

(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2004-514426

(P2004-514426A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/00	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 B O 6 5
		(全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-536447 (P2002-536447)	(71) 出願人	501439149
(86) (22) 出願日	平成13年10月1日 (2001.10.1)		ソルベイ・フアーマシユーチカルズ・ペー
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月14日 (2003.4.14)		・ブイ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011371		オランダ・エヌエルー1381シーピー
(87) 国際公開番号	W02002/033079		ウエースプ・シージエイバンハウテンラー
(87) 国際公開日	平成14年4月25日 (2002.4.25)		ン36
(31) 優先権主張番号	00203566.5	(74) 代理人	100060782
(32) 優先日	平成12年10月16日 (2000.10.16)		弁理士 小田島 平吉
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	デレールスニーダー, ウイリ
(31) 優先権主張番号	60/241,372		オランダ・エヌエルー1381シーピー
(32) 優先日	平成12年10月19日 (2000.10.19)		ウエースプ・シージエイバンハウテンラー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ン36内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトGタンパク質共役受容体およびその使用

(57) 【要約】

本発明は I G S 5 8 Gタンパク質共役受容体ファミリーおよび、前記 I G S 5 8 タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、そのようなポリヌクレオチドおよびポリペチドの作用を阻害もしくは活性化すること、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、I G S 5 8 遺伝子が過剰発現、誤発現、過少発現、もしくは抑制（ノックアウト）される、そのようなベクターを含む宿主細胞およびヒト以外のトランスジェニック動物にも関する。本発明はさらに、前記 Gタンパク質共役受容体ファミリー I G S 5 8 のアゴニストもしくはアンタゴニストの働きをする能力を持つ化合物をスクリーニングする方法、そして、広範な疾患の処置およびそのような状態の診断試験における I G S 5 8 ポリペチドおよびポリヌクレオチドならびに I G S 5 8 受容体ファミリーに対するアゴニストもしくはアンタゴニストの使用に関する。本発明は特に、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系（例えば胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃核、脳梁、海馬および視床）に関係する機能不全、障害もしくは疾患の処置、ならびにそのような状態の診断試験における、前記 Gタンパク質共役受容体ファミリー I G S 5 8 のアゴニストもしくはアンタゴニストの働きをする能力を持つ化合物をスクリーニングするための方法、そして、I G S 5 8 ポリペチドおよびポリヌクレオチドならびに I G S 5 8 受容体ファミリーに対するアゴニストもしくはアンタゴニストの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a) SEQ ID NO: 2 に従う IGS 58 ポリペチドをコードするヌクレオチド配列；
- b) ユトレヒト（オランダ）の Centraalbureau voor Schimmelmelcultures における受託番号 CBS 109717 に含まれる DNA インサートによってコードされるポリペチドをコードするヌクレオチド配列、特に SEQ ID NO: 1 に対応するヌクレオチド配列；
- c) 全長にわたってヌクレオチド配列（a）もしくは（b）に少なくとも 80%（好ましくは少なくとも 90%）の配列同一性を持つヌクレオチド配列；
- d) （a）もしくは（b）もしくは（c）のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；
- から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項2】

- a) SEQ ID NO: 2 に従う IGS 58 ポリペチドをコードするヌクレオチド配列；
- b) ユトレヒト（オランダ）の Centraalbureau voor Schimmelmelcultures における受託番号 CBS 109717 に含まれる DNA インサートによってコードされるポリペチドをコードするヌクレオチド配列、特に SEQ ID NO: 1 に対応するヌクレオチド配列；
- c) 全長にわたってヌクレオチド配列（a）もしくは（b）に少なくとも 90%（好ましくは少なくとも 95%）の配列同一性を持つヌクレオチド配列；
- d) （a）もしくは（b）もしくは（c）のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；
- から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項3】

- a) SEQ ID NO: 2 に従う IGS 58 ポリペチドをコードするヌクレオチド配列；
- b) ユトレヒト（オランダ）の Centraalbureau voor Schimmelmelcultures における受託番号 CBS 109717 に含まれる DNA インサートによってコードされるポリペチドをコードするヌクレオチド配列、特に SEQ ID NO: 1 に対応するヌクレオチド配列；
- c) 全長にわたってヌクレオチド配列（a）もしくは（b）に少なくとも 95%（好ましくは少なくとも 98%）の配列同一性を持つヌクレオチド配列；
- d) （a）もしくは（b）もしくは（c）のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；
- から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド。

30

40

【請求項4】

- a) SEQ ID NO: 2 に従う IGS 58 ポリペチドをコードするヌクレオチド配列；
- b) ユトレヒト（オランダ）の Centraalbureau voor Schimmelmelcultures における受託番号 CBS 109717 に含まれる DNA インサートによってコードされるポリペチドをコードするヌクレオチド配列、特に SEQ ID NO: 1 に対応するヌクレオチド配列；
- c) 全長にわたってヌクレオチド配列（a）もしくは（b）に少なくとも 98%（好ましくは少なくとも 99%）の配列同一性を持つヌクレオチド配列；
- d) （a）もしくは（b）もしくは（c）のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列；

50

チド配列；

から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 2 の IGS 58 ポリペチドをコードする SEQ ID NO: 1 中に含まれるヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 1 の配列もしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートの配列と全長にわたって少なくとも 80% が同一であるヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 7】

SEQ ID NO: 1 の配列もしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートの配列と全長にわたって少なくとも 90% が同一であるヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

SEQ ID NO: 1 の配列もしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートの配列と全長にわたって少なくとも 95% が同一であるヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 9】

SEQ ID NO: 1 の配列もしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートの配列と全長にわたって少なくとも 98% が同一であるヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

SEQ ID NO: 1 の配列もしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートの配列と全長にわたって少なくとも 99% が同一であるヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。 30

【請求項 11】

SEQ ID NO: 1 もしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートのポリヌクレオチドである、請求項 5 ~ 10 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

DNA もしくは RNA である、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含んで成るハイブリダイゼーション・プローブ。 40

【請求項 14】

発現系が適合する宿主細胞中に存在する場合に、SEQ ID NO: 2 のポリペチドもしくはユトレヒト (オランダ) の Centraal bureau voor Schimmelscultures における受託番号 CBS 109 717 に含まれる DNA インサートによってコードされるポリペチドと少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る IGS 58 ポリペチドを生成することができる前記発現系を構成する DNA もしくは RNA 分子。

【請求項 15】

発現系が適合する宿主細胞中に存在する場合に、SEQ ID NO: 2のポリペチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelmeculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチドを生成することができる前記発現系を構成するDNAまたはRNA分子。

【請求項16】

発現系が適合する宿主細胞中に存在する場合に、SEQ ID NO: 2のポリペチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelmeculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチドを生成することができる前記発現系を構成するDNAまたはRNA分子。

10

【請求項17】

発現系が適合する宿主細胞中に存在する場合に、SEQ ID NO: 2のポリペチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelmeculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチドを生成することができる前記発現系を構成するDNAまたはRNA分子。

20

【請求項18】

発現系が適合する宿主細胞中に存在する場合に、SEQ ID NO: 2のポリペチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelmeculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチドを生成することができる前記発現系を構成するDNAまたはRNA分子。

【請求項19】

請求項14~18のいずれかに記載の発現系を含んで成る宿主細胞。

【請求項20】

酵母細胞である請求項19に記載の宿主細胞。

30

【請求項21】

動物細胞である請求項19に記載の宿主細胞。

【請求項22】

請求項19~21のいずれかに記載の細胞に由来するIGS58受容体膜調製品。

【請求項23】

ポリペチドの生産および培養からの前記ポリペチドの回収に十分な条件の下で請求項19~21の宿主を培養することを含んで成る、IGS58ポリペチドを製造するための方法。

【請求項24】

細胞が適当な培養条件の下でIGS58ポリペチドを生産することができるように、請求項14~18のいずれかの発現系により細胞を形質転換もしくはトランスフェクトすることを含んで成る、IGS58ポリペチドを生産する細胞を製造するための方法。

40

【請求項25】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelmeculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと全長にわたって少なくとも80%が同一であるアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチド。

【請求項26】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列もしくはユトレヒト(オランダ)のCentra

50

albureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと全長にわたって少なくとも90%が同一であるアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチド。

【請求項27】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと全長にわたって少なくとも95%が同一であるアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチド。

【請求項28】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと全長にわたって少なくとも98%が同一であるアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチド。 10

【請求項29】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドと全長にわたって少なくとも99%が同一であるアミノ酸配列を含んで成るIGS58ポリペチド。

【請求項30】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を含んで成る、請求項25~29のいずれかに記載のポリペプチド。 20

【請求項31】

請求項25~30のいずれかに記載のIGS58ポリペチドに免疫特異的な抗体。

【請求項32】

(a) 治療的に有効な量の前記受容体に対するアゴニストを患者に投与すること；および/もしくは

(b) SEQ ID NO: 2のIGS58ポリペチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドをコードするヌクレオチド配列に対して、全長にわたって少なくとも80%の同一性を持つヌクレオチド配列、または前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチドを、in vivoにおいて前記受容体活性の生成をもたらすことができる形で患者に提供すること； 30

を含んで成る、請求項25~30のいずれかに記載のIGS58ポリペチド受容体の増強された活性もしくは発現を必要とする患者の処置のための方法。

【請求項33】

(a) 治療的に有効な量の前記受容体に対するアンタゴニストを患者に投与すること；および/もしくは 40

(b) 前記受容体をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチドを患者に投与すること；および/もしくは

(c) 前記受容体とそのリガンドについて競合するポリペチドの治療的に有効な量を患者に投与すること；

を含んで成る、請求項25~30のいずれかに記載のIGS58ポリペチド受容体の活性もしくは発現を阻害する必要がある患者の処置のための方法。

【請求項34】

(a) 患者に由来するサンプルにおいて、前記患者のゲノム中の前記IGS58ポリペチドをコードするヌクレオチド配列中における変異の有無を決定すること；および/もしくは

(b) 患者に由来するサンプルにおいて、IGS58ポリペチド発現の存在もしくは量について分析すること；

を含んで成る、請求項25～30のいずれかのIGS58ポリペチドの患者中における発現もしくは活性に関係する疾患もしくは疾患への感受性を患者において診断するための方法。

【請求項35】

(a) IGS58ポリペチドを生産する細胞に試験化合物を接触させること；および

(b) 試験化合物がIGS58ポリペチドの活性化によって発生するシグナルをもたらすか否かを決定すること；

を含んで成る、請求項25～30のいずれかに記載のIGS58ポリペチドに対するアゴニストを同定するための方法。 10

【請求項36】

請求項35に記載の方法によって同定されるアゴニスト。

【請求項37】

(a) IGS58ポリペチドを生産する細胞にアゴニストを接触させること；および

(b) 前記アゴニストによって発生するシグナルが候補化合物の存在下で減少するか否かを決定すること；

を含んで成る、請求項25～30のいずれかに記載のIGS58ポリペチドに対するアンタゴニストを同定するための方法。

【請求項38】

請求項37に記載の方法によって同定されるアンタゴニスト。 20

【請求項39】

請求項24に記載の方法によって製造された、IGS58ポリペチドを発現している組換え宿主細胞もしくはその膜。

【請求項40】

遺伝子的に操作した非ヒト動物を生産する方法であって、

a) アミノ酸配列SEQ ID NO: 2もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を持つタンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントをコードする核酸配列を本質的に含むポリヌクレオチドのコード部分を、高レベルな遺伝子発現もしくは、その遺伝子が前記動物において通常は発現されない細胞型における発現を駆動することのできる制御配列に連結する段階；あるいは 30

b) アミノ酸配列SEQ ID NO: 2もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を持つタンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントをコードする核酸配列を本質的に含むポリヌクレオチドのコード部分を改変し、そして、アミノ酸配列SEQ ID NO: 2もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を持つタンパク質または生物学的に活性なフラグメントをコードする内在性の対立遺伝子が完全に、もしくは部分的に不活化されるような方法で前記配列を前記動物のゲノム中に再導入する段階； 40

を含んで成る方法。

【請求項41】

請求項35もしくは37に記載の方法を含んで成り、それから、製薬学的に許容されうる担体とみなされる化合物を混合することを含んで成る、製薬組成物の製造のための方法。

【請求項42】

(a) 治療的に有効な量の請求項25～30のいずれかに記載のIGS58受容体ポリペチドに対するアゴニスト；および/もしくは

(b) 請求項25～30のいずれかに記載のIGS58ポリペチドの活性もしくは発現の増加が必要な、IGS58受容体ポリペチドの発現もしくは活性に関係する疾患を患う患者の処置のための薬物の生産のための、前記受容体活性の生成を*in vivo*でもたらしることができるような形の、SEQ ID NO: 2のIGS58ポリペプチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmeculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるポリペチドをコードするヌクレオチド配列に対し、全長にわたって少なくとも80%の同一性を持つヌクレオチド配列を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド;または、前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列;の使用。

10

【請求項43】

(a) 治療的に有効な量の請求項25～30のいずれかに記載のIGS58受容体ポリペチドに対するアンタゴニスト;および/もしくは

(b) 請求項25～30のいずれかに記載のIGS58受容体ポリペチドをコードするヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子;および/もしくは

(c) 請求項25～30のいずれかに記載のIGS58ポリペチドの活性もしくは発現を阻害する必要を有する、IGS58受容体ポリペチドの発現もしくは活性に関係する疾患を患う患者の処置のための薬物の調製のための、治療的に有効な量の請求項25～30のいずれかに記載のIGS58受容体ポリペチドとそのリガンドについて競合するポリペチド;

20

の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド、それらによってコードされるポリペチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドおよびポリペチドの使用、ならびにそれらの製造に関する。より詳細には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペチドは、以下IGS58と記載するGタンパク質共役受容体(GPCR)に関する。本発明はまた、そのようなポリヌクレオチドおよびポリペチドの作用を阻害もしくは活性化すること、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、IGS58遺伝子が過剰発現、誤発現(*misexpressed*)、過少発現、および/もしくは抑制(ノックアウト)される、そのようなベクターを含む宿主細胞およびトランスジェニック動物にも関する。本発明はさらに、前記Gタンパク質共役受容体IGS58のアゴニストもしくはアンタゴニストの働きをする能力を持つ化合物をスクリーニングするための方法に関する。

30

【0002】

〔発明の背景〕

多くの医学的に重要な生物学的プロセスがGタンパク質および/または二次情報伝達物質(例えばcAMP)を含むシグナル伝達経路に参加するタンパク質によって媒介されることは、十分に確立されている(Lefkowitz, *Nature*, 1991, 351: 353-354)。本明細書中では、これらのタンパク質はGタンパク質を含む経路に参加するタンパク質として記載される。これらのタンパク質のいくつかの例には、アドレナリン作動性物質およびドーパミンに対するもののようなGPC受容体(Kobilka, B. K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1987, 84: 46-50; Kobilka, B. K., et al., *Science*, 1987, 238: 650-656; Bunzow, J. R., et al., *Nature*, 1988, 336: 783-787)、Gタンパク質自体、エフェクタータンパク質(例えば、ホスホリパーゼC、アデニル酸シクラーゼおよびホスホジエステラーゼ)、アクチュエータータンパク質(例えば、プロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼC)(Simon, M. I., et al., *Science*, 1991, 252: 802-8)を含む。

40

【0003】

50

例えば、シグナル伝達の一つの形態では、GPCRへのホルモンの結合に伴って、その受容体はヘテロ三量体Gタンパク質と相互作用し、グアニンヌクレオチド結合部位からのGDPの解離を誘導する。グアニンヌクレオチドの正常な細胞内濃度では、GTPが即座に部位を満たす。Gタンパク質のサブユニットへのGTPの結合は、受容体からのGタンパク質の解離と、Gタンパク質のサブユニットへの解離を引き起こす。GTPを保有している形態は、それから、活性化されたアデニル酸シクラーゼに結合する。Gタンパク質自体によって触媒されるGTPのGDPへの加水分解（サブユニットは内因性のGTPアーゼ活性を有する）が、Gタンパク質を基底の不活性な形へと戻す。サブユニットのGTPアーゼ活性は、本質において、オン/オフ・スイッチを制御する内部時計である。サブユニットのGDP結合型は、に対する高いアフィニティーを有し、その後のGDPとの再結合が系を基底状態へと戻す。このように、Gタンパク質は受容体からエフェクター（この例ではアデニル酸シクラーゼ）へのシグナルを中継する中間体として、および、シグナルの持続期間を制御する時計としての二重の役割を担う。

10

【0004】

Gタンパク質共役受容体の膜結合型スーパーファミリーは、推定される7回膜貫通領域を有するとして特徴づけられている。このドメインは細胞外もしくは細胞質内のループにつながれている膜貫通ヘリックスをあらわしていると考えられている。Gタンパク質共役受容体はホルモン、ウイルス、増殖因子および神経性受容体といった、広範囲にわたる生物学的に活性な受容体を含む。

【0005】

Gタンパク質共役受容体ファミリーは、CNS疾患の処理に使用される神経遮断薬に結合するドーパミン受容体を含む。このファミリーのメンバーの他の例は、カルシトニン、アドレナリン、ニューロペプチドY、ソマトスタチン（somatostatin）、ニューロテンシン、ニューロキニン、カプサイシン、VIP、CGRP、CRF、CCK、ブラジキニン、ガラニン、モチリン、ノシセプチン、エンドセリン、cAMP、アデノシン、ムスカリン、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンピン、カイニン、卵胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子1、ロドプシン、臭気物質（odorant）、およびサイトメガロウィルスの受容体を含むが、それらに限定されない。

20

【0006】

大部分のGタンパク質共役受容体は、最初の2つの細胞外ループの各々に単一の保存されたシステイン残基を有しており、これらは機能的なタンパク質構造を安定化すると考えられるジスルフィド結合を形成する。7回膜貫通領域はTM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と名付けられている。TM5とTM6とをつなぐ細胞質内ループはGタンパク質結合ドメインの主要な成分である。

30

【0007】

大部分のGタンパク質共役受容体は、第3の細胞質内ループ内および/もしくはカルボキシル末端に潜在的なリン酸化部位を含む。アドレナリン受容体のような、いくつかのGタンパク質共役受容体では、プロテインキナーゼAおよび/もしくは特異的な受容体キナーゼによるリン酸化が受容体の脱感作を媒介する。

【0008】

最近、カルシトニン受容体様受容体のようないくつかのGPCRは、受容体活性変更タンパク質（RAMP）と呼ばれる小さな1回貫通膜タンパク質と相互作用しうることが発見された。このGPCRと特定のRAMPとの相互作用は、どの天然リガンドがそのGPCRとRAMPの組み合わせに適切なアフィニティーを有し、複合体の機能的シグナル活性を調節するかを決定している（McLathie, L. M. et al., Nature (1998) 393: 333-339）。

40

【0009】

一部の受容体では、Gタンパク質共役受容体のリガンド結合部位は、いくつかのGタンパク質共役受容体膜貫通領域によって形成される親水性ソケットを含んで成り、前記ソケットはGタンパク質共役受容体の疎水性残基によって囲まれていると考えられている。各G

50

タンパク質共役受容体膜貫通ヘリックスの親水性側は、内側を向いており、極性のリガンド結合部位を形成すると仮定される。T M 3 はいくつかのGタンパク質共役受容体において、T M 3のアスパラギン酸残基のようなリガンド結合部位を有するとされている。T M 5のセリン、T M 6のアスパラギン、ならびにT M 6もしくはT M 7のフェニルアランもしくはチロシンもまた、リガンド結合に関係付けられている。

【0010】

Gタンパク質共役受容体は細胞内で、ヘテロ三量体Gタンパク質によって、さまざまな細胞内酵素、イオンチャネルおよび輸送体にカップリングされうる(Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10: 317-331を見よ)。異なるGタンパク質サブユニットは、特定のエフェクターを優先的に刺激して、細胞中のさまざまな生物学的機能を調整する。Gタンパク質共役受容体の細胞質内残基のリン酸化は、一部のGタンパク質共役受容体のGタンパク質カップリングの調節に重要な機構として同定された。Gタンパク質共役受容体は哺乳類宿主内の多数の部位に見出される。

10

【0011】

受容体(主にGPCRクラス)は現在既知の薬剤の半分以上を導いた(Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14: 1516)。これは、これらの受容体が治療の標的としての確立され、証明された歴史を持つことを示す。本発明において記述される新たなIGS58 GPCRは、機能不全、障害もしくは疾患(以降では一般に「疾患」と記載する)の診断、予防、改善もしくは矯正に役割を演じうるさらなる受容体の同定および特徴付けに対して、当該技術分野に存在する必要性を明らかに満足させる。疾患には、統合失調症、強迫性障害(OCD)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、恐怖症およびパニックのような挿間性発作性不安(EPA)障害、大鬱病性障害、双局性障害、パーキンソン病、一般的不安障害、自閉症、譫妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆および他の神経変性疾患、重度の精神遅滞、ジスキネジア、ハンチントン病、トゥレット症候群、チック、震え、筋緊張異常、攣縮、食欲不振症、過食症、発作、中毒/依存症/渴望、睡眠障害、癲癇、片頭痛、注目欠陥/活動亢進障害(ADHD)を含む CNS 障害; 心不全、狭心症、不整性、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧(本態性高血圧症、腎性高血圧症もしくは肺高血圧症など)、血栓症、動脈硬化、脳血管攣縮、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー病、腎臓病(腎不全など)を含む循環器病; 肥満症; 嘔吐; 過敏性腸管症候群(IBS)、炎症性腸疾患(IBD)、胃食道逆流疾患(GERD)、術後性もしくは糖尿病性の胃不全麻痺のような運動性障害および胃排出遅延状態、ならびに糖尿病、潰瘍(胃潰瘍など)を含む胃腸疾患; 下痢; 骨粗鬆症を含む他の疾患; 炎症; 細菌性、真菌性、原生動物性およびウイルス性の感染(特に HIV-1もしくは HIV-2に起因する感染)のような感染症; 疼痛; 癌; 化学療法誘導性傷害; 腫瘍浸潤; 免疫疾患; 尿閉; 喘息; アレルギー; 関節炎; 前立腺肥大症; 内毒素ショック; 敗血症; 真正糖尿病の合併症; ならびに婦人科の疾患を含む。

20

30

【0012】

特に、本発明において記述される新たなIGS58 GPCRは、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系(胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など)に関係する機能不全、障害もしくは疾患を診断、予防、改善もしくは矯正する際に重要な役割を演じうるさらなる受容体の同定および特徴付けに対して、当該技術分野に存在する必要性を満足させる。

40

【0013】

〔発明の概要〕

一つの態様では、本発明はIGS58のポリペチド、ポリヌクレオチド、および組換え物質、ならびにそれらの製造方法に関する。本発明の別の態様は、そのようなIGS58ポリペチド、ポリヌクレオチドおよび組換え物質を使用する方法に関する。そのような使用には治療標的としての使用、および上述の疾患の一つの処置のための使用を含むが、それらに限定されない。特に、この使用には、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系(胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳

50

梁、海馬および視床など)に關係する機能不全、障害もしくは疾患の処置を含む。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は、本発明により提供される物質を用いたアゴニストおよびアンタゴニストを同定するための方法、ならびに、同定された化合物によるIGS58の不均衡に付随した状態の処置に関する。本発明のさらに別の態様は、不適当なIGS58活性もしくはレベルに関連した疾患を検出するための診断試験に関する。本発明のさらなる態様は、IGS58の異常な発現もしくは活性から生じる疾患のモデルとして働く動物に基づいた系に関する。

【0015】

【表1】

10

表1：SEQ ID NO:1のIGS58 DNA

```

5'-
GCCGCCGCCCGCCACCAGCGGAGCATGGCCTTATTGGGCAGCCAGCACTCCGGCGCCCC
CTCCGCGGCCCGCCACCTGGCGGGACTTCCTCCGCGGCCACGGCGGCCGTGCTCTCCTT
CAGCACCGTGGCGACCGCGGCGCTGGGGAACCTGAGCGACGCAAGCGGAGGCGGCACAGC
TGCCGCTCCCGGTGGCGGCGGCCCTGGCGGGTCCGCGGCAGCGCGGGAGGCGGGGGCGGC
GGTGAGGCGGCCGCTAGGCCCGGAGGCGGCGCGCTGCTGTGCACGGAGCTGCAGTGGC
GGCCAGGCGCTCGTCCCTCTGCTCATCTTCTGCTAGCCTTGGCAACTGCGCGGT
GATGGGGTGATTGTGAAGCACCGGCAGCTCCGACCGTCACCAACGCCCTCATCCTGTC
GCTGTCCCTATCGGATCTGCTCACGGCGCTGCTCTGCCTGCCCGCCGCTTCCCTGGACCT
CTTCACTCCGCCCGGGGGTTCGGCGCCTGCCGCCCGCGGGGCCCTGGCGCGGCTTCTG
CGCCGCCAGCCGCTTCTTTCAGCTCGTCTCGGCATCGTGTCCACGCTCAGCGTGGCGCT
CATCTCGTTGGACCGTTACTGCGCTATCGTGCAGCCCGCGGGAGAAGATCGGCCGCCG
CCGCGCGCTGCAGCTGCTGGCGGGCGCCTGGCTGACGGCCCTGGGCTTCTCCTTGCCCTG
GGAGCTGCTCGGGGCGCCCCGGAACTCGCGGCGGCGCAGAGCTCCACGGCTGCCTCTA
CCGACCTCCCGGACCCCGCAGCTGGGCGCGGCCCTCAGCGTGGGGCTGGTGGTGGC
CTGCTACCTGCTGCCCTTCTGCTCATGTGCTTCTGCCACTACCACATCTGCAAGACGGT
GCGCCTGTGCGACGTGCGCGTGGCGCGGTGAACACCTACGCGCGCGTGTGCGCTTCTT
CAGCGAGGTGCGCACGGCCACCACCGTCTCATCATGATCGTCTTCGTATCTGCTGCTG
GGGGCCCTACTGCTTCTTGGTGTGCTGCTGGCCGCCCGCCGAGGCCAGACCATGCAGGC
CCCCTCGTCTCAGCGTGGTGGCCGTCTGGCTGACCTGGGCCAATGGGGCCATCAACCC
TGTCATCTACGCCATCCGCAATCCCAACATTTTCGATGCTCCTAGGGCGCAACCGCGAGGA
GGGCTACCGGACTAGGAATGTGGACGCTTCTTCCAGCCAGGGCCCGGGTCTGCAAGC
CAGAAGCCCGAGTCGCTTCGAAACCGCTATGCCAACCGGCTGGGGGCTGCAACAGGAT
GTCTCTTCCAACCCGGCCAGCGGAGTGGCAGGGACGTGGCCATGTGGGCCGCAAAAA
TCCAGTTGTACTTTCTGCCAGAGGGACCACCAGAGCCGGTACGGCAGTGACCAAAAA
GCCTAAATCCGAAGCTGGGGATACCAGCCTCTAAGACGGTGGAAATGGCCAGCTTATGAA
GGCAAATTTCCACTCGCATTATTTAATGATGGAAGATTCTGGGGGAGAGTTGTGGATTC
ATAAAGCCAAACATTTAAAGCTAGAGACGGGGGAGGCTTACCAC
-3'

```

20

30

【0016】

【表2】

表2：SEQ ID NO:2のIGS58 DNA

40

```

MALLGSQHSAGPSAAGPPGGTSSAATAAVLSFSTVATAALGNLSDASGGGTAAAPGGGGL
GGSGAAREAGAARRRPLGPEAAPLLSHGA AVAAQALVLLLIIFLLSSLGNCVAVMGVIVKHR
QLRVTNFAFILSLSLSDLLTALLCLPAAFLDLETPPGGSAPAAAAGPWRGFCAASRFSS
CFGIVSTLSVALISLDYCAIVRPPREKIGRRRALQLLAGAWLTALGFSLPWELLGAPRE
LAAAQSFHGCLYRTPDPAQLGAAFSVGLVVACYLLPFLLMCFCHYHICKTVRLSDVRVR
PVNTYARVLRFFSEVRTATTVLIMIVEVICCWGPYCFVLVLLAAARQAQTMQAPSLLSVVA
VWLTWANGAINPVIYAIRNPNISMLLGRNREEGYRTRNVDAFLPSQGPGLQARSRLRN
RYANRLGACNRMSSSNPASGVAGDVAMWARKNEVVLFCREGPPEPVTAVTKQPKSEAGDT
SL

```

【0017】

50

〔発明の記述〕

配列およびモチーフの文脈における構造的および化学的な類似が、本発明の I G S 5 8 G P C R と他のヒト G P C R の間に存在する。さらに、I G S 5 8 は、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系（胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など）において発現される。したがって、I G S 5 8 はとりわけ上述の疾患において役割を演じることが暗示される。I G S 5 8 は特に、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系（胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など）に關係する機能不全、障害もしくは疾患において役割を演じることが暗示される。

【0018】

特に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的および科学的な用語は、本発明が属する当該技術分野の通常の熟練者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中で記述されるものと類似もしくは等価なあらゆる方法および材料が、本発明の実施もしくは試験のために使用されうるものの、好ましい方法、装置および材料がこれから記述される。本明細書中で引用される刊行物はすべて、あたかも個々の各刊行物が引用することによって完全に記載されたかのように本明細書中に取り込まれるべきものと明確に、かつ個別的に表示されたかのように、引用することによって本明細書中に取り込まれている。

【0019】

〔定義〕

以下の定義は、本明細書中でしばしば使用される特定の用語の理解を容易にするために提供される。

【0020】

「I G S 5 8」は特に、S E Q I D N O : 2 に規定されるアミノ酸配列を含んで成るポリペチドもしくはそのバリエーションを指す。

【0021】

「受容体活性」もしくは「受容体の生物活性」とは、同様な活性もしくは向上した活性もしくは減少した望ましくない副作用を伴うこれらの活性を含む前記 I G S 5 8 の代謝もしくは生理学的機能を指す。また、前記 I G S 5 8 の抗原性および免疫原性の活性も含まれる。

【0022】

「I G S 5 8 遺伝子」とは、S E Q I D N O : 1 に規定されるヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチドもしくはその各バリエーション（例えば、その対立遺伝子バリエーションおよび/もしくはそれらの相補物）を指す。

【0023】

本明細書中で使用される「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、ヒト化抗体のほか、F a b もしくは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む F a b フラグメントを含む。

【0024】

「単離された」とは、天然の状態から「人の手によって」変更され、および/もしくは天然の環境から分離されたことを意味する。よって、天然に生じる「単離された」組成物もしくは物質が「単離された」ならば、それはそのオリジナルの環境から変更され、もしくは除去され、もしくはその両方を行なわれている。たとえば、生きている動物中に天然に存在するポリヌクレオチドもしくはポリペチドは「単離」されていないが、その天然状態で共に存在する物質から分離された同じポリヌクレオチドもしくはポリペチドは、この用語が本明細書中で使用されるように、「単離」されている。

【0025】

「ポリヌクレオチド」は、あらゆるポリリボヌクレオチドもしくはポリデオキシリボヌクレオチドを一般に指し、未修飾の R N A もしくは D N A、または修飾された R N A もしくは D N A でありうる。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖および二本鎖の D N A、一本鎖

10

20

30

40

50

および二本鎖の領域の混合であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、一本鎖および二本鎖の領域の混合であるRNA、一本鎖または、より一般的には二本鎖もしくは一本鎖および二本鎖の領域の混合でありうるDNAおよびRNAを含んで成る混成分子を限定することなく含む。さらに、「ポリヌクレオチド」には、RNAもしくはDNAもしくはRNAとDNAの両方を含んで成る三本鎖領域もまた含む。また、ポリヌクレオチドという用語には、安定性もしくは他の理由のために、1つ以上の修飾塩基を含むDNAもしくはRNA、および修飾された骨格を持つDNAもしくはRNAも含む。「修飾」塩基には、例えば、トリチル化塩基および、イノシンのような通常は見られない塩基を含む。さまざまな修飾がDNAおよびRNAに対して行なわれている；よって、「ポリヌクレオチド」は天然に一般に見出されるような、化学的、酵素的、もしくは代謝的に修飾された形のポリヌクレオチド、ならびに、ウイルスおよび細胞に特有なDNAおよびRNAの化学形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

10

【0026】

「ポリペチド」とは、ペプチド結合もしくは修飾ペプチド結合（すなわちペプチド・イソスター）によって互いに繋がれた2つ以上のアミノ酸を含んで成る、あらゆるペプチドもしくはタンパク質を指す。「ポリペチド」とは、一般にペプチド、オリゴペプチドもしくはオリゴマーと呼ばれる短い鎖、および一般にタンパク質と呼ばれるより長い鎖、および/もしくはそれらの組み合わせを指す。ポリペチドは、遺伝子にコードされる20種のアミノ酸以外のアミノ酸を含みうる。「ポリペチド」には、翻訳後プロセッシングのような天然の過程、もしくは、当該技術分野において公知の化学修飾技法のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列を含む。そのような修飾は、基本的なテキストおよびより詳細な研究書のほか、豊富な研究論文によく記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖および、アミノもしくはカルボキシル末端を含む、ポリペチド中のあらゆる所に生じうる。同じ型の修飾が、与えられたポリペチド中のいくつかの部位に同一もしくは変化する程度で存在しうるということが理解されるであろう。また、与えられたポリペチドは多くの型の修飾を含みうる。ポリペチドはユビキチン結合の結果として分岐されることができ、また、それらは分枝を持つ環状もしくは分枝を持たない環状でありうる。環状、分枝状、分枝環状のポリペチドは、翻訳後の天然プロセスに起因して生じるか、もしくは合成的方法によって作製されうる。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合；架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋形成、シスチン形成、ピログルタミン酸形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質に対するアミノ酸のt-RNA媒介付加、ならびにユビキチン結合を含む。例としては、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 and World, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seiffter et al., Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646およびRattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663:

20

30

40

50

48 - 62を見よ。

【0027】

「バリエーション」とは、本明細書中で用語が使用されるように、基準のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドからそれぞれ異なっているが、本質的な生物学的性質、構造的性質、制御もしくは生化学的性質といった本質的性質を保持しているポリヌクレオチドもしくはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的なバリエーションは、別の、基準のポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。バリエーションのヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えてもよいし、変えなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下に議論されるように、基準配列によってコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合、および切断をもたらす。ポリペプチドの典型的なバリエーションは、別の、基準のポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般には、基準ポリペプチドとバリエーションの配列が全体的に極めて類似で、多くの領域では同一となるように、差異は限定される。バリエーションおよび基準ポリペプチドは、あらゆる組み合わせの1つ以上の置換、付加および欠失によってアミノ酸配列が異なりうる。置換されたか、もしくは挿入されたアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされたものであっても、もしくは、そうでなくてもよい。ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドのバリエーションは、対立遺伝子バリエーションのような天然に生じるものでも、もしくは、それは天然に生じることが知られていないバリエーションであってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然には生じないバリエーションは、突然変異生成技法によって、もしくは直接合成によって作製されうる。

10

20

【0028】

「同一性」は、ヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、配列は最も高いオーダーの一致が得られるように整列される。「同一性」それ自体は、当該技術分野において認識された意味を有しており、公表された技法を用いて計算されうる。例えば、COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed.; Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991を見よ。2つのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド配列間の同一性を測定するための多くの方法が存在しており、「同一性」という用語は当業者にとって公知である (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48: 1073)。2つの配列間の同一性もしくは類似性を決定するために一般に使用される方法には、Guide to HUGO Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994、および Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48: 1073に開示されているものを、それらに限定することなく含む。同一性および類似性を決定する方法は、コンピュータプログラムにコードされている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法には、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1): 387)、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215: 403)を含むが、それらに限定されない。「相同性」という語は「同一性」

30

40

50

という語に置換されうる。

【0029】

例示として、SEQ ID NO: 1の基準ヌクレオチド配列に対して少なくとも、例えば、95%の「同一性」を持つヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチド配列がSEQ ID NO: 1の基準ヌクレオチド配列各100ヌクレオチドにつき、最高5つまでのヌクレオチドの違いを含みうることを意味する。言い換えれば、基準ヌクレオチド配列が基準配列と同一であることを意味する。言い換えれば、基準ヌクレオチド配列と少なくとも95%が同一なヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドを得るためには、基準配列中のヌクレオチドの任意の5%までが削除され、もしくは別のヌクレオチドと置換されるか、または、基準配列の全ヌクレオチドの5%までの任意の数のヌクレオチドが基準配列中に挿入されるか、あるいは、基準配列の全ヌクレオチドの5%までの任意の数のヌクレオチドに、欠失、挿入および置換の組み合わせが起こりうる。これらの差異は、基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端、または、これら末端位の間のごくにおいて、基準配列内のヌクレオチドの中に個別に分散して、もしくは基準配列中の1ヶ所以上の近接したグループ内に分散して生じうる。

10

【0030】

同様に、SEQ ID NO: 2の基準アミノ酸配列に対して少なくとも、例えば、95%の「同一性」を持つアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、ポリペプチド配列がSEQ ID NO: 2の基準アミノ酸配列各100アミノ酸につき、最高5つまでのアミノ酸の違いを含みうることを意味する。言い換えれば、基準アミノ酸配列に少なくとも95%が同一なアミノ酸配列を持つポリペプチドを得るためには、基準配列中の5%までの任意のアミノ酸が削除されるか、もしくは別のアミノ酸と置換されるか、または、基準配列の全アミノ酸の5%までの任意の数のアミノ酸が基準配列中に挿入される。基準配列のこれらの変更は、基準アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、または、これら末端位置の間のごくにおいて、基準配列内の残基の中に個別に分散して、もしくは基準配列内の1ヶ所以上の近接したグループ内に分散して生じうる。

20

【0031】

〔本発明のポリペプチド〕

一つの態様では、本発明はIGS58ポリペチド(IGS58タンパク質を含む)に関する。IGS58ポリペチドには、SEQ ID NO: 2のポリペチドおよび、2001年8月30日にユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmculturesに寄託された受託番号CBS109717中に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペチド、ならびにSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含んで成るポリペチドおよび、ユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmculturesの受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペチド、ならびにSEQ ID NO: 2および/もしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmculturesにおける受託番号CBS109717中に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペチドに対して、全長にわたり、少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、そして、さらにより好ましくは前記アミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を持つアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドを含む。さらに、少なくとも97%、特に少なくとも99%の同一性を持つものは非常に好ましい。SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を持つポリペチドもしくはユトレヒト(オランダ)のCentraalbureau voor Schimmculturesにおける受託番号CBS109717中に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を持つポリペチドに対して、全長にわたり、少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、そして、さらにより好ましくはSEQ ID NO: 2に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を持つポ

30

40

50

リペチドもまた、IGS58ポリペチドの範囲内に含まれる。さらに、少なくとも97%、特に少なくとも99%の同一性を持つものは非常に好ましい。好ましくは、IGS58ポリペチドは少なくとも一つの受容体生物活性を示す。

【0032】

本発明のさらなる実施態様では、IGS58ポリペチドは融合タンパクのような、より大きなタンパク質の一部でありうる。分泌もしくはリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基のような精製を助ける配列、抗原性ペプチドタグ（ヘマグルチニン（HA）タグなど）のような検出を助ける配列、または、組換え体生産中の安定性のための付加的な配列を含むさらなるアミノ酸配列を含めることは、しばしば有利である。

【0033】

IGS58ポリペチドのフラグメントもまた、本発明に含まれる。フラグメントとは、前記のIGS58ポリペチドのアミノ酸配列の全部ではなく、一部と同一であるアミノ酸配列を有するポリペチドである。IGS58ポリペチドと同様に、フラグメントは「独立的（free-standing）」でありえ、つまり、最も好ましくは単一の連続した領域として、それらがその一部もしくは領域を形成する、より大きなポリペチドの中に含まれうる。発明のポリペチド・フラグメントの代表的な例は、例えば、アミノ酸番号がだいたい1~20、21~40、41~60、61~80、81~100および101からIGS58ポリペチドの終わりまでのフラグメントを含む。この文脈において、「だいたい」には特に列挙された範囲からどちらかの端もしくは両方の端に、いくつか、5、4、3、2もしくは1アミノ酸だけより大きいもの、もしくはより小さいものを含む。

【0034】

好ましいフラグメントには、例えば、アミノ末端を含む連続した一連の残基の欠失、もしくはカルボキシル末端を含む連続した一連の残基の欠失、もしくは一つがアミノ末端を含み、一つがカルボキシル末端を含む2つの連続した一連の残基の欠失を除き、IGS58ポリペチドのアミノ酸配列を持つ切り詰められたポリペチドを含む。また、ヘリックス、ヘリックス形成領域、シートおよびシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性部分、両親媒性領域、両親媒性領域、可動領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原インデクス（high antigenic index）領域といった構造的もしくは機能的属性によって特徴付けられるフラグメントもまた好ましい。他の好ましいフラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントとは、同様な活性もしくは向上した活性、もしくは減少した望ましくない活性をもつものを含む、受容体活性を媒介するものである。また、動物、特にヒトにおいて、抗原性もしくは免疫原性であるものも含まれる。

【0035】

このように、本発明のポリペチドには、SEQ ID NO: 2および/もしくはユトレヒト（オランダ）のCentraalbureau voor Schimmculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列を持つポリペチドと少なくとも80%が同一であるアミノ酸配列を有するポリペチド、または対応するフラグメントと少なくとも80%が同一であるそのフラグメントを含む。好ましくは、これらのポリペチド・フラグメントのすべてが、抗原活性を含む受容体の生物活性を保持する。また、定義された配列およびフラグメントのバリエーションも本発明の一部を構成する。好ましいバリエーションは、保存的なアミノ酸置換（すなわち、似た特性の別の残基によって残基を置換するもの）によって基準と異なっているものである。典型的なそのような置換は、Ala、Val、LeuおよびIleの間、SerとThrの間、酸性残基のAspとGluの間、AsnとGlnの間、塩基性残基のLysとArgの間、もしくは、芳香性残基のPheとTyrの間のものである。特に好ましいものは、数個、5~10、1~5、もしくは1~2個のアミノ酸があらゆる組み合わせで置換、欠失もしくは付加されているバリエーションである。

【0036】

10

20

30

40

50

本発明のIGS58ポリペチドは、あらゆる適当な方法において調製されうる。そのようなポリペチドには、単離された天然に生じるポリペチド、組換えによって生産されたポリペチド、合成的に生産されたポリペチド、もしくは、これらの方法の組み合わせによって生産されたポリペチドを含む。そのようなポリペチドを調製する方法は、当該技術分野において公知である。

〔本発明のポリヌクレオチド〕

本発明のさらなる態様はIGS58ポリヌクレオチドに関する。IGS58ポリヌクレオチドには、IGS58ポリペチドおよびフラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチド、ならびにそれらに密接に関係するポリヌクレオチドを含む。より明確には、本発明のIGS58ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1に含まれるヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド（たとえば、SEQ ID No: 2のIGS58ポリペチドをコードすることができるもの）、SEQ ID No: 1の特定の配列を持つポリヌクレオチド、および、ユトレヒト（オランダ）のCentraal bureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートに本質的に対応するポリヌクレオチドを含む。

10

【0037】

IGS58ポリヌクレオチドはさらに、SEQ ID NO: 2のIGS58ポリペチドをコードするヌクレオチド配列に対し、全長にわたって、少なくとも80%の同一性を持つヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド、SEQ ID NO: 1の配列と全長にわたって少なくとも80%が同一であるヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド、および、ユトレヒト（オランダ）のCentraal bureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートに本質的に対応するポリヌクレオチドを含む。

20

【0038】

この点については、少なくとも90%の同一性を持つポリヌクレオチドは特に好ましく、少なくとも95%の同一性を持つものは、ことのほか好ましい。さらに、少なくとも97%の同一性を持つものは非常に好ましく、少なくとも98~99%の同一性を持つものは極めて非常に好ましく、少なくとも99%の同一性を持つものは最も好ましい。また、SEQ ID NO: 1に含まれるヌクレオチド配列に対して、もしくは、ユトレヒト（オランダ）のCentraal bureau voor Schimmelculturesにおける受託番号CBS109717に含まれるDNAインサートに対して、増幅に使用可能な条件下でハイブリダイズするために、またはプローブもしくはマーカーとして使用するために十分な同一性を持つヌクレオチド配列もIGS58ポリヌクレオチドの下に含まれる。本発明はまた、そのようなIGS58ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも提供する。

30

【0039】

本発明のIGS58は、BLAST検索の結果で示されるように、Gタンパク質共役受容体ファミリーの他のタンパク質と構造的に関連している。表2（SEQ ID NO: 2）のアミノ酸配列は、ヒト白血球血小板活性化因子受容体をあらわすと主張される配列に最も類似していた（アライメントされた312残基について92%の同一性；GenBank登録番号Q14968；しかし、このタンパク質は322残基の長さしかない）。このように、本発明のIGS58ポリペチドおよびポリヌクレオチドは、とりわけ、それらの相同なポリペチドおよびポリヌクレオチドと同様な生物学的機能/性質を持つことが期待され、そして、それらの実用性は当該技術分野における熟練した誰にとっても明らかである。

40

【0040】

本発明のポリヌクレオチドは、ゲノムDNAのような天然の供給源から取得されうる。特に、特定のGPCR遺伝子サブファミリー内で保存されている領域をコードする縮重PCRプライマーが設計されうる。縮重プライマーを用いたゲノムDNAもしくはcDNAのPCR増幅反応は、考慮中の遺伝子ファミリーのいくつかのメンバー（既知と新規の両方

50

)の増幅をもたらすであろう(ゲノム鋳型が用いられる場合は、縮重プライマーは同一エキソン内に位置しなければならない)(Libert et al., Science, 1989, 244:569-572)。また、本発明のポリヌクレオチドは、よく知られている商業的に利用可能な技法(たとえば、F. M. Ausubel et al., 2000, Current Protocols in Molecular Biology)を用いて合成されることもできる。

【0041】

SEQ ID NO: 2のIGS58ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1に含まれるポリペプチドコード配列(ヌクレオチド番号26~1471)と同一であってもよく、あるいは、それは、遺伝コードの冗長性(縮重)の結果として、SEQ ID NO: 1に含まれるペプチドコード配列に比べ変更も示すが、SEQ ID NO: 2のポリペプチドもコードする、異なるヌクレオチド配列であってもよい。

10

【0042】

本発明のポリヌクレオチドがIGS58ポリペプチドの組換え体生産のために用いられる場合、ポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドもしくはそのフラグメントのコード配列それ自体;リーダー配列もしくは分泌配列、プレもしくはプロもしくはプレプロ・タンパク質配列または他の融合ペプチド部分をコードするもののような他のコード配列と同じ読み枠にある成熟ポリペプチドもしくはフラグメントのコード配列を含みうる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされうる。本発明のこの態様のいくつかの好ましい実施態様では、マーカー配列はpQEベクター(Qiagen, Inc.)において提供され、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記述されるようなヘキサヒスチジンペプチド、もしくはHAタグである。ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化のシグナル、リボソーム結合部位および、mRNAを安定化する配列といった、非コード性の5'および3'配列も含みうる。

20

【0043】

さらなる好ましい実施態様は、数個、5~10、1~5、1~3、1~2もしくは1個のアミノ酸残基が任意の組み合わせで置換、削除もしくは付加されているSEQ ID NO: 2のIGS58ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成るIGS58バリエーションをコードしているポリヌクレオチドである。

30

【0044】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子産物のクローニング、プロセッシングおよび/もしくは発現の修正を含むがそれらに限定されない種々の目的のためにIGS58コード配列を変更するために、当該技術分野において一般に知られている方法を用いて操作されうる。遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドのランダムな断片化とPCRによる再集合によるDNAシャッフリングが、ヌクレオチド配列を操作するために使用されうる。たとえば、オリゴヌクレオチドの媒介による部位特異的変異誘発が、アミノ酸置換を行ない、新たな制限部位を創出し、修飾(たとえば、グリコシル化もしくはリン酸化)のパターンを変化させ、コドン優先性を変更し、スプライシング・バリエーションを生成するといった変異を導入するために使用されうる。

40

【0045】

本発明はさらに、本明細書中において前述の配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点について、本発明は特に、ストリンジентな条件下で前述のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書中で使用される「ストリンジентな条件」という用語は少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも97%、特に少なくとも99%の同一性が、配列間に存在する場合にのみ、ハイブリダイゼーションが起こることを意味する。

【0046】

50

SEQ ID NO: 1に含まれるヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントと同一もしくは十分に同一である本発明のポリヌクレオチドは、IGS58をコードしている完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するため、および、IGS58遺伝子に対して高い配列類似を持つ他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローン(ヒト以外の種のホモログおよびオーソログをコードしている遺伝子を含む)を単離するための、cDNAおよびゲノムDNAのためのハイブリダイゼーション・プローブとして用いられうる。当該技術分野における熟練した人々は、そのようなハイブリダイゼーション技法をよく知っている。一般的に、これらのヌクレオチド配列は基準配列に対して80%の同一性を持ち、好ましくは90%の同一性を持ち、より好ましくは95%の同一性を持つ。プローブは一般に、少なくとも5ヌクレオチドを含んで成り、好ましくは少なくとも8ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも10ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも12ヌクレオチド、特には少なくとも15ヌクレオチドを含んで成る。最も好ましくは、そのようなプローブは少なくとも30ヌクレオチドを有し、少なくとも50ヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは30~50ヌクレオチドの範囲である。

10

20

30

40

50

【0047】

ヒト以外の種からホモログおよびオーソログを含むIGS58ポリペチドをコードするポリヌクレオチドを得るための一つの実施態様は、SEQ ID NO: 1もしくはそのフラグメントを有する標識プローブによりストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングし、前記ポリヌクレオチド配列を含んで成る完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するステップを含んで成る。そのようなハイブリダイゼーション技法は、当該技術分野における熟練者にはよく知られている。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件とは上で定義された通り、あるいは、50%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン(w/v)および20μg/ml変性剪断サケ精液DNAを含んで成る溶液中において42で一晩インキュベートした後、約65の0.1×SSC中でフィルターを洗浄した下での条件である。

【0048】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペチドは、動物およびヒトの疾患に対する処置および診断の発見のための研究試薬および材料として用いられうる。

【0049】

〔ベクター、宿主細胞、発現〕

本発明はまた、ポリヌクレオチドもしくは本発明のポリヌクレオチドを含んで成るベクター、および本発明のベクターで遺伝的に操作された宿主細胞、ならびに、組換え技術による本発明のポリペチドの製造にも関する。本発明のDNAコンストラクトに由来するRNAを使って、そのようなタンパク質を合成するために、無細胞翻訳系もまた用いられうる。

【0050】

組換え体の生産のためには、本発明のポリヌクレオチドのための発現系もしくはその一部を取り入れるために、宿主細胞が遺伝的に操作されうる。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY(1986)およびSambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)のような多くの標準的な実験室マニュアルに記述されている方法(たとえば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション(transfection)、マイクロインジェクション、カチオン脂質媒介トランスフェクション法、電気穿孔法、トランスダクション、スクレーパーローディング(scrape loading)、弾道導入法(ballistic introduction)、もし

くは感染など)によって実施されうる。

【0051】

適当な宿主の代表的な例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ストレプトマイセスおよび枯草菌のような細菌細胞；酵母細胞およびコウジカビ細胞のような真菌細胞；シヨウジョウバエS2およびハスモンヨトウスf9細胞のような昆虫細胞；CHO、COS、Hella、C127、3T3、BHK、HEK293およびBowesメラノーマ細胞のような動物細胞；および植物細胞を含む。

【0052】

多種多様な発現系が用いられうる。そのような系には、とりわけ、染色体、エピソームおよびウイルスから誘導された系、たとえば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメントから誘導されたベクター、バキュロウイルス、パポバ・ウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルスから誘導されたベクター、ならびに、プラスミドとバクテリオファージ遺伝子エレメントに由来するものやコスミドとファージミドに由来するものといった、それらの組み合わせから誘導されたベクターを含む。発現系は発現を発生させ、調節する制御領域を含みうる。一般に、宿主細胞中においてポリペチドを生成するためのポリヌクレオチドを維持、増殖もしくは発現するのに適したあらゆる系もしくはベクターが使用されうる。適当なヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (前出)に述べられているもののような、公知のルーチン的な種々の技法のいずれによっても、発現系内に挿入されうる。

10

20

【0053】

小胞体の内腔、細胞膜周辺腔もしくは細胞外環境への翻訳されたタンパク質の分泌のために、適当な分泌シグナルが望みのポリペチドに取り込まれてもよい。これらのシグナルはポリペチドに内在するものであっても、もしくは異種性のもの(つまり異なる種に由来するもの)であってもよい。

【0054】

IGS58ポリペチドがスクリーニングアッセイにおける使用のために発現されるものである場合には、一般に、ポリペチドは細胞の表面で生成されることが好ましい。この場合には、細胞はスクリーニングアッセイにおける使用の前に回収されうる。IGS58ポリペチドのアフィニティーもしくは機能活性が受容体活性修正タンパク質(RAMP)によって変更される場合には、最もありそうなことには細胞の表面における関連するRAMPの同時発現が好ましく、しばしば要求される。また、この場合、スクリーニングアッセイにおける使用の前に、IGS58ポリペチドおよび関連するRAMPを発現している細胞の回収が要求される。IGS58ポリペチドが培地に分泌される場合は、ポリペチドを回収し、精製するために、培地が回収されうる；細胞内に生成される場合は、ポリペチドが回収される前に、まず細胞が溶解されなければならない。IGS58ポリペチドを発現している膜は、当該技術分野における熟練者にとって公知の方法によって回収されることができる。一般に、そのような方法には、IGS58ポリペチドを発現している細胞の回収および、ポッターリング(pottering)のような手法(これに限定はされない)による細胞のホモジナイゼーションを含む。膜は懸濁液を1回もしくは数回、洗浄することによって回収されうる。

30

40

【0055】

IGS58ポリペチドは、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィーおよびレクチン・クロマトグラフィーを含む公知の方法によって、組換え細胞培養から精製されうる。最も好ましくは、高性能液体クロマトグラフィーが精製のために使用される。ポリペチドが単離および/もしくは精製の間に変性する

50

場合には、タンパク質の再フォールディングのためによく知られている技法が活性コンフォメーションを再生させるために用いられうる。

【0056】

〔診断的アッセイ〕

本発明は診断試薬としての使用のためのIGS58ポリヌクレオチドの使用にも関する。機能不全に関連したIGS58遺伝子の変異型の検出は、IGS58の過少発現、過剰発現もしくは異常発現に起因する疾患もしくは疾患への感受性の診断に加えることができる診断ツール、もしくはそれを明確にすることができるツールを提供するであろう。また、この場合、望まれる品質の診断アッセイを得るためには、関連する受容体活性修正タンパク質の同時発現が要求されうる。IGS58遺伝子に突然変異を有する個体は、さまざまな技法によってDNAレベルで検出されうる。

10

【0057】

診断のための核酸は、血液、尿、唾液、組織生検もしくは死体解剖からの材料のような、被検者の細胞から得られうる。ゲノムDNAは検出のために直接用いられるか、または、解析の前にPCRもしくは他の増幅技術を用いることによって酵素的に増幅されうる。RNAもしくはcDNAもまた、同様な方法で使用されうる。欠失および挿入は正常な遺伝子型と比較した増幅産物のサイズの変化によって検出されうる。点変異は、増幅されたDNAを標識IGS58ヌクレオチド配列にハイブリダイズさせることによって同定されうる。完全にマッチした配列はRnase切断によって、もしくは融解温度の差異によって mismatchesを持つ二重鎖から区別されうる。また、DNA配列の差異は、変性剤の存在下もしくは非存在下におけるゲル中のDNA断片の電気泳動移動度の変化によって、もしくは、直接的なDNA塩基配列決定によって検出されうる。Myers et al., Science (1985) 230: 1242を見よ。特定の位置の配列変化は、ヌクレアーゼ・プロテクション・アッセイ(例えば、RNaseおよびS1プロテクション、もしくは化学切断法)によっても明らかにされうる。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401を見よ。別の実施態様では、IGS58ヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントを含んで成るオリゴヌクレオチド・プローブのアレイが、たとえば、遺伝的変異の効率的なスクリーニングを実施するために作製されうる。アレイテクノロジー法は公知であり、一般的な適用性を有しており、遺伝子発現、遺伝的連鎖、および遺伝的多様性を含む分子遺伝学における種々の問題について言及するために使用されうる(例えば、M. Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)を見よ)。

20

30

【0058】

診断的アッセイは、記述された方法によるIGS58遺伝子の突然変異の検出を通して、とりわけ、上記のような疾患を診断し、もしくは、それに対する感受性を決定するための方法を提供する。この診断アッセイは特に、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系(胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など)に関係する機能不全、障害もしくは疾患に対する感受性を、記述された方法によるIGS58遺伝子中の変異の検出を通して、診断もしくは決定するための方法を提供する。

40

【0059】

さらに、とりわけ、上記のような疾患は、被検者に由来するサンプルにおいて異常に減少もしくは増加したIGS58ポリペチドもしくはIGS58 mRNAの量を決定することを含んで成る方法によって診断されうる。特に、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系(例えば、胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床)に関係する機能不全、障害もしくは疾患は、異常に減少もしくは増加したIGS58ポリペチドもしくはIGS58 mRNAの量を被検者に由来するサンプルから決定することを含んで成る方法によって診断されうる。

【0060】

減少もしくは増加した発現は、例えば、PCR、RT-PCR、RNaseプロテクショ

50

ン、ノーザンブロットイング、および他のハイブリダイゼーション法といったポリヌクレオチドの定量のために当該技術分野においてよく知られている方法のいずれかを用いて、RNAのレベルで測定されうる。宿主に由来するサンプル中のタンパク質（例えばIGS58）の量を決定するために用いられうるアッセイ技法は、当該技術分野における熟練者にとって公知である。そのようなアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、結合蛋白競合測定法、ウエスタンブロット解析およびELISAアッセイを含む。

【0061】

別の態様では、本発明は、とりわけ上述のような疾患もしくは疾患に対する感受性についての診断キットに関する。特に、本発明は、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系（胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など）に関係する機能不全、障害もしくは疾患についての診断キットに関する。

10

このキットは、

- (a) IGS58ポリヌクレオチド、好ましくはSEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列、もしくはそのフラグメント；および/もしくは
 - (b) (a)の配列に相補的なヌクレオチド配列；および/もしくは
 - (c) IGS58ポリペプチド、好ましくはSEQ ID NO: 2のポリペプチド配列、もしくはそのフラグメント；および/もしくは
 - (d) IGS58ポリペプチドに対する抗体、好ましくはSEQ ID NO: 2のポリペプチドに対する抗体；および/もしくは
 - (e) IGS58ポリペプチドの関連する生物学的もしくは抗原性の性状のために要求されるRAMPポリペプチド；
- を含んで成る。

20

【0062】

あらゆるそのようなキットにおいて(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)が実質的な成分を構成しうるということが認識されるであろう。

〔染色体アッセイ〕

本発明のヌクレオチド配列はまた、染色体の同定にも価値を持つ。この配列は個々のヒト染色体上の特定の位置へと特異的に誘導され、ハイブリダイズできる。本発明に従う染色体への関連する配列のマッピングは、それらの配列を遺伝子関連疾患に関連させることにおける重要な第一段階である。いったん配列が正確な染色体の位置にマップされたならば、染色体上の配列の物理位置は遺伝子地図データと相関付けられることができる。そのようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通してオンラインで利用可能)に見出される。同じ染色体の領域にマップされた遺伝子と疾患の関係は、それから、連鎖解析（物理的に隣接する遺伝子の共遺伝）を通して同定される。

30

【0063】

罹患した個体と罹患していない個体とのcDNAもしくはゲノム配列中の差異もまた決定されうる。罹患した個体の一部もしくは全部において変異が観察されるが、正常な個体ではまったく見られない場合には、この変異が疾患の原因因子である可能性が高い。

40

【0064】

〔抗体〕

本発明のポリペプチドもしくはそれらのフラグメントもしくはそれらの類似体またはそれらを発現している細胞は、もし必要であれば関連するRAMPと共に、IGS58ポリペプチドに免疫特異的な抗体を作製するために、免疫原としても使用されうる。「免疫特異的」という用語は、抗体が本発明のポリペプチドに対して、先行技術における関連する他のポリペプチドに対するアフィニティーよりも、実質的により大きなアフィニティーを有することを意味する。

【0065】

50

I G S 5 8 ポリペチドに対して作製された抗体は、ポリペチドもしくはエピトープを含むフラグメント、類似体もしくは細胞を、ルーチ的なプロトコールを用いて動物に、好ましくはヒト以外の動物に投与することにより取得されうる。モノクローナル抗体の調製のためには、継続的な細胞株培養によって生産される抗体を提供する、あらゆる技法が使用されうる。例には、ハイブリドーマ技術 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495 - 497)、トリオーマ (trioma) 技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72)、およびEBVハイブリドーマ技術 (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., 1985) を含む。 10

【0066】

上述の抗体は、ポリペチドを発現しているクローンを単離するため、もしくは同定するため、もしくはアフィニティー・クロマトグラフィーによってポリペチドを精製するために利用されうる。

【0067】

また、I G S 5 8 ポリペチド自体、もしくはI G S 5 8 ポリペチドRAMP複合体に対する抗体は、とりわけ、上述のような疾患を処置するために使用されうる。特に、I G S 5 8 ポリペチド自体に対する抗体もしくはポリペチドRAMP複合体に対する抗体は、精巢、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系 (胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃核、脳梁、海馬および視床など) に関する機能不全、障害もしくは疾患を処置するために使用されうる。 20

【0068】

〔動物〕

本発明の別の態様は、I G S 5 8 の異常な発現もしくは活性から生じる疾患のモデルとして働くヒト以外の動物に基づく系に関する。ヒト以外の動物に基づくモデル系は、I G S 5 8 遺伝子の活性をさらに特徴づけるためにも使用されうる。そのような系は、とりわけ、上述の疾患のようなI G S 5 8 に基づく疾患を処置することができる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として利用されうる。特に、この系は、精巢、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系 (胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃核、脳梁、海馬および視床など) に関するI G S 5 8 に基づく機能不全、障害もしくは疾患を処置することのできる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として利用されうる。 30

【0069】

このようにして、動物に基づくモデルは、I G S 5 8 の異常な発現もしくは活性を持つ疾患の処置に有効な製薬化合物、治療、および介入を同定するために使用されうる。さらに、そのような動物モデルは、被検動物におけるLD₅₀ およびED₅₀ を決定するために使用されうる。これらのデータは、潜在的なI G S 5 8 疾患処置のin vivoにおける効能を決定するために用いられうる。

【0070】

異常なI G S 5 8 の発現もしくは活性に基づく、I G S 5 8 に基づく疾患の動物に基づくモデル系は、非組換え動物および組換えにより操作されたトランスジェニック動物の両方を含みうる。 40

【0071】

I G S 5 8 疾患のための動物モデルは、例えば、遺伝的モデルを含みうる。I G S 5 8 に基づく疾患のような症状を呈する動物モデルは、例えば、当該技術分野における熟練者に公知のトランスジェニック動物を生成するための技法と組み合わせて、上述のもののようなI G S 5 8 配列を利用することによって操作されうる。たとえば、I G S 5 8 配列は、目的の動物のゲノム内に導入され、過剰発現され、および/もしくは誤発現されることができ、または、内在性のI G S 5 8 配列が存在する場合には、それらは過剰発現され、誤 50

発現され、あるいは、IGS58 遺伝子発現を過少に発現もしくは不活性化させるために乱されることができる。

【0072】

IGS58 遺伝子配列を過剰発現もしくは誤発現させるために、IGS58 遺伝子配列のコード部分は、高レベルな遺伝子発現もしくは、その遺伝子が目的の動物種において通常は発現されない細胞型における発現を駆動することのできる制御配列に連結されうる。そのような制御領域は当業者にとって公知であり、過度の実験を行わずに使用されうる。

【0073】

内在性 IGS58 遺伝子配列の過少発現のためには、そのような配列は、目的の動物のゲノム内に再導入されたときに、内在性 IGS58 遺伝子の対立遺伝子が不活性化つまり「ノックアウト」されるように単離され、操作されうる。好ましくは、操作された IGS58 遺伝子の配列は、内在性 IGS58 配列が、操作された IGS58 遺伝子配列の動物ゲノムへの組み込みに伴って乱されるように、遺伝子ターゲティングを介して導入される。

10

【0074】

マウス、ラット、ウサギ、リス、モルモット、ブタ、マイクロピッグ (micro pig)、ヤギおよびヒト以外の霊長類動物 (たとえば、ヒヒ、サルおよびチンパンジー) をそれらに限定することなく含む任意の種の動物が、IGS58 関連疾患の動物モデルを生成するために用いられうる。

【0075】

当該技術分野において知られているあらゆる技法が、トランスジェニック動物の初代 (founder) 系統を生成するために IGS58 導入遺伝子を動物に導入するために用いられうる。そのような技法には、前核マイクロインジェクション (Hoppe, P. C. and Wagner, T. E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); レトロウイルスの媒介による生殖細胞系列への遺伝子導入 (van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152, 1985); 胚性幹細胞における遺伝子ターゲティング (Thompson et al., Cell 56:313-321, 1989); 胚のエレクトロポレーション (Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814, 1983); および精子の媒介による遺伝子導入 (Lavitrano et al., Cell 57:717-723, 1989) などを含むが、それらに限定はされない。そのような技法の総説については、Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229, 1989 を見よ。

20

30

【0076】

本発明は、そのすべての細胞中に IGS58 導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、および、そのすべての細胞ではなく、いくつかのものに導入遺伝子を持つ動物 (すなわちモザイク動物) を提供する (例えば、Jakobovits, Curr. Biol. 4:761-763, 1994 によって記述された技法を見よ)。導入遺伝子は単一の導入遺伝子として、もしくはコンカテマー (例えば、先頭と先頭の向かい合ったタンデム型、もしくは先頭と尾部の並んだタンデム型) として組み込まれうる。導入遺伝子はまた、例えば、Lasko et al の教えに従って、特定の細胞型に選択的に導入され、活性化されることもできる (Lasko, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236, 1992)。

40

【0077】

そのような細胞型に特異的な活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、当該技術分野における熟練者にとっては明白である。

【0078】

IGS58 導入遺伝子が内在性 IGS58 遺伝子の染色体の部位に組み込まれることが要求される場合には、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡単に述べると、そのような技術が利用される場合、目的の内在性 IGS58 遺伝子 (例えば、マウス IGS58 遺伝子のヌクレオチド配列) に相同ないくつかのヌクレオチド配列を含むベクターが、染色体配列

50

との相同遺伝子組換えを通して内在性 I G S 5 8 遺伝子もしくは対立遺伝子のヌクレオチド配列内に組み込み、その機能を乱す目的で設計される。導入遺伝子はまた、たとえば、G u e t a l . の教えに従って、選択的に特定の細胞型に導入され、よって、その細胞型のみにおいて目的の内在性遺伝子を不活化することもできる。(G u , H . e t a l . , S c i e n c e 2 6 5 : 1 0 3 - 1 0 6 , 1 9 9 4) 。 そのような細胞型に特異的な不活化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、当該技術分野における熟練者にとっては明白である。

【 0 0 7 9 】

いったんトランスジェニック動物が作製されると、組換え I G S 5 8 遺伝子およびタンパク質の発現は、標準的な技法を利用して分析されうる。初期のスクリーニングは、導入遺伝子の組み込みが起こったか否かを評価するために動物組織を分析するサザンブロット分析もしくは P C R 手法によって達成されうる。また、トランスジェニック動物の組織中の I G S 5 8 導入遺伝子の m R N A 発現レベルは、動物から得られた組織サンプルのノーザンブロット解析、i n s i t u ハイブリダイゼーション解析、および R T - P C R をそれらに限定することなく含む技法を用いても評価されうる。また、標的遺伝子を発現している組織のサンプルは、目的の標的遺伝子の導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いた免疫細胞化学分析によっても評価されうる。I G S 5 8 遺伝子 m R N A もしくは I G S 5 8 導入遺伝子ペプチドを容易に検出可能なレベルで発現する I G S 5 8 トランスジェニック動物(標的遺伝子産物エピトープに対して作製された抗体を用いて、免疫細胞化学的に検出される)は、それから、I G S 5 8 に基づく特徴的な疾患症状を呈する動物を同定するために、さらに評価されうる。

【 0 0 8 0 】

いったん I G S 5 8 トランスジェニック初代動物(つまり、目的の細胞もしくは組織において I G S 5 8 タンパク質を発現し、好ましくは I G S 5 8 に基づく疾患の症状を示す動物)が作製された後は、それらは特定の動物のコロニーを生成するために飼育され、同系交配され、異系交配され、もしくは交雑育種される。そのような育種戦略の例には、別個の系統を確立するための、1つ以上の組み込み部位を持つ初代動物の異系交配;各 I G S 5 8 導入遺伝子の相加的発現効果のための、目的の I G S 5 8 導入遺伝子をより高いレベルで発現する複合 I G S 5 8 トランスジェニック動物を生成するための個別の系統の同系交配;発現を高め、D N A 解析による動物のスクリーニングの必要の可能性を排除するために、与えられた組み込み部位についてホモ接合性の動物を生成するためのヘテロ接合性のトランスジェニック動物の交雑;合成的なヘテロ接合性もしくはホモ接合性の系統を生成するための別個のホモ接合性系統の交雑;対立遺伝子の修正が I G S 5 8 導入遺伝子の発現および I G S 5 8 様症状の発生に与える影響を調べるための、異なる同系交配遺伝的背景への動物の育種;を含むがそれらに制限はされない。一つのそのようなアプローチは、上述のもののような I G S 5 8 関連疾患様症状を示す F 1 世代を生成するために、I G S 5 8 トランスジェニック初代動物と野生型系統を交配することである。F 1 世代はそれから、ホモ接合性の標的遺伝子トランスジェニック動物が生存可能であることが判明した場合には、ホモ接合性の系統を作製するために同系交配される。

【 0 0 8 1 】

〔ワクチン〕

発明の別の態様は、とりわけ上述の疾患から動物を保護する抗体および/もしくは T 細胞免疫応答を生じるのに十分な I G S 5 8 ポリペチドもしくはそのフラグメントを、もし必要であれば R A M P ポリペチドと一緒に、哺乳類に対して(たとえば、接種により)投与することを含んで成る、哺乳類において免疫応答を誘導する方法に関する。特に、本発明は精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺、および中枢神経系(例えば、胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床)に関係する機能不全、障害もしくは疾患から動物を保護する抗体および/もしくは T 細胞免疫応答を生じるのに十分な I G S 5 8 ポリペチドもしくはそのフラグメントを、もし必要であれば R A M P ポリペチドと一緒に、哺乳類に対して(たとえば、接種により)投与するこ

とを含んで成る、哺乳類において免疫応答を誘導する方法に関する。

【0082】

本発明のさらに別の態様は、疾患から哺乳類を保護するための抗体を生成するような免疫応答を誘導するために、*in vivo*におけるIGS58ポリヌクレオチドの発現を指示するベクターを通してIGS58ポリペチドを送達することを含んで成る、前記動物において免疫応答を誘導する方法に関する。

【0083】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物宿主内に導入されるとIGS58ポリペチドに対する免疫応答をその哺乳類において誘導する、IGS58ポリペチドもしくはIGS58遺伝子を含んで成る免疫学的/ワクチン製剤(組成物)に関する。そのような免疫学的/ワクチン製剤(組成物)は、治療用の免疫学的/ワクチン製剤、もしくは予防用の免疫学的/ワクチン製剤のいずれかでありうる。ワクチン製剤はさらに適当な担体を含んで成りうる。IGS58ポリペチドは胃の中で分解されうるため、非経口的に投与されることが好ましい(皮下、筋肉内、静脈内、皮内、その他の注射を含む)。非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、バッファー、静菌薬および、製剤を受容者の血液と等張性にする溶質を含みうる水性もしくは非水性の滅菌注射溶液、ならびに、懸濁剤もしくは増粘剤を含みうる水性および非水性の滅菌懸濁液を含む。この製剤は、例えば、封をされたアンプルおよびバイアルといった単位用量もしくは多用量容器に入れられて提示されることができ、また、使用の直前に無菌液体の添加のみを要求する凍結乾燥条件で保存されうる。ワクチン製剤はまた、たとえば水系中の油および当該技術分野において知られている他の系など、製剤の免疫原性を強化するためのアジュバント系を含みうる。投与量はワクチンの特異的な活性に依存し、ルーチン的な実験によって容易に決定されることができ。

【0084】

〔スクリーニングアッセイ〕

本発明のIGS58ポリペチドは、受容体を結合する化合物、および、活性化する化合物(アゴニスト)もしくは、本発明の受容体ポリペチドの活性化を阻害する化合物(アンタゴニスト)のスクリーニング・プロセスにおいて使用されうる。よって、本発明のポリペチドはまた、たとえば、細胞、無細胞調製液、ケミカルライブラリーおよび天然産物混合液における、小分子基質およびリガンドの結合を評価するためにも使用されうる。これらの基質およびリガンドは天然の基質およびリガンドでありえ、または、構造的もしくは機能的な模倣物でありうる。

【0085】

IGS58ポリペチドは病理を含む生物学的機能をもたらす。したがって、一方ではIGS58を刺激し、他方ではIGS58の機能を阻害することができる化合物および薬剤を見つけることが望ましい。一般に、アゴニストは、とりわけ上述の疾患のような状態に対する、治療的および予防的な目的のために利用される。特に、アゴニストは、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系(胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など)に関係する機能不全、障害もしくは疾患に対する治療的および予防的な目的のために利用される。

【0086】

アンタゴニストは、とりわけ上述の疾患のような状態に対する、さまざまな治療的および予防的な目的のために利用されうる。特に、アンタゴニストは、精巣、前立腺、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎、甲状腺および中枢神経系(胎性脳、脳、小脳、脊髄、尾状核、扁桃体、脳梁、海馬および視床など)に関係する機能不全、障害もしくは疾患に対する、さまざまな治療的および予防的な目的のために利用されうる。

【0087】

一般に、そのようなスクリーニング手順は、本発明の受容体ポリペチドをその表面に発現する適当な細胞を生成すること、および、もし必須であればその表面におけるRAMPOの同時発現を含む。そのような細胞には、哺乳類、酵母、ショウジョウバエもしくは大腸菌からの細胞を含む。受容体を発現している細胞(もしくは発現された受容体を含む細胞膜

10

20

30

40

50

)はそれから、結合もしくは刺激もしくは機能的反応の阻害を観察するために、試験化合物と接触させられる。

【0088】

スクリーニング技法には、細胞外pH、細胞内pHもしくは受容体の活性化に起因する細胞内カルシウムの変化を測定する系における、本発明の受容体を発現する細胞(例えば、トランスフェクトしたCHO細胞)の使用を含む。この技法では、化合物は本発明の受容体ポリペチドを発現している細胞に接触させられうる。それから、潜在的な化合物が受容体を活性化するか、もしくは阻害するか否かを決定するために、二次メッセンジャー反応(例えば、シグナル伝達、pH変化もしくはカルシウム濃度の変化)が測定される。

【0089】

別の方法は、受容体媒介シグナル(例えば、cAMPの蓄積および/もしくはアデニル酸シクラーゼ活性)の変調を決定することによる受容体阻害剤のスクリーニングを含む。そのような方法には、細胞表面上に受容体を発現するために、本発明の受容体を真核細胞にトランスフェクトすることを含む。細胞はそれから、潜在的なアンタゴニストの存在下で、本発明の受容体に対するアゴニストに暴露される。潜在的なアンタゴニストが受容体に結合し、よって受容体結合を阻害するならば、アゴニスト媒介シグナルは変調される。

【0090】

本発明の受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストを検出する別の方法は、米国特許第5,482,835号に記載されているような、酵母に基づく技法である。

【0091】

アッセイは単に、候補化合物の結合を試験してもよい。そして、ここにおいて、受容体を有する細胞への付着は、候補化合物に直接的もしくは間接的に結合する標識によって、または、標識競合物との競合を含むアッセイにおいて検出される。さらに、これらのアッセイは、受容体をその表面に有する細胞に適した検出系を使用して、候補化合物が受容体の活性化によって発生するシグナルをもたらすか否かを試験しうる。活性化の阻害剤は一般に既知のアゴニストの存在下で分析され、候補化合物の存在がアゴニストによる活性化に与える影響が観察される。

【0092】

さらに、アッセイは単に、混合液を形成するために候補化合物とIGS58ポリペチドを含む溶液を混ぜ合わせるステップ、混合液中のIGS58活性を測定するステップ、および、混合液のIGS58活性を標準と比較するステップを含んで成りうる。

【0093】

また、IGS58 cDNA、タンパク質およびタンパク質に対する抗体は、添加された化合物が細胞中のIGS58 mRNAおよびタンパク質の合成に与える影響を検出するためのアッセイを構成するためにも使用されうる。たとえば、ELISAは、当該技術分野において知られている標準的な方法により、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いて、IGS58タンパク質の分泌レベル、もしくは細胞に結合したレベルを測定するために構築されることができ、これは、適当に操作された細胞もしくは組織からのIGS58の合成を阻害もしくは増進しうる薬剤(それぞれ、アンタゴニストもしくはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために使用されうる。スクリーニング・アッセイを行なうための標準的な方法は、当該技術分野において公知である。

【0094】

潜在的なIGS58アンタゴニストの例には、抗体もしくは、いくつかの場合には、IGS58のリガンドに密接に関係したオリゴヌクレオチドもしくはタンパク質(たとえば、受容体の活性が妨げられるように受容体に結合するが、反応は引き出さないリガンドのフラグメントもしくは小分子)を含む。

【0095】

このように、別の態様において、本発明はIGS58ポリペチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、または、IGS58ポリペチドの合成を減少、増加および/もしくは他の方法で高める化合物を同定するためのスクリーニン

10

20

30

40

50

グ・キットであって、

- (a) I G S 5 8 ポリペチド、好ましくは S E Q I D N O : 2 のポリペプチド；
- (b) I G S 5 8 ポリペチド、好ましくは S E Q I D N O : 2 のポリペチドを発現している組換え細胞；
- (c) I G S 5 8 ポリペチド、好ましくは S E Q I D N O : 2 のポリペチドを発現している細胞膜；もしくは
- (d) I G S 5 8 ポリペチド、好ましくは S E Q I D N O : 2 のポリペプチドに対する抗体；

を含んで成るスクリーニング・キットに関する。

【0096】

そのようなあらゆるキットにおいて (a)、(b)、(c) もしくは (d) は実質的な成分を構成しうることが認識されるであろう。

【0097】

〔予防および治療の方法〕

本発明は、過剰な I G S 5 8 活性および不十分な I G S 5 8 活性の両方に関係する異常状態を処置する方法を提供する。

【0098】

I G S 5 8 の活性が過剰である場合には、いくつかのアプローチが利用できる。一つのアプローチは、リガンドの I G S 5 8 への結合をブロックすることによって、または、R A M P ペプチドもしくは二次シグナルとの相互作用を阻害することによって活性化を阻害し、それによって、異常な状態をやわらげるのに有効な量の上に記載されたような阻害剤化合物 (アнтаゴニスト) を製薬学的に許容しうる担体と共に患者に投与することを含んで成る。

【0099】

別のアプローチでは、内在性の I G S 5 8 と競合してリガンドを結合することができる可溶性形態の I G S 5 8 ポリペチドが投与されうる。そのような競合剤の典型的な実施態様は、I G S 5 8 ポリペチドのフラグメントを含んで成る。

【0100】

さらに別のアプローチでは、内在性の I G S 5 8 をコードしている遺伝子の発現が、発現ブロッキング技法を使って阻害されうる。既知のそのような技法には、内部で生成されるか、もしくは別個に投与されるアンチセンス配列の使用を含む。たとえば、O ' C o n n o r , J N e u r o c h e m (1 9 9 1) 5 6 : 5 6 0、O l i g o d e o x y n u c l e o t i d e s a s A n t i s e n s e I n h i b i t o r s o f G e n e E x p r e s s i o n , C R C P r e s s , B o c a R a t o n , F l o r i d a U S A (1 9 8 8) を見よ。あるいは、遺伝子と三重鎖を形成するオリゴヌクレオチドが供給されうる。たとえば、L e e e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s (1 9 7 9) 6 : 3 0 7 3 ; C o o n e y e t a l . , S c i e n c e (1 9 8 8) 2 4 1 : 4 5 6 ; D e r v a n e t a l , S c i e n c e (1 9 9 1) 2 5 1 : 1 3 6 0 を見よ。これらのオリゴマーはそれ自体が投与されることができ、もしくは、関連するオリゴマーが *i n v i v o* で発現されることができ、合成アンチセンスもしくは三重鎖オリゴヌクレオチドは、修飾された塩基もしくは修飾された骨格を含んで成りうる。後者の例には、メチルホスホネート、ホスホロチオネートもしくはペプチド核酸骨格を含む。そのような骨格は、ヌクレアーゼによる分解からの保護を提供するために、アンチセンスもしくは三重鎖オリゴヌクレオチド中に取り入れられ、当該技術分野において公知である。これら、もしくは他の修飾骨格により合成されたアンチセンスおよび三重鎖分子もまた、本発明の一部を構成する。

【0101】

さらに、I G S 5 8 ポリペチドの発現は、I G S 5 8 m R N A 配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げられうる。リボザイムとは、天然もしくは合成の触媒的に活性な R N A である (たとえば、U s m a n , N , e t a l . , C u r r . O p i n . S

10

20

30

40

50

truct. Biol (1996) 6(4), 527-33を見よ)。合成リボザイムは、選択された位置でIGS58 mRNAを特異的に切断し、それによって、IGS58 mRNAが機能的なポリペチドに翻訳されるのを妨げるように設計されうる。リボザイムは、通常RNA分子中に見いだされるような天然型のリボース・リン酸骨格および天然型の塩基によって合成されうる。あるいは、リボザイムは、リボヌクレアーゼ分解からの保護を提供するために、例えば、2'-O-メチルRNAなどの非天然骨格によって合成され、また、修飾された塩基を含んでもよい。

【0102】

また、IGS58の過少な発現およびその活性に関する異常状態の処置のためには、数種のアプローチが利用できる。一つのアプローチは、治療的に有効な量の上述のようなIGS58を活性化する化合物(すなわちアゴニスト)を薬学的に許容されうる担体と組み合わせて患者に投与し、それによって、異常状態をやわらげることを含んで成る。あるいは、遺伝子治療が患者の関連する細胞によるIGS58の内因的合成をもたらすために使用されうる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上で述べたように、複製に欠陥を持つレトロウイルスベクターによる発現用に設計されうる。レトロウイルス発現コンストラクトはそれから単離され、パッケージング細胞が目的遺伝子を含む感染力を持ったウイルス粒子を生成するように、本発明のポリペチドをコードしているRNAを含むレトロウイルス・プラスミドベクターを形質導入されたパッケージング細胞へと導入されうる。これらの生産細胞は、*in vivo*で細胞を操作するため、また、*in vivo*におけるポリペチドの発現のために患者に投与されうる。遺伝子治療の概要については、Human Molecular Genetics, Strachan T. and Read A. P., BIOS Scientific Publishers Ltd (1996)の第20章 Gene Therapy and other Molecular Genetic based Therapeutic Approaches (およびその中で引用されている参考文献)を見よ。

【0103】

上述の治療方法のいずれもが、そのような治療を必要としているあらゆる患者(たとえば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルのような哺乳類、最も好ましくはヒトを含む)に適用されうる。

〔製剤および投与〕

IGS58ポリペチドの可溶性形態のようなペプチド、およびアゴニスト、およびアンタゴニスト・ペプチド、もしくは小分子は、適当な製薬学的担体と組み合わせて調合されうる。そのような製剤は、治療的に有効な量のポリペチドもしくは化合物、および製薬学的に許容されうる担体もしくは賦形剤を含んで成る。製剤は投与の様式に適合すべきであり、十分に当該技術分野の技術の範囲内である。発明はさらに、1種以上の本発明の前述の組成物の成分が充填された1つ以上の容器を含んで成る製薬学的パックおよびキットに関する。

【0104】

本発明のポリペチドおよび他の化合物は単独で、もしくは、治療薬化合物のような他の化合物との併用で使用されうる。

【0105】

本製薬組成物の全身投与の好ましい形態は、一般的には静脈内注射による注射を含む。皮下、筋肉内もしくは腹腔内のような他の注射経路も使用されうる。全身投与のための代替的手段には、胆汁酸塩もしくはフシジン酸もしくは他の界面活性剤のような浸透剤を用いた経粘膜的および経皮的な投与を含む。さらに、腸溶性もしくは被包性の製剤に正しく調剤されたなら、経口投与もまた可能となりうる。

【0106】

必要な投与量の範囲は、ペプチドもしくは化合物の選択、投与の経路、製剤の性質、患者状態の性質、および担当医師の判断に依る。適当な投与量は患者の体重1kgあたり0.1~100μgの範囲にある。しかし、利用可能な化合物の種類およびさまざまな投与経

10

20

30

40

50

路の異なる効率を考慮すると、必要とされる投与量の広い変動が予期される。例えば、経口投与は静脈内注射による投与よりも高い投与量を必要とすることが予期されるであろう。これらの投与量レベルの変動は、当該技術分野においてよく理解されているように、最適化のための標準的な経験的ルーチンを使って調節されうる。

【0107】

処置に使われるポリペチドは、先に述べたように「遺伝子治療」としばしば呼ばれる処置様式において、患者中で内因的にも生成されうる。よって、例えば、患者由来の細胞は、DNAもしくはRNAのようなポリペチドをコードするポリヌクレオチドによって、例えば、レトロウイルス・プラスミドベクターを使用して *ex vivo* で操作されうる。細胞はそれから、患者内に導入される。

10

【0108】

【実施例】

以下の例は、本発明をより詳細にさらに具体的に示すことのみが意図されており、したがって、これらの例は決して本発明の範囲を限定するとはみなされない。

例1. 新規Gタンパク質共役受容体をコードするcDNAのクローニング。

【0109】

未完成のハイスループット・ゲノムDNA配列 (*htgs*) のパブリックドメイン・データバンク中に、我々は潜在的に新規のGタンパク質共役受容体 (GPCR) をコードするヒト・ゲノム配列 (登録番号: AL162471) を同定した。我々はこの新規GPCRをIGS58と呼ぶ。ヒト組織からそのcDNAをクローニングすることを試みることに
 20
 よって、このゲノム配列が機能的な遺伝子をあらわしているか否かを調査することが決定された。ヒト精巢ポリA (+) RNA (Clontech cat # 6535-1) は酵素の供給元によって推奨されるプロトコールに従って、まず、残存する微量のゲノムDNAを破壊するためにDNase I (Life Technologies) によって処置され、それから、SuperscriptTM II逆転写酵素 (Life Technologies) を使い、逆転写を通してcDNAに変換された。PCRプライマーは推定上のIGS58コード配列を増幅するように設計された。最初のPCR反応 (50 μ l 体積) はQiagenによって推奨される条件の下で、それぞれフォワードおよびリバースプライマーのIP15, 073 (SEQ ID NO: 3) およびIP15, 075 (SEQ ID NO: 4) と共にHotStarTaqTM DNAポリメラーゼ (Qiagen # 203203) を使って、精巢cDNA鋳型 (DNase Iで処置され、逆転写された50 ngのヒト精巢ポリA (+) RNAに由来) に対して実施された。PCR反応については、反応チューブは15分間95 で加熱され、それから35サイクルの変性 (30秒、95)、アニーリング (120秒、65) および伸長 (90秒、72) に付された。10分間、72の最終的な伸長が行なわれた。最初のPCR反応の1/50希釈の1 μ l が、それぞれネステッド・フォワードプライマーIP15, 074 (SEQ ID NO: 5) および最初のリバースプライマーIP15, 075 (SEQ ID NO: 4) と共にHotStarTaqTM DNAポリメラーゼ (Qiagen # 203203) を使用したセミネステッドPCR反応における鋳型として使用された。その後の便利なサブクローニングを可能とするために、BamHIクローニングサイト
 30
 40
 がIP15, 074の5'末端に追加された。ネステッドPCR反応のためのサイクリング条件は、最初のPCRのものと同であった。PCR反応産物はアガロースゲル電気泳動によって分析され、エチジウムブロマイドにより染色された。最初のPCR反応はシグナルを生じなかったが、セミネステッドPCR反応は約1600bpの明確なDNAフラグメントを生成した。模擬逆転写したRNA (逆転写反応中にSuperscriptTM IIを加えなかったもの) が使用された場合にはDNA産物は得られず、この1600bpフラグメントがcDNAに由来するものであることが示された。この \pm 1600bpフラグメントは、QiagquickTM 精製キット (Qiagen) を用いて精製され、供給元によって推奨される手順に従って、pGEM-Tベクターに連結された (pGEM-T system, Promega)。組み換えプラスミドはそれから、コンピ
 50

テント大腸菌株DH5 F⁺バクテリアを形質転換するために使用された。形質転換された細胞は、アンピシリン(100 µg/ml)、IPTG(0.5 mM)およびX-gal(50 µg/ml)を含むLB寒天プレート上に塗布された。プラスミドDNAはBioRobotTM 9600核酸精製システム(Qiagen)を使用して、個々の白色コロニーのミニ培養から精製され、シーケンシングされた。DNAシーケンシング反応は、インサートに隣接するプライマーと内部の(IGS58に特異的な)プライマーを使用し、ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット(PE Biosystems)によって、精製されたプラスミドDNAに対して実施された。サイクル・シーケンシング反応産物はEtOH/NaOAc沈殿によって精製され、ABI377自動シーケンサーにセットされた。クローンIGS58.6は1604 bpのDNA配列を含み、482アミノ酸のタンパク質をコードしていた。我々は、このDNA配列(BamHIクロニングサイトを含まない)およびコードされるタンパク質をそれぞれIGS58 DNA(SEQ ID NO:1)およびIGS58 PROT(SEQ ID NO:2)と呼ぶ。IGS58 DNA配列は、19番目(Aの代わりにG)、35番目(Cの代わりにT)および1431番目(Cの代わりにT)のヌクレオチド位置を除き、初めにゲノム・エントリAL162471内に同定された部分と同一だった。19番目のヌクレオチドは5'非コード領域中にあり、コードされるタンパク質には影響しない(ヌクレオチド位置19は実際にはプライマーIP15,074の3'側の最後から2番目のヌクレオチドである。このプライマーはその位置に「A」を持つように設計されたものの、合成中にその位置に「G」が導入されたい)。35番目のヌクレオチドの変化はIGS58のオープンリーディングフレーム内であるが、コードされるアミノ酸の同一性には影響を及ぼさない。しかし、1431番目のヌクレオチドの差異は、コードされるタンパク質の変化(Val->Ala)を導く。IGS58 DNA配列の3'末端と完全に重複するヒト発現配列タグ(EST)配列エントリAW196331およびAA634446もまた、1431番目の位置にTを有している。

10

20

【0110】

最新のタンパク質データバンクおよび翻訳されたDNAデータバンクのIGS58 PROT配列ホモロジー検索が、BLASTアルゴリズム(Altschul S.F. et al. [1997], Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)を用いて実施された。これらの検索は、IGS58 PROT配列がヒト白血球血小板活性化因子受容体をあらわすと主張される配列に最も類似することを示した(アライメントされた312残基について92%の同一性; GenBank登録番号Q14968; しかし、このタンパク質は322残基の長さしかない)。DNAレベルでは、IGS58 DNAはGenBankのM76676配列と(アライメントされた1426ヌクレオチドについて)98%が同一だった。IGS58 DNAと比較すると、M76676 DNA配列中には多くの挿入/欠失が存在しており、その結果、IGS58 PROT(の一部)と92%のみが同一の、より短いコードされたタンパク質がもたらされている。

30

【0111】

【表3】

40

1° FWD	SEQ ID NO:3	IP15,073	5'-CGAGCCACCACTCCGACCTAGTGGC-3'
1°/2° REV	SEQ ID NO:4	IP15,075	5'-GTGGTAAGCCTCCCCCGTCTCTAGC-3'
2° FWD	SEQ ID NO:5	IP15,074	5'-GAGGATCCGCGCCGCCCGCCACCAG-3'

表3：IGS58のcDNAクローニングに用いられたオリゴヌクレオチドプライマーの概要。プライマーIP15,074に付加されたBamHIクローニングサイトには下線が引かれている。

1° FWD：最初のPCR反応に使用されたフォワードプライマー。

1° /2° REV：最初と2回目の（セミネステッド）PCR反応で使用されたリバープライマー。

2° FWD：セミネステッドPCR反応に使用されたフォワードプライマー。

このプライマーの3'側の最後から2番目のヌクレオチドは、ここに示されるように「A」として設計されたが、このプライマーによって生成されたPCR産物の配列解析は、オリゴの合成中に「G」が誤って挿入されたことを示した。

10

【0112】

例2．哺乳類発現ベクターp c DNA 3 . 1 (-) h u I G S 5 8 の作製。

【0113】

プラスミドp GEM - T h s I G S 5 8 (ヒト I G S 5 8 タンパク質の完全なコード配列を含む) を保有する大腸菌株 I G S 5 8 . 6 が、LB寒天プレート (1 m l あたり 1 0 0 μ g のアンピシリンを含む) 上に再塗布された後に再クローニングされ、Innogenetics社の細菌株コレクション (ICCG 4 5 8 4) とオランダ・ユトレヒトの「Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)」 (登録番号：1 0 9 7 1 7) の両方に寄託された。再クローニングされた単離株から調製したプラスミドDNAは再度シーケンシングされ、以前に決定されたIGS58 DNAコンセンサス配列に同一であることが見出された。

20

【0114】

完全なIGS58コード配列を含んでいる1563bpのDNAフラグメントは、オリゴヌクレオチドプライマーIP15,074 (SEQ ID NO : 5) およびIP15,076 (SEQ ID NO : 6) を用いて、pGEM - T h s I G S 5 8 プラスミド鑄型からPCR増幅された。オリゴヌクレオチドIP15,074 (SEQ ID NO : 5) およびIP15,076 (SEQ ID NO : 6) は、それらの5'末端にそれぞれBamHIおよびHindIIIクローニングサイトを含んでいた。増幅されたPCRフラグメントはBamHI / HindIII消化され、ゲルから精製された (Mini Eluteゲル抽出プロトコル、Qiagen)。p c DNA 3 . 1 (-) プラスミド発現ベクター (Invitrogen) はBamHI / HindIIIで消化され、直鎖状化された5413bpのベクターフラグメントもまたゲルで精製された。消化されたプラスミドとPCRフラグメントは連結され、ライゲーション混合液は熱ショックによってコンピテント大腸菌株DH5 F'バクテリア中に導入された。形質転換された細菌はLB寒天プレート (1 m l あたり 1 0 0 μ g のアンピシリンを含む) 上に塗布され、37で一晩インキュベートされた。個々の細菌コロニーが選択され、100 μ g / m l のアンピシリンを含むLB培地中で一晩で培養された。プラスミドDNAが調製され、BamHI / HindIII切断解析によって分析された。3つのクローン (クローン17、23、26) は正しい制限プロファイルを示し、DNA配列解析を通してさらに特徴づけられた。クローン26はICCG 4748としてInnogeneticsの細菌培養コレクションに寄託された (プラスミドp c DNA 3 . 1 (-) h u I G S 5 8 を保持)。

30

40

【0115】

ICCG 4748株から調製されたプラスミドDNAであるp c DNA 3 . 1 (-) h u I G S 5 8 のDNA配列解析は、インサートがIGS58 DNAコンセンサスcDNA

50

配列と完全に同一であることを示した。

例3. 定量的PCR (Q-PCR) による異なるヒト組織中のIGS58 mRNAの発現解析。

【0116】

ヒトGAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) およびIGS58 mRNAの絶対的発現量は、Light CyclerTM Instrument (Roche Diagnostics) および遺伝子特異的PCRプライマーおよびTaqManTM プローブをヒトRNAサンプルに対して用いて、リアルタイム定量的RT-PCRアッセイ (Q-PCR) において決定された。ハウスキーピング遺伝子GAPDHのmRNAレベルが、異なるRNAサンプルのcDNA合成およびPCR増幅の効率のコントロールとして測定された。 10

【0117】

cDNAは異なるヒト組織の総RNA (ClontechヒトRNAパネルcat # K4000-1、K4001-1、K4002-1、K4003-1およびK4004-1)、もしくはヒト脳の異なる小領域に由来するポリ(A)⁺ RNA (Clontech cat # 6580.1, 6575.1, 6543.1, 6574.1, 6577.1, 6578.1および6582.1) のいずれかからの逆転写を通して合成された。逆転写の前に、RNAは可能な汚染性ゲノムDNAを破壊するために、供給元によって推奨される手順に従って、DNase I (Life Technologies cat # 18068-015) で処置された。DNase I反応はEDTAを添加し(最終濃度=2.3mM)、65で10分間加熱することによって停止された。DNase Iで処置されたRNA (5μgの総RNAもしくは945ngのポリ(A)⁺ RNAのいずれか) は、2.5μgのオリゴ(dT) (Life Technologies # 18418-012) にアニーリングさせられ、Omniscrypt Reverse Transcriptase (Qiagen; 100μl反応体積; 37で1時間) を用いた逆転写に付された (= RT⁺ 反応)。逆転写酵素は93で5分間のインキュベーションによって不活化された。DNaseで処置されたRNAの一部は逆転写にかけられず、残存性のゲノムDNAの存在について調べるためのコントロールとして用いられた (RT⁻ 反応)。 20

【0118】

ゲノムDNAの非存在のためのコントロールとして、総RNAのRT⁻ 反応液に対してヒト₂ミクログロブリンDNAに特異的なPCR増幅反応が実施された。PCR反応は、2.5μlのGeneAmpTM 10x PCRバッファー (Applied Biosystems)、各200μMのdNTP、0.5μlの、RT⁻ cDNA合成反応液、各5pmolのPCRプライマーIP3, 981 (SEQ ID NO: 7) およびIP3, 982 (SEQ ID NO: 8)、ならびに1.25UのAmpli Taq GoldTM DNAポリメラーゼ (Applied Biosystems cat # N808-0244) を含む、25μl反応体積中で実施された。95で10分間の初期的なインキュベーションの後、反応は以下のようにして30サイクルが行なわれた: 94で1分の変性、55で1分のアニーリング、および72で1分の伸長。最終的な伸長が72で10分間行なわれた。ポジティブコントロールとして、50ngのヒト・ゲノムDNA (Clontech # 6551-1) が用いられた。予想される長さのアンプリコンが、ゲノムDNA鋳型から得られたが、ネガティブコントロール (H₂O) から、また、RT⁻ サンプルからも得られなかった (IP3, 981 / IP3 982 プライマー対が616bpのイントロンを跨いでいるという事実のために、cDNA上およびゲノムDNAで予想されるアンプリコンの長さはそれぞれ269bpおよび885bpである)。RT⁻ ポリ(A)⁺ RNAサンプルは、0.8μlのRT⁻ cDNA合成反応液を用いたGAPDH特異的Q-PCRによって、ゲノムDNAの存在について分析された (下記参照)。GAPDHに特異的なシグナルは得られなかった。我々は、合成されたcDNAにはゲノムDNAは含まれないと結論した。 30 40 50

【0119】

Q-PCR反応は、1x TaqManTM Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems cat# 4304437)、0.12mg BSA/ml、900nMのGAPDHもしくはIGS58のいずれかに特異的なフォワードおよびリバースプライマー(GAPDHについてはIP15,529[SEQ ID NO:9]/IP15,531[SEQ ID NO:10]、IGS58についてはIP15,714[SEQ ID NO:11]/IP15,715[SEQ ID NO:12])、250nMの遺伝子特異的TaqManプローブ(それぞれ、GAPDHについてはIP15,530[SEQ ID NO:13]、IGS58についてはIP15,705[SEQ ID NO:14])、および1.6μlの総RNA RT⁺もしくはポリ(A)⁺ RT⁺ cDNA合成反応液を含む、20μlの反応体積中で実施された。1x TaqManTM Universal PCR Master Mixは、AmpliTaq GoldTM DNAポリメラーゼ、AmperaseTM ウラシルNグリコシラーゼ(UNG)、dUTPを含むdNTP、Passive Reference 1、および最適化されたバッファー成分を含んだ。特異的なプライマーおよびTaqManプローブは、Primer ExpressTM ソフトウェア(Applied Biosystems)により設計された。遺伝子特異的標準曲線は、直鎖状のpGEM-ThuGAPDH(完全長のヒトGAPDH cDNAを含む)もしくはpGEM-ThsIGS58プラスミド(ICCG 4584)の一連の1/10希釈(1反応あたり10⁸~10²コピー)に基づき確立された。PCR反応はLight CyclerTM 装置のガラスキャピラリーキュベット中で実施された。(Amperase UNG反応を行なわせるための)50で2分間の初期インキュベーションの後、95で10分間のAmpliTaq GoldTMの活性化が続き、以下のようにして反応が50サイクル行なわれた:95で15秒の変性、60で60秒のアニーリング/伸長(GAPDHおよびIGS58の両方)。サンプルの定量はLight Cycler Softwareバージョン3.0を使って実施された。

【0120】

ヒトGAPDH mRNAの絶対発現量は、骨格筋(ポリ(A)⁺ RNA 1ngあたり約7.4×10⁶コピー)、心臓(ポリ(A)⁺ RNA 1ngあたり約2.3×10⁶コピー)、および膵臓、脾臓、肝臓および胃(それぞれ、ポリ(A)⁺ RNA 1ngあたり約4×10⁵~約1.5×10⁶コピーの範囲)を除くほとんどの組織においてポリ(A)⁺ RNA 1ngあたり約1~3×10⁵コピーの範囲であった(図1)。

【0121】

IGS58 mRNAは、精巣においては、2番目に高い発現量を持つ組織(前立腺:mRNA 1ngあたり6,501コピー)よりも、一桁多量に存在することが見出された(図2)。また、比較的高いレベル(mRNA 1ngあたり1,000~4,000コピー)が中枢神経系の組織(胎性脳、脳、小脳および脊髄)においても観察された。これは、異なる脳小領域から得られたポリ(A)⁺ RNAについて得られたQ-PCRのデータによって確認された:この部分のIGS58 mRNA発現量は、黒質(mRNA 1ngあたり296コピー)を除き、mRNA 1ngあたり500~1,000コピーであった。また、かなりのレベルのIGS58 mRNAが、子宮、心臓、腎臓、肺、気管、骨格筋、副腎および甲状腺に見出された。

【0122】

【表4】

SEQ ID NO:6	IP15,076	5'- AGAAGCTTATCCACAACCTCTCCCCAGAATCTTCC- 3'
SEQ ID NO:7	IP3,981	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3'
SEQ ID NO:8	IP3,982	5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'
SEQ ID NO:9	IP15,529	5'-GGTGAAGCAGGCGTCGG-3'
SEQ ID NO:10	IP15,531	5'-GACAAAGTGGTCGTTGAGGGC-3'
SEQ ID NO:11	IP 15,714	5'-TGCCAACCGGCTGGG-3'
SEQ ID NO:12	IP 15,715	5'-TTTAGGCTGTTTGGTCACTGCC-3'
SEQ ID NO:13	IP15,530 TaqManプローブ	5'(FAM)-TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACC- (TAMRA)3'
SEQ ID NO:14	IP 15,705 TaqManプローブ	5'(FAM)-CTTCCAACCCGGCCAGCGGA-(TAMRA)3'

10

20

表4：使用されたオリゴヌクレオチドプライマーおよびTaqmanプローブの概要。

【0123】

例4．IGS58をトランスフェクトした細胞の作製。

【0124】

IGS58のリガンドを同定するためには、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が、IGS58オーファン受容体のcDNAによって安定にトランスフェクトされる。IGS58受容体のGタンパク質共役機構は未だ不明であるので、GPCRのための「万能アダプター」として知られるGタンパク質G16を発現する特異的なCHO細胞株(CHO-K1-G16、Molecular Devices)が用いられる(Milligan G. et al. (1996) Trends Pharmacol. Sci. 17:235-7)。この細胞株はまた、ミトコンドリアへと誘導されるアポエクオリンを安定に発現する。

30

【0125】

材料には、IGS58 p cDNA 3.1ベクター[ICCG #4748]; Superfectトランスフェクション試薬(Qiagen); 培養培地: 10%ウシ胎仔血清(FCS、Gibco BRL)、2mM L-グルタミン、ハイグロマイシンB 400µg/mlを補充したCHO-S-SFM II(Gibco BRL); 選択培地: 10% FCS、2mM L-グルタミン、ハイグロマイシンB 400µg/mlおよびジェネテシン500µg/mlを補充したCHO-S-SFM II(Gibco BRL); RNeasy Mini Kit(Qiagen)、DNase I(Ambion、2U/µl)、SuperScript II(Gibco BRL)、SuperScript II 200U(Gibco BRL)を含む。

40

【0126】

CHO-K1-G16/mtAEQ細胞は、製造業者により記述されたようにして、Superfect(Qiagen)を用いてトランスフェクトされる。トランスフェクシ

50

ヨンは24穴プレート中で行なわれる。培養培地中で24時間後、培地は取り除かれ、選択培地と取り替えられる。選択培地中でコンフルエントになるまで培養された後、このポリクローナルは一度、24穴プレート中で継代される。

【0127】

ポリクローナルの選抜はQ-PCRによって行なわれる。RNAは、供給されるプロトコールに従って、Rneasy Mini Kit (Qiagen)により、モノクローナル(24穴プレートの1つのコンフルエントなウェル)から単離される。RNAはサンプルあたり1UのDNase I (Ambion, 2U/μl)で処理される。RNAサンプルの半分はSuperScript II (Gibco BRL)を用いたRT-PCRに使用される。プライマーのアニーリングはRNAとオリゴdT16 (0.6 μM)によって、65 から15 で10分間実施される。First Strand Buffer (Gibco BRL)と各0.43mMのdNTP、10mM DTT、20U RNasin (Promega, 40U/μl)およびSuperScript II 200U (Gibco BRL, 200U/μl)が30 μlの最終体積にまで添加され、その後、42 で1時間のインキュベーションが続く。

10

【0128】

Q-PCRはIGS58受容体に特異的なQ-PCRプライマーを用いて実施される。PCR産物の量は、dsDNAに結合するSybr Greenの蛍光を測定することによって、各サイクルの後に決定される。IGSの相対発現量は、染色体DNAの4つの異なる希釈の標準曲線と関係する。相対的定量はハウスキーピング遺伝子の チューブリンに対して標準化される。

20

【0129】

2つの最良のポリクローナルが、モノクローナルを得るために用いられる。細胞は限界希釈で播種される。先に述べたように、モノクローナルの選抜はQ-PCRによって為される。6種の最良のモノクローナルが、T75フラスコ中でコンフルエントになるまで培養され、10%のDMSOを含む培養培地中で凍結される。

例5. リガンドの探索。

【0130】

特定のGタンパク質共役受容体を発現しているCHO-K1-G16-mtAEQ細胞が、例4に記述されるようにして培養され、多くの化合物ライブラリーをスクリーニングするために用いられる。化合物は1もしくは10 μMの濃度で試験される。エクオリン・スクリーニングアッセイでは、ATP (10 μM)もしくはジギトニン (50 μM)が、ポジティブコントロールとして用いられる。スクリーニングは下記のように、Micro Beta Jet 1450 (Perkin Elmer)を使って半自動的に実施される。

30

【0131】

一度、化合物が見出されたなら、シグナル活性は第二のエクオリン実験によって確かめられる。その後、それらは用量反応実験において、さらに特徴づけられる。

【0132】

IGS58受容体を発現しているCHO-K1-G16細胞とアポエクオリンを用いてリガンドを見出すことに成功しない場合には、Gタンパク質G16を持たない対応する細胞株が同様にして作製されることができ(例4参照)、その後、化合物の試験が続く。

40

【0133】

【表5】

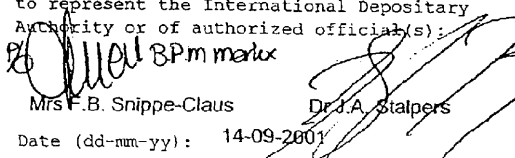
40
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Solvay Pharmaceuticals B.V. Intellectual Property Department Postbus 900 1380 DA WEESP Nederland <p style="text-align: center;"><i>name and address of depositor</i></p>

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

10

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Escherichia coli DH5alphaF' pGEM-ThsIGS58(ICCG 4584)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 109717
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation <i>(mark with a cross where applicable)</i>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 30-08-2001 <i>(date dd-mm-yy of the original deposit)</i> 1	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on not applicable <i>(date dd-mm-yy of the original deposit)</i> and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on not applicable <i>(date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)</i>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures Address: Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 3508 AD UTRECHT The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Snippe-Claus Dr J.A. Stalpers Date (dd-mm-yy): 14-09-2001

20

30

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

CBS/910

40

【 0 1 3 4 】

【 表 6 】

41
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Solvay Pharmaceuticals B.V.
Intellectual Property Department
Postbus 900
1380 DA WEESP
Nederland

*name and address of the party to whom the
viability statement is issued*

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

10

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Solvay Pharmaceuticals B.V. Intellectual Property Department Address Postbus 900 1380 DA WEESP Nederland	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 109717 Date (dd-mm-yy) of the deposit or of the transfer: 1 30-08-2001
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 03-09-2001 2. On that date (dd-mm-yy), the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable	

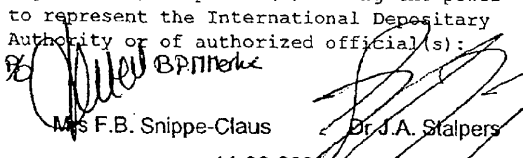
20

- ¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- ² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii) refer to the most recent viability test.
- ³ Mark with a cross the applicable box.

30

40

【 0 1 3 5 】
【 表 7 】

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Snippe-Claus Dr J.A. Stalpers
Address Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 3508 AD UTRECHT The Netherlands	
	Date (dd-mm-yy): 14-09-2001

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form B2/9 (second and last page)

【図面の簡単な説明】

【図 1】

異なるヒト組織における GAPDH mRNA 発現の Q-PCR 分析。報告されている値 (#コピー/ng mRNA) は、2 回の Q-PCR アッセイ (各アッセイは独立に調製した cDNA に対するもの) の平均値をあらわす。mRNA は総 RNA の 2% を占め、その cDNA 合成は 100% の効率であると仮定された。真の効率はおそらく 20 ~ 50% に近いことから、実際のコピー数は 2 ~ 5 倍少なく見積もられている可能性が高い。「*」の印の付けられた組織ではポリ(A)⁺ RNA が用いられたが、他の全ての組織では総 RNA が用いられた。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/33079 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/705, C12Q 1/68, C07K 16/28, A61K 48/00, G01N 33/53, 33/50, 33/68, A01K 67/027
- (21) International Application Number: PCT/EP01/11371
- (22) International Filing Date: 1 October 2001 (01.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00203566.5 16 October 2000 (16.10.2000) EP
60/241,372 19 October 2000 (19.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V. [NL/NL]; C.J. Van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DELEERSNIJDER, Willy [BE/BE], c/o C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL); BLOCKX, Herman [BE/BE]; c/o C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL); DE MOOR, Lucie [BE/BE]; c/o C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP WEEESP (NL).
- (74) Agent: VERHAGE, Marius; Octrooibureau Zoan B.V., P.O. Box 140, NL-1380 AC Weesp (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USES THEREOF

WO 02/33079 A2

(57) Abstract: The present invention relates to the IGS58 G-protein coupled receptor family, and to polynucleotides encoding said IGS58 proteins. The invention also relates to inhibiting or activating the action of such polynucleotides and polypeptides, to a vector containing said polynucleotides, a host cell containing such vector and non-human transgenic animals where the IGS58-gene is either overexpressed, misexpressed, underexpressed or suppressed (knock-out animals). The invention further relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor family IGS58 and the use of IGS58 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS58 receptor family in the treatment of a broad range of disorders and diagnostic assays for such conditions. The invention in particular relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor family IGS58 and the use of IGS58 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS58 receptor family in the treatment of dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus, and diagnostic assays for such conditions.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

Human G-protein coupled receptor and uses thereof**Description**

5 The present invention relates to novel identified polynucleotides, polypeptides encoded by them and to the use of such polynucleotides and polypeptides, and to their production. More particularly, the polynucleotides and polypeptides of the present invention relate to a G-protein coupled receptor (GPCR), hereinafter referred to as IGS58. The invention also relates to inhibiting or activating the action of such polynucleotides and polypeptides, to a vector containing
10 said polynucleotides, a host cell containing such vector and transgenic animals where the IGS58-gene is either overexpressed, misexpressed, underexpressed and/or suppressed (knock-out animals). The invention further relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor IGS58.

15 BACKGROUND OF THE INVENTION

It is well established that many medically significant biological processes are mediated by proteins participating in signal transduction pathways that involve G-proteins and/or second messengers; e.g., cAMP (Lefkowitz, Nature, 1991, 351:353-354). Herein these proteins are referred to as proteins participating in pathways with G-proteins. Some examples of these
20 proteins include the GPC receptors, such as those for adrenergic agents and dopamine (Kobilka, B.K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K., et al., Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R., et al., Nature, 1988, 336:783-787), G-proteins themselves, effector proteins, e.g., phospholipase C, adenylate cyclase, and phosphodiesterase, and
25 actuator proteins, e.g., protein kinase A and protein kinase C (Simon, M.J., et al., Science, 1991, 252:802-8).

For example, in one form of signal transduction, upon hormone binding to a GPCR the receptor interacts with the heterotrimeric G-protein and induces the dissociation of GDP from the
30 guanine nucleotide-binding site. At normal cellular concentrations of guanine nucleotides, GTP fills the site immediately. Binding of GTP to the α subunit of the G-protein causes the dissociation of the G-protein from the receptor and the dissociation of the G-protein into α and $\beta\gamma$ subunits. The GTP-carrying form then binds to activated adenylate cyclase. Hydrolysis of GTP to GDP, catalyzed by the G-protein itself (α subunit possesses an intrinsic GTPase activity),
35 returns the G-protein to its basal, inactive form. The GTPase activity of the α subunit is, in essence, an internal clock that controls an on/off switch. The GDP bound form of the α subunit has high affinity for $\beta\gamma$ and subsequent reassociation of α GDP with $\beta\gamma$ returns the system to the

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

2

basal state. Thus the G-protein serves a dual role, as an intermediate that relays the signal from receptor to effector (in this example adenylate cyclase), and as a clock that controls the duration of the signal.

5 The membrane bound superfamily of G-protein coupled receptors has been characterized as having seven putative transmembrane domains. The domains are believed to represent transmembrane α -helices connected by extracellular or cytoplasmic loops. G-protein coupled receptors include a wide range of biologically active receptors, such as hormone, viral, growth factor and neuroreceptors.

10

The G-protein coupled receptor family includes dopamine receptors which bind to neuroleptic drugs used for treating CNS disorders. Other examples of members of this family include, but are not limited to calcitonin, adrenergic, neuropeptide Y, somatostatin, neurotensin, neurokinin, capsaicin, VIP, CGRP, CRF, CCK, bradykinin, galanin, motilin, nociceptin, 15 endothelin, cAMP, adenosine, muscarinic, acetylcholine, serotonin, histamine, thrombin, kinin, follicle stimulating hormone, opsin, endothelial differentiation gene-1, rhodopsin, odorant, and cytomegalovirus receptors.

20 Most G-protein coupled receptors have single conserved cysteine residues in each of the first two extracellular loops which form disulfide bonds that are believed to stabilize functional protein structures. The 7 transmembrane regions are designated as TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 and TM7. The cytoplasmic loop which connects TM5 and TM6 may be a major component of the G-protein binding domain.

25 Most G-protein coupled receptors contain potential phosphorylation sites within the third cytoplasmic loop and/or the carboxy terminus. For several G-protein coupled receptors, such as the β -adrenoreceptor, phosphorylation by protein kinase A and/or specific receptor kinases mediates receptor desensitization.

30 Recently, it was discovered that certain GPCRs, like the calcitonin-receptor like receptor, might interact with small single pass membrane proteins called receptor activity modifying proteins (RAMP's). This interaction of the GPCR with a certain RAMP is determining which natural ligands have relevant affinity for the GPCR-RAMP combination and regulate the functional signaling activity of the complex (McLathie, L.M. et al., Nature (1998) 393:333-339).

35

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

3

For some receptors, the ligand binding sites of G-protein coupled receptors are believed to comprise hydrophilic sockets formed by several G-protein coupled receptor transmembrane domains, said sockets being surrounded by hydrophobic residues of the G-protein coupled receptors. The hydrophilic side of each G-protein coupled receptor transmembrane helix is postulated to face inward and form a polar ligand-binding site. TM3 has been implicated in several G-protein coupled receptors as having a ligand-binding site, such as the TM3 aspartate residue. TM5 serines, a TM6 asparagine and TM6 or TM7 phenylalanines or tyrosines are also implicated in ligand binding.

G-protein coupled receptors can be intracellularly coupled by heterotrimeric G-proteins to various intracellular enzymes, ion channels and transporters (see, Johnson et al., *Endoc. Rev.*, 1989, 10:317-331). Different G-protein α -subunits preferentially stimulate particular effectors to modulate various biological functions in a cell. Phosphorylation of cytoplasmic residues of G-protein coupled receptors has been identified as an important mechanism for the regulation of G-protein coupling of some G-protein coupled receptors. G-protein coupled receptors are found in numerous sites within a mammalian host.

Receptors - primarily the GPCR class - have led to more than half of the currently known drugs (Drews, *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1516). This indicates that these receptors have an established, proven history as therapeutic targets. The new IGS58 GPCR described in this invention clearly satisfies a need in the art for identification and characterization of further receptors that can play a role in diagnosing, preventing, ameliorating or correcting dysfunctions, disorders, or diseases, hereafter generally referred to as "the Diseases". The Diseases include, but are not limited to, psychiatric and CNS disorders, including schizophrenia, episodic paroxysmal anxiety (EPA) disorders such as obsessive compulsive disorder (OCD), post traumatic stress disorder (PTSD), phobia and panic, major depressive disorder, bipolar disorder, Parkinson's disease, general anxiety disorder, autism, delirium, multiple sclerosis, Alzheimer disease/dementia and other neurodegenerative diseases, severe mental retardation, dyskinesias, Huntington's disease, Tourett's syndrome, tics, tremor, dystonia, spasms, anorexia, bulimia, stroke, addiction/dependency/craving, sleep disorder, epilepsy, migraine; attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD); cardiovascular diseases, including heart failure, angina pectoris, arrhythmias, myocardial infarction, cardiac hypertrophy, hypotension, hypertension - e.g. essential hypertension, renal hypertension, or pulmonary hypertension, thrombosis, arteriosclerosis, cerebral vasospasm, subarachnoid hemorrhage, cerebral ischemia, cerebral infarction, peripheral vascular disease, Raynaud's disease, kidney disease - e.g. renal failure; dyslipidemias; obesity; emesis; gastrointestinal disorders, including irritable bowel syndrome (IBS), inflammatory bowel disease (IBD), gastroesophageal reflux disease (GERD), motility

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

4

disorders and conditions of delayed gastric emptying, such as post operative or diabetic gastroparesis, and diabetes, ulcers – e.g. gastric ulcer; diarrhoea; other diseases including osteoporosis; inflammations; infections such as bacterial, fungal, protozoan and viral infections, particularly infections caused by HIV-1 or HIV-2; pain; cancers; chemotherapy induced injury; tumor invasion; immune disorders; urinary retention; asthma; allergies; arthritis; benign prostatic hypertrophy; endotoxin shock; sepsis; complication of diabetes mellitus; and gynaecological disorders.

In particular, the new IGS58 GPCR described in this invention satisfies a need in the art for identification and characterization of further receptors that can play an important role in diagnosing, preventing, ameliorating or correcting dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the invention relates to IGS58 polypeptides, polynucleotides and recombinant materials and methods for their production. Another aspect of the invention relates to methods for using such IGS58 polypeptides, polynucleotides and recombinant materials. Such uses include, but are not limited to, use as a therapeutic target and for treatment of one of the Diseases as mentioned above. In particular the uses include treatment of dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

In still another aspect, the invention relates to methods to identify agonists and antagonists using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with IGS58 imbalance with the identified compounds. Yet another aspect of the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate IGS58 activity or levels. A further aspect of the invention relates to animal-based systems which act as models for disorders arising from aberrant expression or activity of IGS58.

35 BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Q-PCR analysis of GAPDH mRNA expression in different human tissues. Reported values (#copies / ng mRNA) represent the average of 2 Q-PCR assays (each assay

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

5

on independently prepared cDNA). It was assumed that mRNA represents 2% of total RNA and that cDNA synthesis was 100% efficient. As the true efficiency is probably closer to 20-50%, actual copy numbers are likely underestimated 2-5 fold. For tissues marked with "", poly(A)⁺ RNA was used whereas for all other tissues total RNA was used.

5

Figure 2. Q-PCR analysis of IGS58 mRNA expression in different human tissues. Reported values (#copies / ng mRNA) are from a single determination. It was assumed that mRNA represents 2% of total RNA and that cDNA synthesis was 100% efficient. As the true efficiency is probably closer to 20-50%, actual copy numbers are likely underestimated 2-5 fold. For tissues marked with "", poly(A)⁺ RNA was used whereas for all other tissues total RNA was used. The IGS58 mRNA expression level in testis is an order of magnitude larger than that of prostate and is not represented on the bar diagram.

10

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

Table 1: IGS58-DNA of SEQ ID NO: 1

```

5' -
5  GCGCGCGCCCGCCACCGGGCGAGCATGGCCCTTATGGGGCAGCCAGCACTCGGGCGCCC
   CTCCGCGGGCGGCCACCTGGCGGGACTTCCCTCCGCGGCCACGGCGGGCGTGCCTCCTT
   CAGCACCGTGGCGACCGCGCGCTGGGGAACCTGAGCGACGCAAGCGGAGGGCGGCACAGC
   TGCCGCTCCCGGTGGCGGGCCCTTGGCGGGTCCGGGGCAGCGGGGAGGGGGGGGGCGGC
   GGTGAGGGGGCGCTAGGGCCGGAGGGGGGGCGCGTGTGCGCAGGAGCTGCAGTGGC
10  GSCCAAGGCGCTGCTCCTCTCTCATCTTCCCTGCTGTCTAGCCTTGGCAACTGGCGGGT
   GATGGGGTATTGTGACACACGGGAGTCCCGACCGTCAACCAAGCCTTCACTCTGTG
   GCTGTCCCTATCGGATCTGCTCAGGGCGTGTGCTTGGCTGGCGCCGCTTCCGTGACCT
   CTTCACTCCCGCGGGGTTGGCGGCTTCCGCGCCCGGGGGCCCTGGCGCGCTTCTG
   CGCGCCAGCCGCTTCTTCCGCTCGTGTCTGGGATCGTGTCCACGCTCAGCGTGGCGCT
   CATCTCGTTGGACCGTTACTGCGCTATCGTGGCGCGCGGGGAGAAGATCGCGCGCG
15  CCGCGCGTGCAGCTGCTGGCGGGCGCTGGCTGACGGCCCTGGGCTTCTCCTTGCCTTG
   GGAGCTGCTCGGGGCGCCCGGGAACTCGGGCGGGCGAGAGCTTCCACGGCTGCTCTTA
   CCGGACCTCCCGGACCCCGCGCAGCTGGGGCGGGCCCTCAGCCTGGGGTGGTGGTGGC
   CTGCTACCTGCTGCCCTTCCCTGCTCATGTGCTTTCGCACTACCACTGCAAGAGGCT
   GCGCCTGTGCGGAGTGGCGGTGGCGCGGTGAACACCTAAGCGCGCGTGTGCTGCTTCTT
20  CAGCGAGTGGCGACGGCCAGCACCGTCCCTCATCATGATCGTCTTGTCTATCTGTGCTG
   GGGCCCTACTGCTTCCCTGGTGGCTGCTGGCCCGCCCGGGCAGGCCAGACCATGCGGGC
   CCCCTCGCTCCTCAGCGTGGTGGCTGTGGCTGACTGGGCAATGGGGCACTACACCC
   TGTCACTACGCTATCCGCAATCCACATTTGATGCTCTAGGGCCGACCCCGAGGA
   GGGCTACCGGACTAGGAATGTGGACGCTTTCCTGCCACGACGGGCCCGGGCTGCAAGC
25  CAGAAGCGCAGTGGCTTGGAAACCGTATGCCAACCGCTGGGGGCTGCAACAGGAT
   TCCCTTCCACCCCGCCAGCGGAGTGGCAGGGACGTGGCCATGTGGCCCGCAGAAA
   TCCAGTTGACTTTTTCGCCGAGAGGACCAACAGAGCGGTGACGGCAGTACCAACA
   GCCTAAATCCGAAGCTGGGGATACCAAGCTCTAAGACCGTTGGATGGCCAGCTTATGAA
30  GGCAAATTCACACTCGCATTTAATGATGGAGATTCTGGGGGAGAGTTGTGGATTTC
   ATAAAGCCAAACATTTAAAGCTAGAGACGGGGAGGCTTACCAC
-3'

```

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

7

Table 2: IGS58-protein of SEQ ID NO: 2

5 MALLGSQHSQAPSAAAGPPGGTSSAATAAVLSFSTVATAALGNLSDASGGTAAAPGGGGI
GSSGAAREAGAVRRPLGPEAAPLLSHGAAVAAQALVLLLIIFLLSGLNCVAMGVIVKHR
QLRTVTNAFVLSLSLDLITALLCLPAAFDLETPPGSSAPAAAAGPWRGFCASRFFSS
CFGIVSTLSVALISLDRIYCAIVRPPREKIGRRRALQLLAGAWLTALGFSLPWELLGAPRE
LAAQSFNGCLIRTSDFRQLGAAPSVGLVACVLEPFLMCFCHHICKTVRLSDVWR
10 PVNTYARVLRFESEVRFATVLIIMIVETCCWGPYCFIVLLAARQATMQAPSLLSVVA
VNLFWANGAINPVTYAIRNPNISMLLGRNREEGYRTRNVDAFLPSQGPGLQRSRLRN
RYANRLGACNRMSSNFASGVAGDVAMARKNEVVLFCREGPPEVTVTKQPKSEAGDT
SL

15

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

8

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Structural and chemical similarity, in the context of sequences and motifs, exists among the IGS58 GPCR of the invention and other human GPCR's. In addition, IGS58 is expressed in testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus. Therefore, IGS58 is implied to play a role among other things in the Diseases mentioned above. IGS58 in particular is implied to play a role in dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All publications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

Definitions

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently herein.

"IGS58" refers, among others, to a polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, or a Variant thereof.

"Receptor Activity" or "Biological Activity of the Receptor" refers to the metabolic or physiologic function of said IGS58 including similar activities or improved activities or these activities with decreased undesirable side effects. Also included are antigenic and immunogenic activities of said IGS58.

"IGS58-gene" refers to a polynucleotide comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or respective Variants, e.g. allelic Variants, thereof and/or their complements.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

9

"Antibodies" as used herein includes polyclonal and monoclonal antibodies, chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, including the products of a Fab or other immunoglobulin expression library.

5 "Isolated" means altered "by the hand of man" from the natural state and/or separated from the natural environment. Thus, if an "isolated" composition or substance that occurs in nature has been "isolated", it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living animal is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of
10 its natural state is "isolated", as the term is employed herein.

"Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. "Polynucleotides" include, without limitation single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-
15 stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" may also include triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term polynucleotide also includes DNAs or RNAs containing one or
20 more modified bases and DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications has been made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses
25 and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often referred to as oligonucleotides.

"Polypeptide" refers to any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. "Polypeptide"
30 refers to short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins, and/or to combinations thereof. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. "Polypeptides" include amino acid sequences modified either by natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such
35 modifications are well-described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in voluminous research literature. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

10

appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result from posttranslation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol; cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. See, for instance, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182:626-646 and Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann. NY Acad. Sci. (1992) 683:48-62.

"Variant" as the term is used herein, is a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide respectively, but retains essential properties such as essential biological, structural, regulatory or biochemical properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, and deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

11

"Identity" is a measure of the identity of nucleotide sequences or amino acid sequences. In general, the sequences are aligned so that the highest order match is obtained. "Identity" per se has an art-recognized meaning and can be calculated using published techniques. See, e.g.:

5 (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D.W., ed.; Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS

10 IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). While there exist a number of methods to measure identity between two polynucleotide or polypeptide sequences, the term "identity" is well known to skilled artisans (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073). Methods commonly employed to determine identity or similarity between two sequences include, but are not limited to, those disclosed in

15 Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073. Methods to determine identity and similarity are codified in computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, GCG program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN,

20 FASTA (Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403). The word "homology" may substitute for the word "identity".

As an illustration, by a polynucleotide having a nucleotide sequence having at least, for example, 95% "identity" to a reference nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 is intended that the

25 nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that the polynucleotide sequence may include up to five nucleotide differences per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to any 5% of the nucleotides in the reference sequence may be deleted or

30 substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to any 5% of the total nucleotides in the reference sequence may be inserted into the reference sequence, or in a number of nucleotides of up to any 5% of the total nucleotides in the reference sequence there may be a combination of deletion, insertion and substitution. These differences may occur at the

35 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

12

Similarly, by a polypeptide having an amino acid sequence having at least, for example, 95% "identity" to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is intended that the amino acid sequence of the polypeptide is identical to the reference sequence except that the polypeptide sequence may include up to five amino acid alterations per each 100 amino acids of the reference amino acid of SEQ ID NO: 2. In other words, to obtain a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a reference amino acid sequence, up to any 5% of the amino acid residues in the reference sequence may be deleted or substituted with another amino acid, or a number of amino acids up to any 5% of the total amino acid residues in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

15 Polypeptides of the Invention

In one aspect, the present invention relates to IGS58 polypeptides (including IGS58 proteins). The IGS58 polypeptides include the polypeptide of SEQ ID NO:2 and the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717; deposited on 30 August 2001 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands), as well as polypeptides comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands), and polypeptides comprising an amino acid sequence having at least 80% identity to that of SEQ ID NO:2 and/or to the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands) over its entire length, and still more preferably at least 90% identity, and even still more preferably at least 95% identity to said amino acid sequence. Furthermore, those with at least 97%, in particular at least 99%, are highly preferred. Also included within IGS58 polypeptides are polypeptides having the amino acid sequence which has at least 80% identity to the polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands) over its entire length, and still more preferably at least 90% identity, and even still more preferably at least 95% identity to SEQ ID NO: 2. Furthermore, those with at least 97%, in particular at least 99% are highly preferred. Preferably IGS58 polypeptides exhibit at least one biological activity of the receptor.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

13

In an additional embodiment of the invention, the IGS58 polypeptides may be a part of a larger protein such as a fusion protein. It is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences which aid in purification such as multiple histidine residues, sequences which aid in detection such as antigenic peptide tags (such as the haemagglutinin (HA) tag), or an additional sequence for stability during recombinant production.

Fragments of the IGS58 polypeptides are also included in the invention. A fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that is the same as part of, but not all of, the amino acid sequence of the aforementioned IGS58 polypeptides. As with IGS58 polypeptides, fragments may be "free-standing," or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single-continuous region. Representative examples of polypeptide fragments of the invention, include, for example, fragments from about amino acid number 1-20; 21-40, 41-60, 61-80, 81-100; and 101 to the end of IGS58 polypeptide. In this context "about" includes the particularly recited ranges larger or smaller by several, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid at either extreme or at both extremes.

Preferred fragments include, for example, truncation polypeptides having the amino acid sequence of IGS58 polypeptides, except for deletion of a continuous series of residues that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Also preferred are fragments characterized by structural or functional attributes such as fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions, beta-sheet and beta-sheet-forming regions, turn and turn-forming regions, coil and coil-forming regions, hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions, substrate binding region, and high antigenic index regions. Other preferred fragments are biologically active fragments. Biologically active fragments are those that mediate receptor activity, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also included are those that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human.

Thus, the polypeptides of the invention include polypeptides having an amino acid sequence that is at least 80% identical to either that of SEQ ID NO:2 and/or the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands), or fragments thereof with at least 80% identity to the corresponding fragment. Preferably, all of these

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

14

polypeptide fragments retain the biological activity of the receptor, including antigenic activity. Variants of the defined sequence and fragments also form part of the present invention. Preferred variants are those that vary from the referents by conservative amino acid substitutions – i.e., those that substitute a residue with another of like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr. Particularly preferred are variants in which several, 5-10, 1-5, or 1-2 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination.

10 The IGS58 polypeptides of the invention can be prepared in any suitable manner. Such polypeptides include isolated naturally occurring polypeptides, recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods. Methods for preparing such polypeptides are well known in the art.

15 Polynucleotides of the Invention

A further aspect of the invention relates to IGS58 polynucleotides. IGS58 polynucleotides include isolated polynucleotides which encode the IGS58 polypeptides and fragments, and polynucleotides closely related thereto. More specifically, the IGS58 polynucleotide of the invention includes a polynucleotide comprising the nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1, such as the one capable of encoding a IGS58 polypeptide of SEQ ID NO: 2, polynucleotides having the particular sequence of SEQ ID NO: 1 and polynucleotides which essentially correspond to the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands).

25 IGS58 polynucleotides further include polynucleotides comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity over its entire length to a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide of SEQ ID NO:2, polynucleotides comprising a nucleotide sequence that is at least 80% identical to that of SEQ ID NO:1 over its entire length and a polynucleotide which essentially corresponds to the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands).

30 In this regard, polynucleotides with at least 90% identity are particularly preferred, and those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred and those with at least 98-99% are most highly preferred, with at least 99% being the most preferred. Also included under IGS58 polynucleotides are a nucleotide sequence which has sufficient identity to a nucleotide sequence contained in SEQ ID NO: 1 or to the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

15

Utrecht (the Netherlands) to hybridize under conditions useable for amplification or for use as a probe or marker. The invention also provides polynucleotides which are complementary to such IGS58 polynucleotides.

- 5 IGS58 of the invention is structurally related to other proteins of the G-protein coupled receptor family, as shown by the results of BLAST searches in the public databases. The amino acid sequence of Table 2 (SEQ ID NO:2) was most similar to a sequence claimed to represent the human leukocyte platelet-activating factor receptor (92% identities over 312 aligned residues; GenBank accession n° Q14968; however this protein is only 322 residues long). Thus, 10 IGS58 polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, inter alia, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides, and their utility is obvious to anyone skilled in the art.

- Polynucleotides of the invention can be obtained from natural sources such as genomic 15 DNA. In particular, degenerated PCR primers can be designed that encode conserved regions within a particular GPCR gene subfamily. PCR amplification reactions on genomic DNA or cDNA using the degenerate primers will result in the amplification of several members (both known and novel) of the gene family under consideration (the degenerated primers must be located within the same exon, when a genomic template is used). (Libert et al., Science, 1989, 244: 569-572). 20 Polynucleotides of the invention can also be synthesized using well-known and commercially available techniques (e.g. F.M. Ausubel et al, 2000, Current Protocols in Molecular Biology).

- The nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide of SEQ ID NO:2 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in SEQ ID NO:1 (nucleotide number 25 26 to 1471), or it may be a different nucleotide sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code might also show alterations compared to the polypeptide encoding sequence contained in SEQ ID NO:1, but also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2.

- 30 When the polynucleotides of the invention are used for the recombinant production of the IGS58 polypeptide, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide or a fragment thereof, by itself, the coding sequence for the mature polypeptide or fragment in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro- protein sequence, or other fusion peptide portions. 35 For example, a marker sequence which facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

16

et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1989) 86:821-824, or is an HA tag. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals, ribosome binding sites and sequences that stabilize mRNA.

5 Further preferred embodiments are polynucleotides encoding IGS58 variants comprising the amino acid sequence of the IGS58 polypeptide of SEQ ID NO:2 in which several, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 or 1 amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

10 The polynucleotides of the invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter IGS58-encoding sequences for a variety of purposes including, but not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. For example, oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis may be used to introduce mutations that
15 create amino acid substitutions, create new restriction sites, alter modification (e.g. glycosylation or phosphorylation) patterns, change codon preference, produce splice variants, and so forth.

The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the herein above-described sequences. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides
20 which hybridize under stringent conditions to the polynucleotides described above. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 80%, and preferably at least 90%, and more preferably at least 95%, yet even more preferably at least 97%, in particular at least 99% identity between the sequences.

25 Polynucleotides of the invention, which are identical or sufficiently identical to a nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1 or a fragment thereof, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA, to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding IGS58 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding homologs and orthologs from species other than human) that have a high sequence similarity to the IGS58
30 gene. People skilled in the art are well aware of such hybridization techniques. Typically these nucleotide sequences are 80% identical, preferably 90% identical, more preferably 95% identical to that of the referent. The probes generally will comprise at least 5 nucleotides, and preferably at least 8 nucleotides, and more preferably at least 10 nucleotides, yet even more preferably at least 12 nucleotides, in particular at least 15 nucleotides. Most preferred, such probes will have
35 at least 30 nucleotides and may have at least 50 nucleotides. Particularly preferred probes will range between 30 and 50 nucleotides.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

17

One embodiment, to obtain a polynucleotide encoding the IGS58 polypeptide, including homologs and orthologs from species other than human, comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof, and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to those of skill in the art. Stringent hybridization conditions are as defined above or alternatively conditions under overnight incubation at 42 °C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate (w/v), and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1xSSC at about 65°C.

The polynucleotides and polypeptides of the present invention may be used as research reagents and materials for discovery of treatments and diagnostics to animal and human disease.

15

Vectors, Host Cells, Expression

The present invention also relates to vectors which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, and host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be used to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof for polynucleotides of the present invention. Introduction of polynucleotides into host cells can be effected by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) and Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) such as calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transvection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as streptococci, staphylococci, E. coli, Streptomyces and Bacillus subtilis cells; fungal cells, such as yeast cells and Aspergillus cells; insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9 cells;

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

18

animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

5 A great variety of expression systems can be used. Such systems include, among others, chromosomal, episomal and virus-derived systems, e.g., vectors derived from bacterial
10 plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid
15 and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate nucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for
20 example, those set forth in Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra).

For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be
25 incorporated into the desired polypeptide. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals, i.e. derived from a different species.

If the IGS58 polypeptide is to be expressed for use in screening assays, generally, it is preferred that the polypeptide be produced at the surface of the cell. In this event, the cells may
25 be harvested prior to use in the screening assay. In case the affinity or functional activity of the IGS58 polypeptide is modified by receptor activity modifying proteins (RAMP), coexpression of the relevant RAMP most likely at the surface of the cell is preferred and often required. Also in this event harvesting of cells expressing the IGS58 polypeptide and the relevant RAMP prior to use in screening assays is required. If the IGS58 polypeptide is secreted into the medium, the
30 medium can be recovered in order to recover and purify the polypeptide; if produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered. Membranes expressing the IGS58 polypeptide can be recovered by methods that are well known to a person skilled in the art. In general, such methods include harvesting of the cells expressing the IGS58 polypeptide and homogenization of the cells by a method such as, but not limited to, pottering.
35 The membranes may be recovered by washing the suspension one or several times.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

19

IGS58 polypeptides can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well-known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during isolation and or purification.

Diagnostic Assays

10

This invention also relates to the use of IGS58 polynucleotides for use as diagnostic reagents. Detection of a mutated form of the IGS58 gene associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to or define a diagnosis of a disease or susceptibility to a disease which results from under-expression, over-expression or altered expression of IGS58.

15

Also in this event co-expression of relevant receptor activity modifying proteins can be required to obtain diagnostic assays of desired quality. Individuals carrying mutations in the IGS58 gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques.

20

Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a subject's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy or autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR or other amplification techniques prior to analysis. RNA or cDNA may also be used in similar fashion. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled IGS58 nucleotide sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase digestion or by differences in melting temperatures. DNA sequence differences may also be detected by alterations in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents, or by direct DNA sequencing. See, e.g., Myers et al., *Science* (1985) 230:1242. Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method. See Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 85: 4397-4401. In another embodiment, an array of oligonucleotide probes comprising the IGS58 nucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of e.g., genetic mutations. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability. (See for example: M.Chee et al., *Science*, Vol 274, pp 610-613 (1996)).

25

30

35

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

20

The diagnostic assays offer a process for diagnosing or determining a susceptibility to among other things the Diseases as mentioned above, through detection of mutation in the IGS58 gene by the methods described. The diagnostic assays in particular offer a process for diagnosing or determining a susceptibility to dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus, through detection of mutation in the IGS58 gene by the methods described.

In addition, among other things, the Diseases as mentioned above can be diagnosed by methods comprising determining from a sample derived from a subject an abnormally decreased or increased level of the IGS58 polypeptide or IGS58 mRNA. In particular dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus, can be diagnosed by methods comprising determining from a sample derived from a subject an abnormally decreased or increased level of the IGS58 polypeptide or IGS58 mRNA.

Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as an IGS58, in a sample derived from a host are well known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

In another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit for among other things the Diseases or susceptibility to one of the Diseases as mentioned above. In particular, the present invention relates to a diagnostic kit for dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

The kit may comprise:

- (a) an IGS58 polynucleotide, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof; and/or
- (b) a nucleotide sequence complementary to that of (a); and/or
- (c) an IGS58 polypeptide, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof; and/or

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

21

(d) an antibody to an IGS58 polypeptide, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO: 2; and/or

(e) a RAMP polypeptide required for the relevant biological or antigenic properties of an IGS58 polypeptide.

5

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) (d) or (e) may comprise a substantial component.

Chromosome Assays

10

The nucleotide sequences of the present invention are also valuable for chromosome identification. The sequence is specifically targeted to and can hybridize with a particular location on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating those sequences with

15 gene associated disease. Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data are found, for example, in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available on line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between genes and diseases that have been mapped to the same chromosomal

20 region are then identified through linkage analysis (coinheritance of physically adjacent genes).

The differences in the cDNA or genomic sequence between affected and unaffected individuals can also be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

25

Antibodies

The polypeptides of the invention or their fragments or analogs thereof, or cells expressing them if required together with relevant RAMP's, may also be used as immunogens to produce

30 antibodies immunospecific for the IGS58 polypeptides. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantial greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

Antibodies generated against the IGS58 polypeptides may be obtained by administering

35 the polypeptides or epitope-bearing fragments, analogs or cells to an animal, preferably a nonhuman, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique, which provides antibodies produced by continuous cell line cultures, may be used. Examples

include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

5

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptides by affinity chromatography.

10 Antibodies against IGS58 polypeptides as such, or against IGS58 polypeptide-RAMP complexes, may also be employed to treat among other things the Diseases as mentioned above. In particular, antibodies against IGS58 polypeptides as such, or against IGS58 polypeptide-RAMP complexes, may be employed to treat dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, 15 caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

Animals

20 Another aspect of the invention relates to non-human animal-based systems which act as models for disorders arising from aberrant expression or activity of IGS58. Non-human animal-based model systems may also be used to further characterize the activity of the IGS58 gene. Such systems may be utilized as part of screening strategies designed to identify compounds which are capable to treat IGS58 based disorders such as among other things the Diseases as mentioned above. In particular, the systems may be utilized as part of screening strategies 25 designed to identify compounds which are capable to treat IGS58 based dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

30 In this way the animal-based models may be used to identify pharmaceutical compounds, therapies and interventions which may be effective in treating disorders of aberrant expression or activity of IGS58. In addition such animal models may be used to determine the LD₅₀ and the ED₅₀ in animal subjects. These data may be used to determine the *in vivo* efficacy of potential IGS58 disorder treatments.

35 Animal-based model systems of IGS58 based disorders, based on aberrant IGS58 expression or activity, may include both non-recombinant animals as well as recombinantly engineered transgenic animals.

Animal models for IGS58 disorders may include, for example, genetic models. Animal models exhibiting IGS58 based disorder-like symptoms may be engineered by utilizing, for example, IGS58 sequences such as those described, above, in conjunction with techniques for producing transgenic animals that are well known to persons skilled in the art. For example, IGS58 sequences may be introduced into, and overexpressed and/or misexpressed in, the genome of the animal of interest, or, if endogenous IGS58 sequences are present, they may either be overexpressed, misexpressed, or, alternatively, may be disrupted in order to underexpress or inactivate IGS58 gene expression.

In order to overexpress or misexpress a IGS58 gene sequence, the coding portion of the IGS58 gene sequence may be ligated to a regulatory sequence which is capable of driving high level gene expression or expression in a cell type in which the gene is not normally expressed in the animal type of interest. Such regulatory regions will be well known to those skilled in the art, and may be utilized in the absence of undue experimentation.

For underexpression of an endogenous IGS58 gene sequence, such a sequence may be isolated and engineered such that when reintroduced into the genome of the animal of interest, the endogenous IGS58 gene alleles will be inactivated, or "knocked-out". Preferably, the engineered IGS58 gene sequence is introduced via gene targeting such that the endogenous IGS58 sequence is disrupted upon integration of the engineered IGS58 gene sequence into the animal's genome.

Animals of any species, including, but not limited to, mice, rats, rabbits, squirrels, guinea-pigs, pigs, micro-pigs, goats, and non-human primates, *e.g.*, baboons, monkeys, and chimpanzees may be used to generate animal models of IGS58 related disorders.

Any technique known in the art may be used to introduce a IGS58 transgene into animals to produce the founder lines of transgenic animals. Such techniques include, but are not limited to pronuclear microinjection (Hoppe, P.C. and Wagner, T.E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); retrovirus mediated gene transfer into germ lines (van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152, 1985); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson *et al.*, Cell 58:313-321, 1989.); electroporation of embryos (Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814, 1983); and sperm-mediated gene transfer (Lavitrano et al., Cell 57:717-723, 1989); etc. For a review of such techniques, see Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.115:171-229, 1989.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

24

The present invention provides for transgenic animals that carry the IGS58 transgene in all their cells, as well as animals which carry the transgene in some, but not all their cells, i.e., mosaic animals. (See, for example, techniques described by Jakobovits, *Curr. Biol.* 4:761-763, 1994) The transgene may be integrated as a single transgene or in concatamers, e.g., head-to-head tandems or head-to-tail tandems. The transgene may also be selectively introduced into and activated in a particular cell type by following, for example, the teaching of Lasko et al. (Lasko, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236, 1992).

The regulatory sequences required for such a cell-type specific activation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

When it is desired that the IGS58 transgene be integrated into the chromosomal site of the endogenous IGS58 gene, gene targeting is preferred. Briefly, when such a technique is to be utilized, vectors containing some nucleotide sequences homologous to the endogenous IGS58 gene of interest (e.g., nucleotide sequences of the mouse IGS58 gene) are designed for the purpose of integrating, via homologous recombination with chromosomal sequences, into and disrupting the function of, the nucleotide sequence of the endogenous IGS58 gene or gene allele. The transgene may also be selectively introduced into a particular cell type, thus inactivating the endogenous gene of interest in only that cell type, by following, for example, the teaching of Gu et al. (Gu, H. et al., *Science* 265:103-106, 1994). The regulatory sequences required for such a cell-type specific inactivation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

Once transgenic animals have been generated, the expression of the recombinant IGS58 gene and protein may be assayed utilizing standard techniques. Initial screening may be accomplished by Southern blot analysis or PCR techniques to analyze animal tissues to assay whether integration of the transgene has taken place. The level of mRNA expression of the IGS58 transgene in the tissues of the transgenic animals may also be assessed using techniques which include but are not limited to Northern blot analysis of tissue samples obtained from the animal, in situ hybridization analysis, and RT-PCR. Samples of target gene-expressing tissue, may also be evaluated immunocytochemically using antibodies specific for the target gene transgene product of interest. The IGS58 transgenic animals that express IGS58 gene mRNA or IGS58 transgene peptide (detected immunocytochemically, using antibodies directed against target gene product epitopes) at easily detectable levels may then be further evaluated to identify those animals which display characteristic IGS58 based disorder symptoms.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

25

Once IGS58 transgenic founder animals are produced (i.e., those animals which express IGS58 proteins in cells or tissues of interest, and which, preferably, exhibit symptoms of IGS58 based disorders), they may be bred, inbred, outbred, or crossbred to produce colonies of the particular animal. Examples of such breeding strategies include but are not limited to:

5 outbreeding of founder animals with more than one integration site in order to establish separate lines; inbreeding of separate lines in order to produce compound IGS58 transgenics that express the IGS58 transgene of interest at higher levels because of the effects of additive expression of each IGS58 transgene; crossing of heterozygous transgenic animals to produce animals homozygous for a given integration site in order to both augment expression and eliminate the

10 possible need for screening of animals by DNA analysis; crossing of separate homozygous lines to produce compound heterozygous or homozygous lines; breeding animals to different inbred genetic backgrounds so as to examine effects of modifying alleles on expression of the IGS58 transgene and the development of IGS58-like symptoms. One such approach is to cross the IGS58 transgenic founder animals with a wild type strain to produce an F1 generation that

15 exhibits IGS58 related disorder-like symptoms, such as those described above. The F1 generation may then be inbred in order to develop a homozygous line, if it is found that homozygous target gene transgenic animals are viable.

Vaccines

20

Another aspect of the invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal which comprises administering to (for example by inoculation) the mammal the IGS58 polypeptide, or a fragment thereof, if required together with a RAMP polypeptide, adequate to produce antibody and/or T cell immune response to protect said animal

25 from among other things one of the Diseases as mentioned above. In particular, the invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal which comprises administering to (for example by inoculation) the mammal the IGS58 polypeptide, or a fragment thereof, if required together with a RAMP polypeptide, adequate to produce antibody and/or T cell immune response to protect said animal from dysfunctions, disorders, or diseases related

30 to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

Yet another aspect of the invention relates to a method of inducing immunological response in a mammal which comprises delivering the IGS58 polypeptide via a vector directing expression of the IGS58 polynucleotide in vivo in order to induce such an immunological response to produce antibody to protect said animal from diseases.

35

5 A further aspect of the invention relates to an immunological/vaccine formulation (composition) which, when introduced into a mammalian host, induces an immunological response in that mammal to an IGS58 polypeptide wherein the composition comprises an IGS58 polypeptide or IGS58 gene. Such immunological/vaccine formulations (compositions) may be either therapeutic immunological/vaccine formulations or prophylactic immunological/vaccine formulations. The vaccine formulation may further comprise a suitable carrier. Since the IGS58 polypeptide may be broken down in the stomach, it is preferably administered parenterally (including subcutaneous, intramuscular, intravenous, intradermal etc. injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

20

Screening Assays

25 The IGS58 polypeptide of the present invention may be employed in a screening process for compounds which bind the receptor and which activate (agonists) or inhibit activation of (antagonists) the receptor polypeptide of the present invention. Thus, polypeptides of the invention may also be used to assess the binding of small molecule substrates and ligands in, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures. These substrates and ligands may be natural substrates and ligands or may be structural or functional mimetics.

30

IGS58 polypeptides are responsible for biological functions, including pathologies. Accordingly, it is desirable to find compounds and drugs which stimulate IGS58 on the one hand and which can inhibit the function of IGS58 on the other hand. In general, agonists are employed for therapeutic and prophylactic purposes for such conditions as among other things the Diseases as mentioned above. In particular, agonists are employed for therapeutic and prophylactic purposes for dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous

35

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

27

system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

Antagonists may be employed for a variety of therapeutic and prophylactic purposes for such conditions as among other things the Diseases as mentioned above. In particular, antagonists may be employed for a variety of therapeutic and prophylactic purposes for dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus.

In general, such screening procedures involve producing appropriate cells, which express the receptor polypeptide of the present invention on the surface thereof and, if essential co-expression of RAMP's at the surface thereof. Such cells include cells from mammals, yeast, *Drosophila* or *E. coli*. Cells expressing the receptor (or cell membrane containing the expressed receptor) are then contacted with a test compound to observe binding, or stimulation or inhibition of a functional response.

One screening technique includes the use of cells which express the receptor of this invention (for example, transfected CHO cells) in a system which measures extracellular pH, intracellular pH, or intracellular calcium changes caused by receptor activation. In this technique, compounds may be contacted with cells expressing the receptor polypeptide of the present invention. A second messenger response, e.g., signal transduction, pH changes, or changes in calcium level, is then measured to determine whether the potential compound activates or inhibits the receptor.

Another method involves screening for receptor inhibitors by determining modulation of a receptor-mediated signal, such as cAMP accumulation and/or adenylate cyclase activity. Such a method involves transfecting an eukaryotic cell with the receptor of this invention to express the receptor on the cell surface. The cell is then exposed to an agonist to the receptor of this invention in the presence of a potential antagonist. If the potential antagonist binds the receptor, and thus inhibits receptor binding, the agonist-mediated signal will be modulated.

Another method for detecting agonists or antagonists for the receptor of the present invention is the yeast-based technology as described in U.S. Patent 5,482,835.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

28

The assays may simply test binding of a candidate compound wherein adherence to the cells bearing the receptor is detected by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound or in an assay involving competition with a labeled competitor. Further, these assays may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation of the receptor, using detection systems appropriate to the cells bearing the receptor at their surfaces. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed.

Further, the assays may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing an IGS58 polypeptide to form a mixture, measuring the IGS58 activity in the mixture, and comparing the IGS58 activity of the mixture to a standard.

The IGS58 cDNA, protein and antibodies to the protein may also be used to configure assays for detecting the effect of added compounds on the production of IGS58 mRNA and protein in cells. For example, an ELISA may be constructed for measuring secreted or cell associated levels of IGS58 protein using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art, and this can be used to discover agents which may inhibit or enhance the production of IGS58 (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues. Standard methods for conducting screening assays are well known in the art.

Examples of potential IGS58 antagonists include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligand of the IGS58, e.g., a fragment of the ligand, or small molecules which bind to the receptor but do not elicit a response, so that the activity of the receptor is prevented.

Thus in another aspect, the present invention relates to a screening kit for identifying agonists, antagonists, ligands, receptors, substrates, enzymes, etc. for IGS58 polypeptides; or compounds which decrease, increase and/or otherwise enhance the production of IGS58 polypeptides, which comprises:

- (a) an IGS58 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;
 - (b) a recombinant cell expressing an IGS58 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;
 - (c) a cell membrane expressing an IGS58 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;
- or
- (d) antibody to an IGS58 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO: 2.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

29

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

Prophylactic and Therapeutic Methods

5

This invention provides methods of treating abnormal conditions related to both an excess of and insufficient amounts of IGS58 activity.

10 If the activity of IGS58 is in excess, several approaches are available. One approach comprises administering to a subject an inhibitor compound (antagonist) as hereinabove described along with a pharmaceutically acceptable carrier in an amount effective to inhibit activation by blocking binding of ligands to the IGS58, or by inhibiting interaction with a RAMP polypeptide or a second signal, and thereby alleviating the abnormal condition.

15 In another approach, soluble forms of IGS58 polypeptides still capable of binding the ligand in competition with endogenous IGS58 may be administered. Typical embodiments of such competitors comprise fragments of the IGS58 polypeptide.

20 In still another approach, expression of the gene encoding endogenous IGS58 can be inhibited using expression-blocking techniques. Known such techniques involve the use of antisense sequences, either internally generated or separately administered. See, for example, O'Connor, *J Neurochem* (1991) 56:560 in *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Florida USA (1988). Alternatively, oligonucleotides, which form triple helices with the gene, can be supplied. See, for example, Lee et al., *Nucleic*
25 *Acids Res* (1979) 6:3073; Cooney et al., *Science* (1988) 241:456; Dervan et al., *Science* (1991) 251:1360. These oligomers can be administered per se or the relevant oligomers can be expressed in vivo. Synthetic antisense or triplex oligonucleotides may comprise modified bases or modified backbones. Examples of the latter include methylphosphonate, phosphorothioate or
30 peptide nucleic acid backbones. Such backbones are incorporated in the antisense or triplex oligonucleotide in order to provide protection from degradation by nucleases and are well known in the art. Antisense and triplex molecules synthesized with these or other modified backbones also form part of the present invention.

35 In addition, expression of the IGS58 polypeptide may be prevented by using ribozymes specific to the IGS58 mRNA sequence. Ribozymes are catalytically active RNAs that can be natural or synthetic (see for example Usman, N, et al., *Curr. Opin. Struct. Biol* (1996) 6(4), 527-

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

30

33.) Synthetic ribozymes can be designed to specifically cleave IGS58 mRNAs at selected positions thereby preventing translation of the IGS58 mRNAs into functional polypeptide. Ribozymes may be synthesized with a natural ribose phosphate backbone and natural bases, as normally found in RNA molecules. Alternatively the ribozymes may be synthesized with non-natural backbones to provide protection from ribonuclease degradation, for example, 2'-O-methyl RNA, and may contain modified bases.

For treating abnormal conditions related to an under-expression of IGS58 and its activity, several approaches are also available. One approach comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound which activates IGS58, i.e., an agonist as described above, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, to thereby alleviate the abnormal condition. Alternatively, gene therapy may be employed to effect the endogenous production of IGS58 by the relevant cells in the subject. For example, a polynucleotide of the invention may be engineered for expression in a replication defective retroviral vector, as discussed above. The retroviral expression construct may then be isolated and introduced into a packaging cell transduced with a retroviral plasmid vector containing RNA encoding a polypeptide of the present invention such that the packaging cell now produces infectious viral particles containing the gene of interest. These producer cells may be administered to a subject for engineering cells in vivo and expression of the polypeptide in vivo.

For overview of gene therapy, see Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (and references cited therein) in Human Molecular Genetics, Strachan T. and Read A.P., BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

Formulation and Administration

Peptides, such as the soluble form of IGS58 polypeptides, and agonists and antagonist peptides or small molecules, may be formulated in combination with a suitable pharmaceutical carrier. Such formulations comprise a therapeutically effective amount of the polypeptide or compound, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Formulation should suit the mode of administration, and is well within the skill of the art. The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

31

Polypeptides and other compounds of the present invention may be employed alone or in conjunction with other compounds, such as therapeutic compounds.

5 Preferred forms of systemic administration of the pharmaceutical compositions include injection, typically by intravenous injection. Other injection routes, such as subcutaneous, intramuscular, or intraperitoneal, can be used. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants such as bile salts or fusidic acids or other detergents. In addition, if properly formulated in enteric or encapsulated
10 formulations, oral administration may also be possible.

The dosage range required depends on the choice of peptide or compound, the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's condition, and the judgment of the attending practitioner. Suitable dosages are in the range of 0.1-100 µg/kg of
15 subject. Wide variations in the needed dosage, however, are to be expected in view of the variety of compounds available and the differing efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration would be expected to require higher dosages than administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, as is well understood in the art.
20

Polypeptides used in treatment can also be generated endogenously in the subject, in treatment modalities often referred to as "gene therapy" as described above. Thus, for example, cells from a subject may be engineered with a polynucleotide, such as a DNA or RNA, to encode a polypeptide *ex vivo*, and for example, by the use of a retroviral plasmid vector. The cells are
25 then introduced into the subject.

The following examples are only intended to further illustrate the invention in more detail, and therefore these examples are not deemed to restrict the scope of the invention in any way.

EXAMPLE 1 The cloning of cDNA encoding a novel G protein-coupled receptor.

In the public domain databank of unfinished high throughput genomic DNA sequences (htgs) we identified a human genomic sequence (accession n° AL162471) which potentially encoded a novel G-protein coupled receptor (GPCR). We refer to this novel GPCR as IGS58. It was decided to investigate whether this genomic sequence represented a functional gene by trying to clone its cDNA from human tissue. Human testis poly A (+) RNA (Clontech cat # 6535-1) was first treated with DNase I (Life Technologies) to destroy remaining traces of genomic DNA and then converted to cDNA via reverse transcription using the Superscript™ II reverse transcriptase (Life Technologies) according to the protocols recommended by the supplier of these enzymes. PCR primers were designed to amplify the putative IGS58 coding sequence. The primary PCR reaction (50 µl volume) was carried out on the testis cDNA template (originating from 50 ng DNase I treated and reverse transcribed human testis poly A (+) RNA) using the HotStarTaq™ DNA polymerase (Qiagen # 203203) with forward and reverse primers IP15,073 (SEQ ID NO:3) and IP15,075 (SEQ ID NO:4) respectively under the conditions recommended by Qiagen. For the PCR reaction, reaction tubes were heated at 95°C for 15 min and then subjected to 35 cycles of denaturation (95°C, 30 sec), annealing (65°C, 120 sec) and extension (72°C, 90 sec). There was a final elongation for 10 min at 72°C. 1 µl of a 1/50 dilution of the primary PCR reaction was used as a template in a semi-nested PCR reaction using the HotStarTaq™ DNA polymerase (Qiagen # 203203) with the nested forward primer IP15,074 (SEQ ID NO:5) and the primary reverse primer IP15,075 (SEQ ID NO:4) respectively. A BamHI cloning site had been appended to the 5' end of primer IP15,074 to allow convenient subcloning afterwards. Cycling conditions for the nested PCR reaction were identical to those of the primary PCR. PCR reaction products were analysed via agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The primary PCR reaction yielded no signal while the semi-nested PCR reaction produced a distinct DNA fragment of approximately 1600 bp. No DNA products were obtained when mock reverse transcribed (= no Superscript™ II enzyme added in the reverse transcription reaction) RNA was used, demonstrating that the 1600 bp fragment originated from cDNA. The ± 1600 bp fragment was purified using the Qiaquick™ purification kit (Qiagen) and ligated into the pGEM-T vector according to the procedures recommended by the supplier (pGEM-T system, Promega). The recombinant plasmids were then used to transform competent E. coli strain DH5αF' bacteria. Transformed cells were plated on LB agar plates containing ampicillin (100 µg/ml), IPTG (0.5 mM) and X-gal (50 µg/ml). Plasmid DNA was purified from mini-cultures of individual white colonies using the BioRobot™ 9600 nucleic acid purification system (Qiagen) and sequenced. DNA sequencing reactions were carried out on the purified plasmid DNA with the ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE-Biosystems) using insert

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

33

flanking and internal (IGS58 specific) primers. Cycle sequencing reaction products were purified via EtOH/NaOAc precipitation and loaded on an ABI 377 automated sequencer. Clone IGS58.6 contained a DNA sequence of 1604 bp, encoding a protein of 482 amino acids. We refer to this DNA sequence (minus the BamHI cloning site) and the encoded protein as IGS58DNA (SEQ ID NO:1) and IGS58PROT (SEQ ID NO:2) respectively. The IGS58DNA sequence was identical to the stretch initially identified within genomic entry AL162471 except at nucleotide positions 19 (G instead of A), 35 (T instead of C) and 1431 (T instead of C). Nucleotide position 19 is in the 5' non-coding region and does not influence the encoded protein (nucleotide position 19 is actually the 3' penultimate nucleotide of primer IP15,074; although this primer was designed with an "A" at that position, a "G" was apparently introduced at that position during synthesis). The change at nucleotide position 35 is within the IGS58 open reading frame but does not affect the identity of the encoded amino acid. The difference at nucleotide position 1431 however leads to a change in the encoded protein (Val->Ala). The human expressed sequence tag (EST) sequence entries AW196331 and AA634446, which completely overlap with the 3' end of the IGS58DNA sequence have also a T at position 1431.

For the IGS58PROT sequence homology searches of up to date protein databanks and translated DNA databanks were executed using the BLAST algorithm (Altschul S.F. et al. [1997], Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). These searches showed that the IGS58PROT sequence was most similar to a sequence claimed to represent the human leukocyte platelet-activating factor receptor (92% identities over 312 aligned residues; GenBank accession n° Q14968; however this protein is only 322 residues long). At the DNA level IGS58DNA was 98% identical (over 1426 aligned nucleotides) with the GenBank M76676 sequence. Compared to IGS58DNA a number of insertions/deletions are present in the M76676 DNA sequence resulting in a shorter encoded protein that is only 92% identical with (part of) IGS58PROT.

1° FWD	SEQ ID NO:3	IP15,073	5'-CGAGCCACCACTCCGACCTAGTGGC-3'
1°/2° REV	SEQ ID NO:4	IP15,075	5'-GTGGTAAGCCTCCCCCGTCTAGC-3'
2° FWD	SEQ ID NO:5	IP15,074	5'-GAGGATCCGCGCCGCCCGCCACCAAG-3'

Table 3: Overview of the oligonucleotide primers that were used for the cDNA cloning of IGS58. The BamHI cloning site that was added to primer IP15,074 is underlined.

1° FWD: forward primer used in the primary PCR reaction.
 1°/2° REV: reverse primer used in the primary and secondary (semi-nested) PCR reactions.
 2° FWD: forward primer used in the semi-nested PCR reaction. Although the 3' penultimate nucleotide of this primer was designed as an "A" as shown, sequence analysis of the PCR

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

34

product generated with this primer showed that during synthesis of the oligo a "G" had erroneously been inserted.

5

EXAMPLE 2 Construction of the mammalian expression vector pcDNA3.1(-)hulGS58.

10 The *E. coli* bacterial strain IGS58.6 harboring plasmid pGEM-T_hIGS58, which contained the complete coding sequence of the human IGS58 protein was recloned after replating on LB agar plates (containing 100 µg ampicillin/ml) and deposited both in Innogenetics' bacterial strain collection (ICCG 4584) and at the "Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)" at Utrecht, The Netherlands (accession n° 109717). Plasmid DNA prepared from the recloned isolate was resequenced and found to be identical to the IGS58DNA consensus sequence determined previously.

15 A 1563 bp DNA fragment containing the complete IGS58 coding sequence, was PCR-amplified from the pGEM-T_hIGS58 plasmid template using oligonucleotide primers IP15,074 (SEQ ID NO:5) and IP15,076 (SEQ ID NO:6). At their 5' end oligonucleotides IP15,074 (SEQ ID NO:5) and IP15,076 (SEQ ID NO:6) contained BamHI and HindIII cloning sites respectively. The amplified PCR fragment was BamHI/HindIII digested and purified from gel (MiniElute gel
20 extraction protocol, Qiagen). The pcDNA3.1(-) plasmid expression vector (Invitrogen) was digested with BamHI/HindIII and the linearized 5413 bp vector fragment was also purified from gel. The digested plasmid and PCR fragments were ligated and the ligation mixture was transformed into competent *E. coli* strain DH5αF' bacteria by heat shock. Transformed bacteria
25 were plated on LB agar plates (containing 100 µg/ml ampicillin) and incubated overnight at 37°C. Individual bacterial colonies were selected and cultured overnight in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA was prepared and analysed via BamHI/HindIII restriction analysis. Three clones (clones 17, 23, 26) exhibited the correct restriction profile and were further characterised via DNA sequence analysis. Clone 26 was deposited in Innogenetics' bacterial culture collection as ICCG 4748 (harboring plasmid pcDNA3.1(-)
30)hulGS58).

DNA sequence analysis of plasmid DNA pcDNA3.1(-)hulGS58 prepared from strain ICCG 4748 showed that the insert was completely identical to the IGS58DNA consensus cDNA sequence.

EXAMPLE 3 Expression analysis of IGS58 mRNA in different human tissues via quantitative PCR (Q-PCR).

5 Absolute expression levels of human GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and IGS58 mRNA were determined in a real-time quantitative RT-PCR assay (Q-PCR) using the Light Cycler™ Instrument (Roche Diagnostics) and gene specific PCR primers and TaqMan™ probes on human RNA samples. mRNA levels for the house keeping gene GAPDH were measured as a control for the efficiency of cDNA synthesis and PCR

10 amplification on the different RNA samples.
cDNA was synthesized via reverse transcription from either total RNA of different human tissues (Clontech human RNA panels cat# K4000-1, K4001-1, K4002-1, K4003-1 and K4004-1) or from poly(A)⁺ RNA derived from different subregions of human brain (Clontech cat #6580.1, 6575.1, 6543.1, 6574.1, 6577.1, 6578.1 and 6582.1). Prior to reverse transcription RNA was

15 treated with DNase I (Life Technologies cat# 18068-015) according to the procedure recommended by the supplier in order to destroy possible contaminating genomic DNA. The DNase I reaction was stopped by adding EDTA (final concentration = 2.3 mM) and heating for 10 min at 65°C. DNase I treated RNA (either 5 µg total RNA or 945 ng poly(A)⁺ RNA) was annealed to 2.5 µg oligo(dT) (Life Technologies # 18418-012) and subjected to reverse

20 transcription using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen; 100 µl reaction volume; 1h at 37°C) (= RT⁻-reaction). The reverse transcriptase was inactivated by incubation at 93°C for 5 min. Part of the DNase treated RNA was not subjected to reverse transcription and was used as a control to check for the presence of remaining genomic DNA (RT⁻-reaction).

As a control for the absence of genomic DNA in the RT⁻ reactions of the total RNA

25 samples a PCR amplification reaction specific for human β₂-microglobulin DNA was performed. The PCR reaction was carried out in a 25 µl reaction volume containing 2.5 µl GeneAmp™ 10x PCR buffer (Applied Biosystems), 200 µM each of dNTP, 0.5 µl of the RT⁻ cDNA synthesis reaction, 5 pmol each of PCR primers IP3,981 (SEQ ID NO:7) and IP3,982 (SEQ ID NO:8) and 1.25 U AmpliTaq Gold™ DNA polymerase (Applied Biosystems cat# N808-0244). After an initial

30 incubation at 95°C for 10 min, reactions were cycled 30 times as follows: 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 55°C and 1 min extension at 72°C. There was a final extension at 72°C for 10 min. As a positive control 50 ng of human genomic DNA (Clontech #6551-1) was used. An amplicon of expected length was obtained from the genomic DNA template but not

35 from the negative control (H₂O) nor from the RT⁻ samples (due to the fact that the IP3,981/IP3982 primer pair spans a 616 bp intron the predicted amplicon lengths are 269 bp and 885 bp on cDNA and genomic DNA respectively). RT⁻ poly(A)⁺ RNA samples were analyzed for the presence of genomic DNA via GAPDH specific Q-PCR using 0.8 µl of the RT⁻ cDNA

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

36

synthesis reaction (see below). No GAPDH specific signal was obtained. We concluded that the synthesized cDNA was free of genomic DNA.

Q-PCR reactions were carried out in a 20 μ l reaction volume containing 1x TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems cat# 4304437), 0.12 mg BSA/ml, 900 nM of either GAPDH or IGS58 specific forward and reverse primers (IP15,529 [SEQ ID NO:9] / IP15,531 [SEQ ID NO:10] for GAPDH and IP15,714 [SEQ ID NO:11] / IP 15,715 [SEQ ID NO:12] for IGS58), 250 nM of the gene specific TaqMan probe (IP15,530 [SEQ ID NO:13] for GAPDH and IP 15,705 [SEQ ID NO:14] for IGS58 respectively) and 1.6 μ l of the total RNA RT⁺ or poly(A)⁺ RT⁺ cDNA synthesis reaction. The 1x TaqMan™ Universal PCR Master Mix contained AmpliTaq Gold™ DNA polymerase, AmpErase™ Uracil N-glycosylase (UNG), dNTPs with dUTP, Passive Reference 1 and optimized buffer components. Specific primers and TaqMan probes were designed with the Primer Express™ software (Applied Biosystems). Gene specific standard curves were established on a 1/10 dilution series (10^8 to 10^2 copies/reaction) of linearized pGEM-ThuGAPDH (containing full length human GAPDH cDNA) or pGEM-ThsIGS58 plasmid (ICCG 4584). PCR reactions were carried out in glass capillary cuvettes in the Light Cycler™ instrument. After an initial incubation at 50°C for 2 min (to allow the AmpErase UNG reaction), followed by the activation of the AmpliTaq Gold™ DNA polymerase for 10 min at 95°C, reactions were cycled 50 times as follows: 15 sec denaturation at 95°C and 60 sec annealing/extension at 60°C (for both GAPDH and IGS58). Quantification of the samples was carried out using the Light Cycler Software version 3.0.

Absolute expression levels for human GAPDH mRNA ranged from $\approx 4 \times 10^5$ to $\approx 1.5 \times 10^6$ copies/ng poly(A)⁺ RNA in most tissues except in skeletal muscle ($\approx 7.4 \times 10^8$ copies/ng poly(A)⁺ RNA), heart ($\approx 2.3 \times 10^8$ copies/ ng poly(A)⁺ RNA) and in pancreas, spleen, liver and stomach (ranging between $\approx 1-3 \times 10^5$ copies/ ng poly(A)⁺ RNA respectively) (Fig.1).

IGS58 mRNA was found to be an order of magnitude more abundant in testis than in the tissue with the second highest expression level (prostate: 6,501 copies / ng mRNA) (Fig.2). Relatively high levels (between 1,000 and 4,000 copies / ng mRNA) were also observed in tissues of the central nervous system (fetal brain, brain, cerebellum and spinal cord). This was corroborated by Q-PCR data obtained on poly(A)⁺ RNA obtained from different brain subregions: IGS58 mRNA expression levels here were between 500 and 1,000 copies / ng mRNA except for substantia nigra (296 copies / ng mRNA). Considerable levels of IGS58 mRNA were also found in uterus, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland and thyroid.

SEQ ID NO:6	IP15,076	5'- AGAAGCTTATCCACAACCTCTCCCCAGAATCTCC- 3'
SEQ ID NO:7	IP3,981	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3'
SEQ ID NO:8	IP3,982	5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'
SEQ ID NO:9	IP15,529	5'-GGTGAAGCAGGCGTCGG-3'
SEQ ID NO:10	IP15,531	5'-GACAAAGTGGTCGTTGAGGGC-3'
SEQ ID NO:11	IP 15,714	5'-TGCCAACCGGCTGGG-3'
SEQ ID NO:12	IP 15,715	5'-TTTAGGCTGTTTGGTCACTGCC-3'
SEQ ID NO:13	IP15,530 TaqMan probe	5'(FAM)-TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACC- (TAMRA)3'
SEQ ID NO:14	IP 15,705 TaqMan probe	5'(FAM)-CTTCCAACCCGGCCAGCGGA-(TAMRA)3'

Table 4: Overview of the oligonucleotide primers and Taqman probes that were used.

5

EXAMPLE 4 Construction of IGS58 transfected cells.

10 To identify ligands for IGS58, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are stably transfected with cDNA of the IGS58 orphan receptor. Since the G-protein coupling mechanism of IGS58 receptor is still unknown, a specific CHO-cell strain is used, which expresses the G-protein G α 16 (CHO-K1-G α 16, Molecular Devices), known as "universal adapter" for GPCRs (Milligan G. et al. (1996) Trends Pharmacol. Sci. 17: 235-7). This cell line also stably expresses

15 the mitochondrially targeted apo-aequorin.

The Materials include: IGS58-pcDNA3.1 vector [CCG #4748]; SuperFect Transfection Reagent (Qiagen); Growth-medium: CHO-S-SFM II (Gibco BRL), supplemented with 10% Foetal

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

38

Calf Serum (FCS, Gibco BRL), 2mM L-glutamin, Hygromycin B 400µg/ml; Selection-medium: CHO-S-SFM II (Gibco BRL), supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamin, Hygromycin B 400µg/ml and Geneticin 500µg/ml; RNeasy Mini Kit (Qiagen), DNase I (Ambion, 2 U/µl), SuperScript II (Gibco BRL), SuperScript II 200U (Gibco BRL).

5 CHO-K1-Gα16/mtAEQ cells are transfected with SuperFect (Qiagen), as described by the manufacturer. Transfections are done in a 24 wells plate. After 24 hours in Growth-medium, medium is removed and replaced by Selection-medium. After growing to confluency in Selection-medium the polyclonals are passed once in a 24 wells plate.

10 Selection of polyclonals is done by Q-PCR. RNA is isolated from monoclonals (1 confluent well from 24 wells plate) with the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the supplied protocol. RNA is treated with DNase I (Ambion, 2 U/µl), 1 U per sample. Half of the RNA sample is used for RT-PCR using SuperScript II (Gibco BRL). Primer annealing is carried out with RNA and oligo-dT16 (0,6 µM) for 10 min at 65 °C to 15 °C. First Strand Buffer (Gibco BRL) with dNTP's 0,43mM each, DTT 10mM, 20U RNasin (Promega, 40U/µl) and SuperScript II 200U (Gibco BRL, 200U/µl) to a final volume of 30 µl are added, followed by incubation at 42°C for 1

15 hour.
Q-PCR is carried out with IGS58 receptor specific Q-PCR primers. The amount of PCR product is determined after each cycle by measuring the fluorescence of Sybr Green, which binds to dsDNA. The relative expression level of the IGS is related to a standard curve of four different dilutions of chromosomal DNA. The relative quantification is normalized against the housekeeping gene Beta-Tubulin.

20 The two best polyclonals are used to obtain monoclonals. Cells are seeded in Limited Dilution. Selection of monoclonals is done by Q-PCR, as described earlier. The six best monoclonals are grown in T75 flask to confluency and frozen in growth medium, containing 10%
25 DMSO.

EXAMPLE 5 Ligand finding.

30 CHO-K1-Gα16-mtAEQ cells expressing the particular G-protein coupled receptor are grown as described in Example 4 and used in screening a number of compound libraries. Compounds are tested at a concentration of 1 or 10 µM. In the aequorin screening assay ATP (10 µM) or digitonin (50 µM) is used as a positive control. Screening is performed semi-
35 automatically using a MicroBeta Jet 1450 (Perkin Elmer) as described below.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

39

Once compounds are found showing a signal activity is confirmed in a second aequorin-experiment. Subsequently they are characterized further in dose-response experiments.

If not successful in finding ligands using CHO-K1- $\alpha 16$ cells expressing IG558 receptor and apo-aequorin a corresponding cell line without G-protein $\alpha 16$ can be developed in a similar way (see Example 4) followed by testing compounds.

5

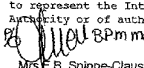
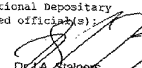
WO 02/33079

PCT/EP01/11371

40
 BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
 RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
 FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Solvay Pharmaceuticals B.V. Intellectual Property Department Postbus 900 1380 DA WEESP Nederland <i>name and address of depositor</i>	RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page
--	---

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Escherichia coli DH5alphaF ⁺ pGEM-THisGS58(ICCG 4584)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 109717
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation <i>(mark with a cross where applicable)</i>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 30-08-2001 <i>(date dd-mm-yy of the original deposit)</i> 1	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on: not applicable <i>(date dd-mm-yy of the original deposit)</i> and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on: not applicable <i>(date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)</i>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmekultures Address: Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 3508 AD UTRECHT The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Snippe-Claus  Dr J.A. Stalpers Date (dd-mm-yy): 14-09-2001

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
 depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

CBS/910

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

41
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Solvay Pharmaceuticals B.V. Intellectual Property Department Postbus 900 1380 DA WEESP Nederland <i>name and address of the party to whom the viability statement is issued</i>

VISIBILITY STATEMENT
 issued pursuant to Rule 10.2 by the
 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
 identified on the following page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Solvay Pharmaceuticals B.V. Intellectual Property Department Address: Postbus 900 1380 DA WEESP Nederland	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 109717 Date (dd-mm-yy) ¹ of the deposit or of the transfer: 1 30-08-2001
III. VIABILITY STATEMENT The viability of the microorganism identified under II above was tested on 03-09-2001 ² . On that date (dd-mm-yy), the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable	

¹ indicates the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).


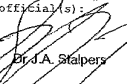
² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii) refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

42

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelfcultures	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  M.S. F.B. Snippe-Claus  E.J.A. Stalpers
Address: Uppsalaalaan 8 P.O. Box 85167 3508 AD UTRECHT The Netherlands	
Date (dd-mm-yy): 14-09-2001	

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

43

Claims

1. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - 5 a) a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide according to SEQ ID NO: 2;
 - b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide
10 sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
 - c) a nucleotide sequence having at least 80 % (preferably at least 90%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
 - d) a nucleotide sequence which is complementary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).
15
2. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - a) a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide according to SEQ ID
20 NO: 2;
 - b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
 - 25 c) a nucleotide sequence having at least 90 % (preferably at least 95%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
 - d) a nucleotide sequence which is complementary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).
3. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group
30 consisting of:
 - a) a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide according to SEQ ID
NO: 2;
 - 35 b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

44

- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- c) a nucleotide sequence having at least 95 % (preferably at least 98%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
 - d) a nucleotide sequence which is complimentary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).
4. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- a) a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide according to SEQ ID NO: 2;
 - b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
 - c) a nucleotide sequence having at least 98 % (preferably at least 99%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
 - d) a nucleotide sequence which is complimentary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).
5. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide comprises the nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1 encoding the IGS58 polypeptide of SEQ ID NO:2.
6. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide comprises a nucleotide sequence that is at least 80% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
7. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide comprises a nucleotide sequence that is at least 90% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
8. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide comprises a nucleotide sequence that is at least 95% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

45

sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.

- 5 9. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide comprises a nucleotide sequence that is at least 98% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 10 10. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide comprises a nucleotide sequence that is at least 99% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 15 11. The polynucleotide of any one of claims 5 to 10 which is the polynucleotide of SEQ ID NO:1 or the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands).
- 20 12. The polynucleotide of any one of claims 1 to 11 which is DNA or RNA.
13. A hybridization probe comprising the polynucleotide of any one of claims 1 to 4.
- 25 14. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence, which has at least 80% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
- 30 15. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence, which has at least 90% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
- 35

16. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence, which has at least 95% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
17. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence, which has at least 98% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
18. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence, which has at least 99% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
19. A host cell comprising the expression system of any one of claims 14 to 18.
20. A host cell according to claim 19 which is a yeast cell
21. A host cell according to claim 19 which is an animal cell
22. IGS58 receptor membrane preparation derived from a cell according to any one of claims 19 to 21.
23. A process for producing an IGS58 polypeptide comprising culturing a host of claim 19 to 21 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture.
24. A process for producing a cell which produces an IGS58 polypeptide thereof comprising transforming or transfecting a cell with the expression system of any one of claims 14 to

18 such that the cell, under appropriate culture conditions, is capable of producing an IGS58 polypeptide.

- 5 25. An IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 80% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or to the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 10 26. An IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or to the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 15 27. An IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 95% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or to the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 20 28. An IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 98% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or to the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 25 29. An IGS58 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 99% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or to the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 30 30. The polypeptide of any one of claims 25 to 29 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands).
- 35 31. An antibody immunospecific for the IGS58 polypeptide of any one of claims 25 to 30.
32. A method for the treatment of a subject in need of enhanced activity or expression of IGS58 polypeptide receptor of any one of claims 25 to 30 comprising:

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

48

- (a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an agonist to said receptor; and/or
- (b) providing to the subject an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity to a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide of SEQ ID NO:2 or the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length; or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence in a form so as to effect production of said receptor activity *in vivo*.
- 5
- 10
33. A method for the treatment of a subject having need to inhibit activity or expression of IGS58 polypeptide receptor of any one of claims 25 to 30 comprising:
- (a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an antagonist to said receptor; and/or
- 15 (b) administering to the subject a polynucleotide that inhibits the expression of the nucleotide sequence encoding said receptor; and/or
- (c) administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide that competes with said receptor for its ligand.
- 20
34. A process for diagnosing a disease or a susceptibility to a disease in a subject related to expression or activity of the IGS58 polypeptide of any one of claims 25 to 30 in a subject comprising:
- (a) determining the presence or absence of a mutation in the nucleotide sequence encoding said IGS58 polypeptide in the genome of said subject in a sample derived from said subject; and/or
- 25 (b) analyzing for the presence or amount of the IGS58 polypeptide expression in a sample derived from said subject.
- 30
35. A method for identifying agonists to the IGS58 polypeptide of any one of claims 25 to 30 comprising:
- (a) contacting a cell which produces a IGS58 polypeptide with a test compound; and
- (b) determining whether the test compound effects a signal generated by activation of the IGS58 polypeptide.
- 35
36. An agonist identified by the method of claim 35.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

49

37. A method for identifying antagonists to the IGS58 polypeptide of any one of claims 25 to 30 comprising:
- 5 (a) contacting a cell which produces a IGS58 polypeptide with an agonist; and
(b) determining whether the signal generated by said agonist is diminished in the presence of a candidate compound.
38. An antagonist identified by the method of claim 37.
39. A recombinant host cell produced by a method of claim 24 or a membrane thereof
10 expressing an IGS58 polypeptide.
40. A method of creating a genetically modified non-human animal comprising the steps of:
- 15 a) ligating the coding portion of a polynucleotide consisting essentially of a nucleic acid sequence encoding a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 or the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) or a biologically active fragment thereof, to a regulatory sequence which is capable of driving high level gene expression or expression in a cell type in which the gene is not normally expressed in said animal; or
- 20 b) engineering the coding portion of a polynucleotide consisting essentially of a nucleic acid sequence encoding a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 or the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) or a biologically active fragment thereof, and reintroducing said sequence in the genome of said animal in such a way that the endogenous gene alleles, encoding a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 or the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) or a biologically active fragment, are fully or partially inactivated.
- 25
- 30
41. A method for the production of a pharmaceutical composition comprising the method of claim 35 or 37 and then mixing the compound identified with a pharmaceutically
35 acceptable carrier.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

50

42. Use of:
- (a) a therapeutically effective amount of an agonist to the IGS58 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30; and/or
 - (b) an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity to a nucleotide sequence encoding the IGS58 polypeptide of SEQ ID NO: 2 or the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109717 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands) over its entire length; or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence in a form so as to effect production of said receptor activity *in vivo*,
- 5 for the preparation of a medicament for the treatment of a subject suffering from a disease related to expression or activity of the IGS58 receptor polypeptide, in need of enhanced activity or expression of IGS58 polypeptide of any one of claims 25 to 30.
- 10
43. Use of:
- (a) a therapeutically effective amount of an antagonist to the IGS58 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30; and/or
 - (b) a nucleic acid molecule that inhibits the expression of the nucleotide sequence encoding the IGS58 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30; and/or
 - (c) a therapeutically effective amount of a polypeptide that competes with the IGS58
- 15 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30 for its ligand,
- 20 for the preparation of a medicament for the treatment of a subject suffering from a disease related to expression or activity of the IGS58 receptor polypeptide, having need to inhibit activity or expression of IGS58 polypeptide of any one of claims 25 to 30.

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

1/7

SEQUENCE LISTING

5 <110> SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V.
 <120> Human G-protein coupled receptor and uses thereof
 <130> SPW00.17 WO
 10 <140>
 <141>
 <160> 14
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1604
 20 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (26)..(1471)
 25 <400> 1
 gccgcgcgcc ccgccaccgg cgage atg gcc tta ttg ggc agc cag cac tcc 52
 Met Ala Leu Leu Gly Ser Gln His Ser
 30 1 5
 ggc gcc ccc tcc gcg gcc ggc cca cct ggc ggg act tcc tcc gcg gcc 100
 Gly Ala Pro Ser Ala Ala Gly Pro Pro Gly Gly Thr Ser Ser Ala Ala
 35 10 15 20 25
 acg gcg gcc gtg ctc tcc ttc agc acc gtg gcg acc gcg gcg ctg ggg 148
 Thr Ala Ala Val Leu Ser Phe Ser Thr Val Ala Thr Ala Ala Leu Gly
 40 30 35 40
 aac ctg agc gac gca agc gga ggc ggc aca gct gcc gct ccc ggt gcc 196
 Asn Leu Ser Asp Ala Ser Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Pro Gly Gly
 45 45 50 55
 ggc gcc ctt ggc ggg tcc ggg gca gcg cgg gag gcg ggg gcg gcg gtg 244
 Gly Gly Leu Gly Gly Ser Gly Ala Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ala Val
 50 60 65 70
 agg cgg ccg cta gcc ccg gag gcg gcg ccg ctg ctg tcg cac gga gct 292
 Arg Arg Pro Leu Gly Pro Glu Ala Ala Pro Leu Leu Ser His Gly Ala
 55 75 80 85
 gca gtg gcg gcc cag gcg ctc gtc ctc ctg ctc atc ttc ctg ctg tot 340
 Ala Val Ala Ala Gln Ala Leu Val Leu Leu Leu Ile Phe Leu Leu Ser
 90 95 100 105
 55 agc ctt gcc aac tgc gcg gtg atg ggg gtg att gtg aag cac cgg cag 388
 Ser Leu Gly Asn Cys Ala Val Met Gly Val Ile Val Lys His Arg Gln
 110 115 120
 60 ctc cgc acc gtc acc aac gcc ttc atc ctg tcg ctg tcc cta tcg gat 436
 Leu Arg Thr Val Thr Asn Ala Phe Ile Leu Ser Leu Ser Leu Ser Asp
 125 130 135

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

277

ctg ctc acg gcg ctg ctc tgc ctg ccc gcc gcc ttc ctg gac ctc ttc 484
 Leu Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Pro Ala Ala Phe Leu Asp Leu Phe
 140 145 150
 5 act cag ccc ggg ggt tgc gcg cct gcc gcc gcc gcg ggg ccc tgg cgc 532
 Thr Pro Pro Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ala Gly Pro Trp Arg
 155 160 165
 10 ggc ttc tgc gcc gcc agc cgc ttc ttc agc tgc tgc ttc ggc atc gtg 580
 Gly Phe Cys Ala Ala Ser Arg Phe Phe Ser Ser Cys Phe Gly Ile Val
 170 175 180 185
 15 tcc acg ctc agc gtg gcg ctc atc tgc ttg gac cgt tac tgc gct atc 628
 Ser Thr Leu Ser Val Ala Leu Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Cys Ala Ile
 190 195 200
 20 gtg cgg cag cag ggg gag aag atc ggc cgc cgc cgc ctg cag ctg 676
 Val Arg Pro Pro Arg Glu Lys Ile Gly Arg Arg Arg Ala Leu Gln Leu
 205 210 215
 25 ctg gcg gcc gcc tgg ctg acg gcc ctg gcc ttc tcc ttg ccc tgg gag 724
 Leu Ala Gly Ala Trp Leu Thr Ala Leu Gly Phe Ser Leu Pro Trp Glu
 220 225 230
 30 ctg ctc ggg ggg ccc cgg gaa ctc gcg gcg gcg cag agc ttc cae gcc 772
 Leu Leu Gly Ala Pro Arg Glu Leu Ala Ala Ala Gln Ser Phe His Gly
 235 240 245
 35 tgc ctc tac cgg acc tcc ccg gac ccc cgc cag ctg gcc gcg gcc ttc 820
 Cys Leu Tyr Arg Thr Ser Pro Asp Pro Ala Gln Leu Gly Ala Ala Phe
 250 255 260 265
 40 agc gtg ggg ctg gtg gtg gcc tgc tac ctg ctg ccc ttc ctg ctc atg 868
 Ser Val Gly Leu Val Val Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Phe Leu Leu Met
 270 275 280
 45 tgc ttc tgc cac tac cae atc tgc aag acg gtg cgc ctg tgc gac gtg 916
 Cys Phe Cys His Tyr His Ile Cys Lys Thr Val Arg Leu Ser Asp Val
 285 290 295
 50 cgc gtg cgg cgg gtg aac acc tac cgc cgc gtg ctg cgc ttc ttc agc 964
 Arg Val Arg Pro Val Asn Thr Tyr Ala Arg Val Leu Arg Phe Phe Ser
 300 305 310
 55 gag gtg cgc acg gcc acc acc gtc ctc atc atg atc gtc ttc gtc atc 1012
 Glu Val Arg Thr Ala Thr Thr Val Leu Ile Met Ile Val Phe Val Ile
 315 320 325
 60 tgc tgc tgg ggg ccc tac tgc ttc ctg gtg ctg ctg gcc gcc gcc cgg 1060
 Cys Cys Trp Gly Pro Tyr Cys Phe Leu Val Leu Leu Ala Ala Ala Arg
 330 335 340 345
 65 cag gcc cag acc atg cag gcc ccc tgc ctc ctc agc gtg gtg gcc gtc 1108
 Gln Ala Gln Thr Met Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ser Val Val Ala Val
 350 355 360
 70 tgg ctg acc tgg gcc aat ggg gcc atc aac cct gtc atc tac gcc atc 1156
 Trp Leu Thr Trp Ala Asn Gly Ala Ile Asn Pro Val Ile Tyr Ala Ile
 365 370 375

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

3/7

cgc aat ccc aac att tgc atg ctc cta ggg cgc aac cgc gag gag ggc 1204
 Arg Asn Pro Asn Ile Ser Met Leu Leu Gly Arg Asn Arg Glu Glu Gly
 380 385 390

5 tac cgg act agg aat gtg gac gct ttc ctg ccc agc cag ggc ccg ggt 1252
 Tyr Arg Thr Arg Asn Val Asp Ala Phe Leu Pro Ser Gln Gly Pro Gly
 395 400 405

10 ctg caa gcc aga agc cgc agt cgc ctt cga aac cgc tat gcc aac cgg 1300
 Leu Gln Ala Arg Ser Arg Ser Arg Leu Arg Asn Arg Tyr Ala Asn Arg
 410 415 420 425

15 ctg ggg gcc tgc aac agg atg tcc tct tcc aac ccg gcc agc gga tgg 1348
 Leu Gly Ala Cys Asn Arg Met Ser Ser Ser Asn Pro Ala Ser Gly Val
 430 435 440

20 gca ggg gac gtg gcc atg tgg gcc cgc aaa aat cca gtt gta ctt ttc 1396
 Ala Gly Asp Val Ala Met Trp Ala Arg Lys Asn Pro Val Val Leu Phe
 445 450 455

25 tgc cga gag gga cca cca gag ccg gtg acg gca gtg acc aaa cag cct 1444
 Cys Arg Glu Gly Pro Pro Glu Pro Val Thr Ala Val Thr Lys Gln Pro
 460 465 470

25 aaa tcc gaa gct ggg gat acc agc ctc taagacggtt ggaatggcca 1491
 Lys Ser Glu Ala Gly Asp Thr Ser Leu
 475 480

30 gcttatggaag gcaaatctcc actcgcatta tttaatgatg gaagattctg ggggagatt 1551
 gtggatttca taaagccaaa catttaaacg tagagacggg ggaggottac cac 1604

35 <210> 2
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 2
 Met Ala Leu Leu Gly Ser Gln His Ser Gly Ala Pro Ser Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Gly Thr Ser Ser Ala Ala Thr Ala Ala Val Leu Ser Phe
 20 25 30
 45 Ser Thr Val Ala Thr Ala Ala Leu Gly Asn Leu Ser Asp Ala Ser Gly
 35 40 45
 50 Gly Gly Thr Ala Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Leu Gly Gly Ser Gly
 50 55 60
 Ala Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ala Val Arg Arg Pro Leu Gly Pro Glu
 65 70 75 80
 55 Ala Ala Pro Leu Leu Ser His Gly Ala Ala Val Ala Ala Gln Ala Leu
 85 90 95
 60 Val Leu Leu Leu Ile Phe Leu Leu Ser Ser Leu Gly Asn Cys Ala Val
 100 105 110
 Met Gly Val Ile Val Lys His Arg Gln Leu Arg Thr Val Thr Asn Ala
 115 120 125

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

4/7

Phe Ile Leu Ser Leu Ser Leu Ser Asp Leu Leu Thr Ala Leu Leu Cys
 130 135 140
 5 Leu Pro Ala Ala Phe Leu Asp Leu Phe Thr Pro Pro Gly Gly Ser Ala
 145 150 155
 Pro Ala Ala Ala Ala Gly Pro Trp Arg Gly Phe Cys Ala Ala Ser Arg
 165 170 175
 10 Phe Phe Ser Ser Cys Phe Gly Ile Val Ser Thr Leu Ser Val Ala Leu
 180 185 190
 15 Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Cys Ala Ile Val Arg Pro Pro Arg Glu Lys
 195 200 205
 Ile Gly Arg Arg Arg Ala Leu Gln Leu Leu Ala Gly Ala Trp Leu Thr
 210 215
 20 Ala Leu Gly Phe Ser Leu Pro Trp Glu Leu Leu Gly Ala Pro Arg Glu
 225 230 235 240
 Leu Ala Ala Ala Gln Ser Phe His Gly Cys Leu Tyr Arg Thr Ser Pro
 245 250 255
 25 Asp Pro Ala Gln Leu Gly Ala Ala Phe Ser Val Gly Leu Val Val Ala
 260 265 270
 30 Cys Tyr Leu Leu Pro Phe Leu Leu Met Cys Phe Cys His Tyr His Ile
 275 280 285
 Cys Lys Thr Val Arg Leu Ser Asp Val Arg Val Arg Pro Val Asn Thr
 290 295 300
 35 Tyr Ala Arg Val Leu Arg Phe Phe Ser Glu Val Arg Thr Ala Thr Thr
 305 310 315 320
 Val Leu Ile Met Ile Val Phe Val Ile Cys Cys Trp Gly Pro Tyr Cys
 325 330 335
 40 Phe Leu Val Leu Leu Ala Ala Ala Arg Gln Ala Gln Thr Met Gln Ala
 340 345 350
 45 Pro Ser Leu Leu Ser Val Val Ala Val Trp Leu Thr Trp Ala Asn Gly
 355 360 365
 Ala Ile Asn Pro Val Ile Tyr Ala Ile Arg Asn Pro Asn Ile Ser Met
 370 375 380
 50 Leu Leu Gly Arg Asn Arg Glu Gln Gly Tyr Arg Thr Arg Asn Val Asp
 385 390 395 400
 Ala Phe Leu Pro Ser Gln Gly Pro Gly Leu Gln Ala Arg Ser Arg Ser
 405 410 415
 55 Arg Leu Arg Asn Arg Tyr Ala Asn Arg Leu Gly Ala Cys Asn Arg Met
 420 425 430
 60 Ser Ser Ser Asn Pro Ala Ser Gly Val Ala Gly Asp Val Ala Met Trp
 435 440 445

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

5/7

Ala Arg Lys Asn Pro Val Val Leu Phe Cys Arg Glu Gly Pro Pro Glu
 450 455 460

5 Pro Val Thr Ala Val Thr Lys Gln Pro Lys Ser Glu Ala Gly Asp Thr
 465 470 475 480

Ser Leu

10

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

20 <400> 3
 cgagccacca ctccgaccta gtggc 25

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

30 <400> 4
 gtgtaagcc tccccgtct ctagc 25

35

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 5
 45 gaggatccgc cgccgccccg cccaccag 28

<210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

55 <400> 6
 agaagttat ccacaactot ccccagaat cttcc 35

60

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

6/7

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 7
 10 ccagcagaga atggaagtc 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 20
 <400> 8
 gatgctgctt acatgtctcg 20

<210> 9
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 9
 35 ggtgaagcag gcgtcgg 17

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 45
 <400> 10
 gacaaagtgg tcggtgaggy c 21

<210> 11
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 55
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 11
 60 tgccaaccgg ctggg 15

WO 02/33079

PCT/EP01/11371

7/7

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 12
 10 tttaggctgt ttggcactg cc 22

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: TaqMan probe
 20
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)
 <223> Labeled with 6-carboxyfluorescein
 25
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (29)
 <223> Labeled with
 30 N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin
 <400> 13
 35 tgggtctcctc tgacttcaac agcgacacc 29

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: TaqMan probe
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)
 <223> Labeled with 6-carboxyfluorescein
 45
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (20)
 <223> Labeled with
 50 N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin
 55 <400> 14
 ottccaacc ggccagcgga 20

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/033079 A3

- (51) **International Patent Classification:** C12N 15/12, C07K 14/705, C12Q 1/68, C07K 16/28, A61K 48/00, G01N 33/53, 33/50, 33/68, A01K 67/027
- (21) **International Application Number:** PCT/EP01/11371
- (22) **International Filing Date:** 1 October 2001 (01.10.2001)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
00203566.5 16 October 2000 (16.10.2000) EP
60/241,372 19 October 2000 (19.10.2000) US
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V. [NL/NL]; C.J. Van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL).
- (72) **Inventors; and**
(75) **Inventors/Applicants (for US only):** DELEERSNIJDER, Willy [BE/BE]; c/o C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL); BLOCKX, Herman [BE/BE]; c/o C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL); DE MOOR, Lucie [BE/BE]; c/o C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP WEESP (NL).
- (74) **Agent:** VERHAGE, Marinus; Octrooibureau Zaan B.V., P.O. Box 140, NL-1380 AC Weesp (NL).
- (81) **Designated States (national):** AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NI, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) **Date of publication of the international search report:** 19 September 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) **Title:** HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USUS THERDOI*

(57) **Abstract:** The present invention relates to the IGS58 G-protein coupled receptor family, and to polynucleotides encoding said IGS58 proteins. The invention also relates to inhibiting or activating the action of such polynucleotides and polypeptides, to a vector containing said polynucleotides, a host cell containing such vector and non-human transgenic animals where the IGS58-gene is either overexpressed, misexpressed, underexpressed or suppressed (knock-out animals). The invention further relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor family IGS58 and the use of IGS58 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS58 receptor family in the treatment of a broad range of disorders and diagnostic assays for such conditions. The invention in particular relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor family IGS58 and the use of IGS58 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS58 receptor family in the treatment of dysfunctions, disorders, or diseases related to testis, prostate, ureter, heart, kidney, lung, trachea, skeletal muscle, adrenal gland, thyroid, and the central nervous system, such as fetal brain, brain, cerebellum, spinal cord, caudate nucleus, amygdala, corpus callosum, hippocampus, and thalamus, and diagnostic assays for such conditions.

WO 02/033079 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/11371
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C12Q1/68 C07K16/28 A61K48/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/68 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q A61K G01N A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 98351 A (INCYTE GENOMICS INC (US) LAL BAUGHN HAFALIA NGUYEN GANDHI KALLICK ET A) 27 December 2001 (2001-12-27) SEQ ID NO:10, 27, 35 the whole document	1-10, 12-43
X	--- DATABASE EMBL 'Online! 2 September 1999 (1999-09-02) "Homo sapiens leukocyte platelet-activating factor receptor mRNA, complete cds." Database accession no. M76676 XP002168124 cited in the application the whole document	1-15, 19-26, 31,36,38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document relating 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 ** 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2002		Date of mailing of the international search report 19/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 840-3015		Authorized officer Macchia, G

Form PCT/ISA/210 (specification sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/11371

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 6 March 2000 (2000-03-06) Database accession no. AL159140 XP002168122 nucleotides 134683-136286 the whole document ---	1-13
X	DATABASE EMBL 'Online! 25 May 2000 (2000-05-25) Database accession no. AL162471 XP002168123 cited in the application nucleotides 58145-59748 the whole document ---	1-13
A	EDWARDSEN O. AND KRISTIANSEN K.: "Internet resources on G-protein-coupled receptors" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 22, no. 6, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 226-227, XP004074685 ISSN: 0968-0004 ---	
A	LEE N.H. KERLAVAGE A.R.: "Molecular biology of G-protein-coupled receptors" DRUG NEWS AND PERSPECTIVES, vol. 6, no. 7, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 488-497, XP000677175 ISSN: 0214-0934 ---	
A	STRADER C.D. ET AL.: "Structure and function of G protein-coupled receptors" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, vol. 63, 1994, pages 101-132, XP001041816 ISSN: 0066-4154 ---	
A	RHEE VAN A.M. AND JACOBSON K.A.: "Molecular architecture of G protein-coupled receptors" DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 37, no. 1, January 1996 (1996-01), pages 1-38, XP001011411 ISSN: 0272-4391 ---	
A	FLOWER D.R.: "Modelling G-protein-coupled receptors for drug design" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1422, no. 3, 16 November 1999 (1999-11-16), pages 207-234, XP004281748 ISSN: 0304-4157 ---	
	-/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11371

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HALAZY S.: "G-protein coupled receptors bivalent ligands and drug design" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, vol. 9, no. 4, 1999, pages 431-446, XP000882817 ISSN: 1354-3776 ---	
A	BIKKER J.A. ET AL.: "G-protein coupled receptors: models, mutagenesis, and drug design" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 41, no. 16, 30 July 1998 (1998-07-30), pages 2911-2927, XP000876776 ISSN: 0022-2623 -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/11371
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 32 and 33 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	32, 33, 36, 38, 42, 43 all in part 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims 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:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 01 11371

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 32, 33, 36, 38, 42, 43 all in part

Present claims 36 and 38 relate to products defined by reference to a desirable characteristic or property, namely their capability to act as agonists or antagonists, respectively, of the receptor disclosed in present application.

Present claims 32, 33, 42 and 43 relate to methods and uses involving said agonists and antagonists. Moreover, claim 33 relates also to a method involving a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its capability to compete with said receptor for its ligand.

The claims cover all products having these characteristics or properties, whereas only a very limited number of such products can be derived from the disclosure of present application, namely polypeptides derived from the receptor disclosed, antibodies against said receptor and polynucleotides complementary to the gene encoding said receptor (antisense molecules, ribozymes etc.).

In the present case, the claims so lack support (Article 6 PCT), and the application so lacks disclosure (Article 5 PCT), that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define products by reference to a result to be achieved.

Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to polypeptides derived from the receptor disclosed, antibodies against said receptor and polynucleotides complementary to the gene encoding said receptor (antisense molecules, ribozymes etc.).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/11371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0198351	A	27-12-2001	
		AU 6697501 A	02-01-2002
		AU 6847101 A	02-01-2002
		WO 0198351 A2	27-12-2001
		WO 0198323 A2	27-12-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 3/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 13/00	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 39/00	
A 6 1 P 39/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ブロクス, ヘルマン

オランダ・エヌエル - 1 3 8 1 シーピー ウエースブ・シーゼイバンハウテンラーン 3 6 内

(72) 発明者 ド・ムーア, ルーシー

オランダ・エヌエル - 1 3 8 1 シーピー ウエースブ・シーゼイバンハウテンラーン 3 6 内

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB20 BB46 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02
 FB03 FB05 FB12 GC15
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 DA02 DA12
 EA04 FA10 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ03 QQ20 QQ43 QR08 QR32 QR41
 QR42 QR55 QR62 QR69 QR77 QR82 QS12 QS24 QS25 QS28
 QS34 QS39 QX01
 4B064 AG20 CA06 CA10 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA72X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 CA18 CA53 DC50
 NA14 ZA01 ZA36 ZA59 ZA66 ZA81 ZA96 ZB31 ZC42
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 DA86 EA20

EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004514426A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002536447	申请日	2001-10-01
[标]申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏威杉机俞蒂卡尔的裴浮标		
[标]发明人	デレールスニーダーウイリ ブロクスヘルマン ドムアーラーシー		
发明人	デレールスニーダー,ウイリ ブロクス,ヘルマン ドムアー,ルーシー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/00 A61P19/00 A61P25/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00 A61P39/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/ 28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1 /68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K48/00 A61K2121/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/00 A61P19/ 00 A61P25/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00 A61P39/00 A61P43/00 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/00 A61P19/00 A61P25/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00 A61P39/00 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33 /15.Z G01N33/50.Z C12N5/00.B C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/BB46 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /DA02 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063 /QQ03 4B063/QQ20 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063 /QS28 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064/AG20 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084 /AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA36 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C084/ZA96 4C084 /ZB31 4C084/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000203566 2000-10-16 EP 60/241372 2000-10-19 US		
其他公开文献	JP2004514426A		

摘要(译)

本发明涉及IGS 58 G蛋白偶联受体家族和编码所述IGS 58蛋白的多核苷酸。本发明还涉及抑制或激活这些多核苷酸和多肽，载体的所述动作包括所述多核苷酸，基因IGS58过表达，MIS表达，低表达，或抑制（敲除），则还涉及宿主细胞和转基因非人动物，包括载体，如。本发明进一步涉及筛选能够充当所述G蛋白偶联受体家族IGS 58的激动剂或拮抗剂的化合物的方法，以及筛选能够充当IGS 58多肽和聚IGS 58受体家族的核苷酸和激动剂或拮抗剂关于使用gonist。本发明特别地，睾丸，前列腺，子宫，心脏，肾脏，肺，气管，骨骼肌，肾上腺，甲状腺和中枢神经系统（例如胎儿大脑，大脑，小脑，脊髓，尾状核，杏仁核，胼胝体，功能障

碍相关的海马和丘脑)，治疗的病症或疾病的，以及在诊断测试这样的条件下，所述激动剂或安塔所述G蛋白偶联受体家族IGS58