

(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2004-522421

(P2004-522421A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-532479 (P2002-532479)	(71) 出願人	501439149
(86) (22) 出願日	平成13年9月28日 (2001. 9. 28)		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1日 (2003. 4. 1)		・ブイ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011319		オランダ・エヌエルー 1 3 8 1 シーピー
(87) 国際公開番号	W02002/028897		ウエースプ・シージェイバンハウテンラー
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002. 4. 11)		ン36
(31) 優先権主張番号	00203411.4	(74) 代理人	100060782
(32) 優先日	平成12年10月2日 (2000. 10. 2)		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	デレールスニエダー, ウイリ
(31) 優先権主張番号	60/237, 394		オランダ・エヌエルー 1 3 8 1 シーピー
(32) 優先日	平成12年10月4日 (2000. 10. 4)		ウエースプ・シージェ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れらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、IGS43G-タンパク質共役受容体ファミリー、および該IGS43タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。また本発明はそのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用を阻害または活性化すること、該ポリヌクレオチドを含むベクター、そのようなベクターを含む宿主細胞、およびIGS43-遺伝子が過剰発現されるか、誤発現されるか、不十分に発現されるか、または抑制される(ノックアウト-動物)非-ヒトトランスジェニック動物に関する。本発明はさらに、該G-タンパク質共役受容体ファミリーIGS43のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる化合物をスクリーニングする方法、およびIGS43ポリペプチドおよびポリヌクレオチドおよびIGS43受容体ファミリーに対するアゴニストまたはアンタゴニストの広範囲の障害の処置およびそのような状態の診断アッセイにおける使用に関する。本発明は特に、G-タンパク質共役受容体ファミリーIGS43のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる化合物のスクリーニング法、およびIGS43ポリペプチドおよびポリヌクレオチドおよびIGS43受容体ファミリーに対するアゴニストまたはアンタゴニストの子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に關係する機能不全、障害または疾患の処置における使用、およびそのような状態の診断アッセイに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) 配列番号 2 による I G S 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；  
b) ユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号 1 に対応するヌクレオチド配列；  
c) ( a ) または ( b ) のヌクレオチド配列に少なくとも 9 5 . 5 % ( 好ましくは少なくとも 9 6 % ) の配列同一性をその全長にわたり有するヌクレオチド配列；  
d) ( a ) または ( b ) または ( 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、

から成る群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 2】

a) 配列番号 2 による I G S 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；  
b) ユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号 1 に対応するヌクレオチド配列；  
c) ( a ) または ( b ) のヌクレオチド配列に少なくとも 9 6 % ( 好ましくは少なくとも 9 7 % ) の配列同一性をその全長にわたり有するヌクレオチド配列；  
d) ( a ) または ( b ) または ( 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、

から成る群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

20

## 【請求項 3】

a) 配列番号 2 による I G S 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；  
b) ユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号 1 に対応するヌクレオチド配列；  
c) ( a ) または ( b ) のヌクレオチド配列に少なくとも 9 7 % ( 好ましくは少なくとも 9 8 % ) の配列同一性をその全長にわたり有するヌクレオチド配列；  
d) ( a ) または ( b ) または ( 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、

から成る群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 4】

a) 配列番号 2 による I G S 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；  
b) ユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号 1 に対応するヌクレオチド配列；  
c) ( a ) または ( b ) のヌクレオチド配列に少なくとも 9 8 % ( 好ましくは少なくとも 9 9 % ) の配列同一性をその全長にわたり有するヌクレオチド配列；  
d) ( a ) または ( b ) または ( 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、

から成る群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

40

## 【請求項 5】

上記ポリヌクレオチドが、配列番号 2 の I G S 4 3 ポリペプチドをコードする配列番号 1 に含まれるヌクレオチド配列から成る、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

上記ポリヌクレオチドがその全長にわたり、配列番号 1 の配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物の配列に少なくとも 9 5 . 5 % 同一であるヌクレオチド配列から成る、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

50

## 【請求項 7】

上記ポリヌクレオチドがその全長にわたり、配列番号 1 の配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物の配列に少なくとも 96% 同一であるヌクレオチド配列から成る、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 8】

上記ポリヌクレオチドがその全長にわたり、配列番号 1 の配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物の配列に少なくとも 97% 同一であるヌクレオチド配列から成る、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 9】

上記ポリヌクレオチドがその全長にわたり、配列番号 1 の配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物の配列に少なくとも 98% 同一であるヌクレオチド配列から成る、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 10】

上記ポリヌクレオチドがその全長にわたり、配列番号 1 の配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物の配列に少なくとも 99% 同一であるヌクレオチド配列から成る、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

20

## 【請求項 11】

配列番号 1 のポリヌクレオチド、またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物である、請求項 5 ないし 10 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 12】

DNA または RNA である、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 13】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドから成るハイブリダイゼーションプローブ。

30

## 【請求項 14】

発現系がコンパチブルな宿主細胞中に存在する時、配列番号 2 のポリペプチドまたはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと少なくとも 95.5% の同一性を有するアミノ酸配列から成る IGS 43 ポリペプチドを生産することができる発現系を含んで成る DNA または RNA 分子。

## 【請求項 15】

発現系がコンパチブルな宿主細胞中に存在する時、配列番号 2 のポリペプチドまたはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと少なくとも 96% の同一性を有するアミノ酸配列から成る IGS 43 ポリペプチドを生産することができる発現系を含んで成る DNA または RNA 分子。

40

## 【請求項 16】

発現系がコンパチブルな宿主細胞中に存在する時、配列番号 2 のポリペプチドまたはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 CBS 109714 に含まれる DNA 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと少なくとも 97% の同一性を有するアミノ酸配列から成る IGS 43 ポリペプチドを生産することができる発現系を含んで成る DNA または RNA 分子。

## 【請求項 17】

発現系がコンパチブルな宿主細胞中に存在する時、配列番号 2 のポリペプチドまたはユト

50

レヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと少なくとも 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列から成る I G S 4 3 ポリペプチドを生産することができる発現系を含んで成る D N A または R N A 分子。

【請求項 1 8】

発現系がコンパチブルな宿主細胞中に存在する時、配列番号 2 のポリペプチドまたはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと少なくとも 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列から成る I G S 4 3 ポリペプチドを生産することができる発現系を含んで成る D N A または R N A 分子。

10

【請求項 1 9】

請求項 1 4 ないし 1 8 のいずれか 1 項に記載の発現系を含んで成る宿主細胞。

【請求項 2 0】

酵母細胞である、請求項 1 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 1】

動物細胞である、請求項 1 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 2】

請求項 1 9 ないし 2 1 のいずれか 1 項に記載の細胞に由来する I G S 4 3 受容体膜調製物。

【請求項 2 3】

請求項 1 9 ないし 2 1 に記載の宿主を、上記ポリヌクレオチドを生産するために十分な条件下で培養し、そして該培養からポリヌクレオチドを回収することを含んで成る、I G S 4 3 ポリペプチドの生産法。

20

【請求項 2 4】

細胞が適切な培養条件下で I G S 4 3 ポリペプチドを生産できるように、請求項 1 4 ないし 1 8 のいずれか 1 項に記載の発現系で細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んで成る、それらの I G S 4 3 ポリペプチドを生産する細胞の生産法。

【請求項 2 5】

配列番号 2 のアミノ酸配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと、全長にわたり少なくとも 9 5 . 5 % 同一であるアミノ酸配列から成る I G S 4 3 ポリペプチド。

30

【請求項 2 6】

配列番号 2 のアミノ酸配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと、全長にわたり少なくとも 9 6 % 同一であるアミノ酸配列から成る I G S 4 3 ポリペプチド。

【請求項 2 7】

配列番号 2 のアミノ酸配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと、全長にわたり少なくとも 9 7 % 同一であるアミノ酸配列から成る I G S 4 3 ポリペプチド。

40

【請求項 2 8】

配列番号 2 のアミノ酸配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリヌクレオチドと、全長にわたり少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列から成る I G S 4 3 ポリペプチド。

【請求項 2 9】

配列番号 2 のアミノ酸配列またはユトレヒト（オランダ国）のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物により

50

コードされるポリヌクレオチドと、全長にわたり少なくとも99%同一であるアミノ酸配列から成るIGS43ポリペプチド。

【請求項30】

配列番号2のアミノ酸配列またはユトレヒト(オランダ国)のセントラルピュローホーアシンメルカルチャーの寄託番号CBS 109714に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列から成る、請求項25ないし29のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項31】

請求項25ないし30のいずれか1項に記載のIGS43ポリペプチドに免疫特異的な抗体。

10

【請求項32】

請求項25ないし30のいずれか1項に記載のIGS43ポリペプチド受容体の活性または発現の強化が必要な個体の処置法であって；

(a) 治療に効果的な量の該受容体に対するアゴニストを個体に投与し；かつ/または  
(b) 配列番号2のIGS43ポリペプチドまたはユトレヒト(オランダ国)のセントラルピュローホーアシンメルカルチャーの寄託番号CBS 109714に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、全長にわたり少なくとも95.5%の同一性を有するヌクレオチド配列；または該受容体活性をインビボで生産するような状態の該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列から成る単離されたポリヌクレオチドを個体に提供する、  
ことを含んで成る上記方法。

20

【請求項33】

請求項25ないし30のいずれか1項に記載のIGS43ポリペプチド受容体の活性または発現の阻害が必要な個体の処置法であって；

(a) 治療に効果的な量の該受容体に対するアンタゴニストを個体に投与し；かつ/または  
(b) 該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個体に投与し；かつ/または  
(c) 該受容体とそのリガンドについて拮抗する、治療に効果的な量のポリペプチドを個体に投与する、  
ことを含んで成る上記方法。

30

【請求項34】

請求項25ないし30のいずれか1項に記載のIGSポリペプチドの発現または活性に関連する個体の疾患、または疾患に対する罹病性を診断するためのプロセスであって；

(a) 該個体に由来するサンプル中の該個体のゲノム中の該IGS43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列中に突然変異が存在するか、または存在しないかを決定し；かつ/または  
(b) 該個体に由来するサンプル中のIGS43ポリペプチド発現の存在または量を分析する、  
ことを含んで成る上記プロセス。

40

【請求項35】

請求項25ないし30のいずれか1項に記載のIGSポリペプチドに対するアゴニストを同定する方法であって；

(a) IGS43ポリペプチドを生産する細胞を試験化合物と接触させ；そして  
(b) 試験化合物がIGS43ポリペプチドの活性化によりシグナルを生成するかどうかを決定する、  
ことを含んで成る上記方法。

【請求項36】

請求項35に記載の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項37】

50

請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定する方法であって：

- ( a ) I G S 4 3 ポリペプチドを生産する細胞をアゴニストと接触させ；そして
  - ( b ) 該アゴニストにより生成されたシグナルが候補化合物の存在下で消失するかどうかを決定する、
- ことを含んで成る上記方法。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項 39】

I G S 4 3 ポリペプチドを発現する請求項 24 に記載の方法により生産される組換え宿主細胞またはその膜。 10

【請求項 40】

遺伝的に改変された非ヒト動物の作出法であって：

- a ) アミノ酸配列である配列番号 2 またはユトレヒト ( オランダ国 ) のセントラルピュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列から成るポリヌクレオチドのコード部分を、高レベルの遺伝子発現または通常はその遺伝子が該動物中で発現されない細胞型中での発現を駆動することができる調節配列に連結し；あるいは
  - b ) アミノ酸配列である配列番号 2 またはユトレヒト ( オランダ国 ) のセントラルピュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列から成るポリヌクレオチドのコード部分を加工し、そしてアミノ酸配列である配列番号 2 またはユトレヒト ( オランダ国 ) のセントラルピュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする内因性の遺伝子である対立遺伝子が、完全にまたは部分的に不活性化するように、該配列を該動物のゲノムに再導入する、
- 工程を含んで成る上記方法。

20

【請求項 41】

請求項 35 または 37 に記載の方法、そして次いで同定された化合物を医薬的に許容されるキャリアーと混合することを含んで成る、医薬組成物の製造方法。 30

【請求項 42】

- ( a ) 請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S 4 3 受容体ポリペプチドに対する治療に効果的な量のアゴニスト；および / あるいは
  - ( b ) 配列番号 2 の I G S 4 3 ポリペプチドまたはユトレヒト ( オランダ国 ) のセントラルピュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれる D N A 挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に、少なくとも 95 . 5 % の同一性を全長にわたり有するヌクレオチド配列から成る単離されたポリヌクレオチド；またはインビボで該受容体活性を生産するような状態の該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、
- の、請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S 4 3 ポリペプチドの活性または発現の強化が必要な、I G S 4 3 受容体ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患に罹患している個体を処置する薬剤を調製するための、使用。 40

【請求項 43】

- ( a ) 請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S 4 3 受容体ポリペプチドに対する治療に効果的な量のアンタゴニスト；および / または
  - ( b ) 請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S 4 3 受容体ポリペプ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 / または
  - ( c ) 請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S 4 3 受容体ポリペプチドとそのリガンドについて拮抗する、治療に効果的な量のポリペプチド、
- の、請求項 25 ないし 30 のいずれか 1 項に記載の I G S 4 3 ポリペプチドの活性または 50

発現の阻害が必要な、IGS43受容体ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患に罹患している個体を処置する薬剤を調製するための、使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

説明

本発明は新規に同定されたポリヌクレオチド、それらによりコードされるポリペプチド、およびそのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、およびそれらの生産に関する。より詳細には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはG-タンパク質共役受容体(GPCR)(今後、IGS43と呼ぶ)に関する。また本発明はそのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用を阻害または活性化する方法、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、そのようなベクターを含有する宿主細胞、およびIGS43-遺伝子が過剰発現する、誤発現する、不十分に発現する(underexpressed)、および/または抑制される(ノックアウト動物)トランスジェニック動物に関する。本発明はさらに、該G-タンパク質共役受容体IGS43のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる化合物のスクリーニング法に関する。

10

発明の背景

多くの医学的に重要な生物学的プロセスは、G-タンパク質および/または第2メッセンジャーが関与するシグナル伝達経路に参加するタンパク質により媒介されることは十分に確立されている：例えばcAMP(Lefkowitz, Nature, 1991, 351: 353-354)。本明細書ではこれらのタンパク質をG-タンパク質の経路に関与するタンパク質と称する。これらのタンパク質の幾つかの例には、アドレナリン作動薬およびドーパミンのような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、およびアクチュエーター(actuator)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。

20

30

【0002】

例えばシグナル伝達の1形態では、ホルモンがGPCRに結合すると、受容体がヘテロ三量体G-タンパク質と相互作用し、そしてGuanine nucleotide-結合部位からGDPの解離を誘導する。正常な細胞濃度のGuanine nucleotideで、GTPはこの部位を即座に満たす。GTPのG-タンパク質のサブユニットへの結合により、受容体からG-タンパク質の解離およびG-タンパク質のサブユニット内の解離を引き起こす。次いでGTPを持つ形態は活性化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り触媒されるGTPのGDPへの加水分解は(サブユニットが本来のGTPase活性を保有する)、G-タンパク質を元の不活性な形態に戻す。サブユニットのGTPase活性は、本質的にはオン/オフスイッチを制御する内部クロックである。サブユニットのGDP結合形態は高い親和性を有し、そして続くGDPとの再会合により系は元の状態に戻る。このようにG-タンパク質は、受容体からエフェクターへのシグナルを渡す中間体として(この例ではアデニル酸シクラーゼ)、およびシグナルの期間を制御するクロックとしての2役をこなす。

40

【0003】

G-タンパク質共役受容体の膜結合スーパーファミリーは、7つの推定上の膜貫通ドメインを有すると特徴づけられた。このドメインは細胞外または細胞質ループにより連結される膜貫通-ヘリックスを表すと考えられている。G-タンパク質共役受容体には、ホルモン、ウイルス、増殖因子および神経受容体のような広い範囲の生物学的に活性な受容体

50

を含む。

【0004】

G - タンパク質共役受容体ファミリーには、CNS障害を処置するために使用する神経弛緩薬に結合するドーパミン受容体を含む。このファミリーの他の員の例には限定するわけではないが、カルシトニン、アドレナリン作動性物質、神経ペプチドY、ソマトスタチン、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、ムスカリン作動性物質、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンピン、キニン、濾胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子 - 1、ロドプシン、臭気物質およびサイトメガロウイルス受容体を含む。

10

【0005】

ほとんどのG - タンパク質共役受容体は、機能的なタンパク質構造を安定化すると考えられているジスルフィド結合を形成する最初の2つの各細胞外ループ内に、1つの保存されたシステイン残基を有する。7回膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と命名されている。TM5およびTM6をつなぐ細胞質ループは、G - タンパク質結合領域の主要な成分となり得る。

【0006】

ほとんどのG - タンパク質共役受容体は、第3細胞質ループおよび/またはカルボキシ末端内に可能なリン酸化部位を含む。 - アドレナリン受容体のように幾つかのG - タンパク質共役受容体については、プロテインキナーゼAおよび/また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。

20

【0007】

最近、カルシトニン - 受容体様受容体のような特定のGPCRが、受容体活性修飾タンパク質 (receptor activity modifying proteins: RAMPs) と呼ばれる小さいシグナル通過膜タンパク質と相互作用するかもしれないことが見いだされた。このGPCRと特定のRAMPsとの相互作用は、どの天然のリガンドがGPCR - RAMPsの組み合わせに関連する親和性を有し、そして複合体の機能的シグナル発信活性を調節するかを決定している (McLathine, L. M. et al., Nature (1998) 393: 333 - 339)。

【0008】

幾つかの受容体に関しては、G - タンパク質共役受容体のリガンド結合部位は幾つかのG - タンパク質受容体膜貫通ドメインにより形成される親水性ソケットを含んで成ると考えられ、該ソケットはG - タンパク質共役受容体の疎水性残基により囲まれている。各G - タンパク質共役受容体の膜貫通ヘリックスの親水性側が内側に面し、そして極性のリガンド - 結合部位を形成すると仮定されている。TM3は、TM3アスパラギン酸残基のようなりガンド - 結合部位を有するので、幾つかのG - タンパク質共役受容体に深く関与してきた。TM5のセリン、TM6のアスパラギンおよびTM6またはTM7のフェニルアラニンまたはチロシンもリガンド結合に深く関与している。

30

【0009】

G - タンパク質共役受容体は、ヘテロ三量体G - タンパク質により種々の細胞内酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターへ細胞内で共役することができる (Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10: 317 - 331)。異なるG - タンパク質 - サブユニットが優先的に特定のエフェクターを刺激して、細胞内で種々の生物学的機能をモジュレートする。G - タンパク質共役受容体の細胞質残基のリン酸化は、幾つかのG - タンパク質共役受容体のG - タンパク質共役の調節に重要なメカニズムとして同定された。G - タンパク質共役受容体は、哺乳動物宿主内の多数の部位に見いだされる。

40

【0010】

受容体 - 主にGPCRクラスは、現在知られている薬剤の半分以上を導いた (Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14: 1516)。これはこ

50

これらの受容体が治療の標的として確立された明白な歴史を有することを示す。本発明の新規 I G S 4 3 G P C R は明らかに、これから一般に「疾患」と呼ぶ機能不全、障害または疾患の診断、防止、改善または修正に役割を果たすことができるさらなる受容体の同定および特性決定のために、従来技術における必要性を満たす。疾患には限定するわけではないが、統合失調症、強迫性障害 ( O C D )、外傷後ストレス障害 ( P T S D )、恐怖症およびパニックのようなエピソード性の発作的不安 ( e p i s o d i c p a r o x y s m a l a n x i e t y : E P A ) 障害、大鬱病性障害、双極性障害、パーキンソン病、全般性不安障害、自閉症、せん妄、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、ジスキネジー、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、失調症、痙攣、食欲不振、過食症、発作、嗜癪 / 依存症 / 渴望、睡眠障害、癲癇、偏頭痛、注意欠陥 / 過活動性障害 ( A D H D ) を含む精神のおよび C N S 障害；心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧症、高血圧 - 例えば本態性高血圧症、腎性高血圧症または肺高血圧症、血栓症、動脈硬化のような心血管疾患、大脳血管痙攣、クモ膜下出血、大脳虚血、大脳梗塞、末梢血管疾患、レーノー病、腎臓疾患 - 例えば腎不全；高脂血症；肥満；嘔吐；過敏性腸症候群 ( I B S )、炎症性腸症候群 ( I B D )、食道逆流疾患 ( G E R D )、術後または糖尿病の胃不全麻痺のような胃排出遅延の運動障害および状態、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸障害；下痢；骨粗鬆症を含む他の疾患；炎症；細菌、真菌、原生生物およびウイルス感染のような感染、特に H I V - 1 または H I V - 2 により引き起こされる感染；疼痛；癌；化学療法が誘導する損傷；腫瘍の浸潤；免疫障害；尿停留；喘息；アレルギー；関節炎；良性の前立腺肥大；内毒素ショック；敗血症；糖尿病の合併症；および婦人科の障害を含む。

10

20

#### 【 0 0 1 1 】

特に本発明で記載する新規 I G S 4 3 G P C R は、子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患の診断、防止、改善または修正に重要な役割を果たすことができるさらなる受容体の同定および特性決定のために、従来技術における必要性を満たす。

#### 発明の要約

1 つの観点では、本発明は I G S 4 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび組換え材料およびそれらの生産法に関する。本発明の別の観点は、そのような I G S 4 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび組換え材料の使用法に関する。そのような使用には、限定するわけではないが治療的標的として、および上記に挙げたような疾患の 1 つの処置のための使用を含む。特に使用には子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患の処置を含む。

30

#### 【 0 0 1 2 】

さらに別の観点では、本発明は本発明により提供される材料を使用してアゴニストおよびアンタゴニストを同定し、そして I G S 4 3 不均衡に関連する状態を同定した化合物を用いて処置する方法に関する。さらに本発明の別の観点は、不適切な I G S 4 3 活性またはレベルに関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。本発明のさらに別の観点は、I G S 4 3 の異所性の発現または活性から生じる疾患に関するモデルとして機能する動物に基づく系に関する。

40

#### 発明の説明

配列およびモチーフの内容における構造的および化学的類似性が、本発明の I G S 4 3 G P C R および他のヒト G P C R 間に存在する。さらに I G S 4 3 は子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄で発現する。したがって I G S 4 3 は上に挙げた疾患において他の疾患よりも役割を果たすことを意味している。特に I G S 4 3 は子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患に役割を果たすことを意味する。

#### 【 0 0 1 3 】

特に定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が

50

属する技術の当業者により通常に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書に記載する方法および材料と同様か、または均等な任意の方法および材料を本発明の実践または教示に使用することができるが、好適な方法、デバイスおよび材料をこれから記載する。本明細書中に引用するすべての各刊行物は、各刊行物が本明細書で完全に説明されているかのように引用により本明細書に具体的かつ個別に包含されることを示すことにより引用により本明細書に編入する。

#### 定義

以下の定義は本明細書で頻繁に使用される特定の用語の理解を助けるために提供する。

##### 【0014】

「IGS43」とはとりわけ、配列番号2で説明されるアミノ酸配列から成るポリペプチド、またはそれらの変異体を称する。 10

##### 【0015】

「受容体活性」または「受容体の生物学的活性」とは、類似する活性または改善された活性または望ましくない副作用が低下したこれらの活性を含む該IGS43の代謝的または生理学的機能を称する。または該IGS43の抗原性および免疫原性活性を含む。

##### 【0016】

「IGS43 - 遺伝子」は、配列番号1で説明するヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチドまたは各変異体、例えばそれらの対立遺伝子変異体および/またはそれらの相補体を称する。

##### 【0017】

本明細書で使用する「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、単鎖抗体およびヒト化抗体、ならびにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントを含む。 20

##### 【0018】

「単離された」とは、自然な状態から「人の手により」改変された、および/または自然な環境から分離されたことを意味する。すなわち「単離された」組成物または自然に存在する物質が「単離された」ならば、それはその元の環境から変えられたか、または取り出され、あるいは両方である。例えば生きている動物中で自然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」いないが、その自然な状態で同時に存在する材料から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書で使用する用語のよ 30

##### 【0019】

「ポリヌクレオチド」は一般に、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであり得る任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを称する。「ポリヌクレオチド」には限定するわけではないが、単 - および二本 - 鎖 - DNA、単 - および二本 - 鎖領域の混合であるDNA、単 - および二本 - 鎖 - RNA、単 - および二本 - 鎖領域の混合であるRNA、単鎖であり得るDNAおよびRNAを含んで成るハイブリッド分子、またはより典型的には二本 - 鎖または単 - および二本 - 鎖領域の混合を含む。さらに「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含んで成る三本 - 鎖領域を含んでもよい。用語ポリヌクレオチドはまた、安定性 40  
もしくは他の理由から1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を含む。「修飾された」塩基には、例えばトリチル化された塩基およびイノシンのような通常ではない塩基を含む。種々の修飾をDNAおよびRNAに作成することができる：すなわち「ポリヌクレオチド」は、典型的に自然に見いだされるようなポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」は、比較的短いポリヌクレオチド、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ぶものも包含する。

##### 【0020】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわちペプチド等配電子 50

体により互いに連結された2以上のアミノ酸を含んで成る任意のペプチドまたはタンパク質を称する。「ポリペプチド」は鎖を称し、通例はペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれ、より長い鎖は一般にタンパク質と、および/またはそれらの組み合わせと称する。ポリペプチドは20個の遺伝子にコードされたアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」には翻訳後プロセッシングのような自然なプロセスにより、または当該技術分野で周知である化学的修飾法によるいずれかで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教科書およびより詳細な技術論文、ならびに詳細で長文な研究論文に十分に記載されている。修飾はポリペプチドのいかなる場所でも起こることができ、それらにはペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含む。同じ種類の修飾が上記のポリペプチド中の幾つかの部位で同じか、または変動する程度で存在し得ると考えられるだろう。また上記のポリペプチドは多くの種類の修飾を含むこともできる。ポリペプチドはまたユビキチン化の結果として分枝してもよく、そしてポリペプチドは分枝を含むか、または含まない環式でもよい。環式、分枝および分枝した環式ポリペプチドは、翻訳後の自然なプロセスから生じるか、または合成法により作ることができる。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、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質また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；架橋結合、環化、ジスルフィド結合の形成、ジメチル化、共有架橋結合の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-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、ヨード化、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転移-RNAが媒介するアミノ酸のタンパク質への付加およびユビキチン化を含む。例えば、タンパク質-構造および分子的性質(PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES)、第2版、T.E. Creighton, W.H. フリーマン アンド カンパニー (Freeman and Company)、ニューヨーク、1993およびWorld, F., 翻訳後タンパク質修飾：展望および考察(Posttranslational Protein Modifications; Perspective and Prospects)、タンパク質の翻訳後の共有修飾(POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEIN)の第1~12頁、B.C. Johnson 編集、アカデミック出版(Academic Press)、ニューヨーク、1983; Seifter et al., 「タンパク質修飾および非タンパク質コファクターの分析(Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors)」、Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646およびRattan et al., 「タンパク質合成：翻訳後修飾および加齢(Posttranslational Modification and Aging)」、Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663: 48-62を参照にされたい。

#### 【0021】

本明細書で使用する用語「変異体」は、参照とするポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、本質的な生物学的、構造的、調節的または生物化学的特性のような本質的特性を保持するそれぞれポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、別の参照とするポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配列中の変化は、参照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えても変えなくてもよい。ヌクレオチド変化は、以下に記載するように参照配列によりコードされるポリペプチド中にアミノ酸置換、付加、欠失、融合および短縮化を生じ得る。ポリペプチドの典型的な変異体は、別の参照とするポリペプチドとアミノ酸配列が異なる。一般に参照ポリペプチドの配列および変異体が全体的に極めて類似し、多くの領域で同一であるように差異が限定されている。変異体および参照ポリペプチドは、1以上の置換、付加および欠失を任意に組み合わせることによりアミノ酸配列

を定めることができる。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子暗号によりコードされてもされなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体のように自然に発生するものであることができ、あるいは自然に生じるとは知られていない変異体でもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの自然には存在しない変異体は、突然変異誘発法により、または直接合成により作ることができる。

#### 【0022】

「同一性」とは、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に配列は最高の順序の対合が得られるように並べられる。「同一性」自体は当該技術分野で認識されている意味を有し、そして公開されている技法を使用して計算することができる。例えば：(コンピューターの使用による分子生物学 (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY)、Lesk, A. M. 編集、オックスフォード大学出版、ニューヨーク、1988; バイオコンピューティング：情報科学および遺伝子プロジェクト (BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS)、Smith, D. W. 編集; アカデミック出版、ニューヨーク、1993; 配列データのコンピューター分析 (COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA)、第1部、Griffin, A. M., and Griffin, H. G. 編集、ヒューmana (Humana) 出版、ニュージャージー、1994; 分子生物学における配列分析 (SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY)、von Heinje, G., アカデミック出版、1987; および配列分析プライマー (SEQUENCE ANALYSIS PRIMER)、Grubskov, M. and Devereux, J. 編集、M ストックトン (Stockton) 出版、ニューヨーク、1991) を参照にされたい。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の同一性を測定するための多数の方法が存在するが、用語「同一性」は当業者に周知である (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48: 1073)。2つの配列間の同一性または類似性を決定するために通常使用される方法は、限定するわけではないが大型コンピューターの指針 (Guide to Huge Computers)、Martin J. Bishop, 編集、アカデミック出版、サンディエゴ、1994 および Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48: 1073 に記載されているものを含む。同一性および類似性を決定するための方法は、コンピュータープログラムにコード化される。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適なコンピュータープログラム法には限定するわけではないが、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1): 387)、BLASTP、BLASTIN、FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215: 403) を含む。用語「相同性」は用語「同一性」に置き換えることができる。

#### 【0023】

具体的説明として、例えば配列番号1の参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列が配列番号1の参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチドあたり最高5個のヌクレオチドの差異を含んでもよいということを除き、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意図している。換言すると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中の最高5%のヌクレオチドが削除されるか、別のヌクレオチドと置換されるか、または全ヌクレオチドの任意の5%までのヌクレオチド数を参照配列に挿入することができ、あるいは参照配列中の全ヌクレオチドの5%までのヌクレオチド数に、欠失、挿入および置換の組み合わせがあってもよい。これらの差異は参照ヌクレオチド配列の5'または3'末端位置で、またはこれらの末端位置間の任意の場所で、参照配列中のヌクレオチド間で個々に、または参照配列内の1以上の連続する群に散在して生じてよい。

## 【0024】

同様に、例えば配列番号2の参照アミノ酸配列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有するポリペプチドは、ポリペプチド配列が配列番号2の参照アミノ酸の100アミノ酸あたり最高5個のアミノ酸の改変を含んでもよいということを除き、ポリペプチドのアミノ酸配列が参照配列と同一であることを意図している。換言すると、参照のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、参照配列中、最高5%のアミノ酸残基が削除されるか、別のアミノ酸と置換されるか、または参照配列中、全アミノ酸残基の任意の5%までのアミノ酸数を参照配列に挿入することができる。これらの参照配列の改変は参照アミノ酸配列のアミノまたはカルボキシ末端位置で、またはこれらの末端位置間の任意の場所で、参照配列中の残基間で個々に、または参照配列内の1以上の連続する群に散在して生じてよい。

10

本発明のポリペプチド

1つの観点では、本発明はIGS43ポリペプチド(IGS43タンパク質を含む)に関する。IGS43ポリペプチドには配列番号2のポリペプチドおよびユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュローホーアシンメルカルチャー(Centraalbureau voor Schimmelcultures)に2001年8月30日に寄託された寄託番号CBS109714に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、およびユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュローホーアシンメルカルチャーに2001年8月30日に寄託された寄託番号CBS109714に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号2の配列および/またはユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュローホーアシンメルカルチャーの寄託番号CBS109714に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドの配列とその全長にわたり少なくとも80%の同一性、そしてより一層好ましくは該アミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、そしてさらに一層好ましくは少なくとも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%の同一性を有するポリペプチドが高度に好ましい。またIGS43ポリペプチドに含まれるのは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュローホーアシンメルカルチャーの寄託番号CBS109714に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドにその全長にわたり少なくとも80%同一性、そしてより好ましくは配列番号2に対して少なくとも90%の同一性、そしてさらに一層好ましくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドである。さらに少なくとも97%、特に少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドが高度に好適である。好ましくはIGS43ポリペプチドは受容体の少なくとも1つの生物学的活性を現す。

20

30

## 【0025】

特に好適であるのは、配列番号2のアミノ酸配列またはユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュローホーアシンメルカルチャーの寄託番号CBS109714で寄託されたDNA挿入物によりコードされるポリペプチドに対して、その全長にわたり少なくとも95.5%の同一であるアミノ酸配列から成る単離されたIGS43ポリペプチドである。

40

## 【0026】

本発明のさらなる態様では、IGS43ポリペプチドは融合タンパク質のようなより大きなタンパク質の部分でもよい。分泌またはリーダー配列、プロ-配列、多ヒスチジン残基のような精製の助けとなる配列、抗原性ペプチドタグ(ヘムアグルチニン(HA)タグのような)検出の助けとなる配列、または組換え生産中の安定性のためのさらなる配列を含むさらなるアミノ酸配列を包含することが有利となることが多い。

## 【0027】

IGS43ポリペプチドのフラグメントも本発明に含まれる。フラグメントは前述のIG

50

S 4 3 ポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同じであるがすべてではないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。I G S 4 3 ポリペプチドのように、フラグメントは独立している ( f r e e - s t a n d i n g ) か、または一部または領域を形成する大きなポリペプチド内に含まれてもよく、最も好ましくは1つの連続する領域である。本発明のポリペプチドフラグメントの代表例には、例えばI G S 4 3 ポリペプチドのおよそのアミノ酸数 1 ~ 2 0 ; 2 1 ~ 4 0、4 1 ~ 6 0、6 1 ~ 8 0、8 1 ~ 1 0 0 ; および 1 0 1 から末端であるフラグメントを含む。この内容において「およそ」にはいずれかの末端または両末端の数個、5、4、3、2または1個のアミノ酸によるより大きいまたは小さい特に列挙した範囲を含む。

#### 【0028】

好適なフラグメントには、I G S 4 3 ポリペプチドのアミノ酸配列を有する例えば短縮化ポリペプチドを含むが、アミノ末端を含む一連の残基の欠失、またはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、または1つがアミノ末端を含み、もう1つがカルボキシル末端を含む2つの一連の残基の欠失は除く。また好適であるのは、アルファ-ヘリックスおよびアルファ-ヘリックス形成領域、ベータ-シートおよびベータ-シート形成領域、回転および回転形成領域：コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、柔軟領域、表面形成領域、基質結合領域および高抗原性指数領域を含んで成るフラグメントのような構造的または機能的性質を特徴とするフラグメントである。他の好適な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は受容体活性を媒介するものであり、類似活性または改善された活性を持つもの、または望ましくない活性が低下しているものを含む。また動物、特にヒト内で抗原性または免疫原性であるフラグメントも含む。

#### 【0029】

このように本発明のポリペプチドは、配列番号2の配列および/またはユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7 1 4 に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または対応するフラグメントに少なくとも80%の同一性を有するそれらのフラグメントを含む。好ましくはこれらポリペプチドフラグメントのすべては、抗原的活性を含む受容体の生物学的活性を保持している。定めた配列およびフラグメントの変異体も本発明の一部を構成する。好適な変異体は、保存的アミノ酸置換により参照 ( r e f e r e n t s ) から変化するものであり、すなわち同様な特性の別の残基への置換である。典型的なそのような置換は、A l a、V a l、L e u および I l e 間；S e r および T h r 間；酸性残基 A s p および G l u 間；A s n および G l n 間；塩基性残基 L y s および A r g 間；または芳香族残基 P h e および T y r 間である。特に好適であるのは、数個、5 ~ 1 0 個、1 ~ 5 個または1 ~ 2 個のアミノ酸置換、欠失または付加の任意の組み合わせの変異体である。

#### 【0030】

本発明のI G S 4 3 ポリペプチドは、任意の適当な様式で調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された自然に存在するポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に生産されたポリペプチドまたはこれらの方法の組み合わせにより生産されたポリペプチドを含む。そのようなポリペプチドの調製法は、当該技術分野では周知である。

本発明のポリヌクレオチド

本発明のさらなる観点、I G S 4 3 ポリヌクレオチドに関する。I G S 4 3 ポリヌクレオチドには、I G S 4 3 ポリペプ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、およびそれらに緊密に関連しているポリヌクレオチドを含む。より具体的には、本発明のI G S 4 3 ポリヌクレオチドは配列番号2のI G S 4 3 ポリペプチドをコードすることができるような配列番号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、配列番号1の特定の配列を有するポリヌクレオチドおよびユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号 C B S 1 0 9 7

10

20

30

40

50

14で寄託されたDNA挿入物に本質的に対応するポリヌクレオチドを含む。

【0031】

IGS43ポリヌクレオチドはさらに、配列番号2のIGS43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にその全長にわたり少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド、配列番号1のヌクレオチド配列にその全長にわたり少なくとも80%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(オランダ国)のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号CBS 109714で寄託されたDNA挿入物に本質的に対応するポリヌクレオチドを含む。

【0032】

これに関して、少なくとも90%の同一性のポリヌクレオチドが特に好適であり、そして少なくとも95%の同一性のポリヌクレオチドが特別に好適である。さらに少なくとも97%の同一性を持つポリヌクレオチドは高度に好適であり、そして少なくとも98~99%の同一性を持つポリヌクレオチドが最も高度に好適であり少なくとも99%が最高に好適である。またIGS43ポリヌクレオチドに含まれるのは、増幅に使用可能なまたはプローブまたはマーカーとして使用するための条件下でハイブリダイズするために、配列番号1に含まれるヌクレオチド配列またはユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号CBS 109714で寄託されたDNA挿入物に十分な同一性を有するヌクレオチド配列である。本発明はそのようなIGS43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。

【0033】

特に好適であるのは：

1. 配列番号2によるIGS43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
2. ユトレヒト(オランダ国)のセントラルビュロー ホーア シンメルカルチャーの寄託番号CBS 109714で寄託されたDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号1に対応するヌクレオチド配列；
3. その全長にわたり、(a)または(b)のヌクレオチド配列に対して少なくとも95.5%(好ましくは少なくとも96%)の配列同一性を有するヌクレオチド配列；
4. (a)または(b)または(c)のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、から成る群から選択される単離されたIGS43ポリヌクレオチドである。

【0034】

本発明のIGS43は、公のデータベースのBLAST調査の結果により示されるG-タンパク質共役受容体ファミリーの他のタンパク質に構造的に関連する。表2のアミノ酸配列(配列番号2)は、ラットのGPCR RTAと最も類似していた(327の並べた残基にわたり85%の同一性；Swissprot 受け入れ番号P23749)。特許明細書では、欧州特許出願公開第1067182号のSeq Id 322が恐らくG-タンパク質共役受容体に関するタンパク質を与えている。このタンパク質は16アミノ酸長い。他はIGS43タンパク質と同一である。すなわち本発明のIGS43ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、中でもとりわけそれらの相補的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様な生物学的機能/特性を有すると期待され、それらの用途は当業者には明らかである。

【0035】

本発明のポリヌクレオチドは、ゲノムDNAのような自然の供給源から得ることができる。特に特定のGPCR遺伝子サブファミリー内の保存領域をコードする縮重PCRプライマーを設計することができる。縮重PCRプライマーを使用したゲノムDNAまたはcDNAに関するPCR増幅反応により、検討中の遺伝子ファミリーの幾つかの員(既知および新規の両方)の増幅がもたらされるだろう(ゲノムの鋳型を使用する時、縮重プライマーは同じ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)。本発明のポリヌクレオチドは、周知の、そして市販されている技法を使用して合成することもできる(例えばF.M.Ausb

10

20

30

40

50

el et al., 2000、分子生物学の現在の手法 (Current Protocols in Molecular Biology)。

【0036】

配列番号2のIGS43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に含まれるポリペプチドをコードする配列(ヌクレオチド番号32~1012)に同一であることができ、あるいはそれは異なるヌクレオチド配列でもよく、これは遺伝子暗号の重複(縮重)の結果として、配列番号1に含まれるポリペプチドをコードする配列に比べて改変を示すかもしれないが、配列番号2のポリペプチドをコードする。

【0037】

本発明のポリヌクレオチドがIGS43ポリペプチドの組換え生産に使用される時、ポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドまたはそれらのフラグメントに関するコード配列をそれ自体により；成熟ポリペプチドまたはフラグメントに関するコード配列を、リーダーまたは分泌配列、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ような他のコード配列を持つリーディングフレーム中に含むことができる。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をコードすることができる。本発明の観点の特定の好適な態様では、マーカー配列はpQEベクター(キアジェン(Qiagen)社)により提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 821-824に記載されているヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、転写された非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニレーションシグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定化する配列のような非コード5'および3'配列を含むこともできる。

【0038】

さらに好適な態様は、数個の、5~10個の、1~5個の、1~3個の、1~2個のまたは1個のアミノ酸残基が任意の組み合わせで置換、欠失、または付加された配列番号2のIGS43ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成るIGS43変異体をコードするポリヌクレオチドである。

【0039】

本発明のポリヌクレオチドは、限定するわけではないがクローニング、プロセッシングおよび/または遺伝子産物の発現の修飾を含む様々な目的にIGS43コード配列を改変するために、当該技術分野で一般的に知られている方法を使用して工作することができる。無作為な断片化によるDNAシャッフリング(shuffling)および遺伝子フラグメントのPCRによる再集成および合成オリゴヌクレオチドを使用して、ヌクレオチド配列を工作することができる。例えばオリゴヌクレオチドが媒介する部位特異的突然変異誘発法を使用して、アミノ酸置換を生じる突然変異を誘導し、新たな制限部位を作り、修飾(例えばグリコシル化またはリン酸化)パターンを改変し、コドンの優先を変え、スプライス変異体等を生じることができる。

【0040】

本発明はさらに、本明細書の上記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。これに関して、本発明は特にストリンジェントな条件で上記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。本明細書で使用するように用語「ストリンジェントな条件」とは、配列間に少なくとも80%、そして好ましくは少なくとも90%、そして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%の同一性が存在すれば起こるハイブリダイゼーションを意味する。

【0041】

配列番号1に含まれるヌクレオチド配列またはそれらのフラグメントと同一、または十分に同一である本発明のポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAのハイブリダイゼーションプローブとして使用して、IGS43をコードする完全長のcDNAおよびゲノムクローンを単離し、およびIGS43遺伝子に高い配列類似性を有する他の遺伝子(ヒト以外の種に由来する相同体およびオーソログをコードする遺伝子を含む)のcDNA

およびゲノムクローンを単離することができる。当業者はそのようなハイブリダイゼーション法を十分に知っている。典型的にはこれらのヌクレオチド配列は参照と80%同一、好ましくは90%同一、より好ましくは95%同一である。プローブは一般に少なくとも5個のヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも8個のヌクレオチド、そしてより好ましくは少なくとも10個のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも12個のヌクレオチド、特に少なくとも15個のヌクレオチドを含んで成るだろう。最も好ましくはそのようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチドを有し、そして少なくとも50個のヌクレオチドを有するだろう。特に好適なプローブは、30から50ヌクレオチドの間の範囲であろう。

#### 【0042】

ヒト以外の種に由来する相同体およびオソログを含むIGS43ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得るための1つの態様は、適当なライブラリーを配列番号1またはそれらのフラグメントを有する標識したプローブを用いてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でスクリーニングし、そして該ポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する工程を含んで成る。そのようなハイブリダイゼーション法は当業者には周知である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は上記定義の通りであるか、または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×デンハーツ溶液、10%硫酸デキストラン(重量/容量)、および20マイクログラム/ml変性、切断サケ精子DNAを含んで成る溶液中で42で一晚インキュベーションし、続いてフィルターを約65で0.1×SSC中で洗浄する条件である。

#### 【0043】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、研究試薬ならびに動物およびヒトの疾患に対する処置および診断を見いだすための材料として使用することができる。

ベクター、宿主細胞、発現

また本発明は本発明のポリヌクレオチド(1つまたは複数)を含んで成るベクター、および本発明のベクターにより遺伝的に工作された宿主細胞および組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。無細胞翻訳系を使用して、本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いてそのようなタンパク質を生産することもできる。

#### 【0044】

組換え生産に関して、宿主細胞を遺伝的に工作して本発明のポリヌクレオチドに関する発現系またはそれらの部分を包含することができる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、Davis et al., 分子生物学の基本的な方法(BASIC METHOD SIN MOLECULAR BIOLOGY)(1986)およびSambrook et al., モレキュラークローニング: アラボラトリーマニュアル(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、(1989)のような多くの標準的な研究用マニュアルに記載されている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、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、切屑(scrape)付加、衝撃導入または感染のような方法により行うことができる。

#### 【0045】

適当な宿主の代表例には、連鎖球菌(Streptococci)、ブドウ球菌(staphylococci)、大腸菌(E. coli)、ストレプトミセス(Streptomyces)および枯草菌(Bacillus subtilis)の細胞のような細菌細胞; 酵母細胞およびアスペルギルス(Aspergillus)細胞のような真菌細胞; ショウショウバエS2およびスポドプテラ(Spodoptera) Sf9細胞のような昆虫細胞; CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293およびBowesの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。

## 【0046】

多種の発現ベクター系を使用することができる。中でもそのような系には、染色体、エピソームおよびウイルスに由来する系、例えば細菌のプラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入要素、酵母染色体要素、パキユロウイルス、SV40のようなパホーウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鳥類ポックスウイルス、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に由来するベクター、およびコスミドおよびファジェミドのようなプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝子材料に由来するそれらの組み合わせから派生するベクターを含む。発現系は発現を調節ならびに発生する制御領域を含むことができる。一般に宿主中でポリペプチドを生産するためにポリヌクレオチドを維持し、増やし、または発現するために適する任意の系またはベクターを使用することができる。適当なヌクレオチド配列を、例えば Sambrook et al., モレキュラークロニング、アラボラトリーマニュアル (MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL) (同上) に説明されているような様々な周知かつ日常的な技法により発現系に挿入することができる。

10

## 【0047】

翻訳されたタンパク質の小胞体内腔への、細胞周辺腔への、または細胞外環境への分泌には、適当な分泌シグナルを所望のポリペプチドに包含させることができる。これらのシグナルはポリペプチドに対して内因性であるか、またはヘテロロガスなシグナル、すなわち異なる種に由来することができる。

20

## 【0048】

IGS43ポリペプチドをスクリーニングアッセイで使用するために発現させる場合、一般にポリペプチドを細胞の表面に生産させることが好ましい。この場合、細胞をスクリーニングアッセイで使用する前に回収することができる。IGS43ポリペプチドの親和性または機能的活性が受容体活性修飾タンパク質 (receptor activity modifying proteins: RAMP) により修飾される場合、最も有望には細胞表面での関連するRAMPの同時発現 (coexpression) が好適であり、そしてしばしば必要である。またこの場合、スクリーニングアッセイに使用する前にIGS43ポリペプチドおよび関連するRAMPを発現している細胞を回収することが必要である。IGS43ポリペプチドが培地に分泌される場合、培地はポリペプチドを回収し、そして精製するために回収することができる：細胞内に生産される場合、細胞はポリペプチドを回収する前に最初に溶解されなければならない。IGS43ポリペプチドを発現している膜は当業者に周知な方法に回収することができる。一般にそのような方法には、IGS43ポリペプチドを発現している細胞を回収し、そして限定するわけではないがポットリングのような方法により細胞を均一化することを含む。膜は1または数回、懸濁液を洗浄することにより回収することができる。

30

## 【0049】

IGS43ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホ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周知方法により組換え細胞カルチャーから回収し、そして精製することができる。最も好ましくは高性能液体クロマトグラフィーを精製に使用する。ポリペプチドが単離または精製中の変性した時に、タンパク質のリフォールディングに関する周知の技法を使用して活性な立体配座に再生することができる。

40

## 診断アッセイ

また本発明は診断用試薬として使用するためのIGS43ポリヌクレオチドの使用に関する。機能不全に関係するIGS43遺伝子の突然変異した形態の検出は、IGS43の不十分な発現、過剰発現または改変した発現をもたらす疾患または疾患に対する罹病性の診断を加え、または定めることができる診断用ツールを提供する。またこの場合、関連する受容体活性修飾タンパク質の同時発現が所望する診断アッセイの質を得るために要求され

50

得る。IGS43 遺伝子に突然変異を持つ個体を、種々の技法により DNA レベルで検出することができる。

【0050】

診断用の核酸は、血液、尿、唾液、組織生検または検体材料のような個体の細胞から得ることができる。ゲノム DNA は検出に直接使用してもよく、または分析前に PCR または他の増殖法を使用することにより酵素的に増幅してもよい。RNA または cDNA も類似様式で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して増幅産物のサイズの変化により検出することができる。点突然変異は、増幅した DNA を標識した IGS43 ヌクレオチド配列にハイブリダイズさせることにより同定することができる。完全に対合する配列は、RNase 消化により、または融解温度の差異により誤対合した二本鎖から識別することができる。DNA 配列の差異は、変性剤を含むかまたは含まないゲル中での DNA 配列の電気泳動の移動度の変化により、または直接的な DNA シーケンシングにより検出することもできる。例えば Myers et al., Science (1985) 230: 1242 を参照にされたい。特別な位置での配列の変化も、RNase および S1 保護のようなヌクレアーゼ保護アッセイまたは化学的開裂法により明らかにすることができる。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401 を参照にされたい。別の態様では、IGS43 ヌクレオチド配列またはそれら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列を構築して、例えば遺伝子突然変異の効率的スクリーニングを行うことができる。整列技法 (array technology methods) は周知であり、そして一般的な応用性を有し、そして遺伝子発現、遺伝子連結および遺伝子変動性を含む分子遺伝学における種々の問題に取り組むことができる。(例えば M. Chee et al., Science, vol 274, pp 610-613 (1996))。

10

20

【0051】

診断アッセイはしばしば、記載した方法により IGS43 遺伝子における突然変異の検出を通して、とりわけ上に挙げた疾患に対する罹病性を診断または決定するためのプロセスを提供する。特に診断アッセイは、記載した方法により IGS43 遺伝子における突然変異の検出を通して、子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患に対する罹病性を診断または決定するためのプロセスを提供する。

30

【0052】

さらに中でも上記の疾患は、IGS43 ポリペプチドまたは IGS43 mRNA レベルが異常に低下または上昇した個体に由来するサンプルを測定することを含んで成る方法により診断することができる。特に子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患は、IGS43 ポリペプチドまたは IGS43 mRNA のレベルが異常に低下または上昇した個体に由来するサンプルからの測定を含んで成る方法により診断することができる。

【0053】

低下または上昇した発現は、例えば PCR、RT-PCR、RNase 保護、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のようなポリヌクレオチドの定量に関して当該技術分野で周知な方法を使用して RNA レベルで測定することができる。宿主に由来するサンプル中の IGS43 のようなタンパク質のレベルを決定するために使用できるアッセイ技法は、当業者には周知である。そのようなアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、競合的-結合アッセイ、ウエスタンブロット分析および ELISA アッセイを含む。

40

【0054】

別の観点では、本発明はとりわけ上に挙げた疾患の1つに対する疾患または罹病性に関する診断キットに関する。特に本発明は子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患に関する診断キットに関する。

50

## 【0055】

キットは：

(a) IGS 43 ポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント；および/または

(b) (a)の配列に相補的なヌクレオチド配列；および/または

(c) IGS 43 ポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチド、またはそれらのフラグメント；および/または

(d) IGS 43 ポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチドに対する抗体；および/または

(e) IGS 43 ポリペプチドの関連する生物学的または抗原的特性に必要な RAMP ポリペプチド、  
を含んで成ることができる。 10

## 【0056】

そのようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は実質的な成分を含んで成ることができる。と考える。

染色体アッセイ

本発明のヌクレオチド配列は染色体の同定にも価値がある。この配列は個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的に標的とし、そしてハイブリダイズすることができる。本発明による染色体に対する関連配列のマッピングは、これらの配列を遺伝子が関連する疾患と関連づける重要な第1工程である。いったん配列が正確な染色体位置にマップされれば、染色体上の配列の物理的な位置を遺伝子マップのデータと相関させることができる。そのようなデータは例えば、V. McKusickのヒトにおけるメンデルの遺伝(Mendelian Inheritance in Man)(ジョンズホプキンス大学ウェルチメデカルライブラリーを通してオンラインで入手可能)に見い出される。次に同じ染色体領域上にマップされた遺伝子と疾患との間の関係は、系統分析を通して同定される(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝(coinheritance))。 20

## 【0057】

影響を受けた、および影響を受けていない個体間のcDNAまたはゲノム配列における差異も決定することができる。突然変異が影響を受けた個体の幾つかまたはすべてで観察されるが、正常な個体では観察されないならば、この突然変異はおそらく疾患の原因である。 30

抗体

本発明のポリペプチドまたはそれらのフラグメントまたはそれらの同族体またはそれらを発現する細胞は、必要ならば関連するRAMPと一緒に免疫原として使用して、IGS 43 ポリペプチドに免疫的に特異的な抗体を生成することもできる。「免疫特異的な」という用語は、抗体が従来技術における他の関連するポリペプチドに対する親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的により大きな親和性を有することを意味する。

## 【0058】

IGS 43 ポリペプチドに対して生成した抗体は、ポリペプチドまたはエピトープを持つフラグメント、同族体または細胞を動物、好ましくは非ヒトに日常的なプロトコールを使用して投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の調製には、連続する細胞系の培養により生産される抗体を提供する任意の技術を使用することができる。例にはハイブリドーマ法(Kozbor, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ法、ヒトB-細胞ハイブリドーマ法(Kohler et al., Immunology Today (1983) 4: 72)およびEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., モノクローナル抗体および癌治療(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY)、第77-96頁、Alan R. Liss社、1985)を含む。 40

## 【0059】

上記抗体はポリペプチドを発現しているクローンを単離または同定するために、あるいは 50

アフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するために使用することができる。

【0060】

I G S 4 3 ポリペプチド自体に対する、または I G S 4 3 ポリペプチド - R A M P 複合体に対する抗体もとりわけ上記の疾患を処置するために使用することができる。特に I G S 4 3 ポリペプチド自体に対する、または I G S 4 3 ポリペプチド - R A M P 複合体に対する抗体は、子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に係する機能不全、障害または疾患を処置するために使用することができる。

動物

本発明の別の観点は、I G S 4 3 の異常型 ( a b e r r a n t ) の発現または活性から生じる障害のモデルとして機能する非ヒト動物に基づく系に関する。非ヒト動物に基づくモデル系は、さらに I G S 4 3 遺伝子の活性を特徴付けるためにも使用することができる。そのような系はとりわけ上記の疾患のような I G S 4 3 に基づく障害を処置することができる化合物を同定するために計画されたスクリーニング法の一部として利用することができる。特にこの系は子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に係する I G S 4 3 に基づく機能不全、障害または疾患を処置することができる化合物を同定するために計画されたスクリーニング法の一部として利用することができる。

10

【0061】

このように動物に基づくモデルは、I G S 4 3 の異常型の発現または活性の障害を処置するために効果的となり得る医薬化合物、治療および介入を同定するために使用することができる。加えてそのような動物モデルは、動物個体の L D <sub>50</sub> および E D <sub>50</sub> を決定するためにも使用することができる。これらのデータを使用して有望な I G S 4 3 障害の処置のインビボ効力を決定することができる。異常型の I G S 4 3 発現または活性に基づく I G S 4 3 に基づく障害の動物に基づくモデル系には、非組換え動物ならびに組換え的に工作されたトランスジェニック動物の両方を含む。

20

【0062】

I G S 4 3 障害に関する動物モデルには、例えば遺伝子モデルを含むことができる。I G S 4 3 に基づく障害様の症状を現す動物モデルは、例えば当業者に周知なトランスジェニック動物を作出する技法に関連して上記に記載したような I G S 4 3 配列を利用することにより工作することができる。例えば I G S 4 3 配列は目的の動物のゲノム中に導入し、そして過剰発現および/または誤発現させるか、あるいは内因性の I G S 4 3 配列が存在するならば、それらを過剰発現、誤発現させるか、またそうではなく I G S 4 3 遺伝子発現を不十分に発現させるかまた不活性化するために破壊することができる。

30

【0063】

I G S 4 3 遺伝子配列を過剰発現または誤発現するために、I G S 4 3 遺伝子配列のコード部分を高レベルの遺伝子発現、または遺伝子が目的の動物種中で通常は発現されない細胞型中での発現を駆動できる調節配列に連結することができる。そのような調節領域は当業者には周知であり、そして過度な実験を行わずに利用することができる。

40

【0064】

内因性の I G S 4 3 遺伝子配列の不十分な発現には、目的の動物のゲノムに再導入した時に内因性の I G S 4 3 遺伝子の対立遺伝子が不活性化または「ノックアウト」されるように、そのような配列を単離し、そして工作することができる。好ましくは工作された I G S 4 3 遺伝子配列は、内因性の I G S 4 3 配列が工作された I G S 4 3 遺伝子配列の動物ゲノムへの組み込みで破壊されるように、遺伝子ターゲティングを介して導入される。

【0065】

限定するわけではないがマウス、ラット、ウサギ、リス、モルモット、ブタ、ミニ-ブタ、ヤギおよび非ヒト霊長類、例えばヒヒ、サルおよびチンパンジーを含む任意の種の動物を使用して、I G S 4 3 関連障害の動物モデルを作出することができる。

50

## 【0066】

当該技術分野で既知の技術を使用してIGS43導入遺伝子を動物に導入して、トランスジェニック動物の創始系 (founder line) を作出する。そのような技法には限定するわけではないが前核マイクロインジェクション (Hoppe, P. C., and Wagner, T. E., 1989, 1989, 米国特許第4,873,191号明細書); レトロウイルスが媒介する遺伝子の生殖細胞系への転移 (van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152, 1985); 胚性幹細胞への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); および精子が媒介する遺伝子転移 (Lavitrano et al., Cell 57: 717-723, 1989) 等を含む。そのような技法の総説は、Gordon、トランスジェニック動物 (Transgenic Animals)、Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229, 1989を参照にされたい。

10

## 【0067】

本発明は、すべてのそれらの細胞中にIGS43導入遺伝子を持つトランスジェニック動物、ならびにそれらすべての細胞ではないが幾つかの細胞中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により記載された技法、Curr. Biol. 4: 761-763, 1994を参照にされたい) 導入遺伝子は1つの導入遺伝子またはコンカテマー、例えば頭から頭の直列 (tandem) または頭から尾への直列として組み込むことができる。導入遺伝子は例えばLasko et al. の教示に従い、特定の細胞型中に選択的に導入され、そして活性化され得る (Lasko, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236, 1992)。

20

## 【0068】

そのような細胞型に特異的な活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当業者には明らかであろう。

## 【0069】

IGS43導入遺伝子が内因性IGS43遺伝子の染色体部位に組み込まれることが望まれる時、遺伝子ターゲティングが好適である。簡単に説明すると、そのような技術が利用される時、目的の内因性IGS43遺伝子に相同的な幾つかのヌクレオチド配列を含むベクター (例えばマウスIGS43遺伝子のヌクレオチド配列) を、内因性IGS43遺伝子または遺伝子の対立遺伝子のヌクレオチド配列に染色体配列との相同的組換えを介して組み込み、そしてその機能を破壊するように計画する。導入遺伝子は選択的に特定の細胞型に導入することもでき、これにより例えばGuet al. (Gu, H. et al. - Science 265: 103-106, 1994) の教示に従いその細胞型のみの目的の内因性遺伝子を不活性化する。そのような細胞型に特異的な不活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当業者には明らかであろう。

30

## 【0070】

いったんトランスジェニック動物が作出されれば、組換えIGS43遺伝子の発現およびタンパク質は標準的な技法を使用してアッセイすることができる。初期のスクリーニングはサザンブロット分析またはPCR法により行い、導入遺伝子の組み込みが起こったかどうかについてアッセイするために動物組織を分析する。トランスジェニック動物の組織中のIGS43導入遺伝子のmRNA発現のレベルも、限定するわけではないが動物から得た組織サンプルのノーザンブロット分析、in situハイブリダイゼーション分析およびRT-PCRを含む技法を使用して評価することができる。標的の遺伝子を発現しているサンプルは、目的の標的遺伝子導入遺伝子産物に特異的な抗体を使用して免疫細胞化学的に評価することもできる。容易に検出可能なレベルでIGS43遺伝子mRNAまたはIGS43導入遺伝子ペプチドを発現するIGS43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する抗体を使用して免疫細胞化学的に検出される) は、次にさら

40

50

に特徴的な I G S 4 3 に基づく障害の症状を現す動物を同定するために評価することができる。

【 0 0 7 1 】

いったん I G S 4 3 トランスジェニック創始動物が作出されれば（すなわち、目的の細胞または組織中で I G S 4 3 タンパク質を発現し、そして好ましくは I G S 4 3 に基づく障害の症状を現す動物）、それらを育種し、同系交配し、異系交配し、または交雑して特定の動物コロニーを作成する。そのような育種法には限定するわけではないが；別の系統を樹立するために 1 以上の組み込み部位を持つ創始動物を異系交配すること；各 I G S 4 3 導入遺伝子の付加的な発現の効果により、より高レベルで目的とする I G S 4 3 導入遺伝子を発現する混合 I G S 4 3 トランスジェニックを作出するために別の系統を同系交配すること；発現を増し、そして D N A 分析による可能な動物のスクリーニングの必要性を排除する両方のために、ヘテロ接合性トランスジェニック動物を交配して、所定の組み込み部位に関してホモ接合性の動物を作出すること；別のホモ接合系を交配して混合ヘテロ接合およびホモ接合系統を作出すること；I G S 4 3 導入遺伝子の発現および I G S 4 3 - 様症状の発症に対する対立遺伝子の修飾効果を調査するために、動物を異なる同系交配遺伝的バックグラウンドに育種することを含む。1 つのそのような取り組みは、上記のような I G S 4 3 に関連する障害様の症状を現す F 1 世代を作出するために、I G S 4 3 トランスジェニック創始動物と野生型の種とを交配する。次いで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と判明すれば、ホモ接合系を作出するために F 1 世代を同系交配することができる。

10

20

ワクチン

本発明の別の観点は哺乳動物中で免疫学的応答を誘導するための方法に関し、この方法はとりわけ上記の疾患の 1 つから該動物を保護するために、抗体および/または T 細胞免疫応答を生じるために十分な能力のある I G S 4 3 ポリペプチド、またはそれらのフラグメントを必要ならば R A M P ポリペプチドと一緒に哺乳動物に（例えば接種により）投与することを含んで成る。特に本発明は哺乳動物中で免疫学的応答を誘導するための方法に関し、この方法は子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に係する機能不全、障害または疾患から該動物を保護するために、抗体および/または T 細胞免疫応答を生じるために十分な能力のある I G S 4 3 ポリペプチド、またはそれらのフラグメントを必要ならば R A M P ポリペプチドと一緒に哺乳動物に（

30

【 0 0 7 2 】

さらに本発明の別の観点は、哺乳動物に免疫学的応答を誘導する方法に関し、この方法はそのような免疫学的応答を誘導し、疾患から該動物を保護するための抗体を生じるために、I G S 4 3 ポリペプチドの発現を支配するベクターを介して I G S 4 3 ポリペプチドを送達することを含んで成る。

【 0 0 7 3 】

本発明のさらなる観点は、哺乳動物宿主に導入した時に、該哺乳動物に I G S 4 3 ポリペプチドに対する免疫学的応答を誘導する免疫学的/ワクチン製剤（組成物）に関し、ここで組成物は I G S 4 3 ポリペプチドまたは I G S 4 3 遺伝子を含んで成る。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/ワクチン製剤または予防用の免疫学的/ワクチン製剤のいずれかでよい。ワクチン製剤はさらに適当なキャリアーを含んで成ることができる。I G S 4 3 ポリペプチドは胃内で分解され得るので、非経口的（皮下、筋肉内、静脈内、皮内等の注射を含む）に投与することが好ましい。非経口投与に適する製剤には、酸化防止剤、バッファー、静菌剤および製剤を受容体の血液と等張性にする溶質を含むことができる水性および非水性滅菌注射溶液；および沈殿防止剤または粘性付与剤を含むことができる水性および非水性懸濁液を含む。製剤は単位用量または多用量容器、例えば密閉したアンプルおよびバイアル中に与えることができ、そして使用直前に滅菌液体キャリアーの添加のみを必要とする凍結乾燥条件で保存することができる。ワクチン製剤は、水中油系および当該技術分野で既知の他の系のような製剤の免疫原性を強化

40

50

するアジュバント系も含むことができる。投薬容量はワクチンの比活性に依存し、そして日常的な実験により容易に決定することができる。

#### スクリーニングアッセイ

本発明のIGS43ポリペプチドは、受容体に結合し、そして本発明の受容体ポリペプチドを活性化するか（アゴニスト）または活性化を阻害する（アンタゴニスト）化合物のスクリーニングプロセスに使用することができる。すなわち本発明のポリペプチドは、例えば細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリーおよび天然産物の混合物中の低分子物質およびリガンドの結合を評価するために使用することができる。これらの物質およびリガンドは自然な物質およびリガンドでよく、または構造的もしくは機能的模造物でもよい。

#### 【0074】

IGS43ポリペプチドは病理を含む生物学的機能の原因である。したがって一方ではIGS43を刺激し、そしてもう一方ではIGS43の機能を阻害することができる化合物および薬剤を見いだすことが望ましい。一般にアゴニストは、とりわけ上記の疾患のような状態の治療および予防目的に使用される。特にアゴニストは、子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患の治療および予防目的に使用される。

10

#### 【0075】

アンタゴニストは、とりわけ上記の疾患のような状態の種々の治療および予防目的に使用され得る。特にアンタゴニストは、子宮、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺、精巣、中枢神経系、小脳および脊髄に関係する機能不全、障害または疾患の種々の治療および予防目的に使用され得る。

20

#### 【0076】

一般にそのようなスクリーニング手順には、本発明の受容体ポリペプチドをそれらの表面に発現し、そしてもし必須ならばそれらの表面にRAMPを同時発現する適切な細胞を生産することが関与する。そのような細胞には哺乳動物、酵母、シヨウジョウバエおよび大腸菌（*E. coli*）に由来する細胞を含む。受容体を発現している細胞（または発現した受容体を含む細胞膜）を次いで試験化合物と接触させて結合、または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する。

#### 【0077】

1つのスクリーニング技法には、受容体の活性化により引き起こされる細胞外pH、細胞内pHまたは細胞内カルシウムの変化を測定する系で本発明の受容体を発現する細胞の使用を含む（例えばトランスフェクトしたCHO細胞）。この技法では、化合物は本発明の受容体ポリペプチドを発現している細胞と接触させることができる。次いで第2メッセンジャー応答、例えばシグナル伝達、pH変化またはカルシウムレベルの変化を測定して、有望な化合物が受容体を活性化または阻害するかどうかを決定する。

30

#### 【0078】

別の方法には、cAMP蓄積および/またはアデニル酸シクラーゼ活性のような受容体が媒介するシグナルのモジュレーションを決定することにより受容体インヒビターをスクリーニングすることが関与する。そのような方法には真核細胞を本発明の受容体でトランスフェクトして、細胞表面上に受容体を発現させることが関与する。次いで細胞を本発明の受容体のアゴニストに、有望なアンタゴニストの存在下で暴露する。有望なアンタゴニストが受容体に結合し、そしてこれが受容体の結合を阻害すれば、アゴニストが媒介するシグナルがモジュレートされるだろう。

40

#### 【0079】

本発明の受容体のアゴニストまた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号明細書に記載されている酵母に基づく技術である。

#### 【0080】

このアッセイは候補化合物の結合を簡単に試験することができ、ここで受容体を持つ細胞への接着が候補化合物に直接または間接的に結合する標識の手段により、あるいは標識した競合物との競合が関与するアッセイで検出される。さらにこれらのアッセイは、候補化

50

合物が表面に受容体を持つ細胞に対して適当な検出系を使用して、受容体の活性化により生成されるシグナルを生じるかどうかを試験することができる。活性化のインヒビターは一般に既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物の存在によるアゴニストによる活性化に及ぼす効果が観察される。

【0081】

さらにアッセイは候補化合物をIGS43ポリペプチドを含有する溶液と混合して混合物を形成し、混合物中のIGS43活性を測定し、そして混合物のIGS43活性を標準と比較する工程を単に含んで成るものでよい。

【0082】

IGS43 cDNA、タンパク質およびタンパク質に対する抗体を使用して、細胞中のIGS43 mRNAおよびタンパク質の生産に及ぼす加えた化合物の効果を検出するアッセイを形成することもできる。例えばELISAは、分泌したか、または細胞に付随するIGS43タンパク質レベルをモノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して当該技術分野で標準的な方法により測定するために構築することができ、そしてこれを使用して適当に操作された細胞または組織からIGS43の生産を阻害または強化することができる作用物質（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる）を見いだすことができる。スクリーニングアッセイを行うための標準的な方法は、当該技術分野で周知である。

10

【0083】

有望なIGS43アンタゴニストの例には、抗体、または場合によりIGS43のリガンドに極めて近いオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、例えばリガンドのフラグメント、または受容体に結合するが応答は誘導しないような、受容体の活性が防止される低分子を含む。

20

【0084】

このように別の観点では、本発明はIGS43ポリペプチドに関するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素等；またはIGS43ポリペプチドの生産を低下し、増加し、かつ/または強化する化合物を同定するためのスクリーニングキットに関し、このキットは：

(a) IGS43ポリペプチド、好ましくは配列番号2のIGS43ポリペプチド；

(b) IGS43ポリペプチド、好ましくは配列番号2のIGS43ポリペプチドを発現している組換え細胞；

30

(c) IGS43ポリペプチド、好ましくは配列番号2のIGS43ポリペプチドを発現している細胞膜；または

(d) IGS43ポリペプチド、好ましくは配列番号2のIGS43ポリペプチドに対する抗体、

を含んで成る。

【0085】

そのようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的な成分を含んで成ることができる。

予防および治療法

40

本発明はIGS43活性の過剰な、および不十分な量の両方に関係する異常な状態を処置する方法を提供する。

【0086】

IGS43の活性が過剰である場合、幾つかの取り組みを利用できる。1つの取り組みは、個体にこれまでに記載したインヒビター化合物（アンタゴニスト）を医薬的に許容できるキャリアと一緒に、IGS43へのリガンドの結合を遮断することにより、またはRAMPPポリペプチドまたは第2シグナルとの相互作用を阻害することにより活性化を阻害するために効果的な量で投与することを含んで成り、それにより異常な状態を緩和する。

【0087】

別の取り組みでは、内因性IGS43と競合してリガンドに結合することができる可溶性

50

状態の I G S 4 3 ポリペプチドを投与してもよい。そのような競合物の典型的な態様には、I G S 4 3 ポリペプチドのフラグメントを含んで成る。

【0088】

さらに別の取り組みでは、内因性 I G S 4 3 をコードする遺伝子の発現を発現 - 遮断法を使用して阻害することができる。既知のそのような技法には、内部で生成された、または別個に投与されたいずれかのアンチセンス配列の使用が関与する。例えば O' Connor, J Neurochem (1991) 56: 560、遺伝子発現のアンチセンスインヒビターとしてのオリゴデオキシヌクレオチド (Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression)、CRC 出版、ボカラトン、フロリダ、米国 (1988) を参照にされたい。あるいは遺伝子と三重ヘリックスを形成するオリゴヌクレオチドを供給することができる。例えば Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6: 3073; Cooney et al., Science (1988) 241: 456; Der van et al., Science (1991) 251: 1360 を参照にされたい。これらのオリゴマーはそれ自体を投与することができ、あるいは関連するオリゴマーをインピボで発現させることができる。合成アンチセンスまたは三重オリゴヌクレオチドは、修飾塩基または修飾骨格を含んで成ることができる。後者の例にはメチルホスホネート、ホスホオチオエートまた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または三重オリゴヌクレオチドに包含され、そして当該技術分野では周知である。これらのまたは他の修飾骨格を用いて合成されたアンチセンスおよび三重分子も、本発明の部分を構成する。

10

20

【0089】

さらに I G S 4 3 ポリペプチドの発現は、I G S 4 3 mRNA 配列に対して特異的なリボザイムを使用することにより防止することができる。リボザイムは天然または合成であり得る触媒的に活性な RNA である (例えば Usman, N, et al., Curr. Opin. Struct. Biol (1996) 6 (4), 527 - 33)。合成リボザイムは選択した位置で I G S 4 3 mRNA を特異的に開裂するように設計され、これにより I G S 4 3 mRNA の機能的ポリペプチドへの翻訳を防止する。リボザイムは、RNA 分子中に通常見いだされるような天然のリボースリン酸骨格および天然の塩基を用いて合成することができる。あるいはリボザイムは例えば 2' - O - メチル RNA のような非天然の骨格を使用して合成してリボヌクレアーゼ分解から保護することができ、そして修飾塩基を含んでもよい。

30

【0090】

I G S 4 3 およびその活性の不十分な発現に関連する異常な状態を処置するために、幾つかの取り組みを利用することができる。1つの取り組みは個体に治療に効果的な量の I G S 4 3 を活性化する化合物、すなわち上記のアゴニストを医薬的に許容されるキャリアーと組み合わせて投与し、これにより異常な状態を緩和する。あるいは遺伝子治療を使用して、個体中の関連する細胞による I G S 4 3 の内因性の生産を行ってもよい。例えば本発明のポリヌクレオチドを上記の複製欠損レトロウイルスベクター中での発現用に工作してもよい。次いでレトロウイルス発現構築物を単離し、そして次にパッケージング細胞が目的遺伝子を含む感染性のウイルス粒子を生産するように、本発明のポリペプチドをコードする RNA を含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入するパッケージング細胞に導入することができる。これらの生産細胞はインピボで細胞を工作して、インピボでポリペプチドを発現させるために個体に投与することができる。遺伝子治療の概観は、ヒトの分子遺伝学 (Human Molecular Genetics) の第 20 章、遺伝子治療および他の分子遺伝学に基づく治療的取り組み (Gene Therapy and other Molecular Genetics - based Therapeutic Approaches) (およびそこに引用されている参考文献)、Strachan T. and Read A. P., BIOS サイエントフィック出版社 (1996) を参照にされたい。

40

50

## 【0091】

上記の任意の治療法は、そのような治療が必要な例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルおよび最も好ましくはヒトを含む任意の個体に適用することができる。

## 製剤および投与

可溶性状態のIGS43ポリペプチドのようなペプチド、およびアゴニストおよびアンタゴニストペプチドまたは低分子は、適当な医薬的キャリアーと組み合わせて配合することができる。そのような製剤は治療に効果的な量のポリペプチドまたは化合物、および医薬的に許容されるキャリアーまたは賦形剤を含んで成る。製剤は投与様式に適するべきであり、そして当該技術分野では周知である。本発明はさらに本発明の上記組成物の1以上の成分で満たされた1以上の容器を含んで成る医薬用包装物およびキットに関連する。

10

## 【0092】

本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独でまたは治療用化合物のような他の化合物と組み合わせて使用することができる。

## 【0093】

医薬組成物の全身投与を好適な形態には、注射、典型的には静脈内注射を含む。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路も使用できる。全身投与用の別の手段には、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を使用する経粘膜および経皮投与を含む。さらに腸溶性またはカプセル化された製剤に適切に配合されれば、経口投与も可能である。

## 【0094】

必要な投薬用量範囲はペプチドまたは化合物の選択、投与の経路、製剤の性質、個体の状態の性質、および医師の判断に依存する。適当な投薬用量は、 $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の個体の範囲である。しかし必要な投薬用量は、利用できる化合物の種類および種々の投与の経路の異なる効力の観点から広い変動が予想される。例えば経口投与は静脈内注射による投与よりも高い投薬用量が予想される。これらの投薬用量レベルにおける変動は、当該技術分野では十分に理解されているように至適化のための標準的な経験的な日常的作業により調整することができる。

20

## 【0095】

処置に使用するポリペプチドは、上記のよく「遺伝子治療」と呼ばれる処置のモダリティーにおいて個体中で内因的に生成することもできる。すなわち例えば個体に由来する細胞は、例えばレトロウイルスプラスミドベクターの使用によりポリペプチドをコードするためのDNAまたはRNAのようなポリヌクレオチドを用いてエクスピボで工作することができる。この細胞を個体に導入する。

30

## 【0096】

以下の実施例は本発明をより詳細にさらに具体的に説明することのみを意図し、したがってこれらの実施例は本発明の範囲をとのようにも限定するとは見なされない。

## 【0097】

## 【実施例】

実施例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  
 未完成の高処理量ゲノムDNA配列(htgs)の公的なドメインのデータバンクで、我々は新規Gタンパク質-共役受容体(GPCR)を有力にコードするゲノム配列(受け入れn°AC019124)を同定した。我々はこの新規GPCRをIGS43と呼ぶ。このゲノム配列が機能的遺伝子を表すのかどうかを、ヒトの組織からこのcDNAをクローン化することにより調査することに決定した。ヒト精巢のpolyA(+)RNA(クローンテック: Clontech cat#6535-1)を最初にDNase I(ライフテクノロジーズ(Life Technologies))で処理してゲノムDNAの残る痕跡を破壊し、次いでSuperscript(商標)II逆転写酵素(ライフテクノロジーズ)をこれらの酵素の供給元に推薦されるプロトコールに従い使用して逆転写を介してcDNAに転換した。PCRプライマーは、推定上のIGS43コード配列を増幅するために設計した。第1のPCR反応(50 μl容量)は精巢cDNA鋳型(50 ngのD

40

50

NAse I で処理し、そして逆転写したヒト poly A (+) 精巢 RNA から生じた) 上で、HotStarTaq (商標) DNA ポリメラーゼ (キアジェン (Qiagen) # 203203) を使用して、前方および逆プライマーであるそれぞれ IP14, 923 (配列番号 3) および IP14, 925 (配列番号 4) を用いてキアジェンにより推薦される条件下で行った。PCR 反応に関しては、反応試験管を 95 に 15 分間加熱し、そして次いで 35 サイクルの変性 (94、30 秒)、アニーリング (55、30 秒) および抽出 (72、90 秒) に供した。最後に 72 で 10 分間の伸長を行った。2.5  $\mu$ l の第 1 PCR 反応物は、キアジェンの HotStarTaq (商標) DNA ポリメラーゼを使用して、ネステッド前方および逆プライマーであるそれぞれ IP14, 924 (配列番号 5) および IP14, 926 (配列番号 6) を用いた第 2 の PCR 反応に鋳型として使用した。クローニング部位をネステッドプライマーに加えて、その後の都合良いサブクローニングを可能とした。ネステッド PCR 反応に関する循環条件は第 1 PCR の条件と同一であったが、30 サイクルのみを行った。PCR 反応産物はアガロースゲル電気泳動により分析し、そしてエチジウムブロマイドで染色した。第 1 PCR 反応産物は幾つかのバンドのスメアとしてゲル上に現れた。しかしネステッド PCR 反応は約 1050 bp の強い顕著な DNA フラグメントを生成した。mock 逆転写 (逆転写反応に Superscript (商標) II 酵素を加えなかった) した RNA を使用した時、DNA 産物が得られなかったのは、1050 bp フラグメントが cDNA から生じたことを示していた。この  $\pm$  1050 bp フラグメントを QIAEX (商標) II 精製キット (キアジェン) を使用してゲルから精製し、そして供給元 (pGEM-T 系、プロメガ (Promega)) により薦められる手順に従い pGEM-T ベクターに連結した。次いで組換えプラスミドを使用してコンピテントな DH5 $\alpha$  バクテリアを形質転換した。形質転換した細胞は、アンピシリン (100  $\mu$ g/ml)、IPTG (0.5 mM) および X-gal (50  $\mu$ g/ml) を含有する LB 寒天培地にまいた。プラスミド DNA は、BioRobot (商標) 9600 核酸精製システム (キアジェン) を使用して個々の白色コロニーのミニ-カルチャーから精製し、そしてシーケンシングした。精製したプラスミド DNA についての DNA シーケンシング反応は、ABI Prism (商標) BigDye (商標) ターミネーターサイクルシーケンシングレディ反応キット (PE アプダイオシステムズ (Applied Biosystems)) を用い、挿入フランキングおよび内部 (IPTG 特異的) プライマーを使用して行った。サイクルシーケンシング反応生成物は、EtOH/NaOAc 沈殿を介して精製し、そして ABI 377 自動化シーケンサー (PE アプダイオシステムズ) に付加した。クローン HB6127 が、327 アミノ酸のタンパク質をコードする 1057 bp の DNA 配列を含んだ。我々はこの DNA 配列およびコードされたタンパク質を、それぞれ IGS43 DNA (配列番号 1) および IGS43 PROT (配列番号 2) と称する。IGS43 DNA 配列は、AC019124 ゲノム配列内で最初に同定された範囲に 97% 同一であった (1057 個の並んだヌクレオチド中に 24 個の誤対合が見いだされた)。これは恐らく AC019124 の配列データが単に草案の質であったという事実によるのだろう。IGS43 PROT 配列に関しては、今日までのタンパク質データバンクおよび翻訳された DNA データバンクの相同性の範囲を、BLAST アルゴリズム (Altschul S. F. et al. [1997], Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) を使用して実行した。これらの調査により、IGS43 PROT 配列はラット GPCR RTA に最も類似することが示された (327 個の並んだ残基にわたり 85% の同一性; スイスポートの受け入れ n° P23749)。欧州特許出願公開第 1067182 号明細書の Seq Id 322 では、可能性のある G-タンパク質共役受容体のタンパク質を与えている。このタンパク質は 16 アミノ酸長い。他は IGS43 タンパク質と同一である。

【0098】

【表 1】

配列番号:3	IP14,923	5'-GCTCCACAGCCACTGCCTTACAGAC-3'
配列番号:4	IP14,925	5'-CACAGTCCCAGGGAGAAGAAGGC-3'
配列番号:5	IP14,924	5'- <u>ACGGATT</u> CATCACAGGTGTCCCTCTCTGC-3'
配列番号:6	IP14,926	5'- <u>AGAAGCT</u> TGGAGCACGATTCCTGCCACTGC-3'

10

## 【0099】

表3: IGS43 cDNAをクローン化するために使用したオリゴヌクレオチドプライマーの全体像。ネスティッドプライマーに加えたクローニング部位 (IP14, 924についてはBamHI制限部位およびIP14, 926についてはHindIII制限部位を意図する) には下線を付す。プライマーIP14, 924内のBamHI制限部位の設計における誤りにより [ "GGATCC" の代わりに "GGATTC" ]、このBamHI制限部位は機能しない。

実施例2 哺乳動物発現ベクターpcDNA3.1(-)hIGS43の構築

20

ヒトIGS43タンパク質の完全なコード配列を含むプラスミドpGEM-ThsIGS43を持つ大腸菌(E. coli) HB6127株を、LB寒天プレート(100μgのアンピシリン/mlを含む)上に再度まいた後に再クローン化し、そしてインノジェネティクス(Innogenetics)の菌株コレクション(ICCG4555)およびオランダ国、ヒトレヒトのセントラルピュローホーアシンメルカルチャー(受け入れn°109714)の両方に寄託した。再クローン化した単離物から調製したプラスミドDNAを再度シーケンシングし、そして以前に決定したIGS43DNAコンセンサス配列と同一であることが分かった。

## 【0100】

完全なIGS43コード配列を含む±1070bpDNAフラグメントを、pGEM-ThsIGS43プラスミド鑄型からオリゴヌクレオチドプライマーIP15, 332(配列番号7)およびIP15, 333(配列番号8)を使用してPCR増幅した。5'末端でオリゴヌクレオチドIP15, 332(配列番号7)およびIP15, 333(配列番号8)は、それぞれKpnIおよびXbaIクローニング部位を含んだ。増幅したPCRフラグメントはKpnI/XbaI消化し、そしてゲルから精製した。pcDNA3.1(+ )プラスミド発現ベクター(インビトロゲン)をKpnI/XbaI消化し、そして直線化した5362bpのベクターフラグメントをゲルから精製した。直線化したプラスミドベクターおよびPCRフラグメントを連結し、そしてライゲーション混合物をコンピテントな大腸菌(E. coli) DH5 F'株に熱ショックにより形質転換した。形質転換した細菌をLB寒天培地(100μg/mlのアンピシリンを含む)にまき、そして

30

40

## 【0101】

ICCG4694株から調製したプラスミドDNAであるpcDNA3.1(+ )hIGS43のDNA配列分析では、挿入物がIGS43DNAコンセンサスcDNA配列と完全に同一であることが示された。

実施例3 定量的なPCR(Q-PCR)を介した種々のヒト組織中のIGS43 mRNA

50

## N A の発現分析

ヒト G A P D H ( グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ ) および I G S 4 3 m R N A の絶対発現レベルは、リアルタイムの定量的 R T - P C R アッセイ ( Q - P C R ) で、L i g h t C y c l e r ( 商標 ) 装置 ( ロッシュ ダイアグノスティクス ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) ) および遺伝子特異的 P C R プライマーおよびヒト R N A サンプルについて T a q M a n ( 商標 ) プローブを使用して決定した。ハウスキーピング遺伝子 G A P D H に関する m R N A レベルは c D N A 合成の効率に関する対照として、そして種々の R N A サンプルについての P C R 増幅を測定した。

## 【 0 1 0 2 】

c D N A は種々のヒト組織の全 R N A ( クローンテックのヒト R N A パネル c a # K 4 0 0 0 - 1、K 4 0 0 1 - 1、K 4 0 0 2 - 1、K 4 0 0 3 - 1 および K 4 0 0 0 4 - 1 ) から、またはヒト脳の種々のサブ領域に由来する p o l y ( A ) <sup>+</sup> R N A ( クローンテックの c a # 6 5 8 0 . 1、6 5 7 5 . 1、6 5 4 3 . 1、6 5 7 4 . 1、6 5 7 7 . 1、6 5 7 8 . 1 および 6 5 8 2 . 1 ) のいずれかから逆転写を介して合成した。逆転写の前に、混入している可能性のあるゲノム D N A を破壊するために、供給元により推薦される手順に従い R N A を D N A s e I ( ライフテクノロジーズ c a # 1 8 0 6 8 - 0 1 5 ) で処理した。D N A s e I 反応は E D T A ( 最終濃度 = 2 . 3 m M ) を加え、そして 6 5 °C で 1 0 分間加熱することにより停止した。D N A s e I で処理した R N A ( 5 μ g の全 R N A または 9 4 5 n g の p o l y ( A ) <sup>+</sup> R N A のいずれか ) を 2 . 5 μ g の o l i g o ( d T ) ( ライフテクノロジーズ # 1 8 4 1 8 - 0 1 2 ) にアニールし、そして O m n i s c r i p t 逆転写酵素 ( キアジェン : 1 0 0 μ l の反応容量 ; 3 7 °C で 1 時間 ) を使用して逆転写に供した ( = R T <sup>+</sup> - 反応 ) 。逆転写酵素は 9 3 °C で 5 分間インキュベーションすることにより不活性化した。D N A s e I 処理した R N A の一部は逆転写にかけず、そして対照として使用して残るゲノム D N A の存在を確認した ( R T <sup>-</sup> - 反応 ) 。

## 【 0 1 0 3 】

全 R N A サンプルの R T <sup>-</sup> - 反応におけるゲノム D N A の不存在に関する対照として、ヒト  $\beta$  - ミクログロブリン D N A に特異的な P C R 増幅反応を行った。P C R 反応は 2 . 5 μ l の G e n e A m p ( 商標 ) 1 0 × P C R バッファー ( アプライドバイオシステムズ )、2 0 0 μ M の各 d N T P、0 . 5 μ l の R T <sup>-</sup> c D N A 合成反応、各 5 p m o l の P C R プライマーである I P 3 , 9 8 1 ( 配列番号 9 ) および I P 3 , 9 8 2 ( 配列番号 1 0 ) および 1 . 2 5 U の A m p l i T a q G o l d ( 商標 ) D N A ポリメラーゼ ( アプライドバイオシステムズ c a t # N 8 0 8 - 0 2 4 4 ) を含む 2 5 μ l の反応容量で行った。9 5 °C で 1 0 分間の最初のインキュベーション後、反応は以下のように 3 0 回循環させた : 9 4 °C で 1 分間の変性、5 5 °C で 1 分間のアニーリングおよび 7 2 °C で 1 分間の伸長。最後に 7 2 °C で 1 0 分間伸長させた。陽性対照として、5 0 n g のヒトゲノム D N A ( クローンテック # 6 5 5 1 - 1 ) を使用した。予想される長さのアンプリコンはゲノム D N A 鋳型から得たが、陰性対照 ( H <sub>2</sub> O ) から R T <sup>-</sup> サンプルからも得られなかった ( I P 3 , 9 8 1 / I P 3 9 8 2 プライマー対は 6 1 6 b p イントロンに広がるという事実から、予想されるアンプリコンの長さは、c D N A およびゲノム D N A についてそれぞれ 2 6 9 b p および 8 8 5 b p である ) 。R T <sup>-</sup> p o l y ( A ) <sup>+</sup> R N A サンプルは、0 . 8 μ l の R T <sup>-</sup> c D N A 合成反応を使用して G A P D H 特異的 Q - P C R を介してゲノム D N A の存在について分析した ( 以下を参照にされたい ) 。G A P D H 特異的シグナルは得られなかった。我々は合成した c D N A がゲノム D N A を含まないと結論した。

## 【 0 1 0 4 】

Q - P C R 反応は、1 × T a q M a n ( 商標 ) ユニバーサル P C R マスターミックス ( アプライドバイオシステムズ c a t # 4 3 0 4 4 3 7 )、0 . 1 2 m g B S A / m l、9 0 0 n M の G A P D H または I G S 4 3 特異的な前方および逆プライマー ( G A P D H については I P 1 5 , 5 2 9 ( 配列番号 1 1 ) / I P 1 5 , 5 3 1 ( 配列番号 1 2 )、そして I G S 4 3 については I P 1 7 , 0 8 0 ( 配列番号 1 3 ) / I P 1 7 , 0 8 1 ( 配列番号 1 4 ) )、2 5 0 n M の遺伝子特異的 T a q M a n プローブ ( それぞれ G A P D H に

いてはIP15, 530 (配列番号15)、そしてIGS43についてはIP17, 082 (配列番号16) および1.6  $\mu$ lの全RNA RT<sup>+</sup>またはpoly(A)<sup>+</sup> RT<sup>+</sup> cDNA合成反応物を含む20  $\mu$ lの反応容量で行った。1  $\times$  TaqMan (商標) ユニバーサルPCRマスターミックスは、Ampli Taq Gold (商標) DNAポリメラーゼ、AmplErase (商標) ウラシルN-グリコシラーゼ(UNG)、dUTPを含むdNTPs、受動的参照(passive Reference)1および最適化バッファー成分を含んだ。特異的プライマーおよびTaqManプローブは、Primer Express (商標) ソフトウェア(アプライドバイオシステムズ)で設計した。遺伝子特異的な標準曲線は、直線化pGEM-ThuGAPDH(完全長のヒトGAPDH cDNAを含む)またはpcDNA3.1(+)-hIGS43プラスミド(ICCG 4694)の1/10連続希釈( $10^8 \sim 10^2$  コピー/反応)で確立した。PCR反応はLight Cycler (商標) 装置中のガラス毛细管キュベット中で行った。50 で2分間の最初のインキュベーション(AmplErase UNG反応を行う)、続いて95 で10分間のAmpli Taq Gold (商標) DNAポリメラーゼの活性化を行った後、反応を以下のように50回循環した: 95 で15秒間の変性、そして60 で60秒間のアニーリング/伸長(GAPDHおよびIGS43の両方について)。サンプルの定量は、Light Cyclerソフトウェアバージョン3.0を使用して行った。

10

【0105】

【外1】

20

ヒトGAPDH mRNAの絶対発現レベルは、骨格筋( $\approx 7.4 \times 10^6$  コピー/ng poly(A)<sup>+</sup>RNA)、心臓( $\approx 2.3 \times 10^6$  コピー/ng poly(A)<sup>+</sup>RNA) および膵臓、脾臓、肝臓および胃(それぞれ $\approx 1 - 3 \times 10^5$  コピー/ng poly(A)<sup>+</sup>RNA)を除き、ほとんどの組織で $\approx 4 \times 10^5$  から $\approx 1.5 \times 10^6$  コピー/ng poly(A)<sup>+</sup>RNAの範囲であった(図1)。

【0106】

IGS43 mRNAは子宮で最も豊富に発現されることが分かった( $\pm 69,000$  コピー/ng mRNA)(図2)。重要なレベル(約10,000から20,000 コピー/ng mRNA)は、腎臓、肺、気管、結腸、小腸、胃、乳腺、前立腺および精巣でも見いだされた。比較的少ないレベルが、小脳および脊髄とは別に中枢神経系で見いだされた。

30

【0107】

【表2】

配列番号:7	IP15,332	5'-GGGGTACCATCACAGGTGTCCCTCTCTGC-3'
配列番号:8	IP15,333	5'-GCTCTAGAGCACGATTCCTGCCACTGCC-3'
配列番号:9	IP3,981	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3'
配列番号:10	IP3,982	5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'
配列番号:11	IP15,529	5'-GGTGAAGCAGGCGTCCG-3'
配列番号:12	IP15,531	5'-GACAAAGTGGTCGTTGAGGGC-3'
配列番号:13	IP 17,080	5'-CCTGGCCATGGTCTCCG-3'
配列番号:14	IP 17,081	5'-ACGATGGGCTTGGCGC-3'
配列番号:15	IP15,530 TaqManプローブ	5'(FAM)-TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACC-(TAMRA)3'
配列番号:16	IP 17,082 TaqManプローブ	5'(FAM)-CCGGCCCCCTTCCCCGAGT-(TAMRA)3'

10

20

## 【0108】

表4：使用したオリゴヌクレオチドプライマーおよびTaqmanプローブの全体像。実施例4 IGS43トランスフェクト細胞の構築

IGS43のリガンドを同定するために、チャイニーズハムスター卵母(CHO)細胞をIGS43オーファン受容体のcDNAで安定にトランスフェクトする。IGS43受容体のG-タンパク質共役メカニズムは未だに未知であるので、GPCRの「ユニバーサルアダプター」として知られているG-タンパク質G16(CHO-K1-G16、モレキュラーデバイス(Molecular Device))を発現する特異的なCHO-細胞種を使用する(Milligan G. et al. (1996) Trends Pharmacol. Sci. 17:235-7)。この細胞系もミトコンドリアを標的としてアポ-エクオリンを安定に発現する。

30

## 【0109】

材料には：IGS43-pcDNA3.1ベクター；SuperFectトランスフェクション試薬(キアジェン)；成長培地：10%ウシ胎児血清(FCS、ギブコBRL)、2mM L-グルタミン、ヒグロマイシンB 400µg/mlを補充したCHO-S-SFM II(ギブコ(Gibco)BRL)；選択-培地：10%FCS、2mM L-グルタミン、ヒグロマイシンB 400µg/mlおよびゲネチシン 500µg/mlを補充したCHO-S-SFM II(ギブコBRL)；RNeasy Miniキット(キアジェン)、DNase I(アンピオン(Ambion)、2U/µl)、SuperScript II(ギブコBRL)、SuperScript II 200U(ギブコBRL)を含む。

40

## 【0110】

CHO-K1-G16/mtAEQ細胞は、SuperFect(キアジェン)を用いて製造元に記載されたようにトランスフェクトする。トランスフェクションは24ウェルプレート中で行う。成長-培地中で24時間後、培地を取り出し、そして選択-培地と交換する。選択-培地中でコンフルエントになるまで成長させた後、ポリクロナルを24ウェルプレートに1回通す。

## 【0111】

50

ポリクローナルの選択は、Q-PCRにより行う。RNAは、モノクローナル(24ウェルプレートから1つのコンフルエントなウェル)をRNeasy Miniキット(キアジェン)を用いて供給されたプロトコールに従い単離する。RNAをDNase(アンピオン、2U/μl)で、サンプルあたり1Uで処理する。RNAサンプルの半分は、SuperScript II(ギブコ、BRL)を使用してRT-PCRに使用する。プライマーのアニーリングは、RNAおよびoligo-dT16(0,6μM)を用いて65~15で10分間行う。各0,43mMのdNTP、DTT 10mM、20U RNasin(プロメガ、40U/ml)およびSuperScript II 200U(ギブコ BRL、200U/μl)を含む第1鎖バッファー(ギブコ BRL)を30μlの最終容量になるまで加え、続いて42で1時間インキュベーションする。

10

## 【0112】

Q-PCRは、Q-PCRプライマーに特異的なIGS43受容体を用いて行う。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り各サイクル後に決定する。IGSの相対的発現レベルは、染色体DNAの4種の希釈の標準曲線と関連づける。相対的な定量をハウスキーピング遺伝子であるベータチューブリンに対して標準化する。

## 【0113】

2つの最高のポリクローナルを使用して、モノクローナルを得る。細胞は限界希釈にまく。モノクローナルの選択は先に記載したようにQ-PCRにより行う。6個の最高のモノクローナルをT75フラスコ中でコンフルエントになるまで成長させ、そして10%DMSOを含有する成長培地中で凍結する。

20

## 実施例5 リガンドの探査

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細胞は実施例4に記載したように成長させ、そして多数の化合物ライブラリーのスクリーニングに使用する。化合物は1または10μMの濃度で試験する。エクオリンのスクリーニングアッセイでは、ATP(10μM)またはジギトニン(50μM)を陽性対照として使用する。スクリーニングは、以下に記載するようにMicroBeta Jet1450(パーキンエルマー(Perkin Elmer))を使用して半自動的にを行う。

## 【0114】

いったん化合物が見い出されれば、シグナル活性を示すことは第2エクオリン実験で確認される。続いてそれらをさらに用量-依存の実験で特性決定する。

30

## 【0115】

IGS43受容体およびアポ-エクオリンを発現しているCHO-K1-G16細胞を使用してリガンドを見いだすことができなければ、G-タンパク質G16無しの対応する細胞を類似様式(実施例4を参照にされたい)で生育し、続いて化合物を試験する。

## 【表3】

表 1: 配列番号1のIGS43-DNA

```

5'
ATCACAGGTGTCCCTCTCTGCACCTGCGCAGATGTGCCCTGGCCTGAGCGAGGCCCGGA
ACTCTACAGCCGGGGCTTCTGACCATCGAGCAGATCGCGATGCTGCCGCCCTCCGGCCGT
CATGAACCTACATCTTCTGCTCCTCTGCCTGTGTGGCCTGGTGGGCAACGGGCTGGTCCT
CTGGTTTTTCGGCTTCTCCATCAAGAGGAACCCCTTCTCCATCTACTTCCCTGCACCTGGC
CAGCGCCGATGTGGGCTACCTCTTCAGCAAGCGGTGTTCTCCATCCTGAACACGGGGGG
CTTCTGGGCACGTTTGCCGACTACATCCGACGCGTGTGCCGGGTCTGGGGCTCTGTAT
GTTCCCTACCGCGGTGAGCCTCCTGCCGGCCGTGAGCGCCGAGCGCTGCGCCTCGGTCAT
CTTCCCGCCTGGTACTGGCGCCGGCGGCCCAAGCGCCTGTGCGCCGTGGTGTGCGCCCT
GCTGTGGGTCTGTCCCTCCTGGTCACCTGCCTGCACAACCTACTTCTGCGTGTCTCTGGG
CCGCGGGGCCCCCGGCGCGCCCTGCAGGCACATGGACATCTTCTGGGCATCCTCCTGTT
CCTGCTCTGCTGCCCGCTCATGGTGTGCCTGCCTGGCCCTCATCCTGCACGTPGGAGTG
CCGGCCCCGACGGCGCCAGCGCTCTGCCAAGCTCAACCACGTCATCCTGGCCATGGTCTC
CGTCTTCCCTGGTGTCCCTCCATCTACTTAGGATCGACTGGTTCCTCTTCTGGGTCTTCCA
GATCCCGCCCCCTTCCCCGAGTACGTCACTGACCTGTGCATCTGCATCAACAGCAGCGC
CAAGCCCATCGTCTACTTCCCTGGCCGGGAGGACAAGTCGCAGCGGCTGTGGGAGCCGCT
CAGGGTGGTCTTCCAGCGGGCCCTGCGGGACGGCGCTGAGCTGGGGGAGGCCGGGGCAG
CAGGCCAACACAGTCACCATGGAGATGCAGTGTCCCCCGGGGAACGCCTCCTGAGACTC
CAGCGCCTGGAGGAGGCAGTGGCAGGAATCGTGCTCC
-3'

```

10

【表 4】

20

表 2: 配列番号2のIGS43-タンパク質

```

MCPGLSEAPELYSRGFLTIEQIAMLPPAVMNYIFLLLCGLVGNGLVWFFGFSIKRN
PFSIYFLHLASADVGYLFSKAVFSILNTGGFLGTFADYIRSVCRVGLCMFLTGVSLLPA
VSAERCASVIFPAWYWRRRPKRLSAVVCALLWVLSLLVTVCLHNYFCVFLGRGAPGAACRH
MDIFLGIILLFLLCCPLMVLPLCALILHVECRARRRQORSAKLNHVILAMVSVFLVSSIYLG
IDWFLFWVFQIPAPFPEYVTDLCICINSSAKPIVYFLAGRDKSQRLWEPLRVVFQRALRD
GAELGEAGGSTPNTVTMEMQCPPGNAS

```

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

種々のヒト組織中のGAPDH mRNA発現のQ-PCR分析。報告された値(#コピー/ng mRNA)は、2回のQ-PCRアッセイの平均を表す(独立して調製されたcDNAについての各アッセイ)。mRNAは全RNAの2%を表し、そしてcDNA合成は100%の効率であったと予想された。真の効率は恐らく20~50%に近いので、実際のコピー数は2~5倍と低くなるだろう。“\*”を記した組織についてはpoly(A)<sup>+</sup>RNAを使用した。すべての他の組織は全RNAを使用した。

【図 2】

種々のヒト組織中のIGS43 mRNA発現のQ-PCR分析。報告された値(#コピー/ng mRNA)は、1回の測定である。mRNAは全RNAの2%を表し、そしてcDNA合成は100%の効率であったと予想された。真の効率は恐らく20~50%に近いので、実際のコピー数は2~5倍と低くなるだろう。“\*”を記した組織についてはpoly(A)<sup>+</sup>RNAを使用した。すべての他の組織は全RNAを使用した。

40

【表 5】

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

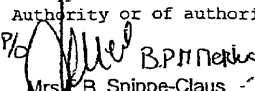
## INTERNATIONAL FORM

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

*name and address of depositor*

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

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Escherichia coli DH5alphaF' pGEM-ThtsGS43 (ICCG 4555)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 109714
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 30-08-2001 (date dd-mm-yy of the original deposit) 1	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on not applicable (date dd-mm-yy of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on not applicable (date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures Address: Uppsalaalaan 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): P/c  B.M. Nerkus Mrs. B. Snippe-Claus Dr. J.A. Stalpers Date (dd-mm-yy): 14-09-2001

20

30

1 Where Rule 5.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

Form BE/4 (sole page)

CBS/910

【表 6】

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

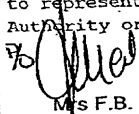
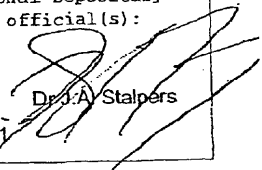
10

<b>I. DEPOSITOR</b>	<b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>
Name: Solvay Pharmaceuticals B.V. Intellectual Property Department  Address Postbus 900 1380 DA WEESP Nederland	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  CBS 109714  Date (dd-mm-yy) of the deposit or of the transfer: 1 30-08-2001
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
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

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures	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. A. Stalpers
Address Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 3508 AD UTRECHT The Netherlands	
Date (dd-mm-yy): 14-09-2001	

10

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

20

30

【 図 1 】

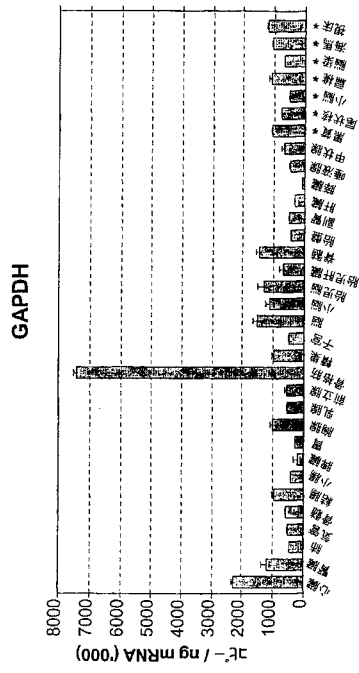


FIG. 1

【 図 2 】

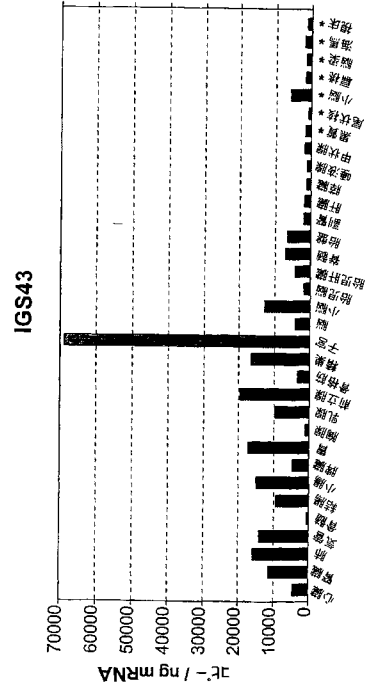


FIG. 2

## 【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  
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/28897 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/705 (74) Agent: VERHAGE, Marius, Octrooibureau Zoan B.V., P.O. Box 140, NL-1380 AC Weesp (NL).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/11319
- (22) International Filing Date: 28 September 2001 (28.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00203411.4 2 October 2000 (02.10.2000) EP  
60/237,394 4 October 2000 (04.10.2000) 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).
- (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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (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).
- 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

(57) Abstract: The present invention relates to the IGS43 G-protein coupled receptor family, and to polynucleotides encoding said IGS43 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 IGS43 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 IGS43 and the use of IGS43 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS43 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 IGS43 and the use of IGS43 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS43 receptor family in the treatment of dysfunctions, disorders, or diseases related to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord, and diagnostic assays for such conditions.

WO 02/28897 A2

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

1

**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 IGS43. 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 IGS43-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 IGS43.

**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  
20 referred to as proteins participating in pathways with G-proteins. Some examples of these 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.I., 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  $\alpha$  subunit of the G-protein causes the dissociation of the G-protein from the receptor and the dissociation of the G-protein into  $\alpha$  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 ( $\alpha$  subunit possesses an intrinsic GTPase activity),  
35 returns the G-protein to its basal, inactive form. The GTPase activity of the  $\alpha$  subunit is, in essence, an internal clock that controls an on/off switch. The GDP bound form of the  $\alpha$  subunit has high affinity for  $\beta\gamma$  and subsequent reassociation of  $\alpha$ GDP with  $\beta\gamma$  returns the system to the

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

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  $\alpha$ -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, neuropeptideY, somatostatin, neurotensin, neurokinin, capsaicin, VIP, CGRP, CRF, CCK, bradykinin, galanin, motilin, nociceptin, endothelin, cAMP, adenosine, muscarinic, acetylcholine, serotonin, histamine, thrombin, kinin, follicle stimulating hormone, opsin, endothelial differentiation gene-1, rhodopsin, odorant, and cytomegalovirus receptors.

15

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.

20

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  $\beta$ -adrenoreceptor, phosphorylation by protein kinase A and/or specific receptor kinases mediates receptor desensitization.

25

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).

30

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

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  $\alpha$ -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 IGS43 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 02/28897

PCT/EP01/11319

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 IGS43 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 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the invention relates to IGS43 polypeptides, polynucleotides and recombinant materials and methods for their production. Another aspect of the invention relates to methods for using such IGS43 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 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

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 IGS43 imbalance with the identified compounds. Yet another aspect of the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate IGS43 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 IGS43.

#### 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 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%,

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

5

actual copy numbers are likely underestimated 2-5 fold. For tissues marked with "\*", poly(A)<sup>+</sup> RNA was used whereas for all other tissues total RNA was used.

**Figure 2.** Q-PCR analysis of IGS43 mRNA expression in different human tissues.

- 5 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)<sup>+</sup> RNA was used whereas for all other tissues total RNA was used.

10

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

6

Table 1: IGS43-DNA of SEQ ID NO: 1

```
5'
5 ATCACAGGTGTCCCTCTCTGCACCTGGCCACATGTGCCCTGGCCTGAGCGAGGCCCGGA
ACTCTACAGCCGGGGCTTCCAGCCATCGAGCATGCGATGCTGGCCCTCCGGCCST
CATGAACATACATCTTCCCTGCTCCTCTGCTGTGGCCTGATGGGCAACCGGCTGTCTCT
CAGGTTTTTCGGCTTCCATCAAGAGGAACCCCTTCTCCATCTACTTCTGCACCTGGC
CAGCGCCGATGTGGGTACCTCTCAGCAAGCCGTGTTCCTCCATCTTGCACACGGGGGG
10 CTTCTGGGCACGTTTGGCGACTACATCCGCGCGTGTGCGCGGTCCGGGGCTGTGTAT
GTTCTTACCGCGGTGAGCCCTCCTGCGCGCGTCAAGCGCGGTGCGCGGTGGCTGGTCAT
CTTCCCGCCTGGTACTGGCGCCGGGGCCCAAGCGCTGTGCGCGTGGTGTGGCCCT
GCTGTGGGTCCCTGCTTCTGCTGACCTGGCTGCACACTACTTCTGGCTGTCTCTGGG
CGCGGGCCCCGGCGGGCCCTGAGGCACATGGACATCTTCCGGGATCTCTCTGTT
15 CCGCTCTGTGCGGCTCAGGTCTGTGCTTGGCTTGGCCCTCATCCGACGTGAGTGG
CGGGCCGACGGCGCCAGCGCTCTGCGAGCTCAGCAGTCTCTGCGCAGTCTC
CGTCTTCCGTGGTGTCCCGCATCTACTAGGGATCGACTGCTCTCTCTGGGTCTCCA
GATCCCGGCCCTTCCCGAGTACGTACATGACCTGTGATCTGCATCAACAGCGCGC
CAGCCCATCGTCTACTTCTGGCCGGGAGGACAGTGCAGCGGCTGTGGGAGCCGT
20 CAGGTTGTCTTCCAGCGGGCCCTGGGAGCGGCTGAGCTGGGGGAGGCCGGGGCAG
CAGGCCAACACAGTACCATGAGATGCAGTGTCCCGGGGACGCTCTGAGACTC
CAGCGCTGGAGAGGCAGTGGCAGGAATCGTGCTCC
-3'
```

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

7

Table 2: IGS43-protein of SEQ ID NO: 2

5 MCGLSSEAFELYSRGFLTIEQIAMLPPAVWNYIFLLCLOGLVGNGLVLFVFGFSIKEN  
PFSIYFLHLASADVGYLFSKAVFSILNMGFLGTFADYIRSVCRVGLCMFLTGVSLLPA  
VSAERCASVIFPAWYRRRKRKLSAVVCALLWVLSLVTCLEHNYFCVELGRGAPGAACRH  
MDIFLGILLFLCCELMVLECLALILHVECRARRRQRSAKLNHYILAMVSVPLVSSIYLG  
IDWFLFWVFQIPAPFEDYVTDLCICINSSAKPIVYFLAGRDEKSQLWEPLRVVFORALRD  
GARLGEAGGSTPNTVITMEMQCPGNAS

10

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

8

**DESCRIPTION OF THE INVENTION**

Structural and chemical similarity, in the context of sequences and motifs, exists among the IGS43 GPCR of the invention and other human GPCR's. In addition, IGS43 is expressed in  
5 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord. Therefore, IGS43 is implied to play a role among other things in the Diseases mentioned above. IGS43 in particular is implied to play a role in dysfunctions, disorders, or diseases related to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and  
10 spinal cord.

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  
15 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.

**20 Definitions**

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

25 "IGS43" refers, among others, to a polypeptide consisting of 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 IGS43 including similar activities or improved activities or these  
30 activities with decreased undesirable side effects. Also included are antigenic and immunogenic activities of said IGS43.

"IGS43-gene" refers to a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or respective Variants, e.g. allelic Variants, thereof and/or their complements.  
35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

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 polydeoxiribonucleotide, 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 02/28897

PCT/EP01/11319

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 posttranslational 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, selenoylation, 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) 663:48-62.

"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 02/28897

PCT/EP01/11319

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 IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and SEQUENCE

10 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 02/28897

PCT/EP01/11319

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 IGS43 polypeptides (including IGS43 proteins). The IGS43 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 109714; 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 109714 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 109714 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 IGS43 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 109714 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 IGS43 polypeptides exhibit at least one biological activity of the receptor.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

13

Particularly preferred is an isolated IGS43 polypeptide consisting of an amino acid sequence which is at least 95.5% 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 109714 at the  
5 Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.

In an additional embodiment of the invention, the IGS43 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  
10 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 IGS43 polypeptides are also included in the invention. A fragment is a  
15 polypeptide having an amino acid sequence that is the same as part of, but not all of, the amino acid sequence of the aforementioned IGS43 polypeptides. As with IGS43 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  
20 number 1-20; 21-40, 41-80, 81-80, 81-100; and 101 to the end of IGS43 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  
25 sequence of IGS43 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  
30 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  
35 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.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

14

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 109714 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 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.

The IGS43 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.

#### 20 Polynucleotides of the Invention

A further aspect of the invention relates to IGS43 polynucleotides. IGS43 polynucleotides include isolated polynucleotides which encode the IGS43 polypeptides and fragments, and polynucleotides closely related thereto. More specifically, the IGS43 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 IGS43 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands).

IGS43 polynucleotides further include polynucleotides comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity over its entire length to a nucleotide sequence encoding the IGS43 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (the Netherlands).

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

15

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 IGS43 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at 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 IGS43 polynucleotides.

10

Particularly preferred is an isolated IGS43 polynucleotide selected from the group consisting of:

1. a nucleotide sequence encoding the IGS43 polypeptide according to SEQ ID NO: 2;
2. a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
3. a nucleotide sequence having at least 95.5 % (preferably at least 96%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
4. a nucleotide sequence which is complimentary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).

20

IGS43 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 with the rat GPCR RTA (85% identities over 327 aligned residues; Swissprot accession no P23749). In the patent literature the application EP1067182 Seq Id 322 gives a protein for a probable G-protein coupled receptor. This protein is 16 amino acids longer, but otherwise identical to the IGS43 protein. Thus, IGS43 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.

30

Polynucleotides of the invention can be obtained from natural sources such as genomic 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).

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

16

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).

5 The nucleotide sequence encoding the IGS43 polypeptide of SEQ ID NO:2 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in SEQ ID NO:1 (nucleotide number 32 to 1012), 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.

10

When the polynucleotides of the invention are used for the recombinant production of the IGS43 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. 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 Gertz 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.

Further preferred embodiments are polynucleotides encoding IGS43 variants comprising the amino acid sequence of the IGS43 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.

25 The polynucleotides of the invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter IGS43-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 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.

35

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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

17

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.

5

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 IGS43 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 IGS43 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 at least 30 nucleotides and may have at least 50 nucleotides. Particularly preferred probes will range between 30 and 50 nucleotides.

10

15

One embodiment, to obtain a polynucleotide encoding the IGS43 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.

20

25

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.

30

#### Vectors, Host Cells, Expression

35

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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

18

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.

- 5 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
- 10 transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.
- 15 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; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.
- 20 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 plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such
- 25 as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid 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
- 30 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 example, those set forth in Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra).
- 35 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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

19

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 IGS43 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 be harvested prior to use in the screening assay. In case the affinity or functional activity of the IGS43 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 IGS43 polypeptide and the relevant RAMP prior to use in screening assays is required. If the IGS43 polypeptide is secreted into the medium, the 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 IGS43 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 IGS43 polypeptide and homogenization of the cells by a method such as, but not limited to, potting. The membranes may be recovered by washing the suspension one or several times.

IGS43 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

This invention also relates to the use of IGS43 polynucleotides for use as diagnostic reagents. Detection of a mutated form of the IGS43 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 IGS43. 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 IGS43 gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques.

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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

20

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 IGS43 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 IGS43 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)).

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 IGS43 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 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord, through detection of mutation in the IGS43 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 IGS43 polypeptide or IGS43 mRNA. In particular dysfunctions, disorders, or diseases related to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord, can be diagnosed by methods comprising determining from a sample derived from a subject an abnormally decreased or increased level of the IGS43 polypeptide or IGS43 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 IGS43, in a sample

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

21

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 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

The kit may comprise:

- 10 (a) an IGS43 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 IGS43 polypeptide, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof; and/or
  - 15 (d) an antibody to an IGS43 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 IGS43 polypeptide.
- 20 It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) (d) or (e) may comprise a substantial component.

#### Chromosome Assays

25 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 gene associated disease. Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal

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

35 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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

22

individuals but not in any normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

#### Antibodies

5

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 antibodies immunospecific for the IGS43 polypeptides. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantial greater affinity for the polypeptides of the invention than their

10

affinity for other related polypeptides in the prior art.

Antibodies generated against the IGS43 polypeptides may be obtained by administering 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

15

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).

20

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

Antibodies against IGS43 polypeptides as such, or against IGS43 polypeptide-RAMP complexes, may also be employed to treat among other things the Diseases as mentioned above. In particular, antibodies against IGS43 polypeptides as such, or against IGS43 polypeptide-RAMP complexes, may be employed to treat dysfunctions, disorders, or diseases related to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

25

30

#### Animals

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 IGS43. Non-human animal-based model systems may also be used to further characterize the activity of the IGS43 gene. Such systems may be utilized as part of screening strategies designed to identify compounds which are capable to treat IGS43 based disorders such as among other things the Diseases as

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

23

mentioned above. In particular, the systems may be utilized as part of screening strategies designed to identify compounds which are capable of treating IGS43 based dysfunctions, disorders, or diseases related to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

5

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 IGS43. In addition such animal models may be used to determine the LD<sub>50</sub> and the ED<sub>50</sub> in animal subjects. These data may be used to determine the *in vivo* efficacy of potential IGS43 disorder treatments.

10

Animal-based model systems of IGS43 based disorders, based on aberrant IGS43 expression or activity, may include both non-recombinant animals as well as recombinantly engineered transgenic animals.

15

Animal models for IGS43 disorders may include, for example, genetic models. Animal models exhibiting IGS43 based disorder-like symptoms may be engineered by utilizing, for example, IGS43 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, IGS43 sequences may be introduced into, and overexpressed and/or misexpressed in, the genome of the animal of interest, or, if endogenous IGS43 sequences are present, they may either be overexpressed, misexpressed, or, alternatively, may be disrupted in order to underexpress or inactivate IGS43 gene expression.

20

In order to overexpress or misexpress a IGS43 gene sequence, the coding portion of the IGS43 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.

25

For underexpression of an endogenous IGS43 gene sequence, such a sequence may be isolated and engineered such that when reintroduced into the genome of the animal of interest, the endogenous IGS43 gene alleles will be inactivated, or "knocked-out". Preferably, the engineered IGS43 gene sequence is introduced via gene targeting such that the endogenous IGS43 sequence is disrupted upon integration of the engineered IGS43 gene sequence into the animal's genome.

30

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

24

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 IGS43 related disorders.

5 Any technique known in the art may be used to introduce a IGS43 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 10 56:313-321, 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.

The present invention provides for transgenic animals that carry the IGS43 transgene in 15 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. 20 (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.

25 When it is desired that the IGS43 transgene be integrated into the chromosomal site of the endogenous IGS43 gene, gene targeting is preferred. Briefly, when such a technique is to be utilized, vectors containing some nucleotide sequences homologous to the endogenous IGS43 gene of interest (e.g., nucleotide sequences of the mouse IGS43 gene) are designed for the purpose of integrating, via homologous recombination with chromosomal sequences, into and 30 disrupting the function of, the nucleotide sequence of the endogenous IGS43 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 35 interest, and will be apparent to those of skill in the art.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

25

Once transgenic animals have been generated, the expression of the recombinant IGS43 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 IGS43 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 IGS43 transgenic animals that express IGS43 gene mRNA or IGS43 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 IGS43 based disorder symptoms.

Once IGS43 transgenic founder animals are produced (*i.e.*, those animals which express IGS43 proteins in cells or tissues of interest, and which, preferably, exhibit symptoms of IGS43 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: 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 IGS43 transgenics that express the IGS43 transgene of interest at higher levels because of the effects of additive expression of each IGS43 transgene; crossing of heterozygous transgenic animals to produce animals homozygous for a given integration site in order to both augment expression and eliminate the 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 IGS43 transgene and the development of IGS43-like symptoms. One such approach is to cross the IGS43 transgenic founder animals with a wild type strain to produce an F1 generation that exhibits IGS43 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

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 IGS43 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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

26

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 IGS43 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 to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

Yet another aspect of the invention relates to a method of inducing immunological response in a mammal which comprises delivering the IGS43 polypeptide via a vector directing expression of the IGS43 polynucleotide in vivo in order to induce such an immunological response to produce antibody to protect said animal from diseases.

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 IGS43 polypeptide wherein the composition comprises an IGS43 polypeptide or IGS43 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 IGS43 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.

#### Screening Assays

The IGS43 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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

27

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.

5

IGS43 polypeptides are responsible for biological functions, including pathologies. Accordingly, it is desirable to find compounds and drugs which stimulate IGS43 on the one hand and which can inhibit the function of IGS43 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 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

10

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 uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord.

15

20

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.

25

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.

30

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

28

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.

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 IGS43 polypeptide to form a mixture, measuring the IGS43 activity in the mixture, and comparing the IGS43 activity of the mixture to a standard.

The IGS43 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 IGS43 mRNA and protein in cells. For example, an ELISA may be constructed for measuring secreted or cell associated levels of IGS43 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 IGS43 (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 IGS43 antagonists include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligand of the IGS43, 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.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

29

Thus in another aspect, the present invention relates to a screening kit for identifying agonists, antagonists, ligands, receptors, substrates, enzymes, etc. for IGS43 polypeptides; or compounds which decrease, increase and/or otherwise enhance the production of IGS43 polypeptides, which comprises:

- 5 (a) an IGS43 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;  
(b) a recombinant cell expressing an IGS43 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;  
(c) a cell membrane expressing an IGS43 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;  
or  
10 (d) antibody to an IGS43 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO: 2.

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

#### 15 Prophylactic and Therapeutic Methods

This invention provides methods of treating abnormal conditions related to both an excess and insufficient amounts of IGS43 activity.

10 If the activity of IGS43 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 IGS43, or by inhibiting interaction with a RAMP polypeptide or a second signal, and thereby alleviating the abnormal condition.

25 In another approach, soluble forms of IGS43 polypeptides still capable of binding the ligand in competition with endogenous IGS43 may be administered. Typical embodiments of such competitors comprise fragments of the IGS43 polypeptide.

30 In still another approach, expression of the gene encoding endogenous IGS43 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 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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

30

or modified backbones. Examples of the latter include methylphosphonate, phosphorothioate or 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.

In addition, expression of the IGS43 polypeptide may be prevented by using ribozymes specific to the IGS43 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), 527-33.) Synthetic ribozymes can be designed to specifically cleave IGS43 mRNAs at selected positions thereby preventing translation of the IGS43 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 IGS43 and its activity, several approaches are also available. One approach comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound which activates IGS43, 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 IGS43 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.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

31

**Formulation and Administration**

Peptides, such as the soluble form of IGS43 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.

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

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 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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of 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.

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 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 genomic sequence (accession n° AC019124) which potentially encoded a novel G-protein coupled receptor (GPCR). We refer to this novel GPCR as IGS43. It was decided to investigate whether this genomic sequence represented a functional gene by trying to clone its cDNA from human tissues. 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 protocol recommended by the supplier of these enzymes. PCR primers were designed to amplify the putative IGS43 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 polyA (+) testis RNA) using the HotStarTaq™ DNA polymerase (Qiagen # 203203) with forward and reverse primers IP14,923 (SEQ ID NO:3) and IP14,925 (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 (94°C, 30 sec), annealing (55°C, 30 sec) and extension (72°C, 90 sec). There was a final elongation for 10 min at 72°C. 2.5 µl of the primary PCR reaction was used as a template in a secondary PCR reaction using the Qiagen HotStarTaq™ DNA polymerase (Qiagen # 203203) with the nested forward and reverse primers IP14,924 (SEQ ID NO:5) and IP14,926 (SEQ ID NO:6) respectively. Cloning sites were added to the nested primers to allow convenient subcloning afterwards. Cycling conditions for the nested PCR reaction were identical to those of the primary PCR, except that only 30 cycles were carried out. PCR reaction products were analysed via agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The primary PCR reaction products showed up on gel as a smear of several bands. The nested PCR reaction however produced a strong distinct DNA fragment of approximately 1050 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 1050 bp fragment originated from cDNA. The ± 1050 bp fragment was purified from gel using the QIAEX™ II purification kit (Qiagen) and ligated into the pGEM-T vector according to the procedure recommended by the supplier (pGEM-T system, Promega). The recombinant plasmids were then used to transform competent 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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

33

Reaction kit (PE Applied Biosystems) using insert flanking and internal (IGS43 specific) primers. Cycle sequencing reaction products were purified via EtOH/NaOAc precipitation and loaded on an ABI 377 automated sequencer (PE Applied Biosystems). Clone HB6127 contained a DNA sequence of 1057 bp, encoding a protein of 327 amino acids. We refer to this DNA sequence and the encoded protein as IGS43DNA (SEQ ID NO:1) and IGS43PROT (SEQ ID NO:2) respectively. The IGS43DNA sequence was 97% identical to the stretch initially identified within the AC019124 genomic sequence (24 mismatches were found over 1057 aligned nucleotides). This is likely due to the fact that the sequence data of AC019124 were only of draft quality. For the IGS43PROT 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 IGS43PROT sequence was most similar with the rat GPCR RTA (85 % identities over 327 aligned residues; Swissprot accession n° P23749). In the patent literature the application EP1067182 Seq Id 322 gives a protein for a probable G-protein coupled receptor. This protein is 16 amino acids longer, but otherwise identical to the IGS43 protein.

SEQ ID NO:3	IP14,923	5'-GCTCCACAGCCACTGCCTTACAGAC-3'
SEQ ID NO:4	IP14,925	5'-CACAGTCCCAGGGAGAAGAAGGC-3'
SEQ ID NO:5	IP14,924	5'-AC <u>GGATTC</u> ATCACAGGTGTCCCTCTGTGC-3'
SEQ ID NO:6	IP14,926	5'-AGA <u>AAGCTT</u> GGAGCACGATTCCTGCCACTGC-3'

Table 3: Overview of the oligonucleotide primers that were used to clone IGS43 cDNA. Cloning sites (intended BamHI restriction site for IP14,924 and HindIII restriction site for IP14,926) that were added to the nested primers are underlined. Due to an error in the design of the BamHI restriction site within primer IP14,924 ["GGATTC" instead of "GGATCC"], this BamHI restriction site is not functional.

**EXAMPLE 2 Construction of the mammalian expression vector pcDNA3.1(-)hIGS43.**

5 The E. coli bacterial strain HB6127 harboring plasmid pGEM-TshIGS43, which contained the complete coding sequence of the human IGS43 protein was recloned after replating on LB agar plates (containing 100 µg ampicillin/ml) and deposited both in Innogenetics' bacterial strain collection (ICCG 4555) and at the "Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)" at Utrecht, The Netherlands (accession n° 109714). Plasmid DNA prepared from the recloned isolate was resequenced and found to be identical to the IGS43DNA consensus sequence determined previously.

10 A ± 1070 bp DNA fragment containing the complete IGS43 coding sequence, was PCR-amplified from the pGEM-TshIGS43 plasmid template using oligonucleotide primers IP15,332 (SEQ ID NO:7) and IP15,333 (SEQ ID NO:8). At the 5' end oligonucleotides IP15,332 (SEQ ID NO:7) and IP15,333 (SEQ ID NO:8) contained KpnI and XbaI cloning sites respectively. The amplified PCR fragment was KpnI/XbaI digested and purified from gel. The pcDNA3.1(+)

15 plasmid expression vector (Invitrogen) was digested with KpnI/XbaI and the linearized 5362 bp vector fragment was purified from gel. The linearized plasmid vector and the PCR fragment were ligated and the ligation mixture was transformed into competent E. coli strain DH5αF' bacteria by heat shock. Transformed bacteria 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 DNA sequence analysis. One clone was deposited in Innogenetics' bacterial culture collection as ICCG 4694 (harboring plasmid pcDNA3.1(+)-hIGS43).

20 DNA sequence analysis of plasmid DNA pcDNA3.1(+)-hIGS43 prepared from strain ICCG 4694 showed that the insert was completely identical to the IGS43DNA consensus cDNA sequence.

**30 EXAMPLE 3 Expression analysis of IGS43 mRNA in different human tissues via quantitative PCR (Q-PCR).**

Absolute expression levels of human GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and IGS43 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

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

35

gene GAPDH were measured as a control for the efficiency of cDNA synthesis and PCR 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)<sup>+</sup> 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 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)<sup>+</sup> RNA) was annealed to 2.5 µg oligo(dT) (Life Technologies # 18418-012) and subjected to reverse transcription using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen; 100 µl reaction volume; 1h at 37°C) (= RT<sup>-</sup>-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<sup>-</sup>-reaction).

As a control for the absence of genomic DNA in the RT<sup>-</sup> reactions of the total RNA samples a PCR amplification reaction specific for human  $\beta_2$ -microglobulin DNA was performed. The PCR reaction was carried out in a 25 µl reaction volume containing 2.5 µl GeneAmp<sup>TM</sup> 10x PCR buffer (Applied Biosystems), 200 µM each of dNTP, 0.5 µl of the RT<sup>-</sup> cDNA synthesis reaction, 5 pmol each of PCR primers IP3,981 (SEQ ID NO:9) and IP3,982 (SEQ ID NO:10) and 1.25 U AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNA polymerase (Applied Biosystems cat# N808-0244). After an initial 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 from the negative control (H<sub>2</sub>O) nor from the RT<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> poly(A)<sup>+</sup> RNA samples were analyzed for the presence of genomic DNA via GAPDH specific Q-PCR using 0.8 µl of the RT<sup>-</sup> cDNA 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 µl reaction volume containing 1x TaqMan<sup>TM</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems cat# 4304437), 0.12 mg BSA/ml, 900 nM of either GAPDH or IGS43 specific forward and reverse primers (IP15,529 [SEQ ID NO:11] / IP15,531 [SEQ ID NO:12] for GAPDH and IP17,080 [SEQ ID NO:13] / IP 17,081 [SEQ ID NO:14] for IGS43), 250 nM of the gene specific TaqMan probe (IP15,530 [SEQ ID NO:15] for GAPDH and IP 17,082 [SEQ ID NO:16] for IGS43 respectively) and 1.6 µl of the total RNA RT<sup>-</sup>

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

36

or poly(A)<sup>+</sup> RT<sup>-</sup> cDNA synthesis reaction. The 1x TaqMan<sup>™</sup> Universal PCR Master Mix contained AmpliTaq Gold<sup>™</sup> DNA polymerase, AmpErase<sup>™</sup> 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<sup>™</sup> software (Applied Biosystems). Gene specific standard curves were established on a 1/10 dilution series (10<sup>8</sup> to 10<sup>2</sup> copies/reaction) of linearized pGEM-ThuGAPDH (containing full length human GAPDH cDNA) or pcDNA3.1(+)-hIGS43 plasmid (ICCG 4694). PCR reactions were carried out in glass capillary cuvettes in the Light Cycler<sup>™</sup> 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<sup>™</sup> 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 IGS43). 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  $\approx 1.5 \times 10^9$  copies/ng poly(A)<sup>+</sup> RNA in most tissues except in skeletal muscle ( $\approx 7.4 \times 10^8$  copies/ng poly(A)<sup>+</sup> RNA), heart ( $\approx 2.3 \times 10^8$  copies/ ng poly(A)<sup>+</sup> RNA) and in pancreas, spleen, liver and stomach (ranging between  $\approx 1\text{-}3 \times 10^8$  copies/ ng poly(A)<sup>+</sup> RNA respectively) (Fig.1).

IGS43 mRNA was found to be most abundantly expressed in uterus ( $\pm 69,000$  copies/ ng mRNA) (Fig.2). Important levels (between approximately 10,000 and 20,000 copies/ ng mRNA) were also found in kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate and testis. Relatively minor levels were found in the central nervous system apart from cerebellum and spinal cord.

SEQ ID NO:7	IP15,332	5'-GGGGTACCATCACAGGTGCCCTCTCTGC-3'
SEQ ID NO:8	IP15,333	5'-GCTCTAGAGCACGATTCTGCCACTGCC-3'
SEQ ID NO:9	IP3,981	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAAGTC-3'
SEQ ID NO:10	IP3,982	5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'
SEQ ID NO:11	IP15,529	5'-GGTGAAGCAGGCGTCGG-3'
SEQ ID NO:12	IP15,531	5'-GACAAAGTGGTCGTTGAGGGC-3'
SEQ ID NO:13	IP 17,080	5'-CCTGGCCATGGTCTCCG-3'

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

37

SEQ ID NO:14	IP 17,081	5'-ACGATGGGCTTGGCGC-3'
SEQ ID NO:15	IP16,530 TaqMan probe	5'(FAM)-TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACC-(TAMRA)3'
SEQ ID NO:16	IP 17,082 TaqMan probe	5'(FAM)-CCGGCCCCCTTCCCCGAGT-(TAMRA)3'

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

5

**EXAMPLE 4 Construction of IGS43 transfected cells.**

To identify ligands for IGS43, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are stably transfected with cDNA of the IGS43 orphan receptor. Since the G-protein coupling mechanism of IGS43 receptor is still unknown, a specific CHO-cell strain is used, which expresses the G-protein  $G\alpha_{16}$  (CHO-K1- $G\alpha_{16}$ , 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 the mitochondrially targeted apo-aequorin.

The Materials include: IGS43-pcDNA3.1 vector; SuperFect Transfection Reagent (Qiagen); Growth-medium: CHO-S-SFM II (Gibco BRL), supplemented with 10% Foetal Calf Serum (FCS, Gibco BRL), 2mM L-glutamin, Hygromycin B 400 $\mu$ g/ml; Selection-medium: CHO-S-SFM II (Gibco BRL), supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamin, Hygromycin B 400 $\mu$ g/ml and Geneticin 500 $\mu$ g/ml; RNeasy Mini Kit (Qiagen), DNase I (Ambion, 2 U/ $\mu$ l), SuperScript II (Gibco BRL), SuperScript II 200U (Gibco BRL).

CHO-K1- $G\alpha_{16}$ /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.

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/ $\mu$ l), 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  $\mu$ M) 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/ $\mu$ l) and SuperScript II 200U

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

38

(Gibco BRL, 200U/ $\mu$ l) to a final volume of 30  $\mu$ l are added, followed by incubation at 42°C for 1 hour.

Q-PCR is carried out with IGS43 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.

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% DMSO.

#### 15 EXAMPLE 5 Ligand finding.

CHO-K1-G $\alpha$ 16-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  $\mu$ M. In the aequorin screening assay ATP (10  $\mu$ M) or digitonin (50  $\mu$ M) is used as a positive control. Screening is performed semi-automatically using a MicroBeta Jet 1450 (Perkin Elmer) as described below.

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-G $\alpha$ 16 cells expressing IGS43 receptor and apo-aequorin a corresponding cell line without G-protein G $\alpha$ 16 can be developed in a similar way (see Example 4) followed by testing compounds.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

39

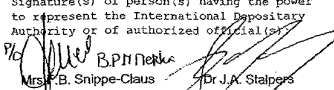
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## INTERNATIONAL FORM

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

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

*name and address of depositor*

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Escherichia coli DH5alphaF' pGEM-TslGS43 (ICCG 4555)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 109714
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
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>	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depositary accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 30-08-2001 (date dd-mm-yy of the original deposit) 1	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on not applicable (date dd-mm-yy of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on not applicable (date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures Address: Uppsalsalaan 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)  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 02/28897

PCT/EP01/11319

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

*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

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 109714  Date (dd-mm-yy) of the deposit or of the transfer: 1      30-08-2001
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 03-09-2001 <sup>2</sup> . On that date (dd-mm-yy), the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable	

<sup>1</sup> 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).

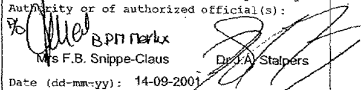
<sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

<sup>3</sup> Mark with a cross the applicable box.

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

41

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED <sup>4</sup>	
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):
Address: Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 3508 AD UTRECHT The Netherlands	 B.P.M. Marx F.B. Snippe-Claus Date (dd-mm-yy): 14-09-2001

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

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

42

## Claims

1. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- 5 a) a nucleotide sequence encoding the IGS43 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
- 10 c) a nucleotide sequence having at least 95.5 % (preferably at least 96%) 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).
- 15 2. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- a) a nucleotide sequence encoding the IGS43 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
- 20 c) a nucleotide sequence having at least 96 % (preferably at least 97%) 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).
- 25 3. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- a) a nucleotide sequence encoding the IGS43 polypeptide according to SEQ ID NO: 2;
- 30 b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 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 97 % (preferably at least 98%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
- 35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

43

- d) a nucleotide sequence which is complimentary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).
4. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- 5 a) a nucleotide sequence encoding the IGS43 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), in particular a nucleotide sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
- 10 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).
- 15 5. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide consists of the nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1 encoding the IGS43 polypeptide of SEQ ID NO:2.
- 20 6. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide consists of a nucleotide sequence that is at least 95.5% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 25 7. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide consists of a nucleotide sequence that is at least 96% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 30 8. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide consists of a nucleotide sequence that is at least 97% identical to that of SEQ ID NO:1 or to the sequence of the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

44

9. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide consists of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
10. The polynucleotide of any one of claims 1 to 4 wherein said polynucleotide consists of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands).
12. The polynucleotide of any one of claims 1 to 11 which is DNA or RNA.
13. A hybridization probe consisting of the polynucleotide of any one of claims 1 to 4.
14. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS43 polypeptide consisting of an amino acid sequence, which has at least 95.5% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
15. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS43 polypeptide consisting of an amino acid sequence, which has at least 96% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.
16. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS43 polypeptide consisting of an amino acid

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

45

sequence, which has at least 97% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 or with the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.

5

17. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS43 polypeptide consisting of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.

10

18. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression system is capable of producing an IGS43 polypeptide consisting of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), when said expression system is present in a compatible host cell.

15

20 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

25

22. IGS43 receptor membrane preparation derived from a cell according to any one of claims 19 to 21.

23. A process for producing an IGS43 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.

30

24. A process for producing a cell which produces an IGS43 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 IGS43 polypeptide.

35

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

46

25. An IGS43 polypeptide consisting of an amino acid sequence which is at least 95.5% 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 5
26. An IGS43 polypeptide consisting of an amino acid sequence which is at least 96% 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 10
27. An IGS43 polypeptide consisting of an amino acid sequence which is at least 97% 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 15
28. An IGS43 polypeptide consisting of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 20
29. An IGS43 polypeptide consisting of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) over its entire length.
- 25
30. The polypeptide of any one of claims 25 to 29 which consists of 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands).
- 30
31. An antibody immunospecific for the IGS43 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 IGS43 polypeptide receptor of any one of claims 25 to 30 comprising:
- 35 (a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an agonist to said receptor; and/or

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

47

- 5 (b) providing to the subject an isolated polynucleotide consisting of a nucleotide sequence that has at least 95.5% identity to a nucleotide sequence encoding the IGS43 polypeptide of SEQ ID NO:2 or the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 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.
- 10 33. A method for the treatment of a subject having need to inhibit activity or expression of IGS43 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
- (b) administering to the subject a polynucleotide that inhibits the expression of the nucleotide sequence encoding said receptor; and/or
- 15 (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 IGS43 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 IGS43 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 IGS43 polypeptide expression in a sample derived from said subject.
- 30 35. A method for identifying agonists to the IGS43 polypeptide of any one of claims 25 to 30 comprising:
- (a) contacting a cell which produces a IGS43 polypeptide with a test compound; and
- (b) determining whether the test compound effects a signal generated by activation of the IGS43 polypeptide.
- 35 36. An agonist identified by the method of claim 35.
37. A method for identifying antagonists to the IGS43 polypeptide of any one of claims 25 to 30 comprising:

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

48

- (a) contacting a cell which produces a IGS43 polypeptide with an agonist; and  
(b) determining whether the signal generated by said agonist is diminished in the presence of a candidate compound.
- 5 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 expressing an IGS43 polypeptide.
- 10 40. A method of creating a genetically modified non-human animal comprising the steps of:
- a) ligating the coding portion of a polynucleotide consisting 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands) to a regulatory sequence which is capable of driving high level  
15 gene expression or expression in a cell type in which the gene is not normally expressed in said animal; or
- b) engineering the coding portion of a polynucleotide consisting 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), 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 109714 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Utrecht (The Netherlands), are fully or partially  
20 inactivated.
- 25
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 acceptable carrier.
- 30
42. Use of:
- (a) a therapeutically effective amount of an agonist to the IGS43 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30; and/or  
35 (b) an isolated polynucleotide consisting of a nucleotide sequence that has at least 95.5% identity to a nucleotide sequence encoding the IGS43 polypeptide of SEQ ID NO:

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

49

- 2 or the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 109714 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 IGS43 receptor polypeptide, in need of enhanced activity or expression of IGS43 polypeptide of any one of claims 25 to 30.
43. Use of:
- 10 (a) a therapeutically effective amount of an antagonist to the IGS43 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 IGS43 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30; and/or
- 15 (c) a therapeutically effective amount of a polypeptide that competes with the IGS43 receptor polypeptide of any one of claims 25 to 30 for its ligand,
- for the preparation of a medicament for the treatment of a subject suffering from a disease related to expression or activity of the IGS43 receptor polypeptide, having need to inhibit activity or expression of IGS43 polypeptide of any one of claims 25 to 30.







WO 02/28897

PCT/EP01/11319

2/7

tgg cgc cgg cgg ccc aag cgc ctg tgc gcc gtg gtg tgc gcc ctg ctg 484  
 Trp Arg Arg Arg Pro Lys Arg Leu Ser Ala Val Val Cys Ala Leu Leu  
 140 145 150

5 tgg gtc ctg tcc ctc ctg gtc acc tgc ctg cac aac tac ttc tgc gtg 532  
 Trp Val Leu Ser Leu Leu Val Thr Cys Leu His Asn Tyr Phe Cys Val  
 155 160 165

10 ttc ctg gcc cgc ggg gcc ccc ggc gcg gcc tgc agg cac atg gac atc 580  
 Phe Leu Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ala Ala Cys Arg His Met Asp Ile  
 170 175 180

15 ttc ctg gcc atc ctc ctg ttc ctg ctc tgc tgc ccg ctc atg gtg ctg 628  
 Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Leu Cys Cys Pro Leu Met Val Leu  
 185 190 195

20 ccc tgc ctg gcc ctc atc ctg cac gtg gag tgc cgg gcc cga cgg cgc 676  
 Pro Cys Leu Ala Leu Ile Leu His Val Glu Cys Arg Ala Arg Arg Arg  
 200 205 210 215

25 cag cgc tct gcc aag ctc aac cac gtc atc ctg gcc atg gtc tcc gtc 724  
 Gln Arg Ser Ala Lys Leu Asn His Val Ile Leu Ala Met Val Ser Val  
 220 225 230

30 gtc ttc cag atc ccg gcc ccc ttc ccc gag tac gtc act gac ctg tgc 820  
 Val Phe Gln Ile Pro Ala Pro Phe Pro Glu Tyr Val Thr Asp Leu Cys  
 250 255 260

35 atc tgc atc aac agc agc gcc aag ccc atc gtc tac ttc ctg gcc ggg 868  
 Ile Cys Ile Asn Ser Ser Ala Lys Pro Ile Val Tyr Phe Leu Ala Gly  
 265 270 275

40 agg gac aag tcg cag cgg ctg tgg gag ccg ctc agg gtg gtc ttc cag 916  
 Arg Asp Lys Ser Ser Gln Arg Leu Trp Glu Pro Leu Arg Val Val Phe Gln  
 280 285 290 295

45 cgg gcc ctg cgg gac gcc gct gag ctg ggg gag gcc ggg gcc agc acg 964  
 Arg Ala Leu Arg Asp Gly Ala Glu Leu Gly Glu Ala Gly Gly Ser Thr  
 300 305 310

50 ccc aac aca gtc acc atg gag atg cag tgt ccc ccg ggg aac gcc tcc 1012  
 Pro Asn Thr Val Thr Met Glu Met Gln Cys Pro Pro Gly Asn Ala Ser  
 315 320 325

55 tgagaatcca gcgctggag gaggcagtgg caggaatcgt gctcc 1057

<210> 2  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Cys Pro Gly Leu Ser Glu Ala Pro Glu Leu Tyr Ser Arg Gly Phe  
 1 5 10 15

60 Leu Thr Ile Glu Gln Ile Ala Met Leu Pro Pro Pro Ala Val Met Asn  
 20 25 30

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

3/7

Tyr Ile Phe Leu Leu Leu Cys Leu Cys Gly Leu Val Gly Asn Gly Leu  
 35 40 45  
 5 Val Leu Trp Phe Phe Gly Phe Ser Ile Lys Arg Asn Pro Phe Ser Ile  
 50 55 60  
 Tyr Phe Leu His Leu Ala Ser Ala Asp Val Gly Tyr Leu Phe Ser Lys  
 65 70 75 80  
 10 Ala Val Phe Ser Ile Leu Asn Thr Gly Gly Phe Leu Gly Thr Phe Ala  
 85 90 95  
 15 Asp Tyr Ile Arg Ser Val Cys Arg Val Leu Gly Leu Cys Met Phe Leu  
 100 105 110  
 Thr Gly Val Ser Leu Leu Pro Ala Val Ser Ala Glu Arg Cys Ala Ser  
 115 120 125  
 20 Val Ile Phe Pro Ala Trp Tyr Trp Arg Arg Arg Pro Lys Arg Leu Ser  
 130 135 140  
 Ala Val Val Cys Ala Leu Leu Trp Val Leu Ser Leu Leu Val Thr Cys  
 145 150 155 160  
 25 Leu His Asn Tyr Phe Cys Val Phe Leu Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ala  
 165 170 175  
 30 Ala Cys Arg His Met Asp Ile Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Leu  
 180 185 190  
 Cys Cys Pro Leu Met Val Leu Pro Cys Leu Ala Leu Ile Leu His Val  
 195 200 205  
 35 Glu Cys Arg Ala Arg Arg Arg Gln Arg Ser Ala Lys Leu Asn His Val  
 210 215 220  
 Ile Leu Ala Met Val Ser Val Phe Leu Val Ser Ser Ile Tyr Leu Gly  
 225 230 235 240  
 40 Ile Asp Trp Phe Leu Phe Trp Val Phe Gln Ile Pro Ala Pro Phe Pro  
 245 250 255  
 Glu Tyr Val Thr Asp Leu Cys Ile Cys Ile Asn Ser Ser Ala Lys Pro  
 260 265 270  
 45 Ile Val Tyr Phe Leu Ala Gly Arg Asp Lys Ser Gln Arg Leu Trp Glu  
 275 280 285  
 50 Pro Leu Arg Val Val Phe Gln Arg Ala Leu Arg Asp Gly Ala Glu Leu  
 290 295 300  
 Gly Glu Ala Gly Gly Ser Thr Pro Asn Thr Val Thr Met Glu Met Gln  
 305 310 315 320  
 55 Cys Pro Pro Gly Asn Ala Ser  
 325  
 60

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

4/7

<210> 3  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
5  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
<400> 3  
10 gctccacagc cactgcctta cagac 25

<210> 4  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
15  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
20  
<400> 4  
cacagtccca gggagaagaa ggc 23

<210> 5  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
25  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
30  
<400> 5  
35 acggattcat cacagtgtc cctctctgc 29

<210> 6  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
40  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
45  
<400> 6  
agaagcttgg agcacgattc ctgccactgc 30

<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
50  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
55  
<400> 7  
ggggtaccat cacagtgtc cctctctgc 29

60

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

5/7

<210> 8  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 5  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 <400> 8  
 10 gctctagagc acgattcctg ccaactgcc 28

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 15  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 20  
 <400> 9  
 20 ccagcagaga atggaagtc 20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 25  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 30  
 <400> 10  
 35 gatgctgctt acatgtctcg 20

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 40  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 45  
 <400> 11  
 45 ggtgaagcag gcgtcgy 17

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 50  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 55  
 <400> 12  
 55 gacaaagtgy togttgagg c 21

60

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

6/7

<210> 13  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 5  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 <400> 13  
 10 cctggocatg gtctccg 17

<210> 14  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 15  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer  
 20  
 <400> 14  
 20 acgatgggct tggcgc 16

<210> 15  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 25  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: TaqMan Probe  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (1)  
 <223> Labeled with 6-carboxyfluorescein  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (29)  
 <223> Labeled with  
 N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin  
 40  
 <400> 15  
 45 tggctcctc tgacttcaac agcgcacc 29

<210> 16  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 50  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: TaqMan probe  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (1)  
 <223> Labeled with 6-carboxyfluorescein  
 60  
 <220>  
 <221> misc\_binding

WO 02/28897

PCT/EP01/11319

7/7

<222> (19)  
<223> Labeled with  
N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin

5 <400> 16  
cggccccc tcccagat

19

10

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/028897 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/705, C12Q 1/68, C07K 16/28, A61K 48/00, G01N 33/50, 33/53, 33/68, A01K 67/027
- (52) International Application Number: PCT/EP01/11319
- (22) International Filing Date: 28 September 2001 (28.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00203411.4 2 October 2000 (02.10.2000) EP  
60/237,394 4 October 2000 (04.10.2000) 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): 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 (GI, 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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 7 November 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 USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to the IGS43 G-protein coupled receptor family, and to polynucleotides encoding said IGS43 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 IGS43-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 IGS43 and the use of IGS43 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS43 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 IGS43 and the use of IGS43 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IGS43 receptor family in the treatment of dysfunctions, disorders, or diseases related to uterus, kidney, lung, trachea, colon, small intestine, stomach, mammary gland, prostate, testis, central nervous system, cerebellum, and spinal cord, and diagnostic assays for such conditions.

WO 02/028897 A3

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 01/11319		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C12Q1/68 C07K16/28 A61K48/00 G01N33/50 G01N33/53 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, EP0-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim: No.
X	WO 96 16087 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); LI YI; ROSEN CRAIG A; GOCAYNE JEANNINE) 30 May 1996 (1996-05-30)	1-4, 6-9, 12-17, 19-28, 31-39, 41-43
Y	the whole document	5, 10, 11, 18, 29, 30, 40
Y	EP 0 711 831 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD (JP); HINUMA S.; FUJI RYO; KAWAMATA Y.) 15 May 1996 (1996-05-15) the whole document	1-43
	-/--	
<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:		*I* 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
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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.
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*S* document member of the same patent family
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
29 July 2002	09/08/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo.nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Macchia, G	

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/11319

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROSS P.C. ET AL.: "RTA, a candidate G protein-coupled receptor: cloning, sequencing, and tissue distribution" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 87, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 3052-3056, XP002029350 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-43
P, X	DATABASE EMBL 'Online! 30 May 2001 (2001-05-30) OTA T. ET AL.: "Secretory protein or membrane protein; patent number EP1067182-A/321" Database accession no. AXI36399 XP002207341 the whole document	1-10, 12-29, 31-39, 41-43
P, X	-& EP 1 067 182 A (HELIX RES INST (JP); OTA ISOGAI; NISHIKAWA; KAWAI; SUGIYAMA; HAYASHI) 10 January 2001 (2001-01-10)  Clone PSEC0142 - PLACE1006269; SEQ ID NO:321, 322 page 7 -page 8 page 15, line 19,20	1-10, 12-29, 31-39, 41-43

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

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP 01/11319
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
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 partially
	because they relate to parts of the international Application that do not comply with the proscribed 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).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
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.:
<b>Remark on Protest</b>	<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 11319

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SAJ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 32, 33, 36-38, 42, 43 all partially

Present claims 36 and 38 relate to an agonist/antagonist of the polypeptide disclosed, present claims 32(a), 33(a), 37, 42(a) and 43(a) concern methods and uses relating to said agonist/antagonist, without giving a true technical characterization of said agonist/antagonist.

In fact, no specific compounds are defined in the application as being agonists, whilst present application recites on page 28 that examples of potential antagonists of the polypeptide of the invention include antibodies, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligand of the polypeptide of the invention, e.g. a fragment of the ligand or small molecules which bind to the receptor but do not elicit a response.

However, no specific ligands of the polypeptide of the invention or small molecules are disclosed in present application. Therefore, 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 a product 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 supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies against the receptor of the invention and oligonucleotides related to the polynucleotide of the invention.

Additionally, present claims 33(b,c) and 43(b,c) relate to methods and uses employing a polynucleotide or a polypeptide defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the ability to inhibit the expression of the nucleotide sequence encoding the receptor of the invention or the ability to compete with the receptor of present application for its ligand, respectively.

The claims cover all polynucleotides/polypeptides having these characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such polynucleotides/polypeptides, i.e. polynucleotides related to the one of present invention and soluble forms or fragments of the receptor of present invention (see page 29).

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

International Application No. PCT/EP 01 11319

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define a product 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 polynucleotides related to the one of present invention and soluble forms or fragments of the receptor of present invention.

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 01/11319

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616087	A	30-05-1996	WO 9616087 A1 30-05-1996
			AU 1550195 A 17-06-1996
			EP 0871667 A1 21-10-1998
			JP 10509870 T 29-09-1998
EP 0711831	A	15-05-1996	JP 8193099 A 30-07-1996
			CA 2162799 A1 15-05-1996
			EP 0711831 A2 15-05-1996
EP 1067182	A	10-01-2001	AU 5849300 A 30-01-2001
			AU 5849400 A 30-01-2001
			AU 5849500 A 30-01-2001
			AU 5850500 A 30-01-2001
			EP 1067182 A2 10-01-2001
			EP 1197554 A1 17-04-2002
			EP 1203816 A1 08-05-2002
			EP 1201754 A1 02-05-2002
			WO 0104312 A1 18-01-2001
			WO 0104299 A1 18-01-2001
			WO 0104300 A1 18-01-2001
			WO 0104301 A1 18-01-2001
			JP 2002017376 A 22-01-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 6
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 15/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00	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	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/68	A 6 1 K 37/02	
// A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	N

(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 ウエースプ・シージエイバンハウテンラン 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 ウエースプ・シージエイバンハウテンラン 3 6 内

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA14 DA36 FB02  
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA02 CA04 CA09 CA11 HA14 HA17  
 4B063 QA18 QA19 QQ43 QR55 QR80 QS34  
 4B064 AG20 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AB01 BA01 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA13 AA17 BA02 BA22 BA23 CA53 CA59 ZA02 ZA59  
 ZA66 ZA81  
 4C085 AA13 AA14 BB31 CC21  
 4C086 AA01 EA16 ZA02 ZA59 ZA66 ZA81  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA21 EA22  
 EA23 EA25 EA26 EA27 EA28 EA29 EA50 FA74

专利名称(译)	人G蛋白偶联受体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004522421A</a>	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2002532479	申请日	2001-09-28
[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 ドムールーシー		
发明人	デレールスニーダー,ウイリ ブロクス,ヘルマン ドムールーシー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P25/00 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	A61P1/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P25/00 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P11/00 A61P13 /12 A61P15/00 A61P25/00.101 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/68 C12N5/00.A A61K37/02 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR80 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064 /CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084 /CA53 4C084/CA59 4C084/ZA02 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC21 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/ZA02 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086 /ZA81 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA25 4H045/EA26 4H045/EA27 4H045 /EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2000203411 2000-10-02 EP 60/237394 2000-10-04 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明中，IGS43G-蛋白偶联受体家族，和编码所述蛋白质IGS43多核苷酸。本发明可以是抑制或激活这些多核苷酸和多肽，或载体的作用包含所述多核苷酸，宿主细胞包含此类载体，并且IGS43-基因是过表达的，错误（敲除 - 动物）表达的非人转基因动物表达不佳或受到抑制。本发明还提供了一种用于筛选能够蛋白充当激动剂或拮抗剂偶联受体家族IGS43化合物G-方法，和IGS43多肽和多核苷酸和IGS43广泛的激动剂或拮抗剂的受体家族的病症的以及它们在这些病症的诊断分析中的用途。本发明特别地，能够作为激动剂或受体家族IGS43的拮抗剂，和IGS43多肽和多核苷酸和IGS43子宫激动剂或拮抗剂的受体家族，肾，肺的蛋白质缀合化合物的G-筛选方法，气管，结肠，小肠，胃，乳腺，前列腺，睾丸，中枢神经系统，功能障碍相关的小脑和脊髓中，处理确定的使用的障碍或疾病的，并为这样的条件的诊断测定。

配列番号3	IP14,923	5-GCTCCACAGCCACTGCCTTACAGAC-3'
配列番号4	IP14,925	5-CACAGTCCCAGGGAGAAGAAGGC-3'
配列番号5	IP14,924	5-ACGGATTATCAGAGGTGCCCTCTCTGC-3'
配列番号6	IP14,926	5-AGAAGCTTGGAGCAGGATTCCCTGCCACTGC-3'