFI-013 probe was added to a further 25 ml of pre-heated (68°C) Express Hyb solution. The pre-hybridisation solution was decanted from the membranes, and the hybridisation solution was added to the membranes. The membranes were incubated at 68°C for 16 hrs. The membranes were washed twice with x0.5 SSPE/0.1% SDS at 68°C and then exposed to BioMAX Autoradiography film (Kodak) for 1 week at -80°C.

The results are shown in Figure 4. Greatest level of PFI-013 mRNA expression was observed in peripheral blood leukocytes (PBLs) with detectable expression in spleen, testis, and colon.

(b) **Taqman® quantitative PCR analysis**

A standard curve reaction was used to quantify PFI-013 expression, using a 0.55 µg/µl plasmid solution of pcDNA3.1 containing the PFI-013 coding sequence. The plasmid solution was serially diluted in log steps to 10⁻¹². The standard curve was set up using this dilution for 2-200,000 copies/well. 300 nM of each primer (PFI-013F-taq (SEQ ID NO: 8) and PFI-013R-taq (SEQ ID NO: 9)) and 150 nM of PFI-013CP (SEQ ID NO: 10) were used with 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). 1 ng of cDNA from Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panels, Human I and Human II (Clontech), were used as the templates. The reaction was run on the TaqMan® 7700 Sequence Detection System as a single reporter, real time quantitation with 25 µl reaction volume and every point in triplicate. PCR conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min for 40 cycles. The results were analysed by the sequence detection software. The baseline, i.e. the background for the fluorescence readings, was set to 3-12 cycles. The results file was exported to Excel (Microsoft), and the standard curve regenerated with the detection parameters from the results file. Results are expressed as copy number of PFI-013 transcripts per 1 ng of tissue cDNA, with error bars representing the standard deviation (see Figure 5).

PCR primers used:

PFI-013F-taq: 5'-AATATTTTATTGGAGCCTGTGGAA-3' (SEQ ID NO: 8)

PFI-013R-taq: 5'-GGAAGAGACAGCAGTCAGTCCA-3' (SEQ ID NO: 9)

PFI-013CP: 5'-FAM-ACACAAAGGATATCAGCGAAAGGCAAGCC-TAMRA-3'
(SEQ ID NO: 10)

The results are shown in Figure 5. The quantitative PCR results support the Northern blot data, in that the greatest level of expression was observed in peripheral blood leukocytes (P.B.Leukocyte), followed by spleen and testis; with low levels of expression detected in the remaining samples.

Example 5**LIGAND-BINDING ASSAY**

2 x 10⁸ CHO-K1 cells were transfected with pcDNA3.1/V5-His-TOPO-PFI-013 or mock-transfected, using Lipofectamine Plus (Gibco-BRL) according to manufacturer's recommendations. After incubation for 48 hours post-transfection, crude membrane preparations were made as follows: The cells were harvested by scraping, resuspended in 20 ml of ice-cold assay buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)), homogenised, and the resulting suspension was centrifuged at 20,000g, 4°C for 30 minutes. The supernatant was decanted, pellet resuspended in 3 ml of assay buffer and re-homogenised (50 mM Tris-HCl pH7.4). Protein concentration was determined via Bradford's assay (Biorad), according to the manufacturer's recommendations.

Aliquots of this membrane preparation containing 200 µg protein were then incubated with various concentrations of ³H-histamine (e.g. 0.72-1500 nM; ³H-histamine obtained from Amersham Pharmacia Biotech) for 2 hrs at 30°C. To terminate incubations,

samples were rapidly filtered using the Brandell cell harvester onto Wallac Filtermats (Perkin Elmer) (which had been previously soaked (for 1h) in a 0.3% (v/v) solution of PEI (polyethylenimine; Sigma) in assay buffer to reduce Filtermat binding). Immediately, the Filtermat/wells were washed four times in rapid succession with 2 ml of assay buffer per well. Filtermats were dried using a microwave oven, and Meltilex scintillant (Perkin Elmer) was melted onto the Filtermats using the Wallac Meltilex heat sealer. The bound radioactivity on the Filtermats was determined using the Wallac betaplate scintillation counter.

The data were expressed as the difference between radioactivity bound to the membranes from PFI-013-transfected and mock-transfected cells.

Preliminary data, shown in Figure 6, suggest that histamine binds to PFI-013, albeit with relatively low affinity.

Example 6

FUNCTIONAL CELL-BASED ASSAYS FOR HISTAMINE AND HISTAMINE AGONIST ACTIVATION OF PFI-013

Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR®) technology was employed as a means to detect activation of PFI-013 by histamine or histamine agonists in a cell-based assay.

5×10^6 Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells expressing the mouse $G\alpha_{15}$ gene (from here on called '293 cells'), were transiently transfected with 7.5 μ g of PFI-013 (contained within the pcDNA4HISmaxB (Invitrogen) plasmid) vector, or vector alone, using Lipofectamine Plus® reagent (Gibco BRL) as per the manufacturer's protocol. The PFI-013 cDNA had been cloned into pcDNA4HISmaxB using restriction sites *Kpn*I and *Not*I to excise the PFI-013 cDNA from pcDNA3.1/V5-His-TOPO and to insert the cDNA into pcDNA4HISmaxB using standard molecular biology techniques (e.g. according to Sambrook, *et al.*, eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) and using T4 DNA ligase

to join the fragments; pcDNA4HISmaxB was used as it contains elements that up-regulate the level of gene transcription over standard pcDNA3.1 vectors). 24 hrs post-transfection, the cells were detached from the flask using Trypsin/EDTA solution (LTI) and seeded into a black sided, Poly-D-lysine-treated, 96-well plate (Becton Dickinson) at 5×10^4 cells/well density. The plates were left overnight to allow the cells to adhere to the bottom of the wells. The medium was removed from the cells and replaced with 100 μ l warm (37°C) dye loading solution (50 μ g Fluo3 (Molecular probes) in 20 μ l DMSO + 20% pluronic acid in DMSO, added to 11 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium containing 1x Probenecid (100x Probenecid - 0.71 g Probenecid was dissolved in 5 ml 1M NaOH and 5 ml Dulbeccos' Phosphate Buffered Saline (PBS), per plate; Probenecid (Molecular Devices) inhibits activity of the anion transport protein, thus improving dye loading). The plates were then incubated for 1 hr at 37°C. Plates were subsequently washed with 250 μ l of wash buffer per well (5 ml 100x Probenecid stock + 495 ml PBS, pH 7.4) 4 times. The plates were returned to the 37°C/5%CO₂ incubator for 30 mins prior to processing within the FLIPR® instrument. The FLIPR® processing involved reading the fluorescence for all samples for 2 minutes; during this time the fluorescence baseline was determined for 10 seconds. The desired amount of compound (i.e. histamine or histamine agonists) was then automatically transferred to the wells and the fluorescence was continuously monitored for the remainder of the time. All compounds were diluted in wash buffer.

(a) Histamine activation of PFI-013 in a FLIPR® cell-based assay

Using methodology as described in detail above, the effect of histamine on the functional activation of PFI-013 was investigated.

Figure 7 depicts the action of 10 μ M histamine dihydrochloride serially diluted in log concentrations down to 10 pM (columns 2 to 8) in duplicate (rows B and C), on PFI-013-transfected 293 cells (Figure 7A) or vector-only transfected 293 cells (Figure 7B). Remaining wells contained buffer only with no compound. A specific activation of PFI-013 by histamine was found at the 10 μ M concentration.

(b) **Analysis of PFI-013 activation by various histaminergic compounds in a FLIPR® cell-based assay**

Using methodology as described in detail above, the effect of histaminergic compounds on the functional activation of PFI-013 was investigated.

Figure 8 depicts the action of various histaminergic compounds (columns 2 to 10) serially diluted from 10 μ M (rows A and B) down to 0.5 μ M in duplicate (rows G and H), on PFI-013-transfected 293 cells (Figure 8A) or vector-only transfected 293 cells (Figure 8B). Remaining wells contained buffer only with no compound.

The results indicate that PFI-013 is activated, in a rank order of potency, by N- α -methyl histamine (column 6) > histamine (column 4) > R- α -methyl histamine (column 5) = histamine-1-methyl (column 8). For the remaining compounds tested (Dimaprit, L-histidine, Imetit, nescapine and clobenpropit, respectively columns 2, 3, 7, 9 and 10), no activation of PFI-013 could be detected in this assay.

Example 7

EOSINOPHIL CHEMOTAXIS STUDIES

Eosinophils were isolated from peripheral blood as previously described (Hansel, TT., De Vries JJ., Iff T., Rihs S., Wandzilak M., Betz S., Blaser K. and Walker C. (1991). An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Imm. Meth.* 145:105-10). Chemotaxis was measured using a 48-well Boyden chamber (Neuro Probe Inc., Cabin John, MD, USA). Agonists were diluted in RPMI media (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) and added to the bottom wells of the chemotaxis chamber. A 5 μ m PVP-free polycarbonate filter was used to separate the wells of the chamber (Neuro Probe Inc., Cabin John, MD, USA). Eosinophils were resuspended in RPMI/BSA media at a concentration of 2.5×10^6 cells per ml. 50 μ l of this cell suspension were then added to the upper chamber. Chambers were incubated

for 45 minutes in a 5% CO₂-humidified atmosphere at 37°C. After the incubation period, the filters were removed, the top side was scraped to remove non-migrating cells, and the filters were stained with Diff-Quik stain (Dade Behring AG, Dudingon, Switzerland). The number of cells migrating (bottom of filter) were counted by light microscopy. The mean of three high-powered fields was then determined. The number of migrating cells was calculated by subtracting this number from the number of cells per high-powered field in those wells not containing any agonist. All compounds were purchased from Sigma-RBI.

(a) Effect of histamine receptor subtype-selective agonists on human eosinophil chemotaxis

Experiments were performed to characterise the histamine receptor subtype involved in the eosinophil chemotactic response to histamine. Methodology was as detailed above. Compounds tested were: histamine dihydrochloride (non-selective histamine receptor agonist), histamine free base, HTMT dimaleate (histamine H1 agonist), Dimaprit (histamine H2 agonist) and Imetit (histamine H3 agonist). Eotaxin was included as a positive control for eosinophil chemotaxis. Burimamide was included in the study, as previously Raible *et al.* had described a partial agonist effect of this compound on intracellular Ca²⁺ production in isolated human eosinophils (Raible D.G. *et al* (1994) Pharmacological characterisation of a novel histamine receptor on human eosinophils, *Am J Respir Crit Care Med*, 149, pp1506-1511).

The results are shown in Figure 9. Only the non-selective histamine receptor agonist, histamine dihydrochloride, induced a significant chemotactic response from isolated human eosinophils in an *in vitro* assay. The H2 agonist, dimaprit, and the H3 agonists, imetit and burimamide, displayed no chemotactic activity, whilst the H1 agonist, HTMT, displayed a very weak chemotactic response only at the highest concentration tested (1 µM).

(b) Effect of histamine receptor subtype-selective antagonists on human eosinophil histamine-induced chemotaxis

Antagonist experiments were performed to further characterise the histamine receptor subtype involved in the eosinophil chemotactic response to histamine. Methodology was as detailed above, except that IL-5 was utilised to prime the eosinophils for chemotaxis studies as this was shown to enhance the chemotactic response to histamine (see Figure 10A). Antagonists were used at a single concentration of 10 μM . Antagonists tested were: mepyramine maleate (histamine H1 antagonist), cimetidine (histamine H2 antagonist), thioperamide (histamine H3 antagonist) and clobenpropit (histamine H3 antagonist).

The results, shown in Figure 10B, indicate that the two H3 antagonists, thioperamide and clobenpropit, had the greatest effect on the reduction of the chemotactic response of isolated human eosinophils to histamine dihydrochloride.

(c) Determination of the IC_{50} of histamine H3 receptor antagonists for inhibiting isolated human eosinophil *in vitro* chemotaxis

A further experiment was performed to determine the IC_{50} of both thioperamide and clobenpropit (histamine H3 antagonists) for inhibiting isolated human eosinophil *in vitro* chemotaxis. Methodology was as above, using thioperamide and clobenpropit at 10 μM , 1 μM and 0.1 μM concentrations (Histamine, as the agonist, was used at 30 nM).

Preliminary results, shown in Figure 10C, indicate that clobenpropit and thioperamide antagonise histamine-induced chemotaxis of human eosinophils with an IC_{50} of 1.5 μM and 0.83 μM respectively.

It will be appreciated that the foregoing is provided by way of example only and modification of detail may be made without departing from the scope of the invention.

SEQUENCE LISTING
(which forms part of the description)

SEQ ID NO: 1

Nucleotide sequence coding for PFI-013

ATGCCAGATACTAATAGCACAAATCAATTTATCACTAAGCACTCGTGTACTTTAGCA
TTTTTTATGTCCTTAGTAGCTTTTGCTATAATGCTAGGAAATGCTTTGGTCATTTTA
GCTTTTGTGGTGGACAAAACCTTAGACATCGAAGTAGTTATTTTTTCTTAACCTG
GCCATCTCTGACTTCTTTGTGGGTGTGATCTCCATTCCCTTGTACATCCCTCACACG
CTGTTTGAATGGGATTTTGGAAAGGAAATCTGTGTATTTTGGCTCACTACTGACTAT
CTGTTATGTACAGCATCTGTATATAACATTGTCCTCATCAGCTATGATCGATACCTG
TCAGTCTCAAATGCTGTGTCTTATAGAACTCAACATACTGGGGTCTTGAAGATTGTT
ACTCTGATGGTGGCCGTTTGGGTGCTGGCCTTCTTAGTGAATGGGCCAATGATTCTA
GTTTCAGAGTCTTGAAGGATGAAGGTAGTGAATGTGAACCTGGATTTTTTTCGGAA
TGGTACATCCCTGCCATCACATCATTCTTGGAAATTCGTGATCCAGTCATCTTAGTC
GCTTATTTCAACATGAATATTTATTGGAGCCTGTGGAAGCGTGATCATCTCAGTAGG
TGCCAAAGCCATCCTGGACTGACTGCTGTCTCTTCCAACATCTGTGGACACTCATT
AGAGGTAGACTATCTTCAAGGAGATCTCTTCTGCATCGACAGAAGTTCCTGCATCC
TTTCATTAGAGAGACAGAGGAGAAAGAGTAGTCTCATGTTTTTCTCAAGAACCAAG
ATGAATAGCAATACAATTGCTTCCAAAATGGGTTCCTTCTCCCAATCAGATTCTGTA
GCTCTTACCAAAGGGAACATGTTGAACTGCTTAGAGCCAGGAGATTAGCCAAGTCA
CTGGCCATTCTTAGGGGTTTTTGCTGTTTGGCTGGGCTCCATATTCTCTGTTTACA
ATTGTCCTTTCATTTTATTCTCAGCACAGGTCCTAAATCAGTTTGGTATAGAATT
GCATTTTGGCTTTCAGTGGTTCAATTCCTTTGTCAATCCTCTTTTGTATCCATTGTGT
CACAAAGCGCTTTCAAAAGGCTTCTTGAAAATATTTTGTATAAAAAAGCAACCTCTA
CCATCACAAACACAGTCGGTCAGTATCTTCTTAA

SEQ ID NO: 2Amino acid sequence coding for PFI-013

MPDTNSTINLSLSTRVTLAFFMSLVAFAIMLGNALVILAFVVDKNLRHRSSYFFLNL
AISDFVVGVISIPLYIPHTLFEWDFGKEICVFWLTTDYLLCTASVYNIIVLLSYDRYL
SVSNAVSYRTQHTGVLKIVTLMVAVWVLAFLVNGPMILVSESWKDEGSECEPGFFSE
WYLLAITSFLEFVIPVILVAYFNMNIYWSLWKRDLSRCQSHPGLTAVSSNICGHSF
RGR.LSSRRSLSASTEVPASFHSEQRKRKSSLMFSSRTKMNSNTIASKMGSFQSOSV
ALHQREHVELLRARRLAKSLAILLGVFAVCWAPYSLETTIVLSFYSSATGPKSVWYRI
AFWLQWENSEFVNPLLYPLCHKRFQKAFKIFCIKKQPLPSQHSRSVSS*

SEQ ID NO: 3

ACCATGCCAGATACTAATAGCACAAATC

SEQ ID NO: 4

TTAAGAAGATACTGACCGACTGTG

SEQ ID NO: 5

GGGCAAGATAAAGGGCAGACCAGAT

SEQ ID NO: 6

TCCTTCTCCCAATCAGATTCTGTAGC

SEQ ID NO: 7

GTATCCATTGTGTCACAAGCGC

SEQ ID NO: 8

AATATTTTATTGGAGCCTGTGGAA

SEQ ID NO: 9

GGAAGAGACAGCAGTCAGTCCA

SEQ ID NO: 10

ACACAAAGGATATCAGCGAAAGGCAAGCC

3. Brief Description of the Drawings

The present invention will now be described, by way of example only, with reference to the accompanying Figures ~~and Sequence Listing~~ in which:-

Figure 1 shows a schema for the bioinformatic analysis of PFI-013 (db = database).

Figure 2 shows a ClustalW alignment of PFI-013 with the human histamine H3 receptor (a vertical line (|) between amino acid residues denotes identity; a colon mark (:) between amino acid residues denotes conservative substitution).

Figure 3 shows, diagrammatically, the genomic structures of the PFI-013 gene and the human histamine H3 receptor gene ("rectangular blocks" = exons; \wedge = introns; the numbers directly below the "rectangular blocks" indicate (1) amino acid residues, for the human H3 diagram and (2) base pairs within the contig, for the PFI-013 diagram).

Figure 4 shows a Northern blot, indicating the tissue distribution of PFI-013 mRNA.

Figure 5 shows the results of quantitative PCR analysis of mRNA from various tissues by Taqman® (P.B.Leukocyte = peripheral blood leukocytes; Sm. Intestine = small intestine; Skel. Muscle = skeletal muscle).

Figure 6 shows the results of a filter ligand-binding assay - expressed as the difference in radioactive ³H-histamine bound to the membranes of PFI-013-transfected and mock-transfected cells (CPM = counts per minute of radioactivity; [Ligand] = concentration of ³H-histamine in nM).

Figure 7 shows the activation of PFI-013-expressing HEK293 cells by histamine in a fluorescent-based functional assay (FLIPR®). **Figure 7A** shows a cell-based assay, indicating the effect of histamine on HEK293 cells (expressing Gα15) transfected with a PFI-013-expression construct. **Figure 7B** shows the same cell-based assay, but indicating the effect of histamine on HEK293 cells (expressing Gα15) transfected with vector only. A peak in a square indicates a transient increase in the intracellular calcium concentration in the corresponding well, and therefore indicates a functional response by the cells resulting from the respective treatment.

Figure 8 shows the activation of PFI-013-expressing HEK293 cells by various histamine agonists (histaminergic ligands) in a fluorescent-based functional assay (FLIPR®). **Figure 8A** shows a cell-based assay, indicating the effect of histamine agonists on HEK293 cells (expressing Gα15) transfected with a PFI-013-expression construct. **Figure 8B** shows the same cell-based assay, but indicating the effect of histamine agonists on HEK293 cells (expressing Gα15) transfected with vector only. A peak in a square indicates a transient increase in the intracellular calcium concentration in the corresponding well, and therefore indicates a functional response by the cells resulting from the respective treatment.

Figure 9 shows the results of human eosinophil chemotaxis assays with various histamine receptor subtype-selective agonists.

Figure 10 shows the effects of various histamine receptor subtype-selective antagonists on histamine-induced human eosinophil chemotaxis. **Figure 10A** shows histamine-induced eosinophil chemotaxis and the enhancing effect of interleukin-5 (IL-5) pretreatment of the eosinophils. **Figure 10B** shows inhibition of histamine-induced chemotaxis by various histamine antagonists (CPD = compound). **Figure 10C** shows a dose-response curve of two histamine antagonists on histamine-induced eosinophil chemotaxis.

Figure 1

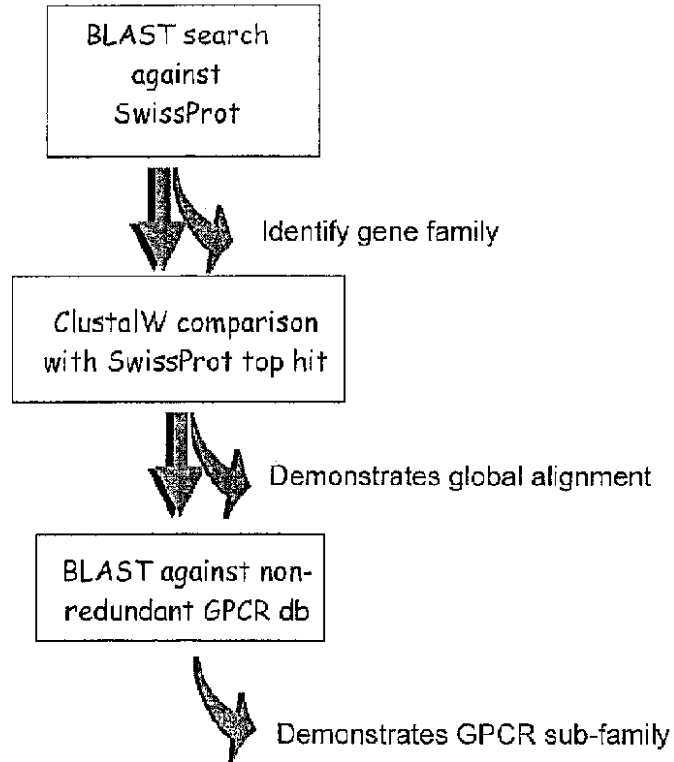


Figure 2

		1		60
PFI-013	(1)	-----MPDTNSTINLSLSTRVTLAFEMSLVAFAIMLGNALVILAFV	: : :	
H3 receptor	(1)	MEKAPPDGPLNAGGALAGDAAAAGGARGFSAAWTAVIAALMALLIVATVLGNALVMLAFV	: : :	
Consensus		S A LA MATL A MLGNALVILAFV		
		61		120
PFI-013	(42)	VDRNLRHRSSYFFLNLAISDFVGVISIPLYIPHTLF-EWDFGKEICVFWLTTDYLCTA	:	
H3 receptor	(61)	ADSSLRTQNNFFLLNLAISDFLVGAFCIPLYVPYVITGRWTFGRGLCKLWLWVVDYLLCTS	:	
Consensus		D LR FF LNLAISDF VG IPLYIPH L W FGK IC WL DYLLCTA		
		121		180
PFI-013	(101)	SVYNIVLISYDRYLSVSNVAVSYRTQHTGVLLKIVTLMVAVWVLAFLVNGFMILVSESWKDE	:	
H3 receptor	(121)	SAFNIVLISYDRFLSVTRAVSYRAQQGDTRRAVRKMLLVWVLAFLLYGFAILSWEYLSG-	:	
Consensus		S FNIVLISYDRFLSVS AVSYR Q K V ML VWVLAFL L GP IL E		
		181		240
PFI-013	(161)	GS-----ECEPGFFSEWYILAITSELEFVIVPILVAYFNMNIEYWSLWKRDLHSRCQS---		
H3 receptor	(180)	GSSIPEGHCYAEFFYNWYFLITASTLEFFTPFLSVTFEFLSYLNIQRRTRLRLDGAREA		
Consensus		GS C FF WY L S LEF P I V FEFL IY I KR L A		
		241		300
PFI-013	(213)	-----HFGLTAVSSNICGHSFRGLSRRRLS-----AS	: : :	
H3 receptor	(240)	AGPEPPPEAQSPPPPPGCGWCGWCKGHGEAMPLHRYCVGEAAVGAEEACEATLGGCGCGGS	: : :	
Consensus		H L G A G A SL AS		
		301		360
PFI-013	(242)	TEVPASEHSERCR---RKSSLMFSSRTKMNSNTTASKMGSPFSQSDSVALHQREHVELLRA		
H3 receptor	(300)	VASFTSSSGSSSRGTERPRSLKRGSKPSASSASLEKRMKMSVQS---FTQRFRLS--RD		
Consensus		P S R R SL SK S SI KM SQS QR L R		
		361		420
PFI-013	(299)	RRLAKSLAILLGVFAVCWAFYSLEFIVLSFYSSATGPRKSVWYRIAFWLQWFNSFVNPLLY	:	
H3 receptor	(354)	RKVAKSLAVIVSIFGLCWAFYTLMLIIRAACHGHCVP-DYWYETSFWLLWANSVAVNPVLY	:	
Consensus		RKLAKSLAILL IFALCWAFYSL II A P WY AFWL W NS VNPLLY		
		421		455
PFI-013	(359)	PLCHKRFQKAFLEKIFCIKKQPLPSQHSRSVSS---		
H3 receptor	(413)	PLCHHSFRRAFTKLLCP--QKLIKIQPHSSLEHCWK		
Consensus		PLCH F KAF KE C Q L Q SL		

Figure 3

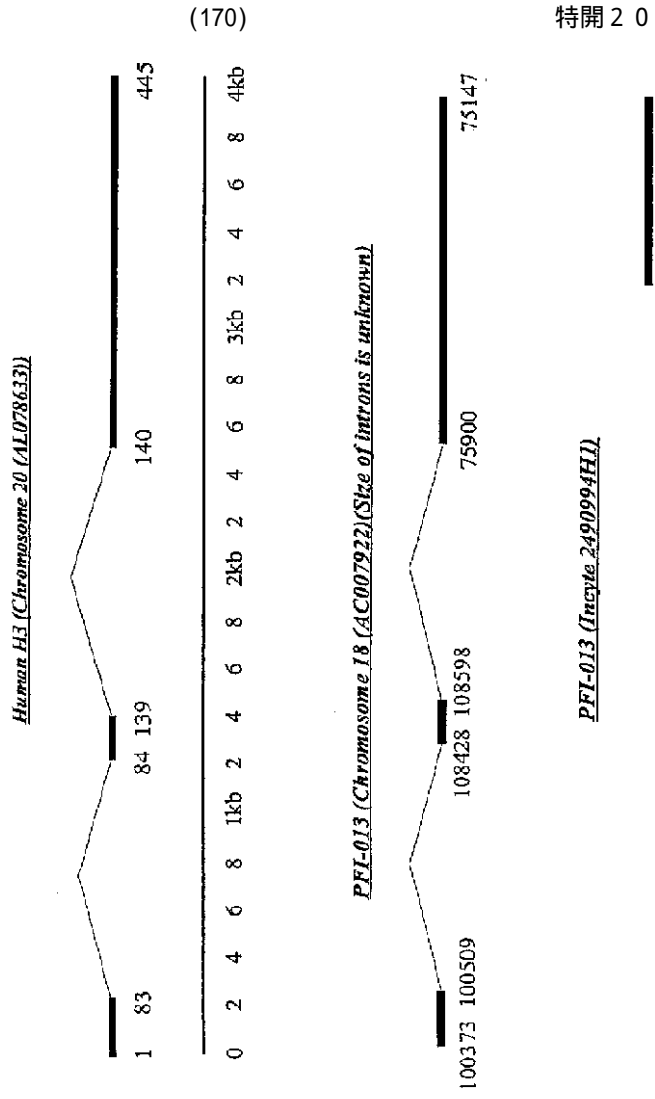


Figure 4

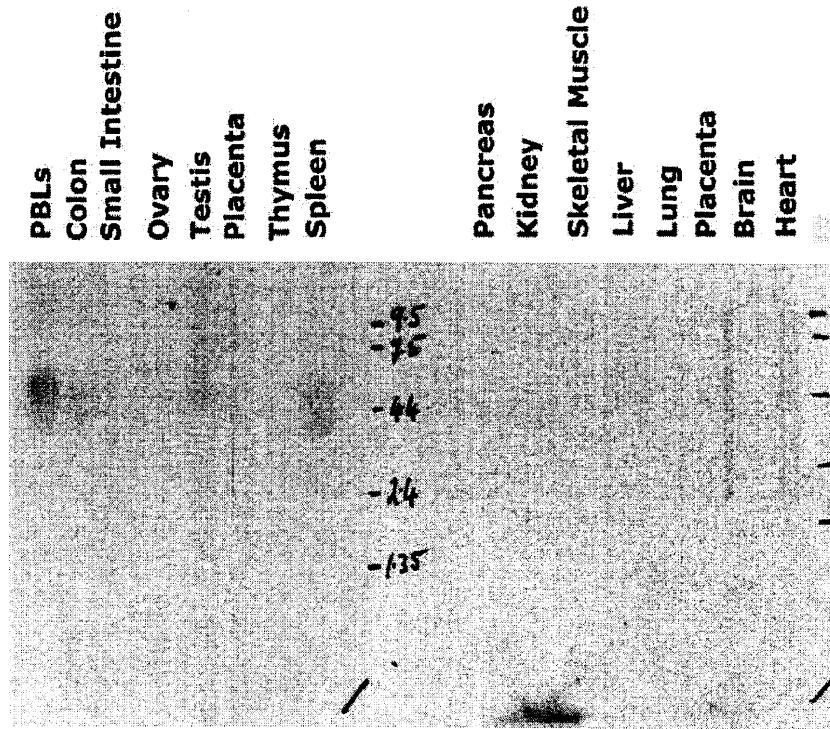


Figure 5
PFI-013 Expression pattern

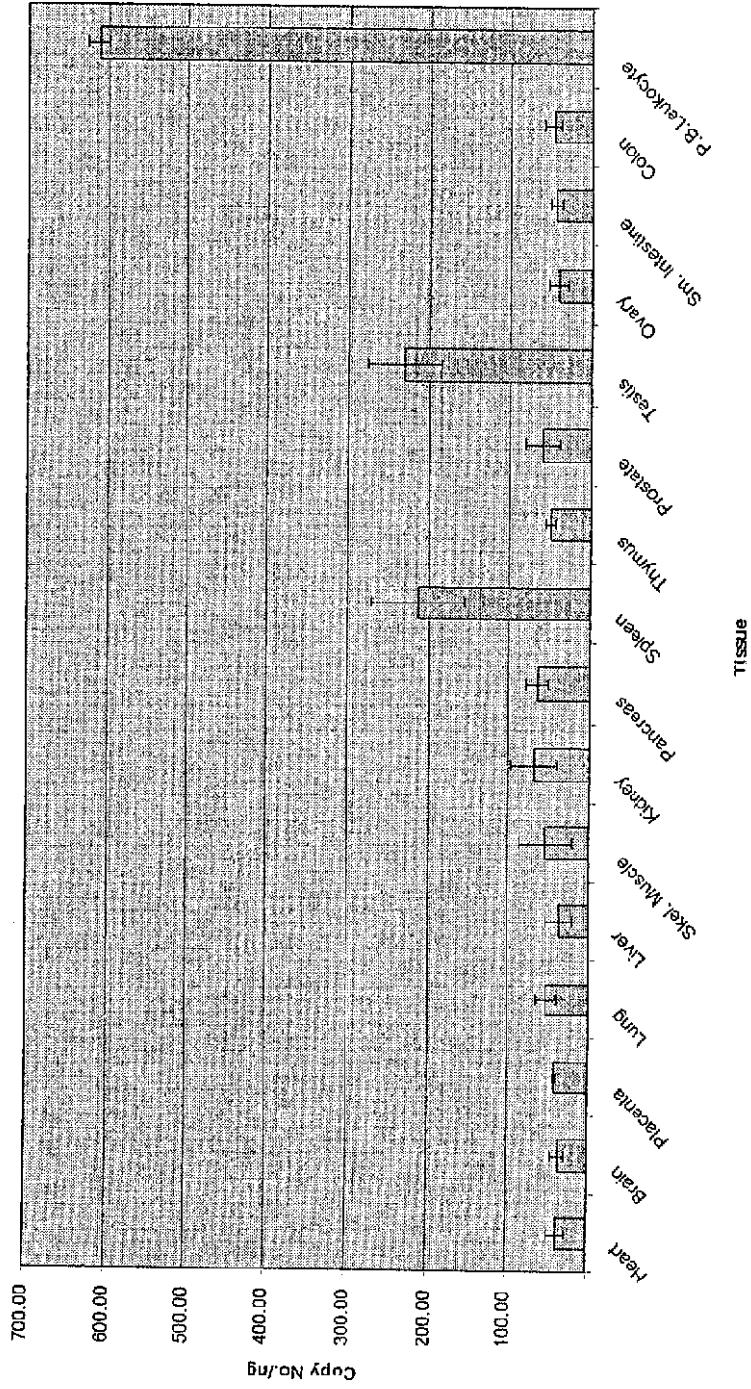


Figure 6

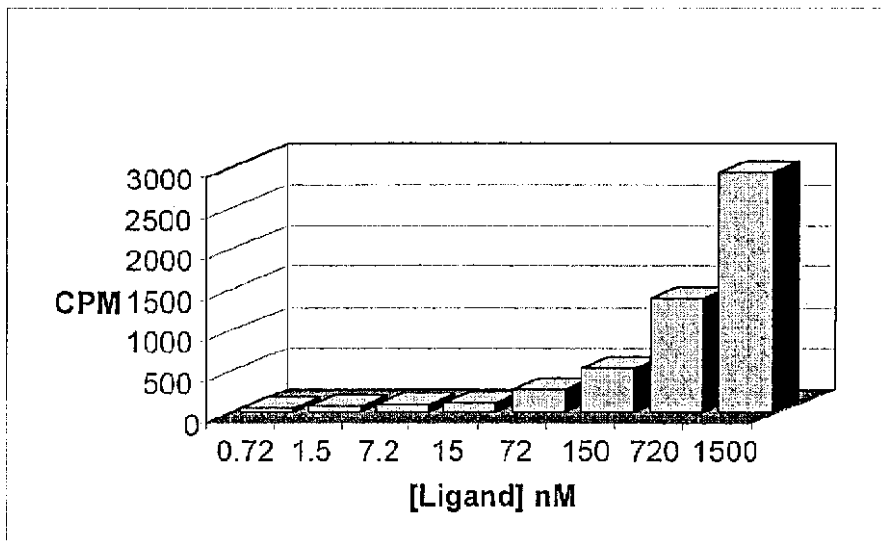


Figure 7A

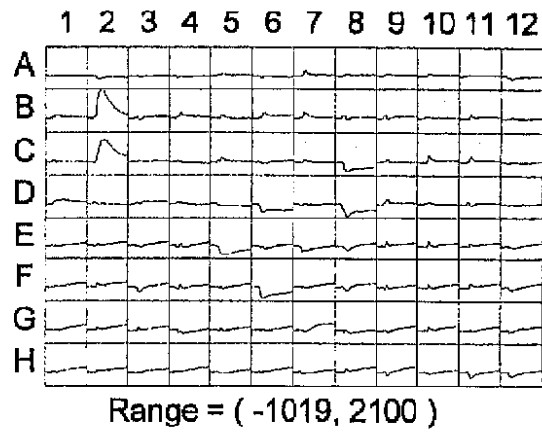


Figure 7B

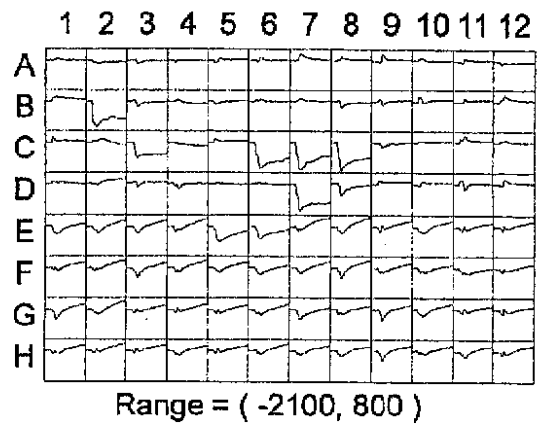


Figure 8A

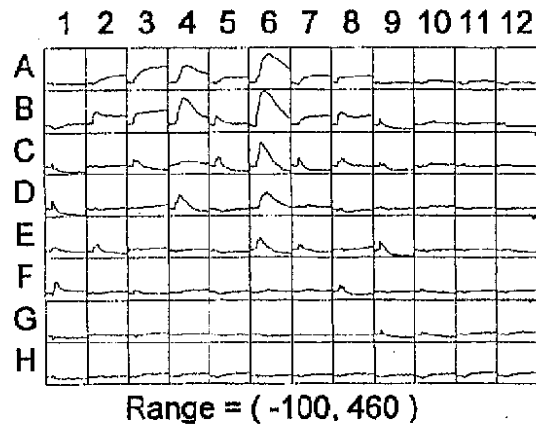


Figure 8B

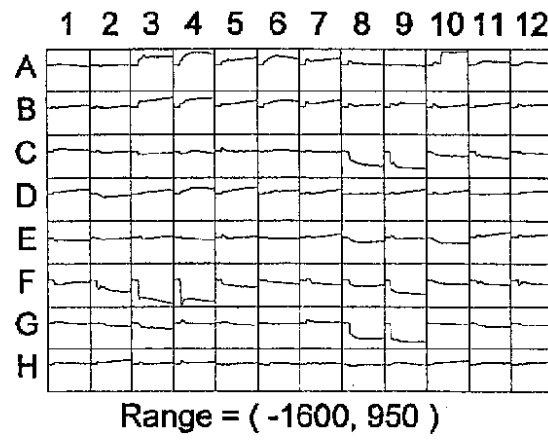


Figure 9

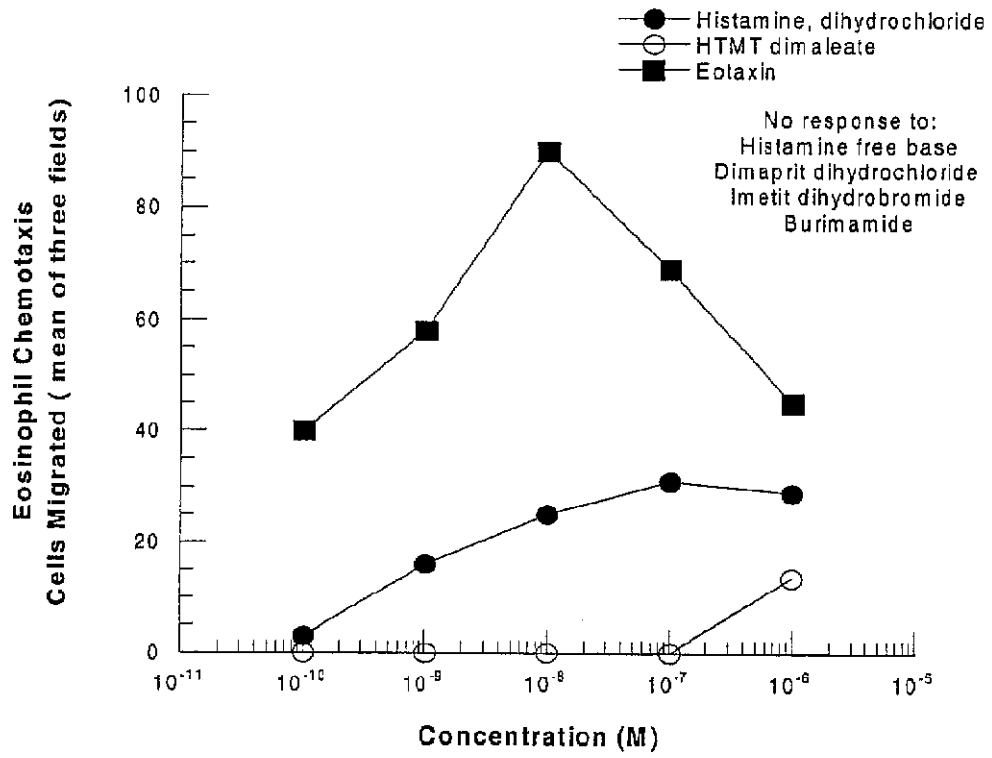


Figure 10A

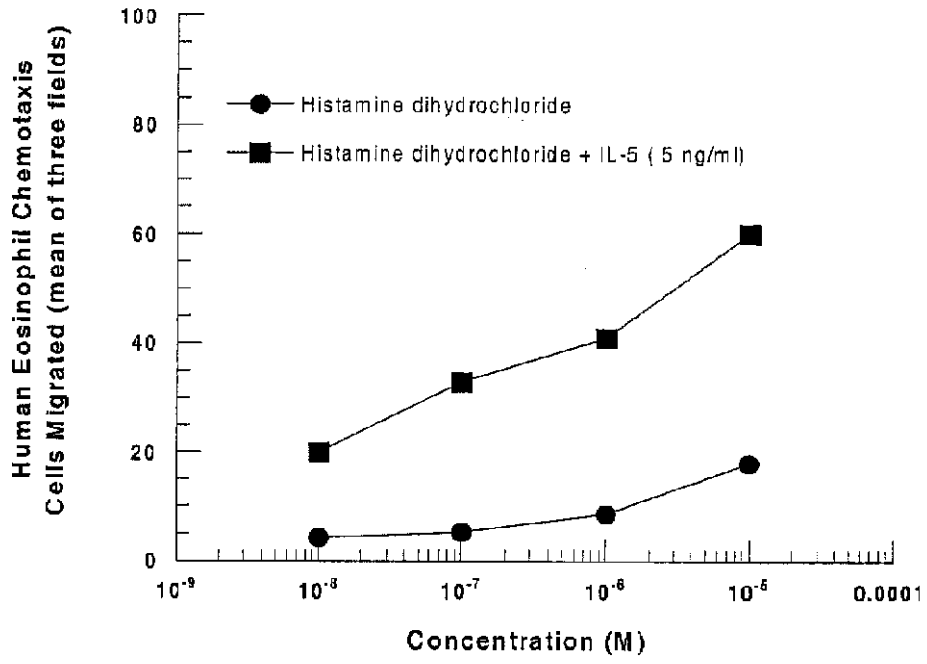


Figure 10B

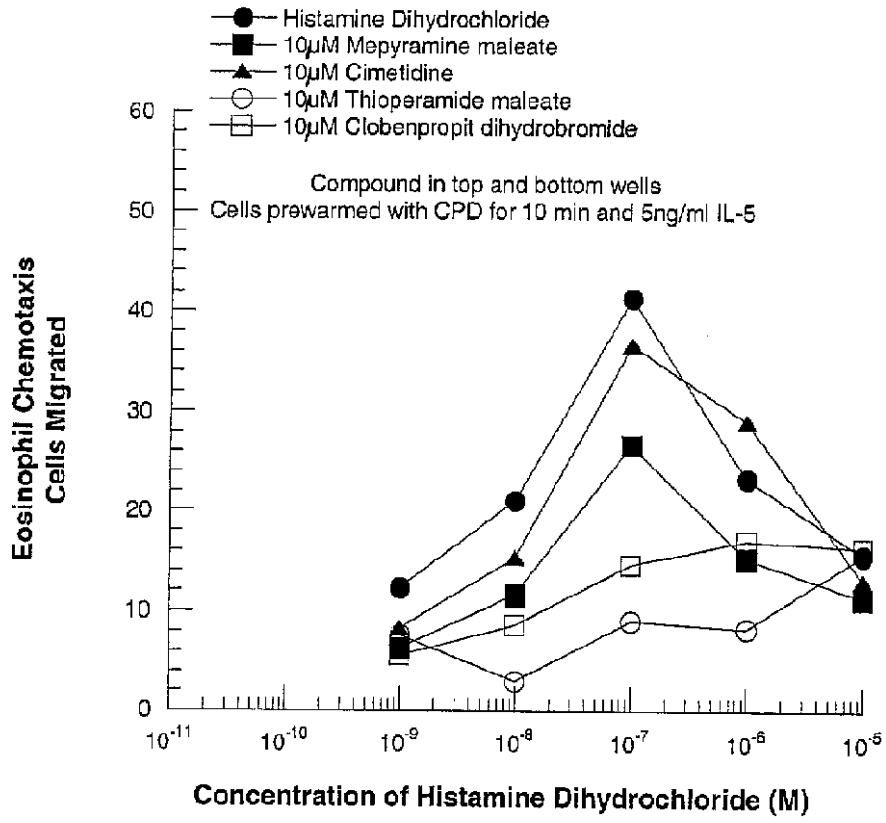
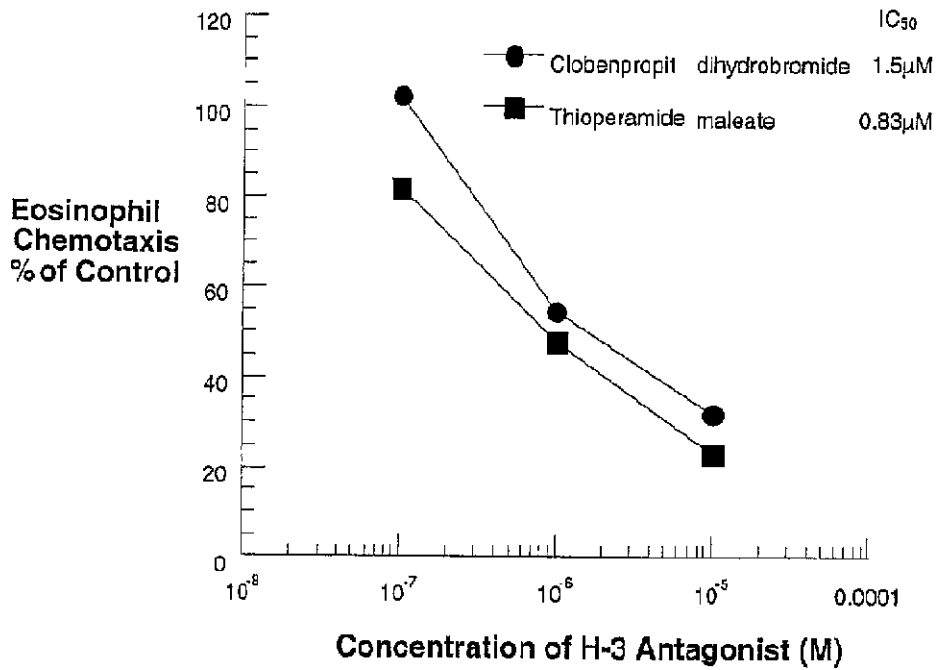


Figure 10C



【要約】

Polynucleotide and polypeptide sequences are described. The polypeptide sequences comprise one or more of: (a) a polypeptide having the deduced amino acid sequence translated from the polynucleotide sequence in SEQ ID NO: 1 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; (b) a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; or (c) a polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41073 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof.

专利名称(译)	新型多肽		
公开(公告)号	JP2001211889A	公开(公告)日	2001-08-07
申请号	JP2000329359	申请日	2000-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞公司		
[标]发明人	ビートピーター マークアンソニーオレイリー		
发明人	ビート ピーター マーク アンソニー オレイリー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/00 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/705 C07K14/723		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CA11 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B050/CC01 4B050/DD20 4B050/LL05 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR77 4B063/QS31 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BD01 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/CA18 4C084/CA26 4C084/CA36 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA682 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C085/AA13 4C085/CC12 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA52 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	9925641:4 1999-10-29 GB 0009973:9 2000-04-20 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供与G蛋白偶联受体有关的新的多核苷酸和多肽序列。该多肽序列包含一个或多个: (a) 具有从人类特定序列的多核苷酸序列翻译而来的推导氨基酸序列的多肽, 及其变体, 片段, 同源物, 类似物和衍生物; (b) 源自人的特定多肽及其变体, 片段, 同源物, 类似物和衍生物; 或 (c) 由NCIMB 41073 cDNA编码的多肽及其变体, 片段, 同源物, 类似物和衍生物。

【表2】

CLUSTAL 用	DNA	タンパク質	
ワードサイズ	2	1	Kトリプル
ギャップペナルティ	10	10	
ギャップ延長	0.1	0.1	