(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-534279
(P2005-534279A)
(43)公表日　平成17年11月17日(2005.11.17)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 38/00	A61K	45/00		4B029
A61K 45/00	A61P	25/28		4B050
A61P 25/28	A61P	29/00		4B063
A61P 29/00	A61P	37/00		4B065

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 93 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-532629 (P2003-532629)
(86)(22)出願日　平成14年9月28日 (2002.9.28)
(85)翻訳文提出日　平成16年5月25日 (2004.5.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/030947
(87)国際公開番号　WO2003/029411
(87)国際公開日　平成15年4月10日 (2003.4.10)
(31)優先権主張番号　60/326,133
(32)優先日　平成13年9月28日 (2001.9.28)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/373,225
(32)優先日　平成14年4月15日 (2002.4.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/373,661
(32)優先日　平成14年4月16日 (2002.4.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500418439
ブリガム　ヤング　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　ユタ州　プロボ　ピー．オー．　ボックス　２１２３１　エーエスビー　エー－２６８　オフィス　オブ　テクノロジー　トランスファー
(74)代理人　110000213
特許業務法人プロスペック特許事務所
(74)代理人　100108280
弁理士　小林　洋平
(72)発明者　シモンズ　ダニエル
アメリカ合衆国　ユタ州　８４６０４　プロヴォ　チッペワ　ウェイ　２８８３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規なシクロオキシゲナーゼ変異体とその使用方法

(57)【要約】
本発明は新規なシクロオキシゲナーゼ１型（ＣＯＸ－１）変異体酵素の単離に関する。より具体的に述べると、本発明は、シクロオキシゲナーゼ１のイントロン－１又はそのフラグメントを含有するシクロオキシゲナーゼ転写産物の同定に関する。本発明はさらに、異常なシクロオキシゲナーゼ１型変異体の遺伝子もしくは遺伝子産物の診断；シクロオキシゲナーゼ１型変異体遺伝子の発現、又は限定されないがシクロオキシゲナーゼ１型変異体、その同族体、類似体及び欠失部分をコードする核酸、そしてアンチセンス、リボザイム、三重ヘリックス、抗体及びポリペプチド分子と小無機分子を含むシクロオキシゲナーゼ１型変異体遺伝子産物の活性を調節する化合物の同定、製造及び使用；並びにこのような化合物の医薬配合物と投与経路に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
シクロオキシゲナーゼ１型のイントロン－１又はそのフラグメントを含みかつＲＮＡである単離された核酸分子。
【請求項２】
核酸分子がｍＲＮＡである請求項１に記載の核酸分子。
【請求項３】
核酸分子がｃＤＮＡである請求項１に記載の核酸分子。
【請求項４】
核酸分子が、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒する少なくとも一つのドメイン、少なくとも一つの膜結合ドメイン及び少なくとも一つのヘム結合ドメインを含むポリペプチドをコードする請求項１に記載の核酸分子。
【請求項５】
核酸分子が、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６からなる群から選択されるポリペプチドをコードする請求項１に記載の核酸分子。
【請求項６】
核酸分子が、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３を含む請求項１に記載の核酸分子。
【請求項７】
ａ）配列番号：１に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｂ）配列番号：３に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｃ）配列番号：４に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｄ）配列番号：６に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｅ）配列番号：１０に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｆ）配列番号：１１に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｇ）配列番号：１２に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子、及び
ｈ）配列番号：１３に記載のヌクレオチド配列を含む核酸分子
からなる群から選択される単離された核酸分子。
【請求項８】
ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、及び
ｂ）配列番号：５に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、
ｃ）配列番号：１４に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、
配列番号：１５に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、及び
配列番号：１６に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子
からなる群から選択される単離された核酸分子。
【請求項９】
ａ）配列番号：２のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変異体をコードしかつストリンジェント条件下配列番号：１又は３を含む核酸分子とハイブリッドを形成する核酸分子、及び
ｂ）配列番号：５のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変異体をコードしかつストリンジェント条件下配列番号：４又は６を含む核酸分子とハイブリッドを形成する核酸分子
からなる群から選択される単離された核酸分子。
【請求項１０】
ａ）配列番号：１、３、４、６、１０、１１、１２もしくは１３のヌクレオチド配列又はその相補鎖と少なくとも６０％相同のヌクレオチド配列を含む核酸分子、
ｂ）配列番号：１、３、４、６、１０、１１、１２もしくは１３のヌクレオチド配列又

はその相補鎖を含む核酸の少なくとも２００個のヌクレオチドのフラグメントを含む核酸分子、
ｃ）配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列と少なくとも約６０％相同のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子、及び
ｄ）配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列を含むポリペプチドのフラグメントをコードする核酸分子であって、そのフラグメントが配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列の少なくとも１５個の連続アミノ酸残基を含んでいる核酸分子
からなる群から選択される単離された核酸分子。
【請求項１１】
ストリンジェント条件下、請求項７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子とハイブリッドを形成する単離された核酸分子。
【請求項１２】
請求項７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子のヌクレオチド配列に相補性であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項１３】
請求項７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子及び異種由来（heterologous）ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項１４】
請求項１、７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項１５】
発現ベクターである請求項１４に記載のベクター。
【請求項１６】
請求項１４に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。
【請求項１７】
請求項１４に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を適切な培地で培養してポリペプチドを製造することを含んでなるポリペプチドの製造方法。
【請求項１８】
ａ）配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列を含むポリペプチドのフラグメントであって、配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６の少なくとも１５個の連続アミノ酸を含むフラグメント、
ｂ）配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列を含むポリペプチドであってストリンジェント条件下配列番号：１、３、４、６、１０、１１、１２もしくは１３を含む核酸分子とハイブリッドを形成する核酸分子によってコードされるポリペプチドの、天然に存在する対立遺伝子変異体、
ｃ）配列番号：１、３、４、６、１０、１１、１２もしくは１３のヌクレオチド配列を含む核酸と少なくとも６０％相同のヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされているポリペプチド、及び
ｄ）配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列と少なくとも６０％相同のアミノ酸配列を含むポリペプチド
からなる群から選択される単離されたポリペプチド。
【請求項１９】
配列番号：２、５、１４、１５もしくは１６のアミノ酸配列を含む請求項１８に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
非相同のアミノ酸配列をさらに含む請求項１８に記載のポリペプチド。
【請求項２１】
請求項１８に記載のポリペプチドに選択的に結合する抗体。
【請求項２２】
ａ）試料を、ポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触させ、次いで

ｂ）上記化合物が試料中のポリペプチドと結合して、請求項１８に記載のポリペプチドが試料中に存在することを検出するかどうかを確認する
ことを含んでなる請求項１８に記載のポリペプチドが試料中に存在することを検出する方法。
【請求項２３】
ポリペプチドに結合する化合物が抗体である請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
請求項１８に記載のポリペプチドに選択的に結合する化合物及び使用説明書を含むキット。
【請求項２５】
ａ）試料を、核酸分子と選択的にハイブリッドを形成する核酸のプローブ又はプライマーと接触させ、次いで
ｂ）上記核酸のプローブ又はプライマーが試料中の核酸分子と結合して請求項１、７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子が試料中に存在することを検出するかどうかを確認する
ことを含んでなる請求項１、７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子が試料中に存在することを検出する方法。
【請求項２６】
試料がｍＲＮＡ分子を含み、そして試料を核酸プローブと接触させる請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
請求項１、７、８、９又は１０のいずれか一つに記載の核酸分子と選択的にハイブリッドを形成する化合物及び使用説明書を含んでなるキット。
【請求項２８】
ａ）ポリペプチド又はそのポリペプチドを発現する細胞を試験化合物と接触させ、次いで
ｂ）そのポリペプチドが試験化合物と結合するかどうかを確認する
ことを含んでなる請求項１８に記載のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法。
【請求項２９】
ａ）試験化合物／ポリペプチドの結合の直接検出による結合の検出、
ｂ）競合結合検定法を利用して行う結合の検出、及び
ｃ）活性検定法を利用して行う結合の検出
からなる群から選択される方法で、試験化合物のポリペプチドとの結合が検出される請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
請求項１８に記載のポリペプチド又はそのポリペプチドを発現する細胞を、そのポリペプチドの活性を調節するのに十分な濃度の、そのポリペプチドに結合する化合物と接触させることを含む請求項１８に記載のポリペプチドの活性を調節する方法。
【請求項３１】
ａ）請求項１８に記載のポリペプチドを試験化合物と接触させ、次いで
ｂ）上記ポリペプチドの活性に対する上記試験化合物の作用を測定して上記ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する
ことを含んでなる請求項１８に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法。
【請求項３２】
医薬として許容できる担体中の、ＣＯＸ－１変異体の活性の特異的インヒビターの有効量を被検者に投与すること含んでなる被検者のアルツマイマー病を予防又は治療する方法。
【請求項３３】
ＣＯＸ－１変異体の活性の前記特異的インヒビターが、請求項１、７、８、９又は１０

に記載の核酸によってコードされるＣＯＸ－１変異体の活性の特異的インヒビターである請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

医薬として許容できる担体中の、請求項１、７、８、９又は１０に記載の核酸によってコードされるシクロオキシゲナーゼ１型の活性の特異的インヒビターを被検者に投与することを含んでなる被検者の神経変性症状を改善する方法。

【請求項３５】

前記神経変性症状が、卒中、脳虚血、脱髄症状又は機械的損傷である請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

医薬として許容できる担体中の、ＣＯＸ－１変異体の活性の特異的インヒビターを被検者に投与することを含んでなる被検者のアルツハイマー病に付随する免疫又は炎症の症状を治療する方法。

【請求項３７】

シクロオキシゲナーゼ１型の活性の前記特異的インヒビターが、請求項１、７、８、９又は１０に記載の核酸によってコードされるシクロオキシゲナーゼ１型の活性の特異的インヒビターである請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

医薬として許容できる担体中の、ＣＯＸ－１変異体の特異的インヒビターの非ステロイド抗炎症剤であるアンタゴニストの有効量を被検者に投与することを含んでなる被験者のアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）の発現、産生又は生成を調節する方法。

【請求項３９】

シクロオキシゲナーゼの活性の前記特異的インヒビターが、請求項１、７、８、９又は１０に記載の核酸によってコードされるシクロオキシゲナーゼ１型の活性の特異的インヒビターである請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

被検者のＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの活性を選択して阻害する方法であって、このような処置を必要とする被検者にＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの遺伝子産物の活性を選択して阻害する化合物を投与することを含む方法。

【請求項４１】

化合物が非ステロイド抗炎症化合物である請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】

被検者のＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの活性を選択的に阻害する方法であって、このような処置を必要とする被検者にＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの遺伝子産物の活性を選択して阻害する非ステロイド化合物を投与することを含みその非ステロイド化合物の活性が被検者に有意な毒性副作用をもたらさない方法。

【請求項４３】

被検者のＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの活性を選択的に阻害する方法であって、このような処置を必要とする被検者にＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの遺伝子産物の活性を選択して阻害する非ステロイド化合物を投与することを含みそしてＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの遺伝子産物の活性を選択して阻害する非ステロイド化合物の性能が、

ａ）ＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａを発現しＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２を発現しない遺伝子工学的に処理された細胞を上記化合物と接触させ次いでその細胞を予め定められた量のアラキドン酸に暴露し、

ｂ）ＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２を発現しＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａを発現しない遺伝子工学的に処理された細胞を上記化合物と接触させ次いでその細胞を予め定められた量のアラキドン酸に暴露し、

ｃ）アラキドン酸の、そのプロスタグランジン代謝産物への変換を測定し、次いで、

ｄ）上記化合物に暴露された各細胞によって変換された変換アラキドン酸の量を、上記化合物に暴露されなかった対照細胞によって変換されたアラキドン酸の量と比較して、Ｃ

ＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａの活性を阻害しＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２の活性を阻害しない化合物を同定する、
ことによって測定される方法。
【請求項４４】
ａ）ＣＯＸ－１変異体をコードするＤＮＡをトランスフェクトしてＣＯＸ－１変異体を発現する細胞を調整し
ｂ）前記細胞を無傷又は破壊された状態で試験化合物と接触させ、次いで
ｃ）ＣＯＸ－１変異体の活性が試験化合物の存在下減少又は増大するかを確認し、前記ＣＯＸ－１変異体の活性が減少又は増大することは試験化合物がＣＯＸ－１変異体の活性を調節していることの指標である
ことを含んでなるＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物の同定方法。
【請求項４５】
ＣＯＸ－１変異体が、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｓ１）、ｈＣＯＸ－３（ｃｓ２）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ３）からなる群から選択される請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
ＣＯＸ－１変異体をコードするＤＮＡが、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６に記載のアミノ酸配列をコードする請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
ＣＯＸ－１変異体をコードするＤＮＡが、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３からなる群から選択される請求項４４に記載の方法。
【請求項４８】
細胞が哺乳類の細胞である請求項４４に記載の方法。
【請求項４９】
細胞が昆虫の細胞である請求項４４に記載の方法。
【請求項５０】
細胞が細菌の細胞である請求項４４に記載の方法。
【請求項５１】
試験化合物が非ステロイド抗炎症医薬である請求項４４に記載の方法。
【請求項５２】
ａ）請求項４４に記載の方法を実施してＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物を同定し、次いで
ｂ）その化合物を製造する
ことを含んでなるＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物の製造方法。
【請求項５３】
包装材料及びその包装材料の中に入れたＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物を含む製品であって、その包装材料が、前記化合物はＣＯＸ－１変異体の活性を調節し被検者の痛みを治療するのに使用できることを示すラベル又は添付文書を備えている製品。
【請求項５４】
包装材料及びその包装材料の中に入れたＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物を含む製品であって、その包装材料が、前記化合物はＣＯＸ－１変異体の活性を調節し被検者の炎症を治療するのに使用できることを示すラベル又は添付文書を備えている製品。
【請求項５５】
包装材料、及びその包装材料の中に入れたＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２と比べてＣＯＸ－１変異体の活性を優先的に調節する化合物を含む製品であって、その包装材料が、前記化合物はＣＯＸ－１変異体の活性を調節しＣＯＸ－１の関連する障害を持つ被検者を治療するのに使用できることを示すラベル又は添付文書を備えている製品。
【請求項５６】

複数のアドレスを有する基質を含むアレーであって、前記複数のアドレスのうちの少なくとも一つのアドレスがＣＯＸ－１変異体の核酸又は前記ＣＯＸ－１変異体の核酸のフラグメントに特異的に結合できる捕獲プローブを備えているアレー。

【請求項５７】

ＣＯＸ－１変異体が、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｓ１）、ｈＣＯＸ－３（ｃｓ２）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ３）からなる群から選択される請求５６に記載のアレー。

【請求項５８】

ＣＯＸ－１変異体の核酸が、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６に記載のアミノ酸配列をコードする請求項５６に記載のアレー。

【請求項５９】

ＣＯＸ－１変異体の核酸が、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３からなる群から選択される請求項５６に記載のアレー。

【請求項６０】

複数のアドレスを有する基質を含むアレーであって、前記複数のアドレスのうちの少なくとも一つのアドレスがＣＯＸ－１変異体の核酸のイントロン-１に特異的に結合できる捕獲プローブを備えているアレー。

【請求項６１】

ＣＯＸ－１変異体が、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｓ１）、ｈＣＯＸ－３（ｃｓ２）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ３）からなる群から選択される請求６０に記載のアレー。

【請求項６２】

ＣＯＸ－１変異体の核酸が、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６に記載のアミノ酸配列をコードする請求項６０に記載のアレー。

【請求項６３】

ＣＯＸ－１変異体の核酸が、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３からなる群から選択される請求項６０に記載のアレー。

【請求項６４】

ａ）各々治療法に関連する複数の基準発現プロファイルを提供し、

ｂ）被検者から得た核酸を提供し、

ｃ）その核酸を請求項５６又は６０に記載のアレーに接触させ、

ｄ）上記核酸が複数のアドレスの各アドレスに結合するのを検出して被検者の発現プロファイルを提供し、

ｅ）上記被検者の発現プロファイルに最も類似している基準プロファイルを選択して被検者の治療法を選択する

ことを含んでなる被検者の治療法を選択する方法。

【請求項６５】

ａ）請求項５６又は６０に記載のアレー、及び

ｂ）複数の発現プロファイルを有するコンピュータ読取り式媒体であって、上記複数のプロファイルの各プロファイルが複数の値を有し各値が上記アレーによって検出されたＣＯＸ－１変異体の核酸配列の発現を表す媒体

を備えてなる医薬組成物を評価するためのキット。

【請求項６６】

ａ）被検者の試料を介護者から入手し、

ｂ）その被検者試料から核酸を得て、

ｃ）その核酸から被検者の発現プロファイルを確認し、

ｄ）複数の基準プロファイルから、被検者の発現プロファイルに最も類似している同等の基準プロファイルを選択し、そしてその基準プロファイルと被検者の発現プロファイルが複数の値を有し各値がＣＯＸ－１変異体の発現レベルを表し、
ｅ）複数の基準プロファイルの各基準プロファイルが治療法と関連があり、次いで
ｆ）上記同等の基準プロファイルと関連がある治療法の記述語を介護者に伝えて前記被検者の治療法を選択する
ことを含んでなる被検者の治療法を選択する方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
［技術分野］
本発明は、新規な哺乳類シクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）ポリペプチドをコードする新規な核酸及びその使用方法に関する。本発明はさらにＣＯＸの活性を調節する化合物及びこのような化合物を同定する方法に関する。
【０００２】
［関連出願の相互参照］
本願は、以下の特許願：２００１年９月２８日付け出願の米国仮特許願第６０／３２６，１３３号、２００２年４月１５日付け出願の同第６０／３７３，２２５号、２００２年４月１６日付け出願の同第６０／３７３，６６１号及び２００２年９月１６日付け出願の同第６０／４１１，５７５号の優先権を主張するものである。なおこれら出願は本願に援用するものである。
【０００３】
[米国連邦政府が支援している研究に関する陳述]
本発明は、米国国立衛生研究所（ＮＩＨ）が授与した助成第ＡＲ４６６８８号による米国政府の支援によってなされた。米国政府は本特許願の発明に権利をもっている。
【０００４】
[背景]
真核細胞中の多不飽和脂肪酸は、以下の３種の一般系：１）植物、動物及び細菌中に確認されている病原体誘導オキシゲナーゼ（ＰＩＯＸ）を含むシクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）と類縁脂肪酸オキシゲナーゼ、２）リポオキシゲナーゼ、及び３）シトクロムＰ－４５０によって酸素化される。現在、２種のＣＯＸのアイソザイムすなわちＣＯＸ－１とＣＯＸ－２が知られている。ニワトリと哺乳類内でクローン化されたＣＯＸ－１の予想アミノ酸配列は、ＣＯＸ－２と比べてアミノ酸配列相同性が約６０％である。
【０００５】
２種の形態のシクロオキシゲナーゼによって触媒されてアラキドン酸がシクロ酸素化されてプロスタグランジン類を生成し、次にそのプロスタグランジン類が、ＣＡＭＰの生成に関与している受容体を活性化することによって神経刺激伝達及び免疫と炎症の応答を制御する（Ｇｏｅｔｚｌら、ＦＡＳＥＢ Ｊ．、９巻１０５１頁１９９５年）。例えば炎症は、損傷細胞のプロスタグランジンの過剰産生によって、少なくとも部分的に開始され維持される。プロスタグランジンが炎症で演ずる主な役割は、多くの病的炎症状態を治療するのに最も有効なアスピリン様非ステロイド系抗炎症医薬（ＮＳＡＩＤ）がすべてプロスタグランジンの合成を阻害することによって作用するという事実によって強調されている。ＮＳＡＩＤは、ＣＯＸアイソザイムのシクロオキシゲナーゼ活性部位のインヒビターとして作用する鎮痛性／抗炎症性／解熱性の薬剤である。個々のＮＳＡＩＤのＣＯＸ活性部位に対する作用に、重要な機構の差が存在する。医療に使用されるＮＳＡＩＤのうちアスピリンだけがＣＯＸ－１及びＣＯＸ－２の共有結合修飾剤である。
【０００６】
シクロオキシゲナーゼの活性を調節する化合物及びこのような化合物の同定法の開発に対する要望が増大している。したがって、分子レベルで、既存の抗炎症医薬の有効性を試験し及び可能性がある抗炎症剤の有効性を評価する方法の改良法並びにこのような方法に

使用する試薬が要望されている。

【０００７】

[要約]

本発明は、少なくとも一部分は、新規な核酸分子及びこの核酸分子によってコードされ、本願でシクロオキシゲナーゼ１型（ＣＯＸ－１）変異体タンパク質と呼称するポリペプチドを発見したことに基づいている。ＣＯＸ－１変異体核酸分子としては、ＣＯＸ－１ゲノム配列由来でかつイントロン－１を有する核酸分子がある。同様に、ＣＯＸ－１変異体アミノ酸配列は、イントロン－１を含有するＣＯＸ－１変異体核酸配列がコードしている。ＣＯＸ－３（すなわちｐＣｅｘ－１）、ＰＣＯＸ－１ａ（すなわちｐＣＯＸ－１△６５７）又はＰＣＯＸ－１ｂは、本発明に含まれるＣＯＸ－１変異体の例である。さらにＣＯＸ－１変異体としては、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）（大脳皮質由来のヒトＣＯＸ－３）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）（肺細胞由来のヒトＣＯＸ－３）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）（エキソン１０が欠失した肺細胞由来のヒトＣＯＸ－３）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（ヒトＣＯＸ－３の共通配列）がある。このような変異体は、ＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物又は薬剤を同定するのに有用である。したがって、本発明は一つの側面で、ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生物学的に活性の部分をコードする単離された核酸分子、及びＣＯＸ－１変異体をコードする核酸を検出するのに使用するプライマー又はハイブリッド形成プローブとして適切な核酸フラグメントを提供するものである。

【０００８】

一実施態様で、本発明のＣＯＸ－１変異体核酸分子は、シクロオキシゲナーゼ１型のイントロン－１又はそのフラグメントを含有している。一側面で、上記核酸分子はｍＲＮＡの転写産物である。別の側面で、この核酸分子はｃＤＮＡである。別の側面でその核酸分子は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒する少なくとも一つのドメイン、少なくとも一つの膜結合ドメイン及び少なくとも一つのヘム結合ドメインを含むポリペプチドをコードしている。さらに別の側面で、その核酸分子は、シクロオキシゲナーゼポリペプチド又はその天然に存在する対立遺伝子変異体をコードし、シクロオキシゲナーゼ１のイントロン－１又はそのフラグメントを含有している。

【０００９】

別の実施態様で、本発明は、シクロオキシゲナーゼ１のイントロン－１又はそのフラグメントがコードするアミノ酸配列を含有する単離されたＣＯＸ－１変異ポリペプチドを提供するものであり、このポリペプチドは脂肪酸の酸素化反応及び／又は環化反応を触媒する。一側面で、上記単離されたポリペプチドはさらに少なくとも一つの膜結合ドメインと少なくとも一つのヘム結合ドメインを含んでいる。

【００１０】

別の実施態様で、本発明のＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：１、配列番号：３（すなわちＣＯＸ－３）を含むヌクレオチド配列（例えばそのヌクレオチド配列の全長）又はその相補鎖に対して少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９８％を超えて相同である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：４、配列番号：６（すなわちＰＣＯＸ－１ａ）を含むヌクレオチド配列又はその相補鎖に対して６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％相同である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：７、配列番号：９（すなわちＰＣＯＸ－１ｂ）を含むヌクレオチド配列又はその相補鎖に対して６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％相同である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：１０（すなわちｈＣＯＸ－３（ｃｃ））を含むヌクレオチド配列又はその相補鎖に対して６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％相同である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：１１（すなわちｈＣＯＸ－３（ａｆ））を含むヌクレオチド配列又はその相補鎖に対して６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％相同である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：１２（すなわちｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０））を含むヌクレオチ

ド配列又はその相補鎖に対して６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％相同である。さらに別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：１３（すなわちｈＣＯＸ－３（ｃｓ））を含むヌクレオチド配列又はその相補鎖に対して６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％相同である。

【００１１】

一実施態様で、上記単離された核酸分子は、配列番号：１もしくは３で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含んでいる。別の好ましい実施態様で、上記単離された核酸分子は配列番号：１又は３で示されるヌクレオチド配列をもっている。

【００１２】

別の実施態様で、上記単離された核酸分子は、配列番号：４もしくは６で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含んでいる。別の好ましい実施態様で上記単離された核酸分子は配列番号：４又は６で示されるヌクレオチド配列をもっている。

【００１３】

さらに別の実施態様で、上記単離された核酸分子は配列番号：１０で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含んでいる。別の実施態様で、上記単離された核酸分子は配列番号：１０で示されるヌクレオチド配列をもっている。

【００１４】

さらに別の実施態様で、上記単離された核酸分子は、配列番号：１１で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含んでいる。別の実施態様で、上記単離された核酸分子は、配列番号：１１で示されるヌクレオチド配列をもっている。

【００１５】

さらに別の実施態様で、上記単離された核酸分子は、配列番号：１２で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含んでいる。別の実施態様で、上記単離された核酸分子は配列番号：１２で示されるヌクレオチド配列をもっている。

【００１６】

さらに別の実施態様で、上記単離された核酸分子は、配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含んでいる。別の実施態様で、上記核酸分子は配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列をもっている。

【００１７】

別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：２（すなわちＣＯＸ－３）、配列番号：５（すなわちＰＣＯＸ－１ａ）、配列番号：１４（ｈＣＯＸ－３（ｃｓ１））、配列番号：１５（すなわちｈＣＯＸ－３（ｃｓ２））及び配列番号：１６（すなわちｈＣＯＸ－３（ｃｓ３））のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる。一実施態様で、ＣＯＸ－１変異体核酸分子は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号１５又は配列番号：１６を含むアミノ酸配列（例えば配列番号：２、５、１４、１５又は１６の全アミノ酸配列）を含むアミノ酸配列と少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、又は９８％を超えて相同のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる。

【００１８】

一実施態様で、ＣＯＸ－１変異体のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子は、哺乳類源、例えば羊、ブタ、オオカミ又はイヌ由来である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体はニワトリ由来である。さらに別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体はヒト由来である。

【００１９】

本発明の別の実施態様が特徴的に提供するものは、ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドをコードするＣＯＸ－１変異体核酸分子を、非ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に検出する核酸分子好ましくはＣＯＸ－１変異体核酸分子である。例えば、一実施態様で、上記の核酸分子は、少なくとも５０、１００、１５０、２００、

２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０又は８００のヌクレオチドからなる長さの核酸分子であり、ストリンジェント条件下で、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号１３で示されるヌクレオチド配列又はその相補鎖を含む核酸分子とハイブリッドを形成する。

【００２０】

他の好ましい実施態様で、上記核酸分子は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変異体をコードし、そしてストリンジェント条件下、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３を含む核酸分子とハイブリッドを形成する。

【００２１】

本発明の別の実施態様は、ＣＯＸ－１変異体核酸分子に対しアンチセンスの単離された核酸分子、例えばＣＯＸ－１変異体核酸分子のコーディングストランドを提供する。

【００２２】

本発明の別の側面は、ＣＯＸ－１変異体核酸分子を含むベクターを提供する。特定の実施態様で、そのベクターは組み換え発現ベクターである。別の実施態様で、本発明は本発明のベクターを含有する宿主細胞を提供する。また本発明は、タンパク質又はポリペプチド、好ましくはＣＯＸ－１変異体のタンパク質又はポリペプチドの製造方法であって、そのタンパク質が産生されるように、組み換え発現ベクターを含有する本発明の宿主細胞例えば哺乳類の宿主細胞又は昆虫の細胞を適切な培地内で培養することによる製造方法を提供するものである。

【００２３】

本発明の別の側面が特徴的に提供するものは、単離されたＣＯＸ－１変異体又は組み換えＣＯＸ－１変異体のタンパク質とポリペプチドである。一実施態様で、その単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質（例えば、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ））は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメイン、膜結合ドメイン及びヘム結合ドメインそれぞれを少なくとも一つずつ含んでいる。別の実施態様で、上記単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメイン、膜結合ドメイン、ヘム結合ドメインそれぞれを少なくとも一つずつ含み、そして配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６を含むアミノ酸配列と、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９８％を超えて相同のアミノ酸配列をもっている。さらに別の実施態様で、上記単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメイン、膜結合ドメイン、ヘム結合ドメインそれぞれを少なくとも一つずつ含み、そして中枢神経系の細胞内で発現され及び／又は機能する。さらに別の実施態様で、上記単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメイン、膜結合ドメイン、ヘム結合ドメインそれぞれを少なくとも一つずつ有し、そして、細胞の成長に関連するシグナル伝達経路例えば細胞周期の調節に関連するシグナル伝達経路及び中枢神経系の機能での役割を果たす。別の実施態様で、上記単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメイン、膜結合ドメイン、ヘム結合ドメインそれぞれを少なくとも一つずつ有しそして、ストリンジェントハイブリッド形成条件下で、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３のヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリッドを形成するヌクレオチド配列を有する核酸分子でコードされている。

【００２４】

別の実施態様で、上記単離されたタンパク質は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列をもっている。一実施態様で、上記タンパク質は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６を含むアミノ酸配列（例えば配列番号：２、５、１４、１５又は１６の全アミノ酸配列）を含むアミノ酸配列と少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９８％を超えて相同のアミノ酸配列を有している。別の実施態様で、本発明が特徴的に提供するものは、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６のアミノ酸配列を有するタンパク質のフラグメントであって、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６で示されるアミノ酸配列の少なくとも１５個のアミノ酸（例えば連続アミノ酸）を含むフラグメントである。別の実施態様で、上記タンパク質は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６で示されるアミノ酸配列を有している。

【００２５】

本発明の別の実施態様が特徴的に提供するものは、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３を含むヌクレオチド配列（例えばそのヌクレオチド配列の全長）又はその相補鎖と、少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９８％を超えて相同であるヌクレオチド配列を有する核酸分子がコードする単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質である。さらに本発明が特徴的に提供するものは、ストリンジェントハイブリッド形成条件下配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号１３のヌクレオチド配列又はその相補鎖を含む核酸分子とハイブリッドを形成するヌクレオチド配列を有する核酸分子でコードされた単離されたタンパク質好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質である。

【００２６】

本発明のタンパク質又はその生物学的に活性の部分は、非ＣＯＸ－１変異体ポリペプチド（例えば異種アミノ酸配列）に作動的に連結されて融合タンパク質を生成することができる。さらに本発明が特徴的に提供するものは、本発明のタンパク質、好ましくはＣＯＸ－１変異体タンパク質（例えば、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ））に特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗などの抗体である。さらに上記ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生物学的に活性の部分は、医薬として許容できる担体を任意に含有する医薬組成物に組み入れることができる。

【００２７】

本発明は、別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体の核酸分子、タンパク質又はポリペプチドを検出することができて、それらが生物試料中に存在していることを検出する試薬と、生物試料を接触させることによって、ＣＯＸ－１変異体の核酸分子、タンパク質又はポリペプチドが生物試料中に存在していることを検出する方法を提供するものである。

【００２８】

別の実施態様で、本発明は、ＣＯＸ－１変異体の活性の指標（indicator）を検出することができてＣＯＸ－１変異体の活性が生物試料中に存在していることが検出される試薬と、生物試料を接触させることによって、ＣＯＸ－１変異体の活性が生物試料中に存在していることを検出する方法を提供するものである。

【００２９】

別の側面で、本発明は、ＣＯＸ－１変異体の活性を有するＣＯＸ－１変異体タンパク質を含有する指標組成物を提供し、その指標組成物を被検化合物と接触させて上記指標組成物中のＣＯＸ－１変異体の活性に対する上記被検化合物の作用を確認してＣＯＸ－１変異体タンパク質の活性を調節する化合物を同定することによって、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質又は核酸の活性を調節する化合物を同定する方法を提供するものである。

【００３０】
別の側面で、本発明は、ＣＯＸ－１変異体を発現できる細胞をＣＯＸ－１変異体の活性を調節する試薬と接触させて細胞のＣＯＸ－１変異体活性を調節することを含んでなるＣＯＸ－１変異体活性の調節方法を提供するものである。一実施態様で、上記試薬はＣＯＸ－１変異体の活性を阻害する。別の実施態様では、上記試薬はＣＯＸ－１変異体の活性を刺激する。一実施態様で、上記試薬は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質と特異的に結合する抗体である。一実施態様で、上記試薬は、ＣＯＸ－１変異体の遺伝子の転写又はＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡの転写を調節することによって、ＣＯＸ－１変異体の発現を調節する。さらに別の実施態様で、上記試薬は、ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はＣＯＸ－１変異体の遺伝子のコードストラントに対してアンチセンスのヌクレオチド配列を有する核酸配列である。

【００３１】
一実施態様で、本発明の方法は、ＣＯＸ－１変異体の活性調節因子である試薬を、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質又は核酸の異常な発現又は活性を特徴とする障害を有する被検者に投与することによって、このような被検者を治療するのに使用される。一実施態様で、ＣＯＸ－１変異体のモジュレーターはＣＯＸ－１変異体のタンパク質である。別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体のモジュレーターはＣＯＸ－１変異体核酸分子である。さらに別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体のモジュレーターは、ペプチドミメティック（peptidomimetic）又は他の小分子である。好ましい実施態様での、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質又は核酸の異常な発現を特徴とする障害は、細胞増殖に関連する障害例えば新生物生成障害又は中枢神経系の障害例えばアルツハイマー病である。

【００３２】
また、本発明は（ｉ）ＣＯＸ－１変異体タンパク質をコードする遺伝子の異常な修飾もしくは突然変異、（ｉｉ）その遺伝子の誤調節、及び（ｉｉｉ）ＣＯＸ－１変異体タンパク質の異常な翻訳後の一修飾のうちの少なくとも一つを特徴とする遺伝子の変化の有無を確認する診断検定法であって、その遺伝子の野生型がＣＯＸ－１変異体の活性を有するタンパク質をコードしている方法を提供するものである。診断検定法としては、例えばＣＯＸ－１変異体の有無又はＣＯＸ－１変異体の遺伝子の変化の有無を検出するアレーベースのシステムがある。

【００３３】
別の実施態様で、本発明は、本発明に記載の核酸によってコードされるＣＯＸ－１変異体の特異的阻害剤を医薬として許容できる担体に入れて投与することによって被検者の神経変性症状を改善する方法を提供する。

【００３４】
別の実施態様で、本発明は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）の遺伝子産物の活性を選択して阻害する化合物を、かような治療を必要とする被検者に投与することによって、被検者のＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）の活性を選択して阻害する方法を提供する。

【００３５】
別の実施態様で、本発明は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）の遺伝子産物を選択して阻害する非ステロイド化合物を、かような治療を必要とする被検者に投与することによって、被検者のＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）の活性を選択して阻害する方法であって、その非ステロイド化合物の活性が被検者に有意な毒性副作用をもたらさない方法を提供する。

【００３６】
さらに別の実施態様で、本発明は、かような治療を必要とする被検者に、ＣＯＸ－１変

異体の遺伝子産物の活性を選択して阻害する非ステロイド化合物を投与することによって、被検者のＣＯＸ－１変異体の活性を選択して阻害する方法であって；ＣＯＸ－１変異体の遺伝子産物の活性を選択して阻害する非ステロイド化合物の性能が、例えばＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）を発現しＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２を発現しない遺伝子工学的に処理された細胞を上記非ステロイド化合物と接触させ次にその細胞を予め定められた量のアラキドン酸に暴露し；ＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２を発現しＣＯＸ－１変異体を発現しない遺伝子工学的に処理された細胞を上記非ステロイド化合物と接触させ次にその細胞を予め定められた量のアラキドン酸に暴露し；アラキドン酸の、そのプロスタグランジンの代謝生成物の変換率を測定し；次に上記非ステロイド化合物に暴露された各細胞が変換した変換アラキドン酸の量を、上記非ステロイド化合物に暴露されなかった対照細胞が変換したアラキドン酸の量と比較して、ＣＯＸ－１変異体の活性を阻害しＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２の活性を阻害しない化合物を同定することによって確認される方法を提供するものである。

【００３７】

本発明の１以上の実施態様の詳細を、添付図面と下記説明で述べる。本発明の他の特徴、目的及び利点は下記説明と図面及び請求項から明らかになるであろう。

【００３８】

［詳細な説明］

本発明は、脳や他の組織内で細胞プロセスと関連するシグナル経路で役割を演じるすなわち機能する、本願で、「シクロオキシゲナーゼ１型変異体」すなわち「ＣＯＸ－１変異体」又は「ＣＯＸ－１変異体の核酸とポリペプチドの分子」と呼称される新規分子の発見に、少なくとも一部分基づいている。本発明の代表的なＣＯＸ－変異体としては、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）がある。一実施態様で、ＣＯＸ－１変異体の分子は、細胞の成長又は分化に関係する１又は２以上のタンパク質の活性を調節する。別の実施態様で、本発明のＣＯＸ－１変異体の分子は中枢神経系の機能を調節することができる。

【００３９】

シクロオキシゲナーゼのアイソザイムは、医薬として重要な治療剤の例えばアスピリン、イブプロフェン及びナプロキセンを含む非ステロイド系抗炎症医薬（ＮＳＡＩＤ）の細胞標的である。本発明は新規なＣＯＸ－１変異体の酵素を提供するものである。脂肪酸オキシゲナーゼの活性は、シクロオキシゲナーゼによるプロスタグランジン、トロンボキサン、ヒドロキシー及びヒドロペルオキシ脂肪酸の産生が主要なものであり、そして病原体誘発性脂肪酸オキシゲナーゼ（ＰＩＯＸ）と呼称される、植物中の酵素の類縁グループによって共有されている。現在のデータは、ＰＩＯＸ様酵素が自然に広く見られることを示している。ＰＩＯＸはヒドロペルオキシ脂肪酸とその誘導体を生成する。したがって、本発明のＣＯＸ－１変異体は、ＰＩＯＸと同様に、脳及び他の組織の中で、重要な酸素化脂肪酸由来のメッセンジャーを合成するために必要な重要なアミノ酸残基を含んでいる。

【００４０】

先に述べたように、シクロオキシゲナーゼは、プロスタグランジンの合成反応で役割を演じている。細胞の成長に関連するシグナル経路に関係するシクロオキシゲナーゼの活性が阻害されるか又は過剰に刺激されると、細胞成長が混乱するようになることがあり、続いて細胞成長が関連する障害になることがある。用語「細胞成長が関連する障害」は本願で使用する場合、細胞成長のディレギュレーション（deregulation）例えばアップレギュレーション（upregulation）又はダウンレギュレーション（downregulation）を特徴とする障害、病気又は症状を含んでいる。細胞成長のディレギュレーションは、細胞増殖、細胞周期のプログレッション（progression）、細胞分化及び／又は細胞肥大のディレギュレーションが原因である。細胞成長が関連する障害の例としては、癌例えば黒色腫、前立腺癌、子宮頸癌、乳癌、結腸癌又は肉腫などの障害がある。細胞成長が関連する障害とし

てはさらに、無調節の（unregulated）又は調節不全の（dysregulated）アポトーシス（すなわちプログラムされた細胞死）に関係する障害がある。アポトーシスは、損傷細胞又は有害細胞が、多細胞生物から排除される細胞自殺プロセスである。アポトーシスを受けている細胞は、細胞の収縮、細胞膜の成熟、クロマチンの凝縮、アポトープ体（apoptotic body）の生成とフラグメンテーションを含む明確な形態の変化をしている。この細胞自殺プログラムは、動物と植物の種に進化の過程で保存されている。アポトーシスは、後生動物の発生とホメオスタシスで重要な役割を演じ、また昆虫の幼虫の発生と変態でも重要である。さらに、アポトーシスは宿主防衛機構として作用する。例えば致命的に感染した細胞は、アポトーシスによって排除されてウィルスの増殖が制限される。アポトーシスの機構は、生物及び非生物の傷害に至る植物反応に関連している。アポトーシスの調節不全は、癌、神経変性障害及び自己免疫疾患を含む各種のヒト疾患に関連している。したがって、アポトーシスを操作する新規の機序が確認されると、そのプロセスを研究し操作する新しい手段が提供される。

【００４１】

本発明は、少なくとも一部分が、特定の保存された構造及び機能の特徴を有する分子のファミリーを有する、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質と核酸の分子と呼称される新規な分子の発見に基づいている。用語「ファミリー」は、本発明のタンパク質と核酸の分子を意味する場合、本願で定義するように、共通の構造ドメイン又は構造モチーフを有しかつアミノ酸又はヌクレオチドの配列の十分な相同性を有する２種以上のタンパク質又は核酸分子を意味するものである。このようなファミリーのメンバーは、天然に生成するか又は非自然的に生成し、同一種又は異なる種から生成する。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第一タンパク質及びヒト起源の他の異なるタンパク質を含んでいることがあり、あるいは非ヒト起源の特定の同族体を含んでいることもある。また、ファミリーのメンバーは、共通の機能特性を有していることもある。本発明の一実施態様は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）を含む代表的なＣＯＸ－１変異体を特徴的に提供する。本発明の核酸とタンパク質の分子を、下記のサブセクションでより詳細に説明する。

【００４２】

一実施態様で、本発明のＣＯＸ－１変異体の核酸分子はシクロオキシゲナーゼ１型のイントロン－１又はそのフラグメントを含有している。一側面で上記核酸分子はｍＲＮＡの転写産物である。別の側面で上記核酸分子はｃＤＮＡである。別の側面で、上記核酸分子は、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメインを少なくとも一つ、膜結合ドメインを少なくとも一つ及びヘム結合ドメインを少なくとも一つ含むポリペプチドをコードしている。さらに別の側面で、上記核酸分子は、シクロオキシゲナーゼ１のイントロン－１又はそのフラグメントを含有するシクロオキシゲナーゼポリペプチド又はその天然に存在する対立遺伝子変異体をコードしている。

【００４３】

本発明は、シクロオキシゲナーゼのイントロン－１を含有するＣＯＸ－１変異体の核酸分子とポリペプチドを提供するものである。これらのｍＲＮＡ転写産物とｃＤＮＡ中にイントロン－１が保持されるとそのタンパク質のシグナルペプチドが破壊されるので、これらのｍＲＮＡ転写産物及びそれら転写産物由来のｃＤＮＡによってコードされるタンパク質の細胞レベル以下の配置が変化すると考えられる。これらタンパク質の細胞レベル以下の配置が、ＣＯＸ－１が通常見られる小胞体内腔からサイトゾル又は他の部位に変わると、我々のｃＤＮＡがコードするタンパク質の翻訳後修飾、レドックス状態及びタンパク質－タンパク質間の相互作用を変える。これらの変化は、上記タンパク質の酵素活性に有意に影響しその作用によってこれらのタンパク質はＣＯＸ－１とは別個の新規な医薬標的になると予想される。

【００４４】

本願で提供されるノーザンブロットとＲＴ－ＰＣＲのデータは、類似の配列がヒトに存

在していることを示唆している。これらのデータは、ヒト組織が、イントロン－１の配列を有するＣＯＸ－１遺伝子からコードされるｍＲＮＡを含有していることを示している。シクロオキシゲナーゼのイントロン－１はすでに配列が決定されているが、本願に開示されている発明は、イントロン－１の配列が成熟シクロオキシゲナーゼ転写産物内に含まれているという最も重要な証拠を提供している。これら配列のアラインメントは、各々の種におけるイントロン－１が短く（９０～１０２ｎｔ）、その配列の長さは３の倍数でありそしてその配列は進化の過程で保存されている。その配列は３の倍数であるから、その配列がＣＯＸ－１のｍＲＮＡに保存されている場合、イントロン－１はインフレーム挿入体（in-frame insertion）を構成している。その配列の進化の過程での保存は、イントロン－１の５’末端がコードしている保存配列が三つの種のすべてに存在していることを予想させ、前記タンパク質を細胞レベルにおいて、標的とする部位に送るのに重要である。

【００４５】

代表的なＣＯＸ－１変異体としてはＣＯＸ－３がある。イントロン－１に対してアンチセンスのオリゴヌクレオチドプローブを使用して行うヒト組織由来の（ポリＡ）ＲＮＡのノーザンブロット分析の結果は、約５．２ＫｂのｍＲＮＡ及び場合によってはこれより小さいｍＲＮＡが上記プローブによって明確に検出されることを示している。このヒトの約５．２Ｋｂのイントロン－１ハイブリッド形成ＲＮＡの発現は脳皮質で最大であったが、イヌの同じ組織が多量のイントロン－１含有ＣＯＸ－１ｍＲＮＡを含有している。ＣＯＸ－３が発現される約５．２ＫｂのＲＮＡが、脳の他の部分や心臓又は筋肉などの他の組織に存在していることも発見された。イントロン－１に対して特異的なセンスプライマー及びＣＯＸ－１のオープンリーディングフレームの終止コドンの領域に対してアンチセンスのプライマーからなるプライマー対を使用する逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を、ヒト脳ＲＮＡを鋳型として使用して実施した。この実験によって１．８Ｋｂのフラグメントが生成したが、これはイントロン－１を含有するヒトＣＯＸ－１ｃＤＮＡを増幅するのに適切な大きさである。さらにこのプロットをネズミのＣＯＸ－１ｃＤＮＡとハイブリッドを形成させると、上記増幅されたフラグメントと、高いストリンジェンシィで強くハイブリッドが形成された。これは、このフラグメントがヒトＣＯＸ－１ｃＤＮＡを含有していることを示している。

【００４６】

一実施態様で、単離されたＣＯＸ－１変異体のタンパク質又はポリペプチドは、脂肪酸ラジカルの環化反応及び／又は酸素化反応を触媒するドメインが少なくとも一つ、膜結合ドメインが少なくとも一つ及びヘム結合ドメインが少なくとも一つ存在していることに基づいて同定される。

【００４７】

本発明の単離されたタンパク質は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のアミノ酸配列に相同のアミノ酸配列を有しているか、又は配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３に相同のヌクレオチド配列によってコードされている。用語「相同の」は、本明細書で使用する場合、第一のアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列と第二のアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列が共通の構造ドメインもしくは構造モチーフ及び／又は共通の機能活性を共有するように、第二のアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列に対して十分な又は最小の数の同一もしくは同等のアミノ酸の残基（例えば類似の側鎖を有するアミノ酸残基）もしくはヌクレオチドを含有する第一のアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列を意味する。例えば、共通の構造ドメインを共有し、それらドメインのアミノ酸配列が少なくとも３０％、４０％もしくは５０％相同であり、好ましくは６０％、より好ましくは７０％～８０％さらにより好ましくは９０～９５％相同でありそして少なくとも一つの好ましくは少なくとも二つの構造ドメインもしくは構造モチーフを含有するアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列は、本願では十分に相同であると定義される。さらに、少なくとも３０％、４０％もしくは５０％、好ましくは６０％より好ましくは７０～８０％もしくは９０

～９５％相同でありそして共通の機能活性を共有するアミノ酸もしくはヌクレオチドの配列は、本願では十分に相同であると定義される。

【００４８】

本願で相互に置きかえて使用する場合、用語「ＣＯＸ－３活性」、「ＣＯＸ－３の生物活性」又は「ＣＯＸ－３の機能活性」は、標準の方法で生体内又は生体外で測定されるような、ＣＯＸ－３応答細胞又はＣＯＸ－３タンパク質の基質に対しＣＯＸ－３のタンパク質、ポリペプチド又は核酸分子が発揮する活性を意味する。ＣＯＸ－３の生物活性はここで説明する。同様に、用語「ＰＣＯＸ－１ａの活性」、「ＰＣＯＸ－１ａの生物活性」又は「ＰＣＯＸ－１ａの機能活性」は、標準の方法で生体内又は生体外で測定されるような、ＰＣＯＸ－１ａ応答細胞又はＰＣＯＸ－１ａタンパク質の基質に対しＰＣＯＸ－１ａのタンパク質、ポリペプチド又は核酸分子によって発揮される活性を意味する。ＰＣＯＸ－１ａの生物活性はここで説明する。先に述べた用語は、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）を含む、ここで説明する代表的なＣＯＸ－１変異体すべてに適用することができる。

【００４９】

単離されたＣＯＸ－３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列とＣＯＸ－３ポリペプチドの予測アミノ酸配列それぞれを、図９Ａ（配列番号：１）と図９Ｂ（配列番号：２）に示す。単離されたＰＣＯＸ－１ａのｃＤＮＡヌクレオチド配列とＰＣＯＸ－１ａポリペプチドの予測アミノ酸配列それぞれを図９Ｄ（配列番号：４）と図９Ｅ（配列番号：５）に示す。ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）のｃＤＮＡの共通ヌクレオチド配列を図１６（配列番号：１３）示す。単離されたｈＣＯＸ－３（ｃｃ）のｃＤＮＡのヌクレオチド配列を図１７（配列番号：１０）に示す。単離されたｈＣＯＸ－３（ａｆ）のｃＤＮＡのヌクレオチド配列を図１８（配列番号：１１）に示す。単離されたｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）のｃＤＮＡヌクレオチド配列を図１９（配列番号：１２）に示す。上記共通配列由来のアミノ酸配列を図２０Ａ～２０Ｆ（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）に示す。

【００５０】

ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）をコードするヌクレオチド配列を含有するプラスミドを、★★★付けでかつ指定受託番号★★★にて、米国バージニア州２０１１０－２２０９、マナッサス１０８０１所在のブールバード大学のＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）に寄託した。これらの寄託物は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の条件下で保管される。これらの寄託は、単に当業者の便宜のために行ったのであり、寄託が米国特許法１１２条に基づいて要求されるということを認めたわけではない。

【００５１】

本発明の一実施態様は、タンパク質もしくはその生物学的に活性の部分をコードする単離された核酸分子とＣＯＸ－１変異体（すなわちＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）をコードする核酸（例えばｍＲＮＡ））を同定するためハイブリッド形成プローブとして使用するのに十分な核酸フラグメント及び核酸分子の増幅又は突然変異のためＰＣＲプライマーとして使用するフラグメントに関する。用語「核酸分子」は、本明細書で使用する場合、ＤＮＡ分子（例えばｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）とＲＮＡ分子（例えばｍＲＮＡ）及びヌクレオチド類似体を使用して生成される前記ＤＮＡもしくはＲＮＡの類似体を含むものである。その核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよいが、二本鎖ＤＮＡが好ましい。

【００５２】

「単離された」核酸分子は、その核酸の自然源中に存在する他の核酸分子類から分離された核酸分子である。例えば、ゲノムＤＮＡについては、用語「単離された」は、そのゲノムＤＮＡが自然に連結している染色体から分離された核酸分子を含んでいる。好ましく

は、「単離された」核酸には、その核酸が誘導される生物のゲノムＤＮＡ中のその核酸に自然に隣接している配列（すなわちその核酸の５’末端と３’末端に位置している配列）がない。例えば、各種の実施態様で、上記単離された核酸分子は、その核酸が誘導される細胞のゲノムＤＮＡ中のその核酸分子に自然に隣接しているヌクレオチド配列であって、約５Ｋｂ、４Ｋｂ、３Ｋｂ、２Ｋｂ、１Ｋｂ、０.５Ｋｂ又は０.１Ｋｂ小さいヌクレオチド配列を含有していてもよい。さらに、ＣＯＸ－１変異体のｃＤＮＡ分子などの「単離された」核酸分子は、組み換え法で製造される場合は他の細胞物質又は培地を実質的に含有しないか又は化学的に、合成される場合は科学的前駆物質もしくは他の化学薬剤を実質的にしていない。

【００５３】

本発明の核酸分子、例えば配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：★、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３又はその一部のヌクレオチド配列を有するヌクレオチド配列は、標準の分子生物学の方法及び本明細書で提供される配列の情報を利用して単離することができる。例えば、配列番号：１の核酸配列又は配列番号：３のヌクレオチド配列の全部又は一部を、ハイブリッド形成プローブとして使用し、標準のハイブリッド形成法とクローニング法（例えばＳａｍｂｒｏｏｋ、Ｊ.、Ｆｒｉｔｓｈ、Ｅ．Ｅ．及びＭａｎｉａｔｉｓ、Ｔ．著「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ: Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｎｕａｌ」第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー１９８９年に記載されているような方法）を利用することによって、核酸分子を単離することができる。

【００５４】

さらに、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の全部又は一部を含有する核酸分子は、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の配列に基づいて設計された合成のオリゴヌクレオチドプライマーを使用しポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって単離することができる。

【００５５】

本発明の核酸は、標準のＰＣＲ増幅法にしたがって、鋳型としてｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ又は代わりにゲノムＤＮＡを使用しかつ適当なオリゴヌクレオチドのプライマーを使用して増幅することができる。このようにして増幅された核酸は適当なベクター中にクローン化され次にＤＮＡ配列分析法によって特性を決定することができる。さらに、標準の合成法によって、例えば自動ＤＮＡ合成機を使用して、ＣＯＸ－１変異体ヌクレオチドの配列に相当するオリゴヌクレオチドを製造することができる。

【００５６】

各種の実施態様で、本発明の単離された核酸分子は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）それぞれのコーディング領域に相当する、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列を含んでいる。

【００５７】

他の好ましい実施態様で、本発明の単離された核酸分子は、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列又はこれらヌクレオチド配列のいずれかの一部の相補鎖である核酸分子を含んでいる。配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列に相補性の核酸分子はそれぞれ、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列とハイブリッドを形成して安定な

二重らせん体を形成することができるように、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列に対して十分に相補性の核酸分子である。

【００５８】

さらに別の好ましい実施態様で、本発明の単離された核酸分子は、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列（例えばそのヌクレオチド配列の全長）又はこれらのヌクレオチド配列のいずれかの一部分と少なくとも約５０％、５４％、５５％、６０％、６２％、６５％、７０％、７５％、７８％、８０％、８５％、８６％、９０％、９７％、９８％もしくは９８％を超えて相同性であるヌクレオチド配列を含んでいる。

【００５９】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の核酸配列の一部分だけ例えばプローブもしくはプライマー又はタンパク質の生物学的に活性の部分をコードするフラグメントとして使用できるフラグメントだけを含有していてもよい。ＣＯＸ－１変異体の転写産物のクローン化によって確認されるヌクレオチド配列は、他のＣＯＸ－１変異体のファミリーのメンバー及び他の種由来の同族体を同定及び／又はクローン化するのに使用するように設定されたプローブ及びプライマーを生成することができる。上記プローブ／プライマーは通常、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含有している。上記オリゴヌクレオチドは通常、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３のセンス配列；配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３のアンチセンス配列；又は配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３の天然に存在する対立遺伝子の変異体もしくは突然変異体の少なくとも約１２もしくは１５個の、好ましくは約２０もしくは２５個の、より好ましくは約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５もしくは７５個の連続ヌクレオチドとストリンジェント条件下ハイブリッドを形成するヌクレオチド配列の領域をもっている。代表的な実施態様で、本発明の核酸分子は、少なくとも３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０もしくは８００個のヌクレオチドの長さでありそして配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２もしくは配列番号：１３の核酸分子とストリンジェントハイブリッド形成条件下でハイブリッドを形成するヌクレオチド配列を含んでいる。

【００６０】

本明細書で定義するように、ストリンジェント条件下、互いにハイブリッドを形成しない核酸は、互いに実質的に同一であるポリペプチドをコードしている場合、やはり互いに実質的に相同である。これは、例えば、核酸が、遺伝暗号の重複性によって可能になるような高いコドン縮重を利用して合成又は組み換えによってつくられるときに起こる。

【００６１】

ＣＯＸ－１変異体のヌクレオチド配列に基づいたプローブを使用して、同じか又は相同のタンパク質をコードする転写産物又はゲノム配列を検出できる。好ましい実施態様で、上記プローブは、さらにそれに添付される標識基を含んでおり、その標識基としては例えば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素又は酵素コファクターがある。このようなプローブは、例えば被検者由来の細胞の試料中のＣＯＸ－１変異体をコードする核酸のレベルを測定することによって例えばＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡのレベルを検出することによって、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質を誤発現（misexpress）する細胞又は組織を同定するための診断試験キットの一部品として使用できる。

【００６２】

「ＣＯＸ－１変異体のタンパク質の生理的に活性の部分」をコードする核酸フラグメントは、生理活性を有するポリペプチド（そのタンパク質の生理活性は本明細書で述べる）をコードする配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号

：１２又は配列番号：１３のヌクレオチド配列の一部を単離し、そのタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば生体外での組み換え発現によって）、次いでそのタンパク質のコードされた部分の活性を評価することによって調製することができる。

【００６３】

本発明さらに、遺伝暗号が縮重しているため配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列とは異なっていて、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３で示されるヌクレオチド配列でコードされているのと同じタンパク質をコードする核酸分子を含んでいる。別の実施態様で、本発明の単離された核酸分子は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有している。

【００６４】

配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３で示されるＣＯＸ－１変異体のヌクレオチド配列に加えて、タンパク質のアミノ酸配列を変化させるＤＮＡ配列の多型性が母集団（例えばヒトの母集団）中に存在しているかもしれないことは当業者は分かっているであろう。このような遺伝多型性は、天然の対立遺伝子の変化によって、母集団中の個体間に存在しているかもしれない。用語「遺伝子」と「組み換え遺伝子」は、本明細書で使用する場合、ＣＯＸ－１タンパク質好ましくは哺乳類のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含みさらに非コード制御配列及びイントロンを含んでいることもある核酸分子を意味する。天然対立遺伝子の変異はＣＯＸ－１遺伝子に起こるので、ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドをコードする変異ｍＲＮＡ転写産物は、このような対立遺伝子の変異を含んでいることがある。天然の対立遺伝子の変異によって起こりかつＣＯＸ－１変異体タンパク質の機能活性を変えないＣＯＸ－１変異体遺伝子中のかようなヌクレオチドの変異とその結果生じるアミノ酸多型性のいずれか及びすべては本発明の範囲内にあるものである。

【００６５】

さらに、他のＣＯＸ－１ファミリーのメンバーをコードし、したがって配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内に入っている。例えば、別のＣＯＸ－１変異体のｃＤＮＡは、開示されたヒト、イヌ又はニワトリの配列のヌクレオチド配列に基づいて同定することができる。さらに、異なる種由来の本発明のタンパク質をコードし、したがって配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の開示された配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内に含まれている。例えば、マウスのＣＯＸ－１変異体のｃＤＮＡは、ヒト、イヌ又は羊のヌクレオチド配列に基づいて同定することができる。

【００６６】

本発明のｃＤＮＡの天然対立遺伝子の変異体と相同体に相当する核酸分子は、それら核酸分子の、本願に開示されているＣＯＸ－１変異体の核酸に対する相同性に基づいて、本願に開示されているｃＤＮＡ又はその一部分をハイブリッド形成プローブとして使用し、ストリンジェントハイブリッド形成条件下、標準のハイブリッド形成法にしたがって単離することができる。

【００６７】

したがって、別の実施態様で、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも１５、２０、２５、３０個又はそれを超える長さのヌクレオチドであり、そしてストリンジェント条件下で、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３のヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリッドを形成する。他の実施態様で、上記核酸は、少なくとも３０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０又は６

００個のヌクレオチドの長さである。用語「ストリンジェント条件下でハイブリッドを形成する」は、本明細書で使用する場合、互いに少なくとも３０％、４０％、５０％又は６０％相同であるヌクレオチド配列が互いにハイブリッドを形成したままであるハイブリッド形成と洗浄の条件を意味するものである。好ましくは、その条件は、互いに少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、さらに一層好ましくは少なくとも約８５％又は９０％相同である配列が一般に互いにハイブリッドを形成したままであるような好ましい。このようなストリンジェント条件は、当業者には知られており、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、米国ニューヨーク１９８９年の６．３．１～６．３．６に見ることができる。ストリンジェントハイブリッド形成条件の好ましい例は、限定されないが、約４５℃にて６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中でハイブリッドを形成し、続いて、５０～６５℃にて０.２×ＳＳＣ、０.１％ＳＤＳ中で１回以上洗浄する条件である。好ましくは、ストリンジェント条件下で、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の配列とハイブリッドを形成する本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子と同じである。用語「天然に存在する」核酸分子は、本明細書で使用する場合、天然に存在する（例えば天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有するＲＮＡ又はＤＮＡの分子を意味する。

【００６８】

母集団中に存在することがある配列の天然に存在する対立遺伝子変異体に加えて、当業者はさらに、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３のヌクレオチド配列を突然変異で変化させて、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を、そのタンパク質の機能性能を変えることなく変化させることができることが分かるであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基のアミノ酸置換を行うヌクレオチド置換は、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の配列で行うことができる。「非必須」アミノ酸の残基は、生理活性を変えることなく（例えば配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６の配列）の野生型配列から変えることができる残基であり、一方「必須」アミノ酸残基は生理活性のために必要である。例えば、本発明のＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質の間に保存されているアミノ酸残基は、特に容易に変えることができないと考えられる。さらに、本発明のタンパク質との他のファミリーメンバーの間に保存されている追加のアミノ酸残基は容易には変えられないようである。

【００６９】

したがって、本発明の別の側面は、活性を得るために不可欠なものではないアミノ酸残基の変化を含む本発明のタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなタンパク質は、アミノ酸配列が配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６とは異なるが生理活性を保持している。一実施態様で、単離された核酸分子は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６のアミノ酸配列と少なくとも約４１％、４２％、４５％、５０％、５５％、５９％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９８％を超えて相同のアミノ酸配列（例えば配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６の全アミノ酸配列）を含有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有している。

【００７０】

配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６のタンパク質に相同の本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子は、１又は２以上のアミノ酸の置換、付加又は削除がコードされているタンパク質に導入されるように、

１又は２以上のヌクレオチドの置換、付加又は削除を、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３のヌクレオチド配列中に導入することによってつくることができる。標準の方法、例えば部位特異的突然変異誘発法及びＰＣＲ仲介突然変異誘発法によって、突然変異を、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３に導入できる。同類アミノ酸置換（conservative amino acid substitution）を１又は２以上の予想非必須アミノ酸残基で行うことが好ましい。「同類アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷の極性側鎖を有するアミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のファミリーがある。したがって、本発明のタンパク質の予想非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。代わりに、別の実施態様で、例えば飽和突然変異誘発法によって、ＣＯＸ－１変異体のコード配列のすべて又は一部分にそってランダムに突然変異誘発を導入することができ、そして生成した突然変異体をＣＯＸ－１変異体の生理活性についてスクリーニングして、活性を保持する突然変異体を同定できる。配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３の突然変異誘発を行った後、コードされたタンパク質は組み換えによって発現することができかつそのタンパク質の活性を確認することができる。

【００７１】

上記のＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質をコードする核酸分子に加えて、本発明の別の側面は、上記核酸分子に対してアンチセンスの単離された核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に対し相補性であるヌクレオチド配列、例えば二本鎖ｃＤＮＡ分子のコーディングストランドに対し相補性であるか又はｍＲＮＡ配列に対して相補性のヌクレオチド配列で構成されている。したがって、アンチセンス核酸はセンス核酸と水素結合をすることができる。そのアンチセンス核酸は、ＣＯＸ－１変異体のコーディングストランドに対し相補性であることもあり又はその一部分だけと相補性のこともある。一実施態様で、アンチセンス核酸分子は、ＣＯＸ－１変異体をコードするヌクレオチド配列のコーディングストランドの「コーディング領域」に対しアンチセンスである。用語「コーディング領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を意味する。別の実施態様で、上記アンチセンス核酸分子は、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコーディングストランドの「非コーディング領域」に対しアンチセンスである。用語「非コーディング領域」は、コーディング領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない５’と３’の配列（すなわち５’と３’の非翻訳領域とも呼称される）を意味する。

【００７２】

本明細書に開示されている、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）をコードするコーディングストランド配列が与えられると、本発明のアンチセンス核酸はワトソンとクリック型塩基対の法則にしたがって設計することができる。上記アンチセンス核酸分子は、ｍＲＮＡの全コーディング領域に相補性であってもよいが、より好ましくは、ｍＲＮＡのコーディング領域又は非コーディング領域の一部のみに対してアンチセンスのオリゴヌクレオチドである。例えば、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドは

、ｍＲＮＡの翻訳開始部位を囲む領域に相補性であってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは例えば約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５又は５０個のヌクレオチドの長さでもよい。本発明のアンチセンス核酸は、当該技術分野で公知の方法を利用し、化学合成法や酵素による連結反応を使用して構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増大するように又はアンチセンス核酸とセンス核酸とで形成される二重らせん体の物理的安定性を増大するように設計された種々修飾されたヌクレオチドを使用して化学的に合成することができ、例えばホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換のヌクレオチドを使用できる。アンチセンス核酸を生成させるのに使用できる修飾ヌクレオチドの例としては、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルキューオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２、２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５’－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（Ｖ）、ワイブトキソシン（wybutoxosine）、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（Ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）Ｗ及び２、６－ジアミノプリンがある。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配向でサブクローン化されている発現ベクターを使用して生物学的に製造することができる（すなわち挿入された核酸から転写されたＲＮＡは対象の標的核酸に対してアンチセンス配向になっている。これについては以下のサブセクションでさらに説明する。）

【００７３】

本発明のアンチセンス核酸分子は一般に、それら分子がタンパク質をコードする細胞ｍＲＮＡ及び／又はゲノムＤＮＡとハイブリッドを形成するか又は結合して、そのタンパク質の発現を例えば転写及び／又は翻訳を阻害することによって阻害するように、被検者に投与されるか又は生体内で生成される。上記のハイブリッド形成反応は、安定な二重らせん体を生成する通常のヌクレオチド相補性で行うことができ、又は例えばＤＮＡ二重らせんに結合するアンチセンス核酸分子の場合は、その二重らせんの主溝における特異的相互作用によって行うことができる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の一例は組織部位への直接注射である。あるいは、アンチセンス核酸分子を修飾し選択された細胞を標的として全身的投与を行うことができる。例えば、アンチセンス分子は全身的投与を行う場合、そのアンチセンス核酸分子は、その分子が選択された細胞表面に発現された受容体又は抗原に特異的に結合するように、例えばそのアンチセンス核酸分子を細胞表面の受容体又は抗原に結合するペプチド又は抗体に結合させることによって修飾できる。また、そのアンチセンス核酸分子は、本明細書に記載されているベクターを使用して細胞に送達することもできる。そのアンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するため、そのアンチセンス核酸分子が強力なポルＩＩ又はポルＩＩＩのプロモーターの制御下におかれているベクター構造体が好ましい。

【００７４】

さらに別の実施態様で、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それが相補的領域を有するｍＲＮＡなどの一本鎖核酸を開裂できるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡ分子である。したがって、リボザイム（例えばハンマーヘッドリボザイム（Ｈａｓｅｌｈｏｆｆ及びＧｅｒｌａｃｈ、Ｎａｔｕｒｅ、３３４巻５８５～５９

１頁１９８８年に記載されている））を使用して、触媒反応でＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ転写産物を開裂しｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる。－インコーディング核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示されているＣＯＸ－１変異体ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号：１、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２又は配列番号：１３）に基づいて設計することができる。例えば、その活性部位のヌクレオチド配列が、－インコーディングｍＲＮＡ内で開裂されるヌクレオチド配列に相補性であるＴｅｔｒａｈｙｍｅｎａ　Ｌ－１９　ＩＶＳ　ＲＮＡの誘導体を構築することができる（例えば、Ｃｅｃｈらの米国特許第４，９８７，０７１号及びＣｅｃｈらの米国特許第５，１１６，７４２号を参照）あるいは、ｍＲＮＡを使用して、特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡを、ＲＮＡ分子のプールから選択することができる（例えばＢａｒｔｅｌ、Ｄ．及びＳｚｏｓｔａｋ、Ｊ．Ｗ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ２６１巻１４１１～１４１８頁１９９３年を参照）。

【００７５】

あるいは、ＣＯＸ－１変異体遺伝子の発現は、（例えばプロモーター及び／又はエンハンサー）の調節領域に相補性のヌクレオチド配列を標的として、標的細胞内の前記遺伝子の転写を阻止する三重らせん構造を形成させることによって阻害することができる（一般に、Ｈｅｌｅｎｅ、Ｃ．、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓ．６（６）巻５６９～５８４頁１９９１年、Ｈｅｌｅｎｅ、Ｃ．ら、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０巻２７～３６頁１９９２年及びＭａｈｅｒ、Ｌ．Ｊ．、Ｂｉｏａｓｓａｙｓ１４（１２）巻８０７～８１５頁１９９２年を参照）。

【００７６】

さらに別の実施態様で、本発明の核酸分子は、塩基部分、糖部分又はリン酸骨格を修飾して、その分子の安定性、ハイブリッド形成性又は可溶性を改善することができる。例えば、本発明の核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格を修飾してペプチド核酸をつくることができる（Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．らのＢｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｅｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４（１）巻５～２３頁１９９６年参照）。用語「ペプチド核酸」すなわち「ＰＮＡ」は、本明細書で使用する場合、そのデオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド骨格によって置換され４個の天然の核酸塩基しか保持されていない核酸擬態（nucleic acid mimic）例えばＤＮＡ擬態を意味する。ＰＮＡの中性骨格は、低イオン強度の条件下で、ＤＮＡ及びＲＮＡと特異的にハイブリッドを形成できることがわかっている。ＰＮＡオリゴマーは、Ｈｙｒｕｐ、Ｂ．らの１９９６年の前掲論文；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’ｋｅｅｆｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３巻１４６７０～１４６７５頁１９９６年に記載されているような標準の固相ペプチド合成プロトコルを利用して合成することができる。

【００７７】

本明細書に開示されている核酸分子のＰＮＡは治療と診断の用途に使用できる。例えばＰＮＡは、例えば転写もしくは翻訳の停止を誘発するか又は置換を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的調節を行うためのアンチセンス剤又は抗原剤として使用することができる。また本発明の核酸分子のＰＮＡは、遺伝子の単一塩基対の突然変異を分析するときに（例えばＰＮＡ特異的ＰＣＲクランピング法によって）、他の酵素と組み合わせて使用する場合、「人工制限酵素」として使用することができ（例えばＳ１ヌクレアーゼ（Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．の１９９６年の前掲論文））、又はＤＮＡの配列決定もしくはハイブリッド形成を行うためのプローブもしくはプライマーとして使用することができる（Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．らの１９９６年の前掲論文、Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’ｋｅｅｆｅの前掲論文）。

【００７８】

別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体のＰＮＡは、親油性基又は他のヘルパー基をＰＮＡに結合させることによって、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラを製造することによって、又は当該技術分野で公知のリポソーム又は他の薬剤送達法を利用することによって、（例えばその安定性又は細胞の摂取を高めるために）修飾することができる。例えば、ＰＮＡとＤＮＡの

有利な特性を兼ね備えた、ＣＯＸ－１変異体核酸分子のＰＮＡ－ＤＮＡキメラを製造することができる。このようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素（例えばＲＮアーゼＨ及びＤＮＡポリメラーゼ）をＤＮＡ部分と相互に作用させて、そのＰＮＡ部分は高い結合のアフィニティと特異性を提供できる。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基のスタッキング、ヌクレオベース間の結合の数及び配向の観点から選択した適切な長さのリンカーを使用して連結することができる（Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．の１９９６年の前掲論文）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、Ｈｙｒｕｐ　Ｂ．の１９９６年の前掲論文及びＦｉｎｎ　Ｐ．Ｊ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２４（１７）巻３３５７～３３６３頁１９９６年に記載されているようにして合成することができる。例えば、ＤＮＡ連鎖は、標準のホスホロアミダイト連結化学法を利用して固体支持体上に合成することができ、そして修飾ヌクレオシド類似体、例えば５’－（４－メトチシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホロアミダイトをＰＮＡとＤＮＡの５’末端との間に使用できる（Ｍａｇ、Ｍ．らＮｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１７巻５９７３～５９８８頁１９８９年）。次にＰＮＡモノマーを段階的に連結して、５’ＰＮＡセグメント及び３’ＤＮＡセグメントとのキメラ分子を製造する（Ｆｉｎｎ　Ｐ．Ｊ．らの１９９６年の前掲論文）。あるいは、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントと３’ＰＮＡセグメントで合成することができる（Ｐｅｔｅｒｓｅｒ、Ｋ．Ｈ．ら、Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５巻１１１９～１１２４頁１９７５年）。

【００７９】

他の実施態様で、上記オリゴヌクレオチドは、以下のような別の基が付加されている。例えばペプチド（例えば生体内の宿主細胞受容体を標的とするため）、又は細胞膜を横切る輸送を容易にする薬剤（例えばＬｅｔｓｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６巻６５５３～６５５６頁１９８９年；Ｌｅｍａｉｔｒｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４巻６４８～６５２頁１９８７年；国際特許願公開第ＷＯ８８／０９８１０号参照）もしくは血液脳関門を横切る輸送を容易にする薬剤（例えば国際特許願公開第ＷＯ８９／１０１３４号参照）の基がある。さらに、前記オリゴヌクレオチドは、ハイブリッド形成でトリガーされる開裂剤（例えばＫｒｏｌら、Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ６巻９５８～９７６頁１９８８年参照）又はインターカレーション剤（例えばＺｏｎ、Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５巻５３９～５４９頁１９８８年参照）で修飾することができる。この目的のために、上記オリゴヌクレオチドは他の分子（例えばペプチド、ハイブリッド形成でトリガーされる架橋剤、輸送剤又はハイブリッド形成でトリガーされる開裂剤）と結合させることができる。

【００８０】

本発明の別の側面は、抗ＣＯＸ－１変異体の抗体を生成させる免疫原として使用するのに適した単離されたＣＯＸ－１変異体タンパク質とその生理活性部分及びポリペプチドフラグメントに関する。一実施態様で、未変性のＰＣＯＸ－１並びにＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質は、標準タンパク質精製技術を使用する適切な精製方式で、細胞又は組織の資源から単離することができる。別の実施態様で、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質は、組み換えＤＮＡ法で製造される。ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質又はポリペプチドは、組み換え発現法の代わりに、標準のペプチド合成法を利用して化学的に合成することができる。

【００８１】

「単離された」か又は「精製された」タンパク質又はその生理活性部分は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質が誘導される細胞又は組織の資源由来の細胞物質又は他の汚染タンパク質を実質的に含有していないか、又は化学的に合成される場合、化学的前駆体又は他の化学薬剤を実質的に含有していない。用語「細胞物質を実質的に含有していない」は、上記

タンパク質が単離されるか又は遺伝子組み換えによって製造される細胞の細胞成分から分離されたＣＯＸ－１変異体タンパク質の製剤を含んでいる。一実施態様で、用語「細胞物質を実質的に含んでいない」は、非タンパク質（本明細書では「汚染タンパク質」とも呼称する）の含有量が約３０乾燥重量％未満、より好ましくは約２０乾燥重量％未満、さらに一層好ましくは約１０乾燥重量％未満そして最も好ましくは約５乾燥重量％未満であるＣＯＸ－１変異体タンパク質の製剤を含んでいる。ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理活性部分は、遺伝子組み換え法で製造する場合、培地を実質的に含有していないことが好ましく、すなわち、培地はタンパク質製剤の約２０容量％未満であり、より好ましくは約１０容量％未満でありそして最も好ましくは約５容量％未満である。

【００８２】

用語「化学的前駆体又は他の化学薬剤を実質的に含有していない」は、本発明のタンパク質の合成にかかわっている化学的前駆体又は他の化学薬剤から分離された本発明のタンパク質の製剤を含んでいる。一実施態様で、用語「化学的前駆体又は他の化学薬剤を実質的に含有していない」は、化学的前駆体又は非化学薬剤の含有量が約３０％乾燥重量％未満であり、より好ましくは約２０乾燥重量％未満であり、さらに一層好ましくは約１０乾燥重量％未満であり、そして最も好ましくは約５乾燥重量％未満であるＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質の製剤を含んでいる。

【００８３】

ＣＯＸ－１変異体タンパク質の生理活性部分は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質のアミノ酸配列に対し十分に相同であるか又はそのアミノ酸配列由来のアミノ酸配列例えばＣＯＸ－１変異体に示されるアミノ酸配列を含み、そして全長のタンパク質より短いアミノ酸を含みかつタンパク質の少なくとも一つの活性を示すペプチドを含んでいる。一般に生理活性部分は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質の少なくとも一つの活性を有するドメイン又はモチーフを含んでいる。タンパク質の生理活性部分は、例えば少なくとも１０、２５、５０、１００又は１００個を超えるアミノ酸の長さを有するポリペプチドである。

【００８４】

好ましい実施態様で、ＣＯＸ－１変異体タンパク質は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６で示されるアミノ酸配列を有している。他の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体タンパク質は、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６と実質的に相同であり、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６のタンパク質の機能活性を保持しているが、上記サブセクションＩで詳細の述べたように、天然対立遺伝子の変化又は突然変異誘発のためアミノ酸配列が異なっている。したがって、別の実施態様で、上記ＣＯＸ－１変異体タンパク質は、配列番号：２又は配列番号：５のアミノ酸配列に対し少なくとも約５０％、５５％、５９％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％又は９８％を超えて相同のアミノ酸配列（例えば配列番号：２、配列番号：５、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６の全アミノ酸配列）を含有するタンパク質である。

【００８５】

二つのアミノ酸配列又は二つの核酸配列の同一性比率を確認するため、これらの配列は最適の比較を行うために並べられる（例えば最適に並べるため、ギャップを第一と第二のアミノ酸又は核酸の配列の一方又は両方に導入することができそして比較するために非相同の配列を無視することができる）。好ましい実施態様で、比較するために調整された参照配列の長さは、その参照配列の長さの少なくとも３０％であり、好ましくは少なくとも４０％であり、より好ましくは少なくとも５０％であり、さらにより好ましくは少なくとも６０％でありそしてさらに一層好ましくは少なくとも７０％、８０％又は９０％である。次に、対応するアミノ酸の位置又はヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一配列の位置が、第二配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占められている場合、それらの分子はその状態で同一である（アミノ酸

又は核酸の「同一性」は本明細書で使用する場合、アミノ酸又は核酸の「相同性」に等しい）。二つの配列間の同一性比率は、その二つの配列を最適に調整するため導入する必要があるギャップの数と各ギャップの長さを考慮する、これら配列が共有している同じ位置の数の関数である。

【００８６】

二つの配列の配列の比較及び同一性比率の測定は、数学アルゴリズムを利用して達成できる。好ましい実施態様で、二つのアミノ酸配列間の同一性比率は、ＧＣＳソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手できる）を使用し、Ｂｌｏｓｓｏｍ６２マトリックス又はＰＡＭ２５０マトリックス及びギャップウェイト１６、１４、１２、１０、８、６もしくは４と長さウェイト１、２、３、４、５もしくは６を使用して測定される。さらに別の好ましい実施態様で、二つのヌクレオチド配列間の同一性比率は、ＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手できる）を使用し、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックス及びギャップウェイト４０、５０、６０、７０もしくは８０と長さウェイト１、２、３、４、５もしくは６を使用して測定される。

【００８７】

本発明の核酸とタンパク質の配列をさらに、「質問配列（query sequence）」として使用して、公開データベースをサーチして例えば他のファミリーメンバー又は類縁配列を同定することができる。このようなサーチは、Ａｌｔｓｃｈａｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５巻４０３～４１０頁１９９０年のＮＢＬＡＳＴとＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）を使用して実施できる。ＢＬＡＳＴのヌクレオチドサーチを、ＮＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝１００、語長＝１２で実施して本発明の核酸分子に相同のヌクレオチド配列を得ることができる。ＢＬＡＳＴタンパク質のサーチを、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、語長＝３で実施して本発明のタンパク質分子に相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較するためギャップを設けた調整を行うため、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５（１７）巻３３８９～３４０２頁１９９７年に記載されているように利用できる。ＢＬＡＳＴプログラムとＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴプログラムを使用するとき、それぞれのプログラム（例えばＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）の省略時パラメータを使用できる（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ参照）。

【００８８】

また本発明はＣＯＸ－１変異体のキメラタンパク質又は融合タンパク質を提供するものである。用語「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、本明細書で使用する場合、非ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドに作動的に連結されたＣＯＸ－１変異体ポリペプチドを含んでいる。「ＣＯＸ－１変異体ポリペプチド」はＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）を含むＣＯＸ－１変異体に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、一方「非ＣＯＸ－１変異体ポリペプチド」は、本発明のタンパク質と実質的に相同でないタンパク質、例えばＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）のタンパク質とは異なりかつ同じか又は異なる生物由来のタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。ＣＯＸ－１変異体の融合タンパク質内のＣＯＸ－１変異体ポリペプチドはタンパク質のすべて又は一部分と一致していればよい。好ましい実施態様で、ＣＯＸ－１変異体の融合タンパク質はＣＯＸ－１変異体タンパク質の少なくとも一つの生理活性部分を含有している。別の好ましい実施態様で、ＣＯＸ－１変異体融合タンパク質はＣＯＸ－１変異体タンパク質の少なくとも二つの生理活性部分を含んでいる。融合タンパク質内の、用語「作動的に連結されている」は、ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドと非ポリペプチドがインフレーム（in-frame）で融合されていることを示すものである。前記非ポリペプチドは、ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドのＮ末端又はＣ末端に融合することができる。

【００８９】
例えば一実施態様の融合タンパク質は、その配列がＧＳＩ配列のＣ末端に融合されているＧＳＴ－融合タンパク質である。このような融合タンパク質によって組み換えＣＯＸ－１変異体の精製が容易になる。
【００９０】
別の実施態様の融合タンパク質は、そのＮ末端に異種のシグナル配列を有するＣＯＸ－１変異体タンパク質である。特定の宿主細胞（例えば哺乳類の宿主細胞）におけるＣＯＸ－１変異体の発現及び／又は分泌は異種のシグナル配列を使用することによっても増大させることができる。
【００９１】
本発明の融合タンパク質は、医薬組成物に組み込んで被検者の生体内に投与することができる。本発明の融合タンパク質を使用してＣＯＸ－１変異体の基質の生物学的利用率に影響を与えることができる。細胞成長に関連する障害又は神経変性疾患に関連する障害を治療するのにＣＯＸ－１変異体の融合タンパク質を使用することは治療上有用である。さらに本発明のＣＯＸ－１変異体の融合タンパク質は、被検者内に抗ＣＯＸ－１変異体抗体を生成させるための免疫源として使用することができ、リガンドを精製するために使用することができ、そしてスクリーニング検定法で酵素と基質の相互作用を阻害する分子を同定するために使用できる。
【００９２】
好ましくは、本発明のキメラタンパク質又は融合タンパク質は標準の組み換えＤＮＡ法によって製造される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントは、従来の方法にしたがって、例えば望ましくない接合と酵素による連結を避けるため、連結のために平滑末端又は粘着末端を利用し、適切な末端を準備するため制限酵素による消化を利用し、適切なアルカリホスファターゼ処理のような粘着末端のフィリングイン（filling-in）を利用することによって、インフレームで連結される。別の実施態様で、融合遺伝子は自動ＤＮＡ合成機を含む従来の技法で合成することができる。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、二つの連続遺伝子フラグメント間に相補的オーバーハングを生じさせるアンカープライマーを使用して実施することができ、それらフラグメントは続いてアニールされ次に再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編集、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ１９９２年参照）。さらに、融合部分（例えばＧＳＴポリペプチド）をすでにコードしている多数の発現ベクターが常販されている。コードしている核酸は、かような発現ベクター中にクローン化することができ、その結果、融合部分はインフレームでタンパク質に連結される。
【００９３】
また本発明は、ＣＯＸ－１変異体アゴニスト（ミメティック）又はＣＯＸ－１変異体アンタゴニストとして機能するＣＯＸ－１変異体タンパク質の変異体に関する。ＣＯＸ－１変異体タンパク質の変異体は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質の突然変異誘発、例えば不連続の点変異又はトランケーション（truncation）によってつくることができる。上記タンパク質類のアゴニストは、天然に存在する形態のタンパク質の生理活性と実質的に同じ生理活性又はそのサブセットを保持することができる。本発明のタンパク質のアンタゴニストは、例えばタンパク質の心臓血管系活性を、競合して調節することによって、本発明の天然に存在する形態のタンパク質の１又は２種以上の活性を阻害することができる。したがって、限定された機能を有する変異体で治療することによって特異的な生物学的効果を引き出すことができる。一実施態様で、天然に存在する形態のタンパク質の生理活性のサブセットを有する変異体で被検者を治療する場合、天然に存在する形態のタンパク質で治療するのと比べて被検者に対する副作用が少ない。
【００９４】
ポリペプチドの「突然変異タンパク質」は、その配列が、未変性のすなわち野生型タンパク質のアミノ酸配列と比べて、１又は２以上のアミノ酸の置換、挿入又は欠失を含んで

いるポリペプチドを意味する。突然変異タンパク質は、野生型タンパク質に対する配列相同性が少なくとも５０％であり、好ましくは６０％であり、より好ましくは７０％である。最も好ましいのは、野生型タンパク質に対する配列相同性が８０％、９０％又は９５％の突然変異タンパク質であり、その配列相同性は、通常の配列分析アルゴリズム例えばＧａｐ又はＢｅｓｔｆｉｔによって測定される。

【００９５】

用語「誘導体」は、一次構造の配列が実質的に相同であるが、例えば生体内もしくは生体外での化学的修飾と生化学的修飾を含み又は特異的なアミノ酸を取り入れているポリペプチド又はそのフラグメントを意味する。このような修飾としては、限定されないが、当業者であれば容易に分かるように、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、例えば放射性核種による標識化、及び各種の酵素による修飾もしくは保存的置換がある。ポリペプチドに標識をつける各種の方法及びその目的のため有用な置換基又は標識は当該技術分野でよく知られており、^{125}Ｉ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ及び^{3}Ｈなどの放射性同位元素、標識をつけた抗リガンドに結合するリガンド（例えば抗体）、発蛍光団、化学発光剤、酵素及び標識を付けたリガンドに対する特異的結合対のメンバーとして働くことができる抗リガンドがある。標識は、要求される感度、プライマーとの接合の容易さ、安定性の要求度及び利用できる手段に基づいて選択される。ポリペプチドに標識する方法は当該技術分野でよく知られている（Ａｕｓｕｂｅｌらの１９９２年の論文参照）。

【００９６】

一実施態様で、ＣＯＸ－１変異体のアゴニスト（ミメティック）又はＣＯＸ－１変異体のアンタゴニストとして機能する修飾ＣＯＸ－１変異体タンパク質は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質（例えばＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ））のアゴニスト又はアンタゴニストの活性の突然変異体例えばトランケーション突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。一実施態様で、修飾ＣＯＸ－１変異体の斑入りライブラリーが、コンビナトリアル突然変異誘発によって核酸レベルでつくられ、そして斑入り遺伝子ライブラリーによってコードされている。修飾ＣＯＸ－１変異体の斑入りライブラリーは、例えば合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素によって遺伝子配列に連結することによって製造することができ、その結果、可能性があるＣＯＸ－１変異体配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして、又は代わりにその中にＣＯＸ－１変異体配列のセットを含有するより大きな融合タンパク質のセットとして（例えばファージディスプレイの場合）発現可能になる。

【００９７】

可能性がある修飾ＣＯＸ－１変異体のライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列からつくるのに利用できる各種の方法がある。縮重遺伝子配列は、自動ＤＮＡ合成機で化学合成し次に適当な発現ベクターに連結することができる。遺伝子の縮重セットを使用すると、一つの混合物に、可能性がある配列の望ましいセットをコードするすべてのセットを提供することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成法は当該技術分野で公知である（例えば、Ｎａｒａｎｇ、Ｓ．Ａ．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ３９巻３頁１９８３年：Ｉｔａｋｕｒａら、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、５３巻３２３頁１９８４年；Ｉｔａｋｕｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９８巻１０５６頁１９８４年、Ｉｋｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１１巻４７７頁１９８３年参照）。

【００９８】

さらに、ＣＯＸ－１変異体タンパク質をコードする配列のフラグメントのライブラリーを使用して、修飾ＣＯＸ－１変異体タンパク質をスクリーニングして次に選別するためのＣＯＸ－１変異体フラグメントの斑入り集団をつくることができる。一実施態様で、コーディング配列のフラグメントのライブラリーは、ＣＯＸ－１変異体をコードする配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントを、ニッキングが一分子当り約一回だけ起こる条件下でヌクレアーゼで処理し、その二本鎖ＤＮＡを変性し、そのＤＮＡを復元して異なるニック産物由来

のセンス／アンチセンス対を含むことができる二本鎖ＤＮＡを生成させ、Ｓ１ヌクレアーゼで処理することによってリフォームされた二重らせん体から一本鎖部分を除き、そして生成したフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結することによってつくることができる。この方法によって、タンパク質の各種大きさのＮ末端、Ｃ末端及び内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

【００９９】

点変異又は点トランケーションでつくられたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする方法及び選択された特性を有する遺伝子産物についてｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするいくつもの方法が当該技術分野で知られている。このような方法は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質のコンビナトリアル突然変異誘発によって得た遺伝子ライブラリーを迅速にスクリーニングするのに適応できる。高処理量の分析に適用できる、大遺伝子ライブラリーをスクリーニングするのに最も広く使用されている方法は、一般に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローン化し、得られたベクターのライブラリーで適当な細胞を形質転換し、次いで所望の活性が検出されると産物が検出された遺伝子をコードするベクターが単離しやすくなる条件下で、前記コンビナトリアル遺伝子を発現させることを含んでいる。リクルーシーブアンサンブル突然変異誘発（recrusive ensamble mutagenesis）（ＲＥＭ）すなわちライブラリー中の機能突然変異体の頻度を高める新しい方法を上記スクリーニング検定法と組み合わせて使用して修飾ＣＯＸ－１変異体を同定することができる（Ａｒｋｉｎ及びＹｏｕｒｖａｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９巻７８１１～７８１５頁１９９２年；Ｄｅｌｇｒａｖｅら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　６（３）巻３２７～３３１頁１９９３年）。

【０１００】

単離されたＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその一部分又はフラグメントを、免疫原として使用し、ポリクローナルとモノクローナルの抗体を調製する標準方法を利用して本明細書に開示されているＣＯＸ－１変異体に結合する抗体をつくることができる。免疫原として使用するため、完全長のタンパク質を利用することができ又は代わりに本発明は、例えばＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）の抗原的ペプチドフラグメントを提供するものである。ＣＯＸ－１変異体の前記抗原的ペプチドは、配列番号：２、配列番号：５、配列番号：８、配列番号：１４、配列番号：１５又は配列番号：１６で示されるアミノ酸配列の少なくとも８個のアミノ酸残基を含有し、かつそのペプチドに対して生成した抗体が特別の免疫複合体を形成するエピトープを含んでいる。好ましくは上記抗原的ペプチドは、少なくとも１０個のアミノ酸残基を含有し、より好ましくは少なくとも１５個のアミノ酸残基を含有し、さらに一層好ましくは少なくとも２０個のアミノ酸残基を含有し、そして最も好ましくは少なくとも３０個のアミノ酸残基を含有している。

【０１０１】

抗原的ペプチドが含有している好ましいエピトープは、そのタンパク質の表面に位置するＣＯＸ－１変異体の領域例えば親水性領域である。

【０１０２】

一般に、ＣＯＸ－１変異体の免疫原を使用し、その免疫原で適切な実験動物（例えばウサギ、ヤギ、マウスなどの哺乳動物）を免疫化することによって抗体が調製される。適当な免疫原製剤は、例えば組み換えて発現されたタンパク質又は化学合成されたＣＯＸ－１変異体のポリペプチドを含んでいてもよい。この製剤はさらに、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバントなどのアジュバント又は類似の免疫刺激剤を含有していてもよい。適切な実験動物を免疫原のＣＯＸ－１変異体の製剤で免疫化するとポリクローナル抗－抗体反応を誘発する。

【０１０３】

したがって、本発明の別の側面は抗抗体に関する。用語「抗体」は、本明細書で使用す

る場合、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性の分子すなわちＣＯＸ－１変異体などの抗原と特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含有する分子を意味する。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性の部分の例としては、ペプシンなどの酵素で抗体を処理することによってつくることができるＦ（ａｂ）フラグメントとＦ（ａｂ’）^{2} フラグメントがある。本発明はＣＯＸ－１変異体に結合するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を提供するものである。用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書で使用する場合、ＣＯＸ－１変異体の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の唯一の種を含有する抗体分子の集団を意味する。したがってモノクローナル抗体組成物は一般にそれが免疫反応する特定のＣＯＸ－１変異体タンパク質に対する単一の結合アフィニティを示す。

【０１０４】

ポリクローナル抗－抗体は、適切な実験動物をＣＯＸ－１変異体免疫原で免疫化することによって上記のように調製することができる。免疫化された実験動物の抗－抗体の力価は、標準の方法例えば固定化されたＣＯＸ－１変異体を使用する酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）で時間の経過とともに監視することができる。必要に応じて、ＣＯＸ－１変異体に対する抗体分子は上記哺乳類から（例えばその血液から）単離し、さらに周知の方法、例えばＩｇＧフラクションを得るためのプロテインＡクロマトグラフィによって精製することができる。免疫化後の適切な時点で、例えば抗－抗体の力価が最大になったとき、抗体産生細胞を実験動物から得て、その細胞を使用して、当初Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ２５６巻４９５～４９７頁１９７５年に記載されたハイブリドーマ法（また、Ｂｒｏｗｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１２７巻５３９～５４６頁１９８１年、Ｂｒｏｗｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２２５巻４９８０～４９８３頁１９９０年、Ｙｅｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７６巻２９２７～２９３１頁１９７６年、及びＹｅｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、２９巻２６９～２７５頁１９８２年参照）；一層新しいヒトＢ細胞ハイブリドーマ法（Ｋｏｚｂｏｒら、Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ ４巻７２頁１９８３年）；ＥＢＪハイブリドーマ法（Ｃｏｌｅら著「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ、Ｉｎｃ．７７～９６頁１９８５年）又はトリオーマ法などの標準の方法によってモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体のハイブリドーマを製造する技術は周知である（一般に、Ｒ．Ｈ．Ｋｅｎｎｅｔｈ著「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｎｅｗ Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ Ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｅｓ」Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｒｐ．、米国ニューヨーク州ニューヨーク１９８０年；Ｅ．Ａ．Ｌｅｒｎｅｒ、Ｙａｌｅ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．５４巻３８７～４０２頁１９８１年；Ｍ．Ｌ．Ｇｅｆｔｅｒら、Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔ．３巻２３１～２３６頁１９７７年参照）。手短に述べると、不死細胞条（一般に骨髄腫）を、上記のように免疫原で免疫化した哺乳類由来のリンパ系細胞（一般に脾細胞）に融合させ、生成したハイブリドーマ細胞の培養上澄液をスクリーニングして、結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

【０１０５】

抗－モノクローナル抗体をつくるために、リンパ球と不死化細胞系を融合するのに利用される多くの周知のプロトコルのどれかを適用することができる（例えば、Ｇ．ＧａｌｆｒｅらＮａｔｕｒｅ２６６巻５５０～５５２頁１９７７年；Ｇｅｆｔｅｒら、Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔ．の前掲論文；Ｌｅｒｎｅｒ、Ｙａｌｅ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．の前掲論文；Ｋｅｎｎｅｔｈ、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、前掲論文参照）。さらに当業者は、有用なかような方法の多くの変形があることは分かるであろう。一般に、上記不死細胞系（例えば黒色腫細胞系）は上記リンパ球と同じ哺乳類の種から誘導される。例えばネズミのハイブリドーマは、本発明の免疫原製剤で免疫化したマウス由来のリンパ球と不死化マウス細胞系と融合させることによってつくることができる。好ましい不死細胞系は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含有する培

養培地（「ＨＡＴ培地」）に感受性のマウスの黒色腫細胞系である。多数の黒色腫細胞系、例えばＰ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４－１、Ｐ３－ｘ６３－Ａｇ８．６５３又はＳｐ２／０－Ａｇ１４黒色腫細胞系などのどれかを、標準の方法にしたがって、融合のパートナーとして使用することができる。これらの黒色腫細胞系はＡＴＣＣから入手できる。一般に、ＨＡＴ感受性マウス黒色腫細胞は、ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）を使用してマウス脾細胞に融合される。上記融合によって生成したハイブリドーマ細胞は、次いで融合しなかった黒色腫細胞と非生産的に融合した黒色腫細胞を殺すＨＡＴ培地を使用して選別される（融合しなかった脾細胞は癌化されないので数日後に死ぬ）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば標準のＥＬＩＳＡ検定法を利用して、ハイブリドーマ培養物の上澄み液を、結合する抗体についてスクリーニングすることによって検出される。

【０１０６】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代わりに、組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば抗体ファージディスプレイライブラリー）をＣＯＸ－１変異体でスクリーニングしてＣＯＸ－１変異体と結合する免疫グロブリンライブラリーのメンバーを単離することによって、モノクローナル抗－抗体を同定し単離することができる。ファージディスプレイライブラリーをつくってスクリーニングするのに使用するキットが市販されている（例えばｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｃａｔａｌｏｇ Ｎｏ．２７－９４００－０１；及びＳｔｒａｔａｇｅｎｅ ＳｕｒｆＺＡＰ™ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ Ｋｉｔ、Ｃａｔａｌｏｇ Ｎｏ．２４０６１２）。さらに抗体ディスプレイライブラリーをつくってスクリーニングする際に特に適用できる方法と試薬の例は、例えばＬａｄｎｅｒらの米国特許第５，２２３，４０９号；Ｋａｎｇら国際特許願公開第ＷＯ９２／１８６１９号；Ｄｏｗｅｒらの国際特許願公開第ＷＯ９１／１７２７１号；Ｗｉｎｔｅｒらの国際特許願公開第ＷＯ９２／２０７９１号；Ｍａｒｋｌａｎｄらの国際特許願公開第ＷＯ９２／１５６７９号；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇらの国際特許願公開第ＷＯ９３／０１２８８号；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙらの国際特許願公開第ＷＯ９２／０１０４７号；Ｇａｒｒａｒｄらの国際特許願公開第ＷＯ９２／０９６９０号；Ｌａｄｎｅｒらの国際特許願公開第ＷＯ９０／０２８０９号；Ｆｕｃｈｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９巻１３７０～１３７２頁１９９１年；Ｈａｙら、Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ３巻８１～８５頁１９９２年；Ｈｕｓｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２４６巻１２７５～１２８１頁１９８９年；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓら、ＥＭＢＯＪ １２巻７２５～７３４頁１９９３年；Ｈａｗｋｉｎｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２６巻８８９～８９６頁１９９２年；Ｃｌａｒｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ３５２巻６２４～６２８頁１９９１年；Ｇｒａｍら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９巻３５７６～３５８０頁１９９２年；Ｇａｒｒａｄら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９巻１３７３～１３７７頁１９９１年；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９巻４１３３～４１３７頁１９９１年；Ｂａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｉｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８巻７９７８～７９８２頁１９９１年；及びＭｃＣａｆｆｅｒｙら、Ｎａｔｕｒｅ３４８巻５５２～５５４頁１９９０年に見つけることができる。

【０１０７】

さらにヒトタンパク質及び非ヒトタンパク質の両方を含有し、標準の組み換えＤＮＡ法を利用して製造できるキメラのヒト化モノクローナル抗体などの組み換え抗－ＣＯＸ－１変異体抗体は、本発明の範囲内に入っている。このようなキメラのヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野で知られている組み換えＤＮＡ法例えば以下の方法を利用して製造することができる。すなわちＲｏｂｉｎｓｏｎらの国際特許願公開第ＰＣＴ／ＵＳ８６／０２２６９号；Ａｋｉｒａら、欧州特許願第１８４，１８７号；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉ、Ｍ．、欧州特許願第１７１，４９６号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、欧州特許願第１７３，４９４号；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、国際特許願公開第ＷＯ８６／０１５３３号；Ｃａｂｉｌｌｙらの米国特許第４，８１６，５６７号；Ｃａｂｉｌｌｙら欧州特許願第１２５，０２３号

；Ｂｅｔｔｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２４０巻１０４１～１０４３頁１９８８年；Ｌｉｕら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４巻３４３９～３４４３頁１９８７年；Ｌｉｕら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９巻３５２１～３５２６頁１９８７年、Ｓｕｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４巻２１４～２１８頁１９８７年：Ｎｉｓｈｉｍｕｒａら、Ｃａｎｃ．Ｒｅｓ．４７巻９９９～１００５頁１９８７年；Ｗｏｏｄら、Ｎａｔｕｒｅ３１４巻４４６～４４９頁１９８５年；Ｓｈａｗら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８０巻１５５３～１５５９頁１９８８年；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｓ．Ｌ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ２２９巻１２０２～１２０７頁１９８５年；Ｏｉら、Ｂｉｏ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ４巻２１４頁１９８６年；Ｗｉｎｔｅｒの米国特許願第５，２２５，５３９号；Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ３２１巻５５２～５２５頁１９８６年；Ｖｅｒｈｏｅｙａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９巻１５３４頁１９８８年；及びＢｅｉｄｌｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１巻４０５３～４０６０頁１９８８年に記載の方法である。

【０１０８】

抗－ＣＯＸ－１変異体抗体（例えばモノクローナル抗体）を使用して、標準の技法、例えばアフィニティクロマトグラフィ又は免疫沈降法などによって、追加のＣＯＸ－１変異体、特にＣＯＸ－１遺伝子のイントロン－１を保持するタンパク質を単離することができる。抗－ＣＯＸ－１変異体抗体によって、細胞由来の天然ＣＯＸ－１変異体及び宿主細胞で発現される、組み換え法で製造されたＣＯＸ－１変異体は精製しやすくなる。さらに、抗－抗体は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質の発現のアバンダンス（abundance）とパターンを評価するためＣＯＸ－１変異体タンパク質（例えば細胞破壊液又は細胞上澄み液中の）を検出するのに使用できる。抗－ＣＯＸ－１変異体抗体を診断に使用し、臨床試験法の一部として組織内のタンパク質のレベルを監視して例えば既定の治療法の有効性を確認することができる。抗体を検出可能な物質に連結する（すなわち物理的に連結する）ことによって、検出しやすくすることができる。検出可能な物質の例としては、各種の酵素、接合団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質及び放射性物質がある。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼがあり、適切な接合団複合体の例としては、ストレプタビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンがあり、適切な蛍光物質の例としてはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンがあり、発光物質の例としてはルミノールがあり、生物発光物質の例としてはルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンがあり、そして適切な放射性物質の例としては^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ又は^{3}Ｈがある。

【０１０９】

本発明の別の側面は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質（又はその一部）をコードする核酸を含有するベクター好ましくは発現ベクターに関する。用語「ベクター」は、本明細書で使用する場合、別の核酸分子に連結されてその別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターの一種は「プラスミド」であり、そのプラスミドは、追加のＤＮＡセグメントを連結できる円形二本鎖ＤＮＡループを意味する。別のタイプのベクターはウィルスベクターであり、追加のＤＮＡセグメントをウィルスのゲノムに連結することができる。特定のベクターは、それらベクターが導入された宿主細胞内で自律複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及び哺乳類のエピソームベクター）。他のベクター（例えば哺乳類の非エピソームベクター）は、宿主細胞中に導入される際、宿主細胞のゲノム中に組み込まれて宿主ゲノムとともに複製される。さらに特定のベクターは、それらが作動的に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼称される。一般に、組み換えＤＮＡ法で有用な発現ベクターはプラスミドの形態のものが多い。本明細書では、用語「プラスミド」と「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるから互換的に使用できる。しかし本発明は、同等の機能を提供するウィルスベクター

（例えば複製欠損レトロウィルス、アデノウィルス及びアデノ随伴ウィルス）などの他の形態の発現ベクターを含むものである。

【０１１０】

本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞内で本発明の核酸を発現するのに適切な形態で、本発明の核酸を含有している。このことは、本発明の組み換え発現ベクターが、発現のために使用すべき宿主細胞に基づいて選択されそして発現すべき核酸配列に作動的に連結されている１又は２以上の制御配列を含有していることを意味する。組み換え発現ベクター内に「作動可能に連結されている」ということは、対象のヌクレオチド配列が、（例えばベクターが宿主細胞中に導入されたとき、生体外の転写／翻訳系内又は宿主細胞で）ヌクレオチド配列を発現できる方式で、１又は２以上の制御配列に連結されていることを意味するものである。用語「制御配列」には、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御要素（例えばポリアデニル化シグナル）が含まれている。このような制御配列は、例えばＧｏｅｄｄｅｌ著「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、米国カリフォルニア州サンディエゴ１９９０年に記載されている。制御配列としては、多種の宿主細胞内でヌクレオチド配列の構成発現と指示する配列及び特定の宿主細胞内のヌクレオチド配列だけの発現を指示する配列（例えば組織特異的制御配列）がある。発現ベクターの設計が、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの要因によって決まることは当業者には分かっているであろう。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入して、本明細書に記載されている核酸がコードする、融合タンパク質又は融合ペプチドを含むタンパク質又はペプチド（例えば、ＣＯＸ－１変異体タンパク質、修飾された形態のＣＯＸ－１変異体タンパク質、融合タンパク質など）を製造することができる。

【０１１１】

本発明の組み換え発現ベクターは、原核細胞内又は真核細胞内でＣＯＸ－１変異体タンパク質を発現するように設計することができる。例えば、ＣＯＸ－１変異体タンパク質は、イー．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウィルスの発現ベクターを使用する）、酵母細胞又は哺乳類の細胞の中で発現させることができる。適切な宿主細胞については、Ｇｏｅｄｄｅｌ著「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、米国カリフォルニア州サンディエゴ１９９０年にさらに詳しく考察されている。あるいは組み換え発現ベクターは、例えばＴ７プロモーター制御配列及びＴ７ポリメラーゼを使用して生体外で転写し翻訳することができる。

【０１１２】

原核細胞内でのタンパク質の発現は、融合タンパク質又は非融合タンパク質の発現を指示する構成プロモーター又は誘導プロモーターを含有するベクターを有するイー．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）内で行うことが最も多い。融合ベクターは、その中にコードされているタンパク質に、通常、組み換えタンパク質のアミノ末端に複数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、一般に以下の三つの目的すなわち１）組み換えタンパク質の発現を増大すること、２）その組み換えタンパク質の溶解度を増大すること、及び３）アフィニティ精製を行う場合にリガンドとして作用することによって組み換えタンパク質の精製を促進することを達成するのに役立つ。融合発現ベクター中に、タンパク質分解開裂部位を、融合部分と組み換えタンパク質の結合部分に導入して、組み換えタンパク質を融合部分から分離して融合タンパク質を精製できるようにすることが多い。このような酵素及びそれらのコグネイト認識配列としては、Ｘａ因子、トロンビン及びエンテロキナーゼがある。典型的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質又はプロテインＡそれぞれを標的の組み換えタンパク質に融合する、ＰＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ．、Ｓｍｉｔｈ、Ｄ．Ｂ．及びＪｏｈｎｓｏｎ、Ｋ．Ｓ．、Ｇｅｎｅ６７巻３１～４０頁１９８８年）ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、米国マサチューセッツ州ビバリー）及

びｐＲＩＴＳ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ）がある。
【０１１３】
精製された融合タンパク質は、ＣＯＸ－１変異体の活性検定法（例えば以下に詳細に述べる直接検定法又は競合検定法）で又はＣＯＸ－１変異体タンパク質に特異的な抗体を生成させるのに使用することができる。
【０１１４】
適切な誘導可能な非融合イー．コリ発現ベクターとしては、ｐＴｒｃ（Ａｍａｎｎら、Ｇｅｎｅ、６９巻３０１～３１５頁１９８８年）及びｐＥＴ１１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒら著、「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、米国カリフォルニア州サンディエゴ１９９０年６０～８９頁）がある。ｐＴｒｃベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドｔｒｐ－ｌａｃ融合プロモーターからの宿主ＲＮＡポリメラーゼの転写によって行われる。ｐＥＴ１１ｄベクターからの標的遺伝子の発現は、共発現されたウィルスＲＮＡポリメラーゼによって仲介されたＴ７ｇｎ１０－ｌａｃ融合プロモーター（Ｔ７ｇｎｌ）からの転写に依存している。このウィルスポリメラーゼは、ｌａｃＵＶ５プロモーターの転写制御下で、Ｔ７ｇｎｌを内蔵する常在性プロファージ由来の宿主株ＢＬ２１（ＤＥ３）又はＨＭＳ１７４（ＤＥ３）によって供給される。
【０１１５】
イー．コリ内で組み換えタンパク質を最大限に発現する一方策は、その組み換えタンパク質をタンパク質分解反応で開裂する能力が低い宿主細胞内でそのタンパク質を発現する方法である（Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ、Ｓ．著「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、米国カリフォルニア州サンディエゴ１１９～１２８頁１９９０年）。別の方策は、各アミノ酸に対する個々のコドンがイー．コリ内で優先的に利用されるコドンであるように、発現ベクター中に挿入される核酸の核酸配列を変える方法である（Ｗａｄａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０巻２１１１～２１１８頁１９９２年）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準のＤＮＡ合成法によって実施できる。
【０１１６】
別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体の発現ベクターは酵母の発現ベクターである。酵母のエス・セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の発現ベクターの例としては、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉら、Ｅｍｂｏ Ｊ．６巻２２９～２３４頁１９８７年）、ｐＭＦａ（Ｋｕｒｊａｎ及びＨｅｒｓｋｏｗｉｔｚ、Ｃｅｌｌ ３０巻９３３～９３４頁１９８２年）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｌｔｓら、Ｇｅｎｅ ５４巻１１３～１２３頁１９８７年）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、米国カリフォルニア州サンディエゴ）及びｐｉｃＺ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、米国カリフォルニア州サンディエゴ）がある。
【０１１７】
代わりに、ＣＯＸ－１変異体タンパク質を、バキュロウィルスの発現ベクターを使用して昆虫細胞内で発現することができる。培養昆虫細胞（例えばｓｆ９細胞）内でタンパク質を発現するのに利用できるバキュロウィルスベクターとしては、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．３巻２１５６～２１６５頁１９８３年）及びｐＶＬシリーズ（Ｌｕｃｋｌｏｗ及びＳｕｍｍｅｒｓ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０巻３１～３９頁１９８９年）がある。
【０１１８】
さらに別の実施態様で、本発明の核酸は、哺乳類の発現ベクターを使用して哺乳類の細胞内で発現される。哺乳類の発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ、Ｂ．、Ｎａｔｕｒｅ ３２９巻８４０頁１９８７年）及びｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎら、ＥＭＢＯ Ｊ．６巻１８７～１９５頁１９８７年）がある。発現ベクターの制御機能は、哺乳類の細胞内で使用される場合、ウィルスの制御要素によって提供されることが多い。例えば、通常使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウィルス２、サイトメガロウ

ィルス及びシミアンウィルス４０から誘導される。原核細胞と真核細胞の両者に用いる他の適切な発現系については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｊ．、Ｆｒｉｔｓｈ、Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔｉｓ、Ｔ．著、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」第２版Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー１９８９年の１６～１７章を参照されたい。

【０１１９】

別の実施態様で、哺乳類の組み換え発現ベクターは、特定の細胞型内で優先的に核酸の発現を指示することができる（例えば組織特異的制御要素を使って核酸を発現させる）。組織特異的制御要素は当該技術分野で知られている。適切な組織特異的プロモーターの非限定的例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔら、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１巻２６８～２７７頁１９８７年）、リンパ特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ及びＥａｔｏｎ、Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３巻２３５～２７５頁１９８８年）特にＴ細胞受容体のプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ及びＢａｌｔｉｍｏｒｅ、ＥＭＢＯ Ｊ．８巻７２９～７３３頁１９８９年）と免疫グロブリン（Ｂａｎｅｒｊｉら、Ｃｅｌｌ ３３巻７２９～７４０頁１９８３年；Ｑｕｅｅｎ及びＢａｌｔｉｍｏｒｅ、Ｃｅｌｌ ３３巻７４１～７４８頁１９８３年）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；Ｂｙｒｎｅ及びＲｕｄｄｌｅ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６巻５４７３～５４７７頁１９８９年）、脾臓特異的プロモーター（ＥｄｌｕｎｄらＳｃｉｅｎｃｅ２３０巻９１２～９１６頁１９８５年）、並びに乳腺特異的プロモーター（例えばミルクホエープロモーター；米国特許願第４，８７３，３１６号及び欧州特許願公開第２６４，１６６号）がある。個体の成長中に制御されるプロモーター例えばマウスのホックスプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ及びＧｒｕｓｓ、Ｓｃｉｅｎｃｅ２４９巻３７４～３７９頁１９９０年）並びにα－フェトプロテインプロモーター（Ｃａｍｐｅｓ及びＴｉｌｇｈｍａｎ、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３巻５３７～５４６頁１９８９年）も含まれる。

【０１２０】

本発明はさらに発現ベクター中に、アンチセンス配向でクローン化された本発明のＤＮＡ分子を含む、組み換え発現ベクターを提供するものである。すなわち、上記ＤＮＡ分子は、ＣＯＸ－１変異体ｍＲＮＡに対しアンチセンスのＲＮＡ分子を発現できる（ＤＮＡ分子の転写によって）方式で制御配列に作動的に連結されている。アンチセンス配向でクローン化された核酸に作動的に連結されそして各種の細胞型の中でアンチセンスＲＮＡ分子の連続発現を指示する制御配列を選択することができ、例えば、アンチセンスＲＮＡの構成性発現、組織特異的発現又は細胞型特異的発現を指示するウィルスプロモーター及び／又はエンハンサー又は制御配列を選択することができる。上記アンチセンス発現ベクターは組み換えプラスミド、ファージミド又は弱毒ウィルスの形態であってもよく、これらベクター中で、アンチセンス核酸が高効率の制御領域の制御下で産生され、その核酸の活性はそのベクターが導入されている細胞型によって決定される（アンチセンス遺伝子を使用して行う遺伝子発現の制御の考察については、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ、Ｈ．ら、「Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ」、Ｒｅｖｉｅｗｓ－Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ１（１）巻１９８６年を参照）。

【０１２１】

本発明の別の側面は、本発明の組み換え発現ベクターを導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」と「組み換え宿主細胞」は本明細書では交換して使用される。このような用語は、特定の被検者の細胞のみならずこのような細胞の子孫又は可能性のある子孫を意味すると解される。特定の修飾が、突然変異又は環境の影響のため後に続く世代に起こることがあるので、このような子孫は、実際に親細胞と同一でないこともあるが、本明細書で使用するときのその用語の範囲に含まれている。

【０１２２】
宿主細胞は原核細胞又は真核細胞であってもよい。例えば、ＣＯＸ－１変異体タンパク質は、イー．コリなどの細菌の細胞、昆虫細胞、酵母又は哺乳類の細胞（例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）又はＣＯＳ細胞）内で発現させることができる。他の適切な宿主細胞は当業者に知られている。

【０１２３】
ベクターＤＮＡは、通常の形質転換法又はトランスフェクション法によって原核細胞又は真核細胞に導入することができる。用語「形質転換」及び「トランスフェクション」は、本明細書で使用する場合、リン酸カルシウム共沈法もしくは塩化カルシウム共沈法、ＤＥＡＥ－デキストラン仲介トランスフェクション法、リポフェクション法又はエレクトロポレーション法を含む外来核酸（例えばＤＮＡ）を宿主細胞に導入する、当該技術分野で知られている各種の方法を意味するものである。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトする適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバー１９８９年）や他の研究所のマニュアルに見つけることができる。

【０１２４】
哺乳類の細胞の安定したトランスフェクションを行うため、利用される発現ベクター及びトランスフェクション法によっては、細胞のごく小さなフラクションがそのゲノムに外来ＤＮＡを組み込むことができることが知られている。これらのインテグラントを同定し選択するため、一般に選択可能なマーカー（例えば抗生物質に対し耐性のマーカー）をコードする遺伝子が、対象の遺伝子とともに宿主細胞中に導入される。好ましい選択可能なマーカーとしては、医薬に対する耐性を付与するマーカー例えばＧ４１８、ヒグロマイシン及びメトトレキセートなどがある。選択可能なマーカーをコードする核酸は、ｐＣＯＸ－１タンパク質又はｐＣＯＸ－１△６５７タンパク質をコードするベクターと同じベクターで又は別のベクターで宿主細胞に導入することができる。導入された核酸で安定してトランスフェクトされた細胞は、医薬選択法で同定することができる（例えば選択可能なマーカー遺伝子を組み込まれた細胞は生き残るが、その他の細胞は死ぬ）。

【０１２５】
本発明の宿主細胞、例えば培養中の原核細胞又は真核細胞を使用して、ＣＯＸ－１変異体タンパク質を産生させる（すなわち発現させる）ことができる。したがって、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用してＣＯＸ－１変異体タンパク質を産生させる方法を提供するものである。一実施態様で、この方法は、本発明の宿主細胞（ＣＯＸ－１変異体タンパク質をコードする組み換え発現ベクターが導入されている）を適切な培地で培養して、ＣＯＸ－１変異体タンパク質を産生させることを含んでなる方法である。別の実施態様で、この方法はさらに、ＣＯＸ－変異体タンパク質を培地又は宿主細胞から単離することを含んでいる。

【０１２６】
本発明の宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物をつくるのにも使用できる。例えば、一実施態様で、本発明の宿主細胞は、－コーディング配列が導入された受精卵母細胞又は胚性幹細胞である。次にこのような宿主細胞を使用して、外因性ＣＯＸ－１変異体配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物又は内因性ＣＯＸ－１変異体配列を変えられた相同組み換え動物をつくることができる。このような動物は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ）などのＣＯＸ－１変異体の機能及び／又は活性を試験したり、それらの活性のモジュレーターを同定及び／又は評価するのに有用である。本発明のトランスジェニック動物には、１種のＣＯＸ－１変異体タンパク質だけを発現するように（ＣＯＸ－１及びＣＯＸ－１変異体類の共発現とは対照的に）修飾された動物が含まれている。用語「トランスジェニック動物」は、本明細書で使用する

場合、その動物の１又は２以上の細胞が導入遺伝子を含んでいる非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはラットもしくはマウスなどのげっ歯類である。トランスジェニック動物のその他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などがある。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が成長する細胞のゲノム中に組み込まれて成熟動物のゲノム中にとどまりそしてそのトランスジェニック動物の１又は２以上の細胞型又は組織中に、コードされた遺伝子産物を発現することを指示する外因性ＤＮＡである。用語「相同組み換え動物」は、本明細書で使用する場合、内因性ＣＯＸ－１変異体遺伝子が、内因性遺伝子と、その動物が成長する前に動物の細胞例えば動物の胚性細胞中に導入された外因性ＤＮＡ分子との間の相互的組み換えによって変えられた非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物でありより好ましくはマウスである。

【０１２７】

本明細書に記載されている核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体及び抗体は、以下の方法：１）スクリーニング検定法；２）予測医療（例えば診断検定法、予後検定法、監視臨床試験及び薬理遺伝学）；及び３）処置法（例えば治療法及び予防法）の１又は２以上に使用することができる。本発明の単離された核酸分子を使用して、例えばＣＯＸ－１変異体タンパク質を（例えば宿主細胞内の組み換え発現ベクターによって）ＣＯＸ－１変異体タンパク質を発現させ、ＣＯＸ－１変異体ｍＲＮＡ（例えば生物試料中の）を検出し、プロスタグランジンの活性を調節し、そしてＣＯＸ－１変異体の活性を修飾する化合物を同定することができる。例えばＣＯＸ－１変異体タンパク質を使用して、基質の不十分なもしくは過剰な産生又はＣＯＸ－１変異体インヒビターの不十分なもしくは過剰な産生を特徴とする障害を治療することができる。さらに本発明のタンパク質を使用して、天然に存在するシクロオキシゲナーゼの基質をスクリーニングし、ＣＯＸ－１変異体の活性を調節する医薬又は化合物をスクリーニングし、及びＣＯＸ－変異体タンパク質の不十分な又は過剰な産生を特徴とする障害を治療することができる。さらに、本発明の抗－ＣＯＸ－１変異体抗体を使用して、ＣＯＸ－１変異体タンパク質を検出して単離し、ＣＯＸ－１変異体タンパク質の生物学利用率を調節しそしてＣＯＸ－１変異体の活性を調節することができる。

【０１２８】

本発明は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質（ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ））に結合し、例えばＣＯＸ－１変異体の発現又はＣＯＸ－１変異体の活性に対して刺激作用もしくは阻害作用を有し、又は例えばＣＯＸ－１変異体の基質の発現又は活性に対し刺激作用もしくは阻害作用を有するモジュレーターすなわち候補物質（candidate）又は試験化合物もしくは試験薬剤（例えばペプチド、ペプチドミメティッィク、小分子又は他の医薬）を同定する方法（本明細書では「スクリーニング検定法」とも呼称される）を提供するものである。ＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物を同定する（すなわちスクリーニングする）プロセスと方法は、同定される化合物を製造することを含んでいると解される。したがって、本発明は、ＣＯＸ－１変異体をコードするＤＮＡでトランスフェクトされた細胞を提供することによってＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物を製造する方法であって；上記細胞が上記変異体を発現し；前記細胞を、無傷の又は破壊された状態で試験化合物と接触させ、次いでＣＯＸ－１変異体の活性が前記試験化合物の存在下で減少するか又は増加するかを確認し、そして前記ＣＯＸ－１の活性の減少又は増加は、前記試験化合物がＣＯＸ－１の活性を調節し、同定された化合物を製造する指標である方法を目的としている。

【０１２９】

一実施態様で、本発明は、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質もしくはポリペプチド又はその生理活性部分の基質である候補物質又は試験化合物をスクリーニングする検定法を提供するものである。別の実施態様で、本発明は、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質もしくはポリペプチド又はその生理活性部分に結合するか、又はそれらの活性を調節し例えばＣＯＸ－１変異体のそのコグネイトリガンドと相互に作用する機能を調節する候補物質又は試験

化合物をスクリーニングする検定法を提供するものである。本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリー；立体的にアドレス可能で平行の（spatially addressable parallel）固相もしくは溶液相のライブラリー；解析を必要とする合成ライブラリー法；１ビード１化合物ライブラリー法；及びアフィニティクロマトグラフィによる選択を利用する合成ライブラリー法を含む、当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリー法の多数の方法のいずれか、を使用して得ることができる。上記生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の四方法は化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマー又は小分子のライブラリーに適用できる（Ｌａｍ、Ｋ．Ｓ．、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．１２巻１４５頁１９９７年）。コンビナトリアルライブラリーについては以下に詳細に説明する。

【０１３０】

別の実施態様の検定法は、ＣＯＸ－１変異体の標的分子（例えばアラキドン酸）を発現する細胞を試験化合物と接触させて、ＣＯＸ－１変異体の標的分子の活性を調節する（例えば刺激又は阻害する）試験化合物の性能を測定することを含む細胞ベースの検定法である。標的分子に対するＣＯＸ－１変異体の活性を調節する試験化合物の性能は、例えば標的化合物分子と結合するか又は相互に作用するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能を測定するか、又は試験分子を修飾するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能を測定することによって測定することができる。

【０１３１】

標的分子と結合するか又は相互に作用するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能は、直接結合性を測定することによって測定できる。ＣＯＸ－１変異体標的分子と結合するか又は相互に作用するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能の測定は、例えばＣＯＸ－１変異体タンパク質に放射性同位元素又は酵素の標識を結合させて、ＣＯＸ－１変異体タンパク質のＣＯＸ－１変異体の標的分子に対する結合性を複合体の標識付きＣＯＸ－１変異体タンパク質を検出することによって測定できるようにすることによって達成できる。例えば、ＣＯＸ－１変異体分子、例えばＣＯＸ－１変異体タンパク質は、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ又は^{3}Ｈで直接又は間接的に標識化し、次いでその放射性同位元素を、放射線放出の直接カウンティング又はシンチレーションカウンティングによって検出することができる。あるいは、ＣＯＸ－１変異体分子は例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファーゼ又はルシフェラーゼで酵素標識化して、その酵素標識を、適当な基質の産生物への変換を測定することによって検出することができる。

【０１３２】

ＣＯＸ－１変異体とその標的分子の間の相互作用を調節する化合物の性能を、これら相互作用物のどれも標識化することなく、測定することも本発明の範囲内に入る。例えば、マイクロフィジオメーター（micro-physiometer）を使用して、ＣＯＸ－１変異体とその標的分子の相互作用を、ＣＯＸ－１変異体又は標的分子を標識することなしに検出することができる（ＭｃＣｏｎｎｅｌ、Ｈ．Ｍ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２５７巻１９０６～１９１２頁１９９２年）。用語「マイクロフィジオメーター」（例えばＣｙｔｏｓｅｎｓｏｒ）は、本明細書で使用する場合、細胞がその環境を酸性化する速度を、ライトアドレサブルポテンシオメトリックセンサ（light-addressable potentio metric sensor）（ＬＡＰＳ）を使用して測定する分析装置を意味する。この酸性化速度の変化は、化合物と受容体の間の相互作用の指標として利用できる。

【０１３３】

好ましい実施態様で、ＣＯＸ－１変異体の標的分子と結合するか又は相互に作用するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能の測定は、標的分子の活性を測定することによって達成できる。例えば標的分子の活性は、標的の細胞第二メッセンジャー（cellular second messenger）（例えば細胞内Ca^{2+}、ジアシルグリセロール、ＩＰ３など）の誘発を検出するか、適切な基質に対する標的の触媒／酵素活性を検出するか、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする核酸に作動的に連結された標的応答制御要素（target-responsive

regulatory element）を含んでいる）の誘発を検出するか、又は標的制御細胞応答を検出することによって測定できる。

【０１３４】

ＣＯＸ－１変異体タンパク質の活性を調節する化合物をスクリーニングする簡単な生体外のシステムの一例として、生細胞、又は培養細胞から調製したミクロソーム抽出物に対し実施される検定法がある。本明細書に開示されるＣＯＸ－１変異体－合成細胞系は、ＣＯＸ－１変異体の活性に対する化合物の活性を、例えばＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２に対する同じ化合物の活性と比較して評価するのに有用である。

【０１３５】

したがって、本明細書は、ＣＯＸ－１変異体又はＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２の活性を選択して阻害ししたがって例えば炎症を起こした哺乳類の組織好ましくはヒトの組織に関連しているか又は哺乳類宿主好ましくはヒト宿主の生理的又は病的状態でのＣＯＸ－１変異体の活性を特異的に阻害する化合物の関連阻害活性を評価する方法を提供するものである。このような検定法は、次のステップで構成されている。すなわちＣＯＸ－１変異体を発現する細胞系又はそのミクロソーム抽出物を、適切な培地又は緩衝液中で、予め選択された量の前記化合物と接触させ、その混合物に基質（例えばアラキドン酸）を添加し、次いでＣＯＸ－１変異体によるアラキドン酸代謝産物の合成レベル又は前記の細胞系もしくはミクロソーム抽出物による、シクロオキシゲナーゼ経路に独特の他の代謝産物の合成のレベルを、前記化合物が存在しない対照の細胞系又はミクロソーム抽出物の一部と比較して測定するステップで構成されている。その化合物は、ＣＯＸ－１変異体又はＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２を選択して阻害するその活性を、上記ステップを採用してＣＯＸ－１及び／又はＣＯＸ－２の発現細胞系で、平行して第二の検定法を実施することによって評価できる。

【０１３６】

さらに別の実施態様の本発明の検定法は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理的活性部分を試験化合物と接触させ次いで試験化合物がＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理的活性部分と結合する性能を測定する無細胞検定法である。試験化合物のＣＯＸ－１変異体タンパク質との結合は、上記のように直接又は間接的に測定できる。好ましい実施態様で、上記検定法は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理的活性部分を、ＣＯＸ－１変異体と結合する既知の化合物と接触させて検定混合物を生成させ、その検定混合物を試験化合物と接触させ、次いで試験化合物のＣＯＸ－１変異体タンパク質と相互に作用する性能を測定するステップを含み、そして試験化合物のＣＯＸ－１変異体タンパク質と相互に作用する性能の測定法は、試験化合物のＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理的活性部分と優先的に結合する性能を、既知の化合物と比較して測定することを含んでいる。

【０１３７】

例えば、本発明の試験によって、アセトアミノフェン、フェナセチン、アンチピリン及びジピロンなどの鎮痛／解熱化合物を含む、ＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２に対する阻害活性がほとんどないか又は全くない化合物によって阻害されるＣＯＸ－１変異体が同定された（表１と図１３参照）。本明細書に記載のスクリーニング法は、このような化合物の誘導体を、ＣＯＸ－１変異体の活性を選択して阻害するこれら誘導体の特性について確認できる手段を提供する。このような化合物は、被検者のＣＯＸ－１変異体関連の障害を治療するのに有用である。例えば、アセトアミノフェノンは、臨床診療及び動物モデルでは、ほとんど抗炎症活性がないにもかかわらず、非ステロイド系の抗炎症医薬（ＮＳＡＩＤ）として類別されることが多い。しかし、アセトアミノフェンは、ＮＳＡＩＤのように、痛みと熱を抑制する。アセトアミノフェンは、一般に、イヌの脳のホモジネートのＣＯＸ活性を、脾臓由来のホモジネートのＣＯＸ活性より阻害することが分かっている（Ｆｌｏｗｅｒ及びＶａｎｅ、Ｎａｔｕｒｅ２４０巻４１０～４１１頁１９７２年）。しかし以前の及び現在の研究論文が示すように、ＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２は、全細胞又はホモジネート中にて生理学的濃度のアセトアミノフェンによって阻害されないが（Ｂｏｔｔｉｎｇ、Ｃ

ｌｉｎ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．３１巻８２０２～８２１０頁２０００年）、このことはアイソザイムがアセトアミノフェンの作用する部位に対する優れた候補物質でないことを示唆している。この研究論文は、ＣＯＸ－１変異体はイヌの脳で明らかに増大しそしてヒトの５．２Ｋｂの転写産物は脳皮質に最も多く含まれていることを示している。さらに、疫学的証拠は、ＮＳＡＩＤを使用することがアルツハイマー病（ＡＤ）の発生又は危険が低下することと関連があることを示している。骨関節症、リウマチ様関節炎にかかっているか又は他の目的のためＮＳＡＩＤを使用している患者のケースコントロールド試験（case-controlled study）では、ＮＳＡＩＤ（特にアスピリン）の使用とＡＤの発病との間に逆の関係が見られる。３年以上の間隔をおいてＡＤを発症した５０才代の双子のコツインコントロールスタディ（co-twin control study）で、類似の逆の相関関係が見られた。計画的なＢａｌｔｉｍｏｒｅ Ｌｏｎｇｉｔｕｄｉｎａｌ Ｓｔｕｄｙ ｏｆ Ａｇｉｎｇで、ＮＳＡＩＤ使用者にＡＤの危険性が低下するとともにＮＳＡＩＤの使用期間が増えるとＡＤの危険性が低下することが発見され、そして１年間のＲｏｔｔｅｒｄａｍ Ｓｔｕｄｙでは認知衰弱症の減少がＮＳＡＩＤの使用と関連があった。

【０１３８】

別の実施態様の検定法は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理活性部分を試験化合物と接触させて、ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理活性部分の活性を調節する（例えば刺激するかは又は阻害する）試験化合物の性能を測定する無細胞検定法である。ＣＯＸ－１変異体タンパク質の活性を調節する試験化合物の性能の測定は、例えばＣＯＸ－１変異体の標的分子の結合するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能を、直接結合を測定する上記方法のうちの一つで測定することによって達成することができる。またＣＯＸ－１変異体の標的分子に結合するＣＯＸ－１変異体タンパク質の性能の測定は、リアルタイム Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｉｓ（ＢＩＡ）などの方法を使用して達成できる（Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ，Ｓ．及びＵｒｂａｎｉｃｚｋｙ，Ｃ．、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３巻２３３８～２３４５頁１９９１年並びにＳｚａｂｏら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５巻６９９～７０５頁１９９５年）。用語「ＢＩＡ」は、本明細書で使用する場合、いずれの反応物にも標識をつけずに、リアルタイムで生物特異的相互作用を研究する技法である（例えばＢＩＡｃｏｒｅ）。表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光現象の変化は、生物分子間のリアルタイム反応の指標として使用することができる。

【０１３９】

さらに別の実施態様で、前記無細胞検定法は、ＣＯＸ－１変異体タンパク質又はその生理活性部分を、ＣＯＸ－１変異体タンパク質に結合する既知の化合物と接触させて検定混合物を生成させ、その検定混合物を試験混合物と接触させ、次いでその試験化合物がＣＯＸ－１変異体タンパク質と相互に作用する性能を測定することを含み、その試験化合物がＣＯＸ－１変異体タンパク質と相互に作用する性能の測定が、そのタンパク質が優先的に標的分子に結合するか又は標的分子の活性を調節する性能を測定することで構成されている。

【０１４０】

本発明の上記検定法の２以上の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体又はその標的分子を固定化して、それらタンパク質の一方又は両方の複合体を未複合体から分離しやすくするとともに、検定法を自動化できるようにすることが望ましい。候補化合物の存在している場合と存在していない場合に、試験化合物とＣＯＸ－１変異体タンパク質の結合又はＣＯＸ－１変異体タンパク質と標的分子の相互作用は、それら反応物が入っている適切な容器で行うことができる。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート（microtitre plate）、試験管及び微小遠心分離管がある。一実施態様で、それらタンパク質の一方又は両者をマトリックスに結合させるドメインを付加する融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／ＣＯＸ－１変異体融合タンパク質又はグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／標的融合タンパク質は、グルタチオン

セファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ、米国ミズーリ州セントルイス）又はグルタチオン被覆マイクロタイタープレートに吸着され、次いで試験化合物と結合させ又は試験化合物と吸着されない標的タンパク質もしくはＣＯＸ－１変異体タンパク質とを結合させそして生成した混合物が、複合体生成をうながす条件下（例えば塩及びpHについての生理的条件で）でインキュベートされる。インキュベーションを行った後、前記のビーズ又はマイクロタイタープレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去し、ビーズの場合、マトリックスが固定化され、例えば上記のようにして複合体が直接もしくは間接的に測定される。あるいは、前記複合体をマトリックスから解離させ次いでＣＯＸ－１変異体の結合性又は活性のレベルを標準の方法を利用して測定できる。

【０１４１】

別の実施態様で、ＣＯＸ－１変異体発現のモジュレーターが、細胞を候補化合物と接触させ次にその細胞内でＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現を確認する方法で同定される。候補化合物の存在下でのＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現のレベルを、候補化合物が存在しないときのＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現レベルと比較する。次に、この比較に基づいて、この候補化合物をＣＯＸ－１変異体発現のモジュレータとして同定することができる。例えば、ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現が、候補化合物の存在下の方が候補化合物が存在しない場合より多い（統計的に有意に多い）場合、その候補化合物は、ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現の刺激物質と判定される。あるいは、ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現が候補化合物の存在下の方が候補化合物が存在しない場合より少ない（統計的に有意に少ない）場合、その候補化合物は、ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の発現のインヒビターと判定される。ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質の細胞内での発現のレベルは、ＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡ又はタンパク質を検出する、本明細書に記載の方法によって測定できる。

【０１４２】

別の実施態様で、本明細書に開示されている核酸及びポリペプチドの配列は、試験化合物の存在下又は非存在下でのＣＯＸ－１変異体酵素の挙動に関する構造ベースの予測を行う方法を提供するものである。このようなコンピュータによる方法は、ポリペプチドの一次アミノ酸の構造に一部基づいた各種の構造情報を処理する数学的アルゴリズムに基づいている。相同のタンパク質又は部分的に相同のタンパク質から得られる追加の情報は、アミノ酸の構造の情報を増大するため前記方法に組み入れることができる。したがって、新規のＣＯＸ－１変異体タンパク質について本明細書に開示されているポリペプチド配列の情報を、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の研究論文から入手できる構造の情報とともに利用して、どの化合物又はどの化合物のファミリーがＣＯＸ－１変異体タンパク質と特異的に相互作用を行うか予測することができる。その全プロセスは、当業者に知られているアルゴリズムを利用しコンピュータによって達成することができる。

【０１４３】

例えば、ＣＯＸの構造モチーフと機能活性に対する作用に関する情報をかなり入手することができる。ＣＯＸ－１及びＣＯＸ－２の二量体が、各単量体の二量体化ドメインがかかわる分子相互作用によって連結されている。ＣＯＸ－１及びＣＯＸ－２のサブユニットのヘテロ二量体化は起こらない。上記二量体ドメインは、タンパク質分解反応で処理されたタンパク質のアミノ末端の近くの約５０個のアミノ酸でコードされている。３個のジスルフィド結合が、このドメインを、上皮成長因子（ＥＧＦ）を連想させる構造に連結している。第四のジスルフィド結合が、前記二量体化ドメインを、球状触媒ドメインと連結している。生成するのに酸化環境を必要とするジスルフィド結合が存在していることは、サイトゾルよりも有意に低く還元される酸化還元状態にある核膜の内腔、ＥＲ、又はゴルジの中にＣＯＸ－１とＣＯＸ－２が位置するという概念と一致している。

【０１４４】

ＣＯＸアイソザイムは、ミクロソーム膜の内腔表面と特異な方式で会合している。ＣＯＸアイソザイムは、連結するため貫通膜橋かけ配列又は共有結合脂質を利用しないで、脂

質二分子層の疎水性コアの内腔側に入りこんだ疎水性表面をつくる四つの両親媒性ヘリックスのタンデムシリーズを含有している。これらのヘリックスは、前記二量体化ドメインの塊のすぐカルボキシ末端側に見られる約５０個のアミノ酸によってコードされている。これらのヘリックスは、ＣＯＸ二量体を、ＥＲ／核膜の内腔の内側面に連結させ、そのタンパク質の大部分はこれらのコンパートメントの内腔空間中に突き出ている。その膜結合ドメインは、シクロオキシゲナーゼの活性部位である狭い疎水性チャネルの口も形成している。

【０１４５】

ＣＯＸ一次構造の膜結合ドメインのカルボキシ末端側に触媒ドメインがあり、このドメインはそのタンパク質の８０％（約４８０個のアミノ酸）を構成し二つの明白な酵素活性部位を含有している。その第一部位はペルオキシターゼ（ＰＯＸ）活性部位である。ＣＯＸアイソザイムの全触媒ドメインは球形で二つの明白な絡みあったローブ（lobe）をもっている。これらローブの界面は、ペルオキシダーゼ活性部位が配置されそしてヘムが結合されている該酵素の上面（すなわち前記膜から最も離れている面）に浅いクレフトをつくっている。上記ヘムの配位は、ヒツジＣＯＸ－１のＨｉｓ３８８を含む鉄－ヒスチジン結合によって行われる。また、プロトポルフィリン間の他の重要な相互作用が起こり、ＰＧＧ２を配位する際に機能する特異的アミノ酸が確認されている。ヘム結合の形態は、ＰＧＧ２及び他の過酸化脂質と相互に作用するペルオキシダーゼ活性部位の開放クレフトに暴露されたヘムの一方の側の大部分を残している。

【０１４６】

触媒ドメインの第二の明白な酵素活性部位は、シクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）活性部位である。そのシクロオキシゲナーゼ活性部位は、ほとんど疎水性の長くて狭窄したゆきどまりチャネルであり、その入口は膜結合ドメインの四つの両親媒性ヘリックスによって縁どられている。そのチャネルは前記球形触媒ドメイン中に約２５オングストローム延出しかつ平均幅が約８オングストロームである。しかし、ＣＯＸ活性部位に見られる二つだけのイオン性残基のうちの一方のアルギニン１２０が上記チャネル中に突出してグルタミン酸５２４（上記チャネルの他方のイオン性残基）及びチロシン３５５と水素結合ネットワークを形成する。アルギニン１２０は、ＣＯＸ－１内で基質が結合するのに不可欠であるが、ＣＯＸ－２内では有意に重要ではない。またアルギニン１２０は、ＣＯＸ－１活性部位がカルボキシレート含有ＮＳＡＩＤと結合するのに明らかに重要であるが、ＡＡ結合と同様に、ＣＯＸ－２内にこれらＮＳＡＩＤを配位させるのに有意に重要ではない。

【０１４７】

前記チャネルの上部すなわち触媒ポケットは、チロシルラジカルを形成し、ＡＡの炭素１３のプローＳ側から水素を引き抜き、次いで環化反応及び／又は酸素化反応を受ける活性化脂肪酸ラジカルを生成するチロシン３８５を含有している（図３参照）。また上記疎水性ポケットにはＳｅｒ５３０があり、これはアスピリンによってトランスアセチル化される。セリン５３０それ自体のヒドロキシルは触媒反応に対して不可欠なものではない。しかしそのアセチル化は、ＡＡが活性部位で産生的に結合するのを立体的に防止することによって、ＣＯＸ－１内のＡＡから水素の引抜きを防止する。対照的に、水素の引抜きがアセチル化ＣＯＸ－２で起こるが、脂肪酸ラジカルの環化とエンド過酸化物の生成は起こらず、ＣＯＸ－２ではなく１５－Ｒ－ヒドロキシエイコサテトラエン酸（１５Ｒ－ＨＥＴＥ）を生成する。

【０１４８】

ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の活性部位の間の構造の差は、ＣＯＸ－２ではバリンが使用されている代わりにＣＯＸ－１ではイソロイシン５２３が使用されていることである。この単一の差によって、いくつかのＣＯＸ－２選択医薬がアクセスできるＣＯＸ－２の疎水性アウトポケッティングが開く。ＣＯＸ活性部位の近くであるがこの部位に並んでいない残基いわゆる第二シェル残基に別の変化があり、その変化は微妙な変化でありＣＯＸ－２活性部位がＣＯＸ－１に対してわずかに大きくなる。

【０１４９】

先に述べたように、ＮＳＡＩＤは、ＣＯＸアイソザイムのシクロオキシゲナーゼ活性部位のインヒビターとして作用する鎮痛／抗炎症／解熱医薬である。個々のＮＳＡＩＤとＣＯＸ活性部位の作用に重要な機構の差がある。医療に使用するＮＳＡＩＤのうちアスピリンだけがＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の共有結合修飾因子（covalent modifer）である。Ｇａｒａｖｉｔｏと同僚の結晶学的研究は、この医薬がＣＯＸ－１のセリン５３０を非常に効率的にアセチル化する理由を示した（Ｌｏｌｌの１９９５年の論文に引用）。他のＮＳＡＩＤと同様に、アスピリンは、前記チャネルの口を通じて酵素のＣＯＸ活性部位中に拡散して、前記チャネル上を横切って、Ａｒｇ１２０、Ｔｙｒ３５５及びＧｌｕ５２４によって形成された狭窄点に至る。前記チャネルの上記狭窄点において、アスピリンのカルボキシル基が、Ａｒｇ１２０の側鎖と弱いイオン結合を形成する。これによって、アスピリンが、Ｓｅｒ５３０に対し５オングストロームだけ下方に、トランスアセチル化を行うための正しい配向で配置される。前記チャネルの触媒ポケットは、ＣＯＸ－１よりＣＯＸ－２の方がいくぶん大きいのでＳｅｒ５３０を攻撃するアスピリンの配向はＣＯＸ－２の場合良くないのでトランスアセチル化の効率は低下する。これが、ＣＯＸ－２のアスピリンに対する感受性がＣＯＸ－１と比べて１／１０～１／１００である理由である。

【０１５０】

アスピリンに加えて他のＮＳＡＩＤは、ＡＡと競合してＣＯＸの活性部位と結合することによって、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２を阻害する。しかしＮＳＡＩＤは、ＣＯＸ活性部位に、時間に依存した方式又は時間に依存しない方式で結合するかどうかという点で互いに有意に異なっている。例えば、ＮＳＡＩＤは、どのくらい速くＣＯＸ活性部位に生産的に結合するのか、及びどのくらい速くＣＯＸチャネルから出るのかについては劇的に異なっている。イブプロフェンなどの何種類ものＮＳＡＩＤはオンレート（on rate）とオフレート（off rate）が非常に速い。これらＮＳＡＩＤは、これを添加した後ほとんど瞬間的にＣＯＸ活性を阻害し、そして酵素の環境から取り出されるとＣＯＸ活性部位から容易に流れ落ちる。対照的に、インドメタシンセジクロフェナクなどの多くのＮＳＡＩＤは時間依存性である。これらのＮＳＡＩＤは、ＣＯＸ活性部位に結合するのに一般に数秒間～数分間かかる。しかし、これらの医薬は、一旦結合されると、一般に、オフレートが低く、ＮＳＡＩＤが活性部位から流れ落ちるのに何時間もの長時間が必要である。時間依存性のＮＳＡＩＤは、ＣＯＸ活性の即時検定法においてＡＡとの競合性が非常に劣っている。カルボキシル含有ＮＳＡＩＤのＣＯＸ結合部位における正確な結合相互作用を定義するコクリスタリゼーション（co-crystallization）の研究を、インドメタシンとＣＯＸ－１のみならずフルルビプロフェンとＣＯＸ－１及びフルルビプリフェンとＣＯＸ－２について実施した。

【０１５１】

ＮＳ３９８は、市販されているので薬理学の研究に広く使用されている特に重要なＣＯＸ－２阻害剤である。セレコキシブ（celecoxib）、ロフェコキシブ（rofecoxib）及びＮＳ３９８はＣＯＸ－２とコクリスタライズされた。セレコキシブとロフェコキシブはそれぞれ、カルボキシル基を含有せずにスルホンアミドとメチルスルホンを含有するジアリール化合物である。したがって、ＣＯＸアイザイムが同定された結果、セレコキシブ、ロフェコキシブの形態のＮＳＡＩＤを最終的に合成して試験することが可能になり、これらが重要な治療剤になったのである。

【０１５２】

ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２について入手可能な構造の情報を、本明細書に開示したＣＯＸ－１変異体の新規な配列の情報及び本明細書に開示した化合物の阻害の研究論文を組み合わせることによって、当業者は、ＣＯＸ－１変異体の三次元構造を予測してＣＯＸ－１変異体の可能性がある阻害剤を選択することができる。したがって、本発明は、原子の配位によって定義されるようなＣＯＸ－１変異体の三次元構造を提供し次いでその三次元構造を採用して可能性がある阻害剤を設計又は選択することによって、ＣＯＸ－１変異体に対する可能性がある阻害剤を同定する方法を含んでいる。上記方法はさらに、上記可能性のある阻害剤を合成し、その可能性のある阻害剤を、ＣＯＸ－１変異体の基質の存在下又は

非存在下で、ＣＯＸ－１変異体と接触させて、酵素Ｚを阻害する前記可能性のある阻害剤の性能を確認することを含んでいる。

【０１５３】

本発明は、さらに、阻害剤がＣＯＸ－１変異体と結合するときの阻害剤の三次元配位を提供し、その阻害剤がＣＯＸ－１変異体と結合するときの阻害剤の三次元配位を、化合物構造のデータベースの化合物の三次元配位と比較して、その阻害剤がＣＯＸ－１変異体と結合するときの阻害剤に構造が類似している少なくとも一つの化合物を前記データベースから選択することによって、ＣＯＸ－１変異体の可能性のある阻害剤を同定する方法を提供するものである。

【０１５４】

本発明は、さらに、阻害剤がＣＯＸ－１変異体と結合するときの阻害剤Ｉの原子の三次元配位および同一性を提供し、阻害剤のＣＯＸ－１変異体との相互作用を支配するその阻害剤の原子のサブセットを選択し、その阻害剤の原子の選択されたサブセットの三次元配位を、化合物構造のデータベースの化合物の三次元配位と比較して、そのデータベースから、阻害剤の原子の選択されたサブセットの三次元配位と同一の三次元配位を含む少なくとも一つの化合物を選択することによって行われ、その選択された化合物がＣＯＸ－１変異体の可能性のある阻害剤である、ＣＯＸ－１変異体の可能性のある阻害剤を同定する方法を提供するものである。

【０１５５】

別の実施態様で、本発明の新規なポリペプチドは、試験化合物の存在下又は非存在下で発現させて結晶化させることができる。結晶化させると、ＣＯＸ－１変異体ポリペプチドの三次元構造は多くの方法で測定することができる。多くの最も正確な方法はＸ線結晶回折法（総説については、Ｖａｎ　Ｈｏｌｄｅ著「Ｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」２２１～２３９頁１９７１年、米国ニュージャージー州Ｐｒｅｎｔｉｃｅ－Ｈａｌｌ参照。なおこの文献は本願に援用するものである）を利用する。この技法は、結晶格子がＸ線などの放射線を回折する性能に基づいている。巨大分子の三次元構造を決定するのに適切な回折試験は一般に高品質の結晶を必要とする。結晶タンパク質及び結晶ポリペプチドの各種製造方法が当該技術分野で公知である（例えば、Ｍｃｐｈｅｒｓｏｎら、「Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｒｙｓｔａｌｓ」、Ａ．ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ,Ｒｏｂｅｒｔ　Ｅ．Ｋｒｉｅｇｅｒ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ、米国フロリダ州マラバル１９８９年；Ｗｅｂｅｒ、Ａｄｖａｎｃｅｓｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４１巻１～３６頁１９９１年；米国特許第４，６７２，１０８号；及び米国特許第４，８３３，２３３号参照。なおこれらはいずれも本願に援用するものである）。

【０１５６】

本発明はさらに、上記スクリーニング検定法で同定された新規な薬剤又は化合物に関する。したがって、さらに、本明細書に記載されているようにして同定された化合物を適切な動物モデルに使用することは本発明の範囲内に含まれている。例えば、本明細書に記載されているようにして同定された化合物（例えばＣＯＸ－１変異体を調節する化合物、アンチセンスＣＯＸ－１変異体核酸分子、ＣＯＸ－１変異体に対する抗体又はＣＯＸ－１変異体結合パートナー）を動物モデルに使用して、このような化合物による治療の効能、毒性又は副作用を確認することができる。あるいは、本明細書に記載されているようにして同定された化合物を動物モデルに使用して、このような化合物の作用の機構を確認することができる。さらに本発明は、上記スクリーニング検定法で同定された新規化合物の、本明細書に記載されているような治療を行うための使用に関する。

【０１５７】

本発明はさらに、本発明のＣＯＸ－１変異体の活性を調節する候補化合物を同定するための高処理量のスクリーニング法の使用を目的としている。従来、有用な特性を有する新しい化学物質は、何らかの望ましい特性又は活性を有する化学化合物（「リード化合物」と呼称される）を同定し、そのリード化合物の変異体をつくり、次いでその変異体化合物

の特性と活性を評価することによって製造されている。しかし、現在の趨勢は、医薬発見のすべての面で所要時間を短くすることである。多数の試料を迅速にかつ効率的に試験できるので、高処理量スクリーニング（ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ））法が従来のリード化合物を同定する方法にとって変わりつつある。

【０１５８】

好ましい一実施態様の高処理量スクリーニング法は、多数の可能性がある治療化合物（候補化合物）を含むライブラリーを提供するステップを含んでいる。次に、このような「コンビナトリアルケミカルライブラリー」を本明細書に記載されているように、１又は２以上の検定法でスクリーニングして、望ましい特徴活性を示すそれらライブラリーのメンバー（特別の化学種又はサブクラス）を同定する。このように同定された化合物は、従来の「リード化合物」として役立てることができ又はそれ自体可能性のある治療薬もしくは実際の治療薬として使用できる。

【０１５９】

コンビナトリアルケミカルライブラリーは、新しいリード化学化合物の製造を助けるのに好ましい手段である。コンビナトリアルケミカルライブラリーは、試薬などの多数の化学的「ビルディングブロック」を組み合わせることによる化学合成又は生物学的合成によって製造される多様な化学化合物のコレクションである。例えばポリペプチドライブラリーなどの線形のコンビナトリアルケミカルライブラリーは、与えられた化合物の長さ（すなわち一ポリペプチド化合物のアミノ酸の数）に対して、化学的ビルディングブロックと呼称されるアミノ酸のセットを、あらゆる可能な方法で組み合わせることによって製造される。化学的ビルディングをこのようにコンビナトリアル混合することによって、何百万種もの化合物を合成することができる。例えば一解説者は、１００種の相互交換可能な化学的ビルディングブロックを系統的にコンビナトリアル混合すると、１億種の四量体化合物又は１００億種の五量体化合物が理論的に合成されると考察している（Ｇｓｌｌｏｐら、３７（９）巻１２３３～１２５０頁１９９４年）。

【０１６０】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの調製とスクリーニングは当業者によく知られている。このようなコンビナトリアルケミカルライブラリーとしては、限定されないがペプチドライブラリーがある（例えば、米国特許第５，０１０，１７５号；Ｆｕｒｋａ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．３７巻４８７～４９３頁１９９１年；Ｈｏｕｇｈｔｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ３５４巻８４～８８頁１９９１年参照）。ペプチドの合成は、本発明での使用が予想され意図される唯一の方法ではない。化学的に多様なライブラリーを生成する他の化学物質も使用できる。このような化学物質としては、限定されないがペプトイド類（国際特許願公開第ＷＯ９１／１９７３５号１９９１年１２月２６日）；コードされたペプチド類（国際特許願公開第ＷＯ９３／２０２４２号１９９３年１０月１４日）；ランダム生物オリゴマー類（国際特許願公開第ＷＯ９２／００９１号１９９２年１月９日）；ベンゾジアゼピン類（米国特許第５，２８８，５１４号）；ヒダントイン類、ベンゾジアゼピン類及びジペプチドなどのダイバーソマー類（diversomer）（Ｈｏｂｂｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０巻６９０９～６９１３頁１９９３年）；ビニロガス（vinylogous）ポリペプチド類（Ｈａｇｉｈａｒａら、Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４巻６５６８頁１９９２年）；β－Ｄ－グルコース骨格を有する非ペプチドのペプチドミメティック類（Ｈｉｒｓｃｈｍａｎｎら、Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４巻９２１７～９２１８頁１９９２年）；小化合物ライブラリーの類の類似有機合成（Ｃｈｅｎら、Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１６巻２６６１頁１９９４年）；オリゴカルバメート類（Ｃｈｏら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２６１巻１３０３頁１９９３年）；及び／又はペプチジルホスホネート類（Ｃａｍｂｅｌｌら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．５９巻６５８頁１９９４年）がある［下記文献を参照。一般にＧｏｒｄｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７巻１３８５頁１９９４年；核酸ライブラリー、ペプチド核酸ライブラリー（例えば米国特許第５，５３９，０８３号参照）；抗体ライブラリー（例えばＶａｕｇｈｎら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４（３）巻３０９～３１

４号１９９６年及び国際特許願第ＰＣＴ／ＵＳ９６／１０２８７号参照）；炭水化物ライブラリー（例えばＬｉａｎｇら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７４巻１５２０～１５２２頁１９９６年及び米国特許第５，５９３，８５３号参照）；並びに小有機分子ライブラリー（例えばベンゾジアゼピン類、Ｂａｕｍ Ｃ＆ＥＮ １９９３年1月１８日３３頁、イソプレノイド類米国特許第５，５６９，５８８号、チアゾリジノン類及びメタチアザノン類米国特許第５，５４９，９７４号、ピロリジン類米国特許第５，５２５，７３５号と同第５，５１９，１３４号、モルホリノ化合物類米国特許第５，５０６，３３７号、ベンゾジアゼビン類米国特許第５，２８８，５１４号などを参照）］。

【０１６１】

コンビナトリアルライブラリーの製造装置は市販されている（例えば、３５７ＭＰＳ、３９０ＭＰＳ、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍ Ｔｅｃｈ、Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ ＫＹ、Ｓｙｍｐｈｏｎｙ、Ｒａｉｎｉｎ、米国マサチューセッツ州ウーバン；４３３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、米国カリフォルニア州フォスターシティ；９０５０Ｐｌｕｓ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、米国マサチューセッツ州ベッドフォード参照）。また溶液相化学反応用に、多数の公知のロボットシステムが開発されている。これらのシステムは、武田薬品工業（株）（日本、大阪）が開発した自動合成装置のような自動ワークステーション及び化学者が行う手作業の合成操作を模倣するロボットアームを利用する多数のロボットシステムを備えている。上記装置はいずれも本発明で使用するのに適している。これらの装置が本明細書で考察されるように作動できるようにこれらの装置になされる変更の性質と実行は（もしあるならば）、関連する技術分野の当業者には分かるであろう。さらに、多種類のコンビナトリアルライブラリーがそれ自体市販されている（例えばＣｏｍＧｅｎｅｘ、米国ニュージャージー州プリンストン；Ａｓｉｎｅｘ、ロシア、モスクワ；Ｔｒｉｐｏｓ，Ｉｎｃ．米国ミズーリ州セントルイス；Ｃｈｅｍｓｔｅｒ，Ｌｔｄ．ロシア、モスクワ；３ＤＰｈａｒｍａｃｕｔｉｃａｌｓ、米国ペンシルベニア州エクストン；Ｍａｒｔｅｋ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、米国メリーランド州コロンビアなど参照）。

【０１６２】

本明細書に記載のＣＯＸ－１変異体の活性を調節できる化合物の検定法はいずれも高処理量のスクリーニングに適用できる。高処理量スクリーニングシステムは市販されている（例えばＺｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐ．、米国マサチューセッツ州ホプキントン；Ａｉｒ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ 米国オハイオ州メントル；Ｂｅｃｋｍａｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．米国カリフォルニア州フラトン；Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．米国マサチューセッツ州ナティックなど参照）。これらのシステムは一般に、すべての試料と試薬のピペッティング、液体の小出し、時限インキュベーション及び検定法に適した単一又は複数の検出器のマイクロプレートの最終の読取りを含む全作動が自動化されている。これらの適合性のあるシステムは、高度な融通性と特注製造性のみならず高い処理量と速い起動性を備えている。このようなシステムのメーカーは各種の高処理量の詳細なプロトコルを提供している。したがって、例えばＺｙｍａｒｋ Ｃｏｒｐ．は、遺伝子の転写、リガンドの結合などの調節を検出するスクリーニングシステムを説明する技術報告書を提供している。

【０１６３】

本願で同定された新規なＣＤＮＡ配列の一部分またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として多くの方式で使用することができる。例えばこれらの配列を使用して（ｉ）それら配列それぞれの遺伝子を染色体にマップして遺伝子疾患に関連がある遺伝子領域の位置を突き止め；（ｉｉ）個体をごく少量の生物試料から同定し（組織タイピング）；そして（ｉｉｉ）生物試料の法医学上の同定を助けることができる。

【０１６４】

ＣＯＸ－１変異体タンパク質の発現又は活性に対する薬剤（例えば医薬又は化合物）の影響を監視することは、基本的な医薬のスクリーニングに利用できるだけでなく臨床試験にも利用できる。例えば本明細書に記載されているようなスクリーニング検定法で測定される、ＣＯＸ－１変異体の遺伝子発現、タンパク質のレベルを増大するか又はＣＯＸ－１

変異体の活性を高める薬剤の効力は、ＣＯＸ－１変異体の転写産物の発現、タンパク質レベルの減少又はＣＯＸ－１変異体の活性の低下を示す被検者の臨床試験で監視することができる。あるいは、スクリーニング検定法によって測定される、ＣＯＸ－１変異体の遺伝子発現、タンパク質レベルを低下させるか又はＣＯＸ－１変異体の活性を下げる薬剤の効力は、ＣＯＸ－１変異体の遺伝子の発現、タンパク質のレベルの増大又はＣＯＸ－１変異体の活性の増大を示す被検者の臨床試験で監視することができる。このような臨床試験では、遺伝子好ましくは障害に関与している他の遺伝子の発現又は活性を、特定の細胞の表現型の「リードアウト（read out）」又は標識として使用することができる。

【０１６５】

好ましい実施態様で、本発明は、（ｉ）薬剤を投与する前に、被検者から投与前試料を入手し、（ｉｉ）その投与前試料中のＣＯＸ－１変異体のタンパク質、ｍＲＮＡの発現レベルを検出し；（ｉｉｉ）被検者から投与後の単一又は複数の試料を入手し；（ｉｖ）その投与後試料中のタンパク質又はｍＲＮＡの発現又は活性のレベルを検出し；（ｖ）上記投与前試料のタンパク質又はｍＲＮＡの発現又は活性のレベルを、上記投与後の単一又は複数の試料中のタンパク質又はｍＲＮＡと比較し；次いで（ｖｉ）その比較結果に応じて被検者に対する薬剤の投与を変更するステップを含んでなる、薬剤（例えば、本明細書に記載のスクリーニング検定法で同定されるアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子又は他の医薬候補物質）による被検者の治療の効力を監視する方法を提供するものである。例えば、ＣＯＸ－１変異体の発現又は活性を検出されたレベルより高く増大するためすなわち薬剤の効力を増大するためには、薬剤の投与を増大することが望ましい。あるいは、ＣＯＸ－１変異体の発現又は活性を検出されたレベルより低く低下させるため、すなわち薬剤の効力を減少させるためには、薬剤の投与を減らすことが望ましい。このような実施態様によって、ＣＯＸ－１変異体の発現又は活性は、観察可能な表現型の応答がなくても、薬剤効力の指標として使用できる。

【０１６６】

本発明は、異常なＣＯＸ－１変異体の発現又は活性に関連する障害を受ける危険がある（その障害に冒されやすい）か又はこのような障害がある被検者の予防処置法と治療処置法の両者を提供するものである。予防処置法と治療処置法について、このような処置は、薬理ゲノミクスの分野から得られる知識に基づいて特異的に適応させるか又は調整することができる。用語「薬理ゲノミクス」は、本明細書で使用する場合、遺伝子配列の決定、統計的遺伝子学及び遺伝子発現の分析などのゲノミックスの技法を、臨床開発中及び市場の医薬に適用することを意味する。さらに具体的に述べると、この用語は、患者の遺伝子が、医薬に対する男性又は女性の患者の応答をどのように決定するか（例えば患者の「医薬反応の表現型」又は「医薬反応の遺伝子型」）の研究を意味する。したがって、本発明の別の側面は、個体の医薬応答遺伝子型にしたがって、本発明のＣＯＸ－１変異体分子又はモジュレータによって行う個体の予防処置又は治療処置を仕立てる方法を提供するものである。薬理ゲノミクスによって、臨床医又は医師は、処置を受けて最も利益を受ける患者に対して予防又は治療の処置を行って、患者が有毒な医薬の関連する副作用を被る処置を避けることができる。

【０１６７】

したがって、本発明は、（ｉ）ＣＯＸ－１変異体タンパク質をコードする遺伝子の異常な修飾又は突然変異；（ｉｉ）遺伝子の誤調節；及び（ｉｉｉ）ＣＯＸ－１変異体タンパク質の翻訳後の異常な修飾のうちの少なくとも一つを特徴としてそしてその遺伝子の野生型がＣＯＸ－１変異体の活性を有するタンパク質をコードしている、遺伝子の変化の有無を判定する診断検定法も提供するものである。本発明は、さらにＣＯＸ－１もしくはＣＯＸ－２の転写産物又はポリペプチドに対するＣＯＸ－１変異体の転写産物又はポリペプチドの相対発現レベルを測定する診断検定法を提供する。診断検定法としては、ＣＯＸ－１変異体が存在しているかもしくは存在していないか又はＣＯＸ－１変異体の遺伝子の変化があるかもしくは無いかを検出するアレーベースのシステムがある。アレーベースシステムには、ａ）ビードアレー、ビードベースアレー、バイオアレー、バイオエレクトロニッ

クアレー、ｃＤＮＡアレー、細胞アレー、ＤＮＡアレー、コードされたビードアレー、ゲルパッドアレー、遺伝子アレー、遺伝子発現アレー、ゲノムアレー、ゲノミックアレー、高密度オリゴヌクレオチドアレー、高密度タンパク質アレー、ハイブリッド形成アレー、ｉｎｓｉｔｕアレー、低密度アレー、マイクロエレクトロニックアレー、マルチプレックスＤＮＡハイブリッド形成アレー、ナノアレー、ナイロンマクロアレー、オリゴアレー、オリゴヌクレオチドアレー、オリゴ糖アレー、ペプチドアレー、プラナーアレー、タンパク質アレー、溶液アレー、スポットアレー、組織アレー、エキソンアレー、フィルターアレー、マクロアレー、小分子ミクロアレー、懸濁液アレー、テーマアレー、傾斜アレー、又は転写産物アレーが組み込まれている。

【０１６８】

例えば、本発明の核酸、タンパク質もしくはポリペプチド又は本発明の核酸、タンパク質もしくはポリペプチドと相互に作用する分子を含むアレーは、検出試験法、診断検定法及び臨床試験中の化合物の作用を監視する検定法に使用することができる。したがって、このようなアレーは、本発明の核酸、タンパク質もしくはポリペプチド、又はＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）もしくはｈＣＯＸ－３（ｃｃ）を含む本明細書に開示されている核酸、タンパク質もしくはポリペプチドと相互に作用する分子を含んでいてもよい。

【０１６９】

本発明は、一側面で、ＣＯＸ－１変異体、又はＣＯＸ－１変異体の発現もしくは少なくとも１種のＣＯＸ－１変異体の活性を調節する化合物を被検者に投与することによって、ＣＯＸ－１変異体の異常な発現又は活性に関連する患者の疾病もしくは症状を予防する方法を提供するものである。ＣＯＸ－１の異常な発現又は活性によって起こるか又はこれが原因になっている疾病になる危険がある被検者は、例えば本願に記載されているような診断検定法又は予後検定法を組み合わせることによって判定できる。ＣＯＸ－１変異体の異常を特徴とする症状が現れる前に予防薬剤を投与して、疾病又は障害を予防するか又はその進行を遅らせることができる。ＣＯＸ－１変異体の異常のタイプによって、例えばＣＯＸ－１変異体、アゴニスト薬剤又はアンタゴニスト薬剤を被検者の治療に使用することができる。適切な薬剤は、本明細書に記載のスクリーニング検定法に基づいて決定できる。

【０１７０】

したがって、本発明は、患者からの試料の被検者発言プロファイルを提供し；治療法に各々関連する複数の参照プロファイルを提供することによって患者に対する治療法を選択する方法であって、被検者の発現プロファイルと各参照プロファイルが複数の値を有し、その値が各々ＣＯＸ－１変異体の転写産物又はポリペプチドの発現レベルを示し；次いで前記被検者の発現プロファイルに最も類似している参照プロファイルを選択して、前記患者の治療法を選択する方法を提供するものである。

【０１７１】

本発明はさらに、複数のアドレスを有する基質を含むアレーであって、各アドレスが、ＣＯＸ－１変異体の核酸に特異的に結合できる捕獲プローブを基質に配置しているアレーを提供するものである。上記核酸は、ＣＯＸ－１変異体の配列番号：１、配列番号：４、配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２、又は配列番号：１３からなる群から選択することができる。上記基質は、各々が独特のＣＯＸ－１変異体の配列に対応するアドレスの範囲を有している。アドレスの範囲は、アレーの密度に応じて５～１０，０００含んでいる。

【０１７２】

本発明はさらに、各々治療法に関連する複数の参照発現プロファイルを提供し；患者から得た核酸を提供し；その核酸を、複数のアドレスを有する基質を含むアレーに接触させ、各アドレスはその上にＣＯＸ－１変異体核酸に特異的に結合できる捕獲プローブを配置されており；複数のアドレスの各アドレスへの前記核酸の結合を検出して被検者の発現プロファイルを提供し；次いでその被検者の発現プロファイルに最も類似している参照プロファイルを選択して前記患者に対する治療法を選択することによって、患者の治療法を選

択する方法を提供するものである。

【０１７３】

本発明はさらに、医薬組成物がＣＯＸ－１変異体と有効に相互に作用するかどうかを評価する方法を提供するものである。この方法は、複数のアドレスを含む基質を有しかつその各アドレスがＣＯＸ－１変異体核酸に特異的に結合できる捕獲プローブを基質に配置しているアレー；及びディジタルにコードされた発現プロファイルを複数有しかつその複数の各プロファイルが複数の値を有し各値がアレーによって検出されるＣＯＸ－１変異体核酸の発現を示すコンピュータ読取り可能媒体を利用できる。

【０１７４】

本発明はさらに、介護者から被検者試料を入手し；その被検者試料から核酸を得；その核酸から被検者の発現プロファイルを確認し；複数の参照プロファイルから前記被検者発現プロファイルに最も類似しているマッチング参照プロフィルを選択し、そしてその参照プロファイルと被検者発現プロファイルが複数の値を有しその値が各々ＣＯＸ－１変異体の発現レベルを表し、前記複数の参照プロファイルの各参照プロファイルが治療に関連があり；次いで前記マッチング参照プロファイルと関連がある治療法の記述語を介護者に伝えて前記被検者に対する治療法を選択することによって、被検者に対する治療法を選択する方法を含んでいる。

【０１７５】

本発明はさらに、上記のようなアレー及び複数の発現プロファイルを有するコンピュータ読取り可能媒体を備え、その複数の各プロファイルが複数の値を有し、各値が前記アレーによって検出されたＣＯＸ－１変異体核酸の発現を示す、医薬組成物を評価するキットを提供するものである。

【０１７６】

本発明の別の側面は、治療を目的としてＣＯＸ－１変異体の発現又は活性を調節する方法に関する。したがって、代表的実施態様の本発明の調節方法は、細胞を、ＣＯＸ－１変異体又はその細胞と関連するＣＯＸ－１変異体タンパク質の活性の１又は２種以上を調節する薬剤と接触させることを含んでいる。ＣＯＸ－１変異体タンパク質の活性を調節する化合物又は薬剤は、本明細書に記載されているような薬剤、例えば核酸もしくはタンパク質、ＣＯＸ－１変異体タンパク質の天然に存在している標的分子、ＣＯＸ－１変異体の抗体、ＣＯＸ－１変異体のアゴニストもしくはアンタゴニスト、ＣＯＸ－１変異体のアゴニストもしくはアンタゴニストのペプチドミメティック又は他の小分子であってもよい。一実施態様で、前記薬剤は１又は２種以上のＣＯＸ－１変異体の活性を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性ＣＯＸ－１変異体タンパク質、及び細胞中に導入されたＣＯＸ－１変異体をコードする核酸分子がある。別の実施態様で、前記薬剤は１又は２種以上ＣＯＸ－１変異体の活性を阻害する。このような阻害化合物又は薬剤の例としては、アンチセンスのＣＯＸ－１変異体核酸分子、抗ＣＯＸ－１変異体抗体及びＣＯＸ－１変異体の阻害剤がある。これらの調節法は、生体外で（例えば細胞を前記薬剤とともに培養することによって）実施するか又はあるいは別のところで述べたように生体内で（例えば薬剤を被検者に投与することによって）もしくはコンピュータ内でさえ実施することができる。したがって、本発明は、ＣＯＸ－１変異体のタンパク質又は核酸分子の異常な発現もしくは活性を特徴とする疾病もしくは障害にかかっている個体の治療方法を提供するものである。

【０１７７】

本発明のＣＯＸ－１変異体核酸分子、ＣＯＸ－１変異体タンパク質、ＣＯＸ－１変異体の活性を調節すると判定された化合物、及び抗－ＣＯＸ－１変異体抗体（本明細書では「活性化合物」とも呼称される）は、投与するのに適した医薬組成物に組み入れることができる。このような組成物は、一般に、核酸分子、タンパク質、化合物又は抗体及び医薬として許容できる担体を含有している。用語「医薬として許容できる担体」は、本明細書で使用する場合、医薬の投与に適合する溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などのいずれか又はすべてを含むものである。医薬として活性の

物質に対してこのような媒体及び薬剤を使用することは当該技術分野では周知のことである。従来の媒体又は薬剤が前記活性化合物と適合しない場合を除いて、医薬組成物にそれらを使用することが考えられる。補助活性化合物も前記組成物に組入れることができる。

【０１７８】

例えば疫学データと臨床データは、非ステロイド抗炎症医薬（ＮＳＡＩＤ）を使用するとアルツハイマー疾患の発症が遅くなりかつＡＤの病的症状の進行が低下することを示唆している（McGeer及びMcGeer, Brain Res. Rev. 21巻195頁1995年）。アスピリンは、大部分のＮＳＡＩＤと同様に、ＣＯＸ－１酵素とＣＯＸ－２酵素の両者を阻害することによって、炎症と痛みを防止する。レスベラトロール（Resveratrol）（ぶどう中に発見されたフェノール系抗酸化剤でかつＣＯＸ阻害剤である）は、プロストグランジンの産生を阻害しかつ抗癌性と抗炎症性をもっている（Jangら、Science 275巻218頁1997年）。アルツハイマー病（ＡＤ）は老化による最も一般的な神経変性障害であり、進行性の痴呆と人格障害が特徴である。変性している神経細胞の近傍におけるアミロイドプラークの異常な蓄積及び反応性星状膠細胞がＡＤの病的特徴である。本発明はさらに、各種の神経疾患と神経変性障害を治療するのに用いる組成物及びこれら障害の治療法に関する。例えば、本発明のＣＯＸ－１変異体を調節する組成物は、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）の過多に関連する神経変性疾患を治療するのに使用できる。細胞リン脂質からアラキドン酸を放出する細胞質ホスホリパーゼＡ２は、ＡＤの脳中に一過性の全般的虚血の後、増大する。２形態のシクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２によって触媒されるアラキドン酸のシクロ酸素化反応（cyclooxygenation）は、プロスタグランジンを産生し、次に、そのプロスタグランジンは、ｃＡＭＰの生成に関与している受容体を活性化することによって、神経伝達、免疫応答及び炎症応答を調節する。神経伝達受容体の活性化によって起こるｃＡＭＰの増大によって、星状膠細胞におけるＡＰＰｍＲＮＡとホロタンパク質の産生が増大した。

【０１７９】

したがって、本明細書に開示されているスクリーニング検定法で同定された活性化合物は、ＣＯＸ－１変異体が関連する障害、例えば神経変性の症状又は疾病などを改善するため医薬組成物に入れることができる。被検者の上記症状は、医薬として許容できる担体に入れた本発明に開示されているようなＣＯＸ－１変異体活性の特異的阻害剤を投与することによって治療することができる。本発明のさらなる目的は、本発明に開示されているようなＣＯＸ－１変異体活性の特異的阻害剤の有効量を投与することによって被検者のアルツハイマー病を予防又は治療する方法を提供することである。

【０１８０】

本発明はさらに、この開示で提供されるようなＣＯＸ－１変異体の特異的阻害剤を投与することによって、被検者の神経変性症状と関連する免疫症状又は炎症症状を治療する方法を提供する。本発明は、本発明のＣＯＸ－１変異体のアンタゴニストの有効量を投与することによって、被検者におけるアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）の発現、産生又は形成を調節する方法を含んでいる。そのアンタゴニストは、例えば、医薬として許容できる担体中の、ＣＯＸ－１変異体活性の特異的阻害剤である非ステロイド抗炎症剤である。したがって本発明は、中枢神経系内でのＡＰＰ遺伝子産物の発現及びＡＰＰ遺伝子の転写又は翻訳を含む、患者におけるＡＰＰの産生又は形成を調節又は制御できる方法と組成物を提供するものである。例えば、哺乳類の細胞、特に脳の細胞によるＡＰＰの産生は増減させることができる。この目的を達成するための本発明の目的は、過剰のアミロイドの形成を阻害し、神経突起ジストロフィーを予防し、そしてＡＰＰの不適切に発現され、産生され又は形成された量の悪影響から起こる神経変性又は認知欠損などの病的症状を改善することである。

【０１８１】

したがって、本発明は、疾病の治療又は改善を行うのに有用であり、特に、神経学的疾病又は神経変性障害に関連する障害、例えば水腫、損傷又は外傷から起こる中枢神経系又は末梢神経系の損傷、不全又は合併症はいうまでもなく、少数の病名をあげればアルツハ

イマー病、パーキンソン病、ルー・ゲーリグ病又は多発性硬化症の治療又は改善を行うのに有用である。このような損傷、不全又は合併症は、明白な神経学的、神経変性的、生理的、心理的又は行動の異常が特徴であり、それら異常の症状は本発明の活性化合物又は活性物質の有効量を投与することによって減退させることができる。

【０１８２】

一実施態様で、本発明のＣＯＸ－１変異体の活性を調節する組成物の有効量を投与して、増大したｃＡＭＰ活性の作用を抑制し、阻害し又は中和することができる。なお、ｃＡＭＰ活性が抑制されないとＡＰＰが過剰に産生される。各種の非ステロイド抗炎症薬剤（ＮＳＡＩＤ）が、ｃＡＭＰ、その誘導体、ｃＡＭＰの細胞レベルに関与している受容体のリガンド、アゴニストもしくはアンタゴニスト、又はｃＡＭＰの核作用を高める化合物の刺激作用を打ち消すのに適していることが発見されている。適切なＮＳＡＩＤの例としては、限定されないが、アドビル（Advil）、アスピリン、アレブ（Aleve）、アナプロックス（Anaprox）、ジクロフェナク、ドコサヘキサエン酸、ドロビット（Dolobid）、エトドラク（Etodolac）、フェルデン（Feldene）、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトロラク、トロメタミン、ロジン（Lodine）、メクロフェナメート、６－ＭＮＡ、モトリン（Motrin）、ナルフォン（Nalfon）、ナプロシン（Naprosyn）、ヌプリン（Nuprin）、オルディス（Orudis）、フェニルブタゾン、ピロキシカム、フェニルブタゾン、ポンステル（Ponstel）、レラフェン（Relafen）、サリチル酸、スリンダクスルフィド、トレクチン（Tolectin）、トラドール（Toradol）、ボルタレン（Voltaren）；また５－リポキシゲナーゼ阻害剤類、ホスホジエステラーゼ阻害剤類又はシクロオキシゲナーゼ阻害剤類（例えばシクロサリチルアゾスルファピリジン、アズールファサラジン（azulfasalazine）、ＤＦＵ（５，５－ジメチル－３－（３－フルエロフェニル）－４－（４－メチルスルホニル）フェニル－２（５Ｈ）－フラノン）、又はＤＦＰ（５，５－ジメチル－３－イソプロピルオキシ－４－（４’－メチルスルホニルフェニル）－２（５Ｈ）－フラノン）がある。

【０１８３】

用語「中枢神経系」は、本明細書で使用する場合、硬膜の内側のすべての構造を意味する。このような構造としては限定されないが脳及び脊髄がある。

【０１８４】

用語「アルツハイマー病にかかっている被検者」、「炎症要素を有する疾病にかかっている被検者」及び「中枢神経系の損傷を受けている被検者」はそれぞれ、本明細書で使用する場合、特定の疾病、損傷又は症状をもっているか又はおそらく持っていると判定された被検者を意味する。用語「アルツハイマー病に冒されやすい被検者」及び「炎症要素を有する疾病に冒されやすい被検者」はそれぞれ、本明細書で使用する場合、特定の疾病、損傷又は症状になるか又はこれらを発生する危険があると判定された被検者を意味する。用語「炎症要素を有する疾病」は本明細書で使用する場合、炎症要素と関連する疾病及び症状を意味する。炎症要素は、前記疾病又は症状に関連する兆候、副作用又は原因事象を含んでいる。炎症要素を有する疾病としては、限定されないが、卒中発作、神経系に対する虚血性損傷、神経外傷（例えば衝撃による脳の損傷、脊髄の損傷及び神経系に対する外傷）、多発性硬化症及び他の免疫仲介神経障害［例えばギラン・バレー症候群とその変形、急性運動軸索性神経障害（acute motor axonal neuropathy）、急性炎症性脱髄多発性神経障害（acute inflammatory demyelinating polyneuropathy）及びフィッシャー症候群］、ＨＩＶ／ＡＩＤ痴呆複合症及び細菌とウイルスによる髄膜炎がある。このような疾病としては、さらに、退行変性疾患、例えばアルツハイマー病（ＡＤ）、パーキンソン病（ＰＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、ハンチントン病（ＨＤ）、ピック病、進行性核上麻痺、線状体黒質変性症、大脳皮質基底核変性症、オリーブ橋小脳萎縮症、リー病、小児壊死性脳脊髄障害、ハンター病（Hunter's disease）、ムコ多糖体沈着症、各種の白質萎縮（例えばクラッベ病、ペリツェーウス－メルツバッヒャー病など）、黒内障性（家核性）白痴、クッフス病、シュピールマイアー－フォークト病、タイサックス病（Tay Sachs disease）、バッテン病、ヤンスキー－ビールショースキー病、ライ病、脳性運動失

調症、慢性アルコール中毒、脚気、ハラーホルデンースパッツ症候群、小脳変性などがある。

【０１８５】

用語「神経欠陥」は、本明細書で使用する場合、前記神経系に関連する欠陥を意味する。いくつかの神経欠陥は、神経系の欠陥組織又は欠陥細胞によって起こるが、その外の欠陥は神経系を冒す欠陥組織又は欠陥細胞によって起こる。用語「神経欠陥哺乳類」は本明細書で使用する場合、１又は２種以上の神経欠陥を有する哺乳類を意味する。神経欠陥が「改善されると」、宿主の症状は改善される。例えば、欠陥組織が部分的に又は全体が正常状態に戻ると改善が起こる。しかし、改善は、組織が正常以下のままであっても起こるが、他の方法で、宿主が有利になるように変えられる。用語「病変（lesion）」は、創傷もしくは損傷又は組織の病的変化を意味する。

【０１８６】

本発明の医薬組成物は、本発明の意図する投与経路に適合するように配合される。投与経路の例としては、非経路投与、例えば静脈内、皮内、皮下；経口（例えば吸入）；経皮（局所）；経粘膜及び直腸の投与がある。非経口、皮内又は皮下の用途に使用される溶液又は懸濁液は、以下の成分、すなわち滅菌希釈剤例えば注射用水、食塩水、固定油類、ポリエチレングリコール類、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒類；抗菌剤例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン類；抗酸化剤例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート化剤例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝材例えば酢酸塩類、クエン酸塩類又はリン酸塩類；並びに張度調節剤例えば塩歌ナトリウム又はデキストロースを含有させることができる。ｐＨは、酸類又は塩基類例えば塩酸又は水酸化ナトリウムで調節することができる。非経口製剤は、ガラス又はプラスチックで製造されたアンプル、使い捨てシリンジ又は多人数投与用バイアルの中に封入することができる。

【０１８７】

注射用に適切な医薬組成物としては、滅菌の水溶液（水溶性の場合）又は分散液及び滅菌の注射溶液もしくは注射分散液の即席製剤用の滅菌粉末がある。静脈内投与の場合に適切な担体としては、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ、米国ニュージャージー州パーシパニー）又はリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）がある。すべての場合、その組成物は滅菌されていなければならず、かつ容易に注入できる程度に流体でなければならない、また組成物は、製造及び貯蔵の条件下で安定でなければならずかつ、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用を受けないように保存されなければならない。担体は溶媒又は分散媒体であり、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセリン、ポリエチレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）並びにそれらの適切な混合物がある。例えばレシチンなどのコーティングを使用し、分散液の場合は必要な粒径を保持し、及び界面活性剤を使用して、適正な流動性を維持することができる。微生物の作用は、各種の抗菌剤と抗真菌剤例えばパラベン類、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどで防止することができる。多くの場合、等張剤例えば砂糖類；マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール類；塩化ナトリウムを組成物に含有させることが好ましい。注射用組成物に、吸収を遅らせる薬剤例えばモノステリン酸アルミニウム及びゼラチンを含有させることによって、注射用組成物の吸収時間を延長することができる。

【０１８８】

滅菌注射溶液は、必要量の活性化合物を、適切な溶媒中に、必要に応じて上記成分の１種又は組合わせとともに組み入れ、続いて濾過滅菌することによって製造できる。一般に分散液は、活性化合物を、基本分散媒体と上記成分中の必要な他の成分とを含有する滅菌媒体中に組み入れることによって製造される。滅菌注射溶液を製造するのに使用する滅菌粉末の場合、好ましい製造方法は、予め滅菌濾過した溶液から、活性成分プラス追加の所望の成分の粉末を生成する、減圧乾燥して凍結乾燥する方法である。

【０１８９】

経口組成物は一般に不活性の希釈剤又は食べられる担体を含んでいる。経口組成物は、

ゼラチンカプセル内に密封するか又は圧縮して錠剤にすることができる。治療のため経口投与するため、活性化合物は添加剤と混合して、錠剤、トローチ剤又はカプセル剤の形態で使用できる。また、うがい剤として使用する経口組成物を流体担体を使って製造できるが、この場合、その流体担体中の化合物を経口で利用しうがいし次いで吐き出すか又は飲み込む。医薬として適合できる結合剤及び／又はアジュバンド物質を組成物の一部として含有させることできる。前記錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分又は類似の性質の化合物のいずれかを含有させることができる。すなわち、結合剤例えば結晶セルロース、トラガントガムもしくはゼラチン；添加剤例えばデンプンもしくはラクトース；崩壊剤例えばアルギン酸、プリモゲル（primogel）もしくはトウモロコシデンプン；滑沢剤例えばステアリン酸マグネシウムもしくはステロート類（sterotes）；グライダント（glidant）例えばコロイド二酸化ケイ素；甘味剤例えばスクロースもしくはサッカリン；又は芳香剤例えばペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジ香料を含有させることができる。

【０１９０】

吸入によって投与する場合、化合物は、適切な噴射剤たとえば二酸化炭素のようなガスが入っている加圧容器もしくは加圧ディスペンサー、又はネブライザーからエーロゾルスプレーの形態で送られる。

【０１９１】

また、全身投与は、経粘膜もしくは経皮の方法で行うことができる。経粘膜又は経皮の投与を行う場合、浸透すべきバリアーに対して適切な浸透剤が処方に使用される。このような浸透剤は当該技術分野では広く知られており、例えば経粘膜投与用として、界面活性剤類、胆汁酸塩類及びフシジン酸誘導体がある。経粘膜投与は鼻腔内スプレー又は坐剤を使用することによって達成できる。経皮投与を行う場合、活性化合物は、当該技術分野で広く知られているように、軟膏、膏薬、ゲル剤又はクリーム剤に配合される。

【０１９２】

またこれらの化合物は、坐剤（例えばカカオバター及び他のグルセリド類などの通常の坐剤ベースを含有する）又は直腸送達用保持浣腸剤の形態で製剤することができる。

【０１９３】

一実施態様で、前記活性化合物は、インプラント（implant）及びマイクロカプセル化送達システムを含む放出制御配合物のような、活性化合物が身体から速く排泄されないように保護する担体で製剤される。生物分解性で生体適合性のポリマー例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物類、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル類及びポリ乳酸を使用できる。このような配合物の製造方法は当業者にとっては明らかであろう。またこれらの物質は、Ａｌｚａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　及び　Ｎｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手することができる。リポソーム懸濁液（ウィルス抗原に対するモノクロラーナル抗体に感染した細胞を標的とするリポソームを含む）も、医薬として許容できる担体として使用できる。これらは当業者に知られている方法、例えば米国特許第４，５２２，８１１号に記載されている方法で製造できる。

【０１９４】

投与しやすくかつ投与量を均一にするため投与量単位（dosageunit）の形態で経口又は非経口の組成物を配合することが特に有利である。用語「投与量単位の形態」は、本明細書で使用する場合、治療すべき被検者に対して単位投与量として適切な物理的に分離された単位を意味し、各単位は、必要な医薬担体と共に所望の治療効果をあげるように計算された予め定められた量の活性化合物を含有している。本発明の投与量単位形態の仕様は、活性化合物の独特の特性及び達成すべき特定の治療効果及び個体を治療するためこのような活性化合物を混合する当該技術分野固有の制限によって直接決まる。

【０１９５】

このような化合物の毒性と治療効力は、例えば$ＬＤ_{５０}$（母集団の５０％が死亡すると推定される投与量）及び$ＥＤ_{５０}$（母集団の５０％に治療効果があると推定される投与量）を測定するための、細胞培養又は実験動物による標準の薬学的方法によって測定するこ

とができる。毒作用と治療作用の間の投与量比は治療指数であり、ＬＤ５０／ＥＤ５０比で表すことができる。治療指数の大きい化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物は使用できるが、未感染の細胞に起りうる損傷を最小限にして副作用を減らすため、冒された組織の部位にこのような化合物を向わせる送達システムは、注意深く設計しなければならない。

【０１９６】

細胞培養による検定及び動物実験で得たデータは、ヒトに使用する投与量の範囲を処方するのに使用できる。このような化合物の投与量は、毒性がほとんどないか又は全くなくＥＤ$_{50}$を含有する循環濃度の範囲内が好ましい。その投与量は、採用される剤形及び利用される投与経路に応じて上記範囲内で変えることができる。本発明の方法で使用される化合物について、治療効果のある投与量は最初、細胞培養検定法で推定される。細胞培養で測定されるＩＣ$_{50}$（すなわち症状を最高５０％抑制する試験化合物の濃度）を含有する循環血漿中濃度範囲を達成する投与量は動物モデルで処方できる。このような情報は、ヒトに対する有用な投与量をより正確に決定するために使用できる。血漿中の濃度は、例えば高速液体クロマトグラフィで測定することができる。

【０１９７】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入して遺伝子治療ベクターとして使用できる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈注射、局所投与（米国特許第５，３２８，４７０号参照）又は定位注射（例えばＣｈｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１巻３０５４～３０５７頁１９９４年）によって被検者に送達できる。前記遺伝子治療ベクターの医薬製剤は、許容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含有しているか、又は遺伝子送達媒体が埋包された徐放性マトリックスを含有している。あるいは、完全な遺伝子送達ベクター例えばレトロウイルスベクターを組換え細胞から無傷で産生できる場合、その医薬製剤は、遺伝子送達システムを産生する１又は２以上の細胞を含有することができる。

【０１９８】

また本発明は、本発明の方法で同定された化合物を含有し、容器に入れてＣＯＸ－１変異体に対する特異的インヒビターとして使用するための説明付きラベルをはられた医薬組成物を含んでいる。この医薬組成物は、ＣＯＸ－１変異体が関連する障害を治療する際にこの組成物を使用するための説明付きのキットに入れることができる。このキットにはさらに用量を使用する場合の説明書が入っている。したがって、本発明は、包装材料を含み、その包装材料中に、ＣＯＸ－１変異体の活性を調節する例えばＣＯＸ－３などの化合物を入れた製品であって、その包装材料は前記化合物がＣＯＸ－１変異体の活性を調節するので被検者の（痛み／炎症）を治療するのに使用することができることを示すラベル又は添付文書を含んでいる製品を提供するものである。本発明はさらに、包装材料を含み、その包装材料中に、ＣＯＸ－１変異体の活性をＣＯＸ－１とＣＯＸ－２と比較して優先的に調節する化合物を入れた製品であって、その包装材料は、前記化合物がＣＯＸ－１変異体の活性を調節するので被検者の（痛み／炎症）を治療するのに使用することができることを示すラベル又は添付文書を含んでいる製品を提供するものである。

【０１９９】

［実施例］

最近の研究は、ＣＯＸ－１が二量化、膜結合及び触媒作用をもたらす少なくとも三つの別個のドメインを持っていることを示した。第四のドメインすなわちＮ末端シグナルペプチドは、一次構造のＣＯＸ－１には明白に見られるが、この配列は一般にミクロソームのシグナルペプチダーゼによって初期のポリペプチドから翻訳と同時に開裂されるので観察されなかった。前記アミノ末端のシグナルペプチドは、ＣＯＸアイソザイムを小胞体／核膜の内腔中に合成させる。アミノ末端の疎水性シグナルペプチドは、初期ポリペプチドから開裂されるが、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２では大きさが異なり、このことは、本発明以前では未知の生物学的意味をもっていた。ＣＯＸ－１のシグナルペプチドは一般に、４個以上のロイシン又はイソロイシンを含有する大きい疎水性コアを有する２２～２９個のアミ

ノ酸からなる長さのペプチドである。この配列はＣＯＸ－１遺伝子のエキソン１と２でコードされている。ＣＯＸ－１のエキソン２は、末端が正確に前記シグナルペプチドの開裂部位である。ＣＯＸ－１とは対照的に、ＣＯＸ－２のシグナルペプチドはすべての種で１７個のアミノ酸の長さであり、全体がＣＯＸ－２遺伝子のエキソン１によってコードされており、そして末端が正確にそのシグナルペプチドの開裂部位である。したがって、前記疎水性シグナルペプチドは、ＣＯＸ－１のエキソン１と２及びＣＯＸ－２遺伝子のエキソン１だけで正確にコードされている。ＣＯＸ－１遺伝子のイントロン－１は、ＣＯＸ－２遺伝子には欠けている。これはＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の遺伝子の構造に大きな差があることを示している。

【０２００】

生体外（in vitro）の翻訳実験によれば、ＣＯＸ－１はイヌの膵臓ミクロソームの内腔中に迅速に転位（translocate）されるが、一方ＣＯＸ－２の転位は非能率的であることがわかった（Ｘｉｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８巻２６９２～２６９６頁１９９１年）。今のところ、これが、シグナルペプチドの長さの上記の差によって影響を受ける、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２のアイソザイムの唯一わかっている生化学的特性である。しかし、本明細書に記載の発見は、この重要なシグナル配列の、ＣＯＸ－１内のイントロン保持による制御が脳などの組織に起こってＣＯＸアイソザイムの独特の変異体（すなわちＣＯＸ－１変異体）をつくることを示している。

【０２０１】

したがって、ＣＯＸ－１変異体タンパク質（例えばＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ））をコードする新規のｍＲＮＡは哺乳類の組織で発現されて提供される。例えばイヌ及びヒトの大脳皮質はＣＯＸ－１変異体のｍＲＮＡを発現する。さらにヒトＣＯＸ－３ｍＲＮＡ（約５．２ｋｂの転写産物）は心臓組織から同定された。イントロン－１は、哺乳類ＣＯＸ－１遺伝子中に、長さと配列が保存されている。このイントロンは、ＣＯＸ－１を小胞体の内腔と核膜中に導く疎水性シグナルペプチドの中に、哺乳類の種に対して３０～３４個のアミノ酸を挿入させるオープンリーディングフレームを含有している。また本発明は、昆虫の細胞内で膜結合タンパク質として有効に発現されるＣＯＸ変異体タンパク質を提供するものである。ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａは本明細書に記載されているＣＯＸ－１変異体の例である。ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａの発現と活性については具体的に述べてあるが、このような発現は本明細書に開示されているどのＣＯＸ－１変異体にも適用できるといえる。したがって、ＰＣＯＸ－１ｂ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）又はｈＣＯＸ－３（ｃｓ）の発現は、本明細書に記載の技法及び分子生物学の技術分野の当業者の知識によって容易に達成することができる。

【０２０２】

代表的なＣＯＸ－３（しかしＰＣＯＸ－１ａではない）はシクロオキシゲナーゼ活性を有し、この活性はグリコシル化されている酵素に依存している。ＣＯＸ－１変異体を選択して阻害する化合物のスクリーニング法も提供される。例えばＣＯＸ－１変異体の活性は、アセトアミノフェン、フェナセチン、アンチピリン、ジピロン及びＮＳＡＩＤ類などの鎮痛／解熱剤によって阻害できる。したがって、例えば中枢神経系の障害を治療する（例えば痛み及び／又は熱を低下させる）のに有用な化合物を同定する方法が提供される。

【０２０３】

本発明は、限定するのではなく例示だけを目的として、ＣＯＸ－１変異体を標的として阻害する特異的化合物を提供するものである。このような化合物の誘導体の製造方法は、生化学の技術分野の当業者には周知の方法である。したがって、本発明は、ＣＯＸ－１変異体を阻害する活性を有していると同定された本明細書に開示されている化合物の誘導体を含んでいる。ＣＯＸインヒビターの例としては、ＣＯＸ－２選択性インヒビターとして開発されたセレコキシブ［Ｃｅｌｅｂｒｅｘ（登録商標）］及びロフェコキシブ（rofecoxib）［Ｖｉｏｘｘ（登録商標）］がある。メロキシカム（meloxicam）［Ｍｏｂｉｃ（登

録商標）］、ニメスリド（nimesulide）及びエトドラク（etodolac）［Ｌｏｄｉｎｅ（登録商標）］を含む他のＮＳＡＩＤも、ＣＯＸ－２の優先的なインヒビターとして同定された。本発明は、ＣＯＸ－１及び／又はＣＯＸ－２よりＣＯＸ－１変異体を優先的に阻害する上記化合物の変異体を同定する方法を提供するものである。

【０２０４】

各種のイヌ組織から単離したＣＯＸｍＲＮＡのノーザンブロットによる分析結果は、すべてのＲＮＡ試料が、脳（皮質）由来の試料を除いて、イヌのＣＯＸ－１ｃＤＮＡプローブとハイブリッドを形成する単一の２．６ＫｂのｍＲＮＡを主として含有していることを示した。このイヌのプローブは、大きさが約１．０ＫｂｐでかつＣＯＸ－１ｍＲＮＡのコーディング領域につくられた。これらの実験で使用されるこのプローブは、ＣＯＸアイソザイムの保存配列につくられた縮重オリゴヌクレオチドを使用して逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によって調製した。上記プローブの同定は、ＤＮＡの配列を決定することによって行われた。他の組織で観察されたものとは対照的に、このプローブは脳組織から単離された全ＲＮＡ中の新規なＣＯＸ－１ｍＲＮＡを検出した（図５、パネルＡ）。この新規なＲＮＡは、イヌのＣＯＸ－１をコードする２．６ＫｂのｍＲＮＡとは対照的に大きさが約１．９Ｋｂであった。類似の大きさのメッセージがニワトリの脳のｍＲＮＡ中に検出された（図５パネルｂ）。

【０２０５】

さらなるノーザンブロットの実験結果は、上記１．９ＫｂのｍＲＮＡがＲＮＡのポリＡフラクションに豊富に存在していたので、プロセスされていないＲＮＡ転写産物の切断産物ではないことを示した（図５、パネルｃ）。さらに（ＲＴ－ＰＣＲ）の実験結果は、この新規な１．９ＫｂのＣＯＸ－１関連ｍＲＮＡが、ＣＯＸ－１ＲＮＡの３’非翻訳領域の長さを変えるがそれ以外はコーディング領域を変化させずに残す別のポリアデニル化プロセスの産物ではないことを示した。このことは、前記メッセージの３’非翻訳領域に対して特異的なプローブを使用してＰＣＲでつくったフラグメントのサザーンブロット分析で確認された。これらの実験で、同じ３’非翻訳領域が２．０Ｋｂと２．８ＫｂのＣＯＸ－１ＲＮＡの両方に存在していることが発見された。したがって、前記１．９ＫｂのＲＮＡは、ＣＯＸ－１ｍＲＮＡ又は高度に関連があるｍＲＮＡのコーディング領域の変化を反映しているようである。

【０２０６】

前記１．９ＫｂのＲＮＡ中に存在しているコーディング領域の変化を確認するため、Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬとＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　それぞれから購入したλＺＩＰＬＯＸ（登録商標）とλＺＡＰ（登録商標）の両者のクローニングベクター中に、ｃＤＮＡライブラリーをつくった。ｃＤＮＡの合成、ベクターの連結及びファージの繁殖の方法は当業者に知られている。ＺＩＰＬＯＸ（登録商標）ライブラリー由来の約４５，０００個の組換え体としてλＺＡＰ（登録商標）ライブラリー由来の約１４９，０００個も組換え体を、イヌの１．０ＫｂのＣＯＸ－１ｃＤＮＡフラグメントでプルーブし、α^{32}ＰＣＴＰで放射能標識を行い、次いで２×１０^{6}ｃｐｍ／ｍｌの濃度でハイブリッドを形成させた。

【０２０７】

前記イヌのＣＯＸ－１クローンと強くハイブリッドを形成した１１個のクローンを単離して、自動ＤＮＡ配列決定法によってＤＮＡの配列を決定した。これらのクローンはすべて、イヌＣＯＸ－１ｃＤＮＡとほぼ同一のある種のＤＮＡ配列を含有していた。しかし３個のクローンは、それらそれぞれのｃＤＮＡの５’末端に又はその近くに、９０個のヌクレオチドのエキストラ配列（extra sequence）の挿入体を含有していた。この挿入された配列を分析した結果、その挿入配列は、イヌＣＯＸ－１遺伝子のイントロン－１が、マウスとヒトのＣＯＸ－１遺伝子中のこのイントロンの位置に基づいて、位置していると予測される位置に位置していることが分かった。さらに、これらの三つのイヌｃＤＮＡに保持されている９０個のヌクレオチドの配列が、ヒトとマウスのＣＯＸ－１遺伝子のイントロン－１と顕著な配列類似性を示しかつ保持されたイントロンを示す５’と３’の共通スプライス部位を含有していることが確認された。この試験は、これらの新規な転写産物が、

これらのｃＤＮＡによってコードされているＣＯＸ関連タンパク質の生化学的特性に有意な変化が起こっていると予測される、イントロン－１のｍＲＮＡ中のインフレーム保持を反映していることを示している。

【０２０８】

確認された上記三つのイントロン－１含有クローンのうちの一つは、前記９０個のヌクレオチドの挿入体に加えて約６５７ｂｐがインフレーム欠失していることが見出された。このインフレーム欠失は、ＣＯＸ－１メッセージのエキソン５～８が除去されたことにほぼ相当する。その上に、一つのコドンがエキソン４の５’末端から削除されて別のコドンがエキソン８の３’末端に付加されているようである。この欠失によって、ペルオキシダーゼの活性を低下させかつこの酵素がコードするその酵素の脂肪酸の酸素化活性を変えるが破壊はしない触媒ドメインの部分が除かれると予想される。

【０２０９】

ＣＯＸ－１変異体（例えばＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）及びｈＣＯＸ－３（ｃｓ））はイントロン－１のインフレーム挿入体を含有している。この配列をこれらＲＮＡ中に挿入すると、そのタンパク質の出発メチオニンの下流に２個のアミノ酸残基が生じて、シグナルペプチドに約３０個のアミノ酸が付加される。この付加によって、細胞内のこの酵素の細胞レベル以下の位置が変わる。特に、このタンパク質は、小胞体、核膜、脂質体などの特定のオルガネラ、又は酵素が、細胞膜のサントゾル表面に、その保持されている膜結合ドメインによって結合する細胞質内の膜構造体の特定のオルガネラを標的としていると予測される。細胞膜又は脂質体のサイドゾル表面に対しこれらの酵素を配置すると、そのタンパク質の折りたたみを変化させると予測される。というのは、酵素がミクロソーム酵素が提供するグリコシル化反応を欠いているからである。またその酵素は、このタンパク質には通常存在しない約６０個のアミノ酸をそのアミノ末端に含有している。この付加はそれ自体、折りたたみを変化させてニ量体化を防止するようである。本明細書のデータは、ＣＯＸ－１変異体タンパク質が、ＣＯＸ－１配列のすべての又は重要な部分を含有しているがＣＯＸ－１タンパク質とは異なる酵素特性を有していることを示している。

【０２１０】

ＣＯＸ－１変異体の１例として、そのアミノ末端にイントロン－１が挿入されているのに加えて重要な（２１９個のアミノ酸）が欠失しているのを示すＰＣＯＸ－１ａがある。この酵素は、ヘムに結合し、ペルオキシダーゼ活性を有しそしてＰＩＯＸ類と同様に脂肪酸を酵素化する構造モチーフをもっている。このことは、ＣＯＸ－１及びＣＯＸ－２とは異なり、ＰＣＯＸ－１ａがシクロペンタンリングを含有するプロスタグランジン類などの産物を産生しそうにないことを意味する。というのは、このような産物が生成するには、脂肪酸と、ＰＣＯＸ－１ａには欠失している疎水性残基との相互作用が必要だからである。代わりに、ＰＣＯＸ－１ａはＰＩＤＸ類と同様に脂肪酸のモノ酵素化されたヒドロペルオキシ誘導体又はヒドロキシ誘導体を生成するようである。

【０２１１】

ヒトとマウスのＣＯＸ－１遺伝子の構造は知られている。これらの種のイントロン－１の構造の分析結果は、これら両方の生物が、イヌのイントロン－１と大きさが類似しているイントロン－１を含有し、そのイントロン－１は、保持されると、そのタンパク質をコードするシグナルペプチド中にインフレーム挿入されることを示している（図７）。前記三つの種すべての上記イントロンのアミノ末端に４個のアミノ酸（ArgGluXAspPro）が保存されている。ＲＮＡは、イントロン－１に特異的なオリゴヌクレオチドアンチセンスプローブを使用するノーザンブロットで分析された。イヌの組織を、イントロン－１に見出されるオリゴヌクレオチド（長さが５０ｂｐ）について分析した。広範囲に脳内を含めて各種の組織内に、このイントロンを含有する特異的ＲＮＡの種が検出された（図８）。各種のヒト組織から単離されたＲＮＡを、イントロン－１に対して、アンチセンスのオリゴ（長さが５０個のヌクレオチド）を使用してノーザンブロットによって分析した。このブロットの洗浄条件は、プローブの計算された溶融温度（Ｔｍ）より約２０℃低い温度で３

０分間、２回洗浄する条件であった。続いて、前記計算された溶融温度より４℃低い温度で１０分間、１回洗浄した。この高度のストリンジェンシィによって、プローブと相互作用ＲＮＡとの非特異的相互作用ではなくて標準の相互作用が予測される。５．２ＫｂのＲＮＡが、心臓、筋肉、肝臓、胎盤、腎臓及び膵臓のみならず前脳特に皮質のヒト組織の中に、イントラン－１特異的オリゴヌクレオチドプローブによって検出された、扁桃、海馬、全脳及び肺臓などの組織はＲＮＡの発現が低かった。前記５．２Ｋｂの転写産物に加えて、約２～２．８Ｋｂのより小さいＲＮＡがいくつか、脳の皮質などの領域内に、前記プローブによって検出された。

【０２１２】

ＣＯＸ－１転写産物を含有するイントロン－１がヒトに存在していることをさらに保証するために、逆転写ＰＣＲを、ヒトの細胞と組織由来のＲＮＡを使用して実施した。予測される約１．８Ｋｂのフラグメントの増幅が、ヒト遺伝子のイントロン－１に配置されたフォーワードプライマー（forward primer）及びメッセージの予測ストップコドンのすぐ３’側に配置されたリベースプライマー（reverse primer）を用いて達成された。このアンプリコンは、サザーンブロット法で、イヌのＣＯＸ－１ｃＤＮＡとハイブリッドを形成した。このサザーンブロット法では、そのブロットを、２ｘＳＳＣ内で６５℃にて数回洗浄した。

【０２１３】

ヒトとイヌのシクロオキシゲナーゼ（ＣＯＸ）－１遺伝子の第一イントロンに対してアンチセンスのオリゴヌクレオチドを合成し、（γ－^{32}Ｐ）－ｄＡＴＰを使って末端に標識を付けた。イヌの大脳皮質のｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングを、約１．０Ｋｂのイヌ ＣＯＸ－１フラグメントを使用し逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって行った。このライブラリーはまた^{32}Ｐで標識したイヌＣＯＸ－１イントロン－１に対してアンチセンスのオリゴヌクレオチドでスクリーニングした。二つの全長のクローンを単離し、完全に配列を決定してＣＯＸ－３及びＰＣＯＸ－１ａと命名した。これら両者はイヌのＣＯＸ－遺伝子から誘導されたがイントロン－１を保持している。また、ＰＣＯＸ－１ａは、エキソン５～８に及ぶ６５７ｂｐのインフレーム欠失部分がある。

【０２１４】

イヌの大脳皮質のｃＤＮＡを合成し、そしてＰＣＲ増幅を行うためプライマーを設計した。そのセンスプライマー［５’－ＣＧＧＡＴＣＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＡＧＣＴＡＴＧＡＧ－３’（配列番号：７）］は、イヌＣＯＸ－３配列のヌクレオチド１５－３２（ＧｅｎＢａｎｋに受託番号ＡＦ５３５１３８で提出した）と同じであり、そのプライマーの３’末端は前記開始メチオニンから２個のヌクレオチドだけ下流に位置している。そのアンチセンスプライマー［５’－ＣＧＣＣＡＴＣＣＴＧＧＴＧＧＧＧＧＴＣＡＧＧＣＡＣＡＣＧＧＡ－３’（配列番号：８）］は、ヌクレオチド１８６５～１８９４と同じであり、ストップコドンから３２個のヌクレオチドだけ上流に位置している。

【０２１５】

ヒト組織をイントロン－１プローブでノーザンブロット分析したところ約５．２ＫｂのｍＲＮＡが検出された。Ｍａｒａｔｈｏｎ－ｒｅａｄｙＴＭヒト大脳皮質ｃＤＮＡ（clontech）を５’プライマーと３’プライマーを使ってＰＣＲ［Ｃｌｏｎｔｅｃｈ－Ａｄｖａｎｔａｇｅ（登録商標）２ＰＣＲ酵素システム］で増幅して、約４．２Ｋｂの増幅されたフラグメントが発見され、イントロン－１が保持されたヒトＣＯＸ－１の全コーディング領域を含んでいることが分かった。

【０２１６】

ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａの両者を、バキュロウイルスの発現ベクターｐＢｌｕｅＢａｃ４．５／Ｖ５－Ｈｉｓ（invitrogen）中にクローン化した。ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ、マウスＣＯＸ－１及びマウスＣＯＸ－２を発現するため、Ｓｆ９細胞（約１×１０^{6}）を、ウイルス株に、感染多重度（ＭＯＩ）３で感染させた。

【０２１７】

ヒト大動脈由来の全タンパク質（２０μｇ）を、ＣＯＸ－１モノクローナル抗体（ＭＡ

ｂ）（Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ、米国ミシガン州アンアーバー）とＣＯＸ－３抗－ペプチドポリクローナル抗体（ＰＡｂ）を使用しウエスタンブロッティングで分析した。一次抗体を、ヒトとマウスのＣＯＸ－１イントロン－１ペプチドの混合物（以下に説明する）とともに４℃で１ｈｒプレインキュベートするか又はブロックされないままにしておいた。Ｓｉｇｍａから入手した適切なウサギ－抗マウス二次抗体（１：２０００）又はヤギ抗ウサギ二次抗体（１：１０，０００）でプロセスした。放射線写真画像の濃度測定を、ＡｌｐｈａＩｍａｇｅｒ（商標）２０００ＤｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎとＡｎａｌｙｓｉｓＳｙｓｔｅｍ（Alpha Innotech Corporation）を使って実施した。

【０２１８】

昆虫細胞にバキュロウイルス構造体を感染させてから１ｈｒ後、ツニカマイシン（Tunicamycin）を最終濃度１０μｇ／ｍｌまで添加した。その細胞を培養し４８ｈｒ後に収穫した。無傷の細胞のＣＯＸ活性を放射線免疫検定法（ＲＩＡ）（Ｓａｌｍｏｎの１９７８年の論文）で測定した。Ｔｕで処理した無傷の細胞のＣＯＸ活性を、適当なウイルスを感染させた（ＭＯＩ＝３）未処理細胞の活性と比較した。

【０２１９】

Ｓｆ９細胞に高タイターのウイルス株をＭＯＩ３で感染させて４８ｈｒ培養した。ＣＯＸ－３を発現する感染細胞を試験管に分取し（約1.5×10^{6}個の細胞）、次いで遠心分離した（１０００×ｇ、５ｍｉｎ）。上澄液を排棄し、生成した細胞ペレットを、被検医薬を含有する無血清培地１００μｌ中に再懸濁し次いで室温にて３０分間プレインキュベートした。次にアラキドン酸（１００μｌ、最終濃度５又は３０μＭ）を添加し、混合し、次いでインキュベートした（３７℃にて１０分間）。次に試料を遠心分離し、上澄液１００μｌについてPGE_2をＲＩＡで測定してＣＯＸ活性を検定した。検定は３度ずつ複数回行った。阻止カーブをつくって、IC_{50}値を、Ｐｒｉｓｍ（登録商標）３．０（Ｇｒａｐｈａｄ、米国サンディエゴ）を使用して測定した。

【０２２０】

ゲノムクローン配列によって予想される、ヒトとマウスのＣＯＸ－３一次配列の最初の１３個のアミノ酸に相当するペプチドを合成してキーホールリンペットヘモシアニンに結合させた。ヒト［ＭＳＲＥＣＤＰＧＡＲＷＧＣ（配列番号：２０）］とマウス［ＭＳＲＥＦＤＰＥＡＰＲＮＣ（配列番号：２１）］のペプチドを、ニュージーランド白ウサギに注射した。生成したポリクローナル抗体を、製造メーカーの説明にしたがって、Ｓｕｌｔｏｌｉｎｋ（商標）カップリングゲル（Ｐｉｅｒｃｅ）に固定化した上記ペプチドを使用して親和性精製を行った。

【０２２１】

ノーザンブロット分析を行ったところ、イントロン－１を含有する約５．２ＫｂのｍＲＮＡを検出した（図１０のパネルＢ）。アンチセンスプライマー［ＨＣＬＥ：５’－ＣＧＧＡＴＣＣＴＧＧＡＡＴＡＧＧＣＣＡＣＣＧＧＡＴＧＧＡＡＧＧＡ－３’（配列番号：９）］を公表されている配列の３’末端から設計し、そしてセンスプライマー［ＨＣＦ：５’－ＣＧＧＡＴＣＣＴＧＣＧＴＣＣＣＧＣＡＣＣＣＣＡＧＣＡ－３’（配列番号：１７）］をヒトＣＯＸ－１遺伝子（Ｇｅｎ－Ｂａｎｋ、受託番号Ｌ０８４０４）の開始コドンの上流の部位の５個のヌクレオチドから設計した。これらのプライマーは、クローン化を促進するため、それらの５’末端のＢａｍＨＩ認識配列で設計した。

【０２２２】

Ｍａｒａｔｈｏｎ－ｒｅａｄｙ（商標）ヒト大脳皮質ｃＤＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、上記プライマーを使ってＰＣＲ［Clontech-Advantage（登録商標）２ＰＣＲ酵素システム］で増幅した。生成した約４．２Ｋｂの増幅フラグメントを低融点アガロースから回収し次いでネステッドプライマー（nested primer）を使って再増幅した［センス、ＨＣＥＩ：５’－ＣＧＧＡＴＣＣＧＣＧＣＣＡＴＧＡＧＣＣＧＴＧＡ－３’（配列番号：１８）；アンチセンス、ＨＣＳ：５’－ＣＧＧＡＴＣＣＴＣＡＧＡＧＣＴＣＴＧＴＧＧＡＴＧＧＴＣＧＣＴ－３’（配列番号：１９）］。ヒトのＣＯＸ－１の全コーディング領域（イントロン－１が保持されている）を含有する

生成したフラグメント（約２．０Ｋｂ）を次いで、プラスミドＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ内にクローン化して配列を決定した。

【０２２３】

単離したＲＮＡを利用して、イヌの大脳皮質からイヌＣＯＸ－１コーディング領域ｃＤＮＡプローブで、ノーザンブロットにて、二つの別個のｍＲＮＡの種（約２．６ｋｂと約１．９ｋｂ）を検出した（図１０、パネル１０、レーン１）。これらの転写産物をさらに調べるため、イヌの大脳皮質ｃＤＮＡライブラリーを構築し次にその非増幅ライブラリーを上記のようにしてスクリーニングした。１１個のクローンを単離し、続いて自動ＤＮＡ配列決定法によって特性を決定した。これら１１個のクローンはすべて、イヌＣＯＸ－１ｃＤＮＡ配列を含有していることが見出された。しかし三つのクローンは、それらクローンそれぞれのｃＤＮＡの５’末端又はその近くに９０個のヌクレオチドが挿入されていたが、これはヒト又はマウスのＣＯＸ－１遺伝子のイントロン－１に対して７５％の配列相同性を示した。またこの追加配列は、イントロンが保持されていることを示す５’と３’の共通スプライス部位を含有していた。前記三つのクローンのうち一つは、イントロン－１を保持していることに加えて、ＣＯＸ－１メッセージのエキソン５～８に相当する６５７ｂｐのインフレーム欠失部分をもっていた。

【０２２４】

先に検出した二つのＣＯＸｍＲＮＡ転写産物（すなわち約２．６Ｋｂと約１．９Ｋｂのもの）がイントロン－１を保持しているかどうかを確認するため、放射能標識をつけたアンチセンスイヌＣＯＸ－１イントロン－１特異的オリゴヌクレオチドプローブ（ＣＣＩ）を利用してノーザンブロット試験を繰り返した（図１０パネルＡレーン２）。重要なことは、新規なＣＯＸ－１ｍＲＮＡスプライス変異体がイヌ大脳皮質で確かに発現されたことを示唆する前記約１．９ＫｂのｍＲＮＡ転写産物と前記約２．６Ｋｂの転写産物が検出されたことである。したがって、非スプライスイントロン－１を保持して前記約２．６ＫｂのｍＲＮＡ転写産物に相当する新規なＣＯＸｃＤＮＡクローンをＣＯＸ－３と命名した。さらに、イントロン－１を保持し、エクソン５～８を欠いて前記約１．９ＫｂのｍＲＮＡ転写産物に相当する新規なＣＯＸｃＤＮＡクローンは、部分ＣＯＸ－１ａすなわちＰＣＯＸ－１ａと命名した（図１１）。

【０２２５】

イヌ大脳皮質ＲＮＡの逆転写ＰＣＲ及びノーザンブロット分析によって、ＣＯＸ－３ｍＲＮＡが、上記大脳の領域に、ＣＯＸ－１ｍＲＮＡの約５％のレベルで存在していることが分かった（図１０、パネルＡ）。興味深いことには、これらの分析結果は、ＰＣＯＸ－１ａに相当する前記約１．９ＫｂのｍＲＮＡが実際は、約９０個のヌクレオチドの大きさの差を有する２種のｍＲＮＡの混合物であることを示した（図１０、パネルＢ）。これらｍＲＮＡのうちの一方はＰＣＯＸ－１でありそして残りの方（ＰＣＯＸ－１ｂ）は、イントロン－１を欠いていることを除いてＰＣＯＸ－１ａと同一であった。ＰＣＯＸ－１ａとＰＣＯＸ－１ｂは大脳皮質中等しい量で発現される（図１０、パネルＢ）。

【０２２６】

新規なＣＯＸ－１関連ｍＲＮＡ転写産物がヒト組織中でも発現されるかどうかを確認するため、ヒトノーザンブロット実験を、ヒトイントロン－１特異的（ＨＣＩ）プローブを利用して実施した。重要なことは、これらの実験結果が、新規な約５．２Ｋｂと約２．８ＫｂのｍＲＮＡ転写産物の存在していることを示したことである（図１０、パネルＣ）。約１．９Ｋｂの弱いハイブリッド形成シグナルも見られた。ＨＣＩと前記約５．２Ｋｂ形とのハイブリッド形成は、組織特異的であり、大脳皮質内に最高レベルで存在し、続くレベルで心臓に存在していた。これらの観察結果は、ＣＯＸ－１ｍＲＮＡの特性決定された発現パターンとは異なっている。

【０２２７】

ＣＯＸ酵素は、小胞体の内腔内レジデントであり、適切な折りたたみと活性を得るためＮ－連結グリコシル化反応に依存している。イントロン－１を保持すると、これらのｍＲＮＡを核から放出することを防止するか、又はこれらのタンパク質を他の細胞レベル以下

のコンパートメントに向かわせることによって、ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１の発現を防止してグリコシル化反応を防止できる。したがって、昆虫細胞（Ｓｆ９）に、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１及びＣＯＸ－１を発現する組換えバキュロウイルスを感染させ、次いで細胞ホモジネートを、ウェスタンブロット法でタンパク質発現について検定した。哺乳類の、イントロン－１によってコードされていると予想される保存アミノ酸配列（ＭＳＲＥＸＤＰＸＡ）に対する抗体を使用して、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ及びＰＣＯＸ－１ｂにプローブした。この分析結果は、ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１がともに昆虫細胞内に有効に発現されていることを示した。スプライシングによってイントロン－１を除くことから得られる検出可能な産物は、免疫学的に又は感染させたＳｆ９細胞から抽出したＲＮＡのＰＴ－ＰＣＲ分析によっても全く検出されなかった。さらに、ＣＯＸ－３及び／又はＰＣＯＸ－１ａもしくはＰＣＯＸ－１ａ中の、イントロン－１がコードしている追加の配列を含有しているシグナルペプチドは、シグナルペプチターゼがＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の中に存在しているときと同様にシグナルペプチターゼによって除去されなかった。

【０２２８】

ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１の翻訳後のＮ連結グリコシル化反応を、コアのグリコシル化反応を阻害するツニカマイシンを使って、ＣＯＸ－１の上記反応と比較した。免疫ブロット分析の結果は、ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１及びＣＯＸ－１のグリコシル化された形態の減少又は消失を示した（これらＣＯＸそれぞれを図１２の上部の左、中央及び右のパネルに示す）。次に発現系を、全昆虫細胞内でのPGE_2の産生量を測定することによって、シクロオキシゲナーゼの活性について検定した。ＣＯＸ－３の活性は、ＣＯＸ－１とＰＣＯＸ－１の活性の約２０％であることが見出され、検出可能なＣＯＸ活性を完全に欠いていた（図１２の下部パネル）。ツニカマイシンで処理した細胞のＣＯＸ活性はこの医薬で有意に減少するか又は排除されることが分かったが、これはＣＯＸ－３がＣＯＸ活性を得るにはＮ連結グリコシル化反応が必要なことを示している。

【０２２９】

ヒト組織中のＲＮＡの試験結果が、最高レベルのＣＯＸ－３のメッセージが大脳皮質と心臓内にあることを示した。ＣＯＸ－１モノクローナル抗体又はＣＯＸ－３抗ペプチドポリクローナル抗体を使って行うヒト大動脈のウェスタンブロット分析（図１５）によって、別個の６５ＫＤａと５３ＫＤａのＣＯＸ－１関連タンパク質が存在していることが検出された。さらに、ＣＯＸ－１の抗体は、グリコシル化ＣＯＸ－１に相当する６９ＫＤａのタンパク質、及びＣＯＸ－１又はＰＣＯＸ－１ｂのタンパク質分解フラグメントを示す５０ＫＤａのタンパク質を検出したがＣＯＸ－３抗体は検出しなかった。

【０２３０】

上記の６５ＫＤａと５３ＫＤａのタンパク質両者の検出は、抗ペプチド血清をそのコグネイトペプチド（cognate peptide）とともにプレインキュベートすることによって選択的に減少したが、ＣＯＸ－１モノクローナル抗体によるこれらタンパク質の検出はこの処理によって影響を受けなかった。

【０２３１】

鎮痛/解熱薬とＮＳＡＩＤがＣＯＸ－３のＣＯＸ活性を阻害する性能とそれらがＣＯＸ－１とＣＯＸ－２を阻害する性能とを試験して比較した。外因的に３０μＭと５μＭの濃度で添加したアラキドン酸の存在下で分析を行った。基質濃度が高い場合、ＣＯＸ－３だけがアセトアミノフェンによって阻害された（図１３、パネルＡ）。さらに基質濃度が低い場合、ＣＯＸ－３はＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２よりアセトアミノフェンに対し有意に一層感受性であることが分かった（図１３、パネルＢ）。アセトアミノフェンは、５μＭのアラキドン酸の存在下で試験したとき、IC_{50}値６４μＭでＣＯＸ－３を阻害したが、一方ＣＯＸ－１及びＣＯＸ－２それぞれのIC_{50}値は２.１倍と９２.４倍であった。

【０２３２】

アセトアミノフェンは、メトヘモグロビン血症、腎臓毒障害及び発癌の疑いがある腎臓と膀胱の症状を起こすためにもはや広く使用されていないが、かつては一般に広く使われていた鎮痛／解熱剤であるフェナセチンの活性代謝産物であるとみなされている。フェナ

セチンは、身体内で迅速に０－脱エチル化されてアセトアミノフェンを形成しさらに代謝され他の小さいが毒性の化合物になる。したがってごく小濃度のフェナセチンしか血液循環しない。興味深いことには、フェナセチンは、ＣＯＸ－３を阻害する場合、アセトアミノフェンよりはるかに強力であった（図１３、パネルＣ）。基質条件３０μＭで、フェナセチンは、同じ条件下で試験したアセトアミノフェンの場合IC_{50}が４６０μＭであったのと対照的にIC_{50}値１０２μＭでＣＯＸ－３を阻害した。アセトアミノフェンと同様に、フェナセチンはＣＯＸ－３を優先的に阻害した。

【０２３３】

別の鎮痛／解熱医薬ジピロンも、ＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２より、ＣＯＸ－３を有意に一層強力に阻害した（図１３、パネルＤ）。ジピロンは、ＣＯＸ－３をIC_{50}値５２μＭで阻害しそしてＣＯＸ－１を６.６倍の濃度で阻害した。ジピロンによるＣＯＸ－２の検出可能な阻害は、１ｍＭより低い濃度では観察されなかった。ジピロンは、水溶液中で自然に分解して、鎮痛／解熱剤として効力が異なる類縁構造の各種ピラゾール化合物になるプロドラッグである。アンチピリンとジメチルアミノピレンは、ジピロンの二つの分解生成物と類似していて、治療効力は著しく低くかつ同様に、ＣＯＸ－３を阻害する作用はジピロンに比べて顕著に低い（表１）。しかしこれらの化合物は、他の鎮痛／解熱剤と同様に、ＣＯＸ－３を優先的に阻害する。

【０２３４】

またＣＯＸ－３は、ＮＳＡＩＤを選択することによって、阻害に対する感度が異なることが分かった。ジクロフェナクは、試験したＣＯＸ－３阻害剤のうち最も強力な阻害剤であり、そしてジクロフェナク、アスピリン及びイブプロフェンは、ＣＯＸ－１及びＣＯＸ－２より優先的にＣＯＸ－３を阻害した。これら医薬のIC_{50}値は表に示してある（表１）。重要なのは、全結果が、ＣＯＸ－３はＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の両者とは薬理学的に異なるＣＯＸ活性をもっていることを示していることである。

【０２３５】

ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａの両者はイントロンを所持して形成されている。我々は、ニワトリのＣＯＸ－２がＣＯＸ－３で見られるのと同様にイントロン－１保持によって制御されることを先に示した。スプライスされていないｍＲＮＡは大部分核内に保持されている。ニワトリのＣＯＸ－２の場合、イントロン－１の保持は、ｍＲＮＡの翻訳と核外輸送を防止する。しかし、昆虫細胞のＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａ両者のｍＲＮＡはイントロン－１を保持し、核から輸送され次いで翻訳される（図１２）。ＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａから産生されるポリペプチドは、イントロン－１がコードする配列を含みそして十分にスプライスされたＣＯＸ－１とは機能が異なっている。したがって、イントロン－１の保持によって、新規なＣＯＸ酵素ＣＯＸ－３を細胞及び組織で産生できる機構が提供される。イントロン－１の保持がＣＯＸ－３及び／又は制御ＣＯＸ－１をつくる際に重要であるという概念は、イヌ、ヒト及びマウスのＣＯＸ－１遺伝子由来のイントロン－１のＤＮＡ配列が高い保存度（high degree of conservation）を示すという知見と一致している。このことは、イントロン－１の５’領域と中央領域で最も明らかである。全イントロン－１は、高度に保存されているイントロンの中央領域の配列５’－ＧＣＣＴＣＮＧＧＮＧＧＡＧＣＣＴＹＧＡＡＹＧＣＹＡＧ－３’（配列番号：４４）を有する三つの種すべての間で４１％の配列同一性を示す。実際に、イントロン－１は、これらの種に、エキソン１よりよく保存されており、これは、イントロン－１が哺乳類で重要かつ類似の役割を演じていることを示唆している。また、イントロン－１の高度に保存された要素は、その保持を制御する役割も演じている。さらに、イントロン－１がＣＯＸ－３の発現を制御するのに重要な役割を演じているという概念を支えているのは、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の遺伝子の構造が、それらの中のイントロン－１の配置だけが異なっているという事実である。ＣＯＸ－１は、１０個のイントロンをもっているがＣＯＸ－２は９個もっている。ＣＯＸ－１遺伝子中の追加イントロンはイントロン－１であり、そのイントロンはＣＯＸ－３に保持されている。

【０２３６】

ＣＯＸ－３は、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２のすべての触媒としての特徴と重要な構造上の特徴を共有している。しかし、イントロン－１を、開始メチオニンから２個のアミノ酸だけ下流に挿入するとシグナルペプチドに３０個のアミノ酸を追加することになる。ＣＯＸ－３は、シグナルペプチド及びイントロン－１がコードする配列を保持しているにもかかわらず、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにおいてＣＯＸ－１と同時に泳動する。またＣＯＸ－３は、グリコシル化されて、そのグリコシル化反応が活性を必要としている場合、小胞体に入るようである。昆虫細胞において、ＣＯＸ－３は、ＣＯＸ－１の活性の約２０％の活性を示し、一方ＣＯＸ－１はＣＯＸ－２の活性の約２０％を示す。ＣＯＸ－１、ＣＯＸ－２、ＣＯＸ－３及びＰＣＯＸ－１ａはすべて、我々のバキュロウィルス系で等しい発現を示し、そして昆虫細胞が活性ＣＯＸ－１を発現する性能がＣＯＸを発現する性能と比べて低いのは、昆虫細胞が翻訳後にＣＯＸ－１を正しくプロセスすることができないためであろう。企画遠心分離法で行った細胞レベル以下の局在化の試験は、ＣＯＸ－３又はＰＣＯＸ－１ａが細胞質型でないことを示している。両タンパク質が膜に結合することは、両者が膜結合ドメインを保持しかつ小胞体の内腔に入るようであるという事実から予想される。イントロン－１の保持によって、折りたたみが変化することがありかつ二量体化と活性部位に影響することもある。これらの作用は、構造の変化又は変化したタンパク質のターゲッティングによって生じる。Cys^{313}又はCys^{540}のＣＯＸ－１部位特異的突然変異誘発は、両者ヘム鉄から２５Ａを超えて位置しているが、酵素の活性を８０～９０％減少させることが観察されている。したがってＣＯＸ－３はすべてのＣＯＸ－１配列を含有しているが、保持されているイントロンの配列はその酵素特性を有意に変えることができる。ＣＯＸ－３に関するこの阻害性の試験は上記のことが事実であることを示している。

【０２３７】

この試験は、ＣＯＸ－１変異体のＣＯＸ－３が、鎮痛／解熱医薬に対して感受性であるが抗炎症活性が低いことを示している。痛みと熱は、複雑な細胞経路と生化学的経路をとる多くの発痛因子をもっている。ＣＯＸ－３が鎮痛／解熱医薬に感受性であるという知見は、ＣＯＸ－１遺伝子が痛み及び／又は熱に不可欠の役割を演じていることを示唆している。生理的背景に応じて、痛みの経路はＣＯＸ－１遺伝子又はＣＯＸ－２遺伝子由来の産物を含んでいる。例えばＣＯＸ－２選択性医薬は、ヒトの炎症性疼痛を抑制するのに臨床面で有用であり、そしてげつ歯動物のいくつかの足炎症検定法の親炎症性薬剤（pro-inflammatory agent）（例えばカラゲナン）によって誘発される痛みを抑制する場合、ＣＯＸ－１選択性ＮＳＡＩＤより強力である。ＣＯＸ－１選択性医薬は、対照的に、各種の化学的な痛み刺激剤によって起こる内臓侵害受容（viscero nocicepion）を抑制する場合、ＣＯＸ－２選択性薬剤により優れている。さらに、Ｂａｌｌｏｕら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９７巻１０２７２頁２０００年）は、内臓侵害受容がＣＯＸ－１の場合大きく低下するがＣＯＸ－２ノックアウトマウスの場合低下しないことを見出した。一方、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の両者は、ホルマリン試験や尿酸塩結晶試験などの腸の外側の痛覚消失を測定する侵害受容モデルに関連している。痛みにおけるＣＯＸ－１の役割は、さらにＣＯＸ－１選択性ＮＳＡＩＤ（例えばアスピリン、ケトロラク、ケトプロフェン、イブプロフェン及びスプロフェン）が臨床的に重要なヒトや動物の鎮痛剤であるという事実によって裏付けられている。これらの医薬は、脳から相対的に締め出されているにもかかわらず、脳内のＣＯＸ－３に作用するのに十分な濃度に到達できる。さらに、これら医薬の鎮痛作用は、炎症を抑制するのに必要な投与量より有意に低い投与量で起こることが多い。ＣＯＸ－１と痛みの臨床上及び実験での関連は、ＣＯＸ－１が、脊髄後根神経節の推定侵害受容ニューロン（putative nociceptor neuron）の部分集団のマーカーであるという知見によって機能的に説明することができる。

【０２３８】

発熱（pyresis）については、ＣＯＸ－２ノックアウトマウスはＬＰＳ－誘発熱及びインターロイキン誘発熱の低下を示すがＣＯＸ－１ノックアウトマウスは示さず、そしていくつかの新しいＣＯＸ－１選択性阻害剤例えばＳＣ－５６０は、動物モデルのＬＰＳ誘発

熱を抑制するのに効果がないことが分かった。ＣＯＸ－２選択性阻害剤のロフェコキシブ（rofecoxib）は、動物モデルで、臨床的に、自然発熱（naturally occurring fever）を抑制し発熱の持続も抑制する。ＣＯＸ－１を優先的に阻害するアスピリンは、最も有効な解熱ＮＳＡＩＤであり、５～１５ｍｇ／ｋｇの範囲内の投与量で発熱を抑制し、この投与量は炎症性疾病を治療するのに使用される６０～８０ｍｇ／ｋｇよりはるかに少ない。さらに、ＣＯＸ－２の優先的阻害剤のニメスリド（nimesulide）は、ＣＯＸ－１も阻害する血漿濃度でイヌだけを解熱することが分かった。したがって、発熱時のＣＯＸ－１に対する役割が存在している。

【０２３９】

アセトアミノフェンの作用の機構は、分かっておらず、まだ確認されていない脳ＣＯＸの阻害によると仮定されている。ノーザンブロット分析とｃＤＮＡのクローニングは、ＣＯＸ－３がイヌの脳内で発現されることを示している。また、ＣＯＸ－３は、ノーザンブロット試験（図１０）から、ヒトの脳の特定の領域、特に大脳皮質で発現されるようである。さらに、昆虫細胞中に異所発現したＣＯＸ－３を使用する我々の試験は、ＣＯＸ－３が、アセトアミノフェンに対して、ＣＯＸ－１やＣＯＸ－２より有意に感受性であることを示している。定常状態のアセトアミノフェンの濃度が約１００μＭに到達し、かつ避難アラキドン酸の濃度が１－５μＭである生理的条件下では、ＣＯＸ－３だけがかなり阻害されると予測される。これらの知見は、脳及び脊髄のＣＯＸ－３を阻害することが、永年にわたって探求されているアセトアミノフェンの目標であることを示唆している。

【０２４０】

また、アセトアミノフェンがＣＯＸ－３を阻害する作用の提案されている機構は、ジピロン及び類縁化合物のアミノピリンとアンチピリンなどのピラゾロン医薬まで広がるようである。ジピロンは、強力な鎮痛／解熱医薬であり、アセトアミノフェンと同様に、抗炎症活性を欠いている。しかし、ジピロンは、構造はアセトアミノフェンと類縁の構造ではない。これらの構造が類似していない薬剤がＣＯＸ－３を優先的に阻害しかつそれらの治療効力がＣＯＸ－３を阻害するそれらの性能にのっとっているという知見は、ＣＯＸ－３が鎮痛解熱医薬の標的であることと一致している。IC_{50}値は次のとおりである。すなわちジピロンは５２μＭ、４－ジメチルアミノアンチピリンは６８８μＭそしてアンチピリンは８６２μＭである。ジピロンだけが、鎮痛／解熱医薬として治療するのに有効である。その活性分解生成物である４－メチルアミノアンチピリンは、血漿中と中枢神経系中それぞれの濃度は１０４μＭと８６μＭに到達する。このように、ＣＯＸ－３の阻害は、アセトアミノフェンのみならずピララゾン（pyralazone）医薬の既知の生理学的濃度で起こる。さらに、ＣＯＸ－３の阻害は、他の系では要求されるグルタチオン、エピネフリンなどの外因的に添加される「コファクター」を添加することを必要としない。

【０２４１】

鎮痛／解熱医薬は、標準ＮＳＡＩＤより高い濃度でＣＯＸ－３の活性を阻害する。治療の観点から、上記のことは、これらの医薬が血漿脳関門を十分に貫通してＣＯＸ－３を阻害するのに十分に高い濃度でＣＮＳ中に蓄積する事実によって合理的に説明することができる。アセトアミノフェンのような鎮痛／解熱医薬は、作用の中心機構を有していると永年にわたって仮定されてきた。一方、カルボキシレート含有ＮＳＡＩＤは、血液脳関門をわずかに横切りそして侵害受容器を敏感にするプロスタグランジンの合成を減らすことによって末梢の痛みを減らす明確な性能をもっている。また、ＣＯＸ－３によって行われている可能性がある脳又は脊髄におけるプロスタグランジンの合成を阻害することがＮＳＡＩＤの鎮痛作用に寄与しているという、ＮＳＡＩＤの作用の中枢での鎮痛機構がいくつも提案されている。したがってＮＳＡＩＤの身体における作用は、末梢での作用（ＣＯＸ－１、ＣＯＸ－２及びＣＯＸ－３）のみならず中枢での作用（ＣＯＸ－３）があるようである。ＣＮＳにおけるＣＯＸ－１変異体は鎮痛／解熱剤及び標準ＮＳＡＩＤの両者の本質的な標的である。

【０２４２】

これらの試験における鎮痛／解熱剤とＮＳＡＩＤによるＣＯＸ－３の阻害の比較（図１

３と表１）は、両タイプの医薬がＣＯＸ変異体の活性（例えばＣＯＸ－３）を調節できることを示唆している。表１は選択された鎮痛解熱医薬とＮＳＡＩＤのＩＣ$_{50}$値を示す。ＣＯＸ－３に対する優先的阻害を示す関連阻害比ＣＯＸ－１／ＣＯＸ－３及びＣＯＸ－２／ＣＯＸ－３も示してある。検定はすべて３０μＭのアラキドン酸で実施した。表１中のアステリスクは次の表示を示す。＊、４－ジメチルアミノアンチピリン；＊＊、１ｍＭで阻害は検出できなかった；＊＊＊、適用できない比率。

【０２４３】

【表１】

表　1

医薬	IC_{50}, μM		
	COX-1	**COX-2**	**COX-3**
アセトアミノフェン	>1000	>1000	460
アミノピリン*	>1000	>1000	688
アンチピリン	>1000	>1000	863
アスピリン	10	>1000	3.1
ジクロフェナク	0.035	0.041	0.008
ジピロン	350	>1000	52
イブプロフェン	2.4	5.7	0.24
インドメタシン	0.010	0.66	0.016
フェナセチン	>1000	>1000	102
カフェイン	>1000	>1000	>1000
サリドマイド	>1000	>1000	>1000

【０２４４】

ＣＯＸ－１、ＣＯＸ－２及びＣＯＸ－３を比較すると、ＣＯＸ－３はＮＳＡＩＤに対する感度がＣＯＸ－１に最も類似しているが、ＣＯＸ－１又はＣＯＸ－２より、ジクロフェナク及びイブプロフェンなどの多くの医薬に対し有意に感受性が高くそしてサリチル酸ナトリウムのような他の医薬に対して感受性が低いことを示している。ＣＯＸ－３は、ＮＳＡＩＤによる阻害に対する感受性が高いので血液脳関門を横切る低濃度のＮＳＡＩＤによってＣＮＳにおいて優先的に阻害することができる。さらにＣＯＸ－３の鎮痛／解熱医薬とＮＳＡＩＤに対する格差のある感受性は、ＣＯＸ－３に対して高度に選択性のインヒビターを製造できることを示唆している。

【０２４５】

ヒトＣＯＸ－３は、主に約５．２ＫｂのｍＲＮＡとして発現され発現の組織特異的パターンを有している（図１０、パネルＣ）。この約５．２ＫｂのｍＲＮＡは、二者択一的にポリアデニル化されたヒトＣＯＸ－１のメッセージであり、これは先に報告され、その３’領域が部分的に確認されたものである（５）。したがって、イントロン－１が保持されるとｍＲＮＡがポリアデニル化されるサイトに影響するようである。この知見は、そのｍＲＮＡの３’非翻訳領域が、ＣＯＸ－３及びおそらくはＰＣＯＸ－１ａを発現する際に機能的役割を演じることを示唆している。イントロンの保持と二者択一的なポリアデニル化を調和させる機能の意義と機構は解明する必要がある。また、前記約５．２ＫｂのｍＲＮＡが制御可能であることが分かったので（３６）生理的刺激やシグナルの伝達に応答して制御されるということは興味深いことである。実際に、ＣＯＸ－３ｍＲＮＡのヒトやイヌの大脳皮質におけるレベルは比較的低い。このことは、例えば推定侵害受容ニューロンの

副集団中のＣＯＸ－１免疫反応性タンパク質について示されている細胞型特異的発現が原因である（２３）。しかし、ヒトのＣＯＸ－３は、公表されている配列のいくつかがイントロン－１と１個のヌクレオチドだけ異なっているのでアウトオブフレーム（out of frame）であるから、さらなる試験が必要である。これらは真性の多型性又は配列決定のエラーを形成するかもしれない。あるいはイントロン－１はヒトの場合、アウトオブフレームであり、機能性ＣＯＸ－３タンパク質を産生するためシフトするリボソームフレームなどの他の機構を必要とするかもしれない。

【０２４６】

この試験によって、ヒト大動脈中の約６５ＫＤａのＣＯＸ－３タンパク質、及び約５３ＫＤａのＰＣＯＸ－１ａタンパク質を含む新規なＣＯＸ－１変異体が確認された。これらのタンパク質は、ＣＯＸ－３抗ペプチドポリクローナル抗体及びＣＯＸ－１モノクローナル抗体の両者によって検出され、ＣＯＸ－１の約２５％レベルで存在しているようである。前記６５ＫＤａのタンパク質は、ＣＯＸ－１と同程度にグリコシル化されている場合に予想されるより小さいが、これは、ヒポグリコシル化又は他の差異が６５ＫＤａのタンパク質とＣＯＸ－１の間に存在していることを示唆している。前記５３ＫＤａのタンパク質は二量体（doublet）として存在していて、ＰＣＯＸ－１ａタンパク質の一次配列で予想されるより大きい分子量のタンパク質である。このことは、昆虫細胞内で発現されるイヌＰＣＯＸ－１ａと同様に、上記ヒトタンパク質はグリコシル化されうること及び異なるグリコシル化状態が存在して、観察された前記ダブレットを生じることを示唆している。また５０ＫＤａのタンパク質がＣＯＸ－１モノクローナル抗体によってのみ検出され、ＰＣＯＸ－１ｂの候補物質である。これはＣＯＸ－１の約１５％のレベルで存在しているようである。

【０２４７】

ＰＣＯＸ－１ａは、ＣＯＸ－３タンパク質の、エキソン５～８に相当する触媒ドメイン中の２１９個のアミノ酸が欠失していることを除いてＣＯＸ－３と同一である。ＰＣＯＸ－１ａは、アラキドン酸からプロスタグランジン類をつくることができないことによって分かるように、検出可能なシクロオキシゲナーゼ活性を欠いている。その欠失部分は、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２に形成されている構造ヘリックスＨＥ、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｈ５及びＨ６の一部を含んでいる。これらヘリックスのうちのＨ２とＨ５は、コアペルオキシダーゼの触媒部位の一部を形成している。ＰＣＯＸ－１は、Ｈ２とＨ５を欠いているので検出可能なペルオキシタダーゼ活性を欠いている可能性が大きい。このように、ＰＣＯＸ－１は、ペルオキシダーゼ活性を欠いている植物のＰＩＯＸ酵素類及びギューマノミセス・グラミニス（Gaeumannomyces graminis）のリノレエートジオールシンターゼ（ＬＤＳ）に類似している。しかしこれらの酵素は、機構がシクロオキシゲナーゼのオキシゲナーゼ活性に類似している脂肪酸オキシゲナーゼの活性を有し、ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２に見られるのと類似の配列を含有している。図１４は、ＰＩＯＸ類とＬＤＳを有するＣＯＸ－１とＣＯＸ－２の共通配列由来のＨ２、Ｈ５及びＨ８（Tyr^{385}と近似ヒスチジンを含有するヘリックス）のアラインメントを示す。

【０２４８】

シクロオキシゲナーゼのペルオキシダーゼ活性は、シクロオキシゲナーゼの反応に使用されるタンパク質ラジカルをつくる必要があるが、連続するペルオキシダーゼ活性は連続するシクロオキシゲナーゼ活性に対して不可欠なものではない。シクロオキシゲナーゼは、一回のペルオキシダーゼ反応によって活性化された後、基質の酵素化反応を触媒し続けることができる。というのはチロシンラジカルが各酵素化反応の後、再生されるからである。また、シクロオキシゲナーゼに対するこの活性化機構はＰＩＯＸ類とＬＤＳによって働くようである。シクロオキシゲナーゼの活性部位のチロシンと近似ヒスチジンはＰＩＯＸ類とＬＤＳ内に保存されている。これらの酵素は、シクロオキシゲナーゼと類似していることから、ＣＯＸに類似した反応機構をもっていると考えられる。したがって、これらの酵素類は、検出できないけれどもシクロオキシゲナーゼ類を活性化してオキシゲナーゼ活性を生成するのに十分な低レベルのペルオキシダーゼ活性を保持しているようである。

【０２４９】
ＣＯＸ－１とＣＯＸ－２にシクロオキシゲナーゼ活性を得るためにペルオキシダーゼ活性部位の代謝回転（turnover）は一回しか必要でないので、ＰＣＯＸ－１タンパク質中に、それらタンパク質を活性化するのに十分な残留ペルオキシダーゼ活性がある。しかし、我々はＰＣＯＸ－１ａがシクロオキシゲナーゼ活性をもっていないことを示した。ＰＩＯＸ類との比較に基づいて、ＰＣＯＸ－１タンパク質が、ＰＩＯＸ類の脂質オキシゲナーゼ活性に類似の脂質オキシゲナーゼ活性を保持している可能性がある。ＰＣＯＸ－１タンパク質の基質が何であるか確認するにはさらなる試験が必要である。
【０２５０】
ＰＣＯＸ－１ａとＰＣＯＸ－１ｂは、その触媒ドメインのかような大きい部分を欠いているので、触媒として活性にするため他のタンパク質と結合させることを必要とすることがある。我々は、シクロオキシゲナーゼ類がヌクレオビンディン（nucleo bindin）に結合することを以前に発見している（Ｂａｌｌｉｆの１９９６年の論文）。ヌクレオビンディンもＰＣＯＸ－１タンパク質に結合する候補物質である。さらに、培養内皮細胞のフィラメント状構造体中に、一形態のＣＯＸ－１が、プロスタサイクリンシンターゼとともに共存していることが述べられている。このフィラメント状形態のＣＯＸ－１はシクロオキシゲナーゼ活性を全くもっておらず、ＰＣＯＸ－１タンパク質の候補物質である。
【０２５１】
ヒトＣＯＸ－３は、主として約５．２ＫｂのｍＲＮＡとして発現されて組織特異的パターンの発現を行う（図１０、パネルＣ）。この約５．２ＫｂのｍＲＮＡは二者択一的にポリアデニル化されるヒトＣＯＸ－１メッセージであり、その３’領域の特徴が一部分明らかになっている。本明細書に提供されるデータは、イントロン－１の保持がｍＲＮＡがポリアデニル化される部位に影響することを示している。イントロンの保持と二者択一的なポリアデニル化が整合される機能の意義及び機構は解明する必要がある。上記約５．２ＫｂのｍＲＮＡは、生理的刺激とシグナルの伝達に応答して、誘発されることが分かっておりかつ制御されることは興味深い。実際に、ヒトとイヌの大脳皮質内のＣＯＸ－３ｍＲＮＡのレベルは比較的低く、これは細胞型変異的発現は特定のシグナルを必要とするためであろう。しかしヒトのＣＯＸ－３は、公表されている配列のいくつかが、イントロン－１内の一つのヌクレオチドが異なっていてアウトオブフレームなのでさらに実験する必要がある。これらは真性の多型性又は配列決定のエラーを構成している。あるいは、イントロン－１は、ヒトではアウトオブフレームであって、機能性ＣＯＸ－３タンパク質を産生するためシフトするリボソームフレームなどの他の機構を必要とするかもしれない。イントロン－１の保持が二者択一的ポリアデニル化と同等に連携しているという知見は、前記ｍＲＮＡの３’非翻訳領域が発現する際の機能的役割を演じることができることを示唆している。
【０２５２】
本発明の多数の実施態様を説明してきたが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく各種の変形を行うことができると解される。
【図面の簡単な説明】
【０２５３】
【図１Ａ－１】既知のＣＯＸ－２配列のアラインメントを示す。「Ｇｕｉｎｅａ」はモルモットを意味し、「Ｒａｉｎｂｏｗ」はニジマスを意味しそして「Ｂｒｏｏｋ」はカワマスを意味する。アステリスク（＊）が、ジスルフィド結合に関与していることが分かっているシステイン残基の上に配置され、そして配列中のギャップはダッシュ（－）で表してある。これらのアラインメント中のすべての番号付けは羊の配列を基準として使用している。ドメインを示してある。
【図１Ａ－２】既知のＣＯＸ－２配列のアラインメントを示す。「Ｇｕｉｎｅａ」はモルモットを意味し、「Ｒａｉｎｂｏｗ」はニジマスを意味しそして「Ｂｒｏｏｋ」はカワマスを意味する。アステリスク（＊）が、ジスルフィド結合に関与していることが分かっているシステイン残基の上に配置され、そして配列中のギャップはダッシュ（－）で表して

ある。これらのアラインメント中のすべての番号付けは羊の配列を基準として使用している。ドメインを示してある。
【図１Ａ－３】既知のＣＯＸ－２配列のアラインメントを示す。「Ｇｕｉｎｅａ」はモルモットを意味し、「Ｒａｉｎｂｏｗ」はニジマスを意味しそして「Ｂｒｏｏｋ」はカワマスを意味する。アステリスク（＊）が、ジスルフィド結合に関与していることが分かっているシステイン残基の上に配置され、そして配列中のギャップはダッシュ（－）で表してある。これらのアラインメント中のすべての番号付けは羊の配列を基準として使用している。ドメインを示してある。
【図１Ｂ－１】既知のＣＯＸ－１アミノ酸配列のアラインメントであって、ヒトのもの（配列番号：２２）、羊のもの（配列番号：２３）、イヌのもの（配列番号：２４）、ウシのもの（配列番号：２５）、ウマのもの（配列番号：２６）、ウサギのもの（配列番号：２７）、モルモットのもの（配列番号：２８）、マウスのもの（配列番号：２９）、ラットのもの（配列番号：３０）、ミンクのもの（配列番号：３０）、ニワトリのもの（配列番号：３１）、ニジマスのもの（配列番号：３２）及びカワマスのもの（配列番号：３３）を示す。アステリスク、ダッシュ及びアラインメントは図１Ａに示したのと同じである。ドメインを示してある。
【図１Ｂ－２】既知のＣＯＸ－１アミノ酸配列のアラインメントであって、ヒトのもの（配列番号：２２）、羊のもの（配列番号：２３）、イヌのもの（配列番号：２４）、ウシのもの（配列番号：２５）、ウマのもの（配列番号：２６）、ウサギのもの（配列番号：２７）、モルモットのもの（配列番号：２８）、マウスのもの（配列番号：２９）、ラットのもの（配列番号：３０）、ミンクのもの（配列番号：３０）、ニワトリのもの（配列番号：３１）、ニジマスのもの（配列番号：３２）及びカワマスのもの（配列番号：３３）を示す。アステリスク、ダッシュ及びアラインメントは図１Ａに示したのと同じである。ドメインを示してある。
【図１Ｂ－３】既知のＣＯＸ－１アミノ酸配列のアラインメントであって、ヒトのもの（配列番号：２２）、羊のもの（配列番号：２３）、イヌのもの（配列番号：２４）、ウシのもの（配列番号：２５）、ウマのもの（配列番号：２６）、ウサギのもの（配列番号：２７）、モルモットのもの（配列番号：２８）、マウスのもの（配列番号：２９）、ラットのもの（配列番号：３０）、ミンクのもの（配列番号：３０）、ニワトリのもの（配列番号：３１）、ニジマスのもの（配列番号：３２）及びカワマスのもの（配列番号：３３）を示す。アステリスク、ダッシュ及びアラインメントは図１Ａに示したのと同じである。ドメインを示してある。
【図１Ｃ－１】二つの種のサンゴであるゲルセミア・フルチコサ（Gersemia fruticosa）（配列番号：３６）とプレクサウラ・ホモマラ（Plexaura homomalla）（配列番号：３７）の配列を含有するＣＯＸ－１（配列番号：３４）とＣＯＸ－２（配列番号：３５）の共通アミノ酸配列のアラインメントを示す。ピリオドは、明確な共通性（５０以上％の共通性）がみられない残基を示す。
【図１Ｃ－２】二つの種のサンゴであるゲルセミア・フルチコサ（Gersemia fruticosa）（配列番号：３６）とプレクサウラ・ホモマラ（Plexaura homomalla）（配列番号：３７）の配列を含有するＣＯＸ－１（配列番号：３４）とＣＯＸ－２（配列番号：３５）の共通アミノ酸配列のアラインメントを示す。ピリオドは、明確な共通性（５０以上％の共通性）がみられない残基を示す。
【図２－１】米（コメ）（配列番号：３８）、エイ．サリアナ（A. Thaliana）（配列番号：３９）及びタバコ（配列番号：４０）から単離された３種の植物のＰＩＯＸを含有する共通シクロオキシゲナーゼ配列の一次配列アラインメントを示す。シクロオキシゲナーゼに対するドメインを示してある。ピリオドは共通性のない残基（その残基の共通性が既知配列の５０％未満である）を示す。シグナルペプチド、ＥＧＦ様ドメイン、結合ドメイン及び二量体化ドメインはＰＩＯＸ配列には存在しない。さらに、遠位ヒスチジンはＰＩＯＸ配列には存在しない。「ＲＥＨＮ」配列はシクロオキシゲナーゼのペルオキシダーゼ触媒ドメインの一部であり、すべての既知シクロオキシゲナーゼ類に絶対保存されている

９個のアミノ酸のストレッチを表す。この配列はＰＩＯＸ中に縮重されている。活性部位チロシンと近位ヒスチジンヘムリガンドはすべてのＰＩＯＸ配列中に保存されている。

【図２－２】米（コメ）（配列番号：３８）、エイ．サリアナ（A. Thaliana）（配列番号：３９）及びタバコ（配列番号：４０）から単離された３種の植物のＰＩＯＸを含有する共通シクロオキシゲナーゼ配列の一次配列アラインメントを示す。シクロオキシゲナーゼに対するドメインを示してある。ピリオドは共通性のない残基（その残基の共通性が既知配列の５０％未満である）を示す。シグナルペプチド、ＥＧＦ様ドメイン、結合ドメイン及び二量体化ドメインはＰＩＯＸ配列には存在しない。さらに、遠位ヒスチジンはＰＩＯＸ配列には存在しない。「ＲＥＨＮ」配列はシクロオキシゲナーゼのペルオキシダーゼ触媒ドメインの一部であり、すべての既知シクロオキシゲナーゼ類に絶対保存されている９個のアミノ酸のストレッチを表す。この配列はＰＩＯＸ中に縮重されている。活性部位チロシンと近位ヒスチジンヘムリガンドはすべてのＰＩＯＸ配列中に保存されている。

【図３Ａ】ＣＯＸとＰＩＯＸに保存されているＴｙｒ３８５－アミノ酸残基の重要な役割を示すＣＯＸ酵素によるアラキドン酸の活性化を示す。ステップ１：アラキドン酸イオンが、広げられたＬ字形でＣＯＸ活性部位に配位され、そのカルボキシル基がＡＲＧ１２０とＴＹＲ３５５によって配位されている。炭素１３からプローＳ水素がＴｙｒ３８５によって引き抜かれてアラキドニルラジカルが形成される。ステップ２：チャネルの口を通じてＣＯＸ活性部位中に拡散したと推測される酸素が、エンドペルオキシルのシクロペンタンリングを形成するアラキドニル残基を攻撃する。ステップ３：前記エンドペルオキシルラジカルは、炭素１５における第二の酸素分子によって攻撃される。ステップ４：Ｔｙｒ３８５はその水素を供与してＰＧＧ２を形成してＴｙｒ３８５にそのラジカルを再生する。

【図３Ｂ】ＣＯＸとＰＩＯＸに保存されているＴｙｒ３８５－アミノ酸残基の重要な役割を示すＣＯＸ酵素によるアラキドン酸の活性化を示す。ステップ１：アラキドン酸イオンが、広げられたＬ字形でＣＯＸ活性部位に配位され、そのカルボキシル基がＡＲＧ１２０とＴＹＲ３５５によって配位されている。炭素１３からプローＳ水素がＴｙｒ３８５によって引き抜かれてアラキドニルラジカルが形成される。ステップ２：チャネルの口を通じてＣＯＸ活性部位中に拡散したと推測される酸素が、エンドペルオキシルのシクロペンタンリングを形成するアラキドニル残基を攻撃する。ステップ３：前記エンドペルオキシルラジカルは、炭素１５における第二の酸素分子によって攻撃される。ステップ４：Ｔｙｒ３８５はその水素を供与してＰＧＧ２を形成してＴｙｒ３８５にそのラジカルを再生する。

【図３Ｃ】ＣＯＸとＰＩＯＸに保存されているＴｙｒ３８５－アミノ酸残基の重要な役割を示すＣＯＸ酵素によるアラキドン酸の活性化を示す。ステップ１：アラキドン酸イオンが、広げられたＬ字形でＣＯＸ活性部位に配位され、そのカルボキシル基がＡＲＧ１２０とＴＹＲ３５５によって配位されている。炭素１３からプローＳ水素がＴｙｒ３８５によって引き抜かれてアラキドニルラジカルが形成される。ステップ２：チャネルの口を通じてＣＯＸ活性部位中に拡散したと推測される酸素が、エンドペルオキシルのシクロペンタンリングを形成するアラキドニル残基を攻撃する。ステップ３：前記エンドペルオキシルラジカルは、炭素１５における第二の酸素分子によって攻撃される。ステップ４：Ｔｙｒ３８５はその水素を供与してＰＧＧ２を形成してＴｙｒ３８５にそのラジカルを再生する。

【図３Ｄ】ＣＯＸとＰＩＯＸに保存されているＴｙｒ３８５－アミノ酸残基の重要な役割を示すＣＯＸ酵素によるアラキドン酸の活性化を示す。ステップ１：アラキドン酸イオンが、広げられたＬ字形でＣＯＸ活性部位に配位され、そのカルボキシル基がＡＲＧ１２０とＴＹＲ３５５によって配位されている。炭素１３からプローＳ水素がＴｙｒ３８５によって引き抜かれてアラキドニルラジカルが形成される。ステップ２：チャネルの口を通じてＣＯＸ活性部位中に拡散したと推測される酸素が、エンドペルオキシルのシクロペンタンリングを形成するアラキドニル残基を攻撃する。ステップ３：前記エンドペルオキシルラジカルは、炭素１５における第二の酸素分子によって攻撃される。ステップ４：Ｔｙｒ

３８５はその水素を供与してＰＧＧ２を形成してＴｙｒ３８５にそのラジカルを再生する。

【図４】ＣＯＸ類とＰＩＯＸ類に保存されているＴｙｒ^{385}－アミノ酸残基の活性化に関与する触媒回路の線図を示す。内因性の酸化体がペルオキシダーゼ活性部位に結合して、第二鉄ヘムを酸化しフェリル－オキソ－ポルフィリンラジカルを生成させ、次に、このラジカルが水素をＴｙｒ^{385}から引き抜いてチロシルラジカルを生成させる。前記ペルオキシダーゼを活性化するのに、その酸素における酸化事象が１回しか必要でない。というのはＴｙｒ^{385}ラジカルが各シクロオキシゲナーゼ回路で再生されるからである。

【図５Ａ】パネルＡは、イヌ組織におけるＣＯＸ－１の分布のノーザンブロット分析結果を示す。矢印は脳組織における追加のＣＯＸ－１転写産物を示す。Ｓ＝胃；ｄ＝十二指腸；ｉ＝回腸；ｊ＝空腸；ｃ＝結腸；ｌ＝肝臓；ｓ＝脾臓；ｂ＝脳；ｌｕ＝肺臓；ｏ＝卵巣；ｋ＝腎臓；ｍ＝ＭＤＫＣ細胞（ｉｎｄ）。上記ブロットを、^{32}Ｐ標識化イヌＣＯＸ－１ＤＮＡ（比活性８．８×１０^{8}ｃｐｍ／μｇ，６×１０^{6}ｃｐｍ／ｍｌ）とハイブリッドを形成させた。ハイブリッド形成を行った後、約６５℃にて、２×ＳＳＣ／０．５％ＳＤＳ内で、３～４回変えて使って３ｈｒ洗浄を行った。

【図５Ｂ】パネルＢは、ニワトリ組織中のＣＯＸ－１の分布のノーザンブロット分析の結果を示す。矢印は脳組織内の追加のＣＯＸ－１転写産物を示す。ｖ＝精のう；ｐ＝膵臓；ｔ＝精巣；ｈ＝心臓；ｌｙ＝滑液リンパ。このブロットは図５パネルＡで述べたようにしてハイブリッドを形成させた。

【図５Ｃ】パネルＣは、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）のＲＮＡのノーザンブロット分析の結果を示す。

【図６Ａ－１】イヌのＣＯＸ－１、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）の核酸配列アラインメント並びに共通配列を示す。

【図６Ａ－２】イヌのＣＯＸ－１、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）の核酸配列アラインメント並びに共通配列を示す。

【図６Ａ－３】イヌのＣＯＸ－１、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）の核酸配列アラインメント並びに共通配列を示す。

【図６Ａ－４】イヌのＣＯＸ－１、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）の核酸配列アラインメント並びに共通配列を示す。

【図６Ａ－５】イヌのＣＯＸ－１、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）の核酸配列アラインメント並びに共通配列を示す。

【図６Ｂ】共通配列と比較して示したイヌのＣＯＸ－１、ＰＣＯＸ－１（すなわちＣＯＸ－３）及びＰＣＯＸ－１Δ６５７（すなわちＰＣＯＸ１ａ）の予想アミノ酸配列を示す。

【図７】イヌ（配列番号：４３）と比較して示したヒト（配列番号：４１）及びマウス（配列番号：４２）のイントロン－１の構造の分析結果を示す。ヒトとマウスの配列は、イヌの配列と大きさが類似しているイントロン－１を含有し、保持されると、タンパク質をコードするシグナルペプチド中へのインフレーム挿入体を提供する。

【図８】イヌのＣＯＸ－１の第一イントロン内から設計した^{32}Ｐ末端標識化オリゴ（５０量体）でプローブしたイヌ全ＲＮＡ（２５μｇ）のノーザンブロット分析結果を示す。そのブロットはＴｍ－４の最終ストリンジェンシー（final stringency）（Ｔｍ＝計算溶融温度）で洗浄した。Ｓ＝胃；Ｄ＝十二指腸；Ｉ＝回腸；Ｊ＝空腸；Ｃ＝結腸；Ｌ＝肝臓；Ｓｐ＝脾臓；Ｂｍ＝脳（大脳皮質）－ｍＲＮＡ（２．５μｇ）；Ｂｔ＝脳（大脳皮質）－全ＲＮＡ；Ｌｕ＝肺臓；Ｏ＝卵巣；Ｋ＝腎臓；Ｃｌ＝ＣＣｌ３４細胞。パネルＡ、Ｂ及びＣで検出された５．２ＫｂのｍＲＮＡは図８に矢印で示してある。

【図９Ａ－１】ＣＯＸ－３のヌクレオチドコーディング配列を示す。

【図９Ａ－２】ＣＯＸ－３のヌクレオチドコーディング配列を示す。

【図９Ｂ】ＣＯＸ－３ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図９Ｃ－１】ＣＯＸ－３転写産物のｃＤＮＡ配列を示す。

【図９Ｃ－２】ＣＯＸ－３転写産物のｃＤＮＡ配列を示す。

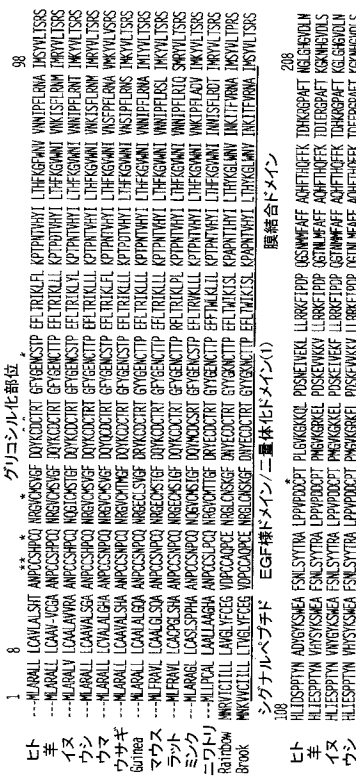
【図９Ｄ】ＰＣＯＸ－１ａのヌクレオチドコーディング配列を示す。

【図９Ｅ】ＰＣＯＸ－１ａポリペプチドのアミノ酸配列を示す。
【図９Ｆ－１】ＰＣＯＸ－１ｂ転写産物のｃＤＮＡ配列を示す。
【図９Ｆ－２】ＰＣＯＸ－１ｂ転写産物のｃＤＮＡ配列を示す。
【図１０Ａ】パネルＡは、１）^{32}Ｐ標識化イヌＣＯＸ－１ｃＤＮＡフラグメント、２）^{32}Ｐ標識化したイヌのイントロン－１に対してアンチセンスのオリゴヌクレオチド（ＣＣＩ）でプローブしたイヌ大脳皮質ポリ（Ａ）ＲＮＡ（レーン１、５．０μｇ；レーン２、２．５μｇ）のノーザンブロット分析結果とＲＴ－ＰＣＲを示す。
【図１０Ｂ】パネルＢは、イヌの大脳皮質内のＰＣＯＸ－１のＰＣＲ増幅を示す。レーン１：イントロン－１を含有するＰＣＯＸ－１ａ（上方バンド）及びイントロン－１を欠いたＰＣＯＸ－１ｂ（下方バンド）に対応する増幅産物の臭化エチジウム染色ゲル；レーン２：イントロン－１に対しアンチセンスのオリゴヌクレオチド（ＣＣＩ）でプローブした増幅産物のサザーンブロット；及びレーン３：ＣＯＸ－３ｃＤＮＡをプローブとして使用したサザーンプロット。
【図１０Ｃ】パネルＣは、イントロン－１に対してアンチセンスの、^{32}Ｐで標識したヒトオリゴヌクレオチド（ＨＣＩ）でプローブしたヒトのＭｕｌｔｉｐｌｅ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　ｂｌｏｔ（ＭＴＮＲ）を示す。約５．２ＫｂのｍＲＮＡが、ブロット１－３（成人組織）及び４（胎児組織）に検出された。略語：Ａｍ＝扁桃；Ｂ＝脳；Ｃ＝小脳；Ｃｃ＝大脳皮質；Ｆｌ＝前頭葉；Ｈ＝海馬；Ｈｔ＝心臓；Ｋ＝腎臓；Ｌ＝肺臓；Ｌｉ＝肝臓；Ｍ＝骨格筋；Ｍｄ＝髄；Ｎ＝尾状核；Ｏｐ＝後頭極；Ｐ＝胎盤；Ｐｎ＝膵臓；Ｐｕ＝被殻；Ｓｃ＝脊髄；Ｔ＝視床；Ｔｌ＝側頭葉；Ｘ＝脳梁。
【図１１】ＣＯＸ－１と比較したＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１のドメインの模式図である。略語：Ｓ＝シグナルペプチド；ｄ１＝二量体化ドメイン／ＥＧＦ様ドメイン１；ｄ２＝二量体化ドメイン２；ｍ＝膜結合ドメイン；ｃ＝触媒ドメイン；ｉ＝イントロン－１がコードしている９０ｂｐの配列。
【図１２】ツニカマイシンで処理した（＋）及び処理していない（－）昆虫細胞中でのＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ及びＣＯＸ－１の発現を示すウェスタンブロットを示す（頂部パネル）。矢印はツニカマイシンで処理された細胞内には存在していないグリコシル化された形態のＣＯＸ－１を示す。ヒトとマウスのＣＯＸ－１イントロン－１配列に対するポリクローナル抗体を使ってＣＯＸ－３とＰＣＯＸ－１ａのブロットをプローブし、一方、羊のＣＯＸ－１に対するモノクローナル抗体（Cayman）を使ってマウスＣＯＸ－１のブロットをプローブした。ＣＯＸ－３、ＰＣＯＸ－１ａ及びＣＯＸ－１を発現する昆虫細胞中のＣＯＸ活性。細胞はツニカマイシンで処理したもの（＋）と処理したものがある（底部パネル）。
【図１３Ａ】昆虫細胞におけるＣＯＸ－１（◆）、ＣＯＸ－２（●）及びＣＯＸ－３（■）の活性に対するアセトアミノフェン（パネルＡとパネルＢ）、フェナセチン（パネルＣ）及びジピロン（パネルＤ）の作用を示す医薬阻害試験の線グラフを示す。ＣＯＸ活性は、外因性アラキドン酸［５μＭ（Ａ）又は３０μＭ（Ｂ、Ｃ、Ｄ）］に１０分間曝露した後のPGF_2の生成によって測定した。データは平均値±ＳＥＭ（ｎ＝６～９）で表してある。
【図１３Ｂ】昆虫細胞におけるＣＯＸ－１（◆）、ＣＯＸ－２（●）及びＣＯＸ－３（■）の活性に対するアセトアミノフェン（パネルＡとパネルＢ）、フェナセチン（パネルＣ）及びジピロン（パネルＤ）の作用を示す医薬阻害試験の線グラフを示す。ＣＯＸ活性は、外因性アラキドン酸［５μＭ（Ａ）又は３０μＭ（Ｂ、Ｃ、Ｄ）］に１０分間曝露した後のPGF_2の生成によって測定した。データは平均値±ＳＥＭ（ｎ＝６～９）で表してある。
【図１３Ｃ】昆虫細胞におけるＣＯＸ－１（◆）、ＣＯＸ－２（●）及びＣＯＸ－３（■）の活性に対するアセトアミノフェン（パネルＡとパネルＢ）、フェナセチン（パネルＣ）及びジピロン（パネルＤ）の作用を示す医薬阻害試験の線グラフを示す。ＣＯＸ活性は、外因性アラキドン酸［５μＭ（Ａ）又は３０μＭ（Ｂ、Ｃ、Ｄ）］に１０分間曝露した後のPGF_2の生成によって測定した。データは平均値±ＳＥＭ（ｎ＝６～９）で表して

ある。
【図１３Ｄ】昆虫細胞におけるＣＯＸ－１（◆）、ＣＯＸ－２（●）及びＣＯＸ－３（■）の活性に対するアセトアミノフェン（パネルＡとパネルＢ）、フェナセチン（パネルＣ）及びジピロン（パネルＤ）の作用を示す医薬阻害試験の線グラフを示す。ＣＯＸ活性は、外因性アラキドン酸［５μＭ（Ａ）又は３０μＭ（Ｂ、Ｃ、Ｄ）］に１０分間曝露した後のＰＧＦ$_2$の生成によって測定した。データは平均値±ＳＥＭ（ｎ＝６～９）で表してある。
【図１４】植物のＰＩＯＸとＬＤＳを有する構造ヘリックスＨ２、Ｈ５及びＨ８に相当するＣＯＸ－１、ＣＯＸ－２及びサンゴＣＯＸ（coral COX）の共通配列のアラインメントを示す。上記ＰＩＯＸは、オリザ・サチバ（Oryza Sativa）（米）、アラビドプシス・サリアナ（Arabidopsisthaliana）（シロイヌナズナ）及びニコチアナ・タバクム（Nicotiana tabacum）（タバコ）由来のものである。ゲウマンノマイセス・グラミニス（Gaeumannomycesgraminis）リノレエートジオールシンターゼ（ＬＤＳ）も整列化した。共通配列は、＞５０％相同の場合は小文字で示し、１００％相同の場合は大文字で示してある。ピリオドは＜５０％相同であることを示す。
【図１５Ａ】パネルＡは、ＣＯＸ－１抗体及びＣＯＸ－３抗体でプローブしたヒト大動脈溶解産物のウェスタンブロットを示す。このブロット（レーン３～８、各レーンの全大動脈溶解産物は２０μｇ）は、表示されているように一次抗体、二次抗体又はブロックされた抗体でプローブした。黒の太い水平矢印は６５ＫＤａのタンパク質を示し、白の太い矢印は５３ＫＤａのタンパク質を示し、そして斜め上方に向いた黒矢印は５０ＫＤａのタンパク質を示す。シングルアステリスク（＊）は未グリコシル化イヌＣＯＸ－３を示しそしてダブルアステリスク（＊＊）は未グリコシル化イヌＰＣＯＸ－１ａを示す。
【図１５Ｂ】パネルＢは、６５、５３及び５０ＫＤａのタンパク質のデンシトメーターによる分析結果を示す。パーセントリラティブデンシトメトリックユニット（percent relative densitometric unit）（％ｒｄｕ）を、ブロックされていない一次抗体由来のシグナルと比較することによって計算した。上記５０ＫＤａのタンパク質はブロックされていないＣＯＸ－３ＰＡｂ又はブロックされたＣＯＸ－３ＰＡｂによって検出されていない（ｎ／ｄ）。
【図１６Ａ】ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）のｃＤＮＡを比較した結果を示し、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）の共通配列であるｈＣＯＸ－３（ｃｓ）共通配列（配列番号：１３）を提示する。
【図１６Ｂ】ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）のｃＤＮＡを比較した結果を示し、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）の共通配列であるｈＣＯＸ－３（ｃｓ）共通配列（配列番号：１３）を提示する。
【図１６Ｃ】ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）のｃＤＮＡを比較した結果を示し、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）の共通配列であるｈＣＯＸ－３（ｃｓ）共通配列（配列番号：１３）を提示する。
【図１６Ｄ】ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）のｃＤＮＡを比較した結果を示し、ｈＣＯＸ－３（ａｆ）、ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）及びｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）の共通配列であるｈＣＯＸ－３（ｃｓ）共通配列（配列番号：１３）を提示する。
【図１７Ａ】ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）転写産物のｃＤＮＡ配列（配列番号：１０）を示す。
【図１７Ｂ】ｈＣＯＸ－３（ｃｃ）転写産物のｃＤＮＡ配列（配列番号：１０）を示す。
【図１８Ａ】ｈＣＯＸ－３（ａｆ）転写産物のｃＤＮＡ配列（配列番号：１１）を示す。
【図１８Ｂ】ｈＣＯＸ－３（ａｆ）転写産物のｃＤＮＡ配列（配列番号：１１）を示す。
【図１９Ａ】ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）転写産物のｃＤＮＡ配列（配列番号：１２）を示す。

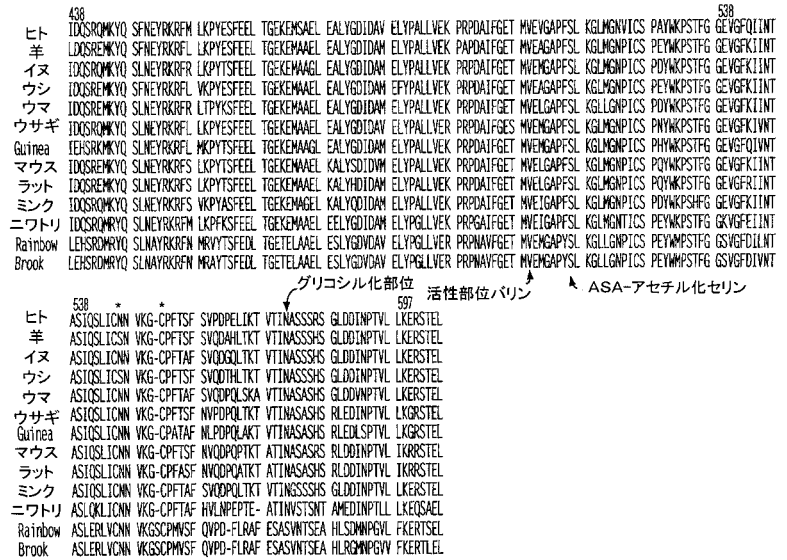
【図１９Ｂ】ｈＣＯＸ－３（ｄｅｌ１０）転写産物のｃＤＮＡ配列（配列番号：１２）を示す。
【図２０Ａ】ｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（配列番号：１３）の異なる読取り枠に対する共通アミノ酸配列（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）を示す。
【図２０Ｂ】ｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（配列番号：１３）の異なる読取り枠に対する共通アミノ酸配列（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）を示す。
【図２０Ｃ】ｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（配列番号：１３）の異なる読取り枠に対する共通アミノ酸配列（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）を示す。
【図２０Ｄ】ｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（配列番号：１３）の異なる読取り枠に対する共通アミノ酸配列（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）を示す。
【図２０Ｅ】ｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（配列番号：１３）の異なる読取り枠に対する共通アミノ酸配列（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）を示す。
【図２０Ｆ】ｈＣＯＸ－３（ｃｓ）（配列番号：１３）の異なる読取り枠に対する共通アミノ酸配列（配列番号：１４、配列番号：１５及び配列番号：１６）を示す。　なお、上記各種図面の同じ参照記号は同じ要素を示す。

【図１Ａ－１】

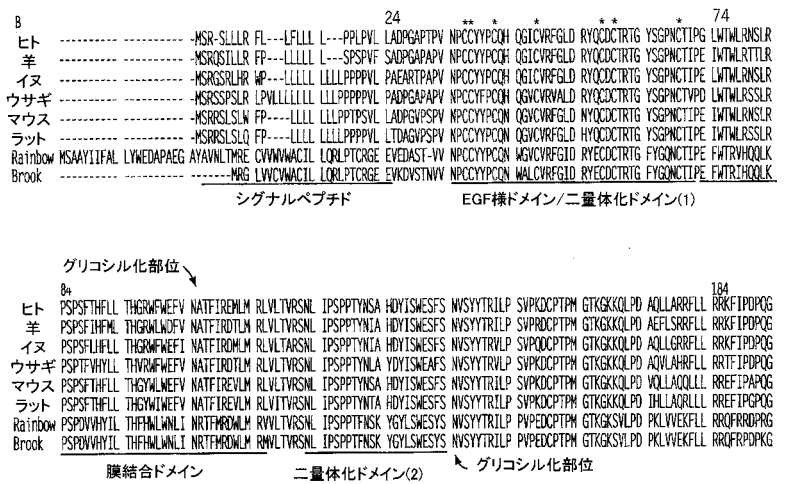


【図１Ａ－２】

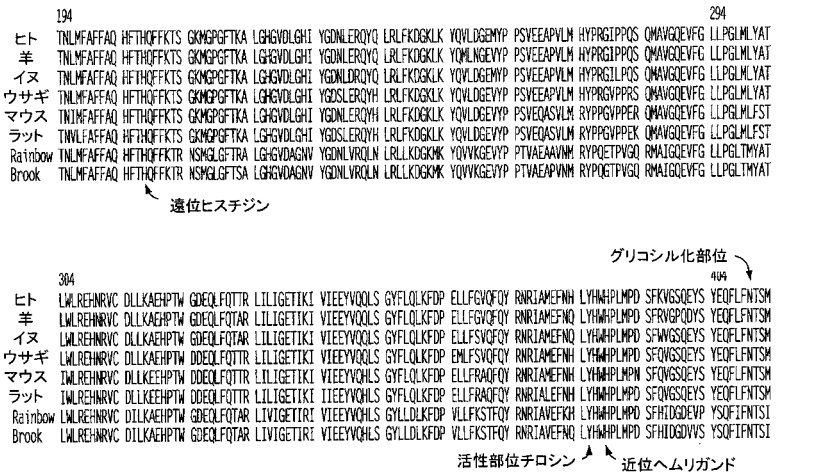
【図１Ａ－３】



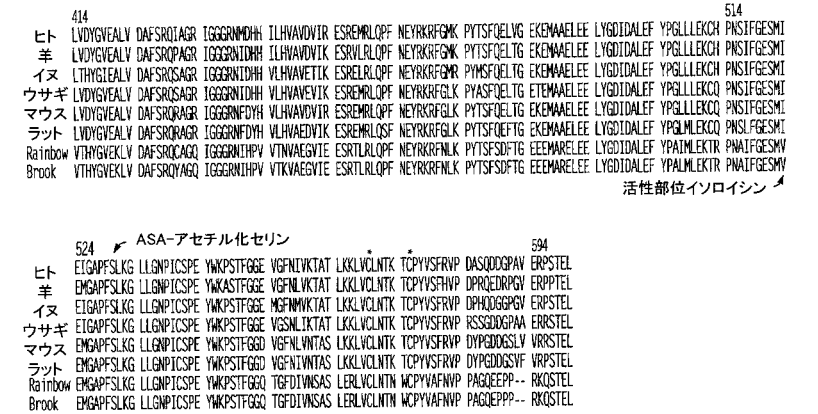
【図１Ｂ－１】



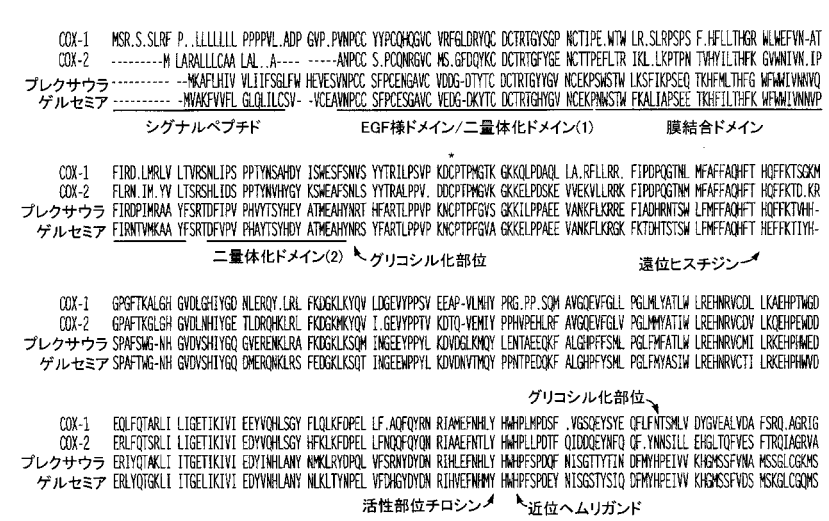
【図１Ｂ－２】



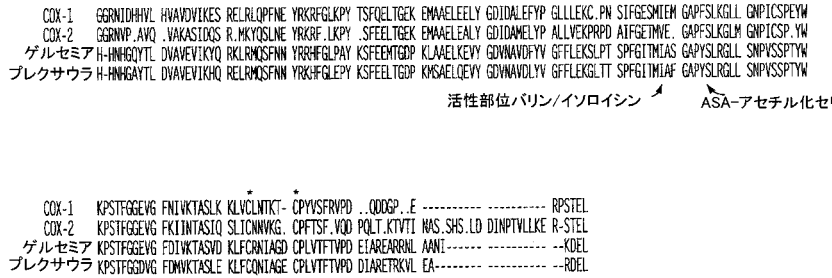
【図１Ｂ－３】



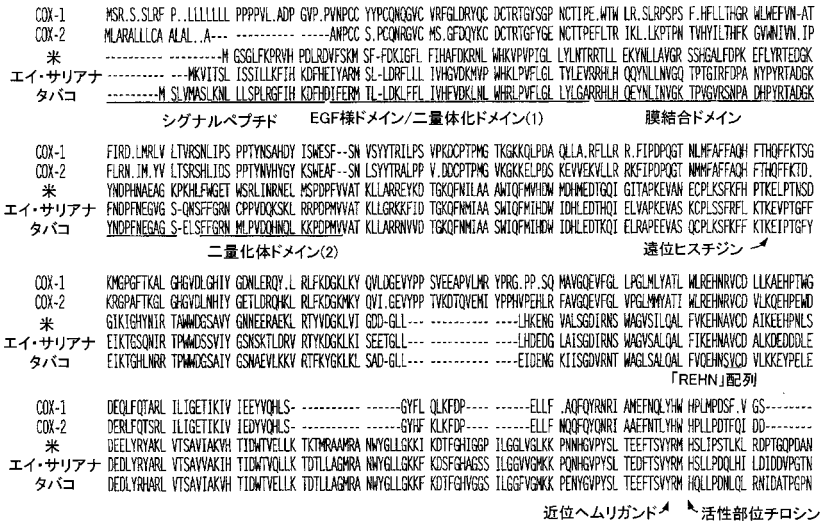
【図１Ｃ－１】



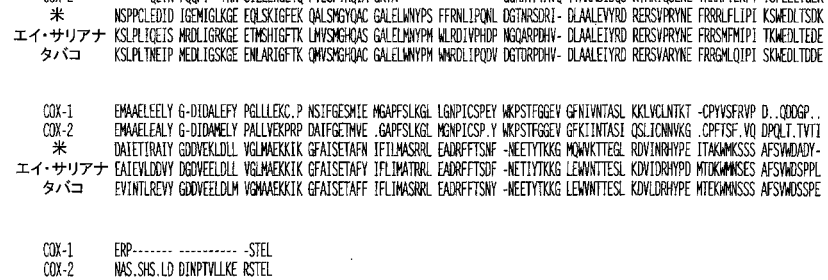
【図１Ｃ－２】



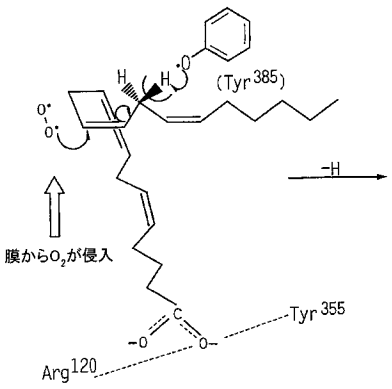
【図２－１】



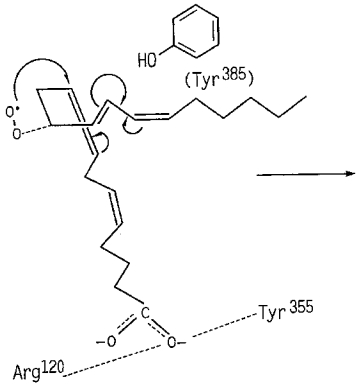
【図２－２】



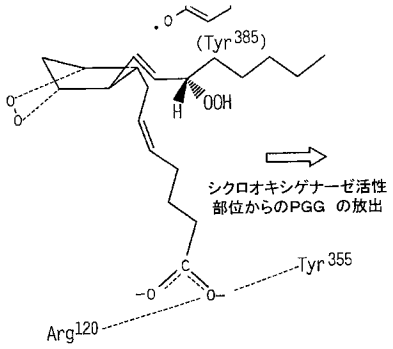
【図３Ａ】



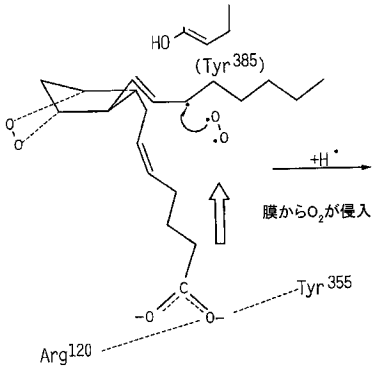
【図３Ｂ】



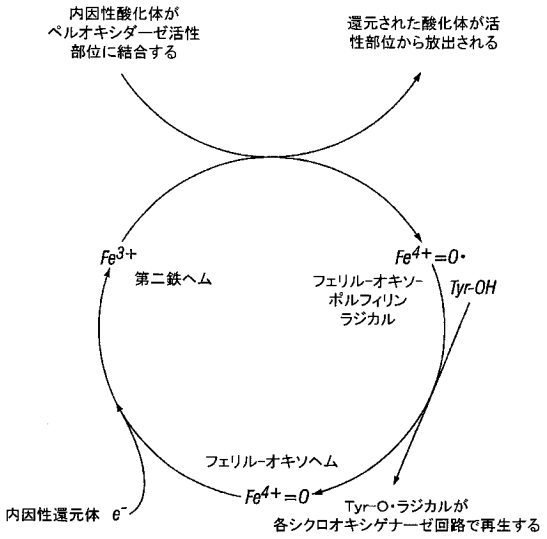
【図３Ｃ】



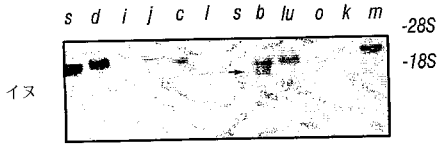
【図３Ｄ】



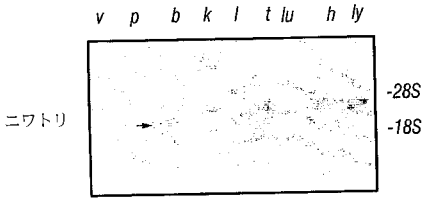
【図４】



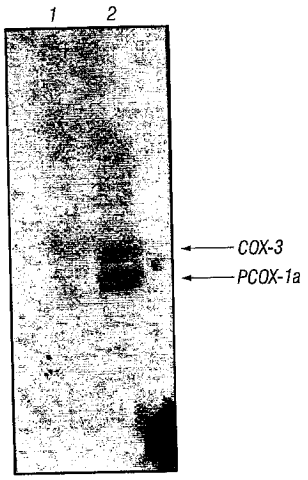
【図５Ａ】



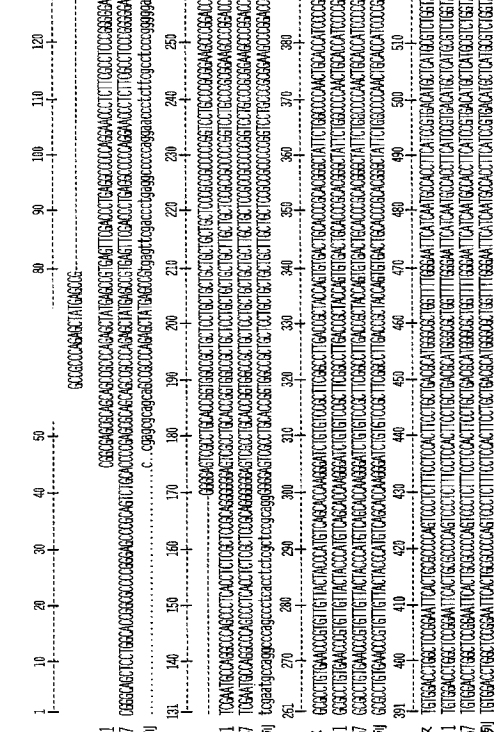
【図５Ｂ】



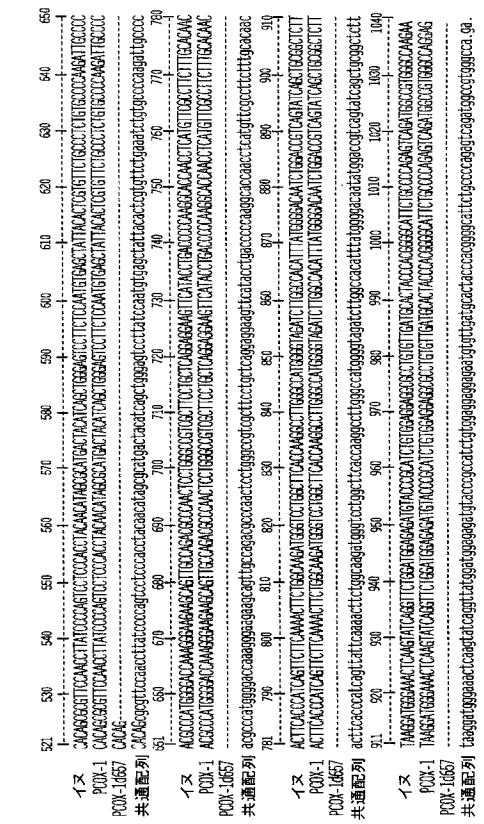
【図５Ｃ】



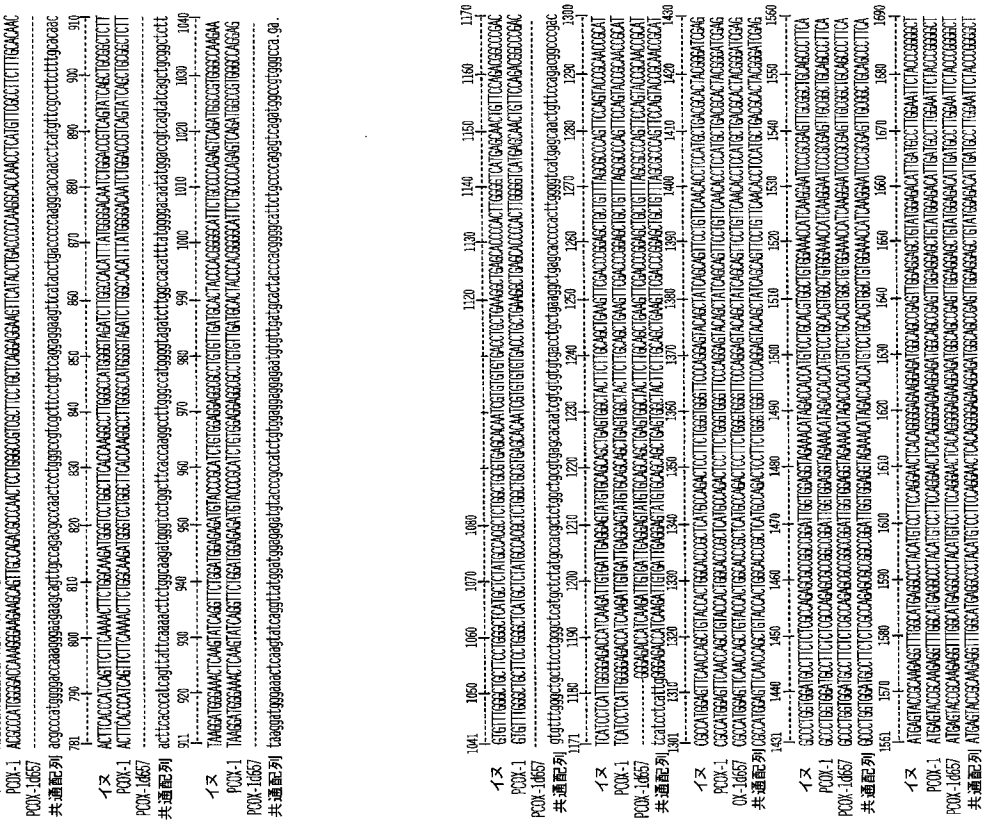
【図６Ａ－１】



【図６Ａ－２】

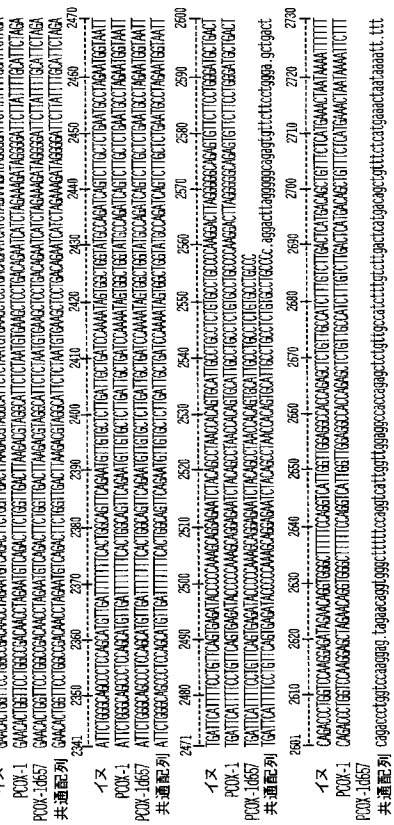


【図６Ａ－３】

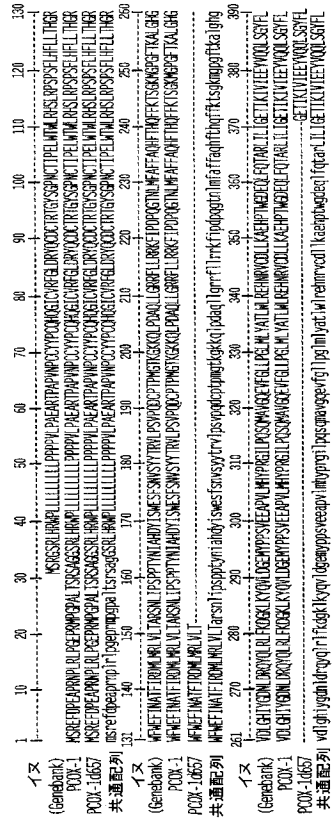


【図６Ａ－４】

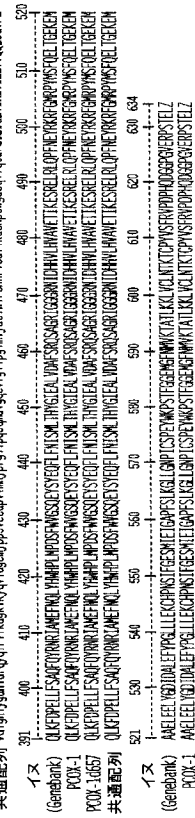
【図６Ａ－５】



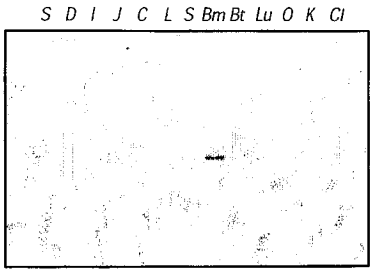
【図６Ｂ】



【図７】



【図８】



【図９Ａ－１】

配列番号：1

```
   1 ATGAGCGGTG AGTTCGACCC TGAGGCCCCC AGGAACCCTC TTCGCCTCCC GGGGCAGCCT  60
  61 CGAATGCCAG GCCCAGCCCT CACCTCTCGC TCCGCAGGGG GGAGTCGCCT GCACCGGTGG 120
 121 CCGCTGCTCC TGCTGCTGCT GCTGCTCGTC CCGCCGCCCC CGGTCCTGCC CGCGGAAGCC 180
 181 CGGACCCCGG CGCCTGTGAA CCCGTGTTGT TACTACCCAT GTCAGCACCA AGGGATCTGT 240
 241 GTCCGCTTCG GCCTTGACCG CTACCAGTGT GACTGCACCC GCACGGGCTA TTCTGGCCCC 300
 301 AACTGCACCA TCCCCGAGCT GTGGACCTGG CTCCGGAATT CACTGCGCCC CAGTCCCTCT 360
 361 TTCCTCCACT TCCTGCTGAC GCATGGGCGC TGGTTTTGGG AATTCATCAA TGCCACCTTC 420
 421 ATCCGTGACA TGCTCATGCG TCTGGTACTC ACAGCGGCGT AGCTGGGAGT CCTTCTCCAA TGTGAGCTAT 540
 481 CCCACCTACA ACATAGGGCA TGACTACATC AGCTGGGAGT CCTTCTCCAA GACCAAAGGG 600
 541 TACACTCGTG TTCTGCCCTC TGTGCCCCAA GATTGCCCCA CGCCCATGGG GACCAAAGGG 600
 601 AAGAAGCAGT TGCCAGACGC CCAACTCCTG GGCCGTCGCT TCCTGCTCAG GAGGAAGTTC 660
 661 ATACCTGACC CCCAAGGCAC CAACCTCATG TTCGCCTTCT TTGCACAACA CTTCACCCAT 720
 721 CAGTTCTTCA AAACTTCTGG CAAGATGGGT CCTGGCTTCA CCAAGGCCTT GGGCCATGGG 780
 781 GTAGATCTTG GCCACATTTA TGGGACAAAT CTGGACCGTC AGTATCAGCT GCGGCTCTTT 840
 841 AAGGATGGGA AACTCAAGTA TGAGGAGAGA TGTACCCGCC ATCTGTGGAG 900
 901 GAGGCGCCTG TGTTGATGCA CTACCCACGG GGCATTCTGC CCCAGAGTCA GATGGCCGTG 960
 961 GGCCAGGAGG TGTTTGGGCT GCTTCCTGGG CTCATGCTCT ATGCCACGCT CTGGCTGCGT 1020
```

【図９Ａ－２】

```
1021 GAGCACAATC GTGTGTGTGA CCTGCTGAAG GCTGAGCACC CCACTTGGGG TGATGAGCAA 1080
1081 CTCTTCCAGA CGGCCCGACT CATCCTCATT GGGGAGACCA TCAAGATTGT GATTGAGGAG 1140
1141 TATGTGCAGC AGCTGAGTGG CTACTTCTTG CAGCTGAAGT TCGACCCGGA GCTGCTGTTT 1200
1201 AGGGCCCAGT TCCAGTACCG CAACCGCATC GCCATGGAGT TCAACCAGCT GTACCACTGG 1260
1261 CACCCGCTCA TGCCAGACTC CTTCTGGGTG GGTTCCCAGG AGTACAGCTA TGAGCAGTTC 1320
1321 CTGTTCAACA CCTCCATGCT GACGGCACTAC GGGATCGAGG CCCTGGTGGA TGCCTTCTCT 1380
1381 CGCCAGAGCG CCGGCCGGAT TGGTGGAGGT AGAAACATAG ACCACCATGT CCTGCACGTG 1440
1441 GCTGTGGAAA CCATCAAGGA ATCCCGCGAG TTGCGGCTGC AGCCCTTCAA TGAGTACCGC 1500
1501 AAGAGGTTTG GCATGAGGCC CTACATGTCC TTCCAGGGAA TCACAGGGGA GAAGGAGATG 1560
1561 GCAGCCGAGT TGGAGGAGCT GTATGGAGAC ATTGATGCCT TGGAATTCTA CCCGGGGCTT 1620
1621 CTTCTGGAGA AGTGCCATCC AAACTCCATC TTTGGAGAGA GTATGATAGA AATTGGGGCT 1680
1681 CCCTTCTCCC TTAAGGGCCT CCTAGGGAAT CCCATCTGTT CTCCAGAGTA CTGGAAGCCA 1740
1741 AGCACAATTG GTGGTGAGAT GGGCTTCAAT ATGGTCAAGA CAGCCACACT GAAGAAGCTG 1800
1801 GTCTGCCTTA ACACCAAGAC TTGTCCTTCC GTGTGCCTGA CCCCCACCAG 1860
1861 GATGGCGGGC CTGGTGTGCA GCGGCCGTCC ACAGAGCTCT GA                    1902
```

【図９Ｂ】

配列番号：2

```
   1 MSREFDPEAP RNPLRLPGEP RMPGPALTSR SAGGSRLHRW PLLLLLLLLL PPPPVLPAEA  60
  61 RTPAPVNPCC YYPCQHQGIC VRFGLDRYQC DCTRTGYSGP NCTIPELWTW LRNSLRPSPS 120
 121 FLHFLLTHGR WFWEFINAIF IRDMLNRLVL TARSNLIPSP PTYNIAHDYI SWESFSNWSY 180
 181 YTRVLPSVPQ DCPTPMGTKG KKQLPDAQLL GRRFLLLRKF IPDPQGTNLM FAFFAQHFTH 240
 241 QFFKTSGKMG PGFTKALGHG VDLGHIYGDN LDRQYQLRLF KDGKLKYQVL DGEMYPPSVE 300
 301 EAPVLMHYPR GILPQSQMAV GQEVFGLLPG LMLYATLWLR EHNRVCDLLK AEHPTWGDEQ 360
 361 LFQTARLILI GETIKIVIEE YVQQLSGYFL QLKFDPELLF SAQFQYRNRI AMEFNQLYHW 420
 421 HPLMPDSFWV GSQETYSYEQF LFNTSMLTHY GIEALVDAFS RQSAGRIGGG RNIDHHIVLH 480
 481 AVETIKESRE LRLQPFNEYR KRFGMRPYMS FQELTGEKEM AAELEELYGD IDALEFYPGL 540
 541 LLEKCHPNSI FGESMIEIGA PFSLKGLLGN PICSPEYWKP STFGGEMGFN MVKTATLKKL 600
 601 VCLNTKTCPY VSFRVPDPHQ DGGPGVQRPS TELZ                            634
```

【図９Ｃ－１】

配列番号：3

```
1 CGGCGAGCGC AGCAGCCGCC CAGAGCTATG  AGCCGTGAGT TCGACCCTGA GGCCCCCAGG 60
61 AACCCTCTTC GCCTCCCGGG GGAGCCTCGA  ATGCCAGGCC CAGCCCTCAC CTCTCGCTCC 120
121 GCAGGGGGGA GTCGCCTGCA CCGGTGGCCG  CTGCTCCTGC TGCTGCTGCT GCTGCTCCCG 180
181 CCGCCCCCGG TCCTGCCCGC GGAAGCCCGG  ACCCCGGCGC CTGTGAACCC GTGTTGTTAC 240
241 TACCCATGTC AGCACCAAGG GATCTGTGTC  CGCTTCGGCC TTGACCGCTA CCAGTGTGAC 300
301 TGCACCCGCA CGGGCTATTC TGGCCCCAAC  TGCACCATCC CCGAGCTGTG GACCTGGCTC 360
361 CGGAATTCAC TGCGCCCCAG TCCCTCTTTC  CTCCACTTCC TGCTGACGCA TGGGCGCTGG 420
421 TTTTGGGAAT TCATCAATGC CACCTTCATC  CGTGACATGC TCATGCGTCT GGTACTCACA 480
481 GCGCGTTCCA ACCTTATCCC CAGTCCTCCC  ACCTACAACA TAGCGCATGA CTACATCAGC 540
541 TGGGAGTCCT TCTCCAATGT GAGCTATTAC  ACTCGTGTTC TGCCCTCTGT GCCCCAAGAT 600
601 TGCCCCACGC CCATGGGGAC CAAAGGGAAG  AAGCAGTTGC CAGACGCCCA ACTCCTGGGC 660
661 CGTCGCTTCC TGCTCAGGAG GAAGTTCATA  CCTGACCCCC AAGGCACCAA CCTCATGTTC 720
721 GCCTTCTTTG CACAACACTT CACCCATCAG  TTCTTCAAAA CTTCTGGCAA GATGGGTCCT 780
781 GGCTTCACCA AGGCCTTGGG CCATGGGGTA  GATCTTGGCC ACATTTATGG GGACAATCTG 840
841 GACCGTCAGT ATCAGCTGCG GCTCTTTAAG  GATGGGAAAC TCAAGTATCA GGTTCTGGAT 900
901 GGAGAGATGT ACCCGCCATC TGTGGAGGAG  GCGCCTGTGT TGATGCACTA CCCACGGGGC 960
961 ATTCTGCCCC AGAGTCAGAT GGCCGTGGGC  CAGGAGGTGT TTGGGCTGCT TCCTGGGCTC 1020
1021 ATGCTCTATG CCACGCTCTG GCTGCGTGAG  CACAATCGTG TGTGTGACCT GCTGAAGGCT 1080
1081 GAGCACCCCA CTTGGGGTGA TGAGCAACTC  TTCCAGACGG CCCGACTCAT CCTCATTGGG 1140
1141 GAGACCATCA AGATTGTGAT TGAGGAGTAT  GTGCAGCAGC TGAGTGGCTA CTTCTTGCAG 1200
1201 CTGAAGTTCG ACCCGGAGCT GCTGTTTAGC  GCCCAGTTCC AGTACCGCAA CCGCATCGCC 1260
1261 ATGGAGTTCA ACCAGCTGTA CCACTGGCAC  CCGCTCATGC CAGACTCCTT CTGGGTGGGT 1320
1321 TCCCAGGAGT ACAGCTATGA GCAGTTCCTG  TTCAACACCT CCATGCTGAC GCACTACGGG 1380
```

【図９Ｃ－２】

```
1381 ATCGAGGCCC TGGTGGATGC CTTCTCTCGC  CAGAGCGCCG GCCGGATTGG TGGAGGTAGA 1440
1441 AACATAGACC ACCATGTCCT GCACGTGGCT  GTGGAAACCA TCAAGGAATC CCGCGAGTTG 1500
1501 CGGCTGCAGC CCTTCAATGA GTACCGCAAG  AGGTTTGGCA TGAGGCCCTA CATGTCCTTC 1560
1561 CAGGAACTCA CAGGGGAGAA GGAGATGGCA  GCCGAGTTGG AGGAGCTGTA TGGAGACATT 1620
1621 GATGCCTTGG AATTCTACCC GGGGCTTCTT  CTGGAGAAGT GCCATCCAAA CTCCATCTTT 1680
1681 GGAGAGAGTA TGATAGAAAT TGGGGCTCCC  TTCTCCCTTA AGGGCCTCCT AGGGAATCCC 1740
1741 ATCTGTTCTC CAGAGTACTG GAAGCCAAGC  ACATTCGGTG GTGAGATGGG CTTCAATATG 1800
1801 GTCAAGACAG CCACACTGAA GAAGCTGGTC  TGCCTTAACA CCAAGACTTG TCCCTATGTT 1860
1861 TCCTTCCGTG TGCCTGACCC CCACCAGGAT  GGCGGGCCTG GTGTGCAGCG GCCGTCCACA 1920
1921 GAGCTCTGAG GGGGCAGAGC AGCAGCATTC  TGGAGGGTGG ACTTGTCATC CCAGAATGCT 1980
1981 GAGGCTGGGG TTAATAATCC CAAATGTTGG  GTCTTTGGTT TGCCTCAAGA ATATCAAGGT 2040
2041 CAACATTTAG AACTTTGTGT CTCTCACCCA  TTATCTGGAA TATCATGGTC TTGTTTGTTA 2100
2101 TTCTAGAATG CTGAATTCCT GGTTGACCAT  CTAGAATGGA TGGAGTGATG CTTCTTTGGC 2160
2161 AAGCCAGAAC ACTGGTTCCT GGCCGACAAC  CTAGAATGTC AGACTTCTGG TTGACTTAAG 2220
2221 ACGTAGGCAT TCTCTAATGT GAAGCTCCTG  ACAGAATCAT CTAGAAAGAT AGGGGATTCT 2280
2281 TATTTTGCAT TCTAGAATTC TGGGCAGCCC  TCCAGCATGT TGATTTTTTT CACTGGCAGT 2340
2341 TCAGAATGTT GTGCTCTTGA TTGCTGATCC  AAAATAGTGG CTGGTATGCC AGATCAGTCT 2400
2401 TGCTCTGAAT GCCTAGAATG GTAATTTGAT  TCATTTTCCT GTTCAGTGAG ATACCCCCAA 2460
2461 AGCAGGAGAA TCTACAGCCT AACCAGAGTG  CATTGCCTGC CTCTGTGCCT GCCCCGAGGA 2520
2521 CTTAGGGGGC AGAGTGTTCT TCCTGGGACG  CTGACTCAGA CCCTGGTCCA AGGAGCTAGA 2580
2581 ACAGGTGGGC TTTTTCCAGG TCATTGGTTG  GAGGCCACCA GAGCTCTGTT GCCATCTTTG 2640
2641 TCTTGACTCA TGACAGCTGT TTCTCATGAA  ACTAATAAAA TTCTTTTTCC AAAAAAAAAA 2700
2701 AAAAAA                                                          2706
```

【図９Ｄ】

配列番号：4

```
1 ATGAGCCGTG AGTTCGACCC TGAGGCCCCC  AGGAACCCTC TTCGCCTCCC GGGGGAGCCT 60
61 CGAATGCCAG GCCCAGCCCT CACCTCTCGC  TCCGCAGGGG GGAGTCGCCT GCACCGGTGG 120
121 CCGCTGCTCC TGCTGCTGCT GCTGCTGCTC  CCGCCGCCCC CGGTCCTGCC CGCGGAAGCC 180
181 CGGACCCCGG CGCCTGTGAA CCCGTGTTGT  TACTACCCAT GTCAGCACCA AGGGATCTGT 240
241 GTCCGCTTCG GCCTTGACCG CTACCAGTGT  GACTGCACCC GCACGGGCTA TTCTGGCCCC 300
301 AACTGCACCA TCCCCGAGCT GTGGACCTGG  CTCCGGAATT CACTGCGCCC CAGTCCCTCT 360
361 TTCCTCCACT TCCTGCTGAC GCATGGGCGC  TGGTTTTGGG AATTCATCAA TGCCACCTTC 420
421 ATCCGTGACA TGCTCATGCG TCTGGTACTC  ACAGGGGAGA CCATCAAGAT TGTGATTGAG 480
481 GAGTATGTGC AGCAGCTGAG TGGCTACTTC  TTGCAGCTGA AGTTCGACCC GGAGCTGCTG 540
541 TTTAGCGCCC AGTTCCAGTA CCGCAACCGC  ATCGCCATGG AGTTCAACCA GCTGTACCAC 600
601 TGGCACCCGC TCATGCCAGA CTCCTTCTGG  GTGGGTTCCC AGGAGTACAG CTATGAGCAG 660
661 TTCCTGTTCA ACACCTCCAT GCTGACGCAC  TACGGGATCG AGGCCCTGGT GGATGCCTTC 720
721 TCTCGCCAGA GCGCCGGCGG GATTGGTGGA  GGTAGAAACA TAGACCACCA TGTCCTGCAC 780
781 GTGGCTGTGG AAACCATCAA GGAATCCCGC  GAGTTGCGGC TGCAGCCCTT CAATGAGTAC 840
841 CGCAAGAGGT TTGGCATGAG GCCCTACATG  TCCTTCCAGG AACTCACAGG GGAGAAGGAG 900
901 ATGGCAGCCG AGTTGGAGGA GCTGTATGGA  GACATTGATG CCTTGGAATT CTACCCGGGG 960
961 CTTCTTCTGG AGAAGTGCCA TCCAAACTCC  ATCTTTGGAG AGAGTATGAT AGAAATTGGG 1020
1021 GCTCCCTTCT CCCTTAAGGG CCTCCTAGGG  AATCCCATCT GTTCTCCAGA GTACTGGAAG 1080
1081 CCAAGCACAT TCGGTGGTGA GATGGGCTTC  AATATGGTCA AGACAGCCAC ACTGAAGAAG 1140
1141 CTGGTCTGCC TTAACACCAA GACTTGTCCC  TATGTTTCCT TCCGTGTGCC TGACCCCCAC 1200
1201 CAGGATGGCG GGCCTGGTGT GCAGCGGCCG  TCCACAGAGC TCTGA                1245
```

【図９Ｅ】

配列番号：5

```
1 MSREFDPEAP RNPLRLPGEP RMPGPALTSR  SAGGSRLHRW PLLLLLLLLL PPPPVLPAEA 60
61 RTPAPVNPCC YYPCQHQGIC VRFGLDRYQC  DCTRTGYSGP NCTIPELWTW LRNSLRPSPS 120
121 FLHFLLTHGR WFWEFINATF IRDMLMRLVL  TGETIKIVIE EYVQQLSGYF LQLKFDPELL 180
181 FSAQFQYRNR IAMEFNQLYH WHPLMPDSFW  VGSQEYSYEQ FLFNTSMLTH YGIEALVDAF 240
241 SRQSAGRIGG GRNIDHHVLH VAVETIKESR  ELRLQPFNEY RKRFGMRPYM SFQELTGEKE 300
301 MAAELEELYG DIDALEFYPG LLLEKCHPNS  IFGESMIEIG APFSLKGLLG NPICSPEYWK 360
361 PSTFGGEMGF NMVKTATLKK LVCLNTKTCP  YVSFRVPDPH QDGGPGVQRP STELZ      415
```

【図９Ｆ－１】

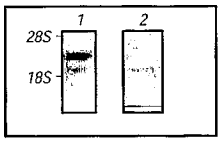
配列番号：６

```
  1 CGGGGAGCTC CTGGCACCGG CGCCCCGGGA GCCCGCAGTC TGCACCCCGA GCGCAGCAGC 60
 61 CGCCCAGAGC TATGAGCCGT GAGTTCGACC CTGAGGCCCC CAGGAACCCT CTTCGCCTCC 120
121 CGGGGGAGCC TCGAATGCCA GGCCCAGCCC TCACCTCTCG CTCCGCAGGG GGGAGTCGCC 180
181 TGCACCGGTG GCCGCTGCTC CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT CCCGCCGCCC CCGGTCCTGC 240
241 CCGCGGAAGC CCGGACCCCG GCGCCTGTGA ACCCGTGTTG TTACTACCCA TGTCAGCACC 300
301 AAGGGATCTG TGTCGGCTTC GGCCTTGACC GCTACCAGTG TGACTGCACC CGCACGGGCT 360
361 ATTCTGGCCC CAACTGCACC ATCCCCGAGC TGTGGACCTG GCTCCGGAAT TCACTGCGCC 420
421 CCAGTCCCTC TTTCCTCCAC TTCCTGCTGA CGCATGGGCG CTGGTTTTGG GAATTCATCA 480
481 ATGCCACCTT CATCCGTGAC ATGCTCATGC GTCTGGTACT CACAGGGAG ACCATCAAGA 540
541 TTGTGATTGA GGAGTATGTG CAGCAGCTGA GTGGCTACTT CTTGCAGCTG AAGTTCGACC 600
601 CGGAGCTGCT GTTTAGCGCC CAGTTCCAGT ACCGCAACCG CATCGCCATG GAGTTCAACC 660
661 AGCTGTACCA CTGGCACCCG CTCATGCCAG ACTCCTTCTG GGTGGGTTCC CAGGAGTACA 720
721 GCTATGAGCA GTTCCTGTTC AACACCTCCA TGCTGACGCA CTACGGGATC GAGGCCCTGG 780
781 TGGATGCCTT CTCCTGCCAG AGCGCCGGCC AGGTAGAAAC ATAGACCACC 840
841 ATGTCCTGCA CGTGGCTGTG GAAACCATCA AGGAATCCCG CGAGTTGCGG CTGCAGCCCT 900
901 TCAATGAGTA CCGCAAGAGG TTTGGCATGA GGCCCTACAT GTCCTTCCAG GAACTCACAG 960
961 GGGAGAAGGA GATGGCAGCC GAGTTGGAGG AGCTGTATGG AGCATTGAT GCCTTGGAAT 1020
```

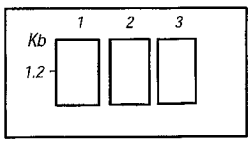
【図９Ｆ－２】

```
1021 TCTACCCGGG GCTTCTTCTG GAGAAGTGCC ATCCAAACTC CATCTTTGGA GAGAGTATGA 1080
1081 TAGAAATTGG GGCTCCCTTC TCCCTTAAGG GCCTCCTAGG GAATCCCATC TGTTCTCCAG 1140
1141 AGTACTGGAA GCCAAGCACA TTCCGGTGGTG AGATGGGCTT CAATATGGTC AAGACAGCCA 1200
1201 CACTGAAGAA GCTGGTCTGC CTTAACACCA AGACTTGTCC CTATGTTTCC TTCCGTGTGC 1260
1261 CTGACCCCCA CCAGGATGGC GGGCCTGGTG TGCAGCGGCC GTCCACAGAG CTCTGAGGGG 1320
1321 GCAGACGCAGC AGCATTCTGG AGGGTGGACT TGTCATCCCA GAATGCTGAG GCTGGGGTTA 1380
1381 ATAATCCCAA ATGTTGGGTC TTTGGTTTGC CTCAAGAATA TCAAGGTCAA CATTTAGAAC 1440
1441 TTTGTGTCTC TCACCCATTA TCTGGAATAT CATGGTCTTG TTTGTTATTC TAGAATGCTG 1500
1501 AATTCCTGGT TGACCATCTA GAATGGATGG AGTGATGCTT CTTTGGCAAG CCAGAACACT 1560
1561 GGTTCCTGGC CGACAACCTA GAATGTCAGA CTTCTGGTTG ACTTAAGACG TAGGCATTCT 1620
1621 CTAATGTGAA GCTCCTGACA GAATCATCTA GAAAGATAGG GGATTCTTAT TTTGCATTCT 1680
1681 AGAATTCTGG GCAGCCCTCC AGCATGTTGA GTATGCCAGA TGGCAGTTCA GAATGTTGTG 1740
1741 CTCTTGATTG CTGATCCAAA ATAGTGGCTG TTTTTTTCAC TCAGTCTTGC TCTGAATGCC 1800
1801 TAGAATGGTA ATTTGATTCA TTTTCCTGTT CAGTGAGATA CCCCCAAAGC AGGAGAATCT 1860
1861 ACAGCCTAAC CAGAGTGCAT TGCCTGCCTC TGTGCCTGCC C 1901
```

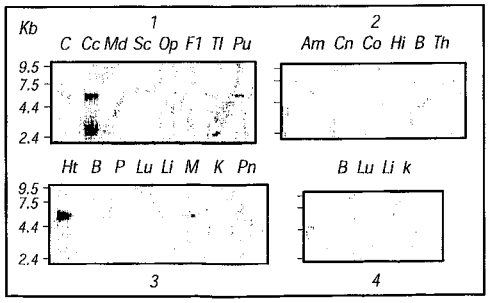
【図１０Ａ】



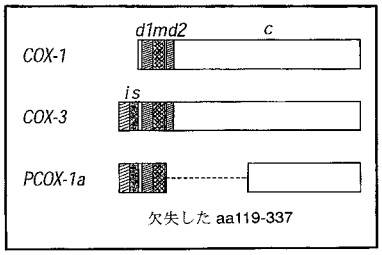
【図１０Ｂ】



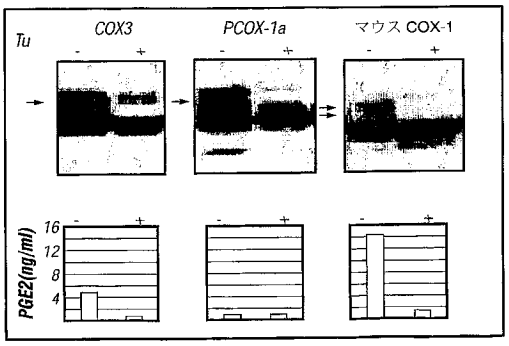
【図１０Ｃ】



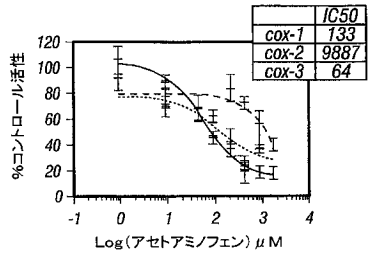
【図１１】



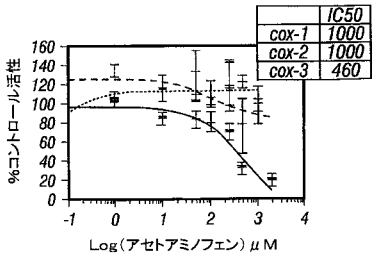
【図１２】



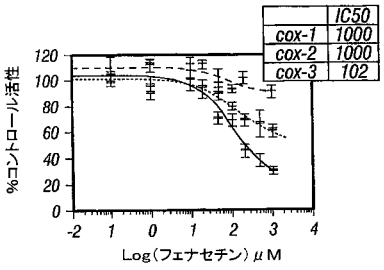
【図１３Ａ】



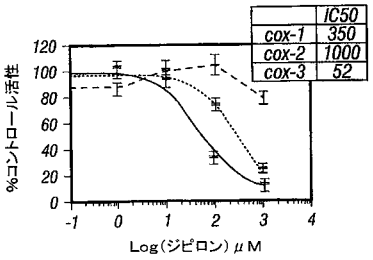
【図１３Ｂ】



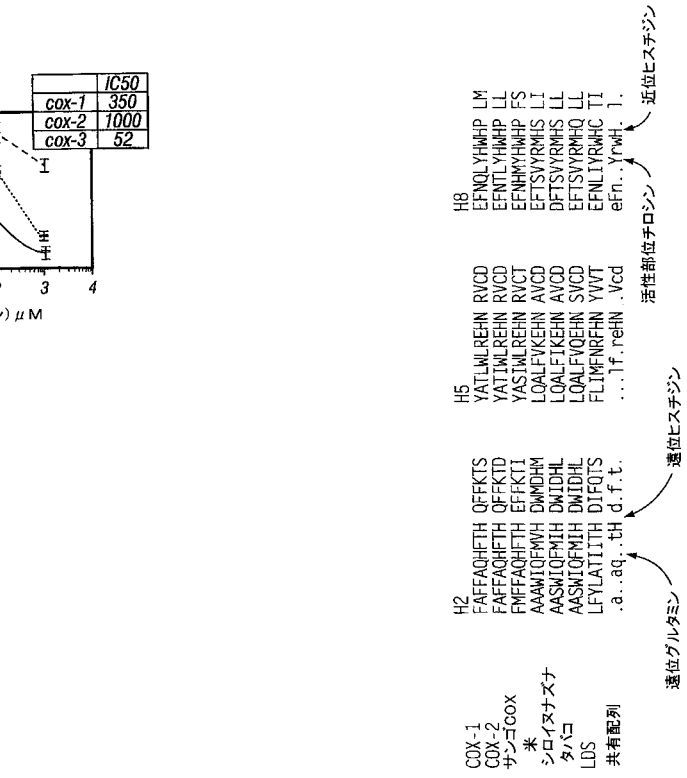
【図１３Ｃ】



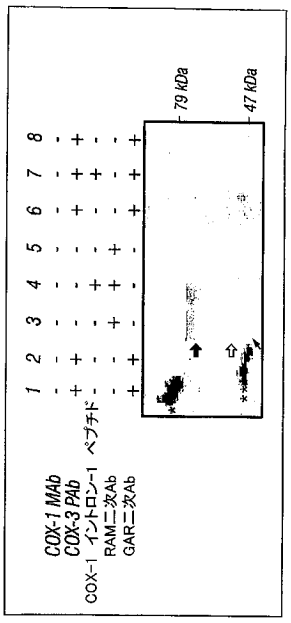
【図１３Ｄ】



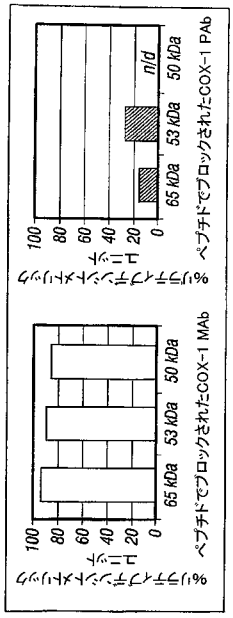
【図１４】



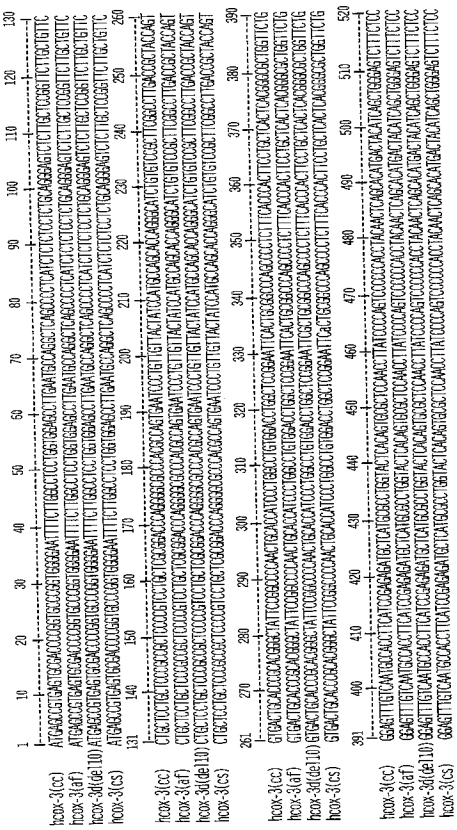
【図１５Ａ】



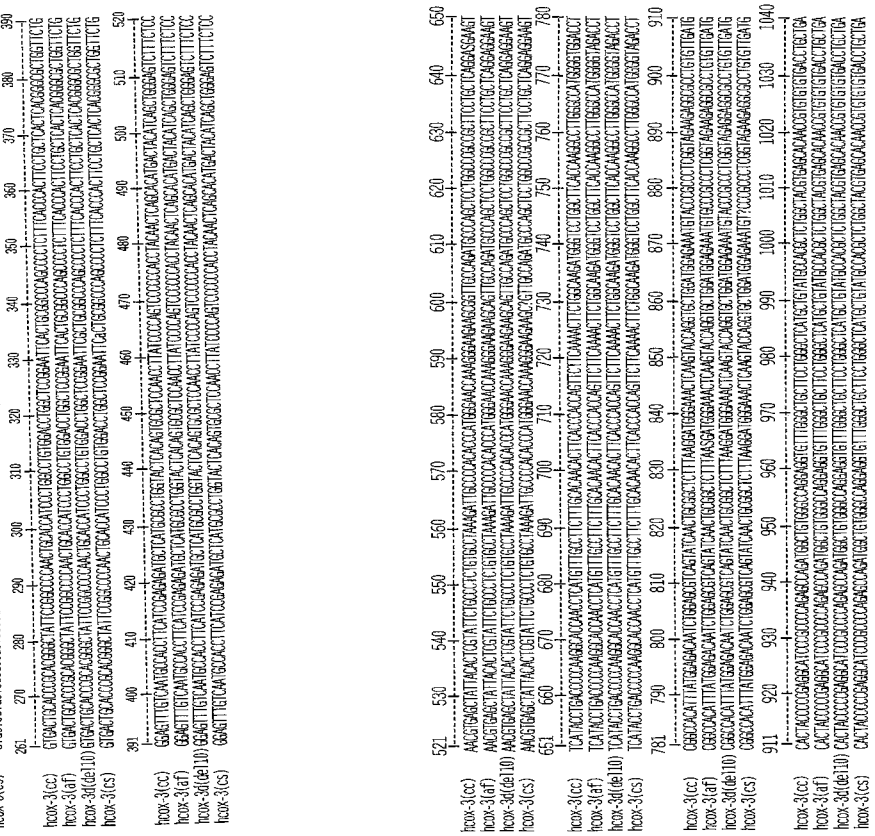
【図１５Ｂ】



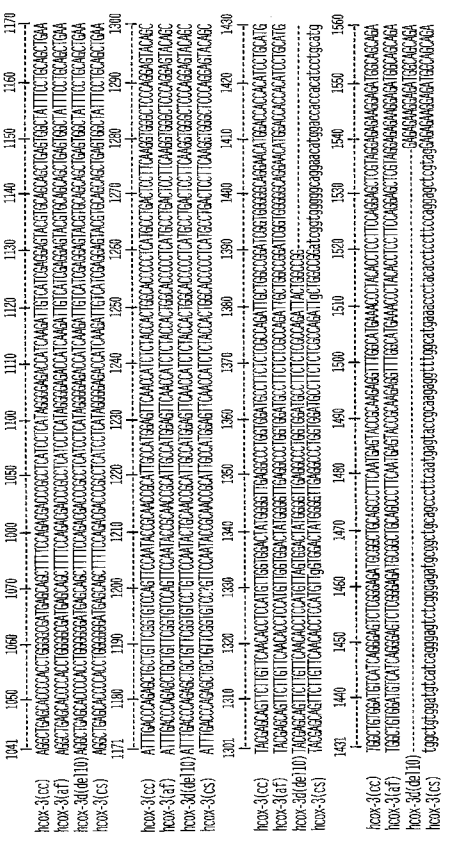
【図１６Ａ】



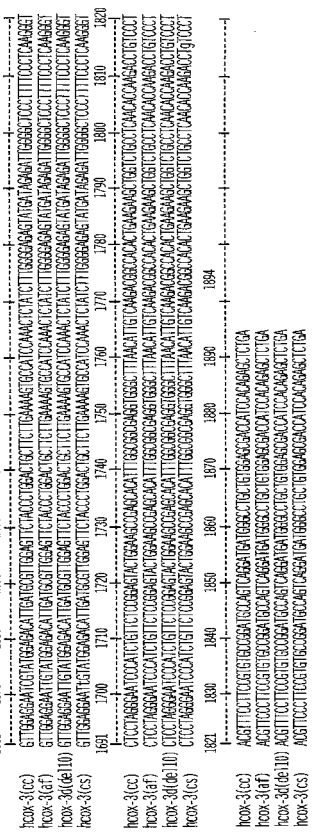
【図１６Ｂ】



【図１６Ｃ】



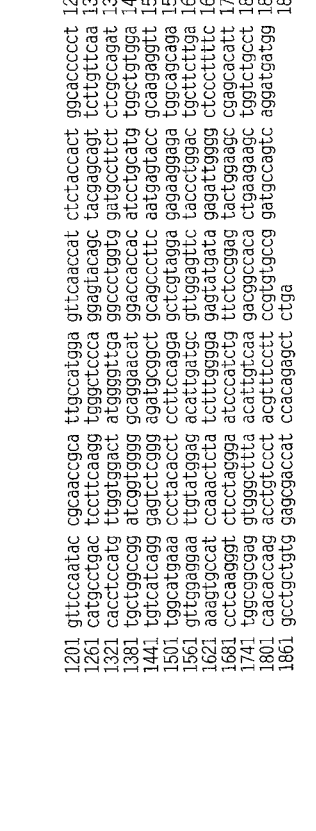
【図１６Ｄ】



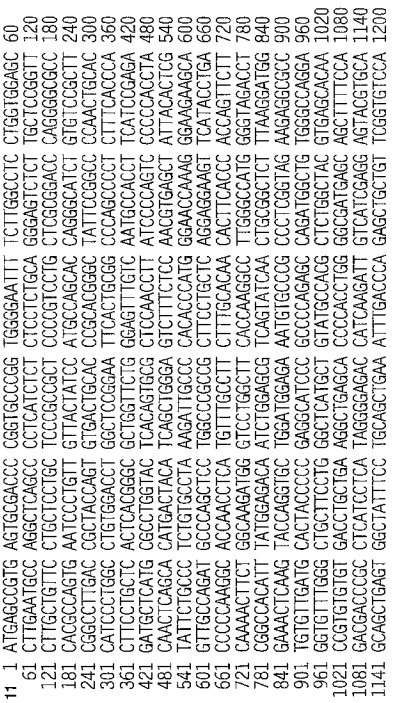
【図１７Ａ】

```
hCOX-3(cc)

配列番号：10  1 atgagccgtg agtgcgaccc cggtgacccg tgggaattt tcttggcctc ctggtggagc  60
              61 cttgaatgcc aggctcagcc cctcatctct ctcctctgca gggagtctct tgctccggtt 120
             121 cttgctgttc ctgctcctgc tcccgccgct ccccgtcctg ctgcggaacc cagggcgccc 180
             181 cacgccagtg aatccctgtt gttactatcc atgccagcac caggcatct gtgtccgctt 240
             241 cggccttgac cgctaccagt gtgactgcac ccgcacgggc tattccggcc ccaactgcac 300
             301 catccctggc ctgtggacct ggctcccgaa ttcactgcgg cccagcccct cttccaccca 360
             361 cttccctgctc actcacggac gctggttctg ggagttctgc tcaatccgac acggcattgc tcacatggca cccctcatgc tgacctcctt caaggtggcc tccagggtac 420
             421 gatgctcatg cgcctggtac tcacagtgcg ctccaacctt atccccagtc ccccccacta 480
             481 caactcagca catgactaca tcagctggga gtcttttctcc aacgtgagct attacactcg 540
             541 tattctgccc tctgtgccta aagattgccc cacacccatg ggaaccaaag ggaaagaagcg 600
             601 gttgccagat gcccagctcc tggcccgccg cttcctgctc aggaggaagt tcataacctga 660
             661 ccccaaggc accaacttca tgtttgcctt ctttgcacaa cacttcaccc accagttctt 720
             721 caaaactttct ggcaagatgg gtcctggctt caccaagccc ttgggccatg gggtagacct 780
             781 cggccacatt tatggagaca atctggagcg tcagtatcaa ctgcggctct ttaaggatgg 840
             841 gaaactcaag taccaggtgc tggatggaga aatgtacccg ccctcggtag aagaggcgcc 900
             901 tgtgttgatg cactacccccc gaggcatccc gccccagagc cagatggctg cagatggccg 960
             961 ggtgtttggg ctgcttcctg ggcttcatgct gtatgccacg ctctggctac gtgagcacaa 1020
            1021 ccgtgtgtgt gacctgctga aggctgagca ccccacctgg ggcgatgagc agcttttcca 1080
            1081 gacgacccgc ctcatcctca tagggagac catcaagatt gtcatcgagg agtacgtgca 1140
            1141 gcagctgagt ggctatttcc tgcagctgaa attgaccca gagctgctgt tcggtgtcca 1200

            1201 gttccaatac cgcaaccgca ttgccatgga gttcaaccat cctaccact ggcacccct 1260
            1261 catgcctgac tccttcaagg tgggctccca ggagtacagc tacgagcagt tcttgttcaa 1320
            1321 cacctccatg ttggtggact atgggttga ggccctggtg gatgcctttc ctcgccagat 1380
            1381 tgctggccgg atcggtgggg gcaggaacat ggaccaccac atcctgcatg tggctgtgga 1440
            1441 tgtcatcagg gagtctcggg agatgcggct gcagccctgc aatgagtacc gcaagaggtt 1500
            1501 tggcatgaaa ccctacacct ccttccagga gctcgtagga gagaaggaga tggcagcaga 1560
            1561 gttggaggaa ttgtatggag acattgatgc tgccttcttga 1620
            1621 aaagtgccat ccaactcta tctttgggga gagtatgata gagattgggg ctcccttttc 1680
            1681 cctcaagggt ctcctaggga atcccatctg ttctccggag tactggaagc cgagcacatt 1740
            1741 tggcggcgag gtgggcttta acattgtcaa gacggccaca ctgaagaagc tggtctgcct 1800
            1801 caacaccaag acctgtccct acgttccttt ccgtgtgccg gatgccagtc aggatgatgg 1860
            1861 gcctgctgtg gagcgaccat ccacagagct ctga                            1894
```

【図１７Ｂ】

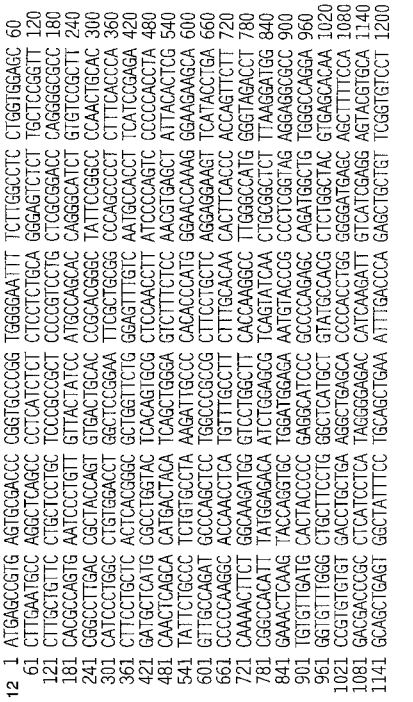


【図１８Ａ】

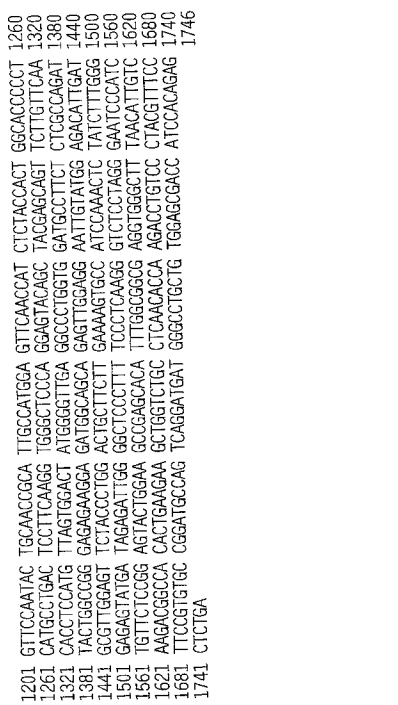


【図１８Ｂ】

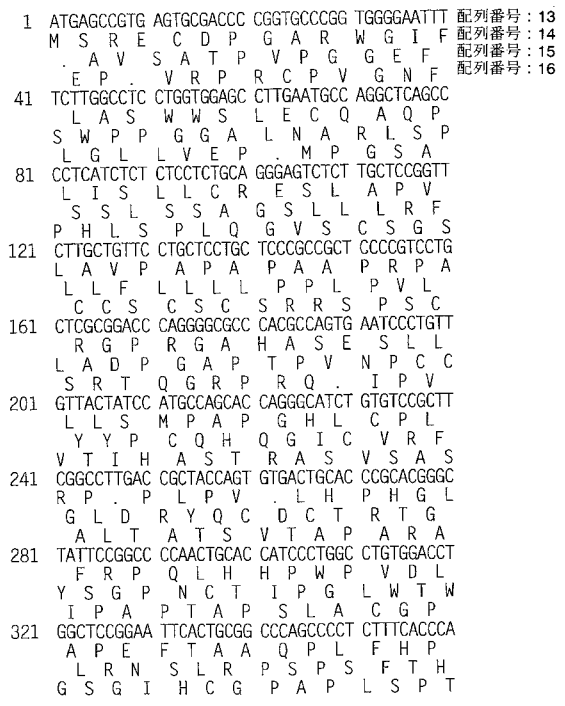
【図１９Ａ】



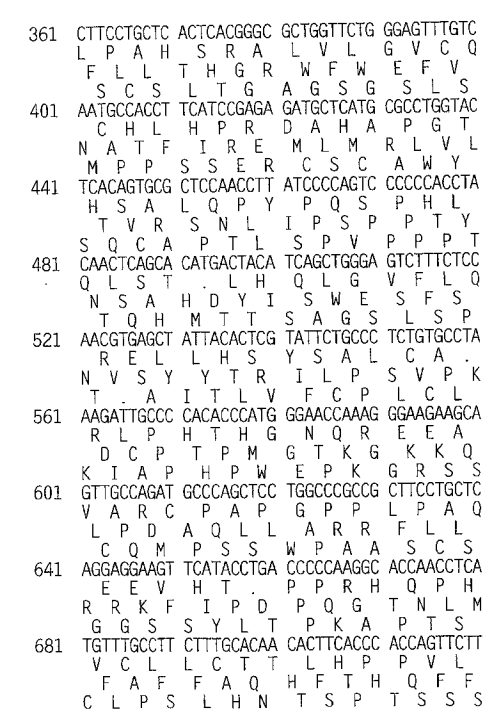
【図１９Ｂ】



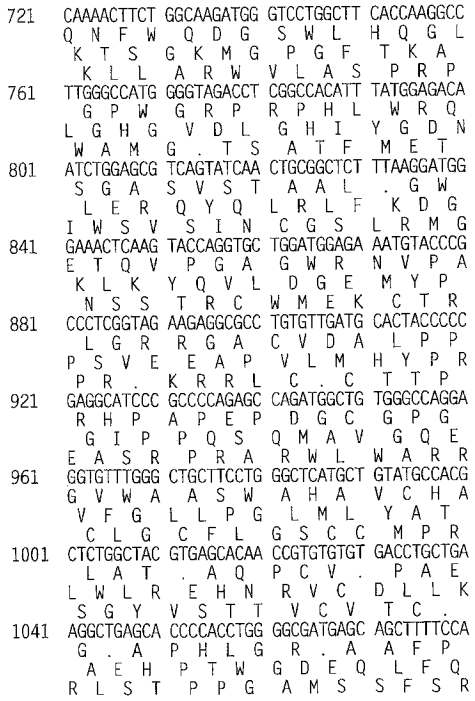
【図２０Ａ】



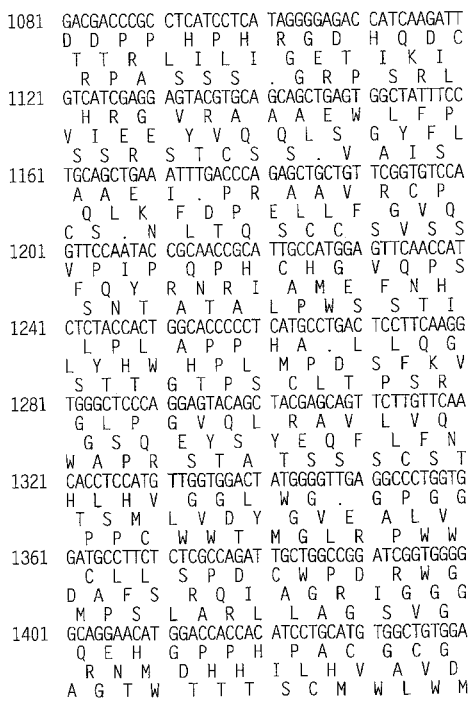
【図２０Ｂ】



【図２０Ｃ】



【図２０Ｄ】



【図２０Ｅ】

hCOX-3(con-p)

```
1441  TGTCATCAGG GAGTCTCGGG AGATGCGGCT GCAGCCCTTC
      C H Q G  V S G  D A A  A A L Q
       V I R  E S R E  M R L  Q P F
        S S G  S L G  R C G C  S P S
1481  AATGAGTACC GCAAGAGGTT TGGCATGAAA CCCTACACCT
        . V P  Q E V  W H E T  L H L
      N E Y R  K R F  G M K  P Y T S
       M S T  A R G L  A . N  P T P
1521  CCTTCCAGGA GCTCGTAGGA GAGAAGGAGA TGGCAGCAGA
       L P G  A R R R  E G D  G S R
        F Q E  L V G  E K E M  A A E
      P S R S  S . E  R R R  W Q Q S
1561  GTTGGAGGAA TTGTATGGAG ACATTGATGC GTTGGAGTTC
      V G G I  V W R  H . C  V G V L
       L E E  L Y G D  I D A  L E F
        W R N  C M E  T L M R  W S S
1601  TACCCTGGAC TGCTTCTTGA AAAGTGCCAT CCAAACTCTA
        P W T  A S .  K V P S  K L Y
      Y P G L  L L E  K C H  P N S I
       T L D  C F L K  S A I  Q T L
1641  TCTTTGGGGA GAGTATGATA GAGATTGGGG CTCCCTTTTC
       L W G  E Y D R  D W G  S L F
        F G E  S M I  E I G A  P F S
      S L G R  V . .  R L G  L P F P
1681  CCTCAAGGGT CTCCTAGGGA ATCCCATCTG TTCTCCGGAG
      P Q G S  P R E  S H L  F S G V
       L K G  L L G N  P I C  S P E
        S R V  S . G  I P S V  L R S
1721  TACTGGAAGC CGAGCACATT TGGCGGCGAG GTGGGCTTTA
        L E A  E H I  W R R G  G L .
      Y W K P  S T F  G G E  V G F N
       T G S  R A H L  A A R  W A L
1761  ACATTGTCAA GACGGCCACA CTGAAGAAGC TGGTCTGCCT
       H C Q  D G H T  E E A  G L P
        I V K  T A T  L K K L  V C L
      T L S R  R P H  . R S  W S A S
```

【図２０Ｆ】

hCOX-3(con-p)

```
1801  CAACACCAAG ACCTGTCCCT ACGTTTCCTT CCGTGTGCCG
      Q H Q D  L S L  R F L  P C A G
       N T K  T C P Y  V S F  R V P
        T P R  P V P  T F P S  V C R
1841  GATGCCAGTC AGGATGATGG GCCTGCTGTG GAGCGACCAT
        C Q S  G . W  A C C G  A T I
      D A S Q  D D G  P A V  E R P S
       M P V  R M M G  L L W  S D H
1881  CCACAGAGCT CTGA
       H R A  L
        T E L
      P Q S S  D
```

【配列表】

2005534279000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/30947

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12N 9/02, 1/20, 15/00; C12P 21/04
US CL : 435/189, 252.3, 320.1, 440, 71.1; 536/23.2
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/189, 252.3, 320.1, 440, 71.1; 536/23.2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
U.S. patent database, est, stremble, pir, swissprot, stn/caplus, EAST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VOGIAGIS. D., et al., Cyclooxygenase-1 and an alternatively spliced mRNA in the rat stomach: effects of aging and ulcers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. May 2000 May, Vol 278, No. 5, pagesG820-7.	1-4 and 14-17
X	FUNK. C.D., et al. P23219. NCBI, 1991, see entire document.	9-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 April 2004 (29.04.2004)

Date of mailing of the international search report
15 JUN 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
Ponnathapu Achutamurthy
Telephone No. 571-272-1600

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/30947

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-17

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/30947

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claim(s) 1-17, drawn to a nucleic acid encoding COX-1 of SEQ ID NO:2, 5, 14, 15 and 16, vector comprising said DNA, host cell comprising said DNA and a method of producing said protein.

Group II, claim(s) 18-20, drawn to COX-1 of SEQ ID NO:2, 5, 14, 15 and 16.

Group III, claim(s) 21, drawn to an antibody against the protein of Group II.

Group IV, claim(s) 22-24, drawn to a method of detecting the presence of a polypeptide using the protein of Group II.

Group V, claim(s) 25-27, drawn to a method of detecting the presence of a nucleic acid using the nucleic acid of Group I.

Group VI, claim(s) 28-29 drawn to a method of identifying a compound that binds to the protein of Group II.

Group VII, claim(s) 30, drawn to a method of modulating the protein of Group II.

Group VIII, claim(s) 31 and 44-51, drawn to a method of identifying a compound that modulates the activity of the protein of Group II.

Group IX, claim(s) 32-33, drawn to a method of preventing or treating Alzheimer's Disease using an inhibitor of the protein of Group II.

Group X, claim(s) 34-35, drawn to a method of ameliorating a neurodegenerative condition in a subject using an inhibitor of the protein of Group II.

Group XI, claim(s) 36-37, drawn to a method of treating immune or inflammatory condition using an inhibitor of the protein of Group II.

Group XII, claim(s) 38-39, drawn to a method of modulating expression, production or formation of amyloid precursor protein in a subject using an antagonist that is a inhibitor of the protein of Group II.

Group XIII, claim(s) 40-43, drawn to a method of inhibiting COX-3 or PCOX-1 activity using a compound that inhibits the protein of Group II.

Group XIV, claim(s) 52, drawn to a method of making a compound that modulates the activity of the protein of Group II.

Group XV, claim(s) 53-55, drawn to an article of manufacture comprising a compound that modulates the activity of the protein of Group II.

Group XVI, claim(s) 56-63 and 65, drawn to an array of probes that binds to the nucleic acid of Group I.

Group XVII, claim(s) 64 and 66, drawn to a method of choosing therapy for a subject using the probe of Group XVI.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/30947

The technical feature linking Groups I-VI appears to be that they all relate to a cyclooxygenase-1.

However, Vogiagis et al. teach a nucleic acid encoding a cyclooxygenase-1 (abstract).

Therefore, the technical feature linking the inventions of Groups I-XVII does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

The special technical feature of Group I is a nucleic acid encoding COX-1 of SEQ ID NO:2, 5, 14, 15 and 16, vector comprising said nucleic acid, host cell comprising said nucleic acid and a method of producing said protein.

The special technical feature of Group II is a COX-1 of SEQ ID NO:2, 5, 14, 15 and 16.

The special technical feature of Group III is an antibody against the protein of Group II.

The special technical feature of Group IV is a method of detecting the presence of a polypeptide using the protein of Group II.

The special technical feature of Group V is a method of detecting the presence of a nucleic acid using the nucleic acid of Group I.

The special technical feature of Group VI is a method of identifying a compound that binds to the protein of Group II.

The special technical feature of Group VII is a method of modulating the protein of Group II.

The special technical feature of Group VIII is a method of identifying a compound that modulates the activity of the protein of Group II.

The special technical feature of Group IX is a method of preventing or treating Alzheimer's Disease using an inhibitor of the protein of Group II.

The special technical feature of Group X is a method of ameliorating a neurodegenerative condition in a subject using an inhibitor of the protein of Group II.

The special technical feature of Group XI is a method of treating immune or inflammatory condition using an inhibitor of the protein of Group II.

The special technical feature of Group XII is a method of modulating expression, production or formation of amyloid precursor protein in a subject using an antagonist that is a inhibitor of the protein of Group II.

The special technical feature of Group XIII is a method of inhibiting COX-3 or PCOX-1 activity using a compound that inhibits the protein of Group II.

The special technical feature of Group XIV is a method of making a compound that modulates the activity of the protein of Group II.

The special technical feature of Group XV is an article of manufacture comprising a compound that modulates the activity of the protein of Group II.

The special technical feature of Group XVI is an array of probes that binds to the nucleic acid of Group I.

The special technical feature of Group XVII is a method of choosing therapy for a subject using the probe of Group XVI.

Accordingly, Groups I-XVII are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 37/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 43/00	Ｃ０７Ｋ 16/40		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 16/40	Ｃ１２Ｍ 1/00	Ａ	
Ｃ１２Ｍ 1/00	Ｃ１２Ｍ 1/34	Ｂ	
Ｃ１２Ｍ 1/34	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 9/02		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 9/02	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 37/00	１０２	
Ｇ０１Ｎ 37/00	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｆ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		

(31)優先権主張番号 60/411,575
(32)優先日 平成14年9月16日(2002.9.16)
(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 チャンドラセクハラン ヴィシュヴァナス エヌ
アメリカ合衆国 ユタ州 ８４６０４ プロヴォ ノース ４４５ イースト ４００ アパートメント ナンバー１２２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA08 CA01 CA04 CA12 GA11 HA12
4B029 AA23 BB20 CC03 FA09 FA12 FA15
4B050 CC03 EE10 LL01 LL03
4B063 QA19 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QR82 QS25 QS34 QX01
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 NA14 ZA16 ZB01 ZB11 ZC20
4H045 AA11 BA10 CA40 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	新型环加氧酶突变体及其使用方法		
公开(公告)号	JP2005534279A	公开(公告)日	2005-11-17
申请号	JP2003532629	申请日	2002-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	杨百翰大学		
申请(专利权)人(译)	杨百翰大学		
[标]发明人	シモンズダニエル チャンドラセクハランヴィシュヴァナスエヌ		
发明人	シモンズ ダニエル チャンドラセクハラン ヴィシュヴァナス エヌ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K16/40 C12M1/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N15/09 C12P21/04 C12Q1/68 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P43/00 C12N9/0083		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K16/40 C12M1/00.A C12M1/34.B C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA08 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/GA11 4B024/HA12 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA09 4B029/FA12 4B029/FA15 4B050/CC03 4B050/EE10 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZA16 4C084/ZB01 4C084/ZB11 4C084/ZC20 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林洋平		
优先权	60/326133 2001-09-28 US 60/373225 2002-04-15 US 60/373661 2002-04-16 US 60/411575 2002-09-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新型1型环氧合酶（COX-1）变体酶的分离。 更具体地，本发明涉及鉴定带有环氧合酶1的1号基因的片段的环氧合酶转录物。 确定，生产和使用调节环氧合酶1型变异基因表达或环氧合酶1型变异基因产物活性的化合物，包括但不限于编码环氧化酶1型变异体及其同源物，类似物及其缺失的核酸 以及反义，核酶，三重螺旋，抗体和多肽分子以及小的无机分子； 以及这类化合物的药物制剂和给药途径。

医薬	IC_{50}, μM		
	COX-1	COX-2	COX-3
アセトアミノフェン	>1000	>1000	460
アミノピリン*	>1000	>1000	688
アンチピリン	>1000	>1000	863
アスピリン	10	>1000	3.1
ジクロフェナク	0.035	0.041	0.008
ジピロン	350	>1000	52
イブプロフェン	2.4	5.7	0.24
インドメタシン	0.010	0.66	0.016
フェナセチン	>1000	>1000	102
カフェイン	>1000	>1000	>1000
サリドマイド	>1000	>1000	>1000