

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506038

(P2005-506038A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 5
		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 226 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-555250 (P2002-555250)	(71) 出願人	500492428
(86) (22) 出願日	平成14年1月8日 (2002.1.8)		インターリューキン ジェネティックス
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日 (2003.7.8)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000070		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(87) 国際公開番号	W02002/053743		2 4 5 2 ウォルサム ビーヴァー スト
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		リート 1 3 5
(31) 優先権主張番号	60/260, 294	(74) 代理人	100073184
(32) 優先日	平成13年1月8日 (2001.1.8)		弁理士 柳田 征史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100090468
			弁理士 佐久間 剛
		(72) 発明者	ダウアー, スティーヴン
			イギリス国 エス6 6ジーアール シェ
			フィールド ハイ モスカー ホップウッド
			ハウス
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類TRIBBLE Sシグナル伝達経路およびそれに関連する方法と試薬

(57) 【要約】

本発明は哺乳類tribbles相似体(htrb)を用いて分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ経路を調節する方法および試薬を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示すヌクレオチド配列またはその相補体と少なくとも約 90% 同一のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、htrb-1 をコードする単離された核酸。

【請求項 2】

前記核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列またはその相補体と少なくとも約 95% 同一のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 1 記載の核酸。

【請求項 3】

前記核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列またはその相補体と少なくとも約 99% 同一のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 1 記載の核酸。

10

【請求項 4】

前記核酸が、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列またはその相補体と少なくとも約 95% 同一のヌクレオチド配列を含み、かつ AP-1 阻害活性をコードすることを特徴とする請求項 1 記載の核酸。

【請求項 5】

配列番号 1 のヌクレオチド 282 から 1400 に対応する htrb-1 ORF をコードする核酸とハイブリダイズすることを特徴とする、請求項 1 から 4 いずれか 1 項記載の核酸。

【請求項 6】

配列番号 2 に示す htrb-1 ポリペプチド配列と少なくとも約 75% 同一の htrb ポリペプチドをコードすることを特徴とする請求項 1 記載の単離された核酸。

20

【請求項 7】

AP-1 阻害活性をさらにコードすることを特徴とする請求項 6 記載の単離された核酸。

【請求項 8】

IL-8 基礎的発現の阻害、AP-1 転写活性化の阻害、MEKK-1 キナーゼシグナル伝達の阻害、MKK-7 キナーゼシグナル伝達の阻害、細胞肥大促進活性、ERK キナーゼシグナル伝達の活性化、および JNK キナーゼシグナル伝達の阻害：から成る群より選択される htrb 生物活性をコードすることを特徴とする、請求項 1、2、3 または 6 いずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 9】

配列番号 1 のヌクレオチド 283 から 730；配列番号 1 のヌクレオチド 1 から 729；および配列番号 1 のヌクレオチド 1500 から 1916：から成る群より選択される htrb-1 ヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

30

【請求項 10】

配列番号 2 に示す htrb-1 ポリペプチド配列と少なくとも約 50% 同一の htrb ポリペプチドをコードすることを特徴とする請求項 9 記載の核酸。

【請求項 11】

htrb-1 生物活性をコードすることを特徴とする請求項 10 記載の核酸。

【請求項 12】

前記 htrb ヌクレオチド配列と同一の少なくとも 25 個の連続ヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 9 記載の核酸。

40

【請求項 13】

配列番号 2 に示す htrb-1 ポリペプチド配列をコードする単離された核酸。

【請求項 14】

配列番号 2 のアミノ酸残基 1 から 150 の範囲の htrb-1 配列からの少なくとも 10 個の連続アミノ酸からなるポリペプチド配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 2 のアミノ酸残基 1 から 150 の範囲の htrb-1 配列からの少なくとも 20 個の連続アミノ酸を含むことを特徴とする請求項 14 記載のポリペプチド。

【請求項 16】

50

配列番号 2 に示す htrb-1 ポリペプチド配列と少なくとも 70% 同一のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 17】

前記アミノ酸配列が、配列番号 2 に示す htrb-1 ポリペプチド配列と少なくとも 80% 同一であることを特徴とする請求項 16 記載のポリペプチド。

【請求項 18】

前記アミノ酸配列が、配列番号 2 に示す htrb-1 ポリペプチド配列と少なくとも 90% 同一であることを特徴とする請求項 16 記載のポリペプチド。

【請求項 19】

少なくとも一つの htrb-1 生物活性を有することを特徴とする請求項 13 から 18 何れか 1 項記載のポリペプチド。 10

【請求項 20】

前記 htrb-1 生物活性が、IL-8 基礎的発現の阻害、AP-1 転写活性化の阻害、MEKK-1 キナーゼシグナル伝達の阻害、MKK-7 キナーゼシグナル伝達の阻害、細胞肥大促進活性、ERK キナーゼシグナル伝達の活性化、および JNK キナーゼシグナル伝達の阻害：から成る群より選択されることを特徴とする請求項 19 記載のポリペプチド。

【請求項 21】

配列番号 2 に示す配列を有する単離された htrb-1 ポリペプチド。

【請求項 22】

細胞に htrb アゴニストまたはアンタゴニストを与える工程を含むことを特徴とする、細胞中の AP-1 媒介炎症性シグナルを調節する方法。 20

【請求項 23】

前記 htrb アゴニストまたはアンタゴニストが、htrb ポリペプチド、htrb 類似構造ペプチドまたは htrb 核酸であることを特徴とする請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

前記 htrb アゴニストまたはアンタゴニストが、htrb-1、htrb-1 N htrb-1 C、htrb-1 N C、htrb-3、および htrb-1 5' UTR および N 末端可変領域アンチセンス構造、htrb-3 5' UTR および N 末端可変領域アンチセンス構造、htrb-1 3' UTR センス構造から成る群より選択されることを特徴とする請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

前記 AP-1 媒介炎症性シグナルが、TNF 誘導炎症性シグナル、およびインターロイキン誘導炎症性シグナル：から成る群より選択されることを特徴とする請求項 22 記載の方法。 30

【請求項 26】

請求項 14、15、16、17、18、20 または 21 のいずれかの htrb ポリペプチドと細胞とを接触させる工程を含むことを特徴とする、細胞中の AP-1 媒介炎症性シグナルを阻害する方法。

【請求項 27】

前記 htrb ポリペプチドが、htrb-1、htrb-1 N htrb-1 C、htrb-1 N C、htrb-3、htrb-3 N htrb-3 C、および htrb-3 N C から成る群より選択されることを特徴とする請求項 26 記載の方法。 40

【請求項 28】

細胞に htrb アゴニスト活性を与える工程を含むことを特徴とする、細胞中の ERK 媒介シグナルを活性化する方法。

【請求項 29】

前記 htrb アゴニスト活性が、請求項 13、14、15、16、17 または 20 のいずれかの htrb-1 ポリペプチドによって与えられることを特徴とする請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

前記 htrb ポリペプチドが、htrb-1、htrb-1 N htrb-1 C、htrb-1 N C、htrb-3、htrb-3 N htrb-3 C、および htrb-3 N C から成る群より選択されることを特徴とする請求項 29 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ERK媒介シグナルが、AP-1媒介遺伝子活性化シグナル、エストロゲン受容体媒介遺伝子活性化シグナル、FGF誘導性シグナル、PMA誘導性シグナルから成る群より選択されることを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 2】

(a)哺乳類cDNAベクターライブラリの低複雑度プールを、インターロイキン遺伝子レポーターを含む哺乳類レポーター細胞に導入し；
(b)ベクターのみを導入した哺乳類レポーター細胞と比較したインターロイキン遺伝子レポーター活性の上昇または低下を用いて導入細胞を特定することによって、陽性クローンに関して遺伝子導入されたレポーター細胞をスクリーニングし；そして
(c)前記陽性クローンからの低複雑度プールを再導入し、再導入で得られた陽性クローンからの挿入cDNAを配列決定することによって、陽性クローンからインターロイキン制御遺伝子を同定して、それによってインターロイキン制御遺伝子を同定する；各工程を含むことを特徴とする、インターロイキン制御遺伝子を同定する方法。

10

【請求項 3 3】

前記インターロイキン遺伝子レポーターが、IL-1A遺伝子レポーター、IL-1B遺伝子レポーター、IL-1RN遺伝子レポーター、およびIL-8遺伝子レポーターから成る群より選択されることを特徴とする請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記哺乳類細胞が、HeLa細胞、NIH3T3細胞、Raw細胞、末梢血リンパ球：から成る群より選択されることを特徴とする請求項 3 2 記載の方法。

20

【請求項 3 5】

前記哺乳類cDNAライブラリが、PBMCライブラリ、HeLa細胞ライブラリ、PMA誘導性哺乳類細胞ライブラリ、およびサイトカイン誘導性哺乳類細胞ライブラリから成る群より選択されることを特徴とする請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 6】

(a)インターロイキン制御遺伝子cDNAおよび発現ベクターを含むインターロイキン制御遺伝子クローンを、哺乳類細胞集団において発現させ；
(b)前記細胞から発現された遺伝子を示す核酸の集団を単離し；
(c)前記細胞から発現された遺伝子を示す核酸の集団のマイクロアレイ分析によって、インターロイキン制御遺伝子発現細胞の遺伝子発現プロファイルを決定し；そして
(d)インターロイキン制御遺伝子発現細胞の中でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされている前記インターロイキン制御遺伝子以外の遺伝子を同定するために、インターロイキン制御遺伝子クローンを導入した細胞からのmRNA発現の遺伝子発現パターンを、ベクターだけを導入して得られたものと比較し、それによって炎症性シグナル伝達ネットワーク中のインターロイキン制御遺伝子の遺伝子ターゲットを同定する；各工程を含むことを特徴とする、炎症性シグナル伝達ネットワーク中のインターロイキン制御遺伝子の遺伝子ターゲットを同定する方法。

30

【請求項 3 7】

請求項 3 6 記載の方法をさらに含むことを特徴とする、請求項 3 2 記載の方法。

40

【請求項 3 8】

前記哺乳類細胞が、HeLa細胞、NIH3T3細胞、Raw細胞、末梢血リンパ球から成る群より選択されることを特徴とする請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 9】

前記発現された遺伝子を示す核酸の集団がmRNA集団であることを特徴とする請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記発現された遺伝子を示す核酸の集団がcDNA集団であることを特徴とする請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 1】

50

マイクロアレイ分析が、遺伝子転写プロファイルまたは遺伝子発現フィンガープリントを与えることを特徴とする請求項36記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類TRIBBLESシグナル伝達経路およびそれに関連する方法と試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫および炎症性遺伝子の機能は、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、乾癬、アルツハイマー病といった多くの疾患において中心的な役割を果たす。これらの免疫および炎症性遺伝子は、互いに依存するシグナル伝達系構成成分の複雑なネットワークとして機能することを示唆する証拠がある。これらのシグナル伝達系構成成分は、細胞外（たとえばインターロイキン類といったさまざまなサイトカインの作用を通じて）および細胞内（たとえばシグナル伝達キナーゼやAP-1およびNF- κ Bといった転写調節因子の作用を通じて）の療法で起こるシグナル伝達現象を媒介する。疾患の経過に関連する炎症反応を制御するためのさまざまな方法が存在する。たとえば、アスピリン（サリチル酸）は、NF- κ B活性化における主要な酵素であるI- κ BキナーゼをブロックすることによってNF- κ Bの活性化を阻害する。スルファサラジンおよび金化合物もまたNF- κ B活性化を阻害する。糖質コルチコイドは、NF- κ B活性化に関係する糖質コルチコイド受容体に結合することによって炎症性遺伝子の発現を抑制する。

10

20

【0003】

そのような薬物は、リウマチ性関節炎といった炎症性疾患を制御するために一般的に用いられている。にもかかわらず、特定の異常な炎症性過程を抑制する一方で病的でない炎症性過程は干渉されることなく継続できるように特に適合させた特別の抗炎症特異性を有する薬物を開発する必要がある。事実、さまざまな抗炎症薬は特別のニーズを有する特定の患者のために最適化された薬物治療にとって有益であると思われる（非特許文献1）を参照のこと）。さらに、炎症の分子メカニズムを理解することの進歩の継続は、炎症性疾患を抑えるためのより効果的でより特異的で、より毒性の低い薬物の開発に利益をもたらすことになる。このネットワークを構成する遺伝子間の関係を理解することで、自己免疫及び炎症性疾患を抑えるための薬物の幅広い標的が与えられる。疾患の過程を抑えるために、この遺伝子ネットワーク中の一個またはそれ以上の点で、単独または協同して作用するように、分子アゴニストおよびアンタゴニストを設計することができる。

30

【0004】

最近、炎症性サイトカイン、細菌細胞壁およびせん断応力によって引き起こされるシグナル伝達系ネットワークに注目して多くの仕事が行われている。一般的に、2つの主要なシグナル伝達カスケードがこれらの刺激によって活性化される。免疫および炎症性遺伝子ネットワーク制御に関係する主要な細胞間シグナル伝達カスケードは、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ（MAPK、またはストレスキナーゼ）カスケードと、DdBキナーゼカスケード、またJAK/STATシグナル伝達経路である（たとえば非特許文献2を参照）。NF- κ Bの活性化は、主にI- κ Bキナーゼ（IKK）を介していると考えられている一方、AP-1/ATFの活性化はストレス活性化プロテインキナーゼ類（SAPKs、またJunキナーゼあるいはJNKsとも呼ばれる）に媒介されうると考えられている。IKK α およびIKK β は、IKK複合体核の2つの触媒サブユニットであり、IKK複合体核はまた制御サブユニットNEMO（NF- κ B必須モジュレータ）/IKK γ を含む。後者のタンパク質はIKKの活性化に必須であるが、その作用機構は未知であるがしかし、細胞内でNEMO/IKK γ と直接相互作用するタンパク質であるこれまで未知であったCIKS（IKKおよびSAPK/JNK伝達物質）の分子クローニングから情報が得られる可能性がある（非特許文献3を参照）。異常に発現されると、CIKSはIKKおよびSAPK/JNKキナーゼを刺激し、NF- κ B依存性レポーターの転写を促進する。NF- κ Bの活性化はキナーゼ能力不全の干渉するIKK変異体の存在下で抑止される。CIKSは、IKKおよびSAPK/JNKモジュールへ上流のシグナル伝達現象から繋げる助けになっている可能性があり

40

50

、CIKSは2つのストレス誘導シグナル伝達経路の活性化を調整することができ、腫瘍壊死因子受容体関連因子受容体タンパク質について知られている機能を思わせる。

【特許文献1】	
米国特許第5,176,996号明細書	
【特許文献2】	
米国特許第5,264,564号明細書	
【特許文献3】	
米国特許第5,256,775号明細書	
【特許文献4】	
国際公開第88/09810号パンフレット	10
【特許文献5】	
国際公開第89/10134号パンフレット	
【特許文献6】	
国際公開第90/11364号パンフレット	
【特許文献7】	
米国特許第5,093,246号明細書	
【特許文献8】	
国際公開第88/04300号パンフレット	
【特許文献9】	
欧州特許出願公開第0259149号明細書	20
【特許文献10】	
米国特許第5,223,409号明細書	
【特許文献11】	
米国特許第5,198,346号明細書	
【特許文献12】	
米国特許第5,096,815号明細書	
【特許文献13】	
国際公開第92/15694号パンフレット	
【特許文献14】	
米国特許第4,833,080号明細書	30
【特許文献15】	
米国特許第4,683,195号明細書	
【特許文献16】	
米国特許第4,683,202号明細書	
【特許文献17】	
米国特許第5,498,531号明細書	
【特許文献18】	
国際公開第94/16101号パンフレット	
【特許文献19】	
米国特許第5,459,039号明細書	40
【特許文献20】	
米国特許第4,998,617号明細書	
【特許文献21】	
米国特許第5,593,826号明細書	
【特許文献22】	
米国特許第4,656,127号明細書	
【特許文献23】	
仏国特許発明第2,650,840号明細書	
【特許文献24】	
国際公開第91/02087号パンフレット	50

- 【特許文献 2 5】
国際公開第92/15712号パンフレット
- 【特許文献 2 6】
国際公開第9 1/07660号パンフレット
- 【特許文献 2 7】
米国特許第5,328,470号明細書
- 【特許文献 2 8】
米国特許第5,539,083号明細書
- 【特許文献 2 9】
米国特許第5,578,832号明細書 10
- 【特許文献 3 0】
米国特許第5,556,752号明細書
- 【特許文献 3 1】
米国特許第5,510,270号明細書
- 【非特許文献 1】
Davies & Skjodt (2000) Clin Pharmacokinetics 38: 377-92
- 【非特許文献 2】
Rivest et al. (2000) Proc Soc Exp Biol Med 223: 22-38
- 【非特許文献 3】
Leonardi et al. (2000) PNAS, USA 97: 10494-9 20
- 【非特許文献 4】
Mata et al. (2000) Cell 101 : 5 1 1-22
- 【非特許文献 5】
Grosshans & Wieschaus (2000) Cell 101 : 523-31
- 【非特許文献 6】
Mayumi-Matsuda, K. et al. (1999) Biochemical and Biophysical Research Communications 258:260-64
- 【非特許文献 7】
Wilkin, F. et al. (1997) European Journal of Biochemistry 248:660-68
- 【非特許文献 8】
Cacace, A.M. et al. (1999) Molecular and Cellular 生物学 19:229-40 30
- 【非特許文献 9】
Yasuda, J. et al. (1999) Mol. 細胞. Biol. 19:7245-54
- 【非特許文献 1 0】
Levchenko, A. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5818-23
- 【非特許文献 1 1】
Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA
- 【非特許文献 1 2】
Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997) 40
- 【非特許文献 1 3】
Feng et al., J. Mol. Evol. (1987) 25:351-360
- 【非特許文献 1 4】
Needleman et al., J. Mol. Biol. (1970) 48:443-453
- 【非特許文献 1 5】
Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489
- 【非特許文献 1 6】
Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 50

- 【非特許文献 1 7】
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) Chapters 16 and 17
- 【非特許文献 1 8】
Van der Krol et al. (1988) Biotechnology 6:958-976
- 【非特許文献 1 9】
Stein et al. (1988) CancerRes 48:2659-2668
- 【非特許文献 2 0】
Wagner, R. 1994. Nature 372:333
- 【非特許文献 2 1】 10
Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556
- 【非特許文献 2 2】
Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652
- 【非特許文献 2 3】
Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549
- 【非特許文献 2 4】
Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670
- 【非特許文献 2 5】
Eglom et al. (1993) Nature 365:566
- 【非特許文献 2 6】 20
Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641
- 【非特許文献 2 7】
Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148
- 【非特許文献 2 8】
Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330
- 【非特許文献 2 9】
Stein et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16:3209
- 【非特許文献 3 0】
Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451
- 【非特許文献 3 1】 30
Bemoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310
- 【非特許文献 3 2】
Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797
- 【非特許文献 3 3】
Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445
- 【非特許文献 3 4】
Brinster et al, 1982, Nature 296:39-42
- 【非特許文献 3 5】
Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225
- 【非特許文献 3 6】 40
Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591
- 【非特許文献 3 7】
Zaug, et al., 1984, Science, 224:574-578
- 【非特許文献 3 8】
Zaug and Cech, 1986, Science, 231 :470-475
- 【非特許文献 3 9】
Zaug, et al., 1986, Nature, 324:429-433
- 【非特許文献 4 0】
Been and Cech, 1986, Cell, 47:207-216
- 【非特許文献 4 1】 50

- Smithies et al., 1985, Nature 317:230-234
 【非特許文献 4 2】
- Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51 :503-512
 【非特許文献 4 3】
- Thompson et al., 1989 Cell 5:313-321
 【非特許文献 4 4】
- Helene, C. 1991, Anticancer Drug Des., 6(6):569-84
 【非特許文献 4 5】
- Helene, C., et al, 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:27 36
 【非特許文献 4 6】 10
- Maher, L.J., 1992, Bioassays 14(12):807-15
 【非特許文献 4 7】
- Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)
 【非特許文献 4 8】
- Broach et al. (1983) in Experimental Manipulation of Gene Expression, ed. M. Inouye Academic Press, p. 83
 【非特許文献 4 9】
- Ben-Bassat et al. (1987) J. Bacteriol. 169:75 1-757
 【非特許文献 5 0】 20
- Miller et al.(1987) PNAS 84:271 8-1722
 【非特許文献 5 1】
- Evans et al.25 (1989) Nature 339:385
 【非特許文献 5 2】
- Huang et al. (1988) J. Virol. 62:3855
 【非特許文献 5 3】
- Schlienger et al. (1992) J. Virol. 66:2
 【非特許文献 5 4】
- Posnett et al. (1988) JBC 263:1719
 【非特許文献 5 5】 30
- Nardelli et al. (1992) J. Immunol. 148:914
 【非特許文献 5 6】
- Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)
 【非特許文献 5 7】
- Biochemistry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman and Co.: 1981
 【非特許文献 5 8】
- Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3
 【非特許文献 5 9】
- Itakura et al. (1981) Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules 40
 , ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289
 【非特許文献 6 0】
- Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323
 【非特許文献 6 1】
- Itakura et al. (1984) Science 198:1056
 【非特許文献 6 2】
- Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477
 【非特許文献 6 3】
- Scott et al. (1990) Science 249:386-390
 【非特許文献 6 4】 50

- Roberts et al. (1992) PNAS 89:2429-2433
 【非特許文献 6 5】
- Devlin et al. (1990) Science 249: 404-406
 【非特許文献 6 6】
- Cwirla et al. (1990) PNAS 87: 6378-6382
 【非特許文献 6 7】
- Arkin and Yourvan, 1992, PNAS USA 89:781 1-7815
 【非特許文献 6 8】
- Yourvan et al., 1992, Parallel Problem Solving from Nature, 2., In Maenner and M
 anderick, eds., Elsevir Publishing Co., Amsterdam, pp.401-410 10
 【非特許文献 6 9】
- Delgrave et al., 1993, Protein Engineering 6(3):327-33 1
 【非特許文献 7 0】
- Freidinger et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM P
 ublisher: Leiden, Netherlands, 1988
 【非特許文献 7 1】
- Huffman et al. in Peptide: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publi
 sher: Leiden, Netherlands, 1988
 【非特許文献 7 2】
- Garvey et al. in Peptide: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publis 20
 her Leiden, Netherlands, 1988
 【非特許文献 7 3】
- Ewenson et al. (1986) J Med Chem 29:295
 【非特許文献 7 4】
- Ewenson et al. in Peptide: Structure and Function (Proceedings of the 9th Americ
 an Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985
 【非特許文献 7 5】
- Nagai et al. (1985) Tetrahedron Lett 26:647
 【非特許文献 7 6】
- Sato et al. (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1 :123 1 30
 【非特許文献 7 7】
- Gordon et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun126:419
 【非特許文献 7 8】
- Dann et al. (1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71
 【非特許文献 7 9】
- Harlow, E. and Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Ha
 rbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)
 【非特許文献 8 0】
- Nature, 256: 495-497, 1975 40
 【非特許文献 8 1】
- Kozbar et al., (1983) Immunology Today , 4: 72
 【非特許文献 8 2】
- Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc.
 pp. 77-96
 【非特許文献 8 3】
- Doetschman et al. (1985) J. Embryol. Exp. 87:27-45
 【非特許文献 8 4】
- loffe et al. (1995) PNAS 92:7357 7361
 【非特許文献 8 5】
- Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, EJ. Robertson, 50

ed. IRL Press, 洗淨ton, D.C. [1987]

【非特許文献 8 6】

Bradley et al. (1986) Current Topics in Devel. Biol.20:357-371

【非特許文献 8 7】

Hogan et al. Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986)

【非特許文献 8 8】

Lakso et al. (1992) PNAS 89:6232-6236

【非特許文献 8 9】

Orban et al. (1992) PNAS 89:6861-6865

10

【非特許文献 9 0】

O'Gorman et al. (1991) Science 251 :1351-1355

【非特許文献 9 1】

Abremski et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 1 509-1 5 14

【非特許文献 9 2】

Brinster et al. (1985) PNAS 82:4438-4442

【非特許文献 9 3】

Jaenich, R. (1976) PNAS 73: 1260-1264

【非特許文献 9 4】

Jahner et al. (1985) PNAS 82:6927-6931

20

【非特許文献 9 5】

Van der Putten et al. (1985) PNAS 82 :6 1 48-6 1 52

【非特許文献 9 6】

Stewart et al. (1987) EMBO J. 6:383-388

【非特許文献 9 7】

Jahner et al. (1982) Nature 298:623-628

【非特許文献 9 8】

Evans et al. (1981) Nature 292:154-156

【非特許文献 9 9】

Bradley et al. (1984) Nature 309:255-258

30

【非特許文献 1 0 0】

Gossler et al. (1986) PNAS 83: 9065-9069

【非特許文献 1 0 1】

Robertson et al. (1986) Nature 322:445-448

【非特許文献 1 0 2】

Jaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474

【非特許文献 1 0 3】

Habig et al (1974) J Biol Chem 249:7130

【非特許文献 1 0 4】

Ellison et al. (1991) J Biol Chem 266:21 150-21 157

40

【非特許文献 1 0 5】

McConnell et al. (1992) Science 257: 1906

【非特許文献 1 0 6】

Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244

【非特許文献 1 0 7】

Landegran et al. (1988) Science 241 :1077-1080

【非特許文献 1 0 8】

Nakazawa et al. (1994) PNAS 91 :360-364

【非特許文献 1 0 9】

Abrevaya et al. (1995) Nuc Acid Res 23:675-682

50

- 【非特許文献 1 1 0】
 Guatelli, J.C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878
- 【非特許文献 1 1 1】
 Kwoh, D.Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177
- 【非特許文献 1 1 2】
 Lizardi, P.M. et al., 1988, Bio/Technology 6: 1197
- 【非特許文献 1 1 3】
 Proc. Natl Acad Sci USA (1977) 74:560
- 【非特許文献 1 1 4】
 Sanger et al (1977) Proc. Nat. Acad. Sci 74:5463 10
- 【非特許文献 1 1 5】
 Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162
- 【非特許文献 1 1 6】
 Griffin et al. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159
- 【非特許文献 1 1 7】
 Biotechniques (1995) 19:448
- 【非特許文献 1 1 8】
 Myers, et al. (1985) 10 Science 230:1242
- 【非特許文献 1 1 9】
 Cotton et al (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397 20
- 【非特許文献 1 2 0】
 Saleeba et al (1992) Methods Enzymol. 217:286-295
- 【非特許文献 1 2 1】
 Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662
- 【非特許文献 1 2 2】
 Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766
- 【非特許文献 1 2 3】
 Cotton (1993) Mutat Res 285:125 1 44
- 【非特許文献 1 2 4】
 Hayashi (1 992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79 30
- 【非特許文献 1 2 5】
 Keen et al. (1991) Trends Genet 7:5
- 【非特許文献 1 2 6】
 Myers et al (1985) Nature 313:495
- 【非特許文献 1 2 7】
 Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265: 12753
- 【非特許文献 1 2 8】
 Saiki et al. (1986) Nature 324:163
- 【非特許文献 1 2 9】
 Saiki et al (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230 40
- 【非特許文献 1 3 0】
 Gibbs et al (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448
- 【非特許文献 1 3 1】
 Prossner (1993) Tibtech 11 :238
- 【非特許文献 1 3 2】
 Gasparini et al (1992) Mol. Cell Probes 6:1
- 【非特許文献 1 3 3】
 Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189
- 【非特許文献 1 3 4】
 Landegren, U. et al., Science 241 :1077-1080 (1988) 50

- 【非特許文献 1 3 5】
 Nickerson, D. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:8923-8927 (1990)
- 【非特許文献 1 3 6】
 Tobe et al. ((1996) Nucleic Acids Res 24: 3728
- 【非特許文献 1 3 7】
 Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res.17:7779-7784 (1989)
- 【非特許文献 1 3 8】
 Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990)
- 【非特許文献 1 3 9】
 Syvanen, A. -C., et al., Genomics 8:684-692 (1990) 10
- 【非特許文献 1 4 0】
 Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1 143-1 147 (1991)
- 【非特許文献 1 4 1】
 Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1:159-164 (1992)
- 【非特許文献 1 4 2】
 Ugozzoli, L. et al., GATA 9:107-1 12 (1992)
- 【非特許文献 1 4 3】
 Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)
- 【非特許文献 1 4 4】
 Syvanen, A. -C., et al., AmerJ. Hum. Genet. 52:46-59 (1993) 20
- 【非特許文献 1 4 5】
 Roest, et. al., (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1719-21
- 【非特許文献 1 4 6】
 van der Luijt, et. al., (1994) Genomics 20:1-4
- 【非特許文献 1 4 7】
 Nuovo, G.J., 1992, PCR in situ hybridization: protocols and applications, Raven Press, NYを
- 【非特許文献 1 4 8】
 Voller, "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", Diagnostic Horizons 2 : 1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD 30
- 【非特許文献 1 4 9】
 Voller, et ah, J. Clin. Pathol. 31 :507-520 (1978)
- 【非特許文献 1 5 0】
 Butler, Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981)
- 【非特許文献 1 5 1】
 Maggio, (ed.) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, 1 980
- 【非特許文献 1 5 2】
 Ishikawa, et al., (eds.) Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo, 1981)
- 【非特許文献 1 5 3】
 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassay, Seventh Training Course on Radiol 40
 igand Assay Technology, The Endocrine Society, March, 1986
- 【非特許文献 1 5 4】
 Jokhi et al.(1997) Cytokine 9: 126-37
- 【非特許文献 1 5 5】
 Dammann et al. (1997) Pediatr Res 42: 1-8
- 【非特許文献 1 5 6】
 Chen et al. (1994) PNAS 91 : 3054-3057
- 【非特許文献 1 5 7】
 Dev et al. ((1994) Cancer Treat Rev 20:105-1 15
- 【非特許文献 1 5 8】 50

Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)

【非特許文献 1 5 9】

DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985)

【非特許文献 1 6 0】

Oligonucleotide synthesis (M. J. Gait ed., 1984)

【非特許文献 1 6 1】

Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984)

【非特許文献 1 6 2】

Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984)

10

【非特許文献 1 6 3】

Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)

【非特許文献 1 6 4】

Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)

【非特許文献 1 6 5】

B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)

【非特許文献 1 6 6】

the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)

20

【非特許文献 1 6 7】

Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)

【非特許文献 1 6 8】

Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986);

【非特許文献 1 6 9】

Bittner et al., 2000, Nature 406:443-546

【非特許文献 1 7 0】

30

Egholm et al., 1993, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, Nature 365:566-568

【非特許文献 1 7 1】

Schena et al., 1995, Science 270:467-470

【非特許文献 1 7 2】

DeRisi et al., 1996, Nature Genetics 14:457-460

【非特許文献 1 7 3】

Shalon et al., 1996, Genome Res. 6:639-645

【非特許文献 1 7 4】

Schena et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10539-1 1286

40

【非特許文献 1 7 5】

Fodor et al., 1991, Science 251 :767-773

【非特許文献 1 7 6】

Pease et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :5022-5026

【非特許文献 1 7 7】

Lockhart et al., 1996, Nature Biotech 14:1675

【非特許文献 1 7 8】

Maskos and Southern, 1992, Nuc. Acids Res. 20:1679-1684

【非特許文献 1 7 9】

Klug and Berger, 1987, Methods Enzymol. 152:316-325

50

- 【非特許文献 1 8 0】
 Kricka, 1992, Academic Press San Diego, Calif
- 【非特許文献 1 8 1】
 Zhao et al., 1995, Gene 156:207
- 【非特許文献 1 8 2】
 Pietu et al., 1996, Genome Res. 6:492
- 【非特許文献 1 8 3】
 Ausubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York
- 【非特許文献 1 8 4】 10
 Shalon et al., 1996, Genome Research 6:639-645
- 【非特許文献 1 8 5】
 Schena et al., 1996, ゲノム Res. 6:639-645
- 【非特許文献 1 8 6】
 Ferguson et al., 1996, Nature Biotech. 14:1681-1684,
- 【非特許文献 1 8 7】
 Sherlock, 2000, Curr. Opin. Immunol. 12:201-205
- 【非特許文献 1 8 8】
 Butte et al., 2000, Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, World Scientific, p.418-29 20
- 【非特許文献 1 8 9】
 Tamayo et al., 1999, PNAS 96:2907-12
- 【非特許文献 1 9 0】
 Wu & Anderson (1998) Nature 392: 93-7
- 【非特許文献 1 9 1】
 Hamann, J. et al. (1993) Journal of Immunology 150:4920-27
- 【非特許文献 1 9 2】
 Seher, T.C. et al. (2000) Curr. Biol. 10:623-29
- 【非特許文献 1 9 3】
 Mukaida, N. et al. (1994) Journal of Leukocyte Biology 56:554-58 30
- 【非特許文献 1 9 4】
 Wilkin, F. et al. (1996) Journal of Biological Chemistry 271 :2845 1-57
- 【非特許文献 1 9 5】
 Rorth, P. et al. (2000) Mol. Cell 6:23-30)
- 【非特許文献 1 9 6】
 Foltz, IN. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:9344-51
- 【非特許文献 1 9 7】
 Holland, P.M. et al. (1997) Journal of Biological Chemistry 272:24994-98
- 【非特許文献 1 9 8】
 Davis, R.J. (1999) Biochemical Society Symposia 64:1-12 40
- 【非特許文献 1 9 9】
 Yamaoka, S. et al. (1998) Cell 93:1231-40
- 【非特許文献 2 0 0】
 Rudolph, D. et al. (2000) Genes Dev. 14:854-62
- 【非特許文献 2 0 1】
 Harhaj, E.W. et al. (1999) Journal of Biological Chemistry 274:2291 1-14
- 【非特許文献 2 0 2】
 Schaeffer, HJ. et al (1998) Science 281:1668-71
- 【非特許文献 2 0 3】
 Whitmarsh, A.J. et al. (1998) Science 281:1671-74 50

【非特許文献204】

Kiss-Tom, E. et al., Journal of Immunological 方法 239, 125-135 (2000)

【非特許文献205】

Wyllie, D.H. et al. (2000) Journal of Immunology 165:7125-32

【非特許文献206】

Maamra, M. et al. (1999) Journal of Biological Chemistry 274: 14791-98

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

個々のストレスキナーゼ媒介経路は異なる細胞型では異なる挙動を示す。特異性は、CIKS 10
といったある経路の成分を細胞型特異的に発現することで部分的に達成しうる。これらの
分裂促進因子活性化プロテインキナーゼシグナル伝達経路の制御および特異性に寄与する
すべての構成成分は、それぞれがこの炎症性シグナル伝達現象の重要な群を制御するため
の標的であるので、すべての構成成分を同定することが重要である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は一部、ある哺乳類htrbs遺伝子のクローニングおよび同定、および特定のストレ 20
スキナーゼ経路の阻害因子として機能するコードされたhtrbsタンパク質に基づく。htrbs
遺伝子は、ショウジョウバエの発生において形態形成と細胞運命決定とともに有糸分裂を
調整する、ショウジョウバエtribbles遺伝子の哺乳類相同遺伝子である(非特許文献4お 20
よび非特許文献5を参照)。本発明はhuman tribbles homologue-1に因んでhtrb-1と名付
けられたショウジョウバエtribbles遺伝子のヒト相同遺伝子を提供する(homo SKIP1 (Ge
n Bank Accession NO. AF250310)ともいう)。htrb-1は、NF- κ BおよびAP-1の両方の
誘導にIL-8プロモータ内に存在するこれらの転写活性化因子結合部位を通じて反応するサ
イトカイン応答性インターロイキン-1 (EL-8)遺伝子リポーターの基本的であるが誘導さ
れたものでない活性を阻害する。本発明のhtrb-1遺伝子は、AP-1媒介転写誘導を特異的に
阻害し、NF- κ BまたはJAK/STAT媒介転写誘導は阻害しない。従って、本発明のhtrb-1
遺伝子は、ストレスキナーゼ誘導経路を調節する便利かつ特異的な手段を提供する。

【0007】

好適な実施形態においては、本発明は配列番号1に示されたヌクレオチド配列と少なくと 30
も約90%同一であるヌクレオチド配列かまたはその相補配列、および好ましくは少なく
とも約95%または99%同一であるヌクレオチド配列から成る核酸をコードする、単離された
htrb-1を提供する。ある実施形態では、本発明の核酸はさらにAP-1活性化阻害活性を有す
る。本発明はさらに、配列番号2に示されたhtrb-1ポリペプチド配列と少なくとも約75%
同一であるポリペプチドのようなhtrbポリペプチドをコードし、さらに好ましくはAP-1阻
害活性をコードする、単離された核酸を提供する。ある好適な実施形態においては、本発
明の単離された核酸は、IL-8基本発現阻害活性、およびAP-1転写活性化阻害活性、MEKK-1
キナーゼシグナル伝達阻害活性、MKK-7キナーゼシグナル伝達阻害活性、ERKキナーゼシグ
ナル伝達阻害活性、JNKキナーゼシグナル伝達阻害活性、あるいは細胞肥大促進活性とい
ったhtrb生物活性をコードする。本発明の好適な核酸は、たとえば：配列番号1のヌクレ 40
オチド1から448；配列番号1のヌクレオチド 1から729；および配列番号1のヌクレオチド1
500から1916、といったストリンジェントな条件下である特定のhtrb-1ヌクレオチド配列
とハイブリッドを形成するヌクレオチド配列を有する単離された核酸を含む。

【0008】

本発明はさらに、配列番号2のアミノ酸残基1から150の範囲のhtrb-1配列から少なくとも 50
10、そしてより好ましくは20または30の連続するアミノ酸のポリペプチド配列を含む単離
されたhtrbポリペプチドを提供する。好ましくは本発明のhtrbポリペプチドは、配列番号
2に示されたhtrb-1配列と少なくとも約70%、より好ましくは80、90、95または99%同一で
ある。好適な実施形態においては、htrbポリペプチドはhtrb-1生物活性、たとえば：IL-8
基本発現阻害、AP-1転写活性化阻害、MEKK-1キナーゼシグナル伝達阻害、MKK-7キナーゼ

シグナル伝達阻害、ERKキナーゼシグナル伝達阻害、JNKキナーゼシグナル伝達阻害、あるいは細胞肥大促進、といった能力をコードする。

【0009】

特に好適な実施形態においては、本発明は細胞にアゴニストまたはアンタゴニストを与えることによって細胞内でAP-1媒介炎症性シグナルを調節する方法を提供する。htrbアゴニストまたはアンタゴニストは、htrbポリペプチド、htrb類似構造ペプチドまたはhtrb核酸とすることができる。本発明の好ましいhtrb核酸アゴニストまたはアンタゴニストは、htrb-1、htrb-1 N htrb-1 C、htrb-1 N C、htrb-3、htrb-1 5' UTRおよびN末端可変領域アンチセンス構造、htrb-3 5' UTRおよびN末端可変領域アンチセンス構造、そしてhtrb-1 3' UTRセンス構造を含む。

10

【0010】

本発明の好ましいhtrbポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、htrb-1、htrb1 N htrb-1 C、htrb-1 N C、htrb-3、htrb-3 N htrb-3 C、そしてhtrb-3 N Cを含む。本発明の方法は、TNF誘導炎症性シグナル、またはインターロイキン誘導炎症性シグナルといったAP-1媒介炎症性シグナルを阻害するのに用いる。本発明の方法はさらに、細胞にhtrbアゴニスト活性を与えることによって細胞内でERK媒介シグナルを活性化する方法を提供する。ERK媒介シグナルはたとえば、AP-1媒介遺伝子活性化シグナル、エストロゲン受容体媒介遺伝子活性化シグナル、FGF誘導シグナル、あるいはPMA誘導シグナルでありうる。

【0011】

特に好適な一実施形態においては、本発明は特定のクローニング過程によってインターロイキン制御遺伝子を同定する方法を提供する。インターロイキン制御遺伝子を同定するために、本発明の過程は：(1)インターロイキン遺伝子または炎症性遺伝子レポーターを含む哺乳類レポーター細胞に、哺乳類cDNAベクターライブラリの低複雑度プールを導入する；(2)遺伝子導入されたレポーター細胞を、ベクターだけを導入した哺乳類レポーター細胞と比較したインターロイキン遺伝子レポーター活性の上昇または低下を用いて導入細胞を特定することにより陽性細胞を得るためにスクリーニングする；そして(3)前記の陽性クローンからの低複雑性プールを再導入し、再導入で得られた陽性クローンからの挿入cDNAを配列決定することによって陽性クローンからインターロイキン制御遺伝子を同定することを含む。インターロイキンまたは炎症性遺伝子レポーターはIL-1A遺伝子レポーター、IL-1B遺伝子レポーター、IL-1RN遺伝子レポーター、またはIL-8遺伝子レポーターでありうる。本発明のこの側面での使用に好ましい細胞は、HeLa細胞、NIH 3T3細胞、Raw細胞、または末梢血リンパ球といった哺乳類細胞を含む。本発明のこの側面での使用に好ましいライブラリは、PBMCライブラリ、HeLa細胞ライブラリ、PMA誘導哺乳類細胞ライブラリ、または、IL-5、TGF- β 、インターフェロン- α 、またはIL-12誘導哺乳類細胞といった他のサイトカイン誘導哺乳類細胞から作られた哺乳類細胞ライブラリのような哺乳類cDNAライブラリを含む。

20

30

【0012】

本発明のこの面の好適な実施形態においては、さらに別の炎症性制御ネットワーク遺伝子を得るために、相互作用過程が用いられる。炎症性シグナル伝達ネットワークを作り出しているインターロイキン制御遺伝子のもう一つの遺伝子ターゲットを同定するために、本発明のこの過程は：最初にインターロイキン制御遺伝子cDNAおよび発現ベクターを含むインターロイキン制御遺伝子クローンを哺乳類細胞集団の中に発現させる；次に前記細胞から発現された遺伝子を示す核酸の集団を単離する；前記細胞からの発現された遺伝子を示す核酸のマイクロアレイ分析によってインターロイキン制御遺伝子発現細胞の遺伝子発現プロファイルを決定する；そして、インターロイキン制御遺伝子発現細胞の中でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされている、前記インターロイキン制御遺伝子以外の遺伝子を同定するために、インターロイキン制御遺伝子クローンを導入された細胞からのmRNA発現の遺伝子発現パターンを、ベクターだけを導入されたものと比較することを含む。好適な実施形態においては、本方法は、遺伝子転写プロファイリングまたは遺伝子発

40

50

現フィンガープリントといったマイクロアレイ分析によって、応答性遺伝子の発現改変を評価する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明は一部、ある哺乳類htrbs遺伝子のクローニングおよび同定、および特定のストレスキナーゼ経路の阻害因子として機能するコードされたhtrbsタンパク質に基づく。htrbs遺伝子は、ショウジョウバエの発生において形態形成と細胞運命決定とともに有糸分裂を調整する、ショウジョウバエtribbles遺伝子の哺乳類相同遺伝子である(非特許文献4および非特許文献5を参照)。本発明はhuman tribbles homologue-1に因んでhtrb-1と名付けられたショウジョウバエtribbles遺伝子のヒト相同遺伝子を提供する。htrb-1遺伝子はまたヒトSKIP1遺伝子としても知られ、核酸配列(配列番号1)および対応するポリペプチド配列(配列番号2)はGenBank Accession NO. AF250310に記載され、図10に示される。配列番号1のヌクレオチド282から1400は、htrb-1ポリペプチド(配列番号2)をコードするhtrb-1遺伝子のORFに対応する。htrb-1遺伝子は、NF- κ BおよびAP-1の両方の誘導にIL-8プロモーター内に存在するこれらの転写活性化因子結合部位を通じて反応するサイトカイン応答性インターロイキン-1(EL-8)遺伝子リポーターの基本的であるが誘導されたものでない活性を阻害する。本発明のhtrb-1遺伝子は、AP-1媒介転写誘導を特異的に阻害し、NF- κ BまたはJAK/STAT媒介転写誘導は阻害しない。従って、本発明のhtrb-1遺伝子は、ストレスキナーゼ誘導経路を調節する便利かつ特異的な手段を提供する。

10

【0014】

分裂促進因子活性化プロテインキナーゼカスケードは幅広い細胞外刺激によって活性化される。しかし、個々の経路は異なる細胞型では異なる反応を示す。この特異性は、ある経路の成分を細胞型特異的に発現することによって部分的に達成しうる。本発明は、MAPK経路の活性に影響する一群の哺乳類tribbles相同遺伝子(htrbs)を提供する。これらのタンパク質の発現は緊密に制御されている(非特許文献6；非特許文献7を参照)。htrbの過剰発現または内因性レベルの抑制はストレスキナーゼ反応性レポーターの阻害に繋がり、これらのタンパク質がMAPK経路の律速成分に相当することを示唆する。htrbの作用機構は、htrb濃度の上昇によって大幅に増強される細胞外シグナル制御キナーゼ(ERKs)のリン酸化の制御を含む。さらに、ERK、JNKおよびp38反応性レポーターの上流キナーゼによる最適活性化は異なる量のhtrbの存在下で達成され、個々のMAPK経路の選択的活性化はhtrb発現の制御によって起こることを示唆する。足場となる構成成分の発現レベルの制御はシグナル伝達反応の幅を制限する効果的な方法である(たとえば非特許文献8；非特許文献9)と示唆する実験的証拠が増えつつあり、数学モデルに支持されている(非特許文献10を参照)。我々の観察に基づき、我々はhtrbタンパク質が足場でありMAPK媒介細胞反応の動力学を制御しているモデルを提案する。本発明はさらに、それぞれ41%および51%がhtrb-1遺伝子と同一である、htrb-2およびhtrb-3 genesを提供する。htrb-3遺伝子はまたヒトSKIP3遺伝子としても知られ、核酸配列(配列番号3)および対応するポリペプチド配列(配列番号4)がGenBank Accession NO. AF250311に記載され、図11に示される。配列番号3のヌクレオチド1から1083がhtrb-3のORFに対応し、したがって、配列番号4に対応するhtrb-3ポリペプチドをコードする。本発明はまたさらに、炎症性シグナル伝達を制御するためにこれらの構成成分を用いる方法を提供する。

20

30

40

【0015】

本発明はさらに、炎症性シグナル伝達ネットワークの構成成分である他の遺伝子をクローニングし同定するための方法を提供する。好適な実施形態においては、この方法は、インターロイキン遺伝子レポーターの基本的または誘導された濃度の増加もしくは減少の効果を示す遺伝子についてcDNAの低複雑性プールをスクリーニングすることを含む。ある実施形態では、本発明の方法は、インターロイキン8(IL-8)レポーター構造のようなサイトカイン反応性レポーター構造の活性を調節する遺伝子産物についての発現スクリーニングを含む。インターロイキン(EL)-8は、そのGタンパク質結合受容体CXCR1およびCXCR2を通して急性炎症において重要な役割を果たすC-X-Cケモカインである。特に好適な実施形態に

50

においては、さらに遺伝子ネットワークの構成成分は、このように同定されたインターロイキン制御遺伝子を用いたマイクロアレイ分析を含む反復過程によってクローンされ同定される。バイオテクノロジービジネスのこれらの方法の目的は、自己免疫および炎症性疾患の経過の制御のための幅広い薬物ターゲットを同定することを含む。さらに先の目標は、自己免疫または炎症性疾患の経過を制御するために、炎症性遺伝子ネットワーク中の任意の一個またはそれ以上の点で、単独または協同して作用しうる分子アゴニストおよびアンタゴニストの設計を含む。

【0016】

定義

便宜上、本明細書、実施例、および付属の請求項で用いたある用語および語句の意味を下記に示す。 10

【0017】

「異常な活性」の語は、htrbといったポリペプチドの活性について当てはめられるとき、野生型または天然ポリペプチドの活性と異なる、または健康被験者のポリペプチドの活性と異なる活性を指す。ポリペプチドの活性は、その天然の対応物の活性より強いために異常でありうる。あるいは、活性はその天然の対応物の活性と比べて弱いかまたは存在しないために異常でありうる。異常な活性はまた活性の変化でありうる。たとえば、異常なポリペプチドは別の標的ペプチドと相互作用しうる。細胞は、htrbをコードする遺伝子の過剰発現または低発現のために、異常なhtrb活性を有しうる。

【0018】

「アゴニスト」の語は、ここで用いられるように、htrb生物活性を模倣しまたはアップレギュレートする(たとえば増強しまたは補う)物質を指すことを意図する。htrbアゴニストは、野生型htrbタンパク質、または野生型htrbの少なくとも一つの生物活性、たとえばAP-1活性化阻害活性を有するその誘導体でありうる。htrb治療薬はまた、htrb遺伝子の発現をアップレギュレートする化合物か、またはhtrbタンパク質の少なくとも一つの生物活性を増加させるものでありうる。アゴニストはまた、htrbポリペプチドと、たとえばEL-1タイプIまたはタイプII受容体といったもう一つの分子との相互作用を増加させる化合物でありうる。そのようなアゴニストは、たとえば、htrbのMAPKへの結合を増加させ、それによってMAPK媒介炎症性シグナルのhtrb依存性阻害を促進する。あるいは、htrbアゴニストはのMAPKへの結合を増加させうる。 20 30

【0019】

「対立遺伝子」の語は、ここでは「対立変異体」と相互に交換しうるよう用いられ、遺伝子またはその一部分の選択的な形を指す。対立遺伝子は同一の相同染色体上の遺伝子座つまり位置を占める。被験者がある遺伝子の二個の同一の対立遺伝子を持つとき、その被験者は当該遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合であるという。被験者がある遺伝子の二個の異なる対立遺伝子を持つとき、その被験者は当該遺伝子または対立遺伝子についてヘテロ接合であるという。特定遺伝子の対立遺伝子は互いに単一ヌクレオチド、または数個のヌクレオチドで異なり得、またヌクレオチドの置換、欠失、挿入を含みうる。しばしば起こる配列変異はトランジション変異(つまりプリンからプリンの置換、ピリミジンからピリミジンの置換、たとえばAからGまたはCからT)、トランスバージョン変異(つまりプリンからピリミジン、およびピリミジンからプリンの置換、たとえばAからTまたはCからG)、そして反復DNA配列変化(たとえば三塩基反復およびその他のタンデムリピート配列の延長または短縮)を含む。ある遺伝子の対立遺伝子はまた変異を含む遺伝子の形でありうる。「htrb遺伝子の多型領域の対立変異体」の語は、別の個人のその遺伝子領域でみられる一または数個のヌクレオチド配列を有するhtrb遺伝子の一つの領域を指す。 40

【0020】

ここで用いられる「アンタゴニスト」は、少なくとも一つのhtrb生物活性をダウンレギュレートする(たとえば抑制または阻害する)物質を指すことを意図する。htrbアンタゴニストは、htrbタンパク質と、たとえばMARKといったもう一つの分子との間の相互作用を阻害または低下させる化合物でありうる。アンタゴニストはまた、htrb遺伝子の発現をダウン 50

レギュレートする化合物かまたは、存在するhtrbタンパク質の量を減少させるものでありうる。htrbアンタゴニストはhtrbポリペプチドの優性阻害型、たとえば、標的ペプチドと相互作用できるhtrbポリペプチドの一つの形でありうる。htrbアンタゴニストはまた、htrbポリペプチドの優性阻害型をコードする核酸、htrbアンチセンス核酸、または特異的にhtrbRNAと相互作用できるリボザイムでありうる。さらに別のhtrbアンタゴニストは、htrbポリペプチドと結合しその作用を阻害する分子でありうる。そのような分子は、たとえば、生物活性を有しないhtrb標的ペプチドの形、およびAP-1転写因子といったhtrb標的分子への結合を阻害するものといったペプチドを含む。

【0021】

ここで用いられる「抗体」の語は、たとえば任意のアイソタイプ(IgG、IgA、IgM、IgE、など)の完全な抗体を含むことを意図し、そしてまた脊椎動物たとえば哺乳類タンパク質と特異的に反応するその断片を含む。抗体は従来の方法で断片化することができ、その断片は同じ方法で完全な抗体について上記に示した通り実用のためにスクリーニングされる。したがってこの語は、あるタンパク質と選択的に反応できる、タンパク質分解によって切断したかまたは抗体分子の組み換えによって作成された部分の断片を含む。そのようなタンパク質分解および／または組み換え断片の限定されない例は、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、およびペプチドリンカーで結合したV[L]および／またはV[H]領域を含む一本鎖抗体(scFv)を含む。scFvは共有結合または非共有結合で二またはそれ以上の結合部位を有する抗体を形成しうる。本発明はポリクローナル、モノクローナル、またはその他の抗体および組み換え抗体の精製調製物を含む。

10

20

【0022】

核酸の異常な発現「に伴う」または「に特徴づけられる」疾患、病気、あるいは状態は、核酸の発現の異常なレベルによって生じたか、それが寄与しているか、またはそれが原因となった患者の疾患、病気、あるいは状態を指す。

【0023】

ここで用いられる「htrbポリペプチドの生物活性断片」は、断片が特に野生型htrbポリペプチドの活性を模倣または拮抗する完全長htrbポリペプチド断片を指す。生物活性断片は好ましくはMAPKと相互作用できる断片である。

【0024】

「生物学的活性」または「生物活性」または「活性」または「生物機能」は、互いに交換可能に用いられ、ここでの目的では、htrbポリペプチド(その未変性または変性コンホメーションで)、またはその任意の部分配列によって直接または間接に発揮されるエフェクターもしくは抗原機能を意味する。生物活性は、たとえばMAPK、好ましくはERKといった標的ペプチドへの結合を含む。htrb生物活性はhtrbポリペプチドに直接干渉することで調節しうる。あるいは、htrb生物活性は、たとえばhtrb遺伝子の発現を調節することによって、htrbポリペプチドの濃度を調節することによって調節しうる。

30

【0025】

「バイオマーカー」の語は、その存在または濃度が検出できた疾患状態のような既知の状態と相関する、たとえば核酸、ペプチド、ホルモン、などといった生物分子を指す。

【0026】

「細胞」、「宿主細胞」または「組み換え宿主細胞」はここでは相互に交換しうるよう利用される用語である。これらの用語は特定の対象細胞だけでなくその子孫またはそのような細胞の潜在的な子孫も指す。変異または環境の影響によってある修飾が後の世代に起こりうるため、そのような子孫は、実際、お野菜棒と同一ではない可能性があるが、なおここで用いられる用語の範囲に含まれる。

40

【0027】

「キメラポリペプチド」または「融合ポリペプチド」は対象のhtrbポリペプチドの一つをコードする最初のアミノ酸配列と、htrbポリペプチドとは無関係でまたどの領域とも本質的に相同でない第二のアミノ酸配列定義領域(たとえばポリペプチド部分)との融合である。キメラポリペプチドは、第一のポリペプチドも発現している生物に(別のポリペプチド

50

中であっても)みられる無関係の領域に存在しえ、また異なる種類の生物によって発現されるポリペプチド構造の「種間」、「遺伝子間」、などの融合でありうる。一般的に、融合ポリペプチドは一般式X-htrb-Yで表すことができ、ここでhtrbはhtrbポリペプチドから得られたポリペプチドの一部を示し、XおよびYは独立して、存在しないかまたは、自然発生変異体を含め、ある生物においてhtrb配列に関係しないアミノ酸配列を示す。

【0028】

「送達複合体」はターゲッティング方法(たとえば標的細胞表面への遺伝子、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのより親和性の高い結合および／または標的細胞による細胞内または核内取り込みの増大をもたらす分子)を意味する。ターゲッティング方法の例には：ステロール類(たとえばコレステロール)、脂質(たとえば陽イオン性脂質、バイロソームまたはリポソーム)、ウイルス(たとえばアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、およびレトロウイルス)または標的細胞特異的結合物質(たとえば標的細胞特異的受容体に認識されるリガンド)が含まれる。好ましい複合体は、標的細胞による内在化の前の顕著な解離を防ぐため、*in vivo*で十分に安定である。しかし、遺伝子、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドが機能する形で放出されるように、複合体は適当な条件下で細胞内で切断しうる。

10

【0029】

よく知られているように、遺伝子は各個体のゲノム内で単一または複数コピーで存在しうる。そのような複製遺伝子は同一でありえ、またはヌクレオチド置換、付加または欠失を含むある修飾を有する可能性があり、それはすべてなお実質的に同じ活性を有するポリペプチドをコードする。「htrbポリペプチドをコードするDNA配列」はしたがって、特定個体の中の一またはそれ以上の遺伝子を指しうる。

20

【0030】

さらに、生物個体間でヌクレオチド配列中にある差異が存在しえ、これは対立遺伝子と呼ばれる。そのような対立遺伝子差はコードされたポリペプチドのアミノ酸配列の差を生じなお同じ生物学的活性を持つポリペプチドをコードする結果になりまたならない可能性がある。

【0031】

「同等な」の語は機能的に同等なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むと理解される。同等なヌクレオチド配列はたとえば対立遺伝子変異体のように一またはそれ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失で異なる配列を含み；したがって、たとえば遺伝子コードの縮重のために、配列番号1および3に示された核酸のヌクレオチド配列とは異なる配列を含む。

30

【0032】

ここで用いられる「ハプロタイプ」の語は、統計的に有意な水準で一緒にグループとして受け継がれる(連鎖不均衡にある)対立遺伝子の組を指すことが意図される($P_{corr} < 0.05$)。ここで用いられるように、「htrbハプロタイプ」の語句は、htrb遺伝子配列の多型変異を含みうるhtrb遺伝子座のハプロタイプを指す。

【0033】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、二つのペプチド間または二つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較の目的で並べられた個々の配列のある位置を比較することで測定しうる。比較された配列のある位置が同一の塩基またはアミノ酸で占められているとき、それらの分子はその位置で同一である。核酸配列間の相同性または類似性または同一性の程度は、核酸配列に共通する位置の同一のつまりマッチするヌクレオチドの数の関数である。アミノ酸配列の同一性の程度は、アミノ酸配列に共通する位置の同一のアミノ酸の数の関数である。アミノ酸配列の相同性または類似性の程度は、アミノ酸配列に共通する位置の、つまり構造的に関連するアミノ酸の数の関数である。「非関連」または「非相同」配列は、本発明のhtrb配列の一つについて同一性が40%より小さく、しかし好ましくは同一性が25%より小さい。ここで用いられるように、「htrb」の語はショウジョウバエtribbles遺伝子の哺乳類相同遺伝子、またはその同等なものを指す。ここで

40

50

用いられるように、htrbの語は、そのストレスキナーゼ阻害活性に基づくhtrbの別名である「SKIP」遺伝子またはタンパク質の語と相互に交換しうるように用いられている(すなわちStress Kinase Inhibitor ProteinのSKIPであり、ここでhtrb-1はSKIP-1と相互に交換しうるように用いられている)。さらにここで用いられるように、htrb-3遺伝子はまたSKIP-3遺伝子とも言われる。

【0034】

「htrb核酸」の語は、配列番号1または3を有する核酸またはその断片、その相補体、およびその誘導体といったhtrbタンパク質をコードする核酸を指す。

【0035】

「htrbポリペプチド」および「htrbタンパク質」の語は、配列番号1または3他に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその断片、およびその相同遺伝子を含み、またアゴニストおよびアンタゴニストポリペプチドを含む。 10

【0036】

「htrb結合パートナー」または「htrbBP」は、htrbタンパク質と結合するさまざまな細胞タンパク質を指す。

【0037】

「htrb治療薬」の語は、htrbポリペプチドのさまざまな形、また類似構造ペプチド、核酸、または小分子であって、htrbポリペプチドの少なくとも一つの活性、たとえばhtrb受容体との相互作用および／または受容体補因子との相互作用、を天然htrbポリペプチドの作用を模倣または増強する(作用する)または阻害する(拮抗する)ことによって調節できるものを指す。野生型htrbポリペプチドの活性を模倣または増強するhtrb治療薬は「htrbアゴニスト」である。逆に、野生型htrbポリペプチドの活性を阻害するhtrb治療薬は「htrbアンタゴニスト」である。 20

【0038】

「増大するリスク」は、特定の多型対立遺伝子を持たない集団の構成員における疾患または状態の出現頻度と比較して、特定の多型対立遺伝子を持つ個体における疾患または状態の統計的に高い出現頻度を指す。

【0039】

ここで用いられる「相互作用する」の語は、自然状態でのタンパク質-タンパク質、タンパク質-核酸、核酸-核酸、およびタンパク質-小分子または核酸-小分子間の相互作用といった、分子間の検出可能な関係または関連(たとえば生化学的相互作用)を含むことを意図する。 30

【0040】

DNAまたはRNAといった核酸についてここで用いられる「単離された」の語は、その巨大分子の自然の起源中に存在する他のDNAまたはRNAからそれぞれ分離された分子を指す。たとえば、対象htrbポリペプチドの一つをコードする単離された核酸は、好ましくは天然にはゲノムDNA中でhtrb遺伝子に直接隣り合う核酸配列の10キロ塩基(kb)しか含まず、より好ましくはそのような自然にみられる隣接配列の5kbしか含まず、そして非常に好ましくはそのような自然にみられる隣接配列の1.5kb未満を含む。ここで用いられる単離されたの語はまた、組み換えDNA技術で生産された場合は細胞物質、ウイルス物質、または培地を実質的に含まない、あるいは化学的に合成された場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはペプチドを指す。さらに、「単離された核酸」は、断片としては自然に発生せず自然状態ではみられない核酸断片を含むことを意図する。「単離された」の語はまた他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドを指すようにここで用いられ、精製および組み換えポリペプチドの両方を含むことを意図する。 40

【0041】

「ノックイン」遺伝子導入動物は、そのゲノムに導入された修飾遺伝子を有する動物を指し、その修飾遺伝子は外因性または内因性起源でありうる。

【0042】

「ノックアウト」遺伝子導入動物は、内因性遺伝子の発現の部分的または完全な抑制(た 50

たとえば、少なくとも遺伝子の一部の欠失、別の配列による少なくとも遺伝子の一部の置換、終止コドンの導入、決定的なアミノ酸をコードする塩基の変異、またはイントロン結合部の除去、などに基づく)がある動物を指す。好適な実施形態において、修飾された内因性遺伝子に対応する「ノックアウト」遺伝子遺伝子座は、機能するポリペプチド活性をもうコードせず、「無効」対立遺伝子と呼ばれる。したがって、本発明のノックアウト遺伝子導入動物は、htrb無効対立遺伝子ヘテロ接合動物のように一つのhtrb遺伝子無効変異を有するもの、およびhtrb無効対立遺伝子ホモ接合動物のように二つのhtrb遺伝子無効変異を有するものを含む。

【0043】

「ノックアウト構造」は、細胞の内因性DNA配列によってコードされたタンパク質の発現を低下または抑制するのに用いることができる核酸配列を指す。簡単な例では、ノックアウト構造はhtrb遺伝子のような遺伝子からなり、そこから活性なタンパク質が発現できないように遺伝子の決定的な部分に欠失を有する。あるいは、いくつかの終止コドンを天然の遺伝子に加え、タンパク質を早く終止させまたはイントロン結合を不活性化させることができる。典型的なノックアウト構造では、遺伝子の一部が選択マーカー(たとえばneo遺伝子)で置換されているので、遺伝子は次のように表すことができる：htrb5' /neo/htrb3'、ここでhtrb5'およびhtrb3'は、htrb遺伝子の一部と比べてそれぞれ上流および下流にあるゲノムまたはcDNA配列を指し、neoはネオマイシン耐性遺伝子を指す。別のノックアウト構造では、もう一つの実験マーカーが隣接位置に加えられているので、遺伝子は次のように表すことができる：htrb/neo/htrb/TK、ここでTKはチミジンキナーゼ遺伝子であって、先の構造のhtrb5'またはhtrb3'配列のどちらかに加えることができ、さらに適当な培地中でこれに対して選択することができる(すなわち陰性選択マーカーである)。この2マーカー構造によって、隣接するTKマーカーを除去する相同組み換え現象を、典型的にはTK配列を保持する非同相組み換え現象から選択することが可能である。遺伝子欠失および/または置換はエキソン、イントロン、特にイントロン結合部、および/またはプロモータのような調節領域からでありうる。

【0044】

「連鎖不均衡」は、あるコントロール集団において二つの対立遺伝子が個々の対立遺伝子の別々の出現頻度から予測されるより大きい頻度で共に遺伝することを指す。独立して遺伝する二つの対立遺伝子の予想出現頻度は、第一の対立遺伝子の頻度に第二の対立遺伝子の頻度をかけたものである。予想された頻度で共に出現する対立遺伝子は「連鎖均衡」にあるといわれる。連鎖不均衡の原因はしばしば不明である。それはある対立遺伝子の組み合わせについての選択、または遺伝的に不均一な集団との最近の混合による可能性がある。さらに、疾患遺伝子と非常に密に連鎖したマーカーの場合は、疾患変異が近い過去に起こったので特定の染色体領域での組み換え現象を通じて平衡に達するための十分な時間が経っていないと、対立遺伝子(または連鎖した対立遺伝子の群)と疾患遺伝子との関連が予測される。一より多い対立遺伝子から成る対立遺伝子パターンをいうとき、第一の対立遺伝子パターンを構成するすべての対立遺伝子が第二の対立遺伝子パターンの少なくとも一つの対立遺伝子と連鎖不均衡にあるならば、第一の対立遺伝子パターンは第二の対立遺伝子パターンと連鎖不均衡にある。連鎖不均衡の一例は、IL-1RN(+2018)の対立遺伝子とIL-1RN(VNTR)多型部位との間に生じるものである。IL-1RN(+2018)の二つの対立遺伝子はEL-1RN(VNTR)の二つの非常に頻度の高い対立遺伝子、これらは対立遺伝子1および対立遺伝子2であるが、これらと100%連鎖不均衡にある。

【0045】

「マーカー」の語は、個体間で異なることが知られているゲノム中の配列を指す。たとえば、IL-1RN遺伝子はタンデムリピート数変異(VNTR)から成るマーカーを有する。

【0046】

ここで用いられる「調節」の語はアップレギュレーション(すなわち、活性化または刺激(たとえば、作用するまたは増強することによって))およびダウンレギュレーション(すなわち阻害または抑制(たとえば、拮抗する、減少させるまたは阻害することによって))の

10

20

30

40

50

両方を指す。

【0047】

「変異遺伝子」の語は、変異遺伝子を有しない対象と比較して変異遺伝子を有する対象の表現型を変化させることのできる遺伝子の対立遺伝子の形を指す。ある対象がこの変異について変化した表現型を持つにはホモ接合でなければならない場合、その変異は劣性であるといわれる。対象の表現型を変化させるのに変異遺伝子の一コピーで十分である場合、その変異は優性であるといわれる。対象が変異遺伝子の一コピーを有し(その遺伝子について)ホモ接合とヘテロ接合の中間の表現型を有する場合、その変異は相互優性であるといわれる。

【0048】

本発明の「非ヒト動物」は、げっ歯類、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシといった哺乳類、ニワトリ、両生類、爬虫類、などを含む。好ましい非ヒト動物はラットおよびマウスを含むげっ歯類から選択され、非常に好ましくはマウスであるが、Xenopus属の仲間のような遺伝子導入両生類、および遺伝子導入ニワトリもまた、たとえば胚発生や組織形成を理解しそれらに影響する物質を同定する重要な手段を提供することができる。「キメラ動物」の語はここでは、組み換え遺伝子がみられる動物または組み換え遺伝子が個体のすべてではなく一部の細胞で発現している動物を指すように用いられる。「組織特異的キメラ動物」の語は、一部の組織で組み換え遺伝子の一つが存在するおよび／または発現しているまたは妨害されているが他の組織ではみられないことを指す。

【0049】

ここで用いられるように、「核酸」の語はポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、たとえばデオキシリボ核酸(DNA)および、適当な場合は、リボ核酸(RNA)を指す。この語はまた、同等なものとして、ヌクレオチドアナログから作られ、記載の実施例にあてはまるような、一本鎖(センスまたはアンチセンス)および二本鎖ポリヌクレオチドRNAまたはDNAアナログを含むと解されるべきである。

【0050】

「配列番号xに示すヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列」の語は、配列番号xを有する核酸鎖の相補鎖のヌクレオチド配列を指す。「相補鎖」の語はここでは「相補体」の語と交換可能に用いられる。核酸鎖の相補体はコード鎖の相補体または非コード鎖の相補体でありうる。二本鎖核酸をいうとき、配列番号xを有する核酸の相補体は、配列番号xを有する鎖の相補鎖、または配列番号xの相補鎖のヌクレオチド配列を有する任意の核酸を指す。ヌクレオチド配列 配列番号xを有する一本鎖核酸をいうとき、この核酸の相補体は、配列番号xのヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸である。ヌクレオチド配列およびその相補配列は常に5'から3'方向で与えられる。

【0051】

「パーセント同一」の語は、二つのアミノ酸配列間または二つのヌクレオチド配列間の配列同一性を指す。同一性は、比較の目的で並べられた個々の配列のある位置を比較することによって決定しうる。比較された配列の同等な位置が同一の塩基またはアミノ酸で占められているとき、それらの分子はその位置について同一である；同等な部位が同一または類似のアミノ酸残基で占められているとき(たとえば、立体的および／または電気的性質が類似である)、それらの分子はその部位について相同(類似)であるといえることができる。相同性、類似性、または同一性のパーセンテージとしての発現は、比較された配列に共通する位置の、同一または類似のアミノ酸の数の関数を指す。相同性、類似性、または同一性のパーセンテージとしての発現は、比較された配列に共通する位置の、同一または類似のアミノ酸の数の関数を指す。FASTA、BLAST、またはENTREZを含むさまざまな配置アルゴリズムおよび／またはプログラムを用いることができる。FASTAおよびBLASTはGCG配列分析パッケージ(University of Wisconsin, Madison, Wis.)の一部として利用可能であり、たとえばと現在の設定と共に用いることができる。ENTREZはNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Mdを通じて利用可能である。一実施形態では、二つの配列のパーセント同

10

20

30

40

50

一性は、たとえば、二つの配列間の単一のアミノ酸またはヌクレオチドミスマッチであるように個々のアミノ酸ギャップが重みづけられる、ギャップ重み1としたGCGプログラムによって決定することができる。

【0052】

配置の他の技術は非特許文献11に記載されている。好ましくは、配列を配置するのに、配列中のギャップを容認する配置プログラムが用いられる。Smith-Watermanは配列配置中にギャップを容認するアルゴリズムの一つの形である。非特許文献12を参照。また、Needleman and Wunsch配置方法を用いるGAPプログラムを利用して配列を配置することができる。他の検索戦略は、MASPARコンピュータ上で動作するMPSRCHソフトウェアを用いる。MPSRCHは超並列コンピュータ上でSmith-Watermanアルゴリズムを用いて配列スコアを付ける。この手法は、遠く関連した組み合わせを拾い出す能力を改善し、特に小さなギャップおよびヌクレオチド配列エラーに耐性である。核酸にコードされたアミノ酸配列を、タンパク質とDNAデータベース両方の検索に用いることができる。

【0053】

個々の配列を含むデータベースが上記の非特許文献11に記載されている。データベースにはGenbank、EMBL、DNA Database of Japan(DDBJ)が含まれる。

【0054】

好ましい核酸は、本発明の配列番号の一に示された配列の核酸配列と、少なくとも70%、より好ましくは80%同一な、そしてより好ましくは90%そしてさらにより好ましくは少なくとも95%同一な配列を有する。配列番号1から2の一つに示された核酸配列と、少なくとも90%、より好ましくは95%、そして非常に好ましくは少なくとも約98~99%同一な核酸は、もちろん本発明の範囲内である。好適な実施形態においては、核酸は哺乳類のものである。新しい核酸を既知の配列と比較するとき、いくつかの配置ツールが利用できる。例にはPileUpが含まれ、これは複数の配列配置を作成するもので、非特許文献13に記載されている。別の方法であるGAPは、非特許文献14の配置方法を用いる。GAPは配列の全体配置に最も適している。第三の方法であるBestFitは、非特許文献15の部分相同性アルゴリズムを用いて、ギャップを挿入することによってマッチの数を最大化するように働く。

【0055】

「多型」の語は、遺伝子またはその一部(たとえば、対立遺伝子変異体)一つより多い形の共存を指す。少なくとも二つの異なる形がある遺伝子の一部、すなわち二つの異なるヌクレオチド配列は、「遺伝子の多型領域」といわれる。多型領域は、異なる対立遺伝子ではその同一性が異なる単一ヌクレオチドでありうる。多型領域はまた、数ヌクレオチドの長さでありうる。

【0056】

「多型遺伝子」は、少なくとも一つの多型領域を有する遺伝子を指す。

【0057】

ここで用いられるように、「プロモータ」の語は、動作するようにプロモータに結合した、選択されたDNA配列の発現を制御するDNA配列を意味し、またこれは細胞中で選択されたDNA配列の発現に作用する。この語は「組織特異的」プロモータ、すなわち特異的細胞(たとえば特定の組織の細胞)においてのみ選択されたDNA配列の発現に作用するプロモータを含む。この語はまた、選択されたDNA配列の発現を主に一つの組織中で調節するが、他の組織でも発現を引き起こす、いわゆる「リーキー」プロモータも含む。この語はまた、非組織特異的プロモータおよび構成的に発現するまたは誘導可能な(つまり、発現レベルを制御しうる)プロモータを含む。

「疾患傾向」、また疾患「素因」あるいは「感受性」または任意の類似した語句は、あるhtrb遺伝子座多型対立遺伝子が特定の疾患に関連しているまたは予測となることが発見されたことを意味する。対立遺伝子はしたがって、健常陣と比べて疾患を有する個人で過剰な頻度に表示される。ゆえに、これらの対立遺伝子は、発症前または罹患前の個人においてさえ疾患を予測するのに用いることができる。

【0058】

「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」の語は、遺伝子産物をいうときはここでは相互に交換しうるように用いられる。

【0059】

「組み換えタンパク質」の語は、組み換えDNA技術によって作られた本発明のポリペプチドを指し、そこでは一般的にはhtrbポリペプチドをコードするDNAが適当な発現ベクターに挿入され、それが今度は宿主細胞を形質転換し異種タンパク質を産生させるのに用いられる。さらに、「に由来する」の語は、組み換えhtrb遺伝子に関しては、is meant to include「組み換えタンパク質」の意味の中で、天然htrbポリペプチドのアミノ酸配列、またはそのポリペプチドの自然に見られる形の、置換および欠失(欠落を含む)を含む変異によって生じたそれと類似のアミノ酸配列を有するタンパク質を含むことを意図する。

10

【0060】

「小分子」は、ここで用いられるように、約5kD未満の分子量を有し、そして非常に好ましくは約4kD未満の分子量を有する組成物を指すことを意図する。小分子は can be 核酸、ペプチド、ポリペプチド、類似構造ペプチド、炭水化物、脂質または他の有機(炭素を含む)または無機分子でありうる。多くの製薬会社は化学および/または、しばしば真菌、細菌、または藻類抽出物である生物学的混合物の大規模なライブラリを有しており、それはhtrb生物活性を調節する化合物を同定するために本発明の任意の検定法を用いてスクリーニングされうる。

【0061】

ここで用いられるように、「特異的にハイブリダイズする」または「特異的に検出する」の語は本発明の核酸分子が、脊椎動物、好ましくはhtrb遺伝子の連続する少なくとも約6、12、20、30、50、100、150、200、300、350、400または425ヌクレオチドとハイブリダイズする能力を指す。

20

【0062】

「転写調節配列」は本明細書を通じて用いられる総称的な語であり、作用のために結合したタンパク質コード配列の転写を誘導または制御する、たとえば開始シグナル、エンハンサー、およびプロモータといったDNA配列を指す。好適な実施形態においては、htrb遺伝子のひとつの転写は、発現が意図される細胞型における組み換え遺伝子発現を制御するプロモータ配列(または他の転写調節配列)の制御下にある。組み換え遺伝子は、htrbポリペプチドの天然に見られる形の転写を制御する配列と同一または異なる転写調節配列の制御

30

【0063】

ここで用いられるように、「導入」の語は、たとえば、発現ベクターを介した受容細胞への核酸媒介遺伝子伝達による核酸の導入を意味する。「形質転換」は、ここで用いられるように、外因性DNAまたはRNAの細胞内取り込みの結果として細胞の遺伝子型が変化する過程を指し、そして、たとえば、形質転換した細胞はhtrbポリペプチドの組み換え形を発現するかまたは、導入遺伝子からのアンチセンス発現の場合は、htrbポリペプチドの天然にみられる形の発現は妨害される。

【0064】

ここで用いられるように、「導入遺伝子」の語は、細胞に導入された核酸配列(たとえば、htrbポリペプチドの一つ、またはそのアンチセンス転写物をコードする)を意味する。導入遺伝子は、導入される遺伝子導入動物または細胞にとって部分的にまたは完全に異種であるすなわち外来であるか、あるいは導入される遺伝子導入動物または細胞の内因性遺伝子に相同であるが挿入される細胞のゲノムを変化させるような方法でその動物のゲノムに挿入されるように設計されているかまたは挿入される(たとえば、天然の遺伝子とは異なる位置に挿入されるかまたはその挿入の結果としてノックアウトが起こる)。導入遺伝子はまたエピソードの形で細胞内に存在しうる。導入遺伝子は一またはそれ以上の転写調節配列および、選択された核酸の最適発現に必要でありうるたとえばイントロンのような任意の他の核酸を含みうる。

40

【0065】

50

「遺伝子導入動物」は、その動物の細胞の一またはそれ以上がたとえば既知の遺伝子導入技術によって人為的に導入された異種核酸を含む任意の動物、好ましくは非ヒト哺乳類、鳥類または両生類を指す。核酸は直接または間接に、遺伝子導入によって細胞の前駆体へ、マイクロインジェクションによってまたは組み換えウイルス感染にによってといった意図的な遺伝子操作で、細胞へ導入される。遺伝子操作は、古典的な交配、またはin vitro受精を含まず、組み換えDNA分子の導入を指す。この分子は染色体内に一体化される可能性があり、または余分の染色体のように複製されるDNAである可能性がある。ここに記載する典型的な遺伝子導入動物では、導入遺伝子はES細胞に、たとえばアゴニストまたはアンタゴニストのいずれかの形の、htrbポリペプチドの組み換え形を発現させる。しかし、組み換え htrb遺伝子がサイレントである遺伝子導入動物もまた考えられ、例としては下記に示すFLPまたはCREリコンビナーゼ依存性構造である。さらに、「遺伝子導入動物」はまた、一またはそれ以上のhtrb遺伝子の遺伝子妨害が、組み換えおよびアンチセンス技術の両方を含む人為的方法で引き起こされた組み換え動物も含む。

10

【0066】

ここで用いられる「治療」の語は、状態または疾患の少なくとも一つの症状を治癒ならびに改善を含むことを意図する。

【0067】

「ベクター」の語は、連鎖した別の核酸を輸送することのできる核酸分子を指す。好ましいベクターの一つの型は、エピソーム、すなわち過剰染色体の複製が可能な核酸である。好ましいベクターは、自律的複製および／または連鎖した核酸の発現を行うことのできるものである。作用のために連鎖している遺伝子の発現を支持することのできるベクターはここでは「発現ベクター」と呼ばれる。一般的に、組み換えDNA技術で有用な発現ベクターはしばしば「プラスミド」の形でありこれは一般的に、ベクターの形では染色体に結合していない環状二本鎖DNA環を指す。プラスミドはベクターのもっとも広く用いられる形であるため、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は相互に交換しうるように用いられる。しかし、本発明は、同等な機能を発揮し後に既知となる他の形の発現ベクターを含むことを意図する。

20

【0068】

「野生型対立遺伝子」の語は、二つのコピーが対象に存在するとき結果として野生型表現型を生じる、ある遺伝子の対立遺伝子を指す。遺伝子中のあるヌクレオチド変化は、そのヌクレオチド変化を有する遺伝子の二つのコピーを有する対象の表現型に影響しない可能性があるため、ある特定の遺伝子にはいくつかの異なる野生型対立遺伝子が存在しうる。

30

【0069】

4.3. 本発明の核酸

本発明はhtrb核酸、その相同遺伝子、およびその一部を提供する。好ましい核酸は、たとえばGenBank Accession Nos.: htrb-1(AF250310)およびhtrb-3(AF250311)を有するhtrb核酸の配列番号 1または3の一つに示す配列またはその相補体のようなhtrb遺伝子のヌクレオチド配列と、少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、そしてより好ましくは85%相同そしてより好ましくは90%そしてより好ましくは95%そしてさらにより好ましくは少なくとも99%相同である配列を有する。配列番号1または3に示す核酸配列またはその相補体と、少なくとも90%、より好ましくは95%、そして非常に好ましくは少なくとも約98~99%同一である核酸もまた、もちろん本発明の範囲内にある。好適な実施形態においては、その核酸は哺乳類由来であり、そして特に好適な実施形態においては、htrb-1およびhtrb-3のOKFにそれぞれ対応する配列番号1または3に示す核酸のコード領域に対応するヌクレオチド配列のすべてまたは一部を含む。

40

【0070】

本発明はさらに、htrb遺伝子の哺乳類相同遺伝子の両方にコードされた、htrb転写物の3' UTR(非翻訳領域)にみられる進化上保存された核酸配列を提供し、これはさらに詳細に下記の実施例に記載する。

50

【0071】

本発明はまた、htrbポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、そのような核酸の変異体および／または同等なものを含む単離された核酸に関する。同等なの語は、機能的に同等なhtrbポリペプチドまたは、ここに記載するようなhtrbタンパク質の活性を有する機能的に同等なペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むと理解される。同等なヌクレオチド配列は、対立遺伝子変異体のように一またはそれ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失で異なる配列を含み；したがって、遺伝子コードの縮重のために配列番号1、2、3、または4に示すhtrb遺伝子のヌクレオチド配列と異なる配列を含む。

【0072】

好ましい核酸は脊椎動物htrb核酸である。特に好ましい脊椎動物htrb核酸は哺乳類のものである。生物種にかかわらず、特に好ましいhtrb核酸は、脊椎動物htrbタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも60%、65%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、90%、または95%類似または同一のポリペプチドをコードする。一実施形態では、核酸は対象のhtrbポリペプチドの少なくとも一つの生物活性を有するポリペプチドをコードするcDNAである。好ましくは、核酸は配列番号1または3の核酸に対応するヌクレオチド配列のすべてまたは一部を含む。

10

【0073】

本発明のさらに他の好ましい核酸は、少なくとも2、5、10、25、50、100、150または200アミノ酸残基を含むhtrbポリペプチドをコードする。たとえば、そのような核酸は約50、60、70、80、90、または100塩基対を含みうる。また、プローブ/プライマーまたはアンチセンス分子(すなわち非コード核酸分子)として用いられる少なくとも長さ約6、12、20、30、50、60、70、80、90または100塩基対を含みうる核酸分子は、本発明の範囲内にある。

20

【0074】

本発明の別の側面は、ストリンジェントな条件下で配列番号1または3で示される核酸またはその相補体またはATCC Designation No. XXXXXXまたはNo. XXXXXXを有する核酸とハイブリダイズする核酸を提供する。DNAハイブリダイゼーションを促進する適当なストリンジェントな条件、たとえば、約45℃で6.0x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、続いて50℃で2.0xSSCで洗浄、は当業者に既知であり、または非特許文献16または非特許文献17に見ることができる。たとえば、洗浄段階の塩濃度は2.0xSSCの低ストリンジェントから50℃で約0.2xSSCの高ストリンジェントまでから選択することができる。さらに、洗浄段階の温度は低ストリンジェントな条件の室温約22℃から高ストリンジェントな条件の約65℃まで上げることができる。温度および塩の両方を変化させることができ、または温度および塩濃度を一定に保ちもう一方の変数を変化させることができる。好適な一実施形態においては、本発明のhtrb核酸は、一つのof配列番号1または3またはその相補体と、たとえば約2.0xSSCおよび約40℃の中等度のストリンジェントな条件下で結合する。特に好適な一実施形態においては、本発明のhtrb核酸は、一つの配列番号1または3またはその相補体と高ストリンジェントな条件下で結合する。特に好ましい一実施形態では、本発明のhtrb核酸配列はhtrbのOKF核酸配列に対応する一つの配列番号1または3の一部と高ストリンジェントな条件下で結合する。

30

【0075】

遺伝子コードの縮重のために、本発明の一つの配列番号1または3に示されるヌクレオチド配列またはその相補体と異なる配列を有する核酸もまた本発明の範囲内にある。そのような核酸は機能的に同等なペプチド(すなわち、htrbポリペプチドの生物学的活性を有するペプチド)をコードするが、遺伝子コードの縮重のために、配列リストに示された配列とは配列が異なる。たとえば、いくつかのアミノ酸は一つより多いトリプレットに指定される。同一アミノ酸を指定するコドン、つまり同義コドン(たとえば、CAUとCACはそれぞれヒスチジンをコードする)はその結果、htrbポリペプチドのアミノ酸配列に影響しない「サイレント」変異を生じうる。しかし、対象のhtrbポリペプチドのアミノ酸配列に結びつかないDNA配列多型が哺乳類の間に存在すると考えられている。当業者は、htrbポリペプチドの活性を有するポリペプチドをコードする核酸の一またはそれ以上のヌクレオチド

40

50

(たとえば、そのヌクレオチドの最大約3~5%)におけるこれらの変異が、自然の対立遺伝子変異のために任意の種の個体間に存在しうることを認めると考えられる。

【0076】

4.3.1 プロブおよびプライマー

哺乳類生物由来のhtrb遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列からさらに、たとえば他の組織からの、また他の哺乳類生物からのhtrb相同遺伝子といった、他の細胞型において他のhtrb相同遺伝子を同定および／またはクローニングするのに用いるために設計されたプロブおよびプライマーを作ることができる。たとえば、本発明はまた、実質的に純粋なオリゴヌクレオチドを含むプロブ/プライマーを提供し、そのオリゴヌクレオチドは、本発明の配列番号1または3から選択されたセンスまたはアンチセンス配列の少なくとも約12、好ましくは25、より好ましくは40、50または75の連続するヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。たとえば、配列番号1または3に示される核酸に基づくプライマーを、htrbポリペプチドをコードする遺伝子をクローンするためのPCR反応において用いることができる。

【0077】

好適な実施形態においては、htrbプライマーは、特異性を最適化し、プライミングの効率に影響する二次構造を回避するように本発明の最適化されたPCRプライマーは、「上流」および「下流」プライマーがほぼ等しい融点を有し、式 $T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\%\text{ホルムアミド}) - (600/\text{長さ})$;または $T_m(Q) = 2(A/T) + 4(G/C)$ によって推定されるように設計されている。最適化されたhtrbプライマーはまた、Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer.cgi>) によって提供される「Primer3」のようなさまざまなプログラムを用いて設計することができる。

【0078】

好適な実施形態においては、htrbプロブおよびプライマーを用いて、htrb遺伝子配列の内部および周辺で起こるhtrb遺伝子座多型を検出することができる。htrb遺伝子座内での遺伝的変異は、htrbにコードされるポリペプチドが重要な病因的役割を果たす炎症性および自己免疫疾患といったいくつかのヒト疾患および状態の進行の可能性と関連していると思われる。したがって、本発明はヒトおよびマウスhtrb遺伝子に関連する多型を含むhtrb遺伝子座多型についてのプロブおよびプライマーを提供する。本発明のPCRプライマーは、htrbヒト多型に隣接するものを含み、ゲノムのこの領域の増幅および分析を可能にする。多型対立遺伝子同一性の分析は、たとえば、直接配列決定によって、または対立遺伝子特異的捕捉プロブを用いてまたはby the use of 分子ビーコンプロブを用いて行うことができる。あるいは、多型対立遺伝子はPCR産物内に制限酵素認識部位を生じまたは消失させることによって直接検出することができ、または適当な配列修飾が少なくとも一つのプライマー中に設計されてのち、少なくとも一つの対立遺伝子と組み合わせて独特の制限部位を生じるがその多型の少なくとも一つの他の対立遺伝子とは生じないように、プライマーの改変された配列が特異的htrb多型対立遺伝子の増幅で得られたPCR産物に組み込まれるとき、タンデムリピート数変異(VNTR)多型に対応するhtrb多型が電気泳動移動度、したがってVNTRに隣接するプライマーを用いて得られたPCR産物の大きさによって検出されうる。適当なhtrb遺伝子座プロブおよびヒトまたは非ヒト動物といった適当な被験生物から得られたゲノムDNAまたはcDNAを用いたサザンブロット上のバンドの移動度によって、制限断片長多型(RFLPs)に対応するさらに他のhtrb多型が直接検出されうる。

【0079】

同様に、予知または診断分析(さらに下記に示す)に用いるための同一または相同タンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を、対象htrb配列に基づくプロブを用いて検出することができる。本発明は、本発明の配列番号1または3にみられる任意の配列と相補的な少なくとも12の連続するヌクレオチドに対応するもののような、htrb転写物の選択的スプライス変異体に共通するプロブを提供する。さらに、本発明は転写物の選択的スプライスされた形と特異的にハイブリダイズするプロブを提供する。プロブおよびプラ

イマーは、たとえば他の型の核酸について前述した通りに、調製および修飾することができる。

【0080】

4.3.2 アンチセンス、リボザイムおよび三重らせん技術

本発明の別の側面は、単離された核酸の「アンチセンス」治療における利用に関する。ここで用いられるように、「アンチセンス」治療は、一またはそれ以上の対象htrbタンパク質をコードする細胞mRNAおよび／またはゲノムDNAと、たとえば転写および／または翻訳を阻害することによってそのタンパク質の発現を阻害するように、細胞条件下で特異的にハイブリダイズする(たとえば結合する)オリゴヌクレオチド分子またはその誘導体の投与またはin situ生成を指す。結合は従来の塩基対相補性により、または、たとえばDNA二重らせんに結合する場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用を通じて起こる。一般に、「アンチセンス」治療は当該分野で一般に用いられる範囲の技術を指し、そしてオリゴヌクレオチド配列への特異的結合に依存する任意の治療を含む。

10

【0081】

本発明のアンチセンス構造はたとえば、細胞内で転写されるときhtrbタンパク質をコードする細胞mRNAの少なくとも特有の部分と相補的なRNAを産生する発現プラスミドとして送達しうる。あるいは、アンチセンス構造は、ex vivoで産生され、細胞内に導入されたとき、htrb遺伝子のmRNAおよび／またはゲノム配列とのハイブリダイズによって発現の阻害を引き起こす、オリゴヌクレオチドプローブである。そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、たとえばエキソヌクレアーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼといった内因性ヌクレアーゼに耐性の、そしてしたがってin vivoで安定である修飾オリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いられる典型的な核酸分子は、DNAのホスホラミデート、ホスホチオエート、およびメチルホスホネートアナログである(特許文献1から3も参照)。加えて、アンチセンス治療に有用なオリゴマーの作成のための一般的手法は、たとえば、非特許文献18;および非特許文献19の総説がある。アンチセンスDNAに関しては、たとえば対象htrbヌクレオチド配列の-10と+10の間の領域といった、翻訳開始部位由来のオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

20

【0082】

アンチセンス手法は、htrbmRNAと相補的なオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)の設計を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドはhtrbmRNA転写物と結合し、翻訳を妨げる。完全な相補性は、好ましいが、必要ではない。二本鎖アンチセンス核酸の場合、二重らせんDNAの一本鎖がそのようにして試験されうるかまたは、三重らせん形成を測定してもよい。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度とアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズ核酸が長いほど、RNAが含む塩基ミスマッチは多くなるが、それでも安定な二重らせん(または場合によっては三重らせん)を形成する。当業者は、容認しうる程度のミスマッチを、ハイブリダイズ複合体の融点を測定する標準手順を用いて確認することができる。

30

【0083】

たとえばAUG開始コドンまでを含む5'非翻訳配列といったmRNAの5'末端と相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳阻害に非常に効率的に作用する。しかし、mRNAの3'非翻訳配列と相補的な配列は最近、同じようにmRNAの翻訳を阻害するのに効果的であることが示されている。(非特許文献20)。したがって、htrb遺伝子の5'または3'非翻訳非コード領域のどちらかと相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性htrbmRNAの翻訳を阻害するアンチセンス手法で用いることができる。mRNAの5'非翻訳配列と相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含むべきである。mRNAコード領域と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、より効率の低い翻訳の阻害因子であるが、また本発明にしたがって用いることができる。htrbmRNAの5'、3'またはコード領域とハイブリダイズするよう設計されているのであっても、アンチセンス核酸は少なくとも長さ6ヌクレオチドであるべきであり、そして好ましくは長さ約100、そしてより好ましくは約50、25、17または10ヌクレオチド未満である。

40

50

【0084】

標的配列の選択にかかわらず、アンチセンスオリゴヌクレオチドが遺伝子発現を阻害する能力を定量するために、*in vitro*試験をまず実施することが好ましい。これらの試験は、アンチセンス遺伝子阻害とオリゴヌクレオチドの非特異的生物学的効果とを識別する対照を設けることが好ましい。これらの試験は、標的RNAまたはタンパク質の濃度を内部標準RNAまたはタンパク質の濃度と比較することがまた好ましい。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られた結果は対照のオリゴヌクレオチドを用いて得られた結果と比較することが想定される。対照オリゴヌクレオチドは試験オリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであること、また対照オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列はアンチセンス配列と比べて、標的配列との特異的ハイブリダイゼーションを防ぐのに必要なだけしか異ならないことが好ましい。

10

【0085】

オリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNAまたはキメラ混合物または誘導体またはその修飾したもので、一本鎖または二本鎖でありうる。オリゴヌクレオチドは、たとえば分子の安定性、ハイブリダイゼーション、などを改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格を修飾することができる。オリゴヌクレオチドは、たとえばペプチド(たとえば宿主細胞受容体ヘターゲティングするため)、または細胞膜を通した輸送を促進する物質(たとえば、非特許文献21;非特許文献22;特許文献4(1988年12月15日公開)を参照)または血液脳関門を通した輸送を促進する物質(たとえば、特許文献5(1988年4月25日公開)を参照)、ハイブリダイゼーションに誘発される分裂物質(たとえば、非特許文献18を参照)または挿入剤(たとえば、非特許文献23)といった他の付属基を含みうる。このために、オリゴヌクレオチドは、たとえばペプチド、ハイブリダイゼーションに誘発される架橋剤、輸送物質、ハイブリダイゼーションに誘発される分裂物質、などといったもう一つの分子と結合しうる。

20

【0086】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-イオドウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-diメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、S'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5オキシ酢酸メチルester、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)_w、および2,6-ジアミノプリンを含む群から選ばれるがこれに限定されない少なくとも一つの修飾塩基部分を含みうる。

30

40

【0087】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースを含む群から選ばれるがこれに限定されない少なくとも一つの修飾糖部分を含みうる。

【0088】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、中性ペプチド様骨格を含みうる。そのような分子は、ペプチド核酸(PNA)-オリゴマーと呼ばれ、たとえば、非特許文献24および非特許文献25に記載されている。PNAオリゴマーの一つの長所は、そのDNAの中性骨格のために、溶媒のイオン強度と本質的に独立して相補的DNAと結合する能力である。さらに別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチ

50

オエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタールまたはそのアナログから成る群より選ばれる少なくとも一つの修飾リン酸骨格を含む。

【0089】

さらに別の一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは α -アノマーオリゴヌクレオチドである。 α -アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的RNAと、通常の β -ユニットとは逆に鎖が互いに平行する特異的二本鎖ハイブリッドを形成する(非特許文献26)。オリゴヌクレオチドは2'-O-メチルリボヌクレオチド(非特許文献27)、またはキメラRNA-DNAアナログ(非特許文献28)である。

【0090】

本発明のオリゴヌクレオチドは当該分野で既知である標準的方法、たとえば、自動DNA合成装置(たとえばBiosearch、Applied Biosystems、などから市販されている)を用いて、合成されうる。例としては、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは非特許文献29)の方法を用いて合成することができ、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは一定孔径のガラスポリマー担体を用いて合成することができる(非特許文献30)、などである。

【0091】

htrbコード領域配列と相補的なアンチセンスヌクレオチドを用いることができる一方、転写された非翻訳領域および開始メチオニンを含む領域領域と相補的なアンチセンスヌクレオチドは非常に好ましい。

【0092】

アンチセンス分子は、htrbをin vivoで発現する細胞へ送達することができる。アンチセンスDNAまたはRNAを細胞へ送達するいくつかの方法が開発されている;たとえば、アンチセンス分子を直接組織部位へ注射することができ、または目的の細胞を標的とするように設計された修飾アンチセンス分子(たとえば、標的細胞表面に発現された受容体または抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体を結合したアンチセンス)を全身投与することができる。

【0093】

しかし、内因性mRNAの翻訳を抑制するのに十分なアンチセンスの細胞内濃度を達成するのはある場合には困難である。したがって、好ましい手法は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが強力なpolIIIまたはpolIIIプロモータの支配下に置かれる組み換えDNA構造を用いる。患者の標的細胞に導入するのにそのような構造を用いることの結果、内因性htrb転写物と相補的塩基対を形成する一本鎖RNAが十分な量転写され、それによってhtrbmRNAの翻訳が防がれる。たとえば、in vivoでベクターを導入することができ、そのためそれが細胞に取り込まれアンチセンスRNAの転写を指示する。そのようなベクターは、転写されて目的のアンチセンスRNAが産生されうるかぎり、エピソームのまま留まるかまたは染色体と一体化することができる。そのようなベクターは、当該分野で標準的な組み換えDNA技術の方法によって作成することができる。ベクターは、哺乳類細胞内での複製および発現に用いられる、プラスミド、ウイルス性、またはその他既知のものでありうる。アンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳類の、好ましくはヒトの細胞で作用する既知の任意のプロモータによることができる。そのようなプロモータは誘導性または構成性であることができる: SV40初期プロモータ領域(非特許文献31)、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復配列に含まれるプロモータ(非特許文献32)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモータ(非特許文献33)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(非特許文献34)、などを含みうるがこれらに限定されない。組織部位に直接導入することのできる組み換えDNA構造を調製するのに、任意の型のプラスミド、コスミド、YACまたはウイルスベクターを用いることができる。あるいは、目的の組織に選択的に感染するウイルスベクターを用いることができ、その場合、投与は他の経路(たとえば全身)で達成されうる。

【0094】

htrbmRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子はまた、htrbmRNAの翻訳およびhtrbの発現を防ぐのに用いることができる(たとえば、特許文献6 (1990年10

10

20

30

40

50

月4日公開) ;非特許文献35および特許文献7を参照)。部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを、htrbmRNAを分解するために用いることができる一方、ハンマーヘッド型リボザイムが好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成する隣接領域に決定される位置でmRNAを切断する。唯一の必要事項は、標的mRNAが次の二つの塩基の配列を有することである：5'-UG-3'。ハンマーヘッド型リボザイムの作成および生産は当該分野でよく知られており、より詳細には非特許文献36に記載されている。たとえば、いくつかの可能なハンマーヘッド型リボザイム切断部位がヒトhtrb-1およびhtrb-3ヌクレオチド配列中に存在する。好ましくはリボザイム切断認識部位がhtrbmRNAの5'末端付近に位置するようにリボザイムを設計する；すなわち、効率を上げ、非機能性mRNA転写物細胞内蓄積を最小化するためである。

10

【0095】

本発明のリボザイムはまた、たとえば*Tetrahymena thermophila*で天然にみられるもの(IVS、またはL-19 IVS RNAとして知られる)であってThomas Cechと共同研究者によって詳細に記載されているもの(非特許文献37；非特許文献38；非特許文献39；特許文献8 (by University Patents Inc.)；非特許文献40)のようなRNAエンドリボヌクレアーゼ(以下、「Cech型リボザイム」)を含む。Cech型リボザイムは、8塩基対の活性部位を有し、それが標的RNA配列とハイブリダイズしその後標的RNAの切断が起こる。本発明は、htrb遺伝子中に存在する8塩基対活性部位配列を標的とするCech型リボザイムを含む。

【0096】

アンチセンス手法でのように、リボザイムは修飾オリゴヌクレオチドで構成することができ(たとえば安定性、ターゲッティング、などの改善のため)、in vivoでhtrb遺伝子を発現する細胞へ送達されるべきである。送達の好ましい方法は、導入細胞が内因性htrbメッセンジャーを分解し翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生するように、強力な構成性polIIIまたはpolIIプロモータの支配下にあるリボザイムを「コードする」DNA構造を用いることである。リボザイムはアンチセンス分子と異なり、触媒であるので、効率のためにはより低い細胞内濃度が必要である。

20

【0097】

内因性htrb遺伝子発現はまた、標的相同組み換えを用いて、htrb遺伝子またはそのプロモータ不活性化するかまたは「ノックアウトする」ことによって低下させることができる。(たとえば、非特許文献41；非特許文献42；非特許文献43；を参照、それぞれ全体がこの参照により開示に含まれる)。たとえば、htrbをin vivoで発現する細胞に導入するために、選択マーカーおよび／または陰性選択マーカーを持つまたは持たない、内因性htrb遺伝子と相同なDNA(htrb遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか)に隣接される変異体の非機能性htrb(または全く無関係なDNA配列)を用いることができる。DNA構造の挿入は、標的となった相同組み換えを介し、その結果としてhtrb遺伝子が活性化される。そのような手法は特に、不活性htrbを持つ動物の子孫を作成するのにES(胚性幹)細胞への修飾を用いることができる農業の分野に適している(たとえば、上記の非特許文献42および43を参照)。しかし、この手法は、組み換えDNA構造が直接投与されるかまたは適当なウイルスベクターを用いてin vivoで必要な部位を標的とするという条件で、ヒトにおける使用に適合させることができる。

40

【0098】

あるいは、htrb遺伝子の調節領域(すなわちhtrbプロモータおよび／またはエンハンサー)と相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的とすることによって、体内の標的細胞中のhtrb遺伝子の転写を阻害する三重らせん構造を形成し、内因性htrb遺伝子発現を低下させることができる。(概要は、非特許文献44；非特許文献45；および非特許文献46を参照)。

【0099】

転写阻害のための三重らせん形成に用いられる核酸分子は、好ましくは一本鎖であってデオキシリボヌクレオチドから成る。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、Hoogsteen塩基対形成則による三重らせん形成を促進すべきであり、ここで一般的にかなりの長さ

50

の一続きのプリンまたはピリミジンが二重らせんの一本の鎖に存在する必要がある。ヌクレオチド配列はピリミジンを基本とすることができ、その結果、生じる三重らせんの会合した三本鎖にわたって、TATおよびCGCトリプレットがみられる。ピリミジンに富む分子は、その鎖と平行する向きの二重らせんの一本鎖のプリンに富む領域に塩基相補性を提供する。さらに、核酸分子はたとえば一続きのG残基を含むように、プリンに富むものを選ぶことができる。これらの分子はGC対に富むDNA二重らせんと三重らせんを形成し、ここで大多数のプリン残基は標的二重らせんの一本鎖上に位置し、その結果、三重らせんの三本鎖にわたってCGCトリプレットがみられる。

【0100】

あるいは、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作ることによって、三重らせん形成の標的になりうる可能な配列を増加させることができる。スイッチバック分子は5'-3'、3'-5'を交互にという方法で合成され、そのため最初に二重らせんの一本の鎖と、次いでもう一方の鎖と塩基対を形成し、かなりの長さの一続きのプリンまたはピリミジンが二重らせんの一本の鎖に存在する必要をなくす。

10

【0101】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、そして三重らせん分子は、DNAおよびRNA分子の合成について当該分野で既知の任意の方法によって調製することができる。これらには、たとえば固相ホスホアミダイト化学合成といった、オリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する当該分野で既知の技術を含む。あるいは、RNA分子はアンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のin vitroおよびin vivo転写によって作成することができる。そのようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモータのような適当なRNAポリメラーゼプロモータを組み込んだ幅広いベクターに組み込むことができる。あるいは、使用したプロモータによってアンチセンスRNAを構成的にまたは誘導的に合成するアンチセンスcDNA構造は、細胞株に安定に導入しうる。

20

【0102】

さらに、細胞内安定性および半減期を増加させる手段として、核酸分子へのさまざまなよく知られた修飾を導入することができる。可能な修飾は、分子の5'および／または3'末端へのリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの隣接配列の付加、またはオリゴデオキシリボヌクレオチド骨格の中でホスホジエステラーゼ結合よりもホスホロチオエートまたは2'-O-メチルを用いることを含むがこれに限定されない。

30

【0103】

4.3.3. htrbタンパク質をコードするベクターおよびhtrb発現細胞

本発明はさらにhtrbタンパク質をコードするプラスミドおよびベクターを提供し、これは宿主細胞でhtrbタンパク質を発現するのに用いることができる。宿主細胞は任意の原核または真核細胞とすることができる。したがって、完全長タンパク質のすべてまたは選択された部分をコードする、哺乳類htrbタンパク質のクローニングに由来するヌクレオチド配列は、微生物または真核細胞過程を経由してhtrbポリペプチドの組み換え形を産生するのに用いることができる。Ligating theポリヌクレオチド配列を発現ベクターのような遺伝子構造に連結すること、および真核(酵母、鳥類、昆虫または哺乳類)または原核(細菌)細胞のいずれかの宿主に形質転換するまたは導入することは、当該分野で既知の標準手順である。

40

【0104】

細胞で核酸を発現させることのできるベクターは発現ベクターと呼ばれる。典型的には、htrbタンパク質を発現させるのに用いられる発現ベクターは、作用のために少なくとも一つの転写調節配列に連鎖した、htrbポリペプチドをコードする核酸を含む。調節配列は技術的に認識されており、対象htrbタンパク質の直接発現のために選択される。転写調節配列は非特許文献47に記載されている。一実施形態では、発現ベクターは、対象htrbポリペプチドのアゴニスト活性を有するペプチドをコードする、またはあるいはペプチドhtrbタンパク質のアンタゴニストの形であるペプチドをコードする組み換え遺伝子を含む。

【0105】

50

htrbポリペプチドの発現のための適当なベクターは、以下の型のプラスミドを含む：pBR322由来プラスミド、PEMBL由来プラスミド、PEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、およびたとえば*E. coli*を含む原核細胞での発現のためのPUC由来プラスミド。

【0106】

酵母での組み換えタンパク質の発現のために、いくつかのベクターが存在する。たとえば、YEP24、YIPS、YEP51、YEP52、pYES2、そしてYRP17は、*S. cerevisiae*へ遺伝子構造を導入するのに有用なクローニングおよび発現の伝達体である(たとえば、非特許文献48(この参照により開示に含まれる)を参照)。これらのベクターはpBR322 oriが存在するために*E. coli*の中で複製でき、酵母2ミクロンプラスミドの複製決定因子のために*S. cerevisiae*の中で複製できる。さらに、アンピシリンのような薬物耐性マーカーを用いることができる。例証となる実施形態において、配列番号1または3に示される一つのhtrb遺伝子のコード配列をサブクローニングすることによって作成された発現ベクターを用いて、htrbポリペプチドが組み換えによって産生される。

10

【0107】

好ましい哺乳類発現ベクターは、細菌内でベクターの増殖を促進する原核配列、および真核細胞で発現されている一またはそれ以上の真核転写ユニットの両方を含む。PCDNA1/amp、PCDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、PMSG、pSVT7、pko-neoそしてpHyg由来ベクターが、真核細胞への導入に適当な哺乳類発現ベクターの例である。これらのベクターの一部は、原核および真核細胞の両方で複製および薬物耐性選択を促進するため、たとえばpBR322といった細菌プラスミドからの配列で修飾されている。あるいは、たとえばウシパピローマウイルス(BPV-1)またはエプスタイン-バーウイルス(pHEBo、PREP由来およびp205)のようなウイルス誘導体を、真核細胞でのタンパク質の一過性発現に用いることができる。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換に用いられたさまざまな方法は当該分野で既知である。原核および真核細胞の両方について他の適当な発現系、また一般的な組み換え手順については、非特許文献17を参照。

20

【0108】

ある場合には、バキュロウイルス発現系を用いて組み換えhtrbポリペプチドを発現するのが望ましい。そのようなバキュロウイルス発現系の例は、PVL由来ベクター(たとえばpVL1392、pVL1393およびpVL941)、pAcUW由来ベクター(たとえばpAcUW1)、そしてpBlueBac由来ベクター(たとえばB-gal含有pBlueBacIII)を含む。

30

【0109】

htrbタンパク質の一部だけ、たとえばN-末端の部分を欠く形、すなわちシグナルペプチドを欠く欠落変異を発現するのが望ましいとき、発現させる目的配列に開始コドン(ATG)をオリゴヌクレオチド断片に付加する必要がある。N末端位置のメチオニンは酵素メチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)を用いて酵素的に切断することができるのはよく知られている。MAPは*E. coli*からクローニングされ(非特許文献49)、*Salmonella typhimurium*とその*in vitro*活性が組み換えタンパク質について示された(非特許文献50)。したがって、N末端メチオニンの除去は、必要に応じて、MAPを産生する宿主(たとえば、*E. coli*またはCM89または*S. cerevisiae*)内で*in vivo*で由来ポリペプチドを発現することによって、または*in vitro*で精製MAP(たとえば、上記非特許文献50の手順)を用いることによって達成されうる。

40

【0110】

さらに、本発明の遺伝子構造はまた、一つの対象htrbタンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストの形をコードする核酸を送達する遺伝子治療計画の一部として用いることができる。したがって、本発明の別の側面は、機能を再構成できるような、またはあるいは、組織中のhtrbの機能を破棄するような、特定の細胞型におけるhtrbポリペプチドの*in vivo*または*in vitro*導入および発現のための発現ベクターを取り上げる。これは、たとえば、タンパク質の天然にみられる形が誤発現した場合、または天然タンパク質が変異して活性が低くなった場合に望ましい。

【0111】

50

ウイルス導入方法に加えて、動物組織中での対象htrbポリペプチドの発現に、非ウイルス方法をまた用いることができる。遺伝子導入の非ウイルス方法の大部分は、巨大分子の取り込みおよび細胞内輸送について哺乳類細胞に用いられる通常の機構に依存する。好適な実施形態においては、本発明の非ウイルスターゲティング法は、標的細胞による対象htrbポリペプチド遺伝子の取り込みのための細胞内経路に依存する。この型の典型的なターゲティング法は、リポソーム由来系、ポリリシン結合物、および人工ウイルス外被を含む。

【0112】

別の実施形態では、下記により詳細に示す遺伝子導入動物を、組み換えタンパク質の産生に用いることができる。

10

【0113】

30 4.4. 本発明のポリペプチド

本発明は、他の細胞タンパク質から単離されたかまたは実質的に他の細胞タンパク質を含まない単離されたhtrbポリペプチドを利用可能にする。「実質的に他の細胞タンパク質を含まない」(またここでは「夾雑タンパク質」ともいう)または「実質的に純粋または精製された調製物」の語は約20%未満(乾重で)の夾雑タンパク質を含む、そして好ましくは約5%未満の夾雑タンパク質を含むhtrbポリペプチドの調製物を含むと定義される。対象ポリペプチドの機能する形は、最初に、ここに記載のクローン遺伝子を用いて、精製された調製物として調製することができる。

【0114】

20

本発明の好ましいhtrbタンパク質は、配列番号2または4のアミノ酸配列と少なくとも約60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、または95%同一または相同であるアミノ酸配列を有する。さらにより好ましいhtrbタンパク質は、少なくとも10、20、30、または50残基のアミノ酸配列を含み、配列番号2または4のアミノ酸配列と少なくとも約70、80、90、95、97、98、または99%相同または同一である。そのようなタンパク質は組み換えタンパク質であることができ、またたとえば、本発明の配列番号1または3に示すヌクレオチド配列の一つまたはもう一つの核酸またはその相同遺伝子を含む核酸からin vitroで産生することができる。たとえば、本発明による好ましい組み換えポリペプチドは、核酸、本発明の配列番号1または3に示すヌクレオチド配列と少なくとも85%相同、そしてより好ましくは90%相同、そして非常に好ましくは95%相同である核酸にコードされうる。本発明の配列番号1または3のヌクレオチド配列と少なくとも約98~99%相同である核酸にコードされたポリペプチドもまた本発明の範囲内にある。

30

【0115】

好適な一実施形態においては、本発明のhtrbタンパク質は哺乳類htrbタンパク質である。特に好適な一実施形態においては、htrbタンパク質は配列番号2または配列番号4として示される。特に好適な実施形態においては、htrbタンパク質はhtrb生物活性を有する。ある翻訳後修飾、たとえばリン酸化など、は修飾されていないポリペプチド鎖と比較してhtrbタンパク質の見かけの分子量を増大させることは理解される。

【0116】

40

本発明はまた、本発明のスプライス変異体にコードされるタンパク質イソ型を取り上げる。そのようなイソ型は、Nos. 2または4に特定されるhtrbタンパク質が有するものと同一のまたは異なる生物活性を有しうる。そのようなイソ型は、たとえば、一またはそれ以上のhtrb遺伝子転写物の選択的スプライシングによって生じうる。

【0117】

htrbポリペプチドは、好ましくは付属の配列リストの野生型(「真の」)htrbタンパク質の少なくとも一つの生物学的活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして機能する能力がある。「進化上関連する」の語は、htrbタンパク質のアミノ酸配列に関して、自然に生じたアミノ酸配列を有するポリペプチドと、またヒトhtrbポリペプチドのたとえば組み換え突然変異誘発によって得られた突然変異体との両方を指す。

50

【0118】

完全長タンパク質、または一またはそれ以上の特定のモチーフおよび／または領域に対応する断片、またはたとえば少なくとも長さ5、10、20、25、50、75および100アミノ酸といった任意の大きさに対応する断片は、本発明の範囲内である。

【0119】

たとえば、単離されたhtrbポリペプチドは、配列番号1または3のいずれかに示す核酸配列のすべてまたは一部にコードされうる。htrbタンパク質の単離されたペプチド部分は、そのようなペプチドをコードする核酸の対応する断片から組み換えによって産生されたペプチドをスクリーニングすることによって得ることができる。さらに、断片は、たとえば従来のMerrifield固相f-Mocまたはt-Boc化学のような既知の技術を用いて、化学的に合成
10
することができる。たとえば、本発明のhtrbポリペプチドは任意に、断片の重なるの無い希望の長さの断片に分割することができ、または好ましくは重なりのある希望の長さの断片に分割することができる。断片は（組み換えによってまたは化学合成によって）産生することができ、そして試験して野生型（たとえば、「真の」）htrbタンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストとして機能しうるペプチド断片を同定することができる。

【0120】

htrbポリペプチドは膜結合型または可溶型でありうる。好ましい可溶性htrbポリペプチドは、疎水性シグナル配列領域を含まないポリペプチドである。そのようなタンパク質は、既知の方法を用いて遺伝子工学によって作成することができる。組み換えポリペプチドの溶解度は、野生型タンパク質の予想される膜貫通領域のような疎水性領域を欠失させるこ
20
とによって増加させうる。

【0121】

一般的に、htrbタンパク質の活性を有する（たとえば「生物活性」である）とここでいうポリペプチドは、配列番号1または3の一つに示される核酸配列のすべてまたは一部にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、天然にみられるhtrbタンパク質の生物学的/生化学的活性のすべてまたは一部を模倣または拮抗するものと定義される。そのような生物学的活性の例は、htrb保存ドメインと呼ぶ保存構造の領域を含む（図6A、htrb NC構造を参照）。

【0122】

対象htrbタンパク質の他の生物活性は、当業者にとって合理的に明らかになる。本発明によると、ポリペプチドは、htrbタンパク質の天然にみられる形の特異的アゴニストまたはアンタゴニストであるならば、生物学的活性を有する。
30

【0123】

ある化合物、たとえばhtrbタンパク質またはその変異体のようなタンパク質が、一またはそれ以上の上記の生物活性を有するかどうか調べる検定法は、htrbアゴニストおよびhtrbアンタゴニスト活性を評価するのに用いられる当該分野で既知である検定法を含む。たとえば、組み換えhtrbポリペプチドがAP-1レポーター構造の活性化を阻害する能力。その一方、組み換えhtrbポリペプチドがインターロイキン-8遺伝子発現のサイトカイン誘導活性化に干渉する能力は、htrbアンタゴニスト活性の指標となる。

【0124】

本発明の他の好ましいタンパク質は、本発明の核酸に関する項に示す核酸にコードされるものである。特に、本発明はたとえばhtrb-免疫グロブリン融合タンパク質といった融合タンパク質を提供する。そのような融合タンパク質は、たとえば、htrbタンパク質の向上した安定性および溶解性を提供することができ、したがって治療に有用である可能性がある。融合タンパク質はまた、htrbタンパク質の免疫原断片を作成するのに用いることができる。たとえば、ロタウイルスのVP6キャプシドタンパク質を、モノマー形またはウイルス粒子の形で、htrbポリペプチドの一部の免疫キャリアタンパク質として用いることができる。ビリオンの一部としてhtrbエピトープを含む融合タンパク質を発現する組み換えウイルスの組を作成するために、対象htrbタンパク質の、それに対する抗体が作られる部分に対応する核酸配列を、後期ワクシニアウイルス構造タンパク質のコード配列を含む融
40
50

合遺伝子構造に組み込むことができる。B型肝炎表面抗原融合タンパク質を利用する免疫原融合タンパク質の使用に関して、組み換えB型肝炎ビリオンをこの役割にもまた利用しうることが示されている。同様に、ポリペプチド抗原の組の免疫原性を増大させるために、htrbタンパク質の一部とポリオウイルスキャプシドタンパク質を含む融合タンパク質をコードするキメラ構造を作成することができる(たとえば、特許文献9;および非特許文献51;非特許文献52;また非特許文献53を参照)。

【0125】

ペプチドによる免疫のための複数抗原ペプチド系はまた、免疫原を作成するのに用いることができ、ここでオリゴマー分枝リジンコア上のペプチドの有機化学合成から直接、htrbポリペプチドの目的の部分が得られる(たとえば、非特許文献54および非特許文献55を参照)。htrbタンパク質の抗原決定基はまた、細菌細胞によって発現され提示されうる。

10

【0126】

免疫原性を増大させるために融合タンパク質を利用するのに加えて、融合タンパク質はまたタンパク質の発現を促進し、したがって本発明のhtrbポリペプチドの発現に用いることができることは広く利用されている。たとえば、htrbポリペプチドはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-融合)タンパク質として作成することができる。そのようなGST-融合タンパク質は、例としてはグルタチオン誘導体化マトリクスを用いることによって、htrbポリペプチドの容易な精製を可能にする(たとえば、非特許文献56を参照)。

【0127】

さらに、htrbポリペプチドとたとえばFLAGまたはヘマグルチニンタグ配列といった小さいエピトープタグとの融合は、結果として生じる組み換えポリペプチドの免疫学的精製を容易にするために、あるいは細胞または組織検体中での免疫学的検出を促進するために用いることができる。既知であり市販されている緑色蛍光タンパク質との融合およびその組み換え形は、さらにhtrbポリペプチドを生きた細胞および組織中で局在化するのに用いることができる。

20

【0128】

本発明はさらに、対象htrbポリペプチドを産生する方法に関する。たとえば、対象ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を導く核酸ベクターを導入した宿主細胞を、ペプチドの発現が起こる適当な条件下で培養することができる。細胞培養のための適当な培地は当該分野で既知である。組み換えhtrbポリペプチドは、細胞培養培地、宿主細胞、または両方から、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、およびそのようなペプチドに特異的な抗体を用いた免疫アフィニティ精製を含む、タンパク質精製のための既知の技術を用いて単離されうる。好適な一実施形態においては、組み換えhtrbポリペプチドは、たとえばGST融合タンパク質のようにその精製を促進するドメインを含む融合タンパク質である。

30

【0129】

さらに、ある環境下では、当該タンパク質の自然にみられる形の生物活性の一部だけを促進または阻害するために、htrbアゴニスト(模倣体)またはhtrbアンタゴニストのいずれかとしての限られた能力で機能する、対象htrbポリペプチドの一つの相同遺伝子を提供することが有益でありうることは広く利用されうる。したがって、特異的生物学的効果は、限られた機能の相同遺伝子を用いた処理によって導くことができ、またhtrbタンパク質の天然にみられる形の生物活性のすべてに向けられたアゴニストまたはアンタゴニストを用いた処理と比べてより副作用が少ない。

40

【0130】

対象htrbタンパク質のそれぞれの相同遺伝子は、たとえば離散点変異による、または欠落による突然変異誘発によって作成することができる。たとえば、変異によって、それが由来するhtrbポリペプチドと実質的に同一かまたは単に一部の生物学的活性を保持する相同遺伝子を生じうる。あるいは、たとえばhtrb受容体に競合的に結合することによってタンパク質の天然にみられる形の機能を阻害することのできる、タンパク質のアンタゴニスト

50

の形を生じうる。

【0131】

本発明の組み換えhtrbポリペプチドはまた、たとえば、例としては、ユビキチン化または当該タンパク質に関連する他の酵素標的化を変化させる変異によって、タンパク質分解による切断に耐性である形のそれらのタンパク質といった、野生型htrbタンパク質の相同遺伝子を含む。

【0132】

htrbポリペプチドはまた、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基などといった他の化学的部分と共有または凝集結合物を形成することによってhtrb誘導体を生じるように化学的に修飾されうる。htrbタンパク質の共有結合誘導体は、タンパク質のアミノ酸側鎖の官能基またはポリペプチドのN末端またはC末端にその化学的部分を結合することによって調製することができる。

【0133】

対象htrbポリペプチドの構造の修飾は、治療的または予防的有効性、安定性(たとえば、*ex vivo*保存性およびタンパク質分解による劣化に対する耐性)を増大させるため、または翻訳後修飾(たとえば、タンパク質のリン酸化パターンを変化させるため)といった目的でありうる。そのような修飾ペプチドは、タンパク質の天然にみられる形の少なくとも一つの活性を維持するように、またはその特異的アンタゴニストを生じるように設計された場合、ここにより詳細に記載するhtrbポリペプチドと機能的に同等物であると考えられる。そのような修飾ペプチドは、たとえば、アミノ酸置換、欠失、または付加によって作成することができる。置換変異は、保存アミノ酸の置換または非保存アミノ酸の置換でありうる。

【0134】

たとえば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンと置換した置換物、アスパラギン酸をグルタミン酸と置換した置換物、スレオ人をセリンと置換した置換物、またはアミノ酸を構造的に関連したアミノ酸で置換した類似の置換物(すなわちイソステリックおよび/またはイソエレクトリック変異)は、結果として生じる分子の生物学的活性に大きな効果を有しないと予測するのが合理的である。保存的置換は、側鎖が関連するアミノ酸のグループ内で起こるものである。遺伝的にコードされるアミノ酸は4つの種類に分けることができる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；そして(4)非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。類似の方式で、アミノ酸の全体は以下のように分類できる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)脂肪族=グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、ここでセリンおよびスレオニンは随意的に脂肪族ヒドロキシルとして別に分類できる；(4)芳香族=フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；(5)アミド=アスパラギン、グルタミン；そして(6)含硫黄=システインおよびメチオニン。(たとえば、非特許文献57を参照)。ペプチドのアミノ酸配列中の変化によって、機能するhtrb相同遺伝子(たとえば、結果として生じるポリペプチドが野生型を模倣または拮抗するという意味で機能する)が生じるかどうかは、変異体ペプチドが野生型タンパク質と類似の方式で細胞内応答を生じるかまたはそのような応答を競合的に阻害する能力を評価することによって容易に決定しうる。一つより多い置換が起こっているポリペプチドも、同じ方法で容易に試験しうる。

【0135】

本発明はさらに、対象htrbタンパク質の組み合わせ変異また欠落変異の組を生じる方法を意図し、特に潜在的変異配列(たとえば相同遺伝子)を同定するのに有用である。そのような組み合わせライブラリをスクリーニングする目的は、たとえば、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用しうるかあるいは同時に新規の活性を有する新規のhtrb相同遺伝子を生み出すことである。したがって、組み合わせ由来相同遺伝子は、タンパク質の天然に

みられる形と比べて高い効果を有するように生み出すことができる。

【0136】

一つの実施形態において、htrb変異体の多彩なhtrbライブラリは核酸レベルでの組み合わせ突然変異誘発によって作られ、多彩な遺伝子htrbライブラリによってコードされる。たとえば、潜在的htrb配列の縮重した組が個々のポリペプチド、あるいは、htrb配列の組を含むより大きい融合タンパク質の組(たとえばファージ提示のために)として発現可能になるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に遺伝子配列中に連結することができる。

【0137】

縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的htrb相同遺伝子のそのようなライブラリを作成する多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成装置で行うことができ、合成遺伝子は次いで適当な発現ベクターと連結させることができる。遺伝子の縮重した組の目的は、一つの混合物中に、潜在的htrb配列の目的の組をコードするすべての配列を提供することである。縮重オリゴヌクレオチドの合成は既知である(たとえば、非特許文献58;非特許文献59;非特許文献60;非特許文献61;非特許文献62を参照。そのような技術は、他のタンパク質の進化工学に用いられている(たとえば、非特許文献63;非特許文献64;非特許文献65;非特許文献66;ならびに特許文献10;特許文献11;および特許文献12を参照。))。 10

【0138】

同様に、スクリーニングおよびそれに続く生物活性断片の選択のためhtrb断片の多彩な集団を作成するために、htrbクローンについてコード配列断片のライブラリを提供することができる。そのような1を作成するための、化学合成を含むさまざまな技術が既知である。一実施形態では、コード配列断片のライブラリは(i)分子あたり約1回のみニックが形成される条件下でhtrbコード配列の二本鎖PCR断片をヌクレアーゼで処理する;(ii)二本鎖DNAを変性させる;(iii)DNAを復元し、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含みうる二本鎖DNAを形成させる;(iv)再生した二重らせんからS1ヌクレアーゼ処理によって一本鎖部分を除去する;そして(v) ligating 結果として生じる断片ライブラリを発現ベクター中に連結する、ことによって作成することができる。この典型的な方法によって、N末端、C末端およびさまざまな大きさの内部断片をコードする発現ライブラリを得ることができる。 20 30

【0139】

点変異または欠落によって作成された組み合わせライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするための、またある性質を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリをスクリーニングするための、幅広い技術が既知である。そのような技術は一般に、htrb相同遺伝子の組み合わせ突然変異誘発によって作成された遺伝子ライブラリの迅速スクリーニングに適合させることができる。大きな遺伝子ライブラリをスクリーニングするためにもっとも広く用いられている技術は、典型的には遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、結果として生じるベクターライブラリを用いて適当な細胞を形質転換すること、そして目的の活性の検出が、産物が検出される遺伝子をコードするベクターの相対的に容易な単離を促進するような条件下で、組み合わせ遺伝子を発現することから成る。下記に示す例証となる検定のそれぞれは、組み合わせ突然変異誘発技術によって作られた多数の縮重htrb配列をスクリーニングするために必要に応じて高処理量分析に合わせることができる。組み合わせ突然変異誘発は、たとえばほぼ1026分子程度の、変異タンパク質の非常に大きなライブラリを生じる可能性がある。この大きさの組み合わせライブラリは、高処理量スクリーニング分析を用いても技術的に困難である可能性がある。この問題を克服するために、最近新しい技術が開発されていて、繰り返しアンサンプル突然変異誘発(REM)によって、無作為ライブラリ中で非機能性タンパク質が非常に高い割合になるのを回避し単純に機能性タンパク質の頻度を高め、したがって配列スペースの有効なサンプリングを達成するために必要な複雑さが低下する。REMは適当な選択またはスクリーニング方法がとられるときライブラリ中の機能性変異の頻度を高めるアルゴリズムである(40 50

非特許文献 67 ; 非特許文献 68 ; 非特許文献 69)。

【0140】

本発明はまた、本発明の htrb ポリペプチドとたとえば標的ペプチドのような分子との結合を崩壊させることのできる、低分子のようなペプチドまたは非ペプチド物質といったミメティックを生じる htrb タンパク質の低下を提供する。このように、そうした上記のような突然変異誘発技術はまた、たとえば対象 htrb ポリペプチドの標的ペプチドへの結合に関与するタンパク質-タンパク質相互作用に参加する htrb タンパク質の決定基をマッピングするのに有用である。たとえば、その受容体の分子認識に関与している対象 htrb ポリペプチドの決定的な残基を決定することができ、また htrb 由来類似構造ペプチドまたはその部分を有する真の htrb タンパク質の結合を競合的に阻害する小分子を作成するのに用いることができる。対象 htrb タンパク質の他のタンパク質との結合に関与しているアミノ酸残基をマッピングするのにたとえばスキャン突然変異誘発を用いることで、htrb タンパク質の相互作用を促進する残基を模倣する類似構造ペプチド化合物を作成することができる。そのような類似構造物質は次いで、htrb タンパク質の正常な機能に干渉するのに用いることができる。たとえば、ベンゾジアゼピン(たとえば、非特許文献 70 を参照)、アゼピン(たとえば、非特許文献 71 を参照)、置換 γ ラクタム環(非特許文献 72)、ケトメチレンブソイドペプチド(非特許文献 73 ; および非特許文献 74)、 β -ターンジペプチドコア(非特許文献 75 ; および非特許文献 76)、および β -アミノアルコール類(非特許文献 77 ; および非特許文献 78)を用いてそうした残基の非加水分解型ペプチドアナログを作成することができる。

10

20

【0141】

4.5. 抗 htrb 抗体とその用途

本発明の別の側面は、たとえば野生型または変異 htrb タンパク質といった哺乳類 htrb タンパク質と特異的に反応する抗体に関する。たとえば、たとえば cDNA 配列に基づいて htrb タンパク質に由来する免疫原を用いることによって、抗タンパク質/抗ペプチド抗血清またはモノクローナル抗体を標準手続きによって作成することができる(たとえば、非特許文献 79)を参照)。マウス、ハムスターまたはウサギといった哺乳類はペプチドの免疫原の形(たとえば、抗体反応を導くことのできる哺乳類 htrb ポリペプチドまたは抗原性断片、または上記の融合タンパク質)で免疫することができる。免疫原性をタンパク質またはペプチドに与える技術は、キャリアーとの結合または既知の他の技術を含む。htrb タンパク質の免疫原性の部分は、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫付与の進行は、血漿または血清中の抗体力価の検出によって観察することができる。免疫原としての抗原について、抗体濃度を評価するために、標準 ELISA または他の免疫検定法を用いることができる。好適な一実施形態においては、対象抗体は、哺乳類の htrb タンパク質の抗原決定基、たとえば、配列番号 2 または 4 に示すタンパク質または近縁の相同体(たとえば、少なくとも 90% 相同、そしてより好ましくは少なくとも 94% 相同)の抗原決定基に免疫特異的である。

30

【0142】

htrb ポリペプチドの抗原性調製物で動物を免疫した後、抗 htrb 抗血清が得られ、また必要に応じて、血清からポリクローナル抗 htrb 抗体が単離されうる。モノクローナル抗体を産生するには、抗体産生細胞(リンパ球)を免疫動物から得ることができ、標準の体細胞融合手順で骨髓腫細胞のような不死化細胞と融合してハイブリドーマ細胞が得られる。そのような技術は当該分野で既知であり、たとえば、Kohler と Milstein によって最初に開発されたハイブリドーマ技術(非特許文献 80)、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術(非特許文献 81)そしてヒトモノクローナル抗体を産生するための EBV-ハイブリドーマ技術(非特許文献 82)を含む。ハイブリドーマ細胞は、本発明の哺乳類 htrb ポリペプチドと特異的に反応する抗体、およびそのようなハイブリドーマ細胞から成る培養から単離されたモノクローナル抗体の産生のために、免疫化学的にスクリーニングすることができる。一つの実施形態では、抗ヒト htrb 抗体は、配列番号 1 または 3 を有する核酸にコードされるタンパク質と特異的に反応する。

40

50

【0143】

ここで用いられる抗体という語は、対象哺乳類htrbポリペプチドの一つとまた特異的に反応するその断片を含むことを意図する。抗体は従来の方法を用いて断片化することができる、実用のために断片は完全な抗体について上述したのと同じ方法でスクリーニングすることができる。たとえば、F(ab)2断片は抗体をペプシン処理して作成できる。結果として生じるF(ab)2断片を処理してジスルフィド架橋を還元し、Fab断片を作ることができる。本発明の抗体はさらに、二重特異性、一本鎖、そして抗体の少なくとも一つのCDR領域によって与えられるhtrbタンパク質への親和性を有するキメラおよびヒト化分子を含むことを意図する。好適な実施形態においては、抗体はさらに結合した標識を含み、検出が可能である(たとえば、標識は放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素補因子でありうる)。 10

【0144】

抗htrb抗体は、たとえば、ある被験者が異常なhtrbタンパク質濃度に関連する疾患または状態を有するかを決定するために、またはそのような疾患に罹った個人について任意の治療計画の有効性を決定できるようにするため、たとえば個人の体内のhtrbタンパク質濃度をモニターするのに用いることができる。htrbポリペプチドの濃度は、血液検体中のような体液中の細胞から測定することができる。

【0145】

本発明の抗htrb抗体の別の用途は、 λ gt11、 λ gt18-23、 λ ZAP、および λ ORF8といった発現ベクター中に構成されたcDNAライブラリの免疫学的スクリーニングである。正しい読み枠と方向で挿入されたコード配列を有するこの型のメッセンジャーライブラリは、融合タンパク質を産生することができる。たとえば λ gt11は、アミノ末端が β -ガラクトシダーゼアミノ酸配列から成りカルボキシ末端が外来ポリペプチドから成る融合タンパク質を産生する。htrbタンパク質の抗原エピトープ、たとえば特定のhtrbタンパク質の他のオルソログまたは同一種のもの、はそれからたとえば感染プレートから取ったニトロセルロースフィルターを抗htrb抗体と反応させて、抗体で検出する。この検定法で検出された陽性ファージは次いで感染プレートから単離することができる。こうして、htrb相同遺伝子の存在を検出することができ他の動物からクローニングすることができ、またヒト由来のイソ型(スプライス変異体を含む)を変えることができる。 20

【0146】

4. 6. 遺伝子導入動物

本発明はさらに、たとえばhtrb治療薬を同定するといったさまざまな目的に使用しうる遺伝子導入動物を提供する。本発明の遺伝子導入動物は、htrbプロモータの支配下にあるかまたは異種プロモータの支配下にある異種htrb遺伝子またはその断片を含む非ヒト動物を含む。したがって、本発明の遺伝子導入動物は、野生型htrbタンパク質またはその断片または、その突然変異体および多型変異体を含むその変異体をコードする導入遺伝子を発現している動物でありうる。そのような動物は、たとえば、多型差のような、配列番号2または4に示された配列とのhtrbタンパク質のアミノ酸配列の差の効果を測定するのに用いることができる。これらの動物はまた、特定部位でのhtrbタンパク質の発現の効果を測定するのに、またはhtrb治療薬を同定するのに、またはそのin vivo活性を確認するのに用いることができる。 30 40

【0147】

一つの側面では、本発明は、in vivoスクリーニングおよびevaluation of炎症性疾患の治療に有用な薬物または他の治療計画の評価に用いるための、遺伝子導入非ヒト生物および細胞株を提供する。一実施形態では、本発明はインターロイキン-1遺伝子が標的として破壊されている遺伝子導入動物である。特に、その遺伝子はhtrb遺伝子である。動物は破壊遺伝子についてキメラ、ヘテロ接合またはホモ接合でありうる。ホモ接合ノックアウトhtrb哺乳類は、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、I型糖尿病、乾癬、骨粗鬆症、糖尿病腎炎、円形脱毛症、グレーブス病、全身性エリテマトーデス、硬化性苔癬、潰瘍性大腸炎、冠動脈疾患、動脈炎、糖尿病性網膜症、低出生体重、妊娠合併症、重症歯周病、乾癬およびインシュリン依存性糖尿病といった炎症性状態を研究するモデルを提供するが、特に動 50

脈病変によって特徴づけられる。標的破壊は、それが機能性htrbタンパク質の産生を阻害するという条件のみで、遺伝子内の任意の場所であることができる。好適な一実施形態においては、破壊によって、たとえば配列番号1に含まれるhtrb-1のコード配列のようなhtrbコード配列の全体が除去される。遺伝子導入動物は（ヒトを除く）任意の種であることができるが、好ましくは哺乳類である。好適な一実施形態においては、htrb遺伝子中に標的破壊を含む非ヒト動物で、前記標的破壊が野生型htrbポリペプチドの産生を阻害し、そのため、その標的破壊についてホモ接合である非ヒト哺乳類の表現型が、変化した炎症性反応で特徴づけられる。

【0148】

別の側面では、本発明はhtrb遺伝子中に標的破壊を含む細胞または細胞株を取り上げる。好適な一実施形態においては細胞または細胞株は未分化細胞、たとえば幹細胞、胚性幹細胞、卵母細胞または胚細胞である。 10

【0149】

さらに別の面では、本発明はhtrb遺伝子中に標的破壊を有する非ヒト哺乳類を作成する方法を取り上げる。たとえばhtrb遺伝子の一部について前記htrb遺伝子の内部の一部分がマーカーで置換されたhtrbノックアウト構造を作り出すことができる。ノックアウト構造は次いで胚性幹(ES)細胞の集団に導入することができる。導入細胞は次いで、マーカーを発現しているものとして選択することができる。遺伝子導入されたES細胞は次いで、前記哺乳類の祖先の胚に導入することができる。胚は満期まで発生させ、生殖細胞系列にノックアウト構造を有するキメラ哺乳類を作成することができる。前記キメラ哺乳類を繁殖させることによって、htrb遺伝子中に標的破壊を有するヘテロ接合哺乳類を生じる。ホモ接合子はヘテロ接合子を交配することによって得ることができる。 20

【0150】

別の面では、本発明は上記の動物の作成に用いることのできるhtrbノックアウト構造を取り上げる。一実施形態では、htrb構造はhtrb遺伝子の一部を含むことができ、前記htrb遺伝子の内部の一部分が選択マーカーで置換されている。好ましくは、マーカーはneo遺伝子であり、htrb遺伝子の一部は少なくとも長さ2.5kbまたは7.0または長さ9.5kbである(任意のhtrb隣接配列および置換部分を含む)。内部の一部分は好ましくは少なくともエキソンの一部をカバーし、一部の実施形態ではhtrbポリペプチドをコードするエキソンの全体をカバーする。 30

【0151】

さらに別の面では、本発明は炎症性状態を治療および／または予防する有効性のための試験物質のための方法を取り上げる。一実施形態では、方法は上記の通り遺伝子導入動物または細胞株を用いることができる。たとえば、試験物質を遺伝子導入動物に投与し、その物質が炎症性状態を改善する能力について前記炎症性状態に対して有効性を有するとして点数を付けることができる。htrb構成成分を有する任意の炎症性状態についてこれらの哺乳類を用いて試験することができるが、しかし特に、動脈病変によって特徴づけられるじょうたいが研究されている。方法はまた、炎症性タンパク質およびその下流構成成分に対して有効な物質を試験するのに用いることができる。 40

【0152】

遺伝子導入動物はまた、たとえばレポーター遺伝子といったhtrbプロモータまたはその断片の支配下にある導入遺伝子を含む動物であることができる。これらの動物はたとえばhtrb遺伝子発現の調節によってhtrbの産生を調節するhtrb薬物を同定するのに有用である。htrb遺伝子プロモータはたとえば、htrbCDNA断片でゲノムライブラリをスクリーニングすることによって単離することができ、既知の方法に従って特徴づけることができる。本発明の好適な一実施形態においては、前記htrbレポーター遺伝子を含む遺伝子導入動物は、ステロイドホルモンとして知られる一群の生物活性分子を、htrb発現を調節する能力についてスクリーニングするのに用いられる。本発明のより好適な一実施形態においては、htrb発現調節活性についてスクリーニングされたステロイドホルモンは、アンドロゲンとして知られるグループに属する。本発明のさらにより好適な一実施形態においては、ステロ 50

イドホルモンはテストステロンまたはテストステロンアナログである。本発明の範囲内にあるさらに別の非ヒト動物は、内因性 htrb 遺伝子の発現が突然変異を受けたかまたは「ノックアウトされた」ものを含む。「ノックアウト」動物は、特定の一遺伝子または複数遺伝子のホモ接合またはヘテロ接合の欠失を有するものである。これらの動物は、htrb の非存在の結果、特異的な表現型が生じるかどうか、特に、たとえば心臓疾患またはがんに対する高い感受性のよう、これらのマウスが特定疾患を有するかまたは罹患する可能性が高いかどうかを決定するのに有用でありうる。さらに、これらの動物は下記に概要を示す通り htrb 遺伝子の変異の結果生じた疾患状態を緩和するまたは減じる薬物をスクリーニングするのに有用である。これらの動物はまた、htrb 遺伝子中の特定のアミノ酸の差異、または対立遺伝子変異の効果を測定するのに有用である。つまり、htrb ノックアウト動物を、たとえば、a htrb の突然変異形または対立遺伝子変異体を発現している遺伝子導入動物と交配することができ、その結果、突然変異タンパク質だけを発現し野生型 htrb タンパク質を発現していない動物が生じる。

10

20

30

40

50

【0153】

本発明のこの面の好適な一実施形態においては、染色体の一方または両方に変異 htrb 遺伝子座を有する遺伝子導入 htrb ノックアウトマウスが、htrb 発現の消失による状態の、遺伝子導入または薬物治療のモデル系として用いられる。遺伝子導入およびノックアウト非ヒト動物を得る方法は当該分野で既知である。ノックアウトマウスは、ノックアウトされる遺伝子をコードしているマウス胚性幹細胞染色体への「ノックアウト」構造の相同組み込みによって作成された。一実施形態では、相同組み換えを用いて動物のゲノムを修飾する方法である遺伝子ターゲティングを、培養胚性幹細胞へ変化を導入するのに用いることができる。ES 細胞中の対象の htrb 遺伝子を標的として、これらの変化を動物の生殖細胞系列に導入することができ、キメラを生じる。遺伝子ターゲティング手順は、標的 htrb 遺伝子座と相同なセグメントを含み、ゲノム配列に対する目的の配列修飾(たとえば挿入、欠失、点変異)を含む DNA ターゲティング構造を、組織培養細胞に導入することによって達成される。処理細胞は次いで、適切にターゲティングされたものを同定し単離するために、正確なターゲティングについてスクリーニングされる。

【0154】

胚性幹細胞での遺伝子ターゲティングは実際、一つまたはそれ以上の htrb ゲノム配列について相同組み換えを受けるように設計したターゲティング導入遺伝子構造を用いて htrb 遺伝子機能を破壊するための方法として、本発明で考えられた計画である。ターゲティング構造は、htrb 遺伝子の要素との組み換え時に、陽性選択マーカーが遺伝子のコード領域に挿入される(または置換する)ように設計することができる。挿入された配列は機能的に htrb 遺伝子を破壊し、一方でまた陽性選択の特徴を提供する。典型的な htrb ターゲティング構造は下により詳細に記載する。

【0155】

一般的に、ノックアウト動物の作成に使用される胚性幹細胞(ES 細胞)は、作成されるノックアウト動物と同種である。このためたとえば、ノックアウトマウスの作成にはマウス胚性幹細胞が通常用いられる。

【0156】

胚性幹細胞は、たとえば非特許文献 83) に記載されたもののような、当該技術の熟練者に既知である方法を用いて作成され維持される。任意の株の ES 細胞を用いることができるが、しかし、選択される株は典型的には、ノックアウト構造の生殖細胞系導入を生じさせるために、その細胞が発生中の胚の生殖細胞系に組み込まれその一部となる能力について選ばれる。したがって、この能力を有すると考えられている任意の ES 細胞株がここでの使用に適当である。ES 細胞の作成に典型的に用いられる一つのマウス系統は 129J 系統である。別の ES 細胞株はマウス細胞株 D3(American Type Culture Collection, catalog no. C KL 1934) である。さらに別の好ましい ES 細胞株は WW6 細胞株(非特許文献 84) である。細胞は、ノックアウト構造の挿入のために、たとえば非特許文献 85; 非特許文献 86; そして非特許文献 87 のような、当該技術の熟練者に既知である方法を用いて培養し準備する

。

【0157】

ノックアウト構造は、幹細胞株に導入された、変異させる目的の遺伝子の染色体遺伝子座でゲノムの組み換えを起こす、独自に構成された核酸断片をいう。このため、あるノックアウト構造は破壊の標的となるある遺伝子に特異的である。にもかかわらず、多数の共通因子がこれらの構造に存在し、またこれらの因子は当該分野で既知である。典型的なノックアウト構造は、変異させる遺伝子をコードするゲノム遺伝子座の5'および3'末端の両方から約0.5kb以上約10.0kb以下の核酸断片を含む。これらの二つの断片は、たとえばネオマイシン耐性遺伝子(neoR)のような陽性選択マーカーをコードする介在する核酸断片によって分離されている。結果として生じる核酸断片は、ゲノム遺伝子座の5'最末端からの核酸が陽性選択マーカーをコードする核酸に連結し、これが今度は目的のゲノム遺伝子座の3'最末端からの核酸に連結したものを含み、ノックアウトするhtrbまたは目的の他の遺伝子のコード配列の大部分を省略している。結果として生じる構造が相同的に染色体とこの遺伝子座で組み換えるとき、その結果、省略されたコード配列が、これは構造遺伝子ともいうが、ゲノム遺伝子座から失われる。そのような稀な相同組み換え現象が起こる幹細胞は、陽性選択マーカーをコードする遺伝子の核酸がゲノム内に安定して組み込まれていること、そして続いてこのマーカー遺伝子を発現している細胞を適当な薬物（この例ではネオマイシン）の存在下で選択することによって選択することができる。

【0158】

この基本技術の変形もまた存在し、当該分野で既知である。たとえば、「ノックイン」構造は、5'ゲノム遺伝子座断片をコードする核酸が陽性選択マーカーをコードする核酸に連結し、これが今度は3'ゲノム遺伝子座断片をコードする核酸に連結する同じ基本配列であるが、コード配列のどれも省略されておらず、したがって使用された5'および3'ゲノム断片は、陽性選択マーカー遺伝子をコードする核酸の導入によって破壊される前は、最初は連続している点で異なる。この「ノックイン」型の構造はしたがって、たとえば単一エクソンのような、変異させる遺伝子のゲノム遺伝子座の限られた領域だけがクローニングおよび遺伝子操作に利用できる場合は、変異遺伝子導入動物の作成に非常に有用である。あるいは、「ノックイン」構造は標的遺伝子の単一の機能ドメインを特異的に消失させるのに用いることができ、その結果、一つの機能について欠陥がある一方、コードされたポリペプチドの他の領域の機能は保っている標的遺伝子のポリペプチドを発現する遺伝子導入動物が生じる。この型の「ノックイン」変異はしばしば、特にホモ多量体を生じるタンパク質の場合は元になる野生型遺伝子のポリペプチド産物の作用を特異的にブロック（または「汚染」）しうるため、いわゆる「優性阻害」変異の特徴を持つ。ノックイン技術の一変形では、マーカー遺伝子の発現が標的遺伝子の転写調節因子の支配下に来るように、マーカー遺伝子が目的のゲノム遺伝子座に組み込まれる。マーカー遺伝子は、その活性を検出することができ（たとえば β -ガラクトシダーゼ）、適当な条件下で酵素気質を細胞に加えることができ、酵素活性を分析することができる酵素をコードするものである。当業者は他の有用なマーカーおよび任意の細胞中でのその存在を検出する方法に通じている。そのようなマーカーはすべて本発明の教示の範囲内にあると考えられる。

【0159】

上述の通り、上記の「ノックアウト」および「ノックイン」構造の相同組み換えは大変稀であり、しばしばそのような構造は非相同的に、欠失させるために標的とした遺伝子に効果を有しない、また変化させることを意図しなかった他の遺伝子を破壊するように組み換えを起こす可能性のある、ゲノムのランダム領域に挿入される。そのような非相同組み換え現象は、上記のノックアウトおよびノックイン構造を修飾していずれかの末端で陰性選択マーカーと隣接させることによって選択除外することができる（特に、チミジンキナーゼ遺伝子の二つの対立遺伝子変異体を用いて、よく知られている適当なすなわち5-ブロモデオキシウリジンのような薬物を含む組織培養培地中で発現細胞株中の選択除外されるポリペプチド産物を通じて）。したがって、本発明のそのようなノックアウトおよびノックイン構造の好ましい実施形態は、陰性選択マーカーをコードする核酸がゲノム遺伝子座の

5'末端をコードする核酸と連結し、陽性選択マーカーの核酸に連結し、それが今度は同一のゲノム遺伝子座の3'末端をコードする核酸と連結し、それが今度は陰性選択マーカーをコードする別の核酸と連結したものを含む。結果として生じるノックアウト構造とゲノムの間の非相同組み換えの結果、通常はこれらの陰性選択マーカーの一つまたは両方の安定な組み込みが生じ、ゆえに非相同組み換えを受けた細胞は、適当な選択培地(たとえば5-ブROMODEOキシウリジンのような薬物を含む培地)で生育させることで選択除外することができる。陽性選択マーカーについてまた陰性選択マーカーに対して同時に選択することで、ノックアウト構造が相同的に、変異させることを意図した遺伝子の遺伝子座で組み換えられているクローンが大幅に濃縮される結果となる。結果として生じるノックアウト幹細胞株において、標的遺伝子の遺伝子座に予測された染色体変化が存在することは、当業者に既知であるサザンブロット分析技術を用いて確認することができる。which are well。あるいは、PCRを用いることができる。

10

【0160】

細胞に挿入する個々のノックアウト構造は、まず直線の形でなければならない。したがって、ノックアウト構造がベクターに挿入されている場合(後述)、ベクター配列の中だけで切断しノックアウト構造配列の中では切断しないように選択した適当な制限酵素でDNAを消化することによって直線化が達成される。

【0161】

挿入については、当該技術の熟練者に既知である通り、選択した挿入方法のための適当な条件下でノックアウト構造をES細胞に加える。たとえば、ES細胞についてエレクトロポレーションを行う場合、ES細胞とノックアウト構造DNAはエレクトロポレーション装置を用いてメーカーの使用説明書に従って電気パルスに曝される。エレクトロポレーション後、ES細胞は典型的には適当なインキュベーション条件下で回復させられる。細胞は次いでノックアウト構造の存在について上で説明した通りスクリーニングされる。一つより多い構造がES細胞に導入される場合、個々のノックアウト構造は同時にまたは一度に一つ導入することができる。ノックアウト構造を適切な位置に含む適当なES細胞が上記に概説した選択技術によって同定された後、細胞は胚に挿入される。挿入は当該技術の熟練者に既知であるさまざまな方法で達成しうるが、しかし好ましい方法は微量注入による。微量注入のためには、約10~30細胞がマイクロピペットに集められ、ノックアウト構造を含む外来のES細胞が発生中の胚に組み込まれるように、発生の適当な段階にある胚に注入される。たとえば、形質転換ES細胞は胞胚に微量注入することができる。ES細胞の挿入に用いられる胚の発生の適当な段階は非常に種依存性であるが、しかし、マウスについては約3.5日目である。胚は妊娠雌の子宮を灌流することによって得られる。これを達成する適当な方法は当該技術の熟練者に既知であり、たとえば、非特許文献86(上記)に示される。

20

30

【0162】

発生の相応しい段階にある任意の胚が使用に適当である一方、好ましい胚は雄である。マウスでは、好ましい胚はまた、ES細胞遺伝子によってコードされる被毛色とは異なる被毛色をコードする遺伝子を有する。この方法で、モザイク被毛色(ES細胞が発生中の胚に組み込まれたことを示す)を探すことによって、ノックアウト構造の存在について仔を容易にスクリーニングすることができる。したがって、たとえば、ES細胞株が白い被毛の遺伝子を有する場合は、選択される胚は黒または茶色の被毛の遺伝子を有する。

40

【0163】

ES細胞が胚に導入されてのち、胚は妊娠のために偽妊娠仮母の子宮に移植することができる。任意の仮母を用いることができるが、仮母は典型的には、良好に繁殖する能力、また育仔能力について選択される。そのような仮母は典型的には、同種の精管切除雄と交尾させて用意する。偽妊娠仮母の段階が移植の成功に重要であり、それは種依存性である。マウスについては、この段階は偽妊娠の約2~3日目である。

【0164】

仮母の出産した仔は、被毛色選択戦略(上および付属の実施例に記載の通り)が用いられている場合は、最初にモザイク被毛色についてスクリーニングすることができる。さらに、

50

または代替法として、仔の尾部組織からのDNAをサザンブロットおよび／またはPCRを用いて上記の通りノックアウト構造の存在についてスクリーニングすることができる。モザイクであると思われる仔は、生殖細胞系にノックアウト構造を有すると考えられる場合は、ホモ接合ノックアウト動物を作成するために次いで互いに交配されうる。ホモ接合子は、この交配の産物であるマウスならびに既知のヘテロ接合子および野生型マウスに由来する同等量のゲノムDNAをサザンブロットすることによって同定しうる。

【0165】

ノックアウト子孫を同定および特徴づけする他の方法が利用可能である。たとえば、ノックアウトされた遺伝子とマーカー遺伝子のいずれか、または両方をコードする転写物の存在または非存在についてmRNAをプローブするノーザンブロットを用いることができる。さらに、特定のhtrbタンパク質に対する抗体または、この遺伝子が発現されているところではマーカー遺伝子産物に対する抗体を用いてウェスタンブロットをプローブすることによって、ノックアウトされたhtrb遺伝子の発現レベルを子孫のさまざまな組織中で評価するのにウェスタンブロットを用いることができる。最後に、ノックアウト構造遺伝子産物の存在または非存在を検索するために、子孫に由来するさまざまな細胞のin situ分析(たとえば細胞を固定し抗体で標識する)および／またはFACS(蛍光活性化細胞分離)分析を、適当な抗体を用いて行うことができる。

10

【0166】

ノックアウトまたは破壊遺伝子導入動物を作成するさらに別の方法もまた一般に知られている。たとえば、非特許文献87を参照。htrb遺伝子の活性化における組織特異的および／または一時的制御がリコンビナーゼ配列によって制御できるような(後述)、リコンビナーゼ依存ノックアウトもまた、たとえば標的配列に挿入する相同組み換えによって、作成することができる。

20

【0167】

一つより多いノックアウト構造および／または一つより多い導入遺伝子発現構造を含む動物が、いくつかの方法のうち任意のもので作成される。作成の好ましい方法は、目的の遺伝子導入表現型のうち一つをそれぞれが含む一連の哺乳類を作成することである。そのような動物を一連の交配、戻し交配および選択を通じて一緒に繁殖させ、最終的に目的のすべてのノックアウト構造および／または発現構造を含む一個体の動物を作成するが、ここでその動物はノックアウト構造および／または導入遺伝子の存在を除く他の点では野生型とコンジェニック(遺伝的に同一)である。htrb導入遺伝子はタンパク質の野生型の形をコードすることができ、またはそのアゴニストおよびアンタゴニストの両方、ならびにアンチセンス構造を含むその相同遺伝子をコードすることができる。好適な実施形態においては、導入遺伝子の発現は、細胞、組織または発生段階の特異的部分集合に限られており、たとえば発現を目的のパターンに制御するシス作用性配列を利用している。本発明においては、htrbタンパク質のそのようなモザイク発現は系統分析の多くの形で本質的に重要となりえ、また、たとえばhtrb発現を欠くことは他の点では正常な胚の中の組織の小さな部分の発生を大きく変化させうるが、その効果を評価する手段を追加的に提供する。これに向かつて、また、組織特異的調節配列および条件的調節配列は、ある空間的模式で導入遺伝子の発現を調節するのに用いることができる。さらに、たとえば条件的組み換え系または原核転写調節配列を用いて、発現の一時的パターンを提供することができる。

30

40

【0168】

in vivo部位特異的遺伝子操作を介して導入遺伝子の発現を調節することができるようにする遺伝子技術は当業者に既知である。たとえば、標的配列の遺伝子組み換えを触媒するリコンビナーゼの調節された発現を行うことのできる遺伝子系が利用可能である。ここで用いられるように、「標的配列」の語句はリコンビナーゼによって遺伝的に組み換えられたヌクレオチド配列を指す。標的配列はリコンビナーゼ認識配列に隣接され、リコンビナーゼ活性を発現している細胞では一般に削除または反転されている。リコンビナーゼに触媒された組み換え現象を、標的配列の組み換えの結果、対象htrbタンパク質の一つの発現の活性化または抑制が生じるように設計することができる。たとえば、アンタゴニスト相

50

同遺伝子またはアンチセンス転写物をコードするもののような、組み換えhtrb遺伝子の発現に干渉する標的配列の削除を、その遺伝子を活性化するために設計することができる。タンパク質の発現に関するこの干渉は、たとえばプロモータ因子または内部終止コドンからhtrb遺伝子が空間的に離れていることのような、さまざまな機構の結果として生じうる。さらに、導入遺伝子は遺伝子のコード配列がリコンビナーゼ認識配列に隣接されるように、またプロモータ因子について最初は細胞内に3'から5'の向きで導入されるように作成することができる。そのような場合、標的配列の逆位は、コード配列の5'末端をプロモータ因子についてプロモータによって起こる転写活性化が起こるような向きに配置することによって、対象遺伝子の向きを再設定する。

【0169】

本発明の遺伝子導入動物はすべて、その複数の細胞内に本発明の導入遺伝子を含み、その導入遺伝子は細胞成長、死および／または分化の制御に関して「宿主細胞」の表現型を変える。ここに記載の一またはそれ以上の導入遺伝子構造を利用する本発明の遺伝子導入生物を作成することが可能であるので、概要の説明は遺伝子導入生物の作成について一般に外因性遺伝子材料に言及して行う。この概要は下記に示す方法および材料を利用して特定の導入遺伝子配列を生物に組み込むために、当業者によって応用されうる。

【0170】

例証となる一実施形態では、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系（非特許文献88；非特許文献89）または*Saccharomyces cerevisiae*のFLPリコンビナーゼ系（非特許文献90；特許文献13）のいずれかを用いてin vivo 部位特異的遺伝子組み換え系を作成することができる。CreリコンビナーゼはloxP配列の間に位置する介在標的配列の部位特異的組み換えを触媒する。loxP配列はCreリコンビナーゼが結合する34塩基対ヌクレオチド反復配列であり、Creリコンビナーゼ媒介遺伝子組み換えに必要である。loxP配列の向きは、Creリコンビナーゼが存在するとき介在標的配列が切除されるかまたは反転されるかを決定し（非特許文献91）；loxP配列が順行反復の向きであるときは標的配列の切除を触媒し、loxP配列が逆行反復の向きであるときは標的配列の反転を触媒する。

【0171】

したがって、標的配列の遺伝子組み換えはCreリコンビナーゼの発現に依存する。リコンビナーゼの発現は、たとえば組織特異的、発生段階特異的、外部から添加した物質によって誘導または抑制されうる調節制御を受けるプロモータ因子によって調節されうる。この調節制御の結果、リコンビナーゼ発現がプロモータ因子によって媒介される細胞だけで標的配列の遺伝子組み換えが生じる。したがって、組み換えhtrbタンパク質の活性化発現はリコンビナーゼ発現の制御を通じて調節されうる。

【0172】

組み換えhtrbタンパク質の発現を調節するためにcre/loxPリコンビナーゼ系を用いるには、Creリコンビナーゼと対象タンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む遺伝子導入動物の作成が必要である。Creリコンビナーゼと組み換えhtrb遺伝子の両方を含む動物は、「二重」遺伝子導入動物の作成によって提供されうる。そのような動物を提供する便利な方法は、それぞれが一つの導入遺伝子、たとえばhtrb遺伝子とリコンビナーゼ遺伝子を含む二つの遺伝子導入動物を交配することである。

htrb導入遺伝子を含む遺伝子導入動物をリコンビナーゼ媒介発現形式で最初に作成することの一つの利点は、対象タンパク質が、アゴニストまたはアンタゴニストであるが、遺伝子導入動物で発現すると有害である可能性に由来する。そのような場合、対象導入遺伝子がすべての組織でサイレントである創始個体集団を繁殖させ維持することができる。この創始個体集団の各個体は、リコンビナーゼをたとえば一またはそれ以上の組織および／または目的の一時的パターンで発現している動物と交配することができる。このように、たとえば拮抗性htrb導入遺伝子がサイレントである創始個体集団を作成することで、その創始個体からの、特定の組織でまたはある発生段階でhtrb媒介誘導が破壊されることがたとえば致死表現型を生じる結果になる子孫を研究することができる。

【0173】

htrb導入遺伝子の発現を促進するには原核タンパク質が同時に発現されている必要のある原核プロモータ配列を用いて、類似の条件的導入遺伝子を提供することができる。典型的なプロモータと、対応する転写活性化原核タンパク質は特許文献14に示されている。

【0174】

条件的導入遺伝子のさらなる過剰発現を、たとえばリコンビナーゼまたは原核タンパク質といった転写活性化タンパク質をコードする遺伝子が組織に送達され細胞型特異的な方式で発現させられる遺伝子治療の方法で誘導することができる。この方法では、htrb導入遺伝子は、転写活性化因子の導入によって「スイッチが入る」までサイレントのまま成熟期まで留まることができる。

【0175】

典型的な一実施形態において、本発明の「遺伝子導入非ヒト動物」は、導入遺伝子を非ヒト動物の生殖細胞系列に導入することによって作成される。導入遺伝子を導入するために、発生のさまざまな段階にある胚の標的細胞を用いることができる。胚の標的細胞の発生段階によって異なる方法が用いられる。本発明の実施に用いられる任意の動物の特定の系列は、良好な一般的健康、良好な胚収率、胚において前核が見えやすいこと、繁殖に関して健康であることについて選択される。さらに、ハプロタイプは重要な要素である。たとえば、遺伝子導入マウスを作成するとき、C57BL/6またはFVBといった系統がしばしば用いられる(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)。好ましい系統は、たとえばC57BL/6またはDBA/1のように、H-2b、H-2dまたはH-2qハプロタイプを有する系統である。本発明の実施に用いられる系統はそれ自体が遺伝子導入動物、および／またはロックアウト動物であることができる(すなわち、部分的または完全に抑制された一またはそれ以上の遺伝子を有する動物から得られた)。一実施形態では、導入遺伝子構造は一細胞期胚に導入される。接合子は微量注入の最良の標的である。マウスでは、雄性前核は直径約20 μm に達し、1~2pLのDNA溶液の再現性のある注入が可能になる。遺伝子導入の標的として接合子を用いることには、大部分の場合注入されたDNAは第一卵割の前に宿主遺伝子に組み込まれるという大きな利点がある(非特許文献92)。結果として、遺伝子導入動物のすべての細胞が組み込まれた導入遺伝子を持つことになる。生殖細胞の50%が導入遺伝子を有するため、このことはまた一般的に、導入遺伝子の創始個体から子孫への効率的な伝達に反映される。

10

20

30

【0176】

通常、受精胚は前核が出現するまで適当な培地中でインキュベートされる。概ねこの時に、導入遺伝子を含むヌクレオチド配列が雌性または雄性前核へ下記に示すように導入される。マウスのような一部の種では、雄性前核が好ましい。外因性遺伝物質を接合子雄DNA相補体に、それが卵核または接合子の雌性前核によって処理される前に加えるのが非常に好ましい。卵核または雌性前核は、雄DNA相補体に影響を与える分子を放出すると考えられており、おそらく雄DNAのプロタミンをヒストンで置換することによって、雌および雄DNA相補体の組み合わせを促進し二倍体接合子を形成する。

【0177】

したがって、外因性遺伝物質を、DNAの雄相補体またはDNAの任意の他の相補体に、それが雌性前核から影響を受ける前に加えるのが好ましい。たとえば、外因性遺伝物質は、雄性前核の形成後できるだけ早く初期雄性前核に加えられ、このとき雄性および雌性前核は十分離れていて両方が細胞膜の近くに位置する。あるいは、精子核が脱凝縮するように誘導された後に、外因性遺伝物質を精子核に加えることができる。外因性遺伝物質を含む精子はそれから卵子に加えることができ、または脱凝縮精子を卵子に加えその後できるだけ早く導入遺伝子構造を加えることができる。

40

【0178】

導入遺伝子ヌクレオチド配列を胚に導入することは、たとえば微量注入、エレクトロポレーション、またはリポフェクションといった既知の任意の方法で達成しうる。導入遺伝子ヌクレオチド配列の胚への導入後、胚はさまざまな長さの時間in vitroでインキュベートすることができ、または代理母に再移植することができ、またはその両方である。満期ま

50

でのin vitroインキュベーションも本発明の範囲内にある。一つの一般的方法では胚をin vitroで種によって約1~7日間インキュベートし、それから代理母に再移植する。

【0179】

本発明の目的のためには、接合子は本質的に、完全な生物に発生することのできる二倍体細胞の形成である。一般的に接合子は、一つの配偶子または複数の配偶子に由来する二つの半数体核の融合によって自然にまたは人工的に生じた核を含む卵から成る。したがって、配偶子核は自然に対応するもの、すなわち、分化を受け、機能する生物に発生することのできる、生存能力のある接合子を生じるものでなければならない。一般的に、正倍数性接合子が好ましい。正倍数性接合子が得られる場合は、染色体数は、両方の配偶子が生じた生物の正倍数と1より大きく異なるべきでない。

10

【0180】

類似の生物学的事項に加えて、物理的な事項もまた、接合子の核または遺伝物質に加えることのできる、接合子核の一部を構成する外因性遺伝物質の量(たとえば容量)を支配する。遺伝物質が全く除去されない場合、加えることのできる外因性遺伝物質の量は、物理的に破壊的となることなく吸収されうる量によって制限される。一般的に、挿入される外因性遺伝物質の量は約10ピコリットルを超えない。付加の物理的影響は、接合子の生存能力を破壊するほど大きくてはならない。結果として生じる接合子の遺伝物質は、外因性遺伝物質を含め、接合子が機能する生物になる分化および発生を開始し維持することが生物学的に可能でなければならないので、DNA配列の数と変異の生物学的な限界は、特定の接合子および外因性遺伝子の機能によって異なり、当業者には容易に明らかとなる。

20

【0181】

接合子に加えられた導入遺伝子構造のコピー数は、加えられた外因性遺伝物質の総量に依存し、遺伝子形質転換が生じることの可能な量となる。理論的に必要なのは一つのコピーだけである;しかし一般的に、一つのコピーが機能するのを保証するため、たとえば導入遺伝子構造の1,000~20,000コピーといった多数のコピーが用いられる。本発明に関しては、外因性DNA配列の表現型発現を高めるために、挿入された外因性DNA配列のそれぞれについて一つより多い機能するコピーを有することにはしばしば利点がある。

【0182】

細胞、核膜または他の存在する細胞または遺伝構造を破壊するものでない限り、外因性遺伝物質を核遺伝物質に付加させることのできる任意の技術を用いることができる。外因性遺伝物質は核遺伝物質に微量注入によって優先的に挿入される。細胞および細胞内構造の微量注入は当該分野で既知であり利用されている。

30

【0183】

再移植は標準的方法を用いて達成される。通常、代理母は麻酔され、胚は卵管に挿入される。特定の宿主に移植される胚の数は種によって異なるが、通常はその種の自然の産仔数に相当する。

【0184】

代理母の遺伝子導入仔は、導入遺伝子の存在および/または発現について任意の適当な方法を用いてスクリーニングすることができる。スクリーニングはしばしば、導入遺伝子の少なくとも一部と相補的なプローブを用いたサザンブロットまたはノーザンブロット分析によって達成される。導入遺伝子産物の存在についてのスクリーニングの代替または追加となる方法として、導入遺伝子にコードされたタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット分析を用いることができる。典型的にはDNAを尾の組織から調製し、サザン分析またはPCRによって導入遺伝子について分析される。あるいは、導入遺伝子を最高のレベルで発現していると考えられている組織または細胞を、導入遺伝子の存在および発現についてサザン分析またはPCRを用いて試験することができるが、この分析には任意の組織または細胞型を用いることができる。

40

【0185】

導入遺伝子の存在を評価するための代替のまたは追加の方法は、制限なく、酵素および/または免疫学的検定のような適当な生化学検定、特定のマーカーまたは酵素活性について

50

の組織染色、フローサイトメトリー分析、などを含む。血液の分析 もまた血液中の導入遺伝子産物の存在を検出するのに、またさまざまな型の血液細胞および他の血液成分の濃度に対する導入遺伝子の効果を評価するのに有益でありうる。

【0186】

遺伝子導入動物の子孫は、遺伝子導入動物を適当なパートナーと交配することによって、または遺伝子導入動物から得られた卵子および／または精子のin vitro受精によって得ることができる。パートナーとの交配を行うとき、パートナーは遺伝子導入および／またはノックアウトであることもまたはないこともできる；遺伝子導入であるとき、同じまたは異なる導入遺伝子、または両方を含むことができる。あるいは、パートナーは親系統であることができる。in vitro受精が用いられるとき、受精胚は代理母に移植またはin vitroインキュベートする、または両方を行うことができる。いずれかの方法を用いて、子孫は導入遺伝子の存在について上記の方法または他の適当な方法を用いて評価することができる。

【0187】

本発明にしたがって作成された遺伝子導入動物は外因性遺伝物質を含む。上記に示すように、外因性遺伝物質は、ある実施形態では、結果としてhtrbタンパク質(アゴニストまたはアンタゴニスト)、そしてアンチセンス転写物、またはhtrb変異体の産生を行うDNA配列である。さらに、そのような実施形態では配列は転写調節因子たとえばプロモータと結合しており、それは好ましくは特定の型の細胞において導入遺伝子産物を発現させる。

【0188】

レトロウイルス感染もまた導入遺伝子を非ヒト動物へ導入するのに用いることができる。発生中の非ヒト胚はin vitroで胞胚期まで培養することができる。この期間中、割球はレトロウイルス感染の標的となりうる(非特許文献93)。割球の効率的な感染は酵素処理で透明帯を除去することによって得られる(非特許文献87)。導入遺伝子を導入するのに用いるウイルスベクター系は典型的には、導入遺伝子を有する複製に欠陥のあるレトロウイルスである(非特許文献94；非特許文献95)。導入は割球を単層のウイルス産生細胞上で培養することによって容易かつ効率的に得られる(非特許文献95(前記)；非特許文献96)。あるいは、感染はより遅い段階で行うことができる。ウイルスまたはウイルス産生細胞は胞胚腔へ注入することができる(非特許文献97)。創始個体の大半は、遺伝子導入非ヒト動物を形成する細胞の部分集合でだけ組み込みが起るため、導入遺伝子についてモザイクとなる。さらに、創始個体はゲノムの異なる位置に導入遺伝子のさまざまなレトロウイルス挿入を有する可能性があり、これは一般に子孫において分離する。さらに、妊娠中期胚の子宮内レトロウイルス感染によって、導入遺伝子を生殖細胞系へ導入することも可能である(非特許文献97(上記))。

【0189】

導入遺伝子導入のための標的細胞の第三の型は胚性幹細胞(ES)である。ES細胞はin vitroで培養された移植前胚から得られ、胚と融合される(非特許文献98；非特許文献99；非特許文献100；および非特許文献101)。導入遺伝子は、DNA導入またはレトロウイルス媒介形質導入によって、ES細胞へ効率的に導入することができる。そのような形質転換ES細胞はその後非ヒト動物からの胞胚と組み合わせることができる。ES細胞はその後、胚にコロニー形成し、結果として生じるキメラ動物の生殖細胞系に寄与する。総説は非特許文献102を参照。

【0190】

4.7. htrb治療薬のスクリーニング検定

本発明はさらに、たとえば治療および／または異常なhtrb活性が原因で生じるかまたはそれが寄与する、そしてhtrb活性またはタンパク質濃度の調節によって恩恵を受けることのできる疾患または状態の発症を防ぐための、htrb治療薬を同定するスクリーニング方法を提供する。そのような疾患、状態または障害の例はたとえば炎症性反応を含む：リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、I型糖尿病、乾癬、骨粗鬆症、糖尿病性腎炎、円形脱毛症、グレーブス病、全身性エリテマトーデス、硬化性苔癬、潰瘍性大腸炎、冠動脈疾患、動脈炎

、糖尿病性網膜症、低出生体重、妊娠合併症、重症歯周病、乾癬およびインシュリン依存性糖尿病：を制限なく含むが、特に動脈病変、がん、たとえば、ステロイドホルモン応答性腫瘍の成長を含むがん(たとえば乳がん、前立腺がん、または精巣がん)、血管系疾患または障害(たとえば血栓症発作、虚血性発作、ならびにアテローム硬化性および血栓性過程に由来する末梢血管疾患)、心臓障害(たとえば、心筋梗塞、鬱血性心不全、不安定狭心症および虚血性心疾患);そして心血管系疾患および障害(たとえば高血圧、低血圧、心筋細胞肥大そして鬱血性心不全に由来するもの)またはhtrb依存性過程の異常または変化の結果として生じる他の疾患、状態または障害によって特徴づけられる。

【0191】

htrb治療薬は、タンパク質、ペプチド、類似構造ペプチド、小分子、そして核酸を含む、任意の型の化合物でありうる。核酸はたとえば、遺伝子、アンチセンス核酸、リボザイム、または、三重らせん分子でありうる。本発明のhtrb治療薬はアゴニストまたはアンタゴニストでありうる。好ましいhtrbアゴニストは、htrbタンパク質または、少なくとも一つのhtrb活性、たとえば、繊維芽細胞成長因子受容体結合またはヘパリン硫酸結合を模倣するその誘導体でありうる。他の好ましいアゴニストは、細胞中のhtrbタンパク質産生を増加させることのできる化合物、たとえば、htrb遺伝子の発現をアップレギュレートすることのできる化合物、そしてhtrb活性および／またはhtrbタンパク質ともう一つの分子たとえば標的ペプチドとの相互作用を増大させることのできる化合物を含む。好ましいhtrbアンタゴニストは、優性阻害タンパク質であってたとえば繊維芽細胞成長因子受容体と結合することができるがヘパリン硫酸とはできないhtrbタンパク質を含む。他の好ましいアンタゴニストは、細胞中のhtrbタンパク質産生を減少または阻害する化合物、htrb遺伝子の発現をダウンレギュレートすることのできる化合物、htrb活性および／またはhtrbタンパク質ともう一つの分子との相互作用をダウンレギュレートすることのできる化合物を含む。別の好ましい一実施形態では、htrbアンタゴニストは標的ペプチドの修飾形であって、htrbタンパク質のFGFR結合領域と相互作用することができるが生物学的活性を有しない、たとえば、それ自体が細胞表面受容体ではない。

【0192】

本発明はまた、たとえば野生型htrbタンパク質またはhtrbタンパク質の変異形といったhtrbタンパク質と結合することができ、それによってhtrbの成長因子活性を調節するか、でなければhtrbの分解を引き起こすhtrb治療薬を同定するためのスクリーニング方法を提供する。たとえば、そのようなhtrb治療薬は、あるhtrbタンパク質(野生型または変異型)と特異的に相互作用する抗体またはその誘導体でありうる。

【0193】

このようにして、本発明は、htrbタンパク質と相互作用することのできる、またはFGF受容体および／またはヘパリン硫酸といったhtrbタンパク質と相互作用することのできる分子と相互作用することのできる化合物、および／またはhtrbタンパク質と受容体および／またはヘパリン硫酸といったもう一つの分子との相互作用を調節することのできる化合物を選択することから成る、htrbアゴニストおよびアンタゴニスト化合物を同定するためのスクリーニング方法を提供する。一般的に、htrbタンパク質と相互作用することのできる分子はここでは「htrb結合パートナー」と呼ぶ。

【0194】

本発明の化合物は、化合物の型および化合物の望まれる活性に応じてさまざまな分析法を用いて同定することができる。加えて、ここで記載するように、被験化合物は動物モデルでさらに試験することができる。下記に示すのはhtrb治療薬の同定に用いることのできる少なくとも一部の分析法である。治療薬を同定するための追加の分析法を設計することは当該分野の技術範囲内にある。

【0195】

4.7.1. 無細胞検定法

無細胞検定法は、htrbタンパク質または結合パートナー相互作用することができ、それによってhtrbタンパク質または結合パートナーの活性を修飾する化合物を同定するのに用い

10

20

30

40

50

ることができる。そのような化合物は、たとえば、タンパク質または結合パートナーの構造を修飾しそれによってその活性を示すことができる。無細胞検定法はまた、htrbタンパク質と標的ペプチドのようなhtrb結合パートナーとの間の相互作用を調節する化合物を同定するのに用いることができる。好適な一実施形態においては、そのような化合物を同定するための無細胞検定法は、本質的に、結合パートナーの存在または非存在下でタンパク質と被験化合物または被験化合物のライブラリを含む反応混合物にある。被験化合物はたとえばhtrb結合パートナーの誘導体であることができ、そのhtrb結合パートナーはたとえば生物学的に不活性な標的ペプチドまたは小分子である。

【0196】

したがって、本発明の一つの典型的なスクリーニング検定法は、htrbタンパク質またはその機能性断片またはhtrb結合パートナーを被験化合物または被験化合物のライブラリと接触させ、複合体の形成を検出する段階を含む。検出目的で、分子は特異的マーカーで、そして被験化合物または被験化合物のライブラリは異なるマーカーで標識することができる。被験化合物のhtrbタンパク質またはその断片またはhtrb結合パートナーとの相互作用はそれから、インキュベート段階と洗浄段階の後で、二つの標識の濃度を測定することによって検出できる。洗浄段階後の二つの標識の存在は、相互作用の存在を示す。

10

【0197】

分子間相互作用はまた、光学現象である表面プラズモン共鳴 (SPR) を検出するリアルタイムBIA (生体分子相互作用分析、Pharmacia Biosensor AB) を用いて確認することができる。検出は生物特異的インターフェースにおける巨大分子の質量濃度の変化に依存し、反応体を標識する必要が無い。一実施形態では、被験化合物のライブラリを、たとえばマイクロフローセルの一つの面となるセンサー表面に固定化することができる。htrbタンパク質、その機能性断片、htrbアナログまたはhtrb結合パートナーを含む溶液をそれからセンサー表面上に連続的に流す。シグナル記録上に示される共鳴角の変化は、相互作用が生じていることを示す。この技術はさらに、たとえばBIATECHNOLOGY HANDBOOK BY PHARMACIAに記載されている。

20

【0198】

本発明の別の典型的なスクリーニング検定法は、(a)(i)htrbポリペプチド、(ii)htrb結合パートナー、および(iii)被験化合物：を含む反応混合物の作成；そして(b)htrbとhtrb結合タンパク質との相互作用を検出する段階を含む。htrbポリペプチドとhtrb結合パートナーは、ここに記載の通り、組み換えによって、またはたとえば血漿といった起源物から精製して、または化学的に合成して作成することができる。被験化合物の存在下でhtrbとhtrb結合タンパク質の相互作用にみられる、被験化合物の非存在下での相互作用と比較して統計的に有意である変化 (増強または阻害) は、被験化合物がhtrb生物活性の潜在的なアゴニスト (模倣体または増強剤) またはアンタゴニスト (阻害因子) であることを示す。この検定法の化合物は同時に接触させることができる。あるいは、htrbタンパク質を最初に被験化合物と適当な長さの時間接触させることができ、次いでhtrb結合パートナーを反応混合物に加える。化合物の有効性は、被験化合物のさまざまな濃度を用いて得られたデータから用量反応曲線を作成することによって評価できる。さらに、比較のためのベースラインを提供する対照分析もまた行うことができる。対照分析では、htrb結合パートナーまたはhtrbポリペプチドを含む組成物に、単離され精製されたhtrbポリペプチドまたは結合パートナーが加えられ、複合体の形成が被験化合物の非存在下で定量される。

30

40

【0199】

htrbタンパク質とhtrb結合パートナーとの間の複合体形成は、さまざまな技術によって検出されうる。複合体の形成の調節は、たとえば放射性標識化、蛍光標識化、酵素的標識化htrbタンパク質またはhtrb結合パートナーといった検出可能に標識されたタンパク質を用いて、免疫検定法によって、またはクロマトグラフィー検出によって定量できる。

【0200】

典型的には、htrbまたはその結合パートナーのどちらかを固定化して、複合体を形成していない形または両方のタンパク質から複合体を分離するのを促進し、また検定法の自動化

50

に適應させるのが望ましい。htrbのhtrb結合パートナーへの結合は、反応物を入れるのに適当な任意の容器中で行うことができる。例にはマイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が含まれる。一実施形態では、タンパク質がマトリクスに結合できるようにするドメインを加えた融合タンパク質を提供することができる。たとえば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/htrb(GST/htrb)融合タンパク質はグルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着させることができ、それらを次いでたとえば³⁵S標識htrb結合パートナーといったhtrb結合パートナー、および被験化合物と組み合わせ、たとえば塩およびpHについて生理的条件で、それより少しストリンジェントな条件が望ましい可能性があるが、複合体形成に適した条件下で混合物をインキュベートする。インキュベート後に、結合していない標識を除去するためビーズを洗浄し、マトリクスを固定化して放射性標識を直接測定する(たとえばビーズをシンチレーター材に入れる)か、または複合体を続いて解離させてのち上清中の放射性標識を測定する。あるいは、複合体をマトリクスから解離させ、SDS-PAGEによって分離し、ビーズ画分にみられるhtrbタンパク質またはhtrb結合パートナーの量をゲルから、標準の電気泳動技術を用いて付属の実施例に記載されたように、定量することができる。

10

【0201】

タンパク質をマトリクス上に固定化する他の技術もまたここで注目する検定法で用いるために利用可能である。たとえば、htrbまたはその同族結合パートナーのいずれかを、ビオチンおよびストレプトアビジンとの結合を利用して固定化することができる。たとえば、ビオチン化htrb分子をビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシニミド)から既知の技術(たとえばビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)を用いて調製し、ストレプトアビジン-被覆96穴プレート(Pierce Chemical)のウェルに固定化することができる。あるいは、htrbと反応する抗体をプレートのウェルに誘導体化し、抗体結合によってhtrbをウェルに捕捉させることができる。上記の通り、htrb結合タンパク質と被験化合物の調製物を、プレートのhtrbを提示するウェルでインキュベートし、ウェルに捕捉された複合体の量を定量することができる。そのような複合体を検出する典型的な方法は、GST-固定化複合体について上に記載したものに加えて、include htrb結合パートナーと反応する抗体、またはhtrbタンパク質と反応し結合パートナーと競合する抗体を用いた複合体の免疫検出; また結合パートナーに関連する、内在性または外来性活性である酵素活性の検出に基づく酵素結合検定法を含む。外来性の場合、酵素は化学的に結合させるかまたはhtrb結合パートナーとの融合タンパク質として与えることができる。たとえば、htrb結合パートナーはホースラディッシュペルオキシダーゼと化学的に架橋するかまたは遺伝的に融合することができ、複合体に捕捉されたポリペプチドの量を酵素の発色基質、たとえば3,3'-ジアミノ-ベンジジン四塩酸塩または4-クロロ-1-ナフトールを用いて評価することができる。同様に、ポリペプチドとグルタチオン-S-トランスフェラーゼを含む融合タンパク質を与え、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを用いてGST活性を検出することによって複合体形成を定量することができる(非特許文献103)。

20

30

【0202】

複合体に捕捉された一つのタンパク質を免疫検出に基づいて定量する過程には、タンパク質に対する抗体、たとえば抗htrb抗体を用いることができる。あるいは、複合体中の検出するタンパク質を、htrb配列に加えて、抗体が容易に(たとえば市販品で)入手できるもう一つのポリペプチドを含む融合タンパク質の形で「エピトープ標識」することができる。たとえば、上記のGST融合タンパク質はまた、GST部分に対する抗体を用いて、結合の定量に使用することができる。他の有用なエピトープ標識は、c-myc由来の1030残基配列を含むmycエピトープ(たとえば非特許文献104を参照)、ならびにpFLAG系(International Biotechnologies, Inc.)またはpEZZ-プロテインA系(Pharmacia, NJ)を含む。

40

【0203】

htrbタンパク質と相互作用しhtrbタンパク質の活性を調節する化合物を同定するのに無細胞検定法をまた用いることができる。したがって、一実施形態では、htrbタンパク質を被

50

験化合物と接触させ、htrbの触媒活性が観察される。一実施形態では、htrbの標的分子と結合する能力が測定される。htrbの標的分子への結合親和性は既知の方法で測定することができる。

【0204】

4.7.2. 細胞検定法

上に記載したような無細胞検定法に加えて、本発明の提供するhtrbタンパク質は、たとえば小分子アゴニストまたはアンタゴニストを同定するための細胞検定法の作成を容易にする。一実施形態では、細胞膜外表面上にhtrb受容体タンパク質を発現している細胞を、被験化合物単独の存在下で、または被験化合物およびhtrbタンパク質の存在下でインキュベートし、被験化合物とhtrb受容体タンパク質との間、またはhtrbタンパク質(好ましくは標識htrbタンパク質)とhtrb受容体との間の相互作用をたとえばマイクロフィジオメーターを用いて検出する(非特許文献105)。htrb受容体タンパク質と、被験化合物またはhtrbタンパク質のいずれかとの間の相互作用は、溶媒の酸性化にみられる変化としてマイクロフィジオメーターによって検出される。この分析系はこのように、たとえばhtrb-htrb受容体相互作用に干渉することによって機能する分子アンタゴニスト、ならびにたとえばhtrb受容体を活性化することによって機能する分子アゴニストを同定する方法を提供する。

10

【0205】

細胞検定法はまた、htrb遺伝子の発現を調節する化合物、htrbmRNAの翻訳を調節する、もしくはhtrbmRNAまたはタンパク質の安定性を調節する化合物を同定するのに用いられる。したがって、一実施形態では、htrbを産生することのできる細胞、たとえば、JEG-3のような絨毛がん細胞株を被験化合物とインキュベートし、細胞培地中に産生されたhtrbの量を測定し、被験化合物と接触していない細胞から産生されたものと比較する。htrbに対するその化合物の特異性はさまざまな対照分析、たとえば、一またはそれ以上の対照遺伝子の発現を測定することによって確認することができる。試験しうる化合物は小分子、タンパク質および核酸を含む。特に、この検定法はhtrbアンチセンス分子またはリボザイムの有効性を測定するのに用いることができる。

20

【0206】

別の一実施形態では、htrb遺伝子の転写に対する被験化合物の影響が、htrb遺伝子のプロモータの少なくとも一部に作用のために連鎖したレポーター遺伝子を用いた導入実験によって測定される。遺伝子のプロモータ領域は、たとえばゲノムライブラリから既知の方法によって単離することができる。レポーター遺伝子は、たとえばルシフェラーゼまたはCAT遺伝子といった、容易に定量できるタンパク質をコードした任意の遺伝子とすることができる。そのようなレポーター遺伝子は既知である。

30

【0207】

好適な実施形態においては、本発明は絨毛がん細胞株JEG-3を用いた細胞検定法を提供する。この細胞株の分析は、これがウサギ抗htrbポリクローナル抗血清で免疫沈降される17 kDaのhtrbポリペプチドを産生することを示している。したがって、この細胞株は、htrb遺伝子の発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートするか、でなければhtrbポリペプチドの定常状態濃度、またはhtrbタンパク質分解処理現象、htrbグリコシル化、htrbリン酸化またはhtrb分泌といったhtrbポリペプチド翻訳後活性の効率に影響を与える物質のスクリーニング検定法に用いることができる。

40

【0208】

本発明の方法に用いることができる他の細胞スクリーニング検定法は当業者に既知であるかまたは明らかとなる。たとえば、htrbアゴニストおよびアンタゴニストは、それらが下流AP-1依存性転写活性化に影響する能力によって同定しうる。AP-1依存性活性化は複数の機構によって起こる。

【0209】

本発明はさらに、上記のスクリーニング検定法によって同定された新規の物質およびそのここに記載の治療への用途に関する。

50

【0210】

4.8. 予測的医薬

本発明はさらに、新規のhtrb遺伝子の同一性および、コードされたhtrbタンパク質の個人における発現レベルおよび／または機能に影響するその遺伝子と関連経路遺伝子の変化に少なくとも一部基づく予測的医薬を扱う。

【0211】

たとえば、ここに記載の診断検定法を用いて得られた情報は(単独で、または同じ疾患に寄与する他の遺伝子欠陥に関する情報と組み合わせて)、症状を有する対象者(たとえば炎症性リウマチ性関節炎の症状を有する対象者)が、特定の疾患または障害の原因となるかまたはそれに寄与する遺伝子欠陥を(たとえばhtrb遺伝子に、またはhtrb遺伝子の発現を調節する遺伝子に)有することを診断するかまたは確認するのに有用である。あるいは、その情報は(単独で、または同じ疾患に寄与する他の遺伝子欠陥に関する情報と組み合わせて)無症状の対象者が、対象者の異常なhtrb活性またはタンパク質濃度が原因で生じるかまたはそれが寄与する疾患または状態を発症する可能性があるかどうかを予知的に予測するのに用いることができる。その予知情報に基づき、医師はその個人における特定の疾患または状態を防ぐかまたは発症を延期するのに有用な、摂生(たとえば食事療法または運動)または治療計画を勧めることができる。

【0212】

さらに、個人において欠陥のあるまたは不完全なhtrb遺伝子またはタンパク質を生じる結果となる特定の一つの変化または複数の変化の知識は(htrb遺伝子プロファイル)、単独で、または同じ疾患に寄与する他の遺伝子欠陥に関する情報と組み合わせて(特定の疾患の遺伝子プロファイル)、「薬理ゲノム学」の目標である、特定の疾患の治療をその人の遺伝子プロファイルにカスタマイズすることを可能にする。たとえば、個人のhtrb遺伝子プロファイル、またはhtrb遺伝子変化が原因となるか寄与するある疾患または状態の遺伝子プロファイルによって、医師は1)その疾患または状態の分子的基盤に対処する薬物をより効果的に処方する;そして2)特定の薬物の適当な用量をよりよく決定することができる。たとえば、htrbタンパク質の発現レベルは、単独で、または同じ疾患に寄与することが知られている他の遺伝子の発現レベルと組み合わせて、その疾患のさまざまな段階にある多くの患者で測定することができ、その疾患の転写または発現プロファイルを作成することができる。個々の患者の発現パターンをそれからその疾患の発現プロファイルと比較し、その患者に投与する適当な薬物および用量を決定することができる。

【0213】

htrbまたは疾患遺伝子プロファイルに基づいて、最高の臨床的有用性を示すことが予測される集団を標的とする能力は:1)市場での結果が思わしくない既発薬物の再位置づけ;2)患者部分集合に特異的な安全性または有効性の限界の結果として臨床開発が中断された薬物候補の救済;そして3)薬物候補について加速されたそしてコストのより低い開発、およびより最適な薬物の識別(たとえばhtrbをマーカーとして用いることは有効量を最適化するのに有用であるので)、を可能にすることができる。

【0214】

これらの、そして他の方法は、以下の節でさらに詳細に記載する。

【0215】

4.8.1. 予知および診断検定法

本方法は、異常なhtrb活性、たとえば、htrbタンパク質の異常な濃度または異常なhtrb生物活性に伴う疾患、状態または障害を有する(診断)かまたは発症する危険がある(予知)かを判断する手段を提供する。そのような疾患、状態または障害の例は:リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、乾癬、紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、そして円形脱毛症、ならびに糖尿病性腎炎を含む炎症性疾患;成長因子サイトカインに関わるがんまたはステロイドホルモン応答性腫瘍(たとえば乳がん、前立腺がん、または精巣がん);血管系疾患または障害(たとえば血栓症発作、虚血性発作、ならびにアテローム硬化性および血栓性過程に由来する末梢血管疾患)、心臓障害(たとえば、心筋梗塞、不安定狭心症および虚血性心疾患);心血

10

20

30

40

50

管系疾患および障害(たとえば高血圧、低血圧、心筋細胞肥大そして鬱血性心不全に由来するもの)創傷治癒;肢再生;神経学的損傷または疾患(たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病、AIDS関連症候群または脳性麻痺に伴うもの);またはhtrb依存性過程の異常または変化の結果として生じる心血管の副血行性増殖と再構成、血管新生、自己分泌または傍分泌機構による細胞形質転換、細胞の走化性刺激(たとえば内皮性)、神経前駆細胞型(たとえばPC12褐色細胞種)の神経突起伸長、成熟ニューロンの神経生理機能の維持、胚間充織および肢芽前駆組織の増殖、中胚葉誘導とその他の発生過程、コラゲナーゼおよびプラスミノゲン活性化因子分泌の刺激、腫瘍血管新生、ならびに腫瘍侵入と転移:を含む他の疾患:を制限なく含む。

【0216】

10

したがって、本発明は、対象者が異常なhtrb濃度または生物活性が原因で生じるかまたはそれが寄与する疾患または状態を有するかまたは発症する可能性があるかどうかを判断する、たとえばhtrb遺伝子またはタンパク質の濃度、htrb生物活性および/またはhtrb遺伝子中の突然変異または特定の多型変異の存在を測定することを含む方法を提供する。

【0217】

一実施形態では、本方法は対象者がhtrbの異常なmRNAおよび/またはタンパク質濃度を有するかどうかを、たとえばノーザンブロット分析、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、in situ ハイブリダイゼーション、免疫沈降法、ウェスタンブロットハイブリダイゼーション、または免疫組織化学法によって測定することを含む。本方法によると、対象者から細胞を得、htrbタンパク質またはmRNA濃度を測定し、健常者のhtrbタンパク質またはmRNA濃度と比較する。異常なhtrbポリペプチド濃度またはmRNA濃度は異常なhtrb活性を示す可能性が高い。

20

【0218】

別の一実施形態では、本方法はhtrbの少なくとも一つの活性を測定することを含む。たとえば、htrbのヘパリンへの親和性は、たとえばここに記載するように測定できる。同様に、対象者のhtrbタンパク質の結合パートナー(たとえばIL-1タイプIまたはタイプII受容体)との親和定数を測定できる。得られた結果と健常者由来のhtrbタンパク質について行った類似の分析の結果との比較は、対象者が異常なhtrb活性を有するかどうかを示す。

【0219】

好適な実施形態においては、対象者が異常なhtrb活性が原因で生じるかまたはそれが寄与する疾患を有するかまたは発症する危険があるかどうかを判断する本方法は、対象者から得た細胞検体中に、(i)htrbポリペプチドをコードする遺伝子の全体性に影響する変化、または(ii)htrb遺伝子の誤発現の少なくとも一つによって特徴づけられる遺伝子変化の存在または非存在を検出すること、を含むとして特徴づけられる。たとえば、そのような遺伝子変化は、(i)htrb遺伝子からの一またはそれ以上のヌクレオチドの欠失、(ii)htrb遺伝子への一またはそれ以上のヌクレオチドの付加、(iii)htrb遺伝子の一またはそれ以上のヌクレオチドの置換、(iv)htrb遺伝子の染色体全体の再配列、(v)htrb遺伝子のメッセンジャーRNA転写物濃度の大きな変化、(vi)たとえばゲノムDNAのメチル化パターンにおける、htrb遺伝子の異常な修飾、(vii)htrb遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii)htrbポリペプチドの非野生型濃度、(ix)htrb遺伝子の対立遺伝子欠損、および/または(x)htrbポリペプチドの不适当的な翻訳後修飾、の少なくとも一つの存在を確認することによって検出できる。下記に示すように、本発明はhtrb遺伝子の変化を検出するための多数の分析技術を提供する。これらの方法は、配列分析を含む方法、サザンブロットハイブリダイゼーション、制限酵素部位マッピング、そして分析対象の核酸とプローブとの間のヌクレオチド対合の非存在の検出を含む方法、を含むがこれに限定されない。これらの、また他の方法はさらに後述する。

30

40

【0220】

特定の疾患または障害、たとえば遺伝子疾患または障害は、ある遺伝子の多型領域の特定の対立遺伝子変異に結びついており、これは必ずしも変異タンパク質をコードしている必要は無い。したがって、対象者におけるたとえば一塩基多型(「SNP」)のようなある遺伝

50

子の多型領域の特定の対立遺伝子変異体の存在は、その対象者を特定の疾患または障害を発症しやすくする。たとえばhtrb遺伝子のような遺伝子中の多型領域は、個人の集合における遺伝子のヌクレオチド配列を測定することによって同定することができる。多型領域、たとえばSNPが同定された場合、特定疾患との関連は、たとえば鬱血性心不全、高血圧、低血圧、またはがん(たとえばステロイド応答性の一または複数の腫瘍の成長を含むがん)のような特定の疾患を発症した個人といった特定の個人の集団を研究することによって判断できる。多型領域はたとえば、エキソン、エキソンのコード領域または非コード領域、イントロン、およびプロモータ領域といった遺伝子の任意の領域に位置しうる。

【0221】

htrb遺伝子は多型領域を含む可能性が高く、その特定の対立遺伝子が特定の疾患または状態、またはそのような疾患または状態を発症するより高い可能性と結びつきうる。したがって、本発明は対象者のhtrb遺伝子の多型領域の対立遺伝子または対立遺伝子変異の同一性を判断する方法を提供し、それによって対象者が多型領域の特定の対立遺伝子変異に結びついた疾患または障害を有するかまたは発症する危険があるかどうかを判断する。

【0222】

典型的な一実施形態において、htrb遺伝子のセンスまたはアンチセンス配列、またはその天然にみられる変異体、または対象htrb遺伝子またはその天然にみられる変異体に天然に結びついた5'または3'隣接配列またはイントロン配列、とハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列の領域を含む核酸プローブから成る核酸組成物が提供される。細胞の核酸は、ハイブリダイズが行われるようにされ、プローブは検体の核酸と接触させ、検体の核酸とプローブのハイブリダイゼーションが検出される。そのような技術は、欠失、置換、などを含む変化または対立遺伝子変異体をゲノムまたはmRNAレベルで検出するため、またmRNA転写物濃度を測定するために用いることができる。

【0223】

好ましい検出方法は、変異または多型部位と重なり合いまた変異または多型領域付近に約5、10、20、25、または30ヌクレオチドを有するプローブを用いた対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションである。本発明の好適な一実施形態においては、一塩基多型のような対立遺伝子変異体と特異的にハイブリダイズすることができるいくつかのプローブがたとえば「チップ」のような固相担体に結合されている。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィを含むさまざまな方法によって固相担体に結合させることができる。たとえば、一つのチップは最大250,000オリゴヌクレオチドを保持することができる。オリゴヌクレオチドを含む、また「DNAプローブアレイ」ともいうこれらのチップを用いた変異検出分析は、たとえば非特許文献106に記載されている。一実施形態では、一つのチップはある遺伝子の少なくとも一つの多型領域のすべての対立遺伝子変異体を含む。固相担体はそれから被験核酸と接触させ、特異的プローブとのハイブリダイゼーションが検出される。したがって、一またはそれ以上の遺伝子の多数の対立遺伝子変異体の同一性が、単純なハイブリダイゼーションで同定することができる。

【0224】

ある実施形態では、変化の検出は、アンカーPCRまたはRACE PCRといったポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(たとえば特許文献15および特許文献16を参照)の、あるいは、リガーゼ連鎖反応(LCR)(たとえば、非特許文献07;および非特許文献108を参照)のプローブ/プライマーを利用することを含み、そしてLCRはhtrb遺伝子中の点変異を検出するのに特に有用となりうる(非特許文献109を参照)。単に例証となる一実施形態において、本方法は(i)患者から細胞の検体を得る、(ii)検体の細胞から核酸(たとえば、ゲノム、mRNAまたはboth)を単離する、(iii)核酸検体を、htrb遺伝子(存在すれば)のハイブリダイゼーションと増幅が起こるような条件下で、htrb遺伝子と特異的にハイブリダイズする一またはそれ以上のプライマーと接触させる、そして(iv)増幅産物の存在または非存在を検出する、または増幅産物の大きさを検出し対照検体の長さと比較する段階を含む。ここに記載の変異を検出する任意の技術と組み合わせて、PCRおよび/またはLCRを予備増幅段階として使用するのが望ましい可能性があると考えられる。

【0225】

別の増幅方法は:自律的配列複製(非特許文献110)、転写増幅系(非特許文献111)、 Q - β レプリカーゼ(非特許文献112)、または任意の他の核酸増幅方法、その後の増幅分子の当業者に既知である技術を用いた検出、を含む。これらの検出の仕組みは、核酸分子が非常に小さい数存在する場合、核酸分子の検出に特に有用である。

【0226】

本検定法の好適な一実施形態においては、検体細胞からのhtrb遺伝子の変異または対立遺伝子変異体は、制限酵素切断パターンの変化によって同定される。たとえば、検体および対照DNAは単離され、増幅され(随意的に)、一またはそれ以上の制限酵素で消化され、そして断片長の大きさがゲル電気泳動で測定される。さらに、配列特異的リボザイム(たとえば、特許文献17を参照)を用いて、リボザイム切断部位の発生または消失によって、特定の変異の存在を調べることができる。

10

【0227】

さらに別の一実施形態では、直接htrb遺伝子を配列決定して、検体htrbの配列を対応する野生型(対照)配列と比較することによって変異を検出するために、既知のさまざまな配列決定反応の任意のものを用いることができる。典型的な配列決定反応は、Maxim and Gilbert(非特許文献113)またはSanger(非特許文献114)によって開発された技術に基づくものを含む。また、本検定法を実施するとき、質量分析による配列決定(たとえば特許文献18;非特許文献115;および非特許文献116を参照)を含むさまざまな自動化配列決定手順の任意のものを用いることができると考えられる(非特許文献117)。ある実施形態について、配列決定反応において核酸塩基の1個、2個、または3個だけの存在を確認すればよいのは当業者には明らかとなる。たとえば、一つの核酸だけが検出されるA-trackなどを行うことができる。

20

【0228】

さらなる一実施形態では、RNA/RNAまたはRNA/DNAまたはDNA/DNAヘテロ二重らせんにおけるミスマッチ塩基を検出するのに、切断試薬(たとえばヌクレアーゼ、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムそしてピペリジンで)からの保護を用いることができる(非特許文献118)。一般に、「ミスマッチ切断」の技術は、野生型htrb配列を含む(標識)RNAまたはDNAを、組織検体から得られた変異している可能性のあるRNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって作られた、ヘテロ二重らせんを得ることから始まる。この二本鎖二重らせんは、対照と検体鎖の間の塩基対ミスマッチによって存在するような二重らせんの一本鎖領域を切断する試薬で処理される。ミスマッチ領域を酵素的に消化するために、たとえば、RNA/DNA二重らせんはRNaseで、またDNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理することができる。別の実施形態では、ミスマッチ領域を消化するために、DNA/DNAまたはRNA/DNA二重らせんは、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムでそしてピペリジンと処理することができる。ミスマッチ領域の消化後、結果として生じる物質はそれから、変位の部位を調べるため、変性ポリアクリルアミドゲルで大きさによって分離される。たとえば、非特許文献119;非特許文献120を参照。好ましい一実施形態では、対照DNAまたはRNAは検出のために標識することができる。

30

【0229】

さらに別の一実施形態では、細胞の検体から得られたhtrbcDNA中の点変異を検出しマッピングする定められた系で、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する一またはそれ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を用いる。たとえば、E. coliのmutY酵素はG/AミスマッチでAを切断し、HeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼはG/TミスマッチでTを切断する(非特許文献121)。典型的な一実施形態によると、たとえば野生型htrb配列といったhtrb配列に基づくプローブを、被験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物とハイブリダイズさせる。二重らせんはDNAミスマッチ修復酵素で処理され、切断産物が生じるなら、電気泳動手順などから検出することができる。たとえば、特許文献19を参照。

40

【0230】

50

別の実施形態では、突然変異またはhtrb遺伝子の多型領域の対立遺伝子変異の同一性を同定するのに、電気泳動移動度の変化が用いられる。たとえば、変異型と野生型核酸との間の電気泳動移動度の違いを検出するのに、一本鎖高次構造多型(SSCP)を用いることができる(非特許文献122、また非特許文献123および非特許文献124を参照)。検体および対照htrb核酸の一本鎖DNA断片は変性され、復元させられる。一本鎖核酸の二次構造は配列によって異なり、結果として生じる電気泳動移動度の変化によって一塩基変化でも検出することができる。DNA断片は標識することができ、または標識プローブを用いて検出することができる。本検定法の感度は、二次構造が配列変化により感受性が高いRNAを(DNAよりも)用いることによって向上させることができる。好適な一実施形態においては、二本鎖ヘテロ二重らせん分子を電気泳動移動度の変化に基づいて分離するために、本方法はヘテロ二重らせん分析を用いる(非特許文献125)。

10

【0231】

さらに別の一実施形態では、変性濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)(非特許文献126)を用いて、変性剤の濃度勾配を含むポリアクリルアミドゲル中での変異型または野生型断片の動きが分析される。DGGEが分析方法として用いられるとき、DNAが完全には変性しないようにするのを確実にするため、たとえば高融点GC rich DNAの約40bpのGCクランプをPCRによって付加することにより、DNAは修飾される。さらなる一実施形態では、対照および検体DNAの移動度の差を同定するために、変性剤濃度勾配の代わりに温度勾配が用いられる(非特許文献127)。

【0232】

20

点変異またはhtrb遺伝子の多型領域の対立遺伝子変異の同一性を同定するための他の技術の例は、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長を含むがこれに限定されない。たとえば、オリゴヌクレオチドプライマーを、既知の変異またはヌクレオチドの違い(たとえば、対立遺伝子変異に)を中心に調製し、次いで、完全なマッチが見いだされる場合のみハイブリダイゼーションが可能である条件下で標的DNAとハイブリダイズさせることができる(非特許文献128);非特許文献129)。オリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に結合され標識された標的DNAとハイブリダイズする場合、オリゴヌクレオチドがPCR増幅された標的DNAまたはいくつかの異なる変異は多型領域とハイブリダイズするとき、そのような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション技術を用いて、反応毎に一つの変異または多型領域を試験することが

30

【0233】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術を、本発明と組み合わせ用いることができる。特異的増幅のプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、目的の変異または多型領域を分子の中心に(増幅が分別的ハイブリダイゼーションに依存するように)(非特許文献130)または、適当な条件下でミスマッチを防ぐかまたはポリメラーゼ伸長を低下させることができる一つのプライマーの3'最末端(非特許文献131)に持つことができる。さらに、切断に基づく検出を行うために、新規の制限部位を変異の領域に導入するのが望ましい可能性がある(非特許文献132)。ある実施形態において、増幅のためにTaqリガーゼを用いて増幅を行うことも考えられる(非特許文

40

献133)。そのような場合、連結反応は5'配列の3'末端に完全マッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を調べることによって特異的部位での既知の変異の存在を検出することができる。

【0234】

別の一実施形態では、対立遺伝子変異の同定は、たとえば特許文献20および非特許文献134に記載されたように、オリゴヌクレオチド連結反応検定法(OLA)を用いて行われる。OLAの手順は、標的の一本鎖の隣接する配列とハイブリダイズすることができるように設計された二つのオリゴヌクレオチドを用いる。そのオリゴヌクレオチドのうち一つは分離マーカーと結合され、たとえばビオチン化され、そしてもう一方は検出可能に標識されている。標的分子中に正確な相補的配列が見つかる場合、オリゴヌクレオチドはハイブリ

50

ダイズしてそれらの末端が隣接し、連結基質を生じる。連結反応によって、次いで標識オリゴヌクレオチドをアビジンまたは別のビオチンリガンドを用いて回収することができる。Nickerson, D. A.らはPCRおよびOLAの特質を組み合われた核酸検出検定法を記載している(非特許文献135)。この方法では、PCRを用いて標的DNAの指数増幅が達成され、標的DNAは次いでOLAを用いて検出される。

【0235】

このOLA法に基づくいくつかの技術が開発されており、htrb遺伝子の多型領域の特定の対立遺伝子変異体を検出するのに用いることができる。たとえば特許文献21は、3'-アミノ基を有するオリゴヌクレオチドと5'-リン酸化オリゴヌクレオチドを用いてホスホロアミデート結合を有する複合体を形成するOLAを開示する。非特許文献136に記載されたOLAの別の変形では、PCRと組み合わせたOLAによって、一つのマイクロタイターウェル内で二つの対立遺伝子のタイピングが可能になる。By marking each of the 対立遺伝子特異的プライマーのそれぞれを独特のハプテン、すなわちジゴキシゲニンとフルオレセインで標識することによって、各々のOLA反応を、異なる酵素レポーター、アルカリホスファターゼまたはホスラディッシュペルオキシダーゼで標識したハプテント異抗体を用いて検出することができる。この系によって、二つの異なる色を生じる高処理量の形式を用いて二つの対立遺伝子の検出が可能になる。

10

【0236】

本発明はさらに、htrb遺伝子中の一塩基多型を検出する方法を提供する。一塩基多型は不変配列の領域に隣接した変異の部位を構成するため、その分析に必要なのは変異の部位に存在する一塩基の同一性を判定することだけであり、患者それぞれについて完全な遺伝子配列を決定する必要は無い。そのような一塩基多型の分析を容易にするいくつかの方法が開発されている。

20

【0237】

一実施形態では、たとえば特許文献22 (Mundy, C. R.)に開示されたように、一塩基多型は特化したエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドを用いて検出することができる。本方法によると、多型部位の直接3'側である対立遺伝子配列と相補的なプライマーを、特定の動物またはヒトから得られた標的分子とハイブリダイズさせる。標的分子上の多型部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド誘導体と相補的なヌクレオチドを含む場合、次いでその誘導体を、ハイブリダイズしたプライマーの末端に組み込む。そのような組み込みによって、そのプライマーはエキソヌクレアーゼに耐性となり、それによって検出が可能になる。検体のエキソヌクレアーゼ耐性誘導体の同一性は既知であるので、プライマーがエキソヌクレアーゼに耐性となったという結果は、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドが、反応に用いられたヌクレオチド誘導体と相補的であったということ を明らかにする。この方法は、大量の無関係な配列データを決定する必要が無いという利点を有する。

30

【0238】

本発明の別の一実施形態では、多型部位のヌクレオチドの同一性を判断するのに、溶液を基盤とした方法が用いられる。Cohen, D. et al.(特許文献23;特許文献24)。特許文献22のMundy法のように、本方法はその部位のヌクレオチドの同一性を標識ジデオキシヌクレオチド誘導体を用いて判断し、またこの誘導体は多型部位のヌクレオチドと相補的であればプライマーの末端に組み込まれる。

40

【0239】

遺伝子ビット分析またはGBAとして知られる別の方法がGoelet, P. et al.によって記載されている(特許文献25)。Goelet, P. et al.の方法は、標識ターミネーターの混合物と、多型部位の3'側の配列と相補的なプライマーを用いる。組み込まれた標識ターミネーターは、標的分子の多型部位に存在する評価対象のヌクレオチドと相補的でありまたこれによって測定される。Cohen et al.の方法(特許文献23;特許文献26)とは対照的に、Goelet, P. et al.の方法は好ましくは不均一相検定法であって、プライマーまたは標的分子は固相に固定化されている。

50

【0240】

近年、DNA中の多型部位を分析するための、プライマーを用いるヌクレオチド組み込み手順がいくつか記載されている（非特許文献137；非特許文献138）；非特許文献139；非特許文献140；非特許文献141；非特許文献142；非特許文献143）。これらの方法は、どれも標識デオキシヌクレオチドの組み込みに依存して多型部位の塩基を識別する点でGBAと異なる。そのような形式では、シグナルは組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同じヌクレオチドの配列中に存在する多型は、配列の長さに比例するシグナルを生じうる（非特許文献144）。

【0241】

タンパク質翻訳の異常に早い終止を生じる変異については、短縮タンパク質試験(PTT)が効率的な診断手法を提供する（非特許文献145；非特許文献146）。PTTのためには、最初にRNAが入手可能な組織から単離され、逆転写され、目的のセグメントがPCRで増幅される。逆転写PCR産物は、次いでRNAポリメラーゼプロモータと真核翻訳を開始させる配列を含むプライマーを用いたnested PCR増幅のテンプレートとして用いられる。目的領域の増幅後、プライマーに組み込まれた独特のモチーフによって、PCR産物のその後のin vitro転写および翻訳が可能になる。翻訳産物のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動で、短縮したポリペプチドの存在が、翻訳の異常に早い終止を引き起こす変異の存在を示す。この技術の一変形において、目的の標的領域が単一エクソンに由来する場合、DNA(RNAでなく)がPCRテンプレートとして用いられる。

【0242】

ここに記載の方法は、たとえば、少なくとも一つのプローブ核酸、プライマーの組；および／またはたとえばhtrbポリペプチドが関連する疾患または病気の症状または家族歴を示す患者を診断するために臨床で容易に使用しうるここに記載の抗体試薬を含む、包装済み診断キットを用いて行うことができる。

【0243】

任意の細胞型または組織を下記に示す診断に用いることができる。好ましい一実施形態において、htrb遺伝子の変異の存在または多型領域の対立遺伝子変異の同一性を判定するために、体液、たとえば血液を対象者から得る。体液、たとえば血液は、既知の技術（たとえば静脈穿刺）によって得ることができる。あるいは、核酸試験は乾燥検体（たとえば毛髪または皮膚）について行うことができる。出生前診断のためには特許文献26（Bianchi）に記載されたように、胎児核酸検体は母体血から得ることができる。あるいは、出生前試験を行うために、羊水細胞または絨毛膜を得ることができる。

【0244】

htrb遺伝子の多型領域の特定の対立遺伝子変異体または突然変異の存在を判定するのにRNAまたはタンパク質を用いるとき、使用する細胞または組織はhtrb遺伝子を発現しなければならない。これらの方法に用いるのに好ましい細胞は、心細胞を含む（実施形態を参照）。使用することのできる他の細胞または組織は、たとえばノーザンブロット分析によって、対象における特定htrb遺伝子の発現パターンを決定することで識別することができる。

【0245】

診断手順はまた、生検または切除で得られた患者組織の（固定および／または凍結）組織切片についてin situで直接行うことができ、核酸精製は不要である。核酸試薬をそのようなin situ手順のためのプローブおよび／またはプライマーとして用いることができる（たとえば非特許文献147参照）。

【0246】

主として一つの核酸配列の検出に注目する方法に加えて、プロファイルもまたそのような検出体系において評価しうる。フィンガープリントプロファイルを、たとえばディフレーションシャルディスプレイ法、ノーザン分析および／またはRT-PCRを用いて、作成することができる。

【0247】

上記の野生型または変異型htrbポリペプチドまたはその対立遺伝子変異体に対する抗体を

10

20

30

40

50

また疾患診断および予知に用いることができる。そのような診断方法は、htrbポリペプチド発現レベルの異常、あるいは構造および／またはhtrbポリペプチドの組織、細胞、または細胞内配置における異常を検出するのに用いることができる。構造上の差異は、たとえば、正常htrbポリペプチドと比較した変異型htrbポリペプチドの大きさ、電気陰性度、または抗原性の違いを含む。分析する組織または細胞型から得られたタンパク質は、当業者に既知である、ウェスタンブロット分析を含むがこれに限定されない技術を用いて容易に検出または単離されうる。ウェスタンブロット分析を実施する方法の詳細な説明については、上記の非特許文献17の18章を参照。ここで用いられるタンパク質検出および単離方法はまた、Harlow and Laneに記載されたようなものであることができ、たとえば(非特許文献79(その全体がこの参照により開示に含まれる))を参照

10

このことは、たとえば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光比色による検出と組み合わせて蛍光標識抗体(下記参照)を用いる免疫蛍光技術によって達成することができる。本発明において有用である抗体(またはその断片)は、追加的に、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡法の場合のように、htrbポリペプチドのin situ検出のために、組織学的に用いることができる。In situ検出は、患者から組織標本を切除して、それに本発明の標識抗体を加えることによって達成することができる。抗体(またはその断片)は、好ましくは標識抗体(または断片)を生物検体に被せて加える。そのような手順の使用を通じて、htrbポリペプチドの存在を検出できるだけでなく、被験組織中のその分布もまた調べることができる。本発明を用いて、通常の技能を有する者はこのようなin situ検出を達成するために幅広い組織学的方法(染色手順のような)の任意のものを修飾しうることを容易に理解する。

20

【0248】

抗原または抗体を結合させることのできる担体として、しばしば固相担体またはキャリアが用いられる。よく知られた担体またはキャリアは、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然または修飾セルロース、ポリアクリルアミド、ハンレイ岩、磁鉄鉱を含む。キャリアの性質は、本発明の目的のためにある程度可溶性であるかまたは不溶性であることができる。担体物質は、結合した分子が抗原または抗体に結合できる限り、事実上任意の可能な構造を有しうる。したがって、担体の構造は、ビーズのように球形、試験管の内面または棒の外表面のように円筒状であることができる。あるいは、表面はシート、試験片、などのように平らであることができる。好ましい担体はポリスチレンビーズを含む。当業者は抗体または抗原を結合するための多くの他の適当なキャリアを知っており、または通常の実験を用いてそのように確認することができる。

30

【0249】

抗htrbポリペプチド特異的抗体を標識する一つの方法は、酵素との結合を介して酵素免疫検定法(EIA)に用いることである(非特許文献148;非特許文献149;非特許文献150;非特許文献151;非特許文献152。抗体に結合する酵素は適当な基質、好ましくは発色基質と反応し、たとえば分光学的、蛍光比色的または目視的方法で検出可能な化学的部分を生じる。抗体を検出可能に標識するのに用いることのできる酵素は、マレイン酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 δ -5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、そしてアセチルコリンエステラーゼを含むがこれに限定されない。検出は、酵素に発色基質を用いる比色法で行うことができる。検出はまた、同様に調製した標準と比べた基質の酵素反応の程度の目視による比較で行うことができる。検出はまたさまざまな他の免疫検定法の任意のものを用いて行うことができる。たとえば、抗体または抗体断片を放射性標識することによって、放射免疫検定法(RIA)を用いてフィンガープリント遺伝子野生型または変異ペプチドを検出することが可能である(たとえば、この参照により開示に含まれる非特許文

40

50

献153を参照)。放射性同位体はたとえば γ カウンターまたはシンチレーションカウンターの使用、またはオートラジオグラフィーによって検出することができる。

【0250】

蛍光化合物を用いて抗体を標識することもまた可能である。蛍光標識抗体が適当な波長の光に曝されると、その存在は蛍光によって検出することができる。もっとも広く用いられている蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドそしてフルオレサミンがある。

【0251】

抗体はまた、 ^{152}Eu または他のランタノイド系列のように蛍光を発する金属を用いて検出可能に標識することができる。これらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)またはエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)のような金属キレート基を用いて抗体に結合させることができる。

【0252】

抗体はまた、化学発光化合物とカップリングさせることによって検出可能に標識することができる。そして化学発光標識抗体の存在は、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することによって測定することができる。特に有用な化学発光標識化合物の例はルミノール、イソルミノール、theromaticアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩そしてシュウ酸エステルである。

【0253】

同様に、本発明の抗体を標識するのに生物発光化合物を用いることができる。生物発光は生物系にみられる化学発光の一種で、触媒タンパク質がその化学発光反応の効率を上昇させる。生物発光タンパク質の存在は発光の存在を検出することによって測定される。標識の目的のために重要な生物発光化合物はルシフェリン、ルシフェラーゼそしてエクオリンである。

【0254】

さらに、遺伝子または遺伝子産物または多型変異体における変化を検出するための上記の方法の任意のものを、処置または治療の過程を観察するために使用することが理解される。

4.8.2. 薬理ゲノム学

個人において欠陥のあるまたは不完全なhtrb遺伝子またはタンパク質を生じる結果となる特定の一つの変化または複数の変化の知識は(htrb遺伝子プロファイル)、単独で、または同じ疾患に寄与する他の遺伝子欠陥に関する情報と組み合わせて(特定の疾患の遺伝子プロファイル)、「薬理ゲノム学」の目標である、特定の疾患の治療をその人の遺伝子プロファイルにカスタマイズすることを可能にする。たとえば、htrb遺伝子の特定の対立遺伝子を有する対象者は、特定の疾患の症状を示しまたは示さない可能性があり、または特定の疾患の症状を発症する素因がある。さらに、これらの対象者が症状を有する場合は、症状はある薬物たとえば特定のhtrb治療薬に応答しまたは応答しない可能性があり、しかし別の薬物には応答する可能性がある。したがって、欠陥のあるおよび／または不完全なhtrb遺伝子および／またはタンパク質によって生じるかまたはそれらが寄与している疾患または状態の症状を有する対象者集団から、htrb遺伝子プロファイル(たとえば、htrb遺伝子の、特定の疾患の発症に関連する変化の分類)を作成すること(htrb遺伝子集団プロファイル)、および個人のhtrbプロファイルを集団プロファイルと比較することで、特定の患者または患者集団(すなわち、同一の遺伝子変化を有する患者の集団)について安全で有効であると予測される薬物を選択または設計することが可能になる。

【0255】

たとえば、欠陥のあるまたは不完全なhtrb遺伝子によって生じるかまたはそれらが寄与している疾患を有する患者群において、たとえばhtrb遺伝子の同一性といったhtrbプロファイルを測定することで、htrb集団プロファイルを行うことができる。随意的に、htrb集団プロファイルはさらに：1)htrb関連疾患に伴う症状の重症度、2)htrb遺伝子発現レベル、

10

20

30

40

50

3) htrbmRNAレベル、および／または4) htrbタンパク質濃度、そして(iii) htrb遺伝子またはhtrb経路遺伝子中に存在する特定の遺伝子の一つの変化または複数の変化に基づいて、集団を分割または分類すること、を観察することを含むさまざまな方法の任意のものをを用いて、集団のhtrb治療薬に対する応答に関する情報を含むことができる。htrb遺伝子集団プロファイルはまた、随意的に、患者が特定の療法に対して応答性または不応性のどちらかである特定の変異を示しうる。この情報つまり集団プロファイルは、したがって、個人のhtrbプロファイルに基づいてどの個人が特定の薬物に反応するかを予測するのに有用である。

【0256】

好適な一実施形態においては、htrbプロファイルは転写または発現レベルプロファイルであり、段階(i)はhtrbタンパク質の発現レベルを、単独で、または同じ疾患に寄与することが分かっている他の遺伝子の発現レベルと組み合わせて、測定することから成る。htrbプロファイルは、疾患のさまざまな段階にある多くの患者で測定することができる。

【0257】

薬理ゲノム学研究はまた、遺伝子導入動物を用いて行うことができる。たとえばhtrb遺伝子の特定の対立遺伝子変異を有する遺伝子導入マウスを、たとえばここに記載するように作成することができる。これらのマウスは、たとえばその野生型htrb遺伝子を、ヒトhtrb遺伝子の対立遺伝子で置き換えることによって作成することができる。特定のhtrb治療薬へのこれらのマウスの応答をそれから測定することができる。

【0258】

4.8.3. 臨床試験中のhtrb治療薬の効果の観察

htrbまたは疾患遺伝子プロファイルに基づいて、最高の臨床的有用性を示すことが予測される集団を標的とする能力は:1)市場での結果が思わしくない既発薬物の再位置づけ;2)患者部分集合に特異的な安全性または有効性の限界の結果として臨床開発が中断された薬物候補の救済;そして3)薬物候補について加速されたそしてコストのより低い開発、およびより最適な薬物の識別(たとえばhtrbをマーカーとして用いることは有効量を最適化するのに有用であるので)、を可能にすることができる。

【0259】

htrb治療薬を用いた個人の治療は、たとえばhtrbタンパク質濃度または活性、htrbmRNAレベル、および／または htrb転写レベルといったhtrbの特性を測定することによって観察することができる。この測定は、治療が有効であるかどうか、あるいは治療を調節または最適化すべきかどうかを示す。このように、htrbは臨床試験中に薬物の有効性に関するマーカーとして用いることができる。

【0260】

好適な一実施形態においては、本発明は対象者の、ある物質(たとえば、アゴニスト、アンタゴニスト、類似構造ペプチド、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、またはここに記載のスクリーニング検定によって同定された他の薬物候補)を用いた治療の有効性を観察する、(i)物質の投与前に、対象者から投与前検体を得る;(ii)投与前検体中のhtrbタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルを検出する;(iii)一またはそれ以上の投与後検体を対象者から得る;(iv)投与後検体中のhtrbタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性レベルを検出する;(v)投与前検体中のhtrbタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性レベルを、一または複数の投与後検体中のhtrbタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAと比較する;そして(vi)相応して対象者への物質の投与を変更する段階から成る方法を提供する。たとえば、物質の投与を増加させることは、htrbの発現または活性を検出されたよりも高いレベルへ上昇させるために、すなわち、物質の有効性を向上させるために望ましい可能性がある。あるいは、物質の投与を減少させることは、htrbの発現または活性を検出されたよりも低いレベルへ低下させるために、すなわち、物質の有効性を減少させるために望ましい可能性がある。

【0261】

htrb治療薬は有害でありうる遺伝子の発現を増加または減少させないことを検証するため

に、対象者の細胞もまたhtrb治療薬の投与の前および後に得ることができ、htrb以外の遺伝子の発現レベルを検出できる。これは、たとえば転写プロファイリングの方法を用いて行うことができる。このように、htrb治療薬で処理されたおよび処理されていない細胞での遺伝子の発現を比較するために、in vivoでhtrb治療薬に曝露された細胞からのmRNAと、htrb治療薬に曝露されていない同じ型の細胞からのmRNAとを逆転写し、多数の遺伝子からのDNAを含むチップとハイブリダイズさせることができる。たとえば、htrb治療薬がある個人において前がん遺伝子の発現のスイッチを入れる場合、この特定のhtrb治療薬を使用することは望ましくない可能性がある。

【0262】

4.9. htrb治療薬および治療方法

本発明は、たとえば炎症または自己免疫疾患といった異常なインターロイキン-1発現または活性に伴う疾患を有するかまたは発症する可能性のある対象者を治療する、予防的および治療的方法の両方を提供する。サイトカイン類であるインターロイキン-1(IL-1)および腫瘍壊死因子(TNF)は炎症性反応の重要な伝達物質であり、多くの慢性炎症性疾患の病因において中心的な役割を果たすように見える。それらのin vivo生物活性は、白血球細胞を組織へ引きつけ活性化しそれらが他のリンパ球親和性サイトカインおよび異化酵素を分泌するのを刺激することによって、局所炎症とマトリクス異化を再現するのに十分であることは現在よく記載されている。これらのサイトカインの高生産はまた、感染に対する応答と結びついてきており、ここでIL-1およびTNFの局所誘導が微生物の侵入の排除を促進する。古典的研究はしかしまた、ある感染条件では非常に高い濃度の単球サイトカインが

10

20

30

40

50

【0263】

たとえば、サイトカインは発生の全期を通じて機能し、ヒト胎盤の発達および機能において特に重要でありうる(総説は非特許文献154)。さまざまなサイトカインが胎盤-子宮境界面に示されているが、着床部位の組織の形状が複雑であるため、産生の正確な細胞起源はまだ同定されていない。発現 of the サイトカインEGF、インターロイキン 1β (IL- 1β)、IL-2、IL-3、インターフェロン α (IFN- α)、IFN- γ 、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)および形質転換成長因子 β 1(TGF- β 1)が、胎盤および脱落膜から単離された細胞から分析されている。さらに、胎盤および子宮細胞による、サイトカイン受容体IGF-1r、PDGF-r α/β 、IL-1rII、IL-6r、IL-7r、IFN- γ r、TNF-rp80およびエンドグリンの発現が、免疫組織学

【0264】

炎症性サイトカインIL-1、IL-6および腫瘍壊死因子- α (TNFa)は、出生前子宮内感染(IUI)と新生児脳損傷の間の繋がりにおいて機能するように見える。さらに、母体IUIは早産の危険を増大させ、これは今度は脳室内出血、新生児白質損傷、および後の脳性麻痺の増大するリスクと結びつく(非特許文献155)。IL-1、IL-6およびTNFaは、IUI、早産、新生児感染、そして新生児脳損傷と結びついていることが見いだされている。三つの関連する母体/胎児の部分(子宮、胎児循環、および胎児脳)におけるそのようなサイトカインの存在、およびそれらが持つ、これらの部分の間の境界(胎盤と血液脳関門の両方)を越えるサイトカインの潜在能力は、出生前母体感染の間の脳室内出血、新生児白質損傷におけるそれらの潜在的役割を示唆する。したがって、IL-1に媒介される炎症性サイトカインカスケードを遮断することは、妊娠中期の終わり近くに生まれた者の後の障害を防ぐ可能性がある。

【0265】

インターロイキン- 1β (IL- 1β)は正常羊水中に存在し、ヒト胎盤マクロファージによって産生される。妊娠中期の羊水中に検出されるIL- 1β の量は、陣痛の始まりと共に3倍の増加を示すことが明らかになっている。IL- 1β は脱落膜および羊膜によるプロスタグランジン類の合成の強力な刺激物質である。プロスタグランジンPGE2およびPGF2aの羊水中での

高濃度は早期陣痛および羊膜内感染と結びつけられてきた。このことは、早期陣痛および組織学的絨毛膜羊膜炎を有する女性からの羊膜は、胎盤炎症の無い女性からの羊膜よりも多くのPGE₂を産生したという事実によって説明されうる。そのようなPGE_aの上昇した濃度は、臨床的または無症状尿生殖路感染の非存在下でも、未熟児低出生体重(PBLW)と結びつけられてきており、実際に、大多数のPLBW出産は起源不明の感染が原因で起こった可能性がある。IL-1は感染の存在下で陣痛開始に関係する第一のサイトカインであった。IL-1はin vitroでヒト脱落膜によって細菌産物に反応して産生される。早期陣痛と羊膜腔に細菌を有する患者では、羊水BL-1生物活性と濃度が上昇する。組み換えヒトIL-1 β を妊娠第12日に注射することによって、胎盤壊死と胎児吸収をラットで誘導することができる。さらに、羊水IL-1 β 濃度と生物活性の両方が、陣痛中に対象と比較して上昇する。さらに、IL-1 β は脱落膜および羊膜によるin vitroでのプロスタグランジン類の産生を刺激することが知られている。 10

【0266】

したがって、本発明のhtrb治療薬は、脳室内出血、新生児白質損傷、および後の脳性麻痺、そして未熟児低出生体重分娩の発生を含むヒト胎盤のインターロイキン-1依存性疾患に拮抗するものを含む。

【0267】

4.9.1. 予防的 方法

一つの側面では、本発明はhtrb発現または少なくとも一つのhtrb活性を調節する薬剤を投与することによって、対象者において異常なhtrb発現または活性に伴う疾患または状態を防ぐための方法を提供する。そのような疾患の危険がある対象者は、たとえば、ここに記載するような、診断または予知検定法によって識別することができる。予防的薬剤の投与は、疾患または障害が防がれるかあるいは、進行が遅くなるように、htrb異常に特有の症状の出現に先立って行うことができる。htrb異常の型によって、たとえば、htrbアゴニストまたはhtrbアンタゴニスト薬剤を、対象者を予防的に治療するのに用いることができる。予防的方法は本発明の治療的方法に類似であり、以下の項でさらに論じる。 20

【0268】

4.9.2. 治療的方法

一般的に、本発明は、異常なhtrb活性が原因で起こるかまたはそれが寄与する疾患または状態を治療するための、htrb活性を調節することのできる化合物の有効量を対象者に投与することから成る方法を提供する。異常なhtrb活性が関係する疾患症状を改善するために用いることのできる手法には、たとえば上記のアンチセンス、リボザイム、そして三重らせん分子がある。適当な化合物の例は、ここに詳細に記載されたアンタゴニスト、アゴニストまたは相同体を含む。 30

【0269】

4.9.3. 有効量

そのような化合物の毒性および治療の有効性は、たとえばLd₅₀(集団の50%について致死である用量)そしてEd₅₀(集団の50%において治療的に有効である用量)を定めるための、培養細胞または実験動物における標準的な医薬的手順によって決定することができる。毒性および治療的効果の間の用量比が治療指数であり、これはLD₅₀/ED₅₀の比で表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を使用することができる一方、非感染細胞への潜在的な障害を最小化し、それによって副作用を低減するため、そのような化合物を病変組織の部位へ送り込む送達系を設計するのに注意を払うべきである。 40

【0270】

培養細胞検定法および動物試験から得られたデータは、ヒトにおける使用のための用量の幅を定めるのに用いることができる。そのような化合物の用量は、好ましくはED₅₀を含む循環濃度の範囲内で、毒性をほとんどまたは全く有しない。用量は、使用する剤形および投与経路によって、この範囲内で変化する。本発明の方法で用いられる任意の化合物について、治療の有効量は最初は培養細胞検定法から推定することができる。培養細胞で決 50

定されたようにIC50（すなわち、症状の半最大量の阻害を達成する被験化合物濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するため、用量を動物モデルで公式化することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおける有効量をより正確に定めることができる。血漿中の濃度を、たとえば高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0271】

4.9.4. 処方および用法

本発明に従って用いるための医薬組成物は、一またはそれ以上の生理学的に受容しうるキャリアーまたは添加物を用いて、従来の方法で処方することができる。したがって、化合物およびその生理学的に受容しうる塩および溶媒和物を、たとえば、注射、吸入（口または鼻から）または経口、舌下、非経口または直腸投与による投与のために処方することができる。

10

【0272】

そのような治療のために、本発明の化合物は全身および外用または局所投与を含むさまざまな投与のために処方することができる。技術および処方は一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PAに見いだすことができる。全身投与のためには、筋肉内、静脈内、腹腔内、および皮下を含む注射が好ましい。注射のためには、本発明の化合物は、溶液として、好ましくはたとえばハंक液またはリンガー液といった生理学的に適合する緩衝液中に処方することができる。さらに、化合物は固体として処方することができ、使用直前に再溶解または懸濁する。凍結乾燥形態もまた含まれる。

20

【0273】

経口投与のためには、医薬組成物は、医薬品として許容されるたとえば：結合剤（たとえば、ゼラチン化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；賦形剤（たとえば、乳糖、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（たとえば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（たとえば、バレイショデンプンまたはグリコールデンプンナトリウム）；または湿潤剤（たとえば、ラウリル硫酸ナトリウム）といった添加物と共に従来の方法で調製され、たとえば錠剤またはカプセル剤の形を取りうる。錠剤は既知の方法で被覆することができる。経口投与のための液体調製物は、たとえば、溶液、シロップ剤または懸濁剤の形を取ることができ、または、使用前に水または他の適当な賦形剤で構成するための乾燥製品として提出することができる。そのような液体調製物は、医薬品として許容されるたとえば：懸濁化剤（たとえば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水素添加食用油）；乳化剤（たとえば、レシチンまたはアカシア）；非水系賦形剤（たとえば、atond油、油性エステル、エチルアルコールまたは分画植物油）；および保存料（たとえば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸エステルまたはソルビン酸）といった添加物と共に従来の方法で調製される。調製物はまた必要に応じて緩衝塩、香料、着色料、および甘味料を含むことができる。

30

【0274】

経口投与のための調製物は、活性化合物の制御された放出を与えるように適当に処方される。舌下投与のためには組成物は従来の方法で処方された錠剤またはトローチ剤の形を取ることができる。吸入による投与のためには、本発明に従って用いる化合物は、加圧容器またはネブライザーから出るエアロゾルスプレーの形で、たとえばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロメタン、二酸化炭素または他の適当なガスといった適当な推進剤を用いて便利に送達することができる。加圧エアロゾルの場合は、用量単位は、計量された量を送り出すバルブを付けることによって定めることができる。吸入器で用いるためのたとえばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と、たとえば乳糖またはデンプンのような適当な粉末基剤を含む処方とすることができる。

40

【0275】

化合物は、たとえばボラスまたは連続輸液による、注射による非経口投与のために処方

50

することができる。注射用処方は、たとえばアンプルまたは多数回使用容器で、保存料を加えて、単位用量剤形として提出することができる。組成物は油性または水系賦形剤中に懸濁剤、溶液剤または乳剤といった剤形を取ることができ、また懸濁剤、安定剤および／または分散剤といった製剤のための物質を含むことができる。あるいは、活性成分はたとえば使用前にパイロジェンフリー滅菌水といった適当な賦形剤で構成する粉末の形とすることができる。

【0276】

化合物はまた、ココアバターまたは他のグリセリド類といった従来の座剤基剤を含む、座剤または保留浣腸剤といった直腸用組成物に処方することができる。

【0277】

前述の処方に加えて、化合物はまたデポ剤として処方することができる。そのような長期に作用する処方、埋め込み(たとえば皮下または筋肉内に)または筋肉内注射によって投与することができる。このように、たとえば、化合物は適当な高分子性または疎水性物質と処方することができる(たとえば、許容できる油中のエマルションとして)またはイオン交換樹脂、またはやや溶けにくい誘導体、たとえばやや溶けにくい塩として、他の適当な送達系は、局所的・非侵襲的な長期に渡る薬物送達の可能性を提供する微小球を含む。この技術は、たとえば心臓またはほかの器官の任意の選択部位に、炎症または虚血を起こすことなく冠動脈カテーテルを通じて注射することができる前毛細血管サイズの微小球を利用する。投与された治療薬はこれらの微小球からゆっくり放出され、周囲の組織細胞(たとえば内皮細胞)に取り込まれる。

【0278】

全身投与はまた経粘膜または経皮によることができる。経粘膜または経皮投与のためには、通過すべき障壁に対して適当である浸透剤が処方中に用いられる。そのような浸透剤は一般に既知であり、そして、たとえば経粘膜投与のためには胆汁酸塩とフシジン酸誘導体が含まれ、さらに、通過を促進するために界面活性剤を用いることができる。経粘膜投与は鼻噴霧を通じてまたは座剤を用いて行うことができる。経皮投与のためには、本発明のオリゴマーは既知であるような軟膏、ゲル、またはクリームに処方することができる。治療を加速するため、損傷または炎症を処置するための洗浄溶液を局所的に用いることができる。

【0279】

臨床においては、それぞれよく知られているいくつかの方法のうち任意のものを用いて、htrb遺伝子治療薬のための遺伝子送達系を患者に導入することができる。たとえば、遺伝子送達系の医薬調製物はたとえば静脈注射によって全身的に導入することができ、そして標的細胞におけるタンパク質の特異的形質導入が、主に遺伝子送達媒介物によって提供される導入の特異性、受容体遺伝子の発現を支配する転写調節配列による細胞型または組織型発現、またはその組み合わせによって起こる。別の実施形態では、組み換え遺伝子の当初の伝達、動物への導入についてはより限られて、非常に局在化している。たとえば、遺伝子送達媒介物はカテーテルで(特許文献27を参照)または定位固定注射で(たとえば非特許文献156)導入することができる。たとえば配列番号1または3またはhtrb選択的5'末端またはその相同配列を含む群中に示された配列のうち任意の一つのhtrb遺伝子は、たとえば、非特許文献157に記載された技術を用いてエレクトロポレーションによって、遺伝子治療構造中で送達することができる。

【0280】

本発明の遺伝子治療構造または化合物の医薬調製物は、本質的に、受容できる希釈剤中の遺伝子送達系から成るかまたは、遺伝子送達媒介物または化合物が徐放性マトリクスである。あるいは、完全な遺伝子送達系を組み換え細胞から完全な形で産生することができる場合、たとえばレトロウイルスベクター、医薬調製物は遺伝子送達系を産生する一またはそれ以上の細胞を含むことができる。

【0281】

組成物は、必要に応じて、活性成分を含む一またはそれ以上の単位用量を含むパックまた

10

20

30

40

50

はまたはディスペンサで提供することができる。パックはたとえばブリスターパックのように金属またはプラスチック箔を含む。パックまたはディスペンサには投与指示が付属する。

4.10. キット

本発明はさらに、診断または予知の方法において使用する、または本発明の異常な htrbタンパク質に伴う疾患または状態の治療のために使用するキットを提供する。本発明はまた、対象者にどの htrb治療薬を投与すべきかを決定するためのキットを提供する。本発明は、生物検体中の htrbmRNAまたはタンパク質の存在を検出するための、または変異の存在または htrb遺伝子中の多型領域の同一性を検出するためのキットを含む。たとえば、キットは、生物検体中の htrbmRNAまたはタンパク質を検出することができる標識化合物または試薬; 検体中の htrbの量を測定するための手段;そして検体中の htrbの量を標準と比較するための手段、を含むことができる。化合物または試薬は適当な容器に包装することができる。キットはさらに htrbmRNAまたはタンパク質を検出するためのキットに関する説明書を含むことができる。

10

20

【0282】

一実施形態では、キットは htrbアンタゴニスト治療薬の有効量を含む医薬組成物と、高血圧の治療または予防における使用のための説明書から成る。別の一実施形態では、キットは htrbアゴニスト治療薬の有効量を含む医薬組成物と、虫刺されの治療における使用のための説明書から成る。一般に、本キットは htrbアゴニストまたはアンタゴニスト治療薬の有効量を含む医薬組成物と、鎮痛剤としての使用のための説明書を含む。たとえば、キットは htrbアゴニスト治療薬の有効量を含む医薬組成物と、鎮痛剤としての使用のための説明書を含むことができる。

【0283】

異常な htrb活性を伴う疾患または状態を対象者が有するかまたは発症する可能性があるかどうかを判定するのに、さらに別のキットを用いることができる。そのようなキットは、たとえば、htrb遺伝子またはその対立遺伝子変異体、またはその突然変異体、の少なくとも一部分と、特異的にハイブリダイズすることのできる一またはそれ以上の核酸プローブを含むことができる。

【0284】

4.11. htrbタンパク質および核酸の他の用途

本発明の htrb核酸はさらに、下記の検定法に用いることができる。

【0285】

一実施形態では、配列番号 1 またはその一部を有するヒト htrb核酸、またはそれとハイブリダイズする核酸を、BL-1遺伝子座内の htrb遺伝子の正確な染色体局在を調べるのに用いることができる。さらに、htrb遺伝子はまた、htrb以外の遺伝子に関する遺伝子連鎖研究において染色体マーカーとして用いることができる。遺伝子の染色体局在化は既知のいくつかの方法によって行うことができる。たとえば、サザンブロットハイブリダイゼーションまたは体細胞ハイブリッドの PCRマッピングを用いて、特定の遺伝子がどの染色体または染色体断片上に存在するか決定することができる。遺伝子を染色体または染色体領域に局在化するのに同様に用いることのできる他のマッピング戦略は、include in situハイブリダイゼーション、標識されフローソートされた染色体の前スクリーニング、そして構造染色体特異的 cDNAライブラリとのハイブリダイゼーションによる前選択を含む。

30

40

【0286】

さらに、核酸、たとえば htrb核酸と中期展開染色体との蛍光 in situハイブリダイゼーション (FISH) は、その核酸の正確な染色体局在化を与える一段階の方法である。この技術は 500または600塩基の短い核酸について用いることができる;しかし、2,000 bpより大きいクローンは、簡易な検出のために十分なシグナル強度で固有の染色体位置に結合する可能性がより高い。そのような技術が、たとえば非特許文献 158 に記載されている。そのような技術を用いて、遺伝子を、約 50 から約 500 遺伝子を含む染色体領域に局在化することができる。

50

【0287】

htrb遺伝子が、共分離する染色体領域に局在化することが示される場合、すなわち、特定の疾患と結びついている場合、cDNAまたはゲノム配列の、病変を有する人と有しない人の間の違いが測定される。病変を有する人の一部またはすべてに変異が存在するが正常な人はどれも変異を有しないことは、その変異がその疾患の原因となるかまたは寄与していることを示す。

【0288】

本発明はさらに、以下に示す実施形態によって説明されるが、これらはどのような形でも限定すると解釈されるべきでない。文献、発行された特許、公開された特許出願を含む、本出願の全体を通じて引用された参考文献のすべては、参照によりここに明示的に開示に 10
含まれる。本発明の実施は、特に記載のない限り、既知である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子導入生物学、微生物学、組み換えDNA、そして免疫学の従来の方法を用いる。そのような技術は文献に十分に説明されている。たとえば、非特許文献17;非特許文献159;非特許文献160;特許文献15(Mullis et al.);非特許文献161;非特許文献162;非特許文献163;非特許文献164;非特許文献165;非特許文献166;非特許文献167;非特許文献168;非特許文献87を参照のこと。

【0289】

4. 12 遺伝子発現の検出とマイクロアレイ転写プロファイリング

本発明は:(1)任意の炎症性遺伝子を調節する第一の遺伝子をクローニングする;(2)その第一の炎症性調節遺伝子を発現プロファイリングの手順に用いて、第一の遺伝子の過剰発現 20
または低発現によって発現が変化する他の炎症経路遺伝子を単離する;そして(3)またさらに細胞の発現プロファイルを、互いにもう一方の炎症経路遺伝子の過剰発現または低発現について調べ、「別の」炎症経路遺伝子それぞれについて過剰発現または低発現によって発現が変化するさらに別の炎症経路遺伝子を単離する、ことによって炎症性遺伝子調節経路を決定する反復的方法を提供する。遺伝子発現を測定するための多数の異なる方法が既知である。古典的方法は定量的RT-PCR、ノーザンブロットおよびヌクレアーゼ保護検定法を含む。そのような方法を用いて、may be used to examine 発現 of 個々の遺伝子ならびに遺伝子クラスター全体の発現レベルを調べることができる。しかし、調べる遺伝子の数が増え、時間と費用は非常にかさむようになる。

【0290】

大スケール検出方法は、多数の遺伝子の発現レベルのより迅速でより費用のかからない分析を同時に可能にする。そのような方法は典型的には、固相基質に固定したプローブのアレイに関係する。個々のプローブは、異なる組の核酸とハイブリダイズすることができる。一つの方法では、プローブは対象のさまざまな遺伝子のコード領域を増幅するかまたは合成してつくられる。これらの遺伝子は次いで固相担体上にスポットされる。mRNA検体が得られ、cDNAに変換され、増幅され標識される(通常は蛍光標識でusually with a 蛍光標識)。標識cDNAsを次いでアレイに加え、cDNAsはそれぞれのプローブと、その濃度と直線関係で、ハイブリダイズする。標識を検出することで、アレイに結合した個々のcDNAの量を測定することができる。

【0291】

Many 方法 for performing そのようなDNAアレイ実験を行うための多数の方法が既知である。典型的な方法を下記に示すが、制限することを意図しない。

【0292】

アレイはしばしば分割されて、マイクロアレイおよびマクロアレイとなり、ここでマイクロアレイは面積当たりでずっと高い濃度の個々のプローブ種を有する。マイクロアレイは1cm²中に1000以上の異なるプローブを有しうる。マイクロとマクロアレイの間の違いに境界を引く明確なカットオフは存在せず、両方の型のアレイを本発明に用いることが考えられる。しかし、その小さなサイズのため、マイクロアレイは速度、自動化および費用有効度について大きな利点を提供する。

【0293】

マイクロアレイは既知であって、遺伝子産物(たとえばcDNAs、mRNAs、オリゴヌクレオチド)の配列に対応するプローブが既知の位置に結合する表面を有する。一実施形態では、マイクロアレイはアレイ(すなわちマトリクス)であって個々の位置が遺伝子にコードされた産物の(たとえば、タンパク質またはRNA)離散的な結合部位を示し、標的生物のゲノムの大部分またはほぼ全部の遺伝子産物の結合部位が存在する。好適な一実施形態においては、「結合部位」(以下「部位」)は核酸または核酸アナログto whichで、特定の同族cDNAは特異的にハイブリダイズすることができる。結合部位の核酸またはアナログはたとえば、合成オリゴマー、完全長cDNA、完全長に満たないcDNA、または遺伝子断片であることができる。

【0294】

好適な一実施形態においては、マイクロアレイは標的生物のゲノムの大部分またはほぼ全部の遺伝子産物の結合部位を含むが、そのような包括性は必ずしも必要ではない。通常、マイクロアレイは少なくとも100遺伝子、より好ましくは、500、1000、4000またはそれ以上に対応する結合部位を有する。ある実施形態では、もっとも好ましいアレイは表示の特定生物の遺伝子の約98~100%を有する。別の実施形態では、より少ない、具体的には選択された遺伝子に対応する結合部位を有するカスタマイズされたマイクロアレイを提供する。より少ない結合部位を有するマイクロアレイは、より安価で、より小さく、作成がより容易である。特に、本発明は移植片の状態を調べるためにカスタマイズされたマイクロアレイを提供する。好ましい実施形態では、カスタマイズされたマイクロアレイは4000未満、1000未満、200未満または50未満の遺伝子の結合部位を含み、またクラスターA, B, C, D, E, FまたはGのうち任意の少なくとも2、好ましくは少なくとも3、4、5またはより多い遺伝子の結合部位を含む。好ましくは、マイクロアレイは目的の生物学的ネットワークモデルの試験および確認に関連する遺伝子の結合部位を有する。いくつかの典型的なヒトマイクロアレイは公に入手可能である。Afymetrix GeneChip HUM 6.8Kは7,070遺伝子から成るオリゴヌクレオチドアレイである。8,150 ヒトcDNAsを有するマイクロアレイがResearch Geneticsによって開発され公表されている(非特許文献169)。

【0295】

アレイに結合するプローブは典型的にはポリヌクレオチドである。これらのDNAは、たとえば、ゲノムDNA、cDNA(たとえばRT-PCRで)、またはクローン配列から得た遺伝子断片のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅によって得ることができる。PCRプライマーは、遺伝子またはcDNAの既知の配列に基づいて、特有の断片(すなわちマイクロアレイ上の他のどの断片とも、10塩基より大きい連続する同一の配列を共有しない断片)が増幅されるように選択される。必要な特異性および最適な増幅特性を有するプライマーの設計にはコンピュータプログラムが有用である。たとえば、Oligo pl version 5.0(National Biosciences)を参照。非常に長い遺伝子に対応する結合部位の場合には、oligo-dTをプライマーに用いたcDNAプローブがマイクロアレイとハイブリダイズするとき完全長に満たないプローブが効率的に結合するように、その遺伝子の3'末端に近いセグメントを増幅するのが望ましいときがある。まだ未知の遺伝子に対応するESTs(発現配列タグ)として知られるcDNAsを得るために、ランダムオリゴ-dTプライミングもまた用いることができる。あるアレイは遺伝子の重なり合う部分に対応する多くの小さなオリゴヌクレオチドを用いる。そのようなオリゴヌクレオチドはよく知られたさまざまな方法によって化学的に合成しうる。合成配列は長さ約15~約500塩基の範囲にあり、より典型的には約20~約50塩基の範囲にある。一部の実施形態では、合成核酸は非天然塩基、たとえばイノシンを含む。上記の通り、核酸アナログはハイブリダイゼーションのための結合部位として用いることができる。適当な核酸アナログの例はペプチド核酸である(たとえば非特許文献170;また特許文献28も参照)。

【0296】

他の一実施形態では、結合(ハイブリダイゼーション)部位は、遺伝子、cDNAs(たとえば、発現配列標識)のプラスミドまたはファージクローン、またはその挿入部から作られる(Nguyen et al., 1995, Differential gene expression in the murine thymus assayed by

10

20

30

40

50

quantitative hybridization of arrayed cDNA clones, Genomics 29:207-209)。さらにもう一つの実施形態では、結合部位のポリヌクレオチドはRNAである。

【0297】

核酸またはアナログは、ガラス、プラスチック（たとえばポリプロピレン、ナイロン）、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、または他の物質から作成することのできる固相担体に結合されている。核酸を表面に結合させる好ましい方法はガラス板へプリントすることであり、非特許文献171に概説される通りである。この方法はcDNAのマイクロアレイを作成するのに特に有用である。(非特許文献172;非特許文献173;および非特許文献174も参照)。上記の論文のそれぞれが、全体がこの参照により開示に含まれる。

【0298】

マイクロアレイを作成するための別の好ましい方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレイを作成することによる。規定の配列と相補的な何千ものオリゴヌクレオチドを含むアレイを、in situ合成のための光リソグラフィ技術を用いて表面の定められた位置に作成する技術(非特許文献175;非特許文献176;非特許文献177;特許文献29;特許文献30;および特許文献31(それぞれの全体がこの参照により開示に含まれる))または規定のオリゴヌクレオチドの迅速合成と沈着のための他の方法が知られている(Blanchard et al., 1996, 11: 687-90)。これらの方法が用いられるとき、既知の配列のオリゴヌクレオチドが、たとえば誘導体化したスライドガラスのような表面上に直接合成される。通常、作成されるアレイは、RNAにつきいくつかのオリゴヌクレオチド分子が重複している。オリゴヌクレオチドプローブは、選択的にスプライスされたmRNAを検出するように選ぶことができる。

10

20

【0299】

たとえばマスキングによって(非特許文献178)マイクロアレイを作成する他の方法もまた用いることができる。原則的に、任意の型のアレイ、たとえば、ナイロンハイブリダイゼーション膜上のドットプロット(非特許文献17(その全体がこの参照により開示に含まれる))を用いることができるがしかし、当業者に理解されるように、ハイブリダイゼーション容量はより小さくなるため、非常に小さいアレイが好ましい。

マイクロアレイに接触させる核酸は様々な方法で作成することができる。トータルRNAおよびポリ(A)+RNAを作成する方法はよく知られており、上記非特許文献17に概説されている。標識cDNAはmRNAからオリゴdTプライマーまたはランダムプライマーを用いた逆転写によって作成され、その両方が既知である(たとえば非特許文献179を参照)。逆転写は、検出可能な標識と結合したdNTP、非常に好ましくは蛍光標識dNTPの存在下で行うことができる。あるいは、単離されたmRNAは、標識dNTPの存在下で二本鎖cDNAのin vitro 転写によって合成された標識アンチセンスRNAに変換することができる(非特許文献177)。cDNAsまたはRNAsは検出可能な標識の非存在下で合成することができ、後でたとえば、ビオチン化dNTPまたはrNTPを組み込み、または何らかの類似の方法を用い(たとえば、ビオチンのソラレン誘導体をRNAへ光架橋する)、その後に標識化ストレプトアビジン(たとえばフィコエリトリン結合ストレプトアビジン)または同等物によって標識することができる。

30

【0300】

蛍光標識を用いる場合、フルオレセイン、リーサミン、フィコエリトリン、ローダミン(Perkin Elmer Cetus)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX(Amersham)、その他(たとえば非特許文献180を参照)を含む多くの適当な蛍光発色団が知られている。

40

【0301】

別の一実施形態では、蛍光標識以外の標識が用いられる。たとえば放射性標識、または放射性標識と明瞭な発光スペクトルの組み合わせを用いることができる(非特許文献181;非特許文献182を参照)。しかし、放射性同位体の使用はより好ましくない実施形態である。

【0302】

核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、標識核酸の集団が、マトリクスに結合さ

50

れた核酸と特異的に適当な相補的ハイブリダイズを行うように選択する。ここで用いられるように、ポリヌクレオチドのうち短い方が25塩基以下であって、標準の塩基対形成則を用いてミスマッチが存在しないかまたは、ポリヌクレオチドのうち短い方が25塩基より長く、ミスマッチが5%以下であるとき、一つのヌクレオチド配列は別のと相補的であると考えられる。好ましくは、ポリヌクレオチドは完全に相補的である(ミスマッチが無い)。

【0303】

最適ハイブリダイゼーション条件は、標識核酸および固定化ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの長さ(たとえば、オリゴマーに対して、200塩基より大きいポリヌクレオチド)および型(たとえば、RNA、DNA、PNA)に依存する。核酸の特異的(すなわち、ストリ
ンジェントな)ハイブリダイゼーション条件のための一般的パラメータは上記非特許文献
17および非特許文献183に記載されており、その全体が開示に含まれる。標識核酸の
アレイへの非特異的結合は、アレイを多量の非特異的DNAで処理するいわゆる「ブロッキ
ング」段階によって減少させることができる。

10

【0304】

蛍光標識プローブを用いるとき、転写物アレイのそれぞれの部位での蛍光発光を、好ま
しくは、共焦点レーザー顕微鏡法を用いて検出することができる。二つの蛍光発色団が用
いられるとき、適当な励起線を用いた別々のスキャンを、使用した二つの蛍光発色団のそ
れぞれについて用いることができる。あるいは波長特異的、に二つの蛍光発色団に特異的
な波長で同時に標本を蛍光発色させることができ、二つの蛍光発色団からの発光を同時に
分析することができる(非特許文献184を参照)。好適な一実施形態においては、アレイ
はレーザー 蛍光 スキャナを用いてスキャンされる。レーザー 蛍光 スキャナはコンピュ
ータ 制御X-Yステージおよび 顕微鏡対物レンズを有する。配列の励起はマルチライン混
合ガスレーザーで行われ、放射光が波長によって分離され、2つの異なる波長の光増幅管
で検出される。and detected with 二つのphotomultiplier tubes. 蛍光 レーザースキャ
ン装置は非特許文献185および前出の他の文献に記載されている。あるいは、非特許文
献186に記載された光ファイバーケーブルを用いて、多数の部位で同時にmRNA量をモニ
ターすることができる。蛍光マイクロアレイスキャナはAfrymetrix、Packard BioChip Te
chnologies、BioRoboticsおよび他の多数のメーカーから市販されている。

20

【0305】

シグナルはさまざまな コンピュータソフトウェアを用いて記録、定量、分析される。一
実施形態ではスキャン画像の傷が画像プログラムによって取り除かれ、(たとえば、Hija
ak Graphics Suite)画像グリッドプログラムを用いて分析される。各波長での各位置のハ
イブリダイゼーション、必要であれば、実験的に2つの蛍光のチャンネルを重ねることが
でき、重なりを補正することができる。「cross talk」(または)二つの蛍光物質のチャ
ンネルを重ねる。特定の転写物アレイ上の任意の特定のハイブリダイゼーション部位につ
いて、二つの蛍光発色団の発光の比が好ましくは計算される。この値は同族遺伝子の絶対
発現レベルとは独立であるが、しかし薬物投与によって発現が顕著に調節される個人の遺
伝子は、薬物投与、遺伝子欠失、または他の任意の試験項目と比べることができる。

30

【0306】

本発明の方法によると、2つの検体中のmRNAの相対量が摂動として記録され、その大き
さが測定される(すなわち二つの起源のmRNAについて相対量が異なる)、かまたは、摂動しな
かったと記録される(すなわち相対量が等しい)。ここで用いられるように、二つの起源の
RNAの差は、少なくとも係数が25%(ある起源からのRNAがもう一つの起源からより25%多い)
、より普通には約50%、さらによりしばしば係数約2 (2倍多い)、3(3倍多い)または5(
5倍多い)と記録される。本検出法は信頼できる差の検出方法であり、オーダーの差は約2
倍~約5倍であるが、より高感度の方法が開発されることが予期される。

40

【0307】

好ましくは、摂動を正または負と識別することに加えて、摂動の大きさを測定することが
有用であると考えられる。このことは、上記の通り、差別的標識に用いた二つの蛍光発色
団の発光の比を計算するか、または当業者に容易に明らかとなる類似の方法によって達成

50

される。

【0308】

本発明の一実施形態では、目的細胞の転写の状態を反映する転写物アレイが、二つの異なる標識の組のcDNAの混合物をマイクロアレイハイブリダイズさせることで得られる。一つの細胞は目的の細胞である一方、もう一つの細胞は正規化の対照として用いる。それぞれの細胞中でのcDNAのマイクロアレイへの相対的なハイブリダイゼーションは、後で2つの細胞における各遺伝子の相対的な発現を示す。たとえば、さまざまな乳がんでの遺伝子発現を評価するためPerou et al.は各腫瘍から得た蛍光標識cDNAを、乳がん細胞株から得たcDNAの標準混合物と組み合わせて、マイクロアレイとハイブリダイズした。この方法で、腫瘍検体それぞれにおける遺伝子発現が同じ標準に対して比較され、腫瘍検体間の比較が容易になる。

10

【0309】

好適な実施形態においては、そのような実験から得られたデータは、マイクロアレイ中に示された個々の遺伝子の相対的な発現を反映する。異なる検体および条件下での発現レベルは、さまざまな統計的方法を用いて比較することができる。

【0310】

利用できるさまざまな統計的方法から、異なる遺伝子の発現パターンにみられる近縁度を評価することができる。その統計的方法は2つの関連する部分に分けられる：一またはそれ以上の遺伝子の発現パターンの近縁度を測定する距離関数、および、適当な距離関数に基づいて発現データの組織化および分類を行うクラスター化法(非特許文献187;非特許文献188)。

20

【0311】

一実施形態では、ピアソン相関を距離関数として用いる。要約すると、任意の遺伝子について、遺伝子発現レベル上の個々のデータ点が、すべての条件にわたるその遺伝子の発現レベルの総平均からの遺伝子発現の変動を表すベクトルを定義する。そのため、各遺伝子の発現パターンは正および負のベクトルの一連のパターンとして見る事ができる。ピアソン相関係数は、各遺伝子のベクトルを互いに比較して計算することによって求められる。そのような方法の一例は既に記載されている。ピアソン相関係数はベクトルの方向を説明するが、大きさは説明しない。

【0312】

別の実施形態では、ユークリッド距離測定を距離関数として用いることができる。これらの方法では、ベクトルは個々の遺伝子について個々の条件で計算され、多次元空間の、その遺伝子のベクトルによって記載された点の間の絶対距離に基づいて比較される。

30

【0313】

さらなる実施形態では、遺伝子発現パターンの近縁度がエントロピー計算(非特許文献188, 上記)によって決定される。エントロピーは個々の遺伝子の発現パターンについて計算される。2つの遺伝子について計算されたエントロピーを比較し、相互情報量を決定する。相互情報量は、それぞれの遺伝子について個別に計算されたエントロピーから、連結した遺伝子発現パターンのエントロピーを差し引くことによって計算される。二つの遺伝子発現パターンが異なっているほど、連結エントロピーは高くなり、計算された相互情報量は低くなる。ゆえに、高い相互情報量は、その二つの遺伝子発現パターン間の規則的な近縁度を示す。

40

【0314】

近縁度に関する異なる距離関数を、遺伝子クラスターを識別するさまざまな方法に用いることができる。一つの実施形態では、エントロピー測定の包括的な2つ組比較によって、特に高い相互情報量を有する遺伝子のクラスターが同定される。好適な実施形態においては、正規化された相互情報量スコアが0.7以上、好ましくは0.8より大、0.9より大、または0.95より大であれば二つの遺伝子の発現パターンは関連している他の実施形態では、相互情報量についての統計的有意性は、発現測定の順序を無作為に30回変更し、そのような無作為な組み合わせから相互情報量の測定値の最高値を決定することによって得られる。

50

30回の順序変更後にランダムに得られる可能性があるよりも高い相互情報量を有するすべてのクラスタは統計的に有意である。さらなる一実施形態では、二つの遺伝子の発現パターンは、相関係数が0.8以上であるとき、そして好ましくは0.85、0.9よりも大きいときまたは、非常に好ましくは0.95よりも大きいとき、相関している。

【0315】

別の一実施形態では、集積的クラスタ化法を用いて遺伝子クラスタを同定することができる。一実施形態では、ピアソン相関係数またはユークリッド距離を、各遺伝子について測定し、それから樹上図を作成する基礎として用いる。一つの実施形態では、遺伝子をスキャンして最も近い相関係数を有する対を求めた。これらの遺伝子は次いで樹状図の二本の枝に、距離と枝の深さが相関の程度と比例するような節点で繋げられ、節点で繋がった樹状図の、この処理を続けて、徐々に枝を木に追加していく。最後には、短い枝で繋がれた遺伝子がクラスタを表し、長い枝で繋がれた遺伝子はクラスタ化していない遺伝子を表す。多次元空間内のユークリッド距離による点もまた、樹状図の作成に用いることができる。

10

【0316】

さらに別の一実施形態では、分割的クラスター化を用いることができる。たとえば、個々の遺伝子の発現パターンにベクトルを割り当て、そして二つのランダムベクトルを生成する。個々の遺伝子を次いでその二つのランダムベクトルのうち一方に、そのベクトルと一致する可能性に基づいて割り当てる。ランダムベクトルを繰り返し再計算し、その遺伝子を二つの群に分割する二つの重心を生じる。この分割によって樹状図の基部に大きな枝を生じる。それぞれの群を次いでさらに同じ方法で分割し、最終的に完全に枝分かれした樹状図を得る。

20

【0317】

さらなる一実施形態では、自己組織化マップ(SOM)を用いてクラスターを生成することができる。一般に、上記のユークリッド距離のような距離関数を用いて、遺伝子発現パターンをn次元空間内にプロットする。次いでそのn次元空間内に重心の格子を配置し、重心は点のクラスターに向かって移動させる。この点のクラスターは遺伝子発現のクラスターを表す。最終的に、重心は、遺伝子クラスターの平均のような一つの遺伝子発現パターンを表す。ある実施形態では、SOMを重心を生成するのに用いることができ、そして個々の重心にクラスター化した遺伝子はさらに樹状図で表すことができる。典型的な方法が非特許文献189に記載されている。重心が一旦形成されると、相関は上記の方法のうち一つを用いて評価しなければならない。

30

【0318】

別の面では、本発明はプローブの組を提供する。好ましいプローブの組は、複数の遺伝子の発現を検出し移植片の状態に関する情報を与えるように設計される。本発明の好ましいプローブの組は、遺伝子クラスターA、B、C、D、E、FまたはGに属する少なくとも2つの遺伝子を検出するのに有用なプローブを含む。特に好ましいプローブの組は、遺伝子クラスターA、B、C、D、E、FまたはGに属する少なくとも3個または少なくとも4個または少なくとも5個の遺伝子の検出に有用なプローブを含む。あるプローブの組は、遺伝子クラスターHに属する一またはそれ以上の遺伝子の検出に有用なプローブを追加的に含みうる。本発明のプローブの組は、10,000を超える遺伝子転写物を検出するのに有用なプローブを含まず、そして好ましいプローブの組は、4000未満、1000未満、200未満、そして非常に好ましくは50未満の遺伝子転写物を検出するのに有用なプローブを含む。本発明のプローブの組は、特定のゲノム中の可能な限り多くの遺伝子を検出することを意図するプローブの組よりも小さく安価であるため特に有用である。本発明のプローブの組は、移植状態について情報を与える遺伝子転写物の検出を標的とする。本発明のプローブの組は、移植状態について情報を与えない遺伝子転写物を検出する多数または少数のプローブを含みうる。そのようなプローブは対照としてまた正規化のために有用である。プローブの組は乾燥した混合物または溶液中の混合物でありうる。好適な実施形態においては、本発明のプローブの組は固体基質に接着され、プローブのアレイを形成する。プローブの組はまた多

40

50

重PCRに有用であることが期待される。

【実施例1】

【0319】

炎症経路遺伝子のクローニングおよび同定

炎症性サイトカインシグナル伝達に関わる新規の遺伝子を同定するため、我々はサイトカイン反応性レポーターの活性を調節する能力を有する遺伝子産物を単離するための発現スクリーニングを開発した(Kiss-loth, E. et al. (2000) Journal of Immunological Methods 239: 125-135)。ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現を調節するIL-8ケモカイン遺伝子プロモータをリードアウトに用いた。このプロモータ断片(-79 to +45: pIL8)はAP-1、C/EBPおよびNFκB部位を含み、炎症性シグナル応答性プロモータの典型的な構造を有する。我々はまた、この系におけるヒトEL-8の培地中への分泌レベルがレポーター系活性と相関していることを見いだしており、ゆえにこのレポーターはこの内因性遺伝子活性の有効な代理指標である。我々はシグナル伝達の抑制因子および活性化因子の両方を単離しており、IL-8遺伝子の転写を調節する役割を果たす遺伝子産物の数の推定値の下限を得ていた。

10

【0320】

オリゴdTプライマーとpCDMSを用いたヒト末梢血単核球cDNA発現ライブラリから得た約300クローンの30プールのスクリーニングin vivoでレポーターpIL-8-ホタルルシフェラーゼに対して、内部標準PTK(HSVチミジンキナーゼプロモータ)-ウミシイタケルシフェラーゼを用いて、デュアルルシフェラーゼ検定法によりHeLa細胞でスクリーニングした。プール(p)は陽性で、pIL-8/PTK 活性比が他方の29と比べて大幅に上昇していた。我々はこれと一つの陰性プールとを、シングルセルpIL-8-EGFP転写検定法によって前記の通り分析した。陽性プールは活性で(図1B)、遺伝子導入された集団のうち5~10%の細胞がレポーターの誘導を示し、これはプール中の300クローンのうちの 하나가生産的に導入される場合に予測される数に相当する。プールの解体後、活性挿入部分はインターフェロン-γのコード領域(ORF)全体をセンス方向で有していたことが配列決定によって明らかになった。この知見は、IFN-γはNF-κBを活性化するという報告に適合する。さらに、サイトカインの分泌が予測されたにもかかわらず、GFP検定法でシグナルの傍分泌性「拡散」はみられず、またそれを発現した細胞はアポトーシス性であったことが、それらが小さく、発光し、アネキシンV陽性であったという事実と共焦点蛍光顕微鏡写真から(データ記載せず)判断された。このことは、IFN-γがFasL/FasまたはTrail/Trail-R アップレギュレーションを介してアポトーシスを生じさせることができるというおよびIFN-γがおそらくTNF/TNFRファミリーメンバーの誘導後に相乗的にNFκB活性化を誘導するという以前の知見、スクリーニングからのデータはpIL-8遺伝子の転写の調節に関わる遺伝子産物の数の推定値の下限を与える。ヒット率は1/8000であり、ライブラリは約 5×10^6 独立クローンを有するので、スクリーニングによってpIL-8 luc阻害因子または活性化因子転写約600クローンが検出されるとを示唆する。

20

30

【0321】

ライブラリは無方向性で、オリゴdTプライマーを使用し、平均挿入長は2~3kBである。明らかにクローンの半数はアンチセンスであり多くが3'UTRsのみを含む。クローンのどの部分が発現可能なタンパク質をコードする挿入配列を有するかを推定するのは困難であり、また実際に我々の結果(下記参照)は、関連するクローンの検出に完全長コード領域は必ずしも必要でないことを示唆する。

40

【0322】

ランダムプライマーを用いたヒトB-細胞系(CB23)ライブラリのタイプII IL-1受容体についてのスクリーニングでは、完全長ORFを有するクローンの収率は推定で約1/300,000であった。我々のライブラリは、一つの細胞株からオリゴdTプライマーを用いてでなく、複雑な細胞集団である活性化末梢血単核球から調製されるので頻度はより低いと思われる。このことと、SKIPの結果(下記参照)を考慮して、我々は稀なmRNAについて発現可能クローンをわずか5個と推定し(クローン集団中に $<1/25,000$)、これは過剰発現によって検出可能である最小100個の明らかな遺伝子産物が、IL-8プロモータ調節に酸化していることを示

50

唆する。D. melanogaster染色体3上の40個の遺伝子が脂肪体細胞中のDifとDorsal転座の調節に関わるという推定を考慮するとこの数は合理的である(非特許文献190を参照)。すべての関連遺伝子産物は過剰発現後に活性が変化しない可能性があるため、これは全構成成分の部分集合に過ぎないと思われる。実際に、我々はIL-1RIとTLR4は、HeLa細胞で過剰発現されたときは、外因性リガンドが培養中に添加されないかぎり、pEL8を活性化しないことを発見している。

【0323】

得られたクローンのうち2つは、一つはIL-8媒介転写の活性化因子として、もう一方は阻害因子として、IL-8のレベルを変える活性があった。活性化因子はセンス方向の完全長RelA cDNAクローンであり;IL-8プロモータの構造を考慮すると予想される結果である。阻害因子cDNAクローンはマウスオーファンステロイドホルモン受容体Nur77のヒト相同遺伝子NAK-1をセンス方向でコードする。Nur77/N10/NAK-1/NGFI-B(NR4サブファミリーの一員)は、PC12細胞と繊維芽細胞でさまざまな刺激に寄って誘導される最初期遺伝子であると以前に同定された[たとえばそれは分裂促進因子による活性化後に多くの細胞型で発現されている]。多数の文献が、たとえば、細胞活性化誘導細胞死(AICD)の負の選択において、Nur77および近縁の転写因子NOR-1とNurrlは多くの細胞型でアポトーシスの中心的役割を果たすとしている。Nur77/N10遺伝子導入マウスは、大規模な早発アポトーシスのために二重陽性および単独陽性陽性胸腺細胞の劇的な減少を示した。最近の報告は、Nur77は未刺激Ig^HELリンパ球のニワトリ卵リゾチーム刺激に応答してアップレギュレートされる最初期遺伝子の限られた組の一つである(誘導1時間後)ことを示している。

【0324】

NAK-1の一過性過剰発現は、IL-8プロモータの基本的およびIL-1刺激された活性の両方を阻害した。さらに、AP-1、NFKBおよびCREレポーターの刺激はNAK-1によって抑制された。それはまた合成LHREプロモータの活性化をブロックした。このようにNAK-1の阻害活性は幅広く、おそらく過剰発現の結果である。しかし、内部調節レポーターの活性は阻害されないため、これは転写または翻訳の一般的阻害因子ではない。Nur77は部分的にしか理解されていないある機構によってAICDを促進することが示されていて、我々のデータはNAK-1はサイトカインシグナル伝達の阻害因子として作用しうること示している。ステロイドホルモン受容体はNFKBによって転写促進をブロックでき、そしてNur77/NAK-1の活性はNur-1、NurrlおよびRXRsとのヘテロ二量体化によって増強することができる。レチノイド類もまたNFKBを通じて作用することによってサイトカイン遺伝子発現をブロックすることが示されている。我々のデータはNAK-1/Nur77はNF-κBのような生存シグナルの阻害を一部の原因としてアポトーシス促進性である可能性があることを示唆している。

【0325】

もう一つの抑制クローンはpoly-A部分に終わるセンス方向の3'UTR断片をコードした。対応する完全長転写物の配列はヒトゲノムおよびcDNA配列データベースを検索することによって推定した。部分配列は以前に報告されている(GenBank AJ000480)。完全長cDNA配列は、IMAGEコレクションから得られた発現配列タグを配列決定することによって確認された。我々はこの遺伝子産物をストレスキナーゼ阻害タンパク質-1(SKIP-1)と命名した。

【0326】

PBMCから作成されたcDNA発現ライブラリからのプールのスクリーニングで(非特許文献191)、さらに、我々は以前は機能未知であった一つのcDNAを同定した。相同ショウジョウバエ遺伝子tribblesが近年記載されている(非特許文献5;非特許文献192;非特許文献4)。したがって我々は、我々のクローンによってコードされる単離された哺乳類タンパク質について、ヒトtribbles相同体-(htrb-1)という名称を提案する。

【実施例2】

【0327】

htrb-1抑制特異性の分析

図1Aはhtrb-1過剰発現のIL-8レポーター活性に対する影響を示す。HeLa細胞にIL-8ルシフェラーゼレポーターを、htrb-1発現構造と共に、またはそれ無しで導入した。黒の棒グラ

10

20

30

40

50

フはhtrb-1共導入無しでのレポーター活性化を示し、一方、灰色の棒グラフは50ngのhtrb-1発現構造の存在下でのレポーター活性化を示す。細胞を炎症性サイトカインで刺激し、レポーター活性を測定した。

【0328】

図B～D：htrb-1はストレスキナーゼシグナル伝達の特異的阻害因子である。HeLa細胞にAP-1(B)、NFkB(C)そしてヒト成長ホルモン(D)シグナル伝達経路特異的転写レポーターを一過性に導入し、htrb-1発現プラスミドの存在下(灰色棒グラフ)または非存在下(黒棒グラフ)で、MEKK-1発現構造(B、C)またはヒト成長ホルモン(D)によって活性化した。図E：PAP-1 lucをV12Ras発現プラスミドで刺激し、htrb-1とhtrb-3の同時発現の効果を調べた。図F：AP-1レポーター(菱形)をMEKK-1発現プラスミド(四角)で刺激し、htrb-1過剰発現(三角)のその刺激に対する効果を調べた。構成性活性TK-Rluc対誘導性AP-1 lucの活性をプロットした。図G：p38応答性PFR-luc + PFA-CHOPレポーターをMEK-3発現構造で刺激した。標示のように刺激の存在または非存在で、htrb-3をレポーターと同時導入した。

10

【0329】

過剰発現時に、htrb-1はIL-8レポーターの基本的活性を阻害するが、一方でこのプロモータのIL-1およびTNF α による誘導は影響されなかったことが発見された(図1A)。この検定に用いたIL-8プロモータ断片は、NFkBおよびAP-1との結合部位を含み、サイトカイン誘導性活性の大部分はNF- κ B部位を通じて媒介される一方、AP-1部位は基本的プロモータ活性に大きく寄与している(非特許文献193)。どのシグナル伝達経路がhtrb-1によって阻害されるかを判断するため、完全長htrb-1 ORFをコードするcDNAを、NFkBまたはAP-1結合部位の複数コピーを含む転写レポーターに対して試験した。レポーターはMEKK-1によって活性化した。htrb-1タンパク質の過剰発現はAP-1の活性化によって抑制されたが、NF- κ Bレポーター(図1BおよびC)あるいはJAK/STAT経路特異的プロモータ(図1D)の活性化では抑制されなかった。これらのデータは、htrb-1のシグナル伝達に対する観察された負の効果は、ストレスキナーゼ経路に特異的であることを示唆する。

20

【0330】

観察されたAP-1阻害はMEKK-1過剰発現に限定されないことを確認するため、htrb-1またはhtrb-3発現構造の非存在または存在下で、V12 RasをAP-1レポーターと同時導入した(下記参照)(図1E)。Ras媒介活性化もまた、上昇したhtrb濃度によって阻害された。htrb過剰発現が構成性HSV-TKプロモータに及ぼす効果(図1F)およびp38媒介一般ストレス応答の活性化に関与している可能性(図1G)を評価した。我々のデータは、htrb-1がMEKK-1媒介AP-1活性化の阻害に及ぼす影響はその誘導性レポーターに特異的であり、一方、TK-調節レポーターの活性はこの処理に影響されなかったことを示した(図1F)。

30

【実施例3】

【0331】

他のhtrb遺伝子の同定と分析

図2はhtrbタンパク質ファミリーの複数の配列を示す。Searching公開DNAデータベースを検索することで、3個のヒトhtrb遺伝子と、さらに脊椎動物と昆虫でtrb相同遺伝子をコードする発現配列タグが見つかった。ヒトhtrbファミリーの推定されるタンパク質配列および同定されたtrb相同遺伝子を、ClustalXによってデフォルトのパラメータを用いて配置している。htrb変異の位置を矢印で示す。略語:h- Homo sapiens、m- Mus musculus、r- Rattus norvegicus、c- Canis canis、b- Bos taurus、x- Xenopus laevis、o- Oncorhynchus mykiss、a- Aedes aegypti。

40

【0332】

htrb-1配列についての公開データベース検索で、さらに2個のヒト遺伝子、htrb-2とhtrb-3が同定され、それぞれ41および51%がhtrb-1と同一である。さらに、trb遺伝子産物と推定されるものがいくつか、脊椎動物種に、また昆虫に見つかった(図2)。これらのタンパク質のすべてが中心の類似のキナーゼ様ドメインを共有している。さらに、それぞれが、データベース中の他のどの配列とも、また互いにも近縁でない短いN末端(約70～100残基)およびC末端(約25残基)ドメインを有している。ヒトhtrb-1配列の一部が報告されている

50

(非特許文献7)。イヌtrb-2は、キナーゼ活性を欠く非常に不安定な細胞質リン酸タンパク質として記載されており:そのmRNAは分裂促進因子によってアップレギュレートされる(非特許文献7;非特許文献194)。htrb-3のラット相同体は、神経細胞死の間に誘導される新規のキナーゼ様遺伝子として同定されている(非特許文献6)。ショウジョウバエ相同体はtribblesであり、これはCDC25系列を調節することによって有糸分裂と形態形成を調節する(非特許文献5;非特許文献192;非特許文献4;非特許文献195)。trbキナーゼ様ドメインは、一般にタンパク質セリン-スレオニンキナーゼと、特にカルシウムカルモジュリンキナーゼおよびSNF1キナーゼと相同性を示す。しかし、trbsは活性部位リジンを欠き、イヌtrb-2(非特許文献7)およびtribble (非特許文献5)について示されるようにキナーゼ活性は無いと予測される。

10

【0333】

To determine whether htrb-3がhtrb-1のと同様の転写調節活性を有するかどうか判断するため、htrb-3発現のAP-1レポーター活性化に対する効果を調べた。この二つの哺乳類相同遺伝子は類似の活性を有し(図3A参照)、さらに、観察されたAP-1阻害は、V12 Ras 媒介AP-1活性化が同様にhtrb-1またはhtrb-3発現構造の発現によって影響されたため(図1E)、MEKK-1過剰発現に限られなかった。さらに、p38反応性レポーターの基本的活性はhtrb-3によって影響されず、これらのキナーゼの活性化はhtrb-3を過剰発現することによってわずかに阻害された(図1G)。

【0334】

さらにhtrb発現レベルがストレスキナーゼシグナル伝達に及ぼす影響を調べるため、逆方向のhtrb-1またはhtrb-3 5'UTRおよびN末端可変領域に対応する領域を発現するアンチセンス構造をHeLa細胞に、AP-1またはNFkBレポーターと、そして活性化因子としてMEKK-1またはNIK発現構造と同時に導入した(図3A、B)。完全長センスcDNAについて観察された通り、これらの構造はAP-1活性化を強く阻害する一方、NFkBには殆ど影響しなかった。

20

【0335】

図3はアンチセンスhtrb-1およびhtrb-3 RNAの発現がストレスキナーゼ活性化阻害するのを示している。同時導入したアンチセンスhtrb-1またはhtrb-3構造の効果は、AP-1(A)およびNFkB反応性レポーター(B)のMEKK-1またはNIK発現プラスミドによる活性化についてそれぞれ記録した。(C)HeLa細胞にセンスまたはアンチセンス htrb-3発現構造を導入し、細胞の大きさをフローサイトメトリーで測定し、前方散乱をプロットした。(D)対照およびhtrb-3を導入したHeLa細胞を可浸透化し、RNase処理し、ヨウ化プロピジニウムで染色した。細胞のDNA含量はフローサイトメトリーで測定した。

30

【実施例4】

【0336】

htrb細胞周期調節の研究

成虫原基細胞におけるtrb^{-/-} 遺伝子型またはtribblesの過剰発現はG2停止と細胞の大きさの増大を生じることが示されている(非特許文献196;非特許文献197)。この効果は細胞型特異的であった(非特許文献5;非特許文献192)。htrbsはtribblesに最も近い既知の哺乳類相同遺伝子であるので、HeLa細胞におけるhtrb発現レベルの、細胞の大きさおよび細胞周期に対する影響を調べた。tribblesについて観察されたように、上昇または低下したhtrb-3(およびhtrb-1、データ記載せず)レベルの結果として、細胞の大きさの増大が生じた(図3C)、対照的に、細胞周期分布は過剰発現したhtrb-3に影響されなかった(図3D)。これらの観察は、ショウジョウバエ成虫原基細胞の大きさがtribblesの支配下にあるように、脊椎動物細胞の大きさはtrbタンパク質によって支配されている可能性があることを示唆する(非特許文献5;非特許文献4)。

40

【実施例5】

【0337】

htrb-1媒介抑制の分析

表1は、htrb-3がAP-1を阻害するが、NF- κ B、さまざまなサイトカインの誘導を阻害しないことを示す。終濃度10nMのそれぞれのサイトカインおよび50ng/mlのPMAを、HeLa細胞

50

胞を4時間刺激するのに用いた。活性化はPBS対照との比較で示す。AP-1レポーターを活性化する能力を有するものを、htrb-3の効果について調べた。結果は、同時導入されたhtrb-3構造によって起こったパーセント阻害で示す。略語：IL- インターロイキン、bFGF- 塩基性繊維芽細胞成長因子、EGF- 上皮成長因子、Ins. like GF- インシュリン様成長因子、TGF β - 形質転換成長因子 β -1、M-CSF- マクロファージコロニー刺激因子、G-CSF- 顆粒球コロニー刺激因子、GM-CSF- 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、PDGF-BB- 血小板由来成長因子-BB、LIF- 白血病抑制因子、PMA テトラデカノイルホルボール酢酸。

【0338】

HeLa細胞におけるhtrb-1の過剰発現はMEKK-1媒介AP-1を阻害するが、NF- κ B活性化は阻害しない。類似の効果が、AP-1レポーターがPMA(図4A、B)または一群のヒトサイトカイン(表1参照)によって刺激されたときにみられた。可能性のあるhtrb作用部位を特徴づけるため、我々はMEKK-1の用量を増やすことで効果をバイパスしうるかどうかに試験した(図4C)。我々のデータはそうでないことを示し、htrb-3はMEKK-1の下流の律速因子と相互作用することを示唆する。我々の現在の理解によると、MEKK-1は二つの下流キナーゼ、MKK4(SEK1)およびMKK7をリン酸化する(非特許文献196;非特許文献197)。これらのキナーゼの活性化は、Junキナーゼを介したc-JunおよびCREB2を含め、いくつかの転写因子のリン酸化につながる(非特許文献198)。htrb遺伝子の作用点をさらに特徴づけるため、MKK4およびMKK7の発現構造がhtrb-1発現プラスミドとともにまたはそれ無しで同時導入された(図4E)。MKK7媒介AP-1活性化はhtrb-1の同時発現時に阻害された。さらに、AP-1のPMAによる活性化はMKK7を過剰発現することによって増強され、またこの活性はhtrb-1またはhtrb-3の同時発現時に阻害された(図4F)。使用したMKK4構造はAP-1レポーターを刺激せず(図4E)、また用いた条件下ではPMA活性化を増強もしなかった(図4F)。MKK4がhtrb作用に関係する可能性を調べるため、HeLa細胞にhtrb-1またはhtrb-3発現構造を導入し、PMAで刺激した(図4D)。内因性MKK4タンパク質のリン酸化レベルはPMAにもhtrbsにも影響されなかった。要約すると、我々のデータはMKK4でなくMKK7がこの系のAP-1活性化に寄与し、またhtrbsの阻害効果はMKK7またはその下流に働くことを示唆する。このことを試験するため、エフェクター転写因子c-Junのリン酸化を、PMA刺激HeLa細胞からの細胞抽出物中で測定した(図5A)。活性化の最大レベルは同等であった一方、c-Junリン酸化の動態はhtrb-3過剰発現時に顕著に変化し、結果としてストレスキナーゼ応答のより迅速なダウンレギュレーションが生じた。

【0339】

図4はhtrb-1がMEKK-1およびMKK7媒介AP-1活性化を阻害するのを示す。HeLa細胞にAP-1レポーター(菱形)および一定量(50ng/ウェル)のhtrb-1(三角)またはhtrb-3(四角)発現構造を導入し、PMAで刺激した。PMAの漸増量を、4時間刺激するのに用いた。B: 50ng/mlのPMAの効果を6時間追跡した。C: MEKK-1の過剰発現がhtrb-3阻害をバイパスしうるかどうかに調べるため、MEKK-1発現プラスミドの漸増量(黒棒グラフ)、および一定量(50ng/ウェル)のhtrb-3発現構造(灰色棒グラフ)を同時導入した。D: HeLa細胞にhtrb-1またはhtrb-3発現構造を導入し、50ng/ml PMAによって導入後24時間刺激した。pMKK4濃度は、等しい量の全細胞破碎液をウェスタンブロットすることによって追跡した。E: AP-1レポーター活性を、htrb-1発現プラスミドの存在(灰色棒グラフ)または非存在(黒棒グラフ)下で、MKK4またはMKK7発現構造の同時導入に対して測定した。F: AP-1レポーター、MKK4またはMKK7発現プラスミド +/- htrb-1発現構造を導入したHeLa細胞を、2ng/ml PMAで刺激しレポーター活性を測定した。

【0340】

外因性MAPK活性化刺激に対する、全体としての細胞反応は、個々のMAPK経路が活性化された程度に依存する。これは精密に調節された過程であり、微小環境、細胞周期の状態、共刺激シグナルを含む多くの因子に関わる。他のMAPK経路がhtrbの過剰発現に影響されるかどうか調べるため、HeLa細胞にhtrb-3発現構造とERK、JNKまたはp38反応性レポーターとを同時導入し、これらのエフェクターキナーゼを特異的に活性化する上流のMAPキナーゼを過剰発現させることによって刺激した。htrb3の漸増量を同時導入した(図5B)。我々の

データが示す通り、少量のhtrb-3はJNKとERKsの活性化を促進することができ、一方でp38活性化は抑制された。多量のhtrb(>20ng)はすべてのMAPK経路の活性化を阻害した。さらに、MAPK活性化を促進する最適htrb-3用量はERKsとJNKsについて異なり、htrb濃度の調節は個々のMAPK経路の活性化の間のバランスを変える感受性の高い機構である可能性があることを示唆する。

【実施例 6】

【0341】

htrbはERK活性化を増大させる

htrb過剰発現のERK活性化に対する効果を調べた。HeLa細胞をPMAで活性化し、リン酸化ERKsの濃度をウェスタンブロット法によって観察した(図5C、D)。我々の結果は、リン酸化ERKの基本濃度がhtrb-3によって上昇し、最大刺激はhtrb-1およびhtrb-3過剰発現の過剰発現の結果として大きく増加したことを示す。同様に、増大したERK活性が、htrb-1またはhtrb-3が過剰発現されたHeLa細胞由来のPMA活性化細胞抽出物を用いて行ったキナーゼ検定法で検出された(図5E)。JNKおよびERKリン酸化レベルおよびキナーゼ活性に対するhtrbの観察された効果とは対照的に、p38キナーゼ活性はこれらのタンパク質の過剰発現時に抑制された(図5F)。

【0342】

図5(A)ではHeLa細胞にhtrb-1またはhtrb-3発現構造を導入し、50ng/ml PMAで刺激している。リン酸-cJun濃度は等しい量の全細胞破碎液をウェスタンブロットすることによって測定し、NIH画像によって定量した。(B) PFR luc レポーターをHeLa細胞にPFA-CHOPと共に導入し、PMEK-3(p38活性化因子)(三角)または、PMEK-1(ERK活性化因子)(菱形)で活性化したpFA2-Elk-1で活性化した。AP-1 lucはストレスキナーゼカスケードを活性化するpMEK K-1同時導入によって活性化された(四角)。(C) HeLa細胞を図5(A)のように導入し処理した。総およびリン酸化-ERK濃度はウェスタンブロット法によって測定した。(D)リン酸化-ERK濃度を測定した：対照を導入(菱形)、htrb-1を同時導入(四角)、htrb-3を同時導入(三角)。キナーゼ検定をPMA刺激細胞抽出物について行い、ERK(E)またはp38(F)活性を測定した。

【実施例 7】

【0343】

htrbタンパク質ドメイン機能の分析

trbタンパク質の複数の配置は、3個の構造的に明瞭なモジュールの存在を示唆する(図2)。これらのドメインのtrb機能における役割を調べるため、一個または二個のドメインを欠くhtrb-1欠失変異体を作成した(図6A)。結果の構造はHeLa細胞でGFP融合タンパク質として発現し、完全長htrb-1および欠失変異体のそれぞれの細胞内局在を調べた。htrb-1は核に局在しているが核小体には含まれないことが分かった。C末端可変領域の欠失は細胞内分布に影響を与えなかった一方(記載せず)、N末端可変領域の欠失によって核内に差別的に局在していないタンパク質が生じた(図6B上)。両方の末端を欠く欠失変異体は均一な細胞内分布を示した(記載せず)。類似の細胞内局在が、完全長またはN末端欠失変異体htrb-3-GFP融合タンパク質が発現されたときにみられた(図6B下)。異なるhtrbドメインのストレスキナーゼシグナル伝達における関与を一過性導入検定法で調べた。HeLa細胞に完全長およびhtrb-1欠失構造を、活性化因子としてMEKK-1発現プラスミドと導入し、htrb変異体のAP-1活性化に対する効果を測定した(図6C)。すべてのhtrb-1欠失変異体はMEKK-1媒介AP-1活性化の強い阻害を示し、htrbキナーゼ様ドメインの過剰発現がストレスキナーゼシグナル伝達を阻害するのに十分であることを示唆する。htrbsの全体のタンパク質配列はtribblesと顕著に類似しているが、プロリンに富むN末端領域は、htrb-1およびhtrb-3に核を標的とさせる原因であるが、最低レベルの相同性を示した。このことから、哺乳類相同遺伝子は、ショウジョウバエタンパク質とは異なる細胞小器官を標的とさせることができるおよび／または異なるタンパク質と相互作用させることのできる可能性が生じる。

【0344】

図6はhtrb-1の欠失突然変異誘発を示す。(A) trbsは高度に保存された中心ドメインと可

10

20

30

40

50

変末端領域を共有する。htrb-1の欠失構造は可変領域の一つまたは両方を欠いて作成され、GFP融合タンパク質として発現された。(B) HeLa細胞に完全長または欠落したhtrb-1またはhtrb-3形を発現する発現構造を導入した。欠落した構造はN末端可変領域を欠く。導入の24時間後、細胞を5%ホルムアルデヒドで固定しヨウ化プロピジニウム (PI) で対比染色した。PIとGFPを励起して共焦点顕微鏡写真を撮影した。顕微鏡写真はPowerMacintoshに取り込んで重ね合わせた。(C) htrb-1-GFP欠落変異体がMEKK-1媒介AP-1活性化を阻害する能力を、一過性導入したHeLa細胞で試験した。

【0345】

我々はさらに、内因性htrb-1メッセージの発現の定常状態レベルがhtrb-1 3'UTRの過剰発現後に上昇したため(データ記載せず)、htrb-1 3'UTR 構造が単独でhtrb-1 タンパク質濃度を上昇させることができることを示している。この調節の機構は、過剰の3'UTR RNAの存在下で滴定されて失われるhtrb-1翻訳の陰性調節因子を含む可能性がある。

【実施例8】

【0346】

htrb発現の組織特異性および機能の細胞特異性

htrbタンパク質は互いに高い一次配列相同性を示すが、in vivo機能は重複していない可能性がある。特異性はしばしば、個々のファミリー構成体の組織特異的発現によって達成される(たとえば INKまたはJIP遺伝子)。この可能性を、3個すべてのhtrb遺伝子のmRNA発現プロファイルをHeLa細胞および休止期ヒト組織で決定することによって試験した。HeLa細胞は3個すべてのhtrb遺伝子を発現する(図7C)対照的に、3個すべてのhtrb遺伝子は制限された発現パターンを示し、組織特異的役割を示唆する(図7A)。この仮説は、HeLa細胞、NIH 3T3繊維芽細胞およびRAW 264.7 マクロファージに、htrb-1またはhtrb-3発現構造とAP-1ルシフェラーゼレポーターを同時導入し、そしてMEKK-1を過剰発現させることによってそれらを活性化させて確認した(図7B)。両方のhtrb遺伝子がAP-1活性化をHeLa細胞で破壊した一方、htrb-3だけがRAW細胞で阻害効果を有した。AP-1のNIH 3T3 細胞における活性化はいずれのhtrbsの過剰発現によっても影響されなかった。これらの結果は、MEKK-1媒介AP-1活性化の下流構成成分およびこのシグナル伝達カスケードに対するhtrbの観察された阻害効果は、細胞型およびhtrbファミリー成員に特異的であることを示す。

【0347】

図7は、htrb遺伝子は組織特異的な方法で発現され作用することを示す。htrb遺伝子の発現プロファイルを特徴づけるため、「Human Rapid-Scan panel」(OriGene)を用いて、多組織PCRを実施した。以下に示す組織をスクリーニングした：1.脳、2.心臓、3.腎臓、4.脾臓、5.肝臓、6.大腸、7.肺、8.小腸、9.筋肉、10.胃、11.精巣、12.胎盤、13.唾液腺、14.甲状腺、15.副腎、16.膵臓、17.卵巣、18.子宮、19.前立腺、20.皮膚、21.末梢血リンパ球、22.骨髄、23.胎児脳、24.胎児肝臓。 B：HeLa, NIH 3T3 およびRAW 264.7 細胞にAP-1レポーター、MEKK-1発現ベクターおよびhtrb-1またはhtrb-3発現構造を一過性に導入した。C：総RNAをHeLa細胞から精製し、htrb遺伝子の発現をRT-PCRによって試験した。D：trb作用の機構についての作業仮説。

【実施例9】

【0348】

htrb足場機能

足場タンパク質は酵母および哺乳類においてNFκBおよびMAPK活性化カスケードの活性化に不可欠であることが示されている(非特許文献199;非特許文献200;非特許文献201;非特許文献202;非特許文献203)。ここで我々はショウジョウバエtribblesのヒト相同遺伝子ファミリーを記載する。我々のデータは、htrb-1および/またはhtrb-3の発現レベルがMAPK活性化の幅を調節することを示唆する。我々の仮説によると(図7D)、htrbタンパク質(「T」)は活性MAPK複合体(「A」および「B」)の会合に必須である。htrbレベルの過剰発現または抑制の結果として不活性複合体の増加が生じ、今度はMARK媒介活性化が低下する。足場はシグナル伝達反応を濃度によって促進または阻害することができるため (Ferrell, J.E. (2000))

(www.stke.org/cgi/content/full/0C_sigtrans;2000/52/pel)、trb作用について提案されたモデル(Fig 7D)は、我々の観察および、ショウジョウバエ実験における観察(非特許文献5;非特許文献192;非特許文献4)(図5B)の両方を説明する。

【0349】

図8は、htrb-1およびhtrb-3の発現の共焦点顕微鏡法による検出を示す。HeLa細胞にhtrb-3-GFP発現プラスミドを、アンチセンスhtrb-3およびアンチセンスhtrb-1発現構造と組み合わせ、一過性に導入した。24時間後、共焦点顕微鏡写真を10xエアレンズを用いて撮影し、htrb-GFP発現細胞をNIH画像を用いて検出した(分析の詳細については非特許文献204を参照)。検出された粒子のThe brightness vs. theWea がプロットされている。赤い点はバックグラウンドレベルより高い蛍光を有する細胞を示し、したがってhtrb-GFP発現細胞を表す。B HeLa細胞に、完全長または欠落のあるhtrb-1-GFPタンパク質を発現するプラスミドを導入した。図8Aと同様に、発現細胞は細胞一個レベルで検出されている。

【0350】

図9はセンス対アンチセンスhtrb-3の滴定を示す。HeLa細胞に、標記のレポーターおよび発現構造を導入し、PMA(A)またはMEKK-1発現ベクターの同時導入(B)によって活性化した。

【実施例10】

【0351】

材料および方法

本書面に報告されているヒトtrb配列はGenBankデータベースに寄託されている:htrb-1(AF250310)およびhtrb-3(AF250311)。

【0352】

配列番号1 = htrb-1の完全長cDNA配列

配列番号2 = htrb-1ポリペプチド配列

配列番号3 = htrb-3ポリペプチド配列

配列番号4 = htrb-3ポリペプチド配列。

プラスミド、PCR: MKK4、MKK7(非特許文献197)、IL-S-luc(非特許文献205およびLHRE-TK-luc(非特許文献206)は先に記載した。V12 RasはDr. J. Downwardより寄贈を受けた。PAP-1 luc、PNF B luc、PFR luc、PFA-CHOP、pFA2-Elk-1、PMEKK-1 PMEK 1およびPMEK-3はPathDetect(Stratagene)シグナル形質導入レポーター系の一部であった。

【0353】

htrbクローン:可変領域を欠く欠失構造は、下記のプライマーを用いてPCRによって作成した:htrb-1 5'欠失プライマー: 5'-CCGGATCCACCATGATCGCCGACTACCTGCTG-3'、3'欠失プライマー: 5'-CCGGTACCTTACGGCCGAAACCAGGGGTGCAGTAG-3'、htrb-3 5'欠失プライマー: 5'-CCGGATCCATCCATCCATGATTGGGCCCTATGTCTCCTGGAG-3'。PCR産物はPCR 2.1 TOP0 (Invitrogen)にサブクロニングし配列決定した。GFP融合タンパク質作成のために、htrb変異体を必要に応じてpEGFPN1またはpEGFPN2(Clontech)にサブクロニングした。

【0354】

培養細胞、導入: HeLa(ECACC、85060701)およびNIH 3T3細胞は10%胎児ウシ血清(FCS)およびペニシリン-ストレプトマイシンを含むDMEM中で維持した。Raw細胞は10%FCSおよびペニシリン-ストレプトマイシンを添加したRPMI中で培養した。導入の24時間前に、細胞(1.5×10^4 /ウェル)を96穴組織培養プレートに播種した。

【0355】

導入はSuperFect(Qiagen)を用いて取扱説明書に従って行われた;適当な図の説明中に特記しない場合は、各ウェルに500ngの誘導性レポーター構造(PIL-8 luc, PAP-1 luc, pNFkB lucまたはpLHRE-TK luc)、導入効率の正規化のために100ngのpTK-RLuc (Promega)、そして50ngの試験対象のhtrb-1またはhtrb-3発現ベクターを加えた。p38またはERKを特異的に活性化するために、およびhtrb-3が活性化に及ぼす影響を調べるために、500ngのPFR luc、100ngのpTK RLucおよび10 ngのPFA-CHOPまたはpFA2-Elk-1、25ngのPMEK-1またはPMEK-3プラスミドが導入された。DNA総用量をT00ng/wellで一定に保つため、十分なpCDNA3.1 (

Invitrogen) (「空ベクター」)を加えた。導入の2時間後、細胞を洗浄し100 μ Lの新しい培地を加えた。処理のそれぞれについて3つ組のウェルに導入した。刺激は24時間後に4時間(特記しない限り)実施した。2nMのIL1 β または10ng/mLのTNF α 、0.5ug/mlのヒト成長ホルモン、50ng/mlのPMAまたは10nMの表1に記載のもう一方のサイトカインを用いた(図中に特記しない限り)。

【0356】

アゴニストは、11ulのPBS中に10倍保存溶液として調製し添加した。レポーター濃度は、4時間の刺激に続いてデュアルルシフェラーゼ系(Promega)を用いてメーカーの指示通りに測定した。

【0357】

サイトカイン: EL-1 β はImmunex Corporationから寄贈を受けた。もう一方のヒトサイトカイン調製物は、NIBSCのDr. Steve Pooleから寄贈を受けた。

【0358】

ウェスタンブロット: pJun、pERKおよびpMKK4の検出のために、ポリクローナル抗体はSigmaから購入した。細胞破碎液のタンパク質濃度を測定し、等しい量の総タンパク質を各レーンに加えた。キナーゼ測定はNew England Biolabsから購入した適当なキットを用いて実施した。

【表1】

表 1

A

サイトカイン	AP-1 活性化倍数	NF- κ B 活性化倍数
インターフェロン- α	3.35 $\pm$ 6%	1.23 $\pm$ 13%
インターフェロン- γ	1.67 $\pm$ 5%	1.25 $\pm$ 6%
IL-2	1.02 $\pm$ 17%	1.00 $\pm$ 34%
IL-3	1.91 $\pm$ 7%	1.22 $\pm$ 11%
IL-4	1.40 $\pm$ 26%	0.95 $\pm$ 8%
IL-5	8.24 $\pm$ 8%	1.74 $\pm$ 2%
IL-6	0.96 $\pm$ 11%	1.05 $\pm$ 6%
IL-7	0.76 $\pm$ 24%	1.10 $\pm$ 6%
IL-9	1.36 $\pm$ 16%	0.86 $\pm$ 2%
IL-10	0.78 $\pm$ 5%	0.89 $\pm$ 5%
IL-11	0.69 $\pm$ 8%	0.76 $\pm$ 9%
IL-12	2.14 $\pm$ 11%	0.69 $\pm$ 13%
IL-13	0.84 $\pm$ 10%	1.08 $\pm$ 21%
IL-15	1.34 $\pm$ 10%	1.76 $\pm$ 7%
bFGF	0.72 $\pm$ 14%	1.14 $\pm$ 9%
EGF	0.84 $\pm$ 4%	1.28 $\pm$ 6%
Ins. like GF	0.69 $\pm$ 16%	1.07 $\pm$ 3%
TGF- β	13.37 $\pm$ 13%	6.61 $\pm$ 5%
オンコスタチンM	0.72 $\pm$ 18%	0.87 $\pm$ 6%
M-CSF	1.52 $\pm$ 5%	1.20 $\pm$ 16%
G-CSF	0.96 $\pm$ 14%	1.06 $\pm$ 15%
GM-CSF	1.04 $\pm$ 15%	1.38 $\pm$ 21%
PDGF-BB	9.06 $\pm$ 6%	0.76 $\pm$ 18%
LIF	0.73 $\pm$ 7%	0.85 $\pm$ 10%
分散因子	3.30 $\pm$ 8%	1.03 $\pm$ 4%
PMA	10.37 $\pm$ 9%	5.16 $\pm$ 15%

10

20

30

B

サイトカイン	AP-1 阻害	NF- κ B 阻害
分散因子	34%	-
IL-5	46%	-1.5%
TGF- β	30%	2%
インターフェロン- α	31%	-
IL-12	16%	-
PDGF-BB	29%	-
PMA	39%	0.8%

40

【0359】

同等物

ここに記載の本発明の特定の実施例の多数の同等物を、通常の実験だけを用いて、当業者は認識することができるかまたは確認することができる。そのような同等物は別記の請求項に含まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0360】

【図1】図1は基本的な、しかしIL-1 β またはTNF α 活性化されたものでないIL-8レポータ

50

一発現のhtrb-1媒介抑制(図A) ; AP-1活性化の特異的抑制(図B)しかしhtrb-1によってNF- κ Bは活性化されない(図C) ; AP-1のhtrb-1とhtrb-3媒介抑制の比較(図E) ; htrb-1(三角)によるMEKK-1媒介AP-1活性化の抑制(四角、横軸) ; そしてp38媒介活性化のhtrb-3抑制を示す図である。

【図2】図2はhtrb-1、htrb-3および関連するtribbles遺伝子配列を示す図である。

【図3】図3はアンチセンスhtrb-1およびhtrb-3RNAの発現がストレスキナーゼ活性化を阻害するのを示す図である。

【図4】図4はhtrb-1がMEKK-1およびMKK7媒介AP-1活性化を阻害するのを示す図である。

【図5】図5はhtrb-1およびhtrb-3がc-JunおよびERKのリン酸化動態を変化させるのを示す図である。

【図6】図6はhtrb-1の欠失分析を示す図である。

【図7】図7はhtrb遺伝子は組織特異的に発現し作用することを示す図である。

【図8】図8は共焦点顕微鏡法によるhtrb-1およびhtrb-3の発現の検出を示す図である。

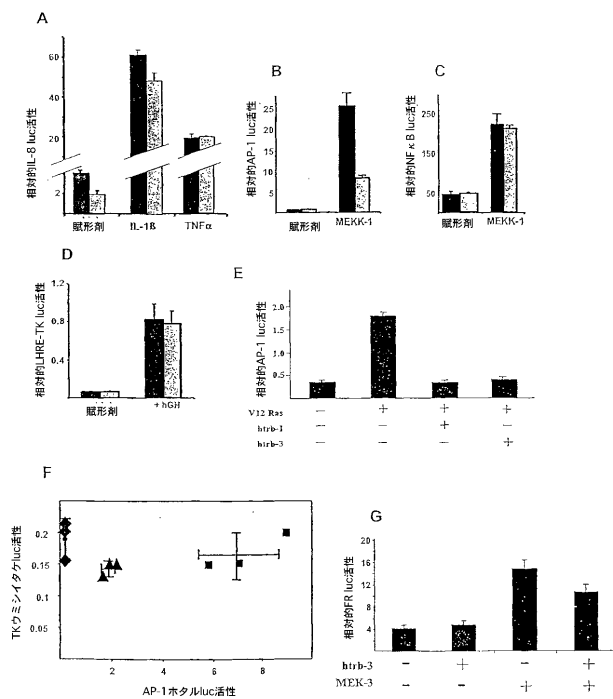
【図9】図9はセンス対アンチセンスhtrb-3の滴定を示す図である。

【図10】図10はhtrb-1(GenBank Accession No. AF250310)の核酸(図A)およびポリペプチド配列を示す図である。

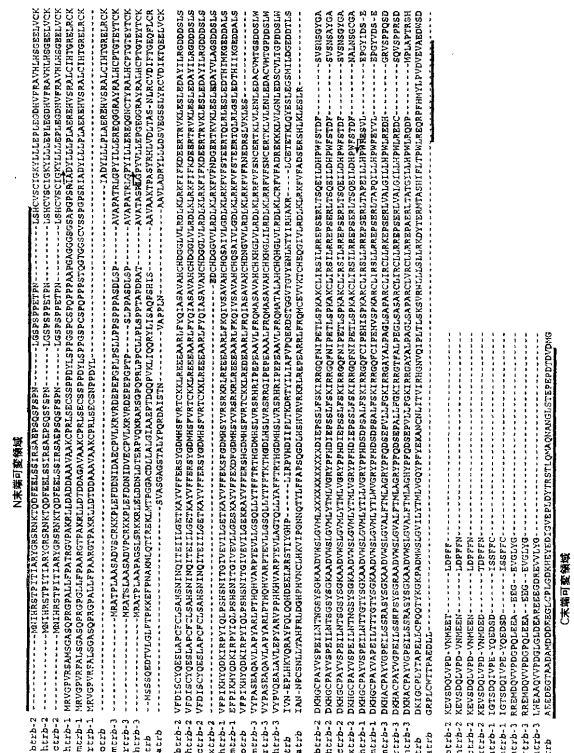
【図11】図11はhtrb-3(GenBank Accession No. AF250311)の核酸(図A)およびポリペプチド配列を示す図である。

10

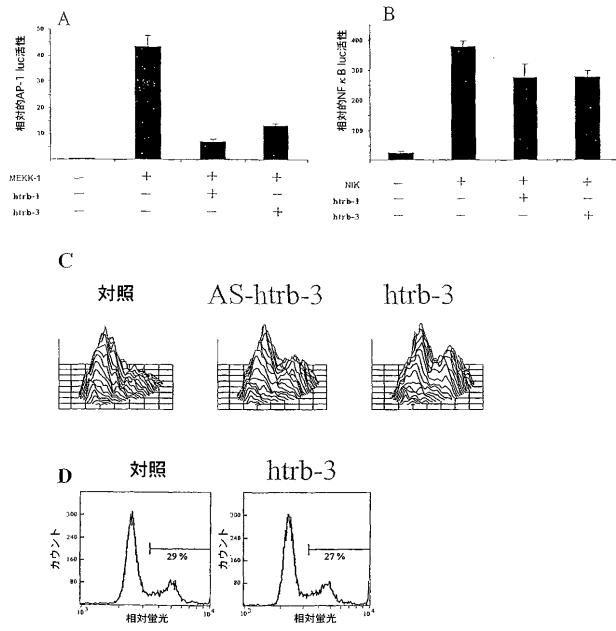
【図1】



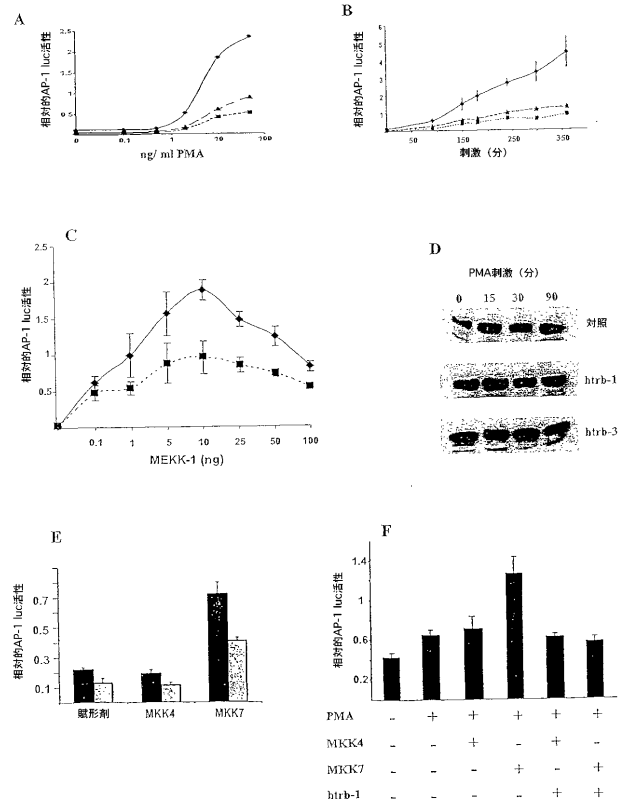
【図2】



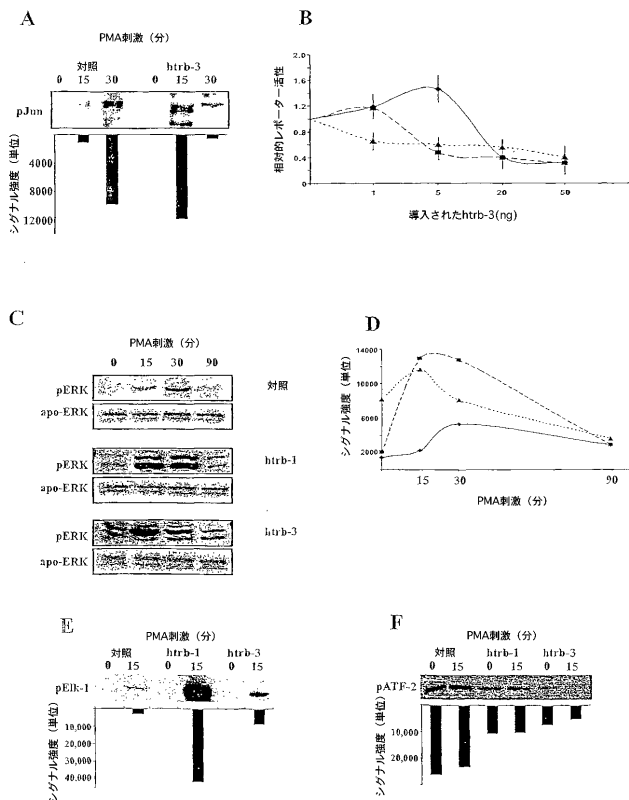
【図 3】



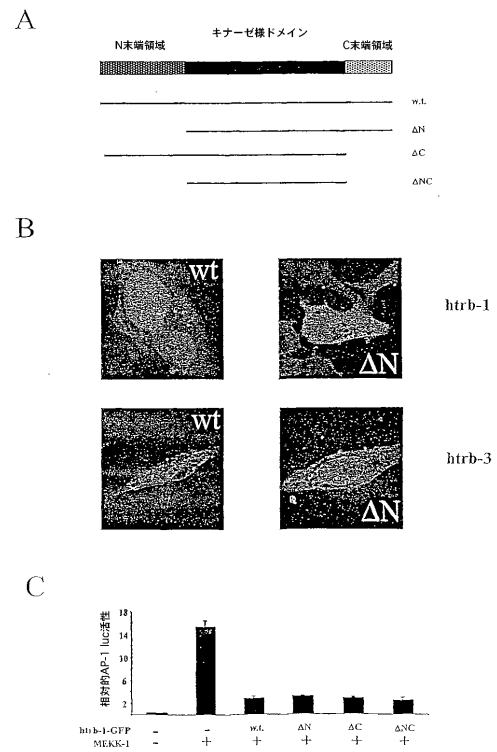
【図 4】



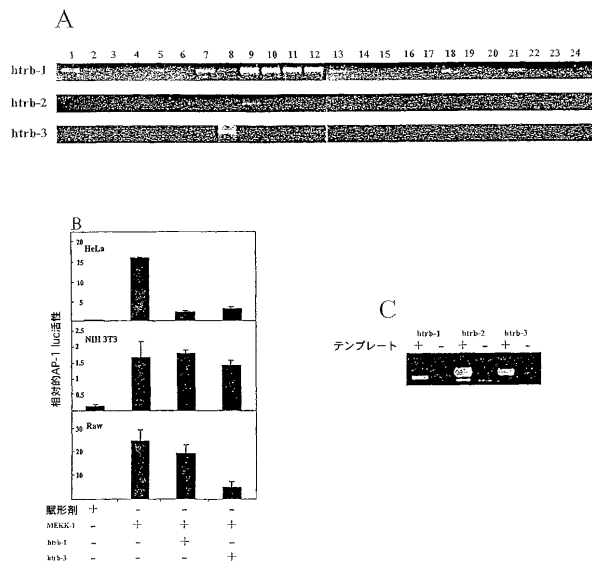
【図 5】



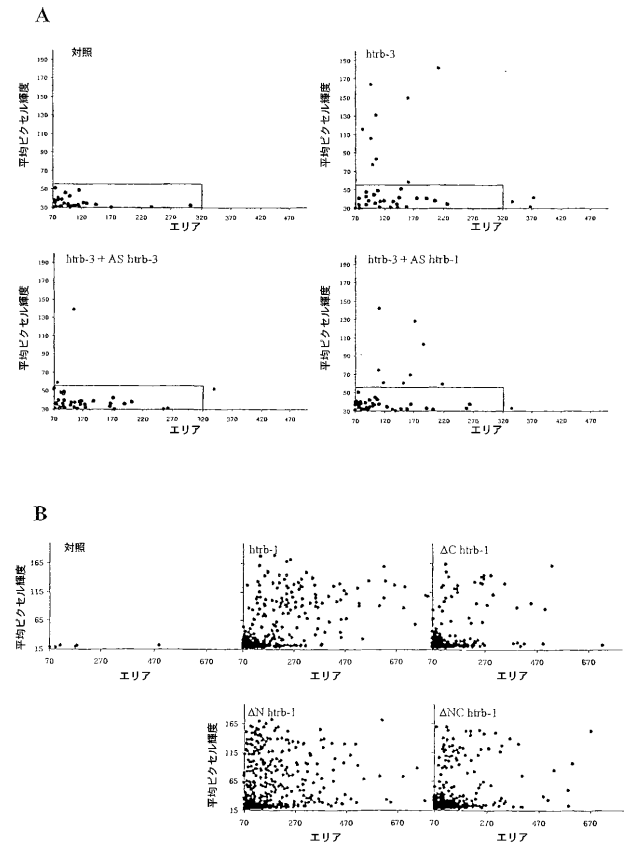
【図 6】



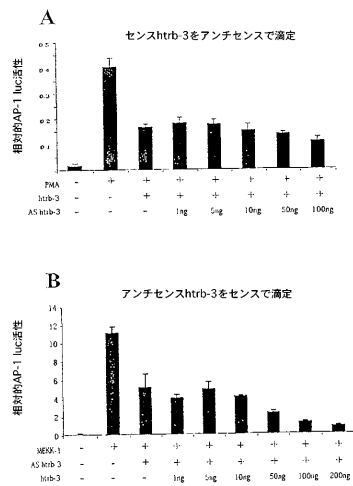
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【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 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053743 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/50

(21) International Application Number: PCT/US02/00070

(22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/260,294 8 January 2001 (08.01.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): INTER-
LEUKIN GENETICS, INC. [US/US]; 135 Beaver Street,
Waltham, MA 02452 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DOWER, Steven
[GB/GB]; Sheffield S10 2JF (GB). QUANSTROM, Eva
[GB/GB]; Sheffield S10 2JF (GB). KISS-TOTH, Endre
[—/—]; * (*).(74) Agents: OLESEN, James, T. et al.; Foley, Hoag LLP, 155
Seaport Boulevard, Boston, MA 02210-2098 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, 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, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/053743 A2

(54) Title: MAMMALIAN TRIBBLES SIGNALING PATHWAYS AND METHODS AND REAGENTS RELATED THEREFO

(57) Abstract: The invention provides methods and reagents for modulating mitogen activated protein kinase pathways using mammalian tribbles homologs (trtb).

WO 02/053743

PCT/US02/00070

MAMMALIAN *TRIBBLES* SIGNALING PATHWAYS AND METHODS AND
REAGENTS RELATED THERETO1. Background of the Invention

5 The function of immune and inflammatory genes play a central role in the pathology of many diseases including rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disorder, psoriasis, and Alzheimer's disease. There is evidence to suggest that these immune and inflammatory genes function as a complex network of interdependent signaling components. These signaling components mediate signaling events which take place both extracellularly (e.g. 10 through the action of various cytokines such as the interleukins) and intracellularly (e.g. through the action of signal transducing kinases and transcriptional regulators such as AP-1 and NF- κ B). A variety of means exist for regulating inflammatory responses involved in disease processes. For example, aspirin (salicylic acid) inhibit activation of NF- κ B by blocking I- κ B kinase, a key enzyme in NF- κ B activation. Sulfasalazine and gold 15 compounds also inhibit NF- κ B activation. Glucocorticoids suppress expression of inflammatory genes by binding glucocorticoid receptors involved in NF- κ B activation. Such drugs are commonly used to regulate inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. Nevertheless there is a need to develop drugs with particular anti-inflammatory specificities that are particularly adapted to controlling certain aberrant inflammatory 20 processes while allowing nonpathological inflammatory processes to continue without interference. Indeed, a variety of anti-inflammatory medicaments would benefit the development of optimized drug treatments for specific patients with particular needs (see Davies & Skjoldt (2000) Clin Pharmacokinet 38: 377-92). Furthermore, continuing advances in understanding the molecular mechanisms of inflammation will benefit the 25 development of more effective, more specific and less toxic drugs to control inflammatory diseases. An understanding of the relationships between the genes comprising this network would provide a broad array of drug targets for the control of autoimmune and inflammatory disease processes. Molecular agonists and antagonists could be designed to act alone or in concert at one or more points in this gene network in order to effect control 30 of the disease process.

A large body of work has recently been focused on signalling networks triggered by proinflammatory cytokines, bacterial cell walls and shear stress. In general, two major signalling cascades are activated by these stimuli. The major intracellular signaling

WO 02/053743

PCT/US02/00070

cascades involved in immune and inflammatory gene network regulation are the mitogen
 activated protein kinase (MAPK, or stress kinase) cascade and the I κ B kinase cascade as
 well as the JAK/STAT signal transduction pathway (see e.g. Rivest et al. (2000) Proc Soc
 Exp Biol Med 223: 22-38). Activation of NF- κ B is thought to be mediated primarily via I-
 5 κ B kinase (IKK), whereas that of AP-1/ATF can be mediated by stress-activated protein
 kinases (SAPKs; also termed Jun kinases or JNKs). IKK α and IKK β are two
 catalytic subunits of a core IKK complex that also contains the regulatory subunit NEMO
 (NF- κ B essential modulator)/IKK γ . The latter protein is essential for activation
 of the IKKs, but its mechanism of action is not known, although the molecular cloning of
 10 CIKS (connection to IKK and SAPK/JNK), a previously unknown protein that directly
 interacts with NEMO/IKK γ in cells, may prove informative (see Leonardi et al.
 (2000) PNAS, USA 97: 10494-9). When ectopically expressed, CIKS stimulates IKK and
 SAPK/JNK kinases and it transactivates an NF- κ B-dependent reporter. Activation of
 NF- κ B is prevented in the presence of kinase-deficient, interfering mutants of the
 15 IKKs. CIKS may help to connect upstream signaling events to IKK and SAPK/JNK
 modules and CIKS could coordinate the activation of two stress-induced signaling
 pathways, functions reminiscent of those noted for tumor necrosis factor receptor-
 associated factor adaptor proteins.

Individual stress kinase mediated pathways behave differently in different cell
 20 types. Specificity may be achieved in part by cell type specific expression of certain
 pathway components such as CIKS. It is important that all components contributing to the
 regulation and specificity of these mitogen activated protein kinase signalling pathways be
 identified as each represents a target for regulation of this important class of inflammatory
 signalling events.

25 2. Summary of the Invention

The invention is based in part upon the cloning and identification of certain
 mammalian htrbs genes and encoded htrbs proteins which function as inhibitors of
 particular stress kinase pathways. The htrbs genes are mammalian homologs of the
 Drosophila tribbles gene, which coordinates mitosis with morphogenesis and cell fate
 30 determination in fruit fly development (see Mata et al. (2000) Cell 101: 511-22; and
 Grosshans & Wieschaus (2000) Cell 101: 523-31). The invention provides a human
 homolog of the Drosophila tribbles gene which has been termed htrb-1, for human tribbles
 homologue-1 (also known as homo SKIP1 (Gen Bank Accession NO. AF250310). The

WO 02/053743

PCT/US02/00070

htrb-1 inhibits basal but not induced activity of the cytokine responsive interleukin-1 (IL-8) gene reporter, which is responsive to both NF-kB and AP-1 induction through binding sites for these transcriptional activators present in the IL-8 promoter. The htrb-1 gene of the invention specifically represses AP-1 but not NF-kB or JAK/STAT mediated transcriptional induction. Therefore the htrb-1 gene of the invention provides a convenient and a specific

tool for modulating stress kinase-induced pathways.

In preferred embodiments, the invention provides an isolated htrb-1 encoding nucleic acid comprising a nucleotide sequence which is at least about 90% identical to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 1 or the complement thereof and more preferably at least about 95% or 99% identical. In certain embodiments, the nucleic acid of the invention further an AP-1 activation inhibitory activity. The invention further provides isolated nucleic acid which encodes an htrb polypeptide, such as a polypeptide that is at least about 75% identical to the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2, and which, preferably, further encodes an AP-1 inhibitory activity. In certain preferred

embodiments, the isolated nucleic acid of the invention encodes an htrb bioactivity such as an IL-8 basal expression inhibitory activity, and AP-1 transcriptional activation inhibitory activity, an MEKK-1 kinase signaling inhibitory activity, an MKK-7 kinase signaling inhibitory activity, an ERK kinase signaling inhibitory activity, a JNK kinase signaling inhibitory activity, or a cellular hypertrophy-promoting activity. Preferred nucleic acids of the invention include isolated nucleic acid with a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to certain particular htrb-1 nucleotide sequences such as: nucleotides 1 to 448 of SEQ ID No. 1; nucleotides 1 to 729 of SEQ ID No. 1; and nucleotides 1500 to 1916 of SEQ ID No. 1.

The invention further provides isolated htrb polypeptides which include a polypeptide sequence of at least 10, and, more preferably, 20 or 30 contiguous amino acids from the htrb-1 sequence spanning amino acid residues 1 to 150 of SEQ ID No. 2. Preferably the htrb polypeptides of the invention are at least about 70%, and, more preferably 80, 90 95 or 99% identical to the htrb-1 sequence set forth in SEQ ID No. 2. In preferred embodiments, the htrb polypeptide encodes an htrb-1 bioactivity such as an ability to: inhibit IL-8 basal expression, inhibit AP-1 transcriptional activation, inhibit MEKK-1 kinase signaling, inhibit MKK-7 kinase signaling, inhibit ERK kinase signaling, inhibit JNK kinase signaling, or promote cellular hypertrophy.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

In particularly preferred embodiments, the invention provides methods of modulating an AP-1 mediated inflammatory signal in a cell by providing the cell with a htrb agonist or antagonist. The htrb agonist or antagonist can be an htrb polypeptide, an htrb peptidomimetic or an htrb nucleic acid. Preferred htrb nucleic acid agonist or

5 antagonists of the invention include htrb-1, htrb-1 N htrb-1 C, htrb-1 N C, htrb-3, an htrb-1 5' UTR and N-terminal variable region antisense construct, an htrb-3 5' UTR and N-terminal variable region antisense construct, and an htrb-1 3'UTR sense construct.

Preferred htrb polypeptide agonist or antagonists of the invention include htrb-1, htrb-1 N htrb-1 C, htrb-1 N C, htrb-3, htrb-3 N htrb-3 C, and htrb-3 N C. The method

10 of the invention may be used to inhibit an AP-1 mediated inflammatory signal such as a TNF induced inflammatory signal, or an interleukin induced inflammatory signal. The method of the invention further provides a method of activating an ERK-mediated signal in a cell by providing the cell with an htrb agonist activity. The ERK-mediated signal may be, for example, an AP-1-mediated gene activation signal, an estrogen receptor-mediated gene

15 activation signal, an FGF induced signal, or a PMA induced signal.

A particularly preferred embodiment of the invention provides a method of identifying an interleukin regulatory gene by a particular cloning process. The process of the invention includes: (1) transfecting a mammalian reporter cell comprising an interleukin gene or inflammatory gene reporter with a low-complexity pool of a mammalian cDNA

20 vector library; (2) screening the transfected reporter cell for positive clones by identifying transfected cells with either an increase or decrease in the interleukin gene reporter activity relative to the mammalian reporter cell transfected with the vector alone; and (3) identifying the interleukin regulatory gene from the positive clones by retransfecting the low complexity pool from said positive clones and sequencing the cDNA inserts from the

25 positive clones obtained upon retransfection, so as to identify an interleukin regulatory gene. The interleukin or inflammatory gene reporter may be an IL-1A gene reporter, an IL-1B gene reporter, an IL-1RN gene reporter, or an IL-8 gene reporter. Preferred cells for use in this aspect of the invention include mammalian cells such as HeLa cells, NIH 3T3 cells, Raw cells, or peripheral blood lymphocytes. Preferred libraries for use in this aspect of the

30 invention includes mammalian cDNA libraries such as PBMC libraries, HeLa cell libraries, PMA-induced mammalian cell libraries, or a mammalian cell library constructed from another cytokine-induced mammalian cell such as an IL-5, TGF-beta, interferon-alpha, or IL-12 induced mammalian cell.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

In preferred embodiments of this aspect of the invention, an interactive cloning process is used to derive still other inflammatory regulatory network genes. This process of the invention involves: first expressing an interleukin regulatory gene clone, comprising an interleukin regulatory gene cDNA and an expression vector, in a population of mammalian cells; next isolating a population of nucleic acids representing expressed genes from said cells; determining the gene expression profile of the interleukin regulatory gene expressing cells by microarray analysis of the population of nucleic acids representing expressed genes from said cells; and then comparing the gene expression pattern of mRNA expression from the cells transfected with the interleukin regulatory gene clone with that obtained by transfecting the vector alone in order to identify genes, other than the said interleukin regulatory gene, which are either up-regulated or down-regulated in the interleukin regulatory gene expressing cells, so as to identify the other gene targets of the interleukin regulatory gene making up the inflammatory signaling network. In preferred embodiments the method assesses altered expression of responsive genes by microarray analysis such as gene transcription profiling or gene expression fingerprinting.

3. Brief Description of the Figures

Figure 1 shows htrb-1 mediated repression of basal, but not IL-1 beta- or TNF alpha- activated, expression of IL-8 reporter (panel A); the specific repression of AP-1 activation (panel B) but not NF-kB activation (panel C) by htrb-1; a comparison of htrb-1 and htrb-3 mediated repression of AP-1 (panel E); the repression of MEKK-1 mediated AP-1 activation (squares, horizontal axis) by htrb-1 (triangles); and htrb-3 repression of p38-mediated activation.

Figure 2 shows an alignment of htrb-1, htrb-3 and related tribbles gene sequences

Figure 3 shows expression of antisense htrb-1 and htrb-3 RNA inhibits stress kinase activation.

Figure 4 shows that htrb-1 inhibits MEKK-1 and MKK7 mediated AP-1 activation.

Figure 5 shows that htrb-1 and htrb-3 alter c-Jun and ERK phosphorylation kinetics.

Figure 6 shows deletion analysis of htrb-1.

Figure 7 shows that htrb genes are expressed and act in a tissue-specific manner.

Figure 8 shows the detection of htrb-1 and htrb-3 expression by confocal microscopy.

Figure 9 shows the titration of sense vs. antisense htrb-3.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Figure 10 shows the nucleic acid (panel A) and polypeptide sequence of htrb-1 (GenBank Accession No. AF250310).

Figure 11 shows the nucleic acid (panel A) and polypeptide sequence of htrb-3 (GenBank Accession No. AF250311).

5 Table 1 shows that htrb-3 inhibits AP-1, but not NF- κ B, induction by a variety of cytokines.

4. Detailed Description of the Invention

4.1. General

The invention is based in part upon the cloning and identification of certain
 10 mammalian htrbs genes and encoded htrbs proteins which function as inhibitors of particular stress kinase pathways. The htrbs genes are mammalian homologs of the *Drosophila* tribbles gene, which coordinates mitosis with morphogenesis and cell fate determination in fruit fly development (see Mata et al. (2000) Cell 101: 511-22; and Grosshans & Wieschaus (2000) Cell 101: 523-31). The invention provides a human
 15 homolog of the *Drosophila* tribbles gene which has been termed htrb-1, for human tribbles homologue-1. The htrb-1 gene is also known as the human SKIP1 gene and the nucleic acid sequence (SEQ ID NO. 1) and corresponding polypeptide sequence (SEQ ID NO. 2) are described in GenBank Accession NO. AF250310 and shown in Figure 10. SEQ ID NO. 1 nucleotides 282 to 1400 correspond to the ORF of the htrb-1 gene which encode the htrb-
 20 1 polypeptide (SEQ ID NO. 2). The htrb-1 gene inhibits basal but not induced activity of the cytokine responsive interleukin-1 (IL-8) gene reporter, which is responsive to both NF- κ B and AP-1 induction through binding sites for these transcriptional activators present in the IL-8 promoter. The htrb-1 gene of the invention specifically represses AP-1 but not NF- κ B or JAK/STAT mediated transcriptional induction. Therefore the htrb-1 gene of the
 25 invention provides a convenient and a specific tool for modulating stress kinase-induced pathways.

Mitogen Activated Protein Kinase cascades are activated by a wide variety of extracellular stimuli. However, the individual pathways respond differently in different cell
 30 types. This specificity is achieved partially by cell type specific expression of certain pathway components. The instant invention provides a family of mammalian tribbles homologs (htrbs) which influence the activity of MAPK pathways. Expression of these proteins is tightly regulated (Mayumi-Matsuda, K. et al. (1999) Biochemical and Biophysical Research Communications 258:260-64; Wilkin, F. et al. (1997) European

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Journal of Biochemistry 248:660-68). Overexpression of htrbs or suppression of endogenous levels leads to the inhibition of a stress kinase responsive reporter, suggesting that these proteins represent a rate-limiting component of MAPK pathways. The mechanism of htrb action involves control of phosphorylation of extracellular signal regulated kinases (ERKs), which is strongly potentiated by elevated htrb levels. In addition, optimal activation of ERK, JNK and p38 responsive reporters by upstream kinases is achieved in the presence of different amounts of htrb, suggesting that selective activation of individual MAPK pathways occurs by regulation of htrb expression. There is an increasing body of experimental evidence, supported by mathematical models, (Levchenko, A. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5818-23), to suggest, that regulation of the expression levels of scaffolding components is an effective way to limit the amplitude of signalling responses (e.g. Cacace, A.M. et al. (1999) Molecular and Cellular Biology 19:229-40; Yasuda, J. et al. (1999) Mol. Cell. Biol. 19:7245-54). Based on our observations we suggest a model where htrb proteins are scaffolds, regulating the dynamics of MAPK mediated cellular responses. The invention further provides htrb-2 and htrb-3 genes, which are 41% and 51% identical, respectively, to the htrb-1 gene. The htrb-3 gene is also known as the human SKIP3 gene and the nucleic acid sequence (SEQ ID NO. 3) and corresponding polypeptide sequence (SEQ ID NO. 4) are described in GenBank Accession NO. AF250311 and shown in Figure 11. Nucleotides 1 to 1083 of SEQ ID NO. 3 correspond to the ORF of htrb-3 and, accordingly, encode the htrb-3 polypeptide corresponding to SEQ ID No. 4. The invention still further provides methods of using these compositions to control inflammatory signaling.

The invention further provides methods for the cloning and identification of other genes that are components of an inflammatory signaling network. In preferred embodiments, this method includes screening of low-complexity pools of cDNA for genes which effect an increase or a decrease in the basal or induced levels of an interleukin gene reporter. In certain embodiments, the method of the invention involves expression screening for gene products which modulate the activity of a cytokine responsive reporter construct, such as an interleukin 8 (IL-8) reporter construct. Interleukin (IL)-8 is a C-X-C chemokine that plays an important role in acute inflammation through its G protein-coupled receptors CXCR1 and CXCR2. In particularly preferred embodiments, further components of the gene network are cloned and identified by an iterative process involving micro-array analysis with the interleukin regulatory genes thus identified. The goals of these methods

WO 02/053743

PCT/US02/00070

of biotechnological business include the identification of a broad array of drug targets for the control of autoimmune and inflammatory disease processes. A further goal includes the design of molecular agonists and antagonists which may act alone or in concert at any one or more points in the inflammatory gene network to effect control of an autoimmune or inflammatory disease process.

4.2. Definitions

For convenience, the meaning of certain terms and phrases employed in the specification, examples, and appended claims are provided below.

The term "aberrant activity", as applied to an activity of a polypeptide such as htrb, refers to an activity which differs from the activity of the wild-type or native polypeptide or which differs from the activity of the polypeptide in a healthy subject. An activity of a polypeptide can be aberrant because it is stronger than the activity of its native counterpart. Alternatively, an activity can be aberrant because it is weaker or absent relative to the activity of its native counterpart. An aberrant activity can also be a change in an activity. For example an aberrant polypeptide can interact with a different target peptide. A cell can have an aberrant htrb activity due to overexpression or underexpression of the gene encoding htrb.

The term "agonist", as used herein, is meant to refer to an agent that mimics or upregulates (e.g. potentiates or supplements) an htrb bioactivity. An htrb agonist can be a wild-type htrb protein or derivative thereof having at least one bioactivity of the wild-type htrb, e.g. an AP-1 activation inhibitory activity. An htrb therapeutic can also be a compound that upregulates expression of an htrb gene or which increases at least one bioactivity of an htrb protein. An agonist can also be a compound which increases the interaction of an htrb polypeptide with another molecule, e.g. an IL-1 type I or type II receptor. Such an agonist may, for example, increase the binding of htrb to a MAPK, thereby promoting an htrb-dependent blocking of a MAPK mediated inflammatory signal. Alternatively, an htrb agonist may increase the binding of htrb to an MAPK.

The term "allele", which is used interchangeably herein with "allelic variant" refers to alternative forms of a gene or portions thereof. Alleles occupy the same locus or position on homologous chromosomes. When a subject has two identical alleles of a gene, the subject is said to be homozygous for the gene or allele. When a subject has two different alleles of a gene, the subject is said to be heterozygous for the gene. Alleles of a specific gene can differ from each other in a single nucleotide, or several nucleotides, and can

WO 02/053743

PCT/US02/00070

include substitutions, deletions, and insertions of nucleotides. Frequently occurring sequence variations include transition mutations (i.e. purine to purine substitutions and pyrimidine to pyrimidine substitutions, e.g. A to G or C to T), transversion mutations (i.e. purine to pyrimidine and pyrimidine to purine substitutions, e.g. A to T or C to G), and alteration in repetitive DNA sequences (e.g. expansions and contractions of trinucleotide repeat and other tandem repeat sequences). An allele of a gene can also be a form of a gene containing a mutation. The term "allelic variant of a polymorphic region of an htrb gene" refers to a region of an htrb gene having one or several nucleotide sequences found in that region of the gene in other individuals.

10 "Antagonist" as used herein is meant to refer to an agent that downregulates (e.g. suppresses or inhibits) at least one htrb bioactivity. An htrb antagonist can be a compound which inhibits or decreases the interaction between an htrb protein and another molecule, e.g., a MAPK. An antagonist can also be a compound that down-regulates expression of an htrb gene or which reduces the amount of htrb protein present. The htrb antagonist can be a dominant negative form of an htrb polypeptide, e.g., a form of an htrb polypeptide which is capable of interacting with a target peptide. The htrb antagonist can also be a nucleic acid encoding a dominant negative form of an htrb polypeptide, an htrb antisense nucleic acid, or a ribozyme capable of interacting specifically with an htrb RNA. Yet other htrb antagonists are molecules which bind to an htrb polypeptide and inhibit its action. Such

15

20 molecules include peptides, e.g., forms of htrb target peptides which do not have biological activity, and which inhibit binding to htrb target molecules, such as an AP-1 transcription factor.

The term "antibody" as used herein is intended to include whole antibodies, e.g., of any isotype (IgG, IgA, IgM, IgE, etc), and includes fragments thereof which are also specifically reactive with a vertebrate, e.g., mammalian, protein. Antibodies can be fragmented using conventional techniques and the fragments screened for utility in the same manner as described above for whole antibodies. Thus, the term includes segments of proteolytically-cleaved or recombinantly-prepared portions of an antibody molecule that are capable of selectively reacting with a certain protein. Nonlimiting examples of such

25

30 proteolytic and/or recombinant fragments include Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, and single chain antibodies (scFv) containing a V[L] and/or V[H] domain joined by a peptide linker. The scFv's may be covalently or non-covalently linked to form antibodies having two or more

WO 02/053743

PCT/US02/00070

binding sites. The subject invention includes polyclonal, monoclonal, or other purified preparations of antibodies and recombinant antibodies.

A disease, disorder, or condition "associated with" or "characterized by" an aberrant expression of a nucleic acid refers to a disease, disorder, or condition in a subject which is caused by, contributed to by, or causative of an aberrant level of expression of a nucleic acid.

As used herein the term "bioactive fragment of an htrb polypeptide" refers to a fragment of a full-length htrb polypeptide, wherein the fragment specifically mimics or antagonizes the activity of a wild-type htrb polypeptide. The bioactive fragment preferably is a fragment capable of interacting with a MAPK.

"Biological activity" or "bioactivity" or "activity" or "biological function", which are used interchangeably, for the purposes herein means an effector or antigenic function that is directly or indirectly performed by an htrb polypeptide (whether in its native or denatured conformation), or by any subsequence thereof. Biological activities include binding to a target peptide, e.g., a MAPK, preferably an ERK. An htrb bioactivity can be modulated by directly affecting an htrb polypeptide. Alternatively, an htrb bioactivity can be modulated by modulating the level of an htrb polypeptide, such as by modulating expression of an htrb gene.

The term "biomarker" refers a biological molecule, e.g., a nucleic acid, peptide, hormone, etc., whose presence or concentration can be detected and correlated with a known condition, such as a disease state.

"Cells", "host cells" or "recombinant host cells" are terms used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

A "chimeric polypeptide" or "fusion polypeptide" is a fusion of a first amino acid sequence encoding one of the subject htrb polypeptides with a second amino acid sequence defining a domain (e.g. polypeptide portion) foreign to and not substantially homologous with any domain of an htrb polypeptide. A chimeric polypeptide may present a foreign domain which is found (albeit in a different polypeptide) in an organism which also expresses the first polypeptide, or it may be an "interspecies", "intergenic", etc. fusion of

WO 02/053743

PCT/US02/00070

polypeptide structures expressed by different kinds of organisms. In general, a fusion polypeptide can be represented by the general formula X-htrb-Y, wherein htrb represents a portion of the polypeptide which is derived from an htrb polypeptide, and X and Y are independently absent or represent amino acid sequences which are not related to an htrb sequence in an organism, including naturally occurring mutants.

A "delivery complex" shall mean a targeting means (e.g. a molecule that results in higher affinity binding of a gene, protein, polypeptide or peptide to a target cell surface and/or increased cellular or nuclear uptake by a target cell). Examples of targeting means include: sterols (e.g. cholesterol), lipids (e.g. a cationic lipid, virosome or liposome), viruses (e.g. adenovirus, adeno-associated virus, and retrovirus) or target cell specific binding agents (e.g. ligands recognized by target cell specific receptors). Preferred complexes are sufficiently stable in vivo to prevent significant uncoupling prior to internalization by the target cell. However, the complex is cleavable under appropriate conditions within the cell so that the gene, protein, polypeptide or peptide is released in a functional form.

As is well known, genes may exist in single or multiple copies within the genome of an individual. Such duplicate genes may be identical or may have certain modifications, including nucleotide substitutions, additions or deletions, which all still code for polypeptides having substantially the same activity. The term "DNA sequence encoding an htrb polypeptide" may thus refer to one or more genes within a particular individual. Moreover, certain differences in nucleotide sequences may exist between individual organisms, which are called alleles. Such allelic differences may or may not result in differences in amino acid sequence of the encoded polypeptide yet still encode a polypeptide with the same biological activity.

The term "equivalent" is understood to include nucleotide sequences encoding functionally equivalent polypeptides. Equivalent nucleotide sequences will include sequences that differ by one or more nucleotide substitutions, additions or deletions, such as allelic variants; and will, therefore, include sequences that differ from the nucleotide sequence of the nucleic acids shown in, for example, SEQ ID Nos. 1 and 3, due to the degeneracy of the genetic code.

The term "haplotype" as used herein is intended to refer to a set of alleles that are inherited together as a group (are in linkage disequilibrium) at statistically significant levels

WO 02/053743

PCT/US02/00070

($p_{\text{corr}} < 0.05$). As used herein, the phrase "an htrb haplotype" refers to a haplotype in the htrb loci which may include polymorphic variations of htrb gene sequences. .

"Homology" or "identity" or "similarity" refers to sequence similarity between two peptides or between two nucleic acid molecules. Homology can be determined by
 5 comparing a position in each sequence which may be aligned for purposes of comparison. When a position in the compared sequence is occupied by the same base or amino acid, then the molecules are identical at that position. A degree of homology or similarity or identity between nucleic acid sequences is a function of the number of identical or matching nucleotides at positions shared by the nucleic acid sequences. A degree of identity of
 10 amino acid sequences is a function of the number of identical amino acids at positions shared by the amino acid sequences. A degree of homology or similarity of amino acid sequences is a function of the number of amino acids, i.e. structurally related, at positions shared by the amino acid sequences. An "unrelated" or "non-homologous" sequence shares less than 40% identity, though preferably less than 25 % identity, with one of the htrb
 15 sequences of the present invention.

As used herein, the term "htrb" refers to a mammalian homolog of a *Drosophila* tribbles gene, or an equivalent thereof. As used herein, the term htrb is used interchangeably with the term "SKIP)" gene or protein, a second name for htrb based upon its stress kinase inhibitory activity (i.e. SKIP from Stress Kinase Inhibitor Protein, wherein
 20 htrb-1 is used interchangeably with SKIP-1). Further as used herein, the htrb-3 gene is also referred to as the SKIP-3 gene.

The term "htrb nucleic acid" refers to a nucleic acid encoding an htrb protein, such as nucleic acids having SEQ ID Nos. 1 or 3 or fragments thereof, a complement thereof, and derivatives thereof.

25 The terms "htrb polypeptide" and "htrb protein" are intended to encompass polypeptides comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID No. 1 or 3 et al. or fragments thereof, and homologs thereof and include agonist and antagonist polypeptides.

The term "htrb binding partner" or "htrb BP" refers to various cell proteins which bind to an htrb protein.

30 The term "htrb therapeutic" refers to various forms of htrb polypeptides, as well as peptidomimetics, nucleic acids, or small molecules, which can modulate at least one activity of an htrb polypeptide, e.g., interaction with an htrb receptor interaction with and/or an htrb coreceptor, by mimicking or potentiating (agonizing) or inhibiting (antagonizing)

WO 02/053743

PCT/US02/00070

the effects of a naturally-occurring htrb polypeptide. An htrb therapeutic which mimics or potentiates the activity of a wild-type htrb polypeptide is an "htrb agonist". Conversely, an htrb therapeutic which inhibits the activity of a wild-type htrb polypeptide is an "htrb antagonist".

5 "Increased risk" refers to a statistically higher frequency of occurrence of the disease or condition in an individual carrying a particular polymorphic allele in comparison to the frequency of occurrence of the disease or condition in a member of a population that does not carry the particular polymorphic allele.

The term "interact" as used herein is meant to include detectable relationships or
10 association (e.g. biochemical interactions) between molecules, such as interaction between protein-protein, protein-nucleic acid, nucleic acid-nucleic acid, and protein-small molecule or nucleic acid-small molecule in nature.

The term "isolated" as used herein with respect to nucleic acids, such as DNA or RNA, refers to molecules separated from other DNAs, or RNAs, respectively, that are
15 present in the natural source of the macromolecule. For example, an isolated nucleic acid encoding one of the subject htrb polypeptides preferably includes no more than 10 kilobases (kb) of nucleic acid sequence which naturally immediately flanks the htrb gene in genomic DNA, more preferably no more than 5kb of such naturally occurring flanking sequences, and most preferably less than 1.5kb of such naturally occurring flanking
20 sequence. The term isolated as used herein also refers to a nucleic acid or peptide that is substantially free of cellular material, viral material, or culture medium when produced by recombinant DNA techniques, or chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. Moreover, an "isolated nucleic acid" is meant to include nucleic acid fragments which are not naturally occurring as fragments and would not be found in the
25 natural state. The term "isolated" is also used herein to refer to polypeptides which are isolated from other cellular proteins and is meant to encompass both purified and recombinant polypeptides.

A "knock-in" transgenic animal refers to an animal that has had a modified gene introduced into its genome and the modified gene can be of exogenous or endogenous
30 origin.

A "knock-out" transgenic animal refers to an animal in which there is partial or complete suppression of the expression of an endogenous gene (e.g. based on deletion of at least a portion of the gene, replacement of at least a portion of the gene with a second

WO 02/053743

PCT/US02/00070

sequence, introduction of stop codons, the mutation of bases encoding critical amino acids, or the removal of an intron junction, etc.). In preferred embodiments, the "knock-out" gene locus corresponding to the modified endogenous gene no longer encodes a functional polypeptide activity and is said to be a "null" allele. Accordingly, knock-out transgenic animals of the present invention include those carrying one *htrb* gene null mutation, such as *htrb* null allele heterozygous animals, and those carrying two *htrb* gene null mutations, such as *htrb* null allele homozygous animals.

A "knock-out construct" refers to a nucleic acid sequence that can be used to decrease or suppress expression of a protein encoded by endogenous DNA sequences in a cell. In a simple example, the knock-out construct is comprised of a gene, such as the *htrb* gene, with a deletion in a critical portion of the gene so that active protein cannot be expressed therefrom. Alternatively, a number of termination codons can be added to the native gene to cause early termination of the protein or an intron junction can be inactivated. In a typical knock-out construct, some portion of the gene is replaced with a selectable marker (such as the *neo* gene) so that the gene can be represented as follows: *htrb* 5'/*neo*/*htrb* 3', where *htrb* 5' and *htrb* 3' refer to genomic or cDNA sequences which are, respectively, upstream and downstream relative to a portion of the *htrb* gene and where *neo* refers to a neomycin resistance gene. In another knock-out construct, a second selectable marker is added in a flanking position so that the gene can be represented as: *htrb* /*neo*/*htrb* /TK, where TK is a thymidine kinase gene which can be added to either the *htrb* 5' or the *htrb* 3' sequence of the preceding construct and which further can be selected against (i.e. is a negative selectable marker) in appropriate media. This two-marker construct allows the selection of homologous recombination events, which removes the flanking TK marker, from non-homologous recombination events which typically retain the TK sequences. The gene deletion and/or replacement can be from the exons, introns, especially intron junctions, and/or the regulatory regions such as promoters.

"Linkage disequilibrium" refers to co-inheritance of two alleles at frequencies greater than would be expected from the separate frequencies of occurrence of each allele in a given control population. The expected frequency of occurrence of two alleles that are inherited independently is the frequency of the first allele multiplied by the frequency of the second allele. Alleles that co-occur at expected frequencies are said to be in "linkage equilibrium". The cause of linkage disequilibrium is often unclear. It can be due to selection for certain allele combinations or to recent admixture of genetically heterogeneous

WO 02/053743

PCT/US02/00070

populations. In addition, in the case of markers that are very tightly linked to a disease gene, an association of an allele (or group of linked alleles) with the disease gene is expected if the disease mutation occurred in the recent past, so that sufficient time has not elapsed for equilibrium to be achieved through recombination events in the specific chromosomal region. When referring to allelic patterns that are comprised of more than one allele, a first allelic pattern is in linkage disequilibrium with a second allelic pattern if all the alleles that comprise the first allelic pattern are in linkage disequilibrium with at least one of the alleles of the second allelic pattern. An example of linkage disequilibrium is that which occurs between the alleles at the IL-1RN (+2018) and IL-1RN (VNTR) polymorphic sites. The two alleles at IL-1RN (+2018) are 100% in linkage disequilibrium with the two most frequent alleles of IL-1RN (VNTR), which are allele 1 and allele 2.

The term "marker" refers to a sequence in the genome that is known to vary among individuals. For example, the IL-1RN gene has a marker that consists of a variable number of tandem repeats (VNTR).

The term "modulation" as used herein refers to both upregulation (i.e., activation or stimulation (e.g., by agonizing or potentiating)) and downregulation (i.e. inhibition or suppression (e.g., by antagonizing, decreasing or inhibiting)).

The term "mutated gene" refers to an allelic form of a gene, which is capable of altering the phenotype of a subject having the mutated gene relative to a subject which does not have the mutated gene. If a subject must be homozygous for this mutation to have an altered phenotype, the mutation is said to be recessive. If one copy of the mutated gene is sufficient to alter the genotype of the subject, the mutation is said to be dominant. If a subject has one copy of the mutated gene and has a phenotype that is intermediate between that of a homozygous and that of a heterozygous subject (for that gene), the mutation is said to be co-dominant.

The "non-human animals" of the invention include mammals such as rodents, non-human primates, sheep, dog, cow, chickens, amphibians, reptiles, etc. Preferred non-human animals are selected from the rodent family including rat and mouse, most preferably mouse, though transgenic amphibians, such as members of the *Xenopus* genus, and transgenic chickens can also provide important tools for understanding and identifying agents which can affect, for example, embryogenesis and tissue formation. The term "chimeric animal" is used herein to refer to animals in which the recombinant gene is found, or in which the recombinant gene is expressed in some but not all cells of the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

animal. The term "tissue-specific chimeric animal" indicates that one of the recombinant htrb genes is present and/or expressed or disrupted in some tissues but not others.

As used herein, the term "nucleic acid" refers to polynucleotides or oligonucleotides such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA).

- 5 The term should also be understood to include, as equivalents, analogs of either RNA or DNA made from nucleotide analogs and as applicable to the embodiment being described, single (sense or antisense) and double-stranded polynucleotides.

- The term "nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. x" refers to the nucleotide sequence of the complementary strand of a
10 nucleic acid strand having SEQ ID No. x. The term "complementary strand" is used herein interchangeably with the term "complement". The complement of a nucleic acid strand can be the complement of a coding strand or the complement of a non-coding strand. When referring to double stranded nucleic acids, the complement of a nucleic acid having SEQ ID No. x refers to the complementary strand of the strand having SEQ ID No. x or to any
15 nucleic acid having the nucleotide sequence of the complementary strand of SEQ ID No. x. When referring to a single stranded nucleic acid having the nucleotide sequence SEQ ID No. x, the complement of this nucleic acid is a nucleic acid having a nucleotide sequence which is complementary to that of SEQ ID No. x. The nucleotide sequences and complementary sequences thereof are always given in the 5' to 3' direction.

- 20 The term "percent identical" refers to sequence identity between two amino acid sequences or between two nucleotide sequences. Identity can each be determined by comparing a position in each sequence which may be aligned for purposes of comparison. When an equivalent position in the compared sequences is occupied by the same base or amino acid, then the molecules are identical at that position; when the equivalent site
25 occupied by the same or a similar amino acid residue (e.g., similar in steric and/or electronic nature), then the molecules can be referred to as homologous (similar) at that position. Expression as a percentage of homology, similarity, or identity refers to a function of the number of identical or similar amino acids at positions shared by the compared sequences. Expression as a percentage of homology, similarity, or identity refers to a
30 function of the number of identical or similar amino acids at positions shared by the compared sequences. Various alignment algorithms and/or programs may be used, including FASTA, BLAST, or ENTREZ. FASTA and BLAST are available as a part of the GCG sequence analysis package (University of Wisconsin, Madison, Wis.), and can be

WO 02/053743

PCT/US02/00070

used with, e.g., default settings. ENTREZ is available through the National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. In one embodiment, the percent identity of two sequences can be determined by the GCG program with a gap weight of 1, e.g., each amino acid gap is weighted as if it were a single amino acid or nucleotide mismatch between the two sequences.

Other techniques for alignment are described in Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA. Preferably, an alignment program that permits gaps in the sequence is utilized to align the sequences. The Smith-Waterman is one type of algorithm that permits gaps in sequence alignments. See Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997). Also, the GAP program using the Needleman and Wunsch alignment method can be utilized to align sequences. An alternative search strategy uses MPSRCH software, which runs on a MASPAR computer. MPSRCH uses a Smith-Waterman algorithm to score sequences on a massively parallel computer. This approach improves ability to pick up distantly related matches, and is especially tolerant of small gaps and nucleotide sequence errors. Nucleic acid-encoded amino acid sequences can be used to search both protein and DNA databases.

Databases with individual sequences are described in Methods in Enzymology, ed. Doolittle, supra. Databases include Genbank, EMBL, and DNA Database of Japan (DDBJ). Preferred nucleic acids have a sequence at least 70%, and more preferably 80% identical and more preferably 90% and even more preferably at least 95% identical to a nucleic acid sequence of a sequence shown in one of SEQ ID Nos. of the invention. Nucleic acids at least 90%, more preferably 95%, and most preferably at least about 98-99% identical with a nucleic sequence represented in one of SEQ ID Nos: 1-2 are of course also within the scope of the invention. In preferred embodiments, the nucleic acid is mammalian. In comparing a new nucleic acid with known sequences, several alignment tools are available. Examples include PileUp, which creates a multiple sequence alignment, and is described in Feng et al., J. Mol. Evol. (1987) 25:351-360. Another method, GAP, uses the alignment method of Needleman et al., J. Mol. Biol. (1970) 48:443-453. GAP is best suited for global alignment of sequences. A third method, BestFit, functions by inserting gaps to maximize the number of matches using the local homology algorithm of Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

The term "polymorphism" refers to the coexistence of more than one form of a gene or portion (e.g., allelic variant) thereof. A portion of a gene of which there are at least two different forms, i.e., two different nucleotide sequences, is referred to as a "polymorphic region of a gene". A polymorphic region can be a single nucleotide, the identity of which differs in different alleles. A polymorphic region can also be several nucleotides long.

A "polymorphic gene" refers to a gene having at least one polymorphic region.

As used herein, the term "promoter" means a DNA sequence that regulates expression of a selected DNA sequence operably linked to the promoter, and which effects expression of the selected DNA sequence in cells. The term encompasses "tissue specific" promoters, i.e. promoters, which effect expression of the selected DNA sequence only in specific cells (e.g. cells of a specific tissue). The term also covers so-called "leaky" promoters, which regulate expression of a selected DNA primarily in one tissue, but cause expression in other tissues as well. The term also encompasses non-tissue specific promoters and promoters that constitutively express or that are inducible (i.e. expression levels can be controlled).

The term "propensity to disease," also "predisposition" or "susceptibility" to disease or any similar phrase, means that certain htrb locus polymorphic alleles are hereby discovered to be associated with or predictive of a particular disease. The alleles are thus over-represented in frequency in individuals with disease as compared to healthy individuals. Thus, these alleles can be used to predict disease even in pre-symptomatic or pre-diseased individuals.

The terms "protein", "polypeptide" and "peptide" are used interchangeably herein when referring to a gene product.

The term "recombinant protein" refers to a polypeptide of the present invention which is produced by recombinant DNA techniques, wherein generally, DNA encoding an htrb polypeptide is inserted into a suitable expression vector which is in turn used to transform a host cell to produce the heterologous protein. Moreover, the phrase "derived from", with respect to a recombinant htrb gene, is meant to include within the meaning of "recombinant protein" those proteins having an amino acid sequence of a native htrb polypeptide, or an amino acid sequence similar thereto which is generated by mutations including substitutions and deletions (including truncation) of a naturally occurring form of the polypeptide.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

“Small molecule” as used herein, is meant to refer to a composition, which has a molecular weight of less than about 5 kD and most preferably less than about 4 kD. Small molecules can be nucleic acids, peptides, polypeptides, peptidomimetics, carbohydrates, lipids or other organic (carbon containing) or inorganic molecules. Many pharmaceutical
5 companies have extensive libraries of chemical and/or biological mixtures, often fungal, bacterial, or algal extracts, which can be screened with any of the assays of the invention to identify compounds that modulate an htrb bioactivity.

As used herein, the term “specifically hybridizes” or “specifically detects” refers to the ability of a nucleic acid molecule of the invention to hybridize to at least approximately
10 6, 12, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 350, 400 or 425 consecutive nucleotides of a vertebrate, preferably an htrb gene.

“Transcriptional regulatory sequence” is a generic term used throughout the specification to refer to DNA sequences, such as initiation signals, enhancers, and promoters, which induce or control transcription of protein coding sequences with which
15 they are operably linked. In preferred embodiments, transcription of one of the htrb genes is under the control of a promoter sequence (or other transcriptional regulatory sequence) which controls the expression of the recombinant gene in a cell-type in which expression is intended. It will also be understood that the recombinant gene can be under the control of transcriptional regulatory sequences which are the same or which are different from those
20 sequences which control transcription of the naturally-occurring forms of htrb polypeptide.

As used herein, the term “transfection” means the introduction of a nucleic acid, e.g., via an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer. “Transformation”, as used herein, refers to a process in which a cell’s genotype is changed as a result of the cellular uptake of exogenous DNA or RNA, and, for example, the
25 transformed cell expresses a recombinant form of an htrb polypeptide or, in the case of anti-sense expression from the transferred gene, the expression of a naturally-occurring form of the htrb polypeptide is disrupted.

As used herein, the term “transgene” means a nucleic acid sequence (encoding, e.g., one of the htrb polypeptides, or an antisense transcript thereto) which has been introduced
30 into a cell. A transgene could be partly or entirely heterologous, i.e., foreign, to the transgenic animal or cell into which it is introduced, or, is homologous to an endogenous gene of the transgenic animal or cell into which it is introduced, but which is designed to be inserted, or is inserted, into the animal’s genome in such a way as to alter the genome of the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

cell into which it is inserted (e.g., it is inserted at a location which differs from that of the natural gene or its insertion results in a knockout). A transgene can also be present in a cell in the form of an episome. A transgene can include one or more transcriptional regulatory sequences and any other nucleic acid, such as introns, that may be necessary for optimal expression of a selected nucleic acid.

A "transgenic animal" refers to any animal, preferably a non-human mammal, bird or an amphibian, in which one or more of the cells of the animal contain heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. This molecule may be integrated within a chromosome, or it may be extrachromosomally replicating DNA. In the typical transgenic animals described herein, the transgene causes cells to express a recombinant form of one of the htrb polypeptides, e.g. either agonistic or antagonistic forms. However, transgenic animals in which the recombinant htrb gene is silent are also contemplated, as for example, the FLP or CRE recombinase dependent constructs described below. Moreover, "transgenic animal" also includes those recombinant animals in which gene disruption of one or more htrb genes is caused by human intervention, including both recombination and antisense techniques.

The term "treating" as used herein is intended to encompass curing as well as ameliorating at least one symptom of the condition or disease.

The term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of preferred vector is an episome, i.e., a nucleic acid capable of extra-chromosomal replication. Preferred vectors are those capable of autonomous replication and/or expression of nucleic acids to which they are linked. Vectors capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of "plasmids" which refer generally to circular double stranded DNA loops which, in their vector form are not bound to the chromosome. In the present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is

WO 02/053743

PCT/US02/00070

intended to include such other forms of expression vectors which serve equivalent functions and which become known in the art subsequently hereto.

The term "wild-type allele" refers to an allele of a gene which, when present in two copies in a subject results in a wild-type phenotype. There can be several different wild-type alleles of a specific gene, since certain nucleotide changes in a gene may not affect the phenotype of a subject having two copies of the gene with the nucleotide changes.

4.3. Nucleic Acids of the Present Invention

The invention provides htrb nucleic acids, homologs thereof, and portions thereof. Preferred nucleic acids have a sequence at least about 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, and more preferably 85% homologous and more preferably 90% and more preferably 95% and even more preferably at least 99% homologous with a nucleotide sequence of an htrb gene, e.g., such as a sequence shown in one of SEQ ID Nos: 1 or 3 or complement thereof of the htrb nucleic acids having the GenBank Accession Nos.: htrb-1 (AF250310) and htrb-3 (AF250311). Nucleic acids at least 90%, more preferably 95%, and most preferably at least about 98-99% identical with a nucleic sequence represented in one of SEQ ID Nos. 1 or 3 or complement thereof are of course also within the scope of the invention. In preferred embodiments, the nucleic acid is mammalian and in particularly preferred embodiments, includes all or a portion of the nucleotide sequence corresponding to the coding region of the nucleic acid set forth in SEQ ID No. 1 or 3 which correspond to the htrb-1 and htrb-3 ORF respectively.

The invention further provides an evolutionarily conserved nucleic acid sequence found in the 3' UTR (untranslated region) of the htrb transcript encoded by both mammalian homologs of the htrb gene, which is described in further detail in the examples which follow.

The invention also pertains to isolated nucleic acids comprising a nucleotide sequence encoding htrb polypeptides, variants and/or equivalents of such nucleic acids. The term equivalent is understood to include nucleotide sequences encoding functionally equivalent htrb polypeptides or functionally equivalent peptides having an activity of an htrb protein such as described herein. Equivalent nucleotide sequences will include sequences that differ by one or more nucleotide substitution, addition or deletion, such as allelic variants; and will, therefore, include sequences that differ from the nucleotide

WO 02/053743

PCT/US02/00070

sequence of the htrb gene shown in SEQ ID Nos. 1, 2, 3, or 4 due to the degeneracy of the genetic code.

Preferred nucleic acids are vertebrate htrb nucleic acids. Particularly preferred vertebrate htrb nucleic acids are mammalian. Regardless of species, particularly preferred htrb nucleic acids encode polypeptides that are at least 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, or 95% similar or identical to an amino acid sequence of a vertebrate htrb protein. In one embodiment, the nucleic acid is a cDNA encoding a polypeptide having at least one bio-activity of the subject htrb polypeptide. Preferably, the nucleic acid includes all or a portion of the nucleotide sequence corresponding to the nucleic acid of SEQ ID Nos. 1 or 3.

Still other preferred nucleic acids of the present invention encode an htrb polypeptide which is comprised of at least 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150 or 200 amino acid residues. For example, such nucleic acids can comprise about 50, 60, 70, 80, 90, or 100 base pairs. Also within the scope of the invention are nucleic acid molecules for use as probes/primer or antisense molecules (i.e. noncoding nucleic acid molecules), which can comprise at least about 6, 12, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 or 100 base pairs in length.

Another aspect of the invention provides a nucleic acid which hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid represented by SEQ ID Nos. 1 or 3 or complement thereof or the nucleic acids having ATCC Designation No. XXXXXX or No. XXXXXX. Appropriate stringency conditions which promote DNA hybridization, for example, 6.0 x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45° C, followed by a wash of 2.0 x SSC at 50°C, are known to those skilled in the art or can be found in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 or in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989). For example, the salt concentration in the wash step can be selected from a low stringency of about 2.0 x SSC at 50°C to a high stringency of about 0.2 x SSC at 50°C. In addition, the temperature in the wash step can be increased from low stringency conditions at room temperature, about 22°C, to high stringency conditions at about 65°C. Both temperature and salt may be varied, or temperature and salt concentration may be held constant while the other variable is changed. In a preferred embodiment, an htrb nucleic acid of the present invention will bind to one of SEQ ID Nos. 1 or 3 or complement thereof under moderately stringent conditions, for example at about 2.0 x SSC and about 40° C. In a particularly preferred embodiment, an htrb nucleic acid of the present invention will bind to one of SEQ ID Nos.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

1 or 3 or complement thereof under high stringency conditions. In another particularly preferred embodiment, an htrb nucleic acid sequence of the present invention will bind to a portion of one of SEQ ID Nos. 1 or 3 that corresponds to the htrb ORF nucleic acid sequences, under high stringency conditions.

- 5 Nucleic acids having a sequence that differs from the nucleotide sequences shown in one of SEQ ID Nos. 1 or 3 of the invention or complement thereof due to degeneracy in the genetic code are also within the scope of the invention. Such nucleic acids encode functionally equivalent peptides (i.e., peptides having a biological activity of an htrb polypeptide) but differ in sequence from the sequence shown in the sequence listing due to
 10 degeneracy in the genetic code. For example, a number of amino acids are designated by more than one triplet. Codons that specify the same amino acid, or synonyms (for example, CAU and CAC each encode histidine) may result in "silent" mutations which do not affect the amino acid sequence of an htrb polypeptide. However, it is expected that DNA
 15 sequence polymorphisms that do lead to changes in the amino acid sequences of the subject htrb polypeptides will exist among mammals. One skilled in the art will appreciate that these variations in one or more nucleotides (e.g., up to about 3-5% of the nucleotides) of the nucleic acids encoding polypeptides having an activity of an htrb polypeptide may exist among individuals of a given species due to natural allelic variation.

4.3.1 Probes and Primers

- 20 The nucleotide sequences determined from the cloning of htrb genes from mammalian organisms will further allow for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning other htrb homologs in other cell types, e.g., from other tissues, as well as htrb homologs from other mammalian organisms. For instance, the present invention also provides a probe/primer comprising a substantially purified
 25 oligonucleotide, which oligonucleotide comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least approximately 12, preferably 25, more preferably 40, 50 or 75 consecutive nucleotides of sense or anti-sense sequence selected from SEQ ID Nos. 1 or 3 of the invention. For instance, primers based on the nucleic acid represented in SEQ ID Nos. 1 or 3 can be used in PCR reactions to clone htrb polypeptide
 30 encoding genes.

In preferred embodiments, the htrb primers are designed so as to optimize specificity and avoid secondary structures which affect the efficiency of priming. Optimized PCR primers of the present invention are designed so that "upstream" and

WO 02/053743

PCT/US02/00070

"downstream" primers have approximately equal melting temperatures such as can be estimated using the formulae: $T_m = 81.5 - C - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\%\text{formamide}) - (600/\text{length})$; or $T_m(C) = 2(A/T) + 4(G/C)$. Optimized htrb primers may also be designed by using various programs, such as "Primer3" provided by the Whitehead

- 5 Institute for Biomedical Research at <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>.

- In preferred embodiments, the htrb probes and primers can be used to detect htrb locus polymorphisms which occur within and surrounding the htrb gene sequence. Genetic variations within the htrb locus may be associated with the likelihood of the development of a number of human diseases and conditions, such as inflammatory and autoimmune diseases in which htrb encoded polypeptides play an important etiological role. Accordingly the invention provides probes and primers for htrb locus polymorphisms, including polymorphisms associated with the human and mouse htrb gene. PCR primers of the invention include those which flank an htrb human polymorphism and allow
- 10 amplification and analysis of this region of the genome. Analysis of polymorphic allele identity may be conducted, for example, by direct sequencing or by the use of allele-specific capture probes or by the use of molecular beacon probes. Alternatively, the polymorphic allele may allow for direct detection by the creation or elimination of a restriction endonuclease recognition site(s) within the PCR product or after an appropriate
- 15 sequence modification is designed into at least one of the primers such that the altered sequence of the primer, when incorporated into the PCR product resulting from amplification of a specific htrb polymorphic allele, creates a unique restriction site in combination with at least one allele but not with at least one other allele of that polymorphism. htrb polymorphisms corresponding to variable number of tandem repeat
- 20 (VNTR) polymorphisms may be detected by the electrophoretic mobility and hence size of a PCR product obtained using primers which flank the VNTR. Still other htrb polymorphisms corresponding to restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) may be detected directly by the mobility of bands on a Southern blot using appropriate htrb locus probes and genomic DNA or cDNA obtained from an appropriate sample organism
- 25 such as a human or a non-human animal.
- 30

Likewise, probes based on the subject htrb sequences can be used to detect transcripts or genomic sequences encoding the same or homologous proteins, for use, e.g., in prognostic or diagnostic assays (further described below). The invention provides probes

WO 02/053743

PCT/US02/00070

which are common to alternatively spliced variants of the htrb transcript, such as those corresponding to at least 12 consecutive nucleotides complementary to a sequence found in any of SEQ ID Nos.1 or 3 of the invention. In addition, the invention provides probes which hybridize specifically to alternatively spliced forms of the htrb transcript. Probes and
 5 primers can be prepared and modified, e.g., as previously described herein for other types of nucleic acids.

4.3.2 Antisense, Ribozyme and Triplex techniques

Another aspect of the invention relates to the use of the isolated nucleic acid in "antisense" therapy. As used herein, "antisense" therapy refers to administration or in situ
 10 generation of oligonucleotide molecules or their derivatives which specifically hybridize (e.g., bind) under cellular conditions, with the cellular mRNA and/or genomic DNA encoding one or more of the subject htrb proteins so as to inhibit expression of that protein, e.g., by inhibiting transcription and/or translation. The binding may be by conventional base pair complementarity, or, for example, in the case of binding to DNA duplexes,
 15 through specific interactions in the major groove of the double helix. In general, "antisense" therapy refers to the range of techniques generally employed in the art, and includes any therapy which relies on specific binding to oligonucleotide sequences.

An antisense construct of the present invention can be delivered, for example, as an expression plasmid which, when transcribed in the cell, produces RNA which is
 20 complementary to at least a unique portion of the cellular mRNA which encodes an htrb protein. Alternatively, the antisense construct is an oligonucleotide probe which is generated ex vivo and which, when introduced into the cell causes inhibition of expression by hybridizing with the mRNA and/or genomic sequences of an htrb gene. Such oligonucleotide probes are preferably modified oligonucleotides which are resistant to
 25 endogenous nucleases, e.g., exonucleases and/or endonucleases, and are therefore stable in vivo. Exemplary nucleic acid molecules for use as antisense oligonucleotides are phosphoramidate, phosphothioate and methylphosphonate analogs of DNA (see also U.S. Patents 5,176,996; 5,264,564; and 5,256,775). Additionally, general approaches to constructing oligomers useful in antisense therapy have been reviewed, for example, by
 30 Van der Krol et al. (1988) BioTechniques 6:958-976; and Stein et al. (1988) Cancer Res 48:2659-2668. With respect to antisense DNA, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation initiation site, e.g., between the -10 and +10 regions of the htrb nucleotide sequence of interest, are preferred.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Antisense approaches involve the design of oligonucleotides (either DNA or RNA) that are complementary to htrb mRNA. The antisense oligonucleotides will bind to the htrb mRNA transcripts and prevent translation. Absolute complementarity, although preferred, is not required. In the case of double-stranded antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with an RNA it may contain and still form a stable duplex (or triplex, as the case may be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

Oligonucleotides that are complementary to the 5' end of the mRNA, e.g., the 5' untranslated sequence up to and including the AUG initiation codon, should work most efficiently at inhibiting translation. However, sequences complementary to the 3' untranslated sequences of mRNAs have recently been shown to be effective at inhibiting translation of mRNAs as well. (Wagner, R. 1994. Nature 372:333). Therefore, oligonucleotides complementary to either the 5' or 3' untranslated, non-coding regions of an htrb gene could be used in an antisense approach to inhibit translation of endogenous htrb mRNA. Oligonucleotides complementary to the 5' untranslated region of the mRNA should include the complement of the AUG start codon. Antisense oligonucleotides complementary to mRNA coding regions are less efficient inhibitors of translation but could also be used in accordance with the invention. Whether designed to hybridize to the 5', 3' or coding region of htrb mRNA, antisense nucleic acids should be at least six nucleotides in length, and are preferably less than about 100 and more preferably less than about 50, 25, 17 or 10 nucleotides in length.

Regardless of the choice of target sequence, it is preferred that in vitro studies are first performed to quantitate the ability of the antisense oligonucleotide to inhibit gene expression. It is preferred that these studies utilize controls that distinguish between antisense gene inhibition and nonspecific biological effects of oligonucleotides. It is also preferred that these studies compare levels of the target RNA or protein with that of an internal control RNA or protein. Additionally, it is envisioned that results obtained using the antisense oligonucleotide are compared with those obtained using a control oligonucleotide. It is preferred that the control oligonucleotide is of approximately the same length as the test oligonucleotide and that the nucleotide sequence of the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

oligonucleotide differs from the antisense sequence no more than is necessary to prevent specific hybridization to the target sequence.

The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810, published December 15, 1988) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. W089/10134, published April 25, 1988), hybridization-triggered cleavage agents. (See, e.g., Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents. (See, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, hybridization-triggered cleavage agent, etc.

The antisense oligonucleotide may comprise at least one modified base moiety which is selected from the group including but not limited to 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxyethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine.

The antisense oligonucleotide may also comprise at least one modified sugar moiety selected from the group including but not limited to arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose.

The antisense oligonucleotide can also contain a neutral peptide-like backbone. Such molecules are termed peptide nucleic acid (PNA)-oligomers and are described, e.g., in

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670 and in Eglom et al. (1993) Nature 365:566. One advantage of PNA oligomers is their ability to bind to complementary DNA essentially independently from the ionic strength of the medium due to the neutral backbone of the DNA. In yet another embodiment, the antisense

5 oligonucleotide comprises at least one modified phosphate backbone selected from the group consisting of a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, and a formacetal or analog thereof.

In yet a further embodiment, the antisense oligonucleotide is an α -anomeric

10 oligonucleotide. An α -anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual β -units, the strands run parallel to each other (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641). The oligonucleotide is a 2'-O-methylribonucleotide (Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

15 Oligonucleotides of the invention may be synthesized by standard methods known in the art, e.g., by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein et al. (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore

20 glass polymer supports (Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.

While antisense nucleotides complementary to the htrb coding region sequence can be used, those complementary to the transcribed untranslated region and to the region comprising the initiating methionine are most preferred.

25 The antisense molecules can be delivered to cells which express htrb in vivo. A number of methods have been developed for delivering antisense DNA or RNA to cells; e.g., antisense molecules can be injected directly into the tissue site, or modified antisense molecules, designed to target the desired cells (e.g., antisense linked to peptides or antibodies that specifically bind receptors or antigens expressed on the target cell surface)

30 can be administered systematically.

However, it may be difficult to achieve intracellular concentrations of the antisense sufficient to suppress translation on endogenous mRNAs in certain instances. Therefore a preferred approach utilizes a recombinant DNA construct in which the antisense

WO 02/053743

PCT/US02/00070

oligonucleotide is placed under the control of a strong pol III or pol II promoter. The use of such a construct to transfect target cells in the patient will result in the transcription of sufficient amounts of single stranded RNAs that will form complementary base pairs with the endogenous htrb transcripts and thereby prevent translation of the htrb mRNA. For example, a vector can be introduced in vivo such that it is taken up by a cell and directs the transcription of an antisense RNA. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells. Expression of the sequence encoding the antisense RNA can be by any promoter known in the art to act in mammalian, preferably human cells. Such promoters can be inducible or constitutive and can include but not be limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al, 1982, Nature 296:39-42), etc. Any type of plasmid, cosmid, YAC or viral vector can be used to prepare the recombinant DNA construct which can be introduced directly into the tissue site. Alternatively, viral vectors can be used which selectively infect the desired tissue, in which case administration may be accomplished by another route (e.g., systematically).

Ribozyme molecules designed to catalytically cleave htrb mRNA transcripts can also be used to prevent translation of htrb mRNA and expression of htrb (See, e.g., PCT International Publication WO90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225 and U.S. Patent No. 5,093,246). While ribozymes that cleave mRNA at site specific recognition sequences can be used to destroy htrb mRNAs, the use of hammerhead ribozymes is preferred. Hammerhead ribozymes cleave mRNAs at locations dictated by flanking regions that form complementary base pairs with the target mRNA. The sole requirement is that the target mRNA have the following sequence of two bases: 5'-UG-3'. The construction and production of hammerhead ribozymes is well known in the art and is described more fully in Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591. For example, there are a number of potential hammerhead ribozyme cleavage sites within the nucleotide sequence of human htrb-1 and htrb-3. Preferably the ribozyme is engineered so

WO 02/053743

PCT/US02/00070

that the cleavage recognition site is located near the 5' end of the htrb mRNA; i.e., to increase efficiency and minimize the intracellular accumulation of non-functional mRNA transcripts.

The ribozymes of the present invention also include RNA endoribonucleases (hereinafter "Cech-type ribozymes") such as the one which occurs naturally in *Tetrahymena thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and which has been extensively described by Thomas Cech and collaborators (Zaug, et al., 1984, *Science*, 224:574-578; Zaug and Cech, 1986, *Science*, 231:470-475; Zaug, et al., 1986, *Nature*, 324:429-433; published International patent application No. WO88/04300 by University Patents Inc.; Been and Cech, 1986, *Cell*, 47:207-216). The Cech-type ribozymes have an eight base pair active site which hybridizes to a target RNA sequence whereafter cleavage of the target RNA takes place. The invention encompasses those Cech-type ribozymes which target eight base-pair active site sequences that are present in an htrb gene.

As in the antisense approach, the ribozymes can be composed of modified oligonucleotides (e.g., for improved stability, targeting, etc.) and should be delivered to cells which express the htrb gene in vivo. A preferred method of delivery involves using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong constitutive pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient quantities of the ribozyme to destroy endogenous htrb messages and inhibit translation. Because ribozymes unlike antisense molecules, are catalytic, a lower intracellular concentration is required for efficiency.

Endogenous htrb gene expression can also be reduced by inactivating or "knocking out" the htrb gene or its promoter using targeted homologous recombination. (E.g., see Smithies et al., 1985, *Nature* 317:230-234; Thomas & Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-512; Thompson et al., 1989 *Cell* 5:313-321; each of which is incorporated by reference herein in its entirety). For example, a mutant, non-functional htrb (or a completely unrelated DNA sequence) flanked by DNA homologous to the endogenous htrb gene (either the coding regions or regulatory regions of the htrb gene) can be used, with or without a selectable marker and/or a negative selectable marker, to transfect cells that express htrb in vivo. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous recombination, results in inactivation of the htrb gene. Such approaches are particularly suited in the agricultural field where modifications to ES (embryonic stem) cells can be used to generate animal offspring with an inactive htrb (e.g., see Thomas & Capecchi 1987 and Thompson 1989,

WO 02/053743

PCT/US02/00070

supra). However this approach can be adapted for use in humans provided the recombinant DNA constructs are directly administered or targeted to the required site in vivo using appropriate viral vectors.

- Alternatively, endogenous htrb gene expression can be reduced by targeting
- 5 deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the htrb gene (i.e., the htrb promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the htrb gene in target cells in the body. (See generally, Helene, C. 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6):569-84; Helene, C., et al., 1992, *Am. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27-36; and Maher, L.J., 1992, *Bioassays* 14(12):807-15).
- 10 Nucleic acid molecules to be used in triple helix formation for the inhibition of transcription are preferably single stranded and composed of deoxyribonucleotides. The base composition of these oligonucleotides should promote triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizable stretches of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex. Nucleotide sequences may be
- 15 pyrimidine-based, which will result in TAT and CGC triplets across the three associated strands of the resulting triple helix. The pyrimidine-rich molecules provide base complementarity to a purine-rich region of a single strand of the duplex in a parallel orientation to that strand. In addition, nucleic acid molecules may be chosen that are purine-rich, for example, containing a stretch of G residues. These molecules will form a
- 20 triple helix with a DNA duplex that is rich in GC pairs, in which the majority of the purine residues are located on a single strand of the targeted duplex, resulting in CGC triplets across the three strands in the triplex.

- Alternatively, the potential sequences that can be targeted for triple helix formation may be increased by creating a so called "switchback" nucleic acid molecule. Switchback
- 25 molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner, such that they base pair with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex.

- Antisense RNA and DNA, ribozyme, and triple helix molecules of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA
- 30 molecules. These include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides well known in the art such as for example solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by in vitro and in vivo transcription of DNA sequences encoding the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors which incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

Moreover, various well-known modifications to nucleic acid molecules may be introduced as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include but are not limited to the addition of flanking sequences of ribonucleotides or deoxyribonucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the oligodeoxyribonucleotide backbone.

4.3.3. Vectors Encoding htrb Proteins and htrb Expressing Cells

The invention further provides plasmids and vectors encoding an htrb protein, which can be used to express an htrb protein in a host cell. The host cell may be any prokaryotic or eukaryotic cell. Thus, a nucleotide sequence derived from the cloning of mammalian htrb proteins, encoding all or a selected portion of the full-length protein, can be used to produce a recombinant form of an htrb polypeptide via microbial or eukaryotic cellular processes. Ligating the polynucleotide sequence into a gene construct, such as an expression vector, and transforming or transfecting into hosts, either eukaryotic (yeast, avian, insect or mammalian) or prokaryotic (bacterial) cells, are standard procedures well known in the art.

Vectors that allow expression of a nucleic acid in a cell are referred to as expression vectors. Typically, expression vectors used for expressing an htrb protein contain a nucleic acid encoding an htrb polypeptide, operably linked to at least one transcriptional regulatory sequence. Regulatory sequences are art-recognized and are selected to direct expression of the subject htrb proteins. Transcriptional regulatory sequences are described in Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). In one embodiment, the expression vector includes a recombinant gene encoding a peptide having an agonistic activity of a subject htrb polypeptide, or alternatively, encoding a peptide which is an antagonistic form of an htrb protein.

Suitable vectors for the expression of an htrb polypeptide include plasmids of the types: pBR322-derived plasmids, pEMBL-derived plasmids, pEX-derived plasmids,

WO 02/053743

PCT/US02/00070

pBTac-derived plasmids and pUC-derived plasmids for expression in prokaryotic cells, such as *E. coli*.

A number of vectors exist for the expression of recombinant proteins in yeast. For instance, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2, and YRP17 are cloning and expression vehicles useful in the introduction of genetic constructs into *S. cerevisiae* (see, for example, Broach et al. (1983) in *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye Academic Press, p. 83, incorporated by reference herein). These vectors can replicate in *E. coli* due to the presence of the pBR322 ori, and in *S. cerevisiae* due to the replication determinant of the yeast 2 micron plasmid. In addition, drug resistance markers such as ampicillin can be used. In an illustrative embodiment, an htrb polypeptide is produced recombinantly utilizing an expression vector generated by sub-cloning the coding sequence of one of the htrb genes represented in SEQ ID Nos. 1 or 3.

The preferred mammalian expression vectors contain both prokaryotic sequences, to facilitate the propagation of the vector in bacteria, and one or more eukaryotic transcription units that are expressed in eukaryotic cells. The pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo and pHyg derived vectors are examples of mammalian expression vectors suitable for transfection of eukaryotic cells. Some of these vectors are modified with sequences from bacterial plasmids, such as pBR322, to facilitate replication and drug resistance selection in both prokaryotic and eukaryotic cells. Alternatively, derivatives of viruses such as the bovine papillomavirus (BPV-1), or Epstein-Barr virus (pHEBo, pREP-derived and p205) can be used for transient expression of proteins in eukaryotic cells. The various methods employed in the preparation of the plasmids and transformation of host organisms are well known in the art. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells, as well as general recombinant procedures, see *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) Chapters 16 and 17.

In some instances, it may be desirable to express the recombinant htrb polypeptide by the use of a baculovirus expression system. Examples of such baculovirus expression systems include pVL-derived vectors (such as pVL1392, pVL1393 and pVL941), pAcUW-derived vectors (such as pAcUW1), and pBlueBac-derived vectors (such as the β -gal containing pBlueBac III)

WO 02/053743

PCT/US02/00070

When it is desirable to express only a portion of an htrb protein, such as a form lacking a portion of the N-terminus, i.e. a truncation mutant which lacks the signal peptide, it may be necessary to add a start codon (ATG) to the oligonucleotide fragment containing the desired sequence to be expressed. It is well known in the art that a methionine at the N-terminal position can be enzymatically cleaved by the use of the enzyme methionine aminopeptidase (MAP). MAP has been cloned from *E. coli* (Ben-Bassat et al. (1987) J. Bacteriol. 169:751-757) and *Salmonella typhimurium* and its *in vitro* activity has been demonstrated on recombinant proteins (Miller et al. (1987) PNAS 84:2718-1722). Therefore, removal of an N-terminal methionine, if desired, can be achieved either *in vivo* by expressing htrb derived polypeptides in a host which produces MAP (e.g., *E. coli* or CM89 or *S. cerevisiae*), or *in vitro* by use of purified MAP (e.g., procedure of Miller et al., supra).

Moreover, the gene constructs of the present invention can also be used as part of a gene therapy protocol to deliver nucleic acids encoding either an agonistic or antagonistic form of one of the subject htrb proteins. Thus, another aspect of the invention features expression vectors for *in vivo* or *in vitro* transfection and expression of an htrb polypeptide in particular cell types so as to reconstitute the function of, or alternatively, abrogate the function of htrb in a tissue. This could be desirable, for example, when the naturally-occurring form of the protein is misexpressed or the natural protein is mutated and less active.

In addition to viral transfer methods, non-viral methods can also be employed to cause expression of a subject htrb polypeptide in the tissue of an animal. Most nonviral methods of gene transfer rely on normal mechanisms used by mammalian cells for the uptake and intracellular transport of macromolecules. In preferred embodiments, non-viral targeting means of the present invention rely on endocytic pathways for the uptake of the subject htrb polypeptide gene by the targeted cell. Exemplary targeting means of this type include liposomal derived systems, poly-lysine conjugates, and artificial viral envelopes.

In other embodiments transgenic animals, described in more detail below could be used to produce recombinant proteins.

4.4. Polypeptides of the Present Invention

The present invention makes available isolated htrb polypeptides which are isolated from, or otherwise substantially free of other cellular proteins. The term "substantially free of other cellular proteins" (also referred to herein as "contaminating proteins") or

WO 02/053743

PCT/US02/00070

“substantially pure or purified preparations” are defined as encompassing preparations of htrb polypeptides having less than about 20% (by dry weight) contaminating protein, and preferably having less than about 5% contaminating protein. Functional forms of the subject polypeptides can be prepared, for the first time, as purified preparations by using a cloned gene as described herein.

Preferred htrb proteins of the invention have an amino acid sequence which is at least about 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 90%, or 95% identical or homologous to an amino acid sequence of SEQ ID No. 2 or 4. Even more preferred htrb proteins comprise an amino acid sequence of at least 10, 20, 30, or 50 residues which is at least about 70, 80, 90, 95, 97, 98, or 99% homologous or identical to an amino acid sequence of SEQ ID Nos. 2 or 4. Such proteins can be recombinant proteins, and can be, e.g., produced in vitro from nucleic acids comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID Nos. 1 or 3, or another nucleic acid of the invention or homologs thereof. For example, recombinant polypeptides preferred by the present invention can be encoded by a nucleic acid, which is at least 85% homologous and more preferably 90% homologous and most preferably 95% homologous with a nucleotide sequence set forth in a SEQ ID Nos. 1 or 3 of the invention. Polypeptides which are encoded by a nucleic acid that is at least about 98-99% homologous with the sequence of SEQ ID No. 1 or 3 of the invention are also within the scope of the invention.

In a preferred embodiment, an htrb protein of the present invention is a mammalian htrb protein. In a particularly preferred embodiment an htrb protein is set forth as SEQ ID No. 2 or SEQ ID No. 4. In particularly preferred embodiments, an htrb protein has an htrb bioactivity. It will be understood that certain post-translational modifications, e.g., phosphorylation and the like, can increase the apparent molecular weight of the htrb protein relative to the unmodified polypeptide chain.

The invention also features protein isoforms encoded by splice variants of the present invention. Such isoforms may have biological activities identical to or different from those possessed by the htrb proteins specified by Nos. 2 or 4. Such isoforms may arise, for example, by alternative splicing of one or more htrb gene transcripts.

htrb polypeptides preferably are capable of functioning as either an agonist or antagonist of at least one biological activity of a wild-type (“authentic”) htrb protein of the appended sequence listing. The term “evolutionarily related to”, with respect to amino acid sequences of htrb proteins, refers to both polypeptides having amino acid sequences which

WO 02/053743

PCT/US02/00070

have arisen naturally, and also to mutational variants of human htrb polypeptides which are derived, for example, by combinatorial mutagenesis.

Full length proteins or fragments corresponding to one or more particular motifs and/or domains or to arbitrary sizes, for example, at least 5, 10, 20, 25, 50, 75 and 100, amino acids in length are within the scope of the present invention.

For example, isolated htrb polypeptides can be encoded by all or a portion of a nucleic acid sequence shown in any of SEQ ID Nos. 1 or 3. Isolated peptidyl portions of htrb proteins can be obtained by screening peptides recombinantly produced from the corresponding fragment of the nucleic acid encoding such peptides. In addition, fragments can be chemically synthesized using techniques known in the art such as conventional Merrifield solid phase Fmoc or t-Boc chemistry. For example, an htrb polypeptide of the present invention may be arbitrarily divided into fragments of desired length with no overlap of the fragments, or preferably divided into overlapping fragments of a desired length. The fragments can be produced (recombinantly or by chemical synthesis) and tested to identify those peptidyl fragments which can function as either agonists or antagonists of a wild-type (e.g., "authentic") htrb protein.

An htrb polypeptide can be a membrane bound form or a soluble form. A preferred soluble htrb polypeptide is a polypeptide which does not contain a hydrophobic signal sequence domain. Such proteins can be created by genetic engineering by methods known in the art. The solubility of a recombinant polypeptide may be increased by deletion of hydrophobic domains, such as predicted transmembrane domains, of the wild type protein.

In general, polypeptides referred to herein as having an activity (e.g., are "bioactive") of an htrb protein are defined as polypeptides which include an amino acid sequence encoded by all or a portion of the nucleic acid sequences shown in one of SEQ ID No. 1 or 3 and which mimic or antagonize all or a portion of the biological/biochemical activities of a naturally occurring htrb protein. Examples of such biological activity include a region of conserved structure referred to as the htrb conserved domain (see Figure 6A, htrb NC construct).

Other biological activities of the subject htrb proteins will be reasonably apparent to those skilled in the art. According to the present invention, a polypeptide has biological activity if it is a specific agonist or antagonist of a naturally-occurring form of an htrb protein.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Assays for determining whether a compound, e.g., a protein, such as an htrb protein or variant thereof, has one or more of the above biological activities include those assays, well known in the art, which are used for assessing htrb agonist and htrb antagonist activities. For example, the ability of recombinant htrb polypeptide to block activation of an AP-1 reporter construct. In contrast, the ability of recombinant htrb polypeptides to interfere with cytokine induced activation of interleukin-8 gene expression is indicative of htrb antagonist activity.

Other preferred proteins of the invention are those encoded by the nucleic acids set forth in the section pertaining to nucleic acids of the invention. In particular, the invention provides fusion proteins, e.g., htrb -immunoglobulin fusion proteins. Such fusion proteins can provide, e.g., enhanced stability and solubility of htrb proteins and may thus be useful in therapy. Fusion proteins can also be used to produce an immunogenic fragment of an htrb protein. For example, the VP6 capsid protein of rotavirus can be used as an immunologic carrier protein for portions of the htrb polypeptide, either in the monomeric form or in the form of a viral particle. The nucleic acid sequences corresponding to the portion of a subject htrb protein to which antibodies are to be raised can be incorporated into a fusion gene construct which includes coding sequences for a late vaccinia virus structural protein to produce a set of recombinant viruses expressing fusion proteins comprising htrb epitopes as part of the virion. It has been demonstrated with the use of immunogenic fusion proteins utilizing the Hepatitis B surface antigen fusion proteins that recombinant Hepatitis B virions can be utilized in this role as well. Similarly, chimeric constructs coding for fusion proteins containing a portion of an htrb protein and the poliovirus capsid protein can be created to enhance immunogenicity of the set of polypeptide antigens (see, for example, EP Publication No: 0259149; and Evans et al. (1989) *Nature* 339:385; Huang et al. (1988) *J. Virol.* 62:3855; and Schlienger et al. (1992) *J. Virol.* 66:2).

The Multiple antigen peptide system for peptide-based immunization can also be utilized to generate an immunogen, wherein a desired portion of an htrb polypeptide is obtained directly from organo-chemical synthesis of the peptide onto an oligomeric branching lysine core (see, for example, Posnett et al. (1988) *JBC* 263:1719 and Nardelli et al. (1992) *J. Immunol.* 148:914). Antigenic determinants of htrb proteins can also be expressed and presented by bacterial cells.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

In addition to utilizing fusion proteins to enhance immunogenicity, it is widely appreciated that fusion proteins can also facilitate the expression of proteins, and accordingly, can be used in the expression of the htrb polypeptides of the present invention. For example, htrb polypeptides can be generated as glutathione-S-transferase (GST-fusion) proteins. Such GST-fusion proteins can enable easy purification of the htrb polypeptide, as for example by the use of glutathione-derivatized matrices (see, for example, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)). Additionally, fusion of htrb polypeptides to small epitope tags, such as the FLAG or hemagglutinin tag sequences, can be used to simplify immunological purification of the resulting recombinant polypeptide or to facilitate immunological detection in a cell or tissue sample. Fusion to the green fluorescent protein, and recombinant versions thereof which are known in the art and available commercially, may further be used to localize htrb polypeptides within living cells and tissue.

The present invention further pertains to methods of producing the subject htrb polypeptides. For example, a host cell transfected with a nucleic acid vector directing expression of a nucleotide sequence encoding the subject polypeptides can be cultured under appropriate conditions to allow expression of the peptide to occur. Suitable media for cell culture are well known in the art. The recombinant htrb polypeptide can be isolated from cell culture medium, host cells, or both using techniques known in the art for purifying proteins including ion-exchange chromatography, gel filtration chromatography, ultrafiltration, electrophoresis, and immunoaffinity purification with antibodies specific for such peptide. In a preferred embodiment, the recombinant htrb polypeptide is a fusion protein containing a domain which facilitates its purification, such as GST fusion protein.

Moreover, it will be generally appreciated that, under certain circumstances, it may be advantageous to provide homologs of one of the subject htrb polypeptides which function in a limited capacity as one of either an htrb agonist (mimetic) or an htrb antagonist, in order to promote or inhibit only a subset of the biological activities of the naturally-occurring form of the protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a homolog of limited function, and with fewer side effects relative to treatment with agonists or antagonists which are directed to all of the biological activities of naturally occurring forms of htrb proteins.

Homologs of each of the subject htrb proteins can be generated by mutagenesis, such as by discrete point mutation(s), or by truncation. For instance, mutation can give rise

WO 02/053743

PCT/US02/00070

to homologs which retain substantially the same, or merely a subset, of the biological activity of the htrb polypeptide from which it was derived. Alternatively, antagonistic forms of the protein can be generated which are able to inhibit the function of the naturally occurring form of the protein, such as by competitively binding to an htrb receptor.

5 The recombinant htrb polypeptides of the present invention also include homologs of the wildtype htrb proteins, such as versions of those protein which are resistant to proteolytic cleavage, as for example, due to mutations which alter ubiquitination or other enzymatic targeting associated with the protein.

htrb polypeptides may also be chemically modified to create htrb derivatives by
10 forming covalent or aggregate conjugates with other chemical moieties, such as glycosyl groups, lipids, phosphate, acetyl groups and the like. Covalent derivatives of htrb proteins can be prepared by linking the chemical moieties to functional groups on amino acid sidechains of the protein or at the N-terminus or at the C-terminus of the polypeptide.

Modification of the structure of the subject htrb polypeptides can be for such
15 purposes as enhancing therapeutic or prophylactic efficacy, stability (e.g., ex vivo shelf life and resistance to proteolytic degradation), or post-translational modifications (e.g., to alter phosphorylation pattern of protein). Such modified peptides, when designed to retain at least one activity of the naturally-occurring form of the protein, or to produce specific antagonists thereof, are considered functional equivalents of the htrb polypeptides described
20 in more detail herein. Such modified peptides can be produced, for instance, by amino acid substitution, deletion, or addition. The substitutional variant may be a substituted conserved amino acid or a substituted non-conserved amino acid.

For example, it is reasonable to expect that an isolated replacement of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, a threonine with a serine, or a similar
25 replacement of an amino acid with a structurally related amino acid (i.e. isosteric and/or isoelectric mutations) will not have a major effect on the biological activity of the resulting molecule. Conservative replacements are those that take place within a family of amino acids that are related in their side chains. Genetically encoded amino acids can be divided into four families: (1) acidic = aspartate, glutamate; (2) basic = lysine, arginine, histidine;
30 (3) nonpolar = alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged polar = glycine, asparagine, glutamine, cysteine, serine, threonine, tyrosine. In similar fashion, the amino acid repertoire can be grouped as (1) acidic = aspartate, glutamate; (2) basic = lysine, arginine histidine, (3) aliphatic = glycine,

WO 02/053743

PCT/US02/00070

alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, with serine and threonine optionally be grouped separately as aliphatic-hydroxyl; (4) aromatic = phenylalanine, tyrosine, tryptophan; (5) amide = asparagine, glutamine; and (6) sulfur -containing = cysteine and methionine. (see, for example, *Biochemistry*, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman and Co.: 1981). Whether a change in the amino acid sequence of a peptide results in a functional htrb homolog (e.g., functional in the sense that the resulting polypeptide mimics or antagonizes the wild-type form) can be readily determined by assessing the ability of the variant peptide to produce a response in cells in a fashion similar to the wild-type protein, or competitively inhibit such a response. Polypeptides in which more than one replacement has taken place can readily be tested in the same manner.

This invention further contemplates a method for generating sets of combinatorial mutants of the subject htrb proteins as well as truncation mutants, and is especially useful for identifying potential variant sequences (e.g., homologs). The purpose of screening such combinatorial libraries is to generate, for example, novel htrb homologs which can act as either agonists or antagonist, or alternatively, possess novel activities all together. Thus, combinatorially-derived homologs can be generated to have an increased potency relative to a naturally occurring form of the protein.

In one embodiment, the variegated htrb library of htrb variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level, and is encoded by a variegated gene htrb library. For instance, a mixture of synthetic oligonucleotides can be enzymatically ligated into gene sequences such that the degenerate set of potential htrb sequences are expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of htrb sequences therein.

There are many ways by which such libraries of potential htrb homologs can be generated from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be carried out in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic genes then ligated into an appropriate expression vector. The purpose of a degenerate set of genes is to provide, in one mixture, all of the sequences encoding the desired set of potential htrb sequences. The synthesis of degenerate oligonucleotides is well known in the art (see for example, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1981) *Recombinant DNA*, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477. Such techniques have been

WO 02/053743

PCT/US02/00070

employed in the directed evolution of other proteins (see, for example, Scott et al. (1990) Science 249:386-390; Roberts et al. (1992) PNAS 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) PNAS 87: 6378-6382; as well as U.S. Patents Nos. 5,223,409, 5,198,346, and 5,096,815).

5 Likewise, a library of coding sequence fragments can be provided for an htrb clone in order to generate a variegated population of htrb fragments for screening and subsequent selection of bioactive fragments. A variety of techniques are known in the art for generating such 1, including chemical synthesis. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by (i) treating a double stranded PCR fragment of an
10 htrb coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule; (ii) denaturing the double stranded DNA; (iii) renaturing the DNA to form double stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products; (iv) removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease; and (v) ligating the resulting fragment library into an expression vector. By
15 this exemplary method, an expression library can be derived which codes for N-terminal, C-terminal and internal fragments of various sizes.

A wide range of techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a certain property. Such techniques will be generally
20 adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of htrb homologs. The most widely used techniques for screening large gene libraries typically comprises cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting libraries of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates
25 relatively easy isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Each of the illustrative assays described below are amenable to high through-put analysis as necessary to screen large numbers of degenerate htrb sequences created by combinatorial mutagenesis techniques. Combinatorial mutagenesis has a potential to generate very large libraries of mutant proteins, e.g., in the order of 1026 molecules. Combinatorial libraries of
30 this size may be technically challenging to screen even with high throughput screening assays. To overcome this problem, a new technique has been developed recently, recursive ensemble mutagenesis (REM), which allows one to avoid the very high proportion of non-functional proteins in a random library and simply enhances the frequency of functional

WO 02/053743

PCT/US02/00070

proteins, thus decreasing the complexity required to achieve a useful sampling of sequence space. REM is an algorithm which enhances the frequency of functional mutants in a library when an appropriate selection or screening method is employed (Arkin and Yourvan, 1992, PNAS USA 89:7811-7815; Yourvan et al., 1992, *Parallel Problem Solving from Nature*, 2., In Maenner and Manderick, eds., Elsevir Publishing Co., Amsterdam, pp. 401-410; Delgrave et al., 1993, *Protein Engineering* 6(3):327-331).

The invention also provides for reduction of the htrb proteins to generate mimetics, e.g., peptide or non-peptide agents, such as small molecules, which are able to disrupt binding of an htrb polypeptide of the present invention with a molecule, e.g. target peptide.

Thus, such mutagenic techniques as described above are also useful to map the determinants of the htrb proteins which participate in protein-protein interactions involved in, for example, binding of the subject htrb polypeptide to a target peptide. To illustrate, the critical residues of a subject htrb polypeptide which are involved in molecular recognition of its receptor can be determined and used to generate htrb derived peptidomimetics or small molecules which competitively inhibit binding of the authentic htrb protein with that moiety. By employing, for example, scanning mutagenesis to map the amino acid residues of the subject htrb proteins which are involved in binding other proteins, peptidomimetic compounds can be generated which mimic those residues of the htrb protein which facilitate the interaction. Such mimetics may then be used to interfere with the normal function of an htrb protein. For instance, non-hydrolyzable peptide analogs of such residues can be generated using benzodiazepine (e.g., see Freidinger et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), azepine (e.g., see Huffman et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), substituted gamma lactam rings (Garvey et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), keto-methylene pseudopeptides (Ewenson et al. (1986) *J Med Chem* 29:295; and Ewenson et al. in *Peptides: Structure and Function* (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), b-turn dipeptide cores (Nagai et al. (1985) *Tetrahedron Lett* 26:647; and Sato et al. (1986) *J Chem Soc Perkin Trans* 1:1231), and b-aminoalcohols (Gordon et al. (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126:419; and Dam et al. (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 134:71).

WO 02/053743

PCT/US02/00070

4.5. Anti-htrb Antibodies and Uses Therefor

Another aspect of the invention pertains to an antibody specifically reactive with a mammalian htrb protein, e.g., a wild-type or mutated htrb protein. For example, by using immunogens derived from an htrb protein, e.g., based on the cDNA sequences, anti-protein/anti-peptide antisera or monoclonal antibodies can be made by standard protocols (See, for example, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). A mammal, such as a mouse, a hamster or rabbit can be immunized with an immunogenic form of the peptide (e.g., a mammalian htrb polypeptide or an antigenic fragment which is capable of eliciting an antibody response, or a fusion protein as described above). Techniques for conferring immunogenicity on a protein or peptide include conjugation to carriers or other techniques well known in the art. An immunogenic portion of an htrb protein can be administered in the presence of adjuvant. The progress of immunization can be monitored by detection of antibody titers in plasma or serum. Standard ELISA or other immunoassays can be used with the immunogen as antigen to assess the levels of antibodies. In a preferred embodiment, the subject antibodies are immunospecific for antigenic determinants of an htrb protein of a mammal, e.g., antigenic determinants of a protein set forth in SEQ ID No. 2 or 4 or closely related homologs (e.g., at least 90% homologous, and more preferably at least 94% homologous).

Following immunization of an animal with an antigenic preparation of an htrb polypeptide, anti-htrb antisera can be obtained and, if desired, polyclonal anti-htrb antibodies isolated from the serum. To produce monoclonal antibodies, antibody-producing cells (lymphocytes) can be harvested from an immunized animal and fused by standard somatic cell fusion procedures with immortalizing cells such as myeloma cells to yield hybridoma cells. Such techniques are well known in the art, and include, for example, the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein ((1975) *Nature*, 256: 495-497), the human B cell hybridoma technique (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Hybridoma cells can be screened immunochemically for production of antibodies specifically reactive with a mammalian htrb polypeptide of the present invention and monoclonal antibodies isolated from a culture comprising such hybridoma cells. In one embodiment anti-human htrb antibodies specifically react with the protein encoded by a nucleic acid having SEQ ID No. 1 or 3.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

The term antibody as used herein is intended to include fragments thereof which are also specifically reactive with one of the subject mammalian htrb polypeptides. Antibodies can be fragmented using conventional techniques and the fragments screened for utility in the same manner as described above for whole antibodies. For example, F(ab)2 fragments can be generated by treating antibody with pepsin. The resulting F(ab)2 fragment can be treated to reduce disulfide bridges to produce Fab fragments. The antibody of the present invention is further intended to include bispecific, single-chain, and chimeric and humanized molecules having affinity for an htrb protein conferred by at least one CDR region of the antibody. In preferred embodiments, the antibody further comprises a label attached thereto and able to be detected, (e.g., the label can be a radioisotope, fluorescent compound, enzyme or enzyme co-factor).

Anti-htrb antibodies can be used, e.g., to monitor htrb protein levels in an individual for determining, e.g., whether a subject has a disease or condition associated with an aberrant htrb protein level, or allowing determination of the efficacy of a given treatment regimen for an individual afflicted with such a disorder. The level of htrb polypeptides may be measured from cells in bodily fluid, such as in blood samples.

Another application of anti-htrb antibodies of the present invention is in the immunological screening of cDNA libraries constructed in expression vectors such as λ gt11, λ gt18-23, λ ZAP, and λ ORF8. Messenger libraries of this type, having coding sequences inserted in the correct reading frame and orientation, can produce fusion proteins. For instance, λ gt11 will produce fusion proteins whose amino termini consist of β -galactosidase amino acid sequences and whose carboxy termini consist of a foreign polypeptide. Antigenic epitopes of an htrb protein, e.g., other orthologs of a particular htrb protein or other paralogs from the same species, can then be detected with antibodies, as, for example, reacting nitrocellulose filters lifted from infected plates with anti-htrb antibodies. Positive phage detected by this assay can then be isolated from the infected plate. Thus, the presence of htrb homologs can be detected and cloned from other animals, as can alternate isoforms (including splice variants) from humans.

4.6. Transgenic Animals

The invention further provides for transgenic animals, which can be used for a variety of purposes, e.g., to identify htrb therapeutics. Transgenic animals of the invention include non-human animals containing a heterologous htrb gene or fragment thereof under the control of an htrb promoter or under the control of a heterologous promoter.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Accordingly, the transgenic animals of the invention can be animals expressing a transgene encoding a wild-type htrb protein or fragment thereof or variants thereof, including mutants and polymorphic variants thereof. Such animals can be used, e.g., to determine the effect of a difference in amino acid sequence of an htrb protein from the sequence set forth in SEQ

- 5 ID Nos. 2 or 4, such as a polymorphic difference. These animals can also be used to determine the effect of expression of an htrb protein in a specific site or for identifying htrb therapeutics or confirming their activity in vivo.

- In one aspect, the invention provides transgenic non-human organisms and cell lines for use in the in vivo screening and evaluation of drugs or other therapeutic regimens useful
10 in the treatment of inflammatory disorders. In one embodiment, the invention is a transgenic animal with a targeted disruption in an interleukin-1 gene. In particular, the gene is the htrb gene. The animal may be chimeric, heterozygotic or homozygotic for the disrupted gene. Homozygotic knock-out htrb mammals provide a model for studying inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disorder, Type I
15 diabetes, psoriasis, osteoporosis, nephropathy in diabetes mellitus, alopecia areata, Graves disease, systemic lupus erythematosus, lichen sclerosis, ulcerative colitis, coronary artery disease, arteritic disorders, diabetic retinopathy, low birth weight, pregnancy complications, severe periodontal disease, psoriasis and insulin dependent diabetes, but is particularly characterized by arteritic lesions. The targeted disruption may be anywhere in
20 the gene, subject only to the requirement that it inhibit production of functional htrb protein. In a preferred embodiment, the disruption removes the entire htrb coding sequence such as that of htrb-1 contained in SEQ ID No. 1. The transgenic animal may be of any species (except human), but is preferably a mammal. In a preferred embodiment, the non-human animal comprising a targeted disruption in the htrb gene, wherein said targeted disruption
25 inhibits production of wild-type htrb polypeptide so that the phenotype of a non-human mammal homozygous for the targeted disruption is characterized by an altered inflammatory response.

- In another aspect, the invention features a cell or cell line, which contains a targeted disruption in the htrb gene. In a preferred embodiment, the cell or cell line is an
30 undifferentiated cell, for example, a stem cell, embryonic stem cell, oocyte or embryonic cell.

Yet in a further aspect, the invention features a method of producing a non-human mammal with a targeted disruption in an htrb gene. For example, an htrb knock-out

WO 02/053743

PCT/US02/00070

construct can be created with a portion of the htrb gene having an internal portion of said htrb gene replaced by a marker. The knock-out construct can then be transfected into a population of embryonic stem m(ES) cells. Transfected cells can then be selected as expressing the marker. The transfected ES cells can then be introduced into an embryo of an ancestor of said mammal. The embryo can be allowed to develop to term to produce a chimeric mammal with the knock-out construct in its germline. Breeding said chimeric mammal will produce a heterozygous mammal with a targeted disruption in the htrb gene. Homozygotes can be generated by crossing heterozygotes.

In another aspect, the invention features htrb knock-out constructs, which can be used to generate the animals described above. In one embodiment, the htrb construct can comprise a portion of the htrb gene, wherein an internal portion of said htrb gene is replaced by a selectable marker. Preferably, the marker is the neo gene and the portion of the htrb gene is at least 2.5 kb long or 7.0 or 9.5 kb long (including the replaced portion and any htrb flanking sequences). The internal portion preferably covers at least a portion of an exon and in some embodiments it covers all of the exons which encode an htrb polypeptide.

In still another aspect, the invention features methods for testing agents for effectiveness in treating and/or preventing an inflammatory condition. In one embodiment, the method can employ the transgenic animal or cell lines, as described above. For example, a test agent can be administered to the transgenic animal and the ability of the agent to ameliorate the inflammatory condition can be scored as having effectiveness against said inflammatory condition. Any inflammatory condition with an htrb component can be tested using these mammals, but in particular, conditions characterized by arteritic lesions are studied. The method may also be used to test agents that are effective against inflammatory proteins and their downstream components.

The transgenic animals can also be animals containing a transgene, such as reporter gene, under the control of an htrb promoter or fragment thereof. These animals are useful, e.g., for identifying htrb drugs that modulate production of htrb, such as by modulating htrb gene expression. An htrb gene promoter can be isolated, e.g., by screening of a genomic library with an htrb cDNA fragment and characterized according to methods known in the art. In a preferred embodiment of the present invention, the transgenic animal containing said htrb reporter gene is used to screen a class of bioactive molecules known as steroid hormones for their ability to modulate htrb expression. In a more preferred embodiment of the invention, the steroid hormones screened for htrb expression modulating activity

WO 02/053743

PCT/US02/00070

belong to the group known as androgens. In a still more preferred embodiment of the invention, the steroid hormone is testosterone or a testosterone analog. Yet other non-human animals within the scope of the invention include those in which the expression of the endogenous htrb gene has been mutated or "knocked out". A "knock out" animal is one

5 carrying a homozygous or heterozygous deletion of a particular gene or genes. These animals could be useful to determine whether the absence of htrb will result in a specific phenotype, in particular whether these mice have or are likely to develop a specific disease, such as high susceptibility to heart disease or cancer. Furthermore these animals are useful in screens for drugs which alleviate or attenuate the disease condition resulting from the

10 mutation of the htrb gene as outlined below. These animals are also useful for determining the effect of a specific amino acid difference, or allelic variation, in an htrb gene. That is, the htrb knock out animals can be crossed with transgenic animals expressing, e.g., a mutated form or allelic variant of htrb, thus resulting in an animal which expresses only the mutated protein and not the wild-type htrb protein.

15 In a preferred embodiment of this aspect of the invention, a transgenic htrb knock-out mouse, carrying the mutated htrb locus on one or both of its chromosomes, is used as a model system for transgenic or drug treatment of the condition resulting from loss of htrb expression.

Methods for obtaining transgenic and knockout non-human animals are well known

20 in the art. Knock out mice are generated by homologous integration of a "knock out" construct into a mouse embryonic stem cell chromosome which encodes the gene to be knocked out. In one embodiment, gene targeting, which is a method of using homologous recombination to modify an animal's genome, can be used to introduce changes into cultured embryonic stem cells. By targeting a htrb gene of interest in ES cells, these

25 changes can be introduced into the germlines of animals to generate chimeras. The gene targeting procedure is accomplished by introducing into tissue culture cells a DNA targeting construct that includes a segment homologous to a target htrb locus, and which also includes an intended sequence modification to the htrb genomic sequence (e.g., insertion, deletion, point mutation). The treated cells are then screened for accurate

30 targeting to identify and isolate those which have been properly targeted.

Gene targeting in embryonic stem cells is in fact a scheme contemplated by the present invention as a means for disrupting a htrb gene function through the use of a targeting transgene construct designed to undergo homologous recombination with one or

WO 02/053743

PCT/US02/00070

more htrb genomic sequences. The targeting construct can be arranged so that, upon recombination with an element of a htrb gene, a positive selection marker is inserted into (or replaces) coding sequences of the gene. The inserted sequence functionally disrupts the htrb gene, while also providing a positive selection trait. Exemplary htrb targeting
5 constructs are described in more detail below.

Generally, the embryonic stem cells (ES cells) used to produce the knockout animals will be of the same species as the knockout animal to be generated. Thus for example, mouse embryonic stem cells will usually be used for generation of knockout mice.

Embryonic stem cells are generated and maintained using methods well known to the skilled artisan such as those described by Doetschman et al. (1985) *J. Embryol. Exp.*
10 87:27-45). Any line of ES cells can be used, however, the line chosen is typically selected for the ability of the cells to integrate into and become part of the germ line of a developing embryo so as to create germ line transmission of the knockout construct. Thus, any ES cell line that is believed to have this capability is suitable for use herein. One mouse strain that
15 is typically used for production of ES cells, is the 129J strain. Another ES cell line is murine cell line D3 (American Type Culture Collection, catalog no. CKL 1934) Still another preferred ES cell line is the WW6 cell line (Ioffe et al. (1995) *PNAS* 92:7357-7361). The cells are cultured and prepared for knockout construct insertion using methods well known to the skilled artisan, such as those set forth by Robertson in: *Teratocarcinomas*
20 and *Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. IRL Press, Washington, D.C. [1987]); by Bradley et al. (1986) *Current Topics in Devel. Biol.* 20:357-371); and by Hogan et al. (*Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1986]) .

A knock out construct refers to a uniquely configured fragment of nucleic acid
25 which is introduced into a stem cell line and allowed to recombine with the genome at the chromosomal locus of the gene of interest to be mutated. Thus a given knock out construct is specific for a given gene to be targeted for disruption. Nonetheless, many common elements exist among these constructs and these elements are well known in the art. A typical knock out construct contains nucleic acid fragments of not less than about 0.5 kb nor
30 more than about 10.0 kb from both the 5' and the 3' ends of the genomic locus which encodes the gene to be mutated. These two fragments are separated by an intervening fragment of nucleic acid which encodes a positive selectable marker, such as the neomycin resistance gene (neo^R). The resulting nucleic acid fragment, consisting of a nucleic acid

WO 02/053743

PCT/US02/00070

from the extreme 5' end of the genomic locus linked to a nucleic acid encoding a positive selectable marker which is in turn linked to a nucleic acid from the extreme 3' end of the genomic locus of interest, omits most of the coding sequence for htrb or other gene of interest to be knocked out. When the resulting construct recombines homologously with
5 the chromosome at this locus, it results in the loss of the omitted coding sequence, otherwise known as the structural gene, from the genomic locus. A stem cell in which such a rare homologous recombination event has taken place can be selected for by virtue of the stable integration into the genome of the nucleic acid of the gene encoding the positive selectable marker and subsequent selection for cells expressing this marker gene in the
10 presence of an appropriate drug (neomycin in this example).

Variations on this basic technique also exist and are well known in the art. For example, a "knock-in" construct refers to the same basic arrangement of a nucleic acid encoding a 5' genomic locus fragment linked to nucleic acid encoding a positive selectable marker which in turn is linked to a nucleic acid encoding a 3' genomic locus fragment, but
15 which differs in that none of the coding sequence is omitted and thus the 5' and the 3' genomic fragments used were initially contiguous before being disrupted by the introduction of the nucleic acid encoding the positive selectable marker gene. This "knock-in" type of construct is thus very useful for the construction of mutant transgenic animals when only a limited region of the genomic locus of the gene to be mutated, such as
20 a single exon, is available for cloning and genetic manipulation. Alternatively, the "knock-in" construct can be used to specifically eliminate a single functional domain of the targeted gene, resulting in a transgenic animal which expresses a polypeptide of the targeted gene which is defective in one function, while retaining the function of other domains of the encoded polypeptide. This type of "knock-in" mutant frequently has the
25 characteristic of a so-called "dominant negative" mutant because, especially in the case of proteins which homomultimerize, it can specifically block the action of (or "poison") the polypeptide product of the wild-type gene from which it was derived. In a variation of the knock-in technique, a marker gene is integrated at the genomic locus of interest such that expression of the marker gene comes under the control of the transcriptional regulatory
30 elements of the targeted gene. A marker gene is one that encodes an enzyme whose activity can be detected (e.g., b-galactosidase), the enzyme substrate can be added to the cells under suitable conditions, and the enzymatic activity can be analyzed. One skilled in the art will be familiar with other useful markers and the means for detecting their presence in a given

WO 02/053743

PCT/US02/00070

cell. All such markers are contemplated as being included within the scope of the teaching of this invention.

As mentioned above, the homologous recombination of the above described "knock out" and "knock in" constructs is very rare and frequently such a construct inserts
5 nonhomologously into a random region of the genome where it has no effect on the gene which has been targeted for deletion, and where it can potentially recombine so as to disrupt another gene which was otherwise not intended to be altered. Such nonhomologous recombination events can be selected against by modifying the abovementioned knock out and knock in constructs so that they are flanked by negative selectable markers at either end
10 (particularly through the use of two allelic variants of the thymidine kinase gene, the polypeptide product of which can be selected against in expressing cell lines in an appropriate tissue culture medium well known in the art - i.e. one containing a drug such as 5-bromodeoxyuridine). Thus a preferred embodiment of such a knock out or knock in construct of the invention consist of a nucleic acid encoding a negative selectable marker
15 linked to a nucleic acid encoding a 5' end of a genomic locus linked to a nucleic acid of a positive selectable marker which in turn is linked to a nucleic acid encoding a 3' end of the same genomic locus which in turn is linked to a second nucleic acid encoding a negative selectable marker. Nonhomologous recombination between the resulting knock out construct and the genome will usually result in the stable integration of one or both of these
20 negative selectable marker genes and hence cells which have undergone nonhomologous recombination can be selected against by growth in the appropriate selective media (e.g. media containing a drug such as 5-bromodeoxyuridine for example). Simultaneous selection for the positive selectable marker and against the negative selectable marker will result in a vast enrichment for clones in which the knock out construct has recombined
25 homologously at the locus of the gene intended to be mutated. The presence of the predicted chromosomal alteration at the targeted gene locus in the resulting knock out stem cell line can be confirmed by means of Southern blot analytical techniques which are well known to those familiar in the art. Alternatively, PCR can be used.

Each knockout construct to be inserted into the cell must first be in the linear form.
30 Therefore, if the knockout construct has been inserted into a vector (described infra), linearization is accomplished by digesting the DNA with a suitable restriction endonuclease selected to cut only within the vector sequence and not within the knockout construct sequence.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

For insertion, the knockout construct is added to the ES cells under appropriate conditions for the insertion method chosen, as is known to the skilled artisan. For example, if the ES cells are to be electroporated, the ES cells and knockout construct DNA are exposed to an electric pulse using an electroporation machine and following the manufacturer's guidelines for use. After electroporation, the ES cells are typically allowed to recover under suitable incubation conditions. The cells are then screened for the presence of the knock out construct as explained above. Where more than one construct is to be introduced into the ES cell, each knockout construct can be introduced simultaneously or one at a time.

After suitable ES cells containing the knockout construct in the proper location have been identified by the selection techniques outlined above, the cells can be inserted into an embryo. Insertion may be accomplished in a variety of ways known to the skilled artisan, however a preferred method is by microinjection. For microinjection, about 10-30 cells are collected into a micropipet and injected into embryos that are at the proper stage of development to permit integration of the foreign ES cell containing the knockout construct into the developing embryo. For instance, the transformed ES cells can be microinjected into blastocytes. The suitable stage of development for the embryo used for insertion of ES cells is very species dependent, however for mice it is about 3.5 days. The embryos are obtained by perfusing the uterus of pregnant females. Suitable methods for accomplishing this are known to the skilled artisan, and are set forth by, e.g., Bradley et al. (*supra*).

While any embryo of the right stage of development is suitable for use, preferred embryos are male. In mice, the preferred embryos also have genes coding for a coat color that is different from the coat color encoded by the ES cell genes. In this way, the offspring can be screened easily for the presence of the knockout construct by looking for mosaic coat color (indicating that the ES cell was incorporated into the developing embryo). Thus, for example, if the ES cell line carries the genes for white fur, the embryo selected will carry genes for black or brown fur.

After the ES cell has been introduced into the embryo, the embryo may be implanted into the uterus of a pseudopregnant foster mother for gestation. While any foster mother may be used, the foster mother is typically selected for her ability to breed and reproduce well, and for her ability to care for the young. Such foster mothers are typically prepared by mating with vasectomized males of the same species. The stage of the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

pseudopregnant foster mother is important for successful implantation, and it is species dependent. For mice, this stage is about 2-3 days pseudopregnant.

Offspring that are born to the foster mother may be screened initially for mosaic coat color where the coat color selection strategy (as described above, and in the appended examples) has been employed. In addition, or as an alternative, DNA from tail tissue of the offspring may be screened for the presence of the knockout construct using Southern blots and/or PCR as described above. Offspring that appear to be mosaics may then be crossed to each other, if they are believed to carry the knockout construct in their germ line, in order to generate homozygous knockout animals. Homozygotes may be identified by Southern blotting of equivalent amounts of genomic DNA from mice that are the product of this cross, as well as mice that are known heterozygotes and wild type mice.

Other means of identifying and characterizing the knockout offspring are available. For example, Northern blots can be used to probe the mRNA for the presence or absence of transcripts encoding either the gene knocked out, the marker gene, or both. In addition, Western blots can be used to assess the level of expression of the htrb gene knocked out in various tissues of the offspring by probing the Western blot with an antibody against the particular htrb protein, or an antibody against the marker gene product, where this gene is expressed. Finally, in situ analysis (such as fixing the cells and labeling with antibody) and/or FACS (fluorescence activated cell sorting) analysis of various cells from the offspring can be conducted using suitable antibodies to look for the presence or absence of the knockout construct gene product.

Yet other methods of making knock-out or disruption transgenic animals are also generally known. See, for example, *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Recombinase dependent knockouts can also be generated, e.g. by homologous recombination to insert target sequences, such that tissue specific and/or temporal control of inactivation of a htrb-gene can be controlled by recombinase sequences (described infra).

Animals containing more than one knockout construct and/or more than one transgene expression construct are prepared in any of several ways. The preferred manner of preparation is to generate a series of mammals, each containing one of the desired transgenic phenotypes. Such animals are bred together through a series of crosses, backcrosses and selections, to ultimately generate a single animal containing all desired knockout constructs and/or expression constructs, where the animal is otherwise congenic

WO 02/053743

PCT/US02/00070

(genetically identical) to the wild type except for the presence of the knockout construct(s) and/or transgene(s) .

A htrb transgene can encode the wild-type form of the protein, or can encode homologs thereof, including both agonists and antagonists, as well as antisense constructs.

- 5 In preferred embodiments, the expression of the transgene is restricted to specific subsets of cells, tissues or developmental stages utilizing, for example, cis-acting sequences that control expression in the desired pattern. In the present invention, such mosaic expression of a htrb protein can be essential for many forms of lineage analysis and can additionally provide a means to assess the effects of, for example, lack of htrb expression which might
- 10 grossly alter development in small patches of tissue within an otherwise normal embryo. Toward this end, tissue-specific regulatory sequences and conditional regulatory sequences can be used to control expression of the transgene in certain spatial patterns. Moreover, temporal patterns of expression can be provided by, for example, conditional recombination systems or prokaryotic transcriptional regulatory sequences.

- 15 Genetic techniques, which allow for the expression of transgenes can be regulated via site-specific genetic manipulation in vivo, are known to those skilled in the art. For instance, genetic systems are available which allow for the regulated expression of a recombinase that catalyzes the genetic recombination of a target sequence. As used herein, the phrase "target sequence" refers to a nucleotide sequence that is genetically recombined
- 20 by a recombinase. The target sequence is flanked by recombinase recognition sequences and is generally either excised or inverted in cells expressing recombinase activity. Recombinase catalyzed recombination events can be designed such that recombination of the target sequence results in either the activation or repression of expression of one of the subject htrb proteins. For example, excision of a target sequence which interferes with the
- 25 expression of a recombinant htrb gene, such as one which encodes an antagonistic homolog or an antisense transcript, can be designed to activate expression of that gene. This interference with expression of the protein can result from a variety of mechanisms, such as spatial separation of the htrb gene from the promoter element or an internal stop codon. Moreover, the transgene can be made wherein the coding sequence of the gene is flanked
- 30 by recombinase recognition sequences and is initially transfected into cells in a 3' to 5' orientation with respect to the promoter element. In such an instance, inversion of the target sequence will reorient the subject gene by placing the 5' end of the coding sequence

WO 02/053743

PCT/US02/00070

in an orientation with respect to the promoter element which allow for promoter driven transcriptional activation.

The transgenic animals of the present invention all include within a plurality of their cells a transgene of the present invention, which transgene alters the phenotype of the "host cell" with respect to regulation of cell growth, death and/or differentiation. Since it is possible to produce transgenic organisms of the invention utilizing one or more of the transgene constructs described herein, a general description will be given of the production of transgenic organisms by referring generally to exogenous genetic material. This general description can be adapted by those skilled in the art in order to incorporate specific transgene sequences into organisms utilizing the methods and materials described below.

In an illustrative embodiment, either the cre/loxP recombinase system of bacteriophage P1 (Lakso et al. (1992) PNAS 89:6232-6236; Orban et al. (1992) PNAS 89:6861-6865) or the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al. (1991) Science 251:1351-1355; PCT publication WO 92/15694) can be used to generate in vivo site-specific genetic recombination systems. Cre recombinase catalyzes the site-specific recombination of an intervening target sequence located between loxP sequences. loxP sequences are 34 base pair nucleotide repeat sequences to which the Cre recombinase binds and are required for Cre recombinase mediated genetic recombination. The orientation of loxP sequences determines whether the intervening target sequence is excised or inverted when Cre recombinase is present (Abremski et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:1509-1514); catalyzing the excision of the target sequence when the loxP sequences are oriented as direct repeats and catalyzes inversion of the target sequence when loxP sequences are oriented as inverted repeats.

Accordingly, genetic recombination of the target sequence is dependent on expression of the Cre recombinase. Expression of the recombinase can be regulated by promoter elements which are subject to regulatory control, e.g., tissue-specific, developmental stage-specific, inducible or repressible by externally added agents. This regulated control will result in genetic recombination of the target sequence only in cells where recombinase expression is mediated by the promoter element. Thus, the activation expression of a recombinant htrb protein can be regulated via control of recombinase expression.

Use of the cre/loxP recombinase system to regulate expression of a recombinant htrb protein requires the construction of a transgenic animal containing transgenes encoding

WO 02/053743

PCT/US02/00070

both the Cre recombinase and the subject protein. Animals containing both the Cre recombinase and a recombinant htrb gene can be provided through the construction of "double" transgenic animals. A convenient method for providing such animals is to mate two transgenic animals each containing a transgene, e.g., a htrb gene and recombinase gene.

5 One advantage derived from initially constructing transgenic animals containing a htrb transgene in a recombinase-mediated expressible format derives from the likelihood that the subject protein, whether agonistic or antagonistic, can be deleterious upon expression in the transgenic animal. In such an instance, a founder population, in which the subject transgene is silent in all tissues, can be propagated and maintained. Individuals of
10 this founder population can be crossed with animals expressing the recombinase in, for example, one or more tissues and/or a desired temporal pattern. Thus, the creation of a founder population in which, for example, an antagonistic htrb transgene is silent will allow the study of progeny from that founder in which disruption of htrb mediated induction in a particular tissue or at certain developmental stages would result in, for example, a lethal
15 phenotype.

Similar conditional transgenes can be provided using prokaryotic promoter sequences which require prokaryotic proteins to be simultaneous expressed in order to facilitate expression of the htrb transgene. Exemplary promoters and the corresponding trans-activating prokaryotic proteins are given in U.S. Patent No. 4,833,080.

20 Moreover, expression of the conditional transgenes can be induced by gene therapy-like methods wherein a gene encoding the trans-activating protein, e.g. a recombinase or a prokaryotic protein, is delivered to the tissue and caused to be expressed, such as in a cell-type specific manner. By this method, an htrb transgene could remain silent into adulthood until "turned on" by the introduction of the trans-activator.

25 In an exemplary embodiment, the "transgenic non-human animals" of the invention are produced by introducing transgenes into the germline of the non-human animal. Embryonal target cells at various developmental stages can be used to introduce transgenes. Different methods are used depending on the stage of development of the embryonal target cell. The specific line(s) of any animal used to practice this invention are selected for
30 general good health, good embryo yields, good pronuclear visibility in the embryo, and good reproductive fitness. In addition, the haplotype is a significant factor. For example, when transgenic mice are to be produced, strains such as C57BL/6 or FVB lines are often used (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Preferred strains are those with H-2b, H-2d or

WO 02/053743

PCT/US02/00070

H-2q haplotypes such as C57BL/6 or DBA/1. The line(s) used to practice this invention may themselves be transgenics, and/or may be knockouts (i.e., obtained from animals which have one or more genes partially or completely suppressed). In one embodiment, the transgene construct is introduced into a single stage embryo. The zygote is the best
5 target for micro-injection. In the mouse, the male pronucleus reaches the size of approximately 20 micrometers in diameter which allows reproducible injection of 1-2pl of DNA solution. The use of zygotes as a target for gene transfer has a major advantage in that in most cases the injected DNA will be incorporated into the host gene before the first cleavage (Brinster et al. (1985) PNAS 82:4438-4442). As a consequence, all cells of the
10 transgenic animal will carry the incorporated transgene. This will in general also be reflected in the efficient transmission of the transgene to offspring of the founder since 50% of the germ cells will harbor the transgene.

Normally, fertilized embryos are incubated in suitable media until the pronuclei appear. At about this time, the nucleotide sequence comprising the transgene is introduced
15 into the female or male pronucleus as described below. In some species such as mice, the male pronucleus is preferred. It is most preferred that the exogenous genetic material be added to the male DNA complement of the zygote prior to its being processed by the ovum nucleus or the zygote female pronucleus. It is thought that the ovum nucleus or female pronucleus release molecules which affect the male DNA complement, perhaps by
20 replacing the protamines of the male DNA with histones, thereby facilitating the combination of the female and male DNA complements to form the diploid zygote.

Thus, it is preferred that the exogenous genetic material be added to the male complement of DNA or any other complement of DNA prior to its being affected by the female pronucleus. For example, the exogenous genetic material is added to the early male
25 pronucleus, as soon as possible after the formation of the male pronucleus, which is when the male and female pronuclei are well separated and both are located close to the cell membrane. Alternatively, the exogenous genetic material could be added to the nucleus of the sperm after it has been induced to undergo decondensation. Sperm containing the exogenous genetic material can then be added to the ovum or the decondensed sperm could
30 be added to the ovum with the transgene constructs being added as soon as possible thereafter.

Introduction of the transgene nucleotide sequence into the embryo may be accomplished by any means known in the art such as, for example, microinjection,

WO 02/053743

PCT/US02/00070

electroporation, or lipofection. Following introduction of the transgene nucleotide sequence into the embryo, the embryo may be incubated in vitro for varying amounts of time, or reimplanted into the surrogate host, or both. In vitro incubation to maturity is within the scope of this invention. One common method in to incubate the embryos in vitro for about
5 1-7 days, depending on the species, and then reimplant them into the surrogate host.

For the purposes of this invention a zygote is essentially the formation of a diploid cell which is capable of developing into a complete organism. Generally, the zygote will be comprised of an egg containing a nucleus formed, either naturally or artificially, by the fusion of two haploid nuclei from a gamete or gametes. Thus, the gamete nuclei must be
10 ones which are naturally compatible, i.e., ones which result in a viable zygote capable of undergoing differentiation and developing into a functioning organism. Generally, a euploid zygote is preferred. If an aneuploid zygote is obtained, then the number of chromosomes should not vary by more than one with respect to the euploid number of the organism from which either gamete originated.

In addition to similar biological considerations, physical ones also govern the amount (e.g., volume) of exogenous genetic material which can be added to the nucleus of the zygote or to the genetic material which forms a part of the zygote nucleus. If no genetic material is removed, then the amount of exogenous genetic material which can be added is limited by the amount which will be absorbed without being physically disruptive.
20 Generally, the volume of exogenous genetic material inserted will not exceed about 10 picoliters. The physical effects of addition must not be so great as to physically destroy the viability of the zygote. The biological limit of the number and variety of DNA sequences will vary depending upon the particular zygote and functions of the exogenous genetic material and will be readily apparent to one skilled in the art, because the genetic material,
25 including the exogenous genetic material, of the resulting zygote must be biologically capable of initiating and maintaining the differentiation and development of the zygote into a functional organism.

The number of copies of the transgene constructs which are added to the zygote is dependent upon the total amount of exogenous genetic material added and will be the
30 amount which enables the genetic transformation to occur. Theoretically only one copy is required; however, generally, numerous copies are utilized, for example, 1,000-20,000 copies of the transgene construct, in order to insure that one copy is functional. As regards the present invention, there will often be an advantage to having more than one functioning

WO 02/053743

PCT/US02/00070

copy of each of the inserted exogenous DNA sequences to enhance the phenotypic expression of the exogenous DNA sequences.

Any technique which allows for the addition of the exogenous genetic material into nucleic genetic material can be utilized so long as it is not destructive to the cell, nuclear
5 membrane or other existing cellular or genetic structures. The exogenous genetic material is preferentially inserted into the nucleic genetic material by microinjection. Microinjection of cells and cellular structures is known and is used in the art.

Reimplantation is accomplished using standard methods. Usually, the surrogate host is anesthetized, and the embryos are inserted into the oviduct. The number of embryos
10 implanted into a particular host will vary by species, but will usually be comparable to the number of off spring the species naturally produces.

Transgenic offspring of the surrogate host may be screened for the presence and/or expression of the transgene by any suitable method. Screening is often accomplished by Southern blot or Northern blot analysis, using a probe that is complementary to at least a
15 portion of the transgene. Western blot analysis using an antibody against the protein encoded by the transgene may be employed as an alternative or additional method for screening for the presence of the transgene product. Typically, DNA is prepared from tail tissue and analyzed by Southern analysis or PCR for the transgene. Alternatively, the tissues or cells believed to express the transgene at the highest levels are tested for the
20 presence and expression of the transgene using Southern analysis or PCR, although any tissues or cell types may be used for this analysis.

Alternative or additional methods for evaluating the presence of the transgene include, without limitation, suitable biochemical assays such as enzyme and/or immunological assays, histological stains for particular marker or enzyme activities, flow
25 cytometric analysis, and the like. Analysis of the blood may also be useful to detect the presence of the transgene product in the blood, as well as to evaluate the effect of the transgene on the levels of various types of blood cells and other blood constituents.

Progeny of the transgenic animals may be obtained by mating the transgenic animal with a suitable partner, or by in vitro fertilization of eggs and/or sperm obtained from the
30 transgenic animal. Where mating with a partner is to be performed, the partner may or may not be transgenic and/or a knockout; where it is transgenic, it may contain the same or a different transgene, or both. Alternatively, the partner may be a parental line. Where in vitro fertilization is used, the fertilized embryo may be implanted into a surrogate host or

WO 02/053743

PCT/US02/00070

incubated in vitro, or both. Using either method, the progeny may be evaluated for the presence of the transgene using methods described above, or other appropriate methods.

The transgenic animals produced in accordance with the present invention will include exogenous genetic material. As set out above, the exogenous genetic material will, in certain embodiments, be a DNA sequence which results in the production of a htrb protein (either agonistic or antagonistic), and antisense transcript, or a htrb mutant. Further, in such embodiments the sequence will be attached to a transcriptional control element, e.g., a promoter, which preferably allows the expression of the transgene product in a specific type of cell.

- 10 Retroviral infection can also be used to introduce transgene into a non-human animal. The developing non-human embryo can be cultured in vitro to the blastocyst stage. During this time, the blastomeres can be targets for retroviral infection (Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264). Efficient infection of the blastomeres is obtained by enzymatic treatment to remove the zona pellucida (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds. 15 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986). The viral vector system used to introduce the transgene is typically a replication-defective retrovirus carrying the transgene (Jahner et al. (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Putten et al. (1985) PNAS 82:6148-6152). Transfection is easily and efficiently obtained by culturing the blastomeres on a monolayer of virus-producing cells (Van der Putten, supra; Stewart et al. (1987) 20 EMBO J. 6:383-388). Alternatively, infection can be performed at a later stage. Virus or virus-producing cells can be injected into the blastocoele (Jahner et al. (1982) Nature 298:623-628). Most of the founders will be mosaic for the transgene since incorporation occurs only in a subset of the cells which formed the transgenic non-human animal. Further, the founder may contain various retroviral insertions of the transgene at different positions 25 in the genome which generally will segregate in the offspring. In addition, it is also possible to introduce transgenes into the germ line by intrauterine retroviral infection of the midgestation embryo (Jahner et al. (1982) supra).

- A third type of target cell for transgene introduction is the embryonal stem cell (ES). ES cells are obtained from pre-implantation embryos cultured in vitro and fused with 30 embryos (Evans et al. (1981) Nature 292:154-156; Bradley et al. (1984) Nature 309:255-258; Gossler et al. (1986) PNAS 83: 9065-9069; and Robertson et al. (1986) Nature 322:445-448). Transgenes can be efficiently introduced into the ES cells by DNA transfection or by retrovirus-mediated transduction. Such transformed ES cells can

WO 02/053743

PCT/US02/00070

thereafter be combined with blastocysts from a non-human animal. The ES cells thereafter colonize the embryo and contribute to the germ line of the resulting chimeric animal. For review see Jaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474.

4.7. Screening Assays for htrb Therapeutics

5 The invention further provides screening methods for identifying htrb therapeutics, e.g., for treating and/or preventing the development of diseases or conditions caused by, or contributed to by an abnormal htrb activity or which can benefit from a modulation of an htrb activity or protein level. Examples of such diseases, conditions or disorders such as those involving the inflammatory response including without limitation: rheumatoid
10 arthritis, inflammatory bowel disorder, Type I diabetes, psoriasis, osteoporosis, nephropathy in diabetes mellitus, alopecia areata, Graves disease, systemic lupus erythematosus, lichen sclerosis, ulcerative colitis, coronary artery disease, arteritic disorders, diabetic retinopathy, low birth weight, pregnancy complications, severe periodontal disease, psoriasis and insulin dependent diabetes, but is particularly
15 characterized by arteritic lesions, cancer e.g., cancers involving the growth of steroid hormone-responsive tumors (e.g. breast, prostate, or testicular cancer), vascular diseases or disorders (e.g. thrombotic stroke, ischemic stroke, as well as peripheral vascular disease resulting from atherosclerotic and thrombotic processes), cardiac disorders (e.g., myocardial infarction, congestive heart failure, unstable angina and ischemic heart disease);
20 and cardiovascular system diseases and disorders (e.g. those resulting from hypertension, hypotension, cardiomyocyte hypertrophy and congestive heart failure) or other diseases conditions or disorders which result from aberrations or alterations of htrb-dependent processes.

An htrb therapeutic can be any type of compound, including a protein, a peptide,
25 peptidomimetic, small molecule, and nucleic acid. A nucleic acid can be, e.g., a gene, an antisense nucleic acid, a ribozyme, or a triplex molecule. An htrb therapeutic of the invention can be an agonist or an antagonist. Preferred htrb agonists include htrb proteins or derivatives thereof which mimic at least one htrb activity, e.g., fibroblast growth factor receptor binding or heparin sulfate binding. Other preferred agonists include compounds
30 which are capable of increasing the production of an htrb protein in a cell, e.g., compounds capable of up-regulating the expression of an htrb gene, and compounds which are capable of enhancing an htrb activity and/or the interaction of an htrb protein with another molecule, such as a target peptide. Preferred htrb antagonists include htrb proteins which

WO 02/053743

PCT/US02/00070

are dominant negative proteins, which, e.g., are capable of binding to fibroblast growth factor receptors, but not heparin sulfate. Other preferred antagonists include compounds which decrease or inhibit the production of an htrb protein in a cell and compounds which are capable of downregulating expression of an htrb gene, and compounds which are

5 capable of downregulating an htrb activity and/or interaction of an htrb protein with another molecule. In another preferred embodiment, an htrb antagonist is a modified form of a target peptide, which is capable of interacting with the FGFR binding domain of an htrb protein, but which does not have biological activity, e.g., which is not itself a cell surface receptor.

10 The invention also provides screening methods for identifying htrb therapeutics which are capable of binding to an htrb protein, e.g., a wild-type htrb protein or a mutated form of an htrb protein, and thereby modulate the growth factor activity of htrb or otherwise cause the degradation of htrb. For example, such an htrb therapeutic can be an antibody or derivative thereof which interacts specifically with an htrb protein (either wild-

15 type or mutated).

Thus, the invention provides screening methods for identifying htrb agonist and antagonist compounds, comprising selecting compounds which are capable of interacting with an htrb protein or with a molecule capable of interacting with an htrb protein such as an FGF receptor and/or heparin sulfate and/or a compound which is capable of modulating

20 the interaction of an htrb protein with another molecule, such as a receptor and/or heparin sulfate. In general, a molecule which is capable of interacting with an htrb protein is referred to herein as "htrb binding partner".

The compounds of the invention can be identified using various assays depending on the type of compound and activity of the compound that is desired. In addition, as

25 described herein, the test compounds can be further tested in animal models. Set forth below are at least some assays that can be used for identifying htrb therapeutics. It is within the skill of the art to design additional assays for identifying htrb therapeutics.

4.7.1. Cell-free assays

Cell-free assays can be used to identify compounds which are capable of interacting

30 with an htrb protein or binding partner, to thereby modify the activity of the htrb protein or binding partner. Such a compound can, e.g., modify the structure of an htrb protein or binding partner and thereby effect its activity. Cell-free assays can also be used to identify compounds which modulate the interaction between an htrb protein and an htrb binding

WO 02/053743

PCT/US02/00070

partner, such as a target peptide. In a preferred embodiment, cell-free assays for identifying such compounds consist essentially in a reaction mixture containing an htrb protein and a test compound or a library of test compounds in the presence or absence of a binding partner. A test compound can be, e.g., a derivative of an htrb binding partner, e.g., a

5 biologically inactive target peptide, or a small molecule.

Accordingly, one exemplary screening assay of the present invention includes the steps of contacting an htrb protein or functional fragment thereof or an htrb binding partner with a test compound or library of test compounds and detecting the formation of complexes. For detection purposes, the molecule can be labeled with a specific marker and

10 the test compound or library of test compounds labeled with a different marker. Interaction of a test compound with an htrb protein or fragment thereof or htrb binding partner can then be detected by determining the level of the two labels after an incubation step and a washing step. The presence of two labels after the washing step is indicative of an interaction.

An interaction between molecules can also be identified by using real-time BIA (Biomolecular Interaction Analysis, Pharmacia Biosensor AB) which detects surface plasmon resonance (SPR), an optical phenomenon. Detection depends on changes in the mass concentration of macromolecules at the biospecific interface, and does not require any labeling of interactants. In one embodiment, a library of test compounds can be

20 immobilized on a sensor surface, e.g., which forms one wall of a micro-flow cell. A solution containing the htrb protein, functional fragment thereof, htrb analog or htrb binding partner is then flown continuously over the sensor surface. A change in the resonance angle as shown on a signal recording, indicates that an interaction has occurred. This technique is further described, e.g., in BIA technology Handbook by Pharmacia.

Another exemplary screening assay of the present invention includes the steps of (a) forming a reaction mixture including: (i) an htrb polypeptide, (ii) an htrb binding partner, and (iii) a test compound; and (b) detecting interaction of the htrb and the htrb binding protein. The htrb polypeptide and htrb binding partner can be produced recombinantly, purified from a source, e.g., plasma, or chemically synthesized, as described herein. A

30 statistically significant change (potentiation or inhibition) in the interaction of the htrb and htrb binding protein in the presence of the test compound, relative to the interaction in the absence of the test compound, indicates a potential agonist (mimetic or potentiator) or antagonist (inhibitor) of htrb bioactivity for the test compound. The compounds of this

WO 02/053743

PCT/US02/00070

assay can be contacted simultaneously. Alternatively, an htrb protein can first be contacted with a test compound for an appropriate amount of time, following which the htrb binding partner is added to the reaction mixture. The efficacy of the compound can be assessed by generating dose response curves from data obtained using various concentrations of the test compound. Moreover, a control assay can also be performed to provide a baseline for comparison. In the control assay, isolated and purified htrb polypeptide or binding partner is added to a composition containing the htrb binding partner or htrb polypeptide, and the formation of a complex is quantitated in the absence of the test compound.

Complex formation between an htrb protein and an htrb binding partner may be detected by a variety of techniques. Modulation of the formation of complexes can be quantitated using, for example, detectably labeled proteins such as radiolabeled, fluorescently labeled, or enzymatically labeled htrb proteins or htrb binding partners, by immunoassay, or by chromatographic detection.

Typically, it will be desirable to immobilize either htrb or its binding partner to facilitate separation of complexes from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of htrb to an htrb binding partner, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples include microtitre plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows the protein to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/htrb (GST/htrb) fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the htrb binding partner, e.g. an 35S-labeled htrb binding partner, and the test compound, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation, e.g. at physiological conditions for salt and pH, though slightly more stringent conditions may be desired. Following incubation, the beads are washed to remove any unbound label, and the matrix immobilized and radiolabel determined directly (e.g. beads placed in scintillant), or in the supernatant after the complexes are subsequently dissociated. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, separated by SDS-PAGE, and the level of htrb protein or htrb binding partner found in the bead fraction quantitated from the gel using standard electrophoretic techniques such as described in the appended examples.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices are also available for use in the subject assay. For instance, either htrb or its cognate binding partner can be

WO 02/053743

PCT/US02/00070

immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. For instance, biotinylated htrb molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical).

- 5 Alternatively, antibodies reactive with htrb can be derivatized to the wells of the plate, and htrb trapped in the wells by antibody conjugation. As above, preparations of an htrb binding protein and a test compound are incubated in the htrb presenting wells of the plate, and the amount of complex trapped in the well can be quantitated. Exemplary methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized
- 10 complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the htrb binding partner, or which are reactive with htrb protein and compete with the binding partner; as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the binding partner, either intrinsic or extrinsic activity. In the instance of the latter, the enzyme can be chemically conjugated or provided as a fusion protein with the
- 15 htrb binding partner. To illustrate, the htrb binding partner can be chemically cross-linked or genetically fused with horseradish peroxidase, and the amount of polypeptide trapped in the complex can be assessed with a chromogenic substrate of the enzyme, e.g. 3,3'-diamino-benzadine tetrahydrochloride or 4-chloro-1-naphthol. Likewise, a fusion protein comprising the polypeptide and glutathione-S-transferase can be provided, and complex
- 20 formation quantitated by detecting the GST activity using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (Habig et al (1974) J Biol Chem 249:7130).

- For processes which rely on immunodetection for quantitating one of the proteins trapped in the complex, antibodies against the protein, such as anti-htrb antibodies, can be used. Alternatively, the protein to be detected in the complex can be "epitope tagged" in
- 25 the form of a fusion protein which includes, in addition to the htrb sequence, a second polypeptide for which antibodies are readily available (e.g. from commercial sources). For instance, the GST fusion proteins described above can also be used for quantification of binding using antibodies against the GST moiety. Other useful epitope tags include myc-epitopes (e.g., see Ellison et al. (1991) J Biol Chem 266:21150-21157) which includes a 10-
- 30 residue sequence from c-myc, as well as the pFLAG system (International Biotechnologies, Inc.) or the pEZZ-protein A system (Pharmacia, NJ).

Cell-free assays can also be used to identify compounds which interact with an htrb protein and modulate an activity of an htrb protein. Accordingly, in one embodiment, an

WO 02/053743

PCT/US02/00070

htrb protein is contacted with a test compound and the catalytic activity of htrb is monitored. In one embodiment, the ability of htrb to bind a target molecule is determined. The binding affinity of htrb to a target molecule can be determined according to methods known in the art.

5 4.7.2. Cell based assays

In addition to cell-free assays, such as described above, htrb proteins as provided by the present invention, facilitate the generation of cell-based assays, e.g., for identifying small molecule agonists or antagonists. In one embodiment, a cell expressing an htrb receptor protein on the outer surface of its cellular membrane is incubated in the presence
10 of a test compound alone or in the presence of a test compound and an htrb protein and the interaction between the test compound and the htrb receptor protein or between the htrb protein (preferably a tagged htrb protein) and the htrb receptor is detected, e.g., by using a microphysiometer (McConnell et al. (1992) Science 257:1906). An interaction between the htrb receptor protein and either the test compound or the htrb protein is detected by the
15 microphysiometer as a change in the acidification of the medium. This assay system thus provides a means of identifying molecular antagonists which, for example, function by interfering with htrb - htrb receptor interactions, as well as molecular agonist which, for example, function by activating an htrb receptor.

Cell based assays can also be used to identify compounds which modulate
20 expression of an htrb gene, modulate translation of an htrb mRNA, or which modulate the stability of an htrb mRNA or protein. Accordingly, in one embodiment, a cell which is capable of producing htrb, e.g., a choriocarcinoma cell line such as JBG-3, is incubated with a test compound and the amount of htrb produced in the cell medium is measured and compared to that produced from a cell which has not been contacted with the test
25 compound. The specificity of the compound vis a vis htrb can be confirmed by various control analysis, e.g., measuring the expression of one or more control genes. Compounds which can be tested include small molecules, proteins, and nucleic acids. In particular, this assay can be used to determine the efficacy of htrb antisense molecules or ribozymes.

In another embodiment, the effect of a test compound on transcription of an htrb
30 gene is determined by transfection experiments using a reporter gene operatively linked to at least a portion of the promoter of an htrb gene. A promoter region of a gene can be isolated, e.g., from a genomic library according to methods known in the art. The reporter

WO 02/053743

PCT/US02/00070

gene can be any gene encoding a protein which is readily quantifiable, e.g. the luciferase or CAT gene. Such reporter gene are well known in the art.

In preferred embodiments, the invention provides cell-based assays employing the choriocarcinoma cell line JEG-3. Analysis of this cell line has shown that it produces a 17 kDa htrb polypeptide which is immunoprecipitated with rabbit anti-htrb polyclonal antiserum. Accordingly, this cell line can be adapted for screening assays for agents which up-regulate or down-regulate the expression of the htrb gene or otherwise affect the steady-state level of an htrb polypeptide(s) or the efficiency of an htrb polypeptide post-translational activity such as an htrb proteolytic processing event, htrb glycosylation, htrb phosphorylation or htrb secretion.

Other cell-based screening assays which can be employed in the method of the present invention are known or would be apparent to one of skill in the art. For example, htrb agonists and antagonists may be identified by their ability to affect downstream AP-1 dependent transcriptional activation. AP-1 dependent activation occurs by multiple mechanisms.

This invention further pertains to novel agents identified by the above-described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

4.8. Predictive Medicine

The invention further features predictive medicines, which are based, at least in part, on the identity of the novel htrb genes and alterations in the genes and related pathway genes, which affect the expression level and/or function of the encoded htrb protein in a subject.

For example, information obtained using the diagnostic assays described herein (alone or in conjunction with information on another genetic defect, which contributes to the same disease) is useful for diagnosing or confirming that a symptomatic subject (e.g. a subject symptomatic for inflammatory rheumatoid arthritis), has a genetic defect (e.g. in an htrb gene or in a gene that regulates the expression of an htrb gene), which causes or contributes to the particular disease or disorder. Alternatively, the information (alone or in conjunction with information on another genetic defect, which contributes to the same disease) can be used prognostically for predicting whether a non-symptomatic subject is likely to develop a disease or condition, which is caused by or contributed to by an abnormal htrb activity or protein level in a subject. Based on the prognostic information, a

WO 02/053743

PCT/US02/00070

doctor can recommend a regimen (e.g. diet or exercise) or therapeutic protocol, useful for preventing or prolonging onset of the particular disease or condition in the individual.

In addition, knowledge of the particular alteration or alterations, resulting in defective or deficient htrb genes or proteins in an individual (the htrb genetic profile), alone or in conjunction with information on other genetic defects contributing to the same disease (the genetic profile of the particular disease) allows customization of therapy for a particular disease to the individual's genetic profile, the goal of "pharmacogenomics". For example, an individual's htrb genetic profile or the genetic profile of a disease or condition, to which htrb genetic alterations cause or contribute, can enable a doctor to 1) more effectively prescribe a drug that will address the molecular basis of the disease or condition; and 2) better determine the appropriate dosage of a particular drug. For example, the expression level of htrb proteins, alone or in conjunction with the expression level of other genes, known to contribute to the same disease, can be measured in many patients at various stages of the disease to generate a transcriptional or expression profile of the disease. Expression patterns of individual patients can then be compared to the expression profile of the disease to determine the appropriate drug and dose to administer to the patient.

The ability to target populations expected to show the highest clinical benefit, based on the htrb or disease genetic profile, can enable: 1) the repositioning of marketed drugs with disappointing market results; 2) the rescue of drug candidates whose clinical development has been discontinued as a result of safety or efficacy limitations, which are patient subgroup-specific; and 3) an accelerated and less costly development for drug candidates and more optimal drug labeling (e.g. since the use of htrb as a marker is useful for optimizing effective dose).

These and other methods are described in further detail in the following sections.

4.8.1. Prognostic and Diagnostic Assays

The present methods provide means for determining if a subject has (diagnostic) or is at risk of developing (prognostic) a disease, condition or disorder that is associated with an aberrant htrb activity, e.g., an aberrant level of htrb protein or an aberrant htrb bioactivity. Examples of such diseases, conditions or disorders include without limitation: inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disorder, psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis and alopecia areata as well as diabetic nephropathy; cancers involving the growth factor cytokines or steroid hormone-responsive

WO 02/053743

PCT/US02/00070

tumors (e.g. breast, prostate, or testicular cancer); vascular diseases or disorders (e.g. thrombotic stroke, ischemic stroke, as well as peripheral vascular disease resulting from atherosclerotic and thrombotic processes); cardiac disorders (e.g. myocardial infarction, unstable angina and ischemic heart disease); cardiovascular system diseases and disorders

5 (e.g. those resulting from hypertension, hypotension, cardiomyocyte hypertrophy and congestive heart failure) wound healing; limb regeneration; neurological damage or disease (e.g. that associated with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, AIDS-related complex, or cerebral palsy); or other diseases conditions or disorders which result from aberrations or alterations of htrb-dependent processes including: collateral growth and remodeling of

10 cardiac blood vessels, angiogenesis, cellular transformation through autocrine or paracrine mechanisms, chemotactic stimulation of cells (e.g. endothelial), neurite outgrowth of neuronal precursor cell types (e.g. PC12 pheochromocytoma), maintenance of neural physiology of mature neurons, proliferation of embryonic mesenchyme and limb-bud precursor tissue, mesoderm induction and other developmental processes, stimulation of

15 collagenase and plasminogen activator secretion, tumor vascularization, as well as tumor invasion and metastasis.

Accordingly, the invention provides methods for determining whether a subject has or is likely to develop, a disease or condition that is caused by or contributed to by an abnormal htrb level or bioactivity, for example, comprising determining the level of an htrb

20 gene or protein, an htrb bioactivity and/or the presence of a mutation or particular polymorphic variant in the htrb gene.

In one embodiment, the method comprises determining whether a subject has an abnormal mRNA and/or protein level of htrb, such as by Northern blot analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), in situ hybridization,

25 immunoprecipitation, Western blot hybridization, or immunohistochemistry. According to the method, cells are obtained from a subject and the htrb protein or mRNA level is determined and compared to the level of htrb protein or mRNA level in a healthy subject. An abnormal level of htrb polypeptide or mRNA level is likely to be indicative of an aberrant htrb activity.

30 In another embodiment, the method comprises measuring at least one activity of htrb. For example, the affinity of htrb for heparin, can be determined, e.g., as described herein. Similarly, the constant of affinity of an htrb protein of a subject with a binding partner (e.g. an IL-1 type I or type II receptor) can be determined. Comparison of the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

results obtained with results from similar analysis performed on htrb proteins from healthy subjects is indicative of whether a subject has an abnormal htrb activity.

In preferred embodiments, the methods for determining whether a subject has or is at risk for developing a disease, which is caused by or contributed to by an aberrant htrb activity is characterized as comprising detecting, in a sample of cells from the subject, the presence or absence of a genetic alteration characterized by at least one of (i) an alteration affecting the integrity of a gene encoding an htrb polypeptide, or (ii) the mis-expression of the htrb gene. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of (i) a deletion of one or more nucleotides from an htrb gene, (ii) an addition of one or more nucleotides to an htrb gene, (iii) a substitution of one or more nucleotides of an htrb gene, (iv) a gross chromosomal rearrangement of an htrb gene, (v) a gross alteration in the level of a messenger RNA transcript of an htrb gene, (vii) aberrant modification of an htrb gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, (vii) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of an htrb gene, (viii) a non-wild type level of an htrb polypeptide, (ix) allelic loss of an htrb gene, and/or (x) inappropriate post-translational modification of an htrb polypeptide. As set out below, the present invention provides a large number of assay techniques for detecting alterations in an htrb gene. These methods include, but are not limited to, methods involving sequence analysis, Southern blot hybridization, restriction enzyme site mapping, and methods involving detection of absence of nucleotide pairing between the nucleic acid to be analyzed and a probe. These and other methods are further described infra.

Specific diseases or disorders, e.g., genetic diseases or disorders, are associated with specific allelic variants of polymorphic regions of certain genes, which do not necessarily encode a mutated protein. Thus, the presence of a specific allelic variant of a polymorphic region of a gene, such as a single nucleotide polymorphism ("SNP"), in a subject can render the subject susceptible to developing a specific disease or disorder. Polymorphic regions in genes, e.g. htrb genes, can be identified, by determining the nucleotide sequence of genes in populations of individuals. If a polymorphic region, e.g., SNP is identified, then the link with a specific disease can be determined by studying specific populations of individuals, e.g., individuals which developed a specific disease, such as congestive heart failure, hypertension, hypotension, or a cancer (e.g. a cancer involving growth of a steroid responsive tumor or tumors). A polymorphic region can be located in any region of a gene, e.g., exons, in coding or non coding regions of exons, introns, and promoter region.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

It is likely that htrb genes comprise polymorphic regions, specific alleles of which may be associated with specific diseases or conditions or with an increased likelihood of developing such diseases or conditions. Thus, the invention provides methods for determining the identity of the allele or allelic variant of a polymorphic region of an htrb gene in a subject, to thereby determine whether the subject has or is at risk of developing a disease or disorder associated with a specific allelic variant of a polymorphic region.

In an exemplary embodiment, there is provided a nucleic acid composition comprising a nucleic acid probe including a region of nucleotide sequence which is capable of hybridizing to a sense or antisense sequence of an htrb gene or naturally occurring mutants thereof, or 5' or 3' flanking sequences or intronic sequences naturally associated with the subject htrb genes or naturally occurring mutants thereof. The nucleic acid of a cell is rendered accessible for hybridization, the probe is contacted with the nucleic acid of the sample, and the hybridization of the probe to the sample nucleic acid is detected. Such techniques can be used to detect alterations or allelic variants at either the genomic or mRNA level, including deletions, substitutions, etc., as well as to determine mRNA transcript levels.

A preferred detection method is allele specific hybridization using probes overlapping the mutation or polymorphic site and having about 5, 10, 20, 25, or 30 nucleotides around the mutation or polymorphic region. In a preferred embodiment of the invention, several probes capable of hybridizing specifically to allelic variants, such as single nucleotide polymorphisms, are attached to a solid phase support, e.g., a "chip". Oligonucleotides can be bound to a solid support by a variety of processes, including lithography. For example a chip can hold up to 250,000 oligonucleotides. Mutation detection analysis using these chips comprising oligonucleotides, also termed "DNA probe arrays" is described e.g., in Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244. In one embodiment, a chip comprises all the allelic variants of at least one polymorphic region of a gene. The solid phase support is then contacted with a test nucleic acid and hybridization to the specific probes is detected. Accordingly, the identity of numerous allelic variants of one or more genes can be identified in a simple hybridization experiment.

In certain embodiments, detection of the alteration comprises utilizing the probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g. U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligase chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegran et al. (1988) Science 241:1077-1080; and Nakazawa et

WO 02/053743

PCT/US02/00070

al. (1994) PNAS 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the htrb gene (see Abravaya et al. (1995) Nuc Acid Res 23:675-682). In a merely illustrative embodiment, the method includes the steps of (i) collecting a sample of cells from a patient, (ii) isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the cells
 5 of the sample, (iii) contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to an htrb gene under conditions such that hybridization and amplification of the htrb gene (if present) occurs, and (iv) detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be
 10 desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli, J.C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, D.Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177),
 15 Q-Beta Replicase (Lizardi, P.M. et al., 1988, Bio/Technology 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

20 In a preferred embodiment of the subject assay, mutations in, or allelic variants, of an htrb gene from a sample cell are identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S.
 25 Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the htrb gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample htrb with the corresponding wild-type (control) sequence.
 30 Exemplary sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxim and Gilbert (Proc. Natl Acad Sci USA (1977) 74:560) or Sanger (Sanger et al (1977) Proc. Nat. Acad. Sci 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures may be utilized when performing the subject assays (Biotechniques

WO 02/053743

PCT/US02/00070

(1995) 19:448), including sequencing by mass spectrometry (see, for example PCT publication WO 94/16101; Cohen et al. (1996) *Adv Chromatogr* 36:127-162; and Griffin et al. (1993) *Appl Biochem Biotechnol* 38:147-159). It will be evident to one skilled in the art that, for certain embodiments, the occurrence of only one, two or three of the nucleic acid
 5 bases need be determined in the sequencing reaction. For instance, A-track or the like, e.g., where only one nucleic acid is detected, can be carried out.

In a further embodiment, protection from cleavage agents (such as a nuclease, hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine) can be used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA or DNA/DNA heteroduplexes (Myers, et al. (1985)
 10 *Science* 230:1242). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labelled) RNA or DNA containing the wild-type htrb sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to base pair mismatches
 15 between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digest the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is
 20 then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for example, Cotton et al (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397; Saleeba et al (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more
 25 proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in htrb cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu et al. (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). According to an
 30 exemplary embodiment, a probe based on an htrb sequence, e.g., a wild-type htrb sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. Patent No. 5,459,039.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations or the identity of the allelic variant of a polymorphic region in htrb genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766, see also Cotton (1993) Mutat Res 285:125-144; and Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control htrb nucleic acids are denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments may be labelled or detected with labelled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen et al. (1991) Trends Genet 7:5).

In yet another embodiment, the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers et al (1985) Nature 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing agent gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265:12753).

Examples of other techniques for detecting point mutations or the identity of the allelic variant of a polymorphic region include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation or nucleotide difference (e.g., in allelic variants) is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions which permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki et al. (1986) Nature 324:163; Saiki et al (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230). Such allele specific oligonucleotide hybridization techniques may be used to test one mutation or polymorphic region per reaction when oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations or polymorphic regions when the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labelled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology which depends on selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides
5 used as primers for specific amplification may carry the mutation or polymorphic region of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs et al (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner (1993) Tibtech 11:238. In addition it may be desirable to
10 introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini et al (1992) Mol. Cell Probes 6:1). It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189). In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the
15 presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

In another embodiment, identification of the allelic variant is carried out using an oligonucleotide ligation assay (OLA), as described, e.g., in U.S. Pat. No. 4,998,617 and in Landegren, U. et al., Science 241:1077-1080 (1988). The OLA protocol uses two
20 oligonucleotides which are designed to be capable of hybridizing to abutting sequences of a single strand of a target. One of the oligonucleotides is linked to a separation marker, e.g., biotinylated, and the other is detectably labeled. If the precise complementary sequence is found in a target molecule, the oligonucleotides will hybridize such that their termini abut, and create a ligation substrate. Ligation then permits the labeled oligonucleotide to be
25 recovered using avidin, or another biotin ligand. Nickerson, D. A. et al. have described a nucleic acid detection assay that combines attributes of PCR and OLA (Nickerson, D. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:8923-8927 (1990). In this method, PCR is used to achieve the exponential amplification of target DNA, which is then detected using OLA.

Several techniques based on this OLA method have been developed and can be used
30 to detect specific allelic variants of a polymorphic region of an htrb gene. For example, U.S. Patent No. 5,593,826 discloses an OLA using an oligonucleotide having 3'-amino group and a 5'-phosphorylated oligonucleotide to form a conjugate having a phosphoramidate linkage. In another variation of OLA described in Tobe et al. ((1996)

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Nucleic Acids Res 24: 3728), OLA combined with PCR permits typing of two alleles in a single microtiter well. By marking each of the allele-specific primers with a unique hapten, i.e. digoxigenin and fluorescein, each OLA reaction can be detected by using hapten specific antibodies that are labeled with different enzyme reporters, alkaline phosphatase or
5 horseradish peroxidase. This system permits the detection of the two alleles using a high throughput format that leads to the production of two different colors.

The invention further provides methods for detecting single nucleotide polymorphisms in an htrb gene. Because single nucleotide polymorphisms constitute sites of variation flanked by regions of invariant sequence, their analysis requires no more than
10 the determination of the identity of the single nucleotide present at the site of variation and it is unnecessary to determine a complete gene sequence for each patient. Several methods have been developed to facilitate the analysis of such single nucleotide polymorphisms.

In one embodiment, the single base polymorphism can be detected by using a specialized exonuclease-resistant nucleotide, as disclosed, e.g., in Mundy, C. R. (U.S. Pat.
15 No.4,656,127). According to the method, a primer complementary to the allelic sequence immediately 3' to the polymorphic site is permitted to hybridize to a target molecule obtained from a particular animal or human. If the polymorphic site on the target molecule contains a nucleotide that is complementary to the particular exonuclease-resistant nucleotide derivative present, then that derivative will be incorporated onto the end of the
20 hybridized primer. Such incorporation renders the primer resistant to exonuclease, and thereby permits its detection. Since the identity of the exonuclease-resistant derivative of the sample is known, a finding that the primer has become resistant to exonucleases reveals that the nucleotide present in the polymorphic site of the target molecule was complementary to that of the nucleotide derivative used in the reaction. This method has the
25 advantage that it does not require the determination of large amounts of extraneous sequence data.

In another embodiment of the invention, a solution-based method is used for determining the identity of the nucleotide of a polymorphic site. Cohen, D. et al. (French Patent 2,650,840; PCT Appln. No. WO91/02087). As in the Mundy method of U.S. Pat.
30 No. 4,656,127, a primer is employed that is complementary to allelic sequences immediately 3' to a polymorphic site. The method determines the identity of the nucleotide of that site using labeled dideoxynucleotide derivatives, which, if complementary to the

WO 02/053743

PCT/US02/00070

nucleotide of the polymorphic site will become incorporated onto the terminus of the primer.

An alternative method, known as Genetic Bit Analysis or GBA™ is described by Goelet, P. et al. (PCT Appln. No. 92/15712). The method of Goelet, P. et al. uses mixtures of labeled terminators and a primer that is complementary to the sequence 3' to a polymorphic site. The labeled terminator that is incorporated is thus determined by, and complementary to, the nucleotide present in the polymorphic site of the target molecule being evaluated. In contrast to the method of Cohen et al. (French Patent 2,650,840; PCT Appln. No. WO91/02087) the method of Goelet, P. et al. is preferably a heterogeneous phase assay, in which the primer or the target molecule is immobilized to a solid phase.

Recently, several primer-guided nucleotide incorporation procedures for assaying polymorphic sites in DNA have been described (Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A. -C., et al., Genomics 8:684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1:159-164 (1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)). These methods differ from GBA™ in that they all rely on the incorporation of labeled deoxynucleotides to discriminate between bases at a polymorphic site. In such a format, since the signal is proportional to the number of deoxynucleotides incorporated, polymorphisms that occur in runs of the same nucleotide can result in signals that are proportional to the length of the run (Syvanen, A. -C., et al., Amer.J. Hum. Genet. 52:46-59 (1993)).

For mutations that produce premature termination of protein translation, the protein truncation test (PTT) offers an efficient diagnostic approach (Roest, et. al., (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1719-21; van der Luijt, et. al., (1994) Genomics 20:1-4). For PTT, RNA is initially isolated from available tissue and reverse-transcribed, and the segment of interest is amplified by PCR. The products of reverse transcription PCR are then used as a template for nested PCR amplification with a primer that contains an RNA polymerase promoter and a sequence for initiating eukaryotic translation. After amplification of the region of interest, the unique motifs incorporated into the primer permit sequential in vitro transcription and translation of the PCR products. Upon sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of translation products, the appearance of truncated polypeptides signals the presence of a mutation that causes premature termination of

WO 02/053743

PCT/US02/00070

translation. In a variation of this technique, DNA (as opposed to RNA) is used as a PCR template when the target region of interest is derived from a single exon.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid, primer set; and/or
5 antibody reagent described herein, which may be conveniently used, e.g., in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving an htrb polypeptide.

Any cell type or tissue may be utilized in the diagnostics described below. In a preferred embodiment a bodily fluid, e.g., blood, is obtained from the subject to determine
10 the presence of a mutation or the identity of the allelic variant of a polymorphic region of an htrb gene. A bodily fluid, e.g., blood, can be obtained by known techniques (e.g. venipuncture). Alternatively, nucleic acid tests can be performed on dry samples (e.g. hair or skin). For prenatal diagnosis, fetal nucleic acid samples can be obtained from maternal blood as described in International Patent Application No. WO91/07660 to Bianchi.
15 Alternatively, amniocytes or chorionic villi may be obtained for performing prenatal testing.

When using RNA or protein to determine the presence of a mutation or of a specific allelic variant of a polymorphic region of an htrb gene, the cells or tissues that may be utilized must express the htrb gene. Preferred cells for use in these methods include cardiac
20 cells (see Examples). Alternative cells or tissues that can be used, can be identified by determining the expression pattern of the specific htrb gene in a subject, such as by Northern blot analysis.

Diagnostic procedures may also be performed in situ directly upon tissue sections (fixed and/or frozen) of patient tissue obtained from biopsies or resections, such that no
25 nucleic acid purification is necessary. Nucleic acid reagents may be used as probes and/or primers for such in situ procedures (see, for example, Nuovo, G.J., 1992, PCR in situ hybridization: protocols and applications, Raven Press, NY).

In addition to methods which focus primarily on the detection of one nucleic acid sequence, profiles may also be assessed in such detection schemes. Fingerprint profiles
30 may be generated, for example, by utilizing a differential display procedure, Northern analysis and/or RT-PCR.

Antibodies directed against wild type or mutant htrb polypeptides or allelic variants thereof, which are discussed above, may also be used in disease diagnostics and

WO 02/053743

PCT/US02/00070

prognostics. Such diagnostic methods, may be used to detect abnormalities in the level of htrb polypeptide expression, or abnormalities in the structure and/or tissue, cellular, or subcellular location of an htrb polypeptide. Structural differences may include, for example, differences in the size, electronegativity, or antigenicity of the mutant htrb polypeptide relative to the normal htrb polypeptide. Protein from the tissue or cell type to be analyzed may easily be detected or isolated using techniques which are well known to one of skill in the art, including but not limited to western blot analysis. For a detailed explanation of methods for carrying out Western blot analysis, see Sambrook et al, 1989, supra, at Chapter 18. The protein detection and isolation methods employed herein may also be such as those described in Harlow and Lane, for example, (Harlow, E. and Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), which is incorporated herein by reference in its entirety.

This can be accomplished, for example, by immunofluorescence techniques employing a fluorescently labeled antibody (see below) coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorimetric detection. The antibodies (or fragments thereof) useful in the present invention may, additionally, be employed histologically, as in immunofluorescence or immunoelectron microscopy, for in situ detection of htrb polypeptides. In situ detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient, and applying thereto a labeled antibody of the present invention. The antibody (or fragment) is preferably applied by overlaying the labeled antibody (or fragment) onto a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of the htrb polypeptide, but also its distribution in the examined tissue. Using the present invention, one of ordinary skill will readily perceive that any of a wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to achieve such in situ detection.

Often a solid phase support or carrier is used as a support capable of binding an antigen or an antibody. Well-known supports or carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external

WO 02/053743

PCT/US02/00070

surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports include polystyrene beads. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

- 5 One means for labeling an anti-htrb polypeptide specific antibody is via linkage to an enzyme and use in an enzyme immunoassay (EIA) (Voller, "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", Diagnostic Horizons 2:1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller, et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, (ed.) Enzyme
- 10 Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980; Ishikawa, et al., (eds.) Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo, 1981). The enzyme which is bound to the antibody will react with an appropriate substrate, preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorimetric or by visual means. Enzymes which can be used to
- 15 detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate, dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and
- 20 acetylcholinesterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

- Detection may also be accomplished using any of a variety of other immunoassays.
- 25 For example, by radioactively labeling the antibodies or antibody fragments, it is possible to detect fingerprint gene wild type or mutant peptides through the use of a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, which is incorporated by reference herein). The
- 30 radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography.

It is also possible to label the antibody with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled antibody is exposed to light of the proper wave length, its presence

WO 02/053743

PCT/US02/00070

can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, α -phthaldehyde and fluorescamine.

The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as ^{152}Eu , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

The antibody also can be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, therratic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in, which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

Moreover, it will be understood that any of the above methods for detecting alterations in a gene or gene product or polymorphic variants can be used to monitor the course of treatment or therapy.

4.8.2. Pharmacogenomics

Knowledge of the particular alteration or alterations, resulting in defective or deficient htrb genes or proteins in an individual (the htrb genetic profile), alone or in conjunction with information on other genetic defects contributing to the same disease (the genetic profile of the particular disease) allows a customization of the therapy for a particular disease to the individual's genetic profile, the goal of "pharmacogenomics". For example, subjects having a specific allele of an htrb gene may or may not exhibit symptoms of a particular disease or be predisposed of developing symptoms of a particular disease. Further, if those subjects are symptomatic, they may or may not respond to a certain drug, e.g., a specific htrb therapeutic, but may respond to another. Thus, generation of an htrb genetic profile, (e.g., categorization of alterations in htrb genes which are associated with the development of a particular disease), from a population of subjects, who are

WO 02/053743

PCT/US02/00070

symptomatic for a disease or condition that is caused by or contributed to by a defective and/or deficient htrb gene and/or protein (an htrb genetic population profile) and comparison of an individual's htrb profile to the population profile, permits the selection or design of drugs that are expected to be safe and efficacious for a particular patient or patient population (i.e., a group of patients having the same genetic alteration).

For example, an htrb population profile can be performed, by determining the htrb profile, e.g., the identity of htrb genes, in a patient population having a disease, which is caused by or contributed to by a defective or deficient htrb gene. Optionally, the htrb population profile can further include information relating to the response of the population to an htrb therapeutic, using any of a variety of methods, including, monitoring: 1) the severity of symptoms associated with the htrb related disease, 2) htrb gene expression level, 3) htrb mRNA level, and/or 4) htrb protein level. and (iii) dividing or categorizing the population based on the particular genetic alteration or alterations present in its htrb gene or an htrb pathway gene. The htrb genetic population profile can also, optionally, indicate those particular alterations in which the patient was either responsive or non-responsive to a particular therapeutic. This information or population profile, is then useful for predicting which individuals should respond to particular drugs, based on their individual htrb profile.

In a preferred embodiment, the htrb profile is a transcriptional or expression level profile and step (i) is comprised of determining the expression level of htrb proteins, alone or in conjunction with the expression level of other genes, known to contribute to the same disease. The htrb profile can be measured in many patients at various stages of the disease.

Pharmacogenomic studies can also be performed using transgenic animals. For example, one can produce transgenic mice, e.g., as described herein, which contain a specific allelic variant of an htrb gene. These mice can be created, e.g. by replacing their wild-type htrb gene with an allele of the human htrb gene. The response of these mice to specific htrb therapeutics can then be determined.

4.8.3. Monitoring of Effects of htrb Therapeutics During Clinical Trials

The ability to target populations expected to show the highest clinical benefit, based on the htrb or disease genetic profile, can enable: 1) the repositioning of marketed drugs with disappointing market results; 2) the rescue of drug candidates whose clinical development has been discontinued as a result of safety or efficacy limitations, which are

WO 02/053743

PCT/US02/00070

patient subgroup-specific; and 3) an accelerated and less costly development for drug candidates and more optimal drug labeling (e.g. since the use of htrb as a marker is useful for optimizing effective dose).

- The treatment of an individual with an htrb therapeutic can be monitored by
- 5 determining htrb characteristics, such as htrb protein level or activity, htrb mRNA level, and/or htrb transcriptional level. This measurements will indicate whether the treatment is effective or whether it should be adjusted or optimized. Thus, htrb can be used as a marker for the efficacy of a drug during clinical trials.

- In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring
- 10 the effectiveness of treatment of a subject with an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of (i) obtaining a preadministration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of an htrb protein, mRNA, or genomic DNA in the preadministration
- 15 sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the htrb protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the htrb protein, mRNA, or genomic DNA in the preadministration sample with the htrb protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (vi)
- 20 altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of htrb to higher levels than detected, i.e., to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of htrb to lower levels than detected, i.e., to decrease the effectiveness of the agent.

- 25 Cells of a subject may also be obtained before and after administration of an htrb therapeutic to detect the level of expression of genes other than htrb, to verify that the htrb therapeutic does not increase or decrease the expression of genes which could be deleterious. This can be done, e.g., by using the method of transcriptional profiling. Thus, mRNA from cells exposed in vivo to an htrb therapeutic and mRNA from the same type of
- 30 cells that were not exposed to the htrb therapeutic could be reverse transcribed and hybridized to a chip containing DNA from numerous genes, to thereby compare the expression of genes in cells treated and not treated with an htrb- therapeutic. If, for example

WO 02/053743

PCT/US02/00070

an htrb therapeutic turns on the expression of a proto-oncogene in an individual, use of this particular htrb therapeutic may be undesirable.

4.9. htrb Therapeutics and Methods of Treatment

The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods
 5 of treating a subject having or likely to develop a disorder associated with aberrant
 interleukin-1 expression or activity, e.g., inflammation or autoimmune disorders. The
 cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) are important mediators of
 inflammatory responses, and appear to play a central role in the pathogenesis of many
 chronic inflammatory diseases. It is now well documented that their biological activities in
 10 vivo are sufficient to reproduce local inflammation and matrix catabolism by attracting and
 activating white blood cells to tissues, and stimulating their secretion of other
 lymphocytotropic cytokines and catabolic enzymes. Higher production of these cytokines
 have also been associated with response to infection, where local induction of IL-1 and
 TNF facilitates the elimination of the microbial invasion. Classic studies however also
 15 report that in some infectious conditions very high levels of monocytic cytokines are
 produced, which activate a cascade of concomitant events such as tissue catabolism,
 vascular reactivity and hyper-coagulation with damaging effects on the host.

For example, cytokines function throughout development and may be of particular
 importance in the development and function of the human placenta (reviewed in Jokhi et al.
 20 (1997) Cytokine 9: 126-37). A variety of cytokines have been demonstrated at the
 placental-uterine interface, but the exact cellular sources of production have not yet been
 identified due to the complex tissue topography of the implantation site. The expression of
 the cytokines EGF, interleukin 1 beta (IL-1 beta), IL-2, IL-3, interferon alpha (IFN- alpha),
 IFN-gamma, tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor beta
 25 1 (TGF-beta 1) have been assayed from cells isolated from the placenta and decidua.
 Furthermore, the expression of the cytokine receptors IGF-1r, PDGF-r alpha/beta, IL-1rII,
 IL-6r, IL-7r, IFN-gamma r, TNF-rp80 and endoglin by placental and uterine cells has been
 assessed by both immunohistological and flow cytometric methods. These studies reveal a
 complex array of cytokine activities at the human placental-uterine interface.

30 The pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNFa)
 appear to function in the link between prenatal intrauterine infection (IUI) and neonatal
 brain damage. Furthermore, maternal IUI increases the risk of preterm delivery, which in
 turn is associated with an increased risk of intraventricular hemorrhage, neonatal white

WO 02/053743

PCT/US02/00070

matter damage, and subsequent cerebral palsy (Dammam et al. (1997) *Pediatr Res* 42: 1-8). IL-1, IL-6, and TNF α have been found associated with IUI, preterm birth, neonatal infections, and neonatal brain damage. The presence of such cytokines in the three relevant maternal/fetal compartments (uterus, fetal circulation, and fetal brain) and their potential ability of the cytokines to cross boundaries (both placental and the blood-brain barrier) between these compartments suggests their potential role in intraventricular hemorrhage, neonatal white matter damage during prenatal maternal infection. Therefore interrupting the proinflammatory cytokine cascade mediated by IL-1 might prevent later disability in those born near the end of the second trimester.

Interleukin-1 beta (IL-1 β) is present in normal amniotic fluid and is produced by human placental macrophages. The amount of IL-1 β detected in the second trimester amniotic fluid has been shown to exhibit a threefold increase with the onset of labor. IL-1 β is a potent stimulator of the synthesis of prostaglandins by decidua and by amnion. High levels of the prostaglandins PGE₂ and PGF 2 α in the amniotic fluid have been associated with preterm labor and intraamniotic infection. This may be explained by the fact that amnion from women with preterm labor and histologic chorioamnionitis produced more PGE₂ than amnion from women without placental inflammation. Such elevated levels of PGE₂ have been associated with premature low birth weight (PBLW) even in the absence of clinical or subclinical genitourinary tract infection and indeed the majority of PLBW deliveries may be caused by an infection of unknown origin. IL-1 was the first cytokine implicated in the onset of labor in the presence of infection. IL-1 is produced in vitro by human decidua in response to bacterial products. In patients with preterm labor and bacteria in the amniotic cavity, amniotic fluid IL-1 bioactivity and concentrations are elevated. Placental necrosis and fetal resorption can be induced in rats by the injection of recombinant human IL-1 β on day 12 of gestation. Furthermore, both the amniotic fluid IL-1 β concentration and bioactivity are elevated during labor compared to controls. In addition, IL-1 β is known to stimulate prostaglandin production by amnion and decidua in vitro.

Accordingly, htrb therapeutics of the present invention include those which antagonize interleukin-1 dependent disorders of the human placental including intraventricular hemorrhage, neonatal white matter damage and subsequent cerebral palsy, and the occurrence of premature low birth weight deliveries.

4.9.1. Prophylactic Methods

WO 02/053743

PCT/US02/00070

In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease or condition associated with an aberrant htrb expression or activity by administering to the subject an agent which modulates htrb expression or at least one htrb activity. Subjects at risk for such a disease can be identified by a diagnostic or prognostic assay, e.g., as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the htrb aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of htrb aberrancy, for example, a htrb agonist or htrb antagonist agent can be used for treating the subject prophylactically. The prophylactic methods are similar to therapeutic methods of the present invention and are further discussed in the following subsections.

4.9.2. Therapeutic Methods

In general, the invention provides methods for treating a disease or condition which is caused by or contributed to by an aberrant htrb activity comprising administering to the subject an effective amount of a compound which is capable of modulating an htrb activity. Among the approaches which may be used to ameliorate disease symptoms involving an aberrant htrb activity are, for example, antisense, ribozyme, and triple helix molecules described above. Examples of suitable compounds include the antagonists, agonists or homologues described in detail herein.

4.9.3. Effective Dose

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining The LD₅₀ (The Dose Lethal To 50% Of The Population) And The ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds which exhibit large therapeutic induces are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects may be used, care should be taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method

WO 02/053743

PCT/US02/00070

of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

4.9.4. Formulation and Use

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention may be formulated in conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers or excipients. Thus, the compounds and their physiologically acceptable salts and solvates may be formulated for administration by, for example, injection, inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral or rectal administration.

For such therapy, the compounds of the invention can be formulated for a variety of loads of administration, including systemic and topical or localized administration. Techniques and formulations generally may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. For systemic administration, injection is preferred, including intramuscular, intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous. For injection, the compounds of the invention can be formulated in liquid solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hank's solution or Ringer's solution. In addition, the compounds may be formulated in solid form and redissolved or suspended immediately prior to use. Lyophilized forms are also included.

For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulfate). The tablets may be coated by methods well known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as

WO 02/053743

PCT/US02/00070

suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., ationd oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, 5 flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate.

Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound. For buccal administration the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner. For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently 10 delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebuliser, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of e.g., gelatin for use in an inhaler or insufflator may be 15 formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. 20 The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories 25 or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. 30 Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt. Other suitable delivery systems include microspheres which offer the possibility of local

WO 02/053743

PCT/US02/00070

noninvasive delivery of drugs over an extended period of time. This technology utilizes microspheres of precapillary size which can be injected via a coronary catheter into any selected part of the e.g. heart or other organs without causing inflammation or ischemia. The administered therapeutic is slowly released from these microspheres and taken up by surrounding tissue cells (e.g. endothelial cells).

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration bile salts and fusidic acid derivatives. in addition, detergents may be used to facilitate permeation. Transmucosal administration may be through nasal sprays or using suppositories. For topical administration, the oligomers of the invention are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art. A wash solution can be used locally to treat an injury or inflammation to accelerate healing.

In clinical settings, a gene delivery system for the therapeutic htrb gene can be introduced into a patient by any of a number of methods, each of which is familiar in the art. For instance, a pharmaceutical preparation of the gene delivery system can be introduced systemically, e.g., by intravenous injection, and specific transduction of the protein in the target cells occurs predominantly from specificity of transfection provided by the gene delivery vehicle, cell-type or tissue-type expression due to the transcriptional regulatory sequences controlling expression of the receptor gene, or a combination thereof. In other embodiments, initial delivery of the recombinant gene is more limited with introduction into the animal being quite localized. For example, the gene delivery vehicle can be introduced by catheter (see U.S. Patent 5,328,470) or by stereotactic injection (e.g., Chen et al. (1994) PNAS 91: 3054-3057). An htrb gene, such as any one of the sequences represented in the group consisting of SEQ ID Nos. 1 or 3 or the htrb alternative 5' ends or a sequence homologous thereto can be delivered in a gene therapy construct by electroporation using techniques described, for example, by Dev et al. ((1994) Cancer Treat Rev 20:105-115).

The pharmaceutical preparation of the gene therapy construct or compound of the invention can consist essentially of the gene delivery system in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle or compound is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery system can be produced intact

WO 02/053743

PCT/US02/00070

from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can comprise one or more cells which produce the gene delivery system.

The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may
5 for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

4.10. Kits

The invention further provides kits for use in diagnostics or prognostic methods or for treating a disease or condition associated with an aberrant htrb protein. The invention
10 also provides kits for determining which htrb therapeutic should be administered to a subject. The invention encompasses kits for detecting the presence of htrb mRNA or protein in a biological sample or for determining the presence of mutations or the identity of polymorphic regions in an htrb gene. For example, the kit can comprise a labeled compound or agent capable of detecting htrb protein or mRNA in a biological sample;
15 means for determining the amount of htrb in the sample; and means for comparing the amount of htrb in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect htrb mRNA or protein.

In one embodiment, the kit comprises a pharmaceutical composition containing an
20 effective amount of an htrb antagonist therapeutic and instruction for use in treating or preventing hypertension. In another embodiment, the kit comprises a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an htrb agonist therapeutic and instructions for use in treating insect bites. Generally, the kit comprises a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an htrb agonist or antagonist therapeutic and instructions
25 for use as an analgesic. For example, the kit can comprise a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an htrb agonist therapeutic and instructions for use as an analgesic.

Yet other kits can be used to determine whether a subject has or is likely to develop a disease or condition associated with an aberrant htrb activity. Such a kit can comprise,
30 e.g., one or more nucleic acid probes capable of hybridizing specifically to at least a portion of an htrb gene or allelic variant thereof, or mutated form thereof.

4.11. Additional Uses for htrb Proteins and Nucleic Acids

WO 02/053743

PCT/US02/00070

The htrb nucleic acids of the invention can further be used in the following assays. In one embodiment, the human htrb nucleic acid having SEQ ID No.1 or a portion thereof, or a nucleic acid which hybridizes thereto can be used to determine the precise chromosomal localization of an htrb gene within the IL-1 locus. Furthermore, the htrb gene
5 can also be used as a chromosomal marker in genetic linkage studies involving genes other than htrb.

Chromosomal localization of a gene can be performed by several methods well known in the art. For example, Southern blot hybridization or PCR mapping of somatic cell hybrids can be used for determining on which chromosome or chromosome fragment a
10 specific gene is located. Other mapping strategies that can similarly be used to localize a gene to a chromosome or chromosomal region include in situ hybridization, prescreening with labeled flow-sorted chromosomes and preselection by hybridization to construct chromosome specific-cDNA libraries.

Furthermore, fluorescence in situ hybridization (FISH) of a nucleic acid, e.g., an
15 htrb nucleic acid, to a metaphase chromosomal spread is a one step method that provides a precise chromosomal location of the nucleic acid. This technique can be used with nucleic acids as short as 500 or 600 bases; however, clones larger than 2,000 bp have a higher likelihood of binding to a unique chromosomal location with sufficient signal intensity for simple detection. Such techniques are described, e.g., in Verma et al., Human
20 Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988). Using such techniques, a gene can be localized to a chromosomal region containing from about 50 to about 500 genes.

If the htrb gene is shown to be localized in a chromosomal region which cosegregates, i.e., which is associated, with a specific disease, the differences in the cDNA
25 or genomic sequence between affected and unaffected individuals are determined. The presence of a mutation in some or all of the affected individuals but not in any normal individuals, will be indicative that the mutation is likely to be causing or contributing to the disease.

The present invention is further illustrated by the following examples which should
30 not be construed as limiting in any way. The contents of all cited references (including literature references, issued patents, published patent applications as cited throughout this application are hereby expressly incorporated by reference. The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of cell biology,

WO 02/053743

PCT/US02/00070

cell culture, molecular biology, transgenic biology, microbiology, recombinant DNA, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, for example, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA*

- 5 Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To*
- 10 *Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes
- 15 I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

4.12 Detecting Gene Expression and Microarray Transcription Profiling

The invention provides for iterative methodologies for determining inflammatory gene regulatory pathways by: (1) cloning a first gene regulating a given inflammatory gene;

20 (2) using that first inflammatory regulatory gene in an expression profiling procedure to isolate other inflammatory pathway genes whose expression is altered by over or under-expression of the first gene; and (3) still further determining the expression profile of a cell over or under expressing each of the other inflammatory pathway genes to isolate still other inflammatory pathway genes whose expression is altered by over or under-expression of

25 each of the "other" inflammatory pathway genes. Many different methods are known in the art for measuring gene expression. Classical methods include quantitative RT-PCR, Northern blots and ribonuclease protection assays. Such methods may be used to examine expression of individual genes as well as entire gene clusters. However, as the number of genes to be examined increases, the time and expense may become prohibitive.

- 30 Large scale detection methods allow faster, less expensive analysis of the expression levels of many genes simultaneously. Such methods typically involve an ordered array of probes affixed to a solid substrate. Each probe is capable of hybridizing to a different set of nucleic acids. In one method, probes are generated by amplifying or synthesizing a

WO 02/053743

PCT/US02/00070

substantial portion of the coding regions of various genes of interest. These genes are then spotted onto a solid support. mRNA samples are obtained, converted to cDNA, amplified and labeled (usually with a fluorescence label). The labeled cDNAs are then applied to the array, and cDNAs hybridize to their respective probes in a manner that is linearly related to their concentration. Detection of the label allows measurement of the amount of each cDNA adhered to the array.

Many methods for performing such DNA array experiments are well known in the art. Exemplary methods are described below but are not intended to be limiting.

Arrays are often divided into microarrays and macroarrays, where microarrays have a much higher density of individual probe species per area. Microarrays may have as many as 1000 or more different probes in a 1 cm² area. There is no concrete cut-off to demarcate the difference between micro- and macroarrays, and both types of arrays are contemplated for use with the invention. However, because of their small size, microarrays provide great advantages in speed, automation and cost-effectiveness.

Microarrays are known in the art and consist of a surface to which probes that correspond in sequence to gene products (e.g., cDNAs, mRNAs, oligonucleotides) are bound at known positions. In one embodiment, the microarray is an array (i.e., a matrix) in which each position represents a discrete binding site for a product encoded by a gene (e.g., a protein or RNA), and in which binding sites are present for products of most or almost all of the genes in the organism's genome. In a preferred embodiment, the "binding site" (hereinafter, "site") is a nucleic acid or nucleic acid analogue to which a particular cognate cDNA can specifically hybridize. The nucleic acid or analogue of the binding site can be, e.g., a synthetic oligomer, a full-length cDNA, a less-than full length cDNA, or a gene fragment.

Although in a preferred embodiment the microarray contains binding sites for products of all or almost all genes in the target organism's genome, such comprehensiveness is not necessarily required. Usually the microarray will have binding sites corresponding to at least 100 genes and more preferably, 500, 1000, 4000 or more. In certain embodiments, the most preferred arrays will have about 98-100% of the genes of a particular organism represented. In other embodiments, the invention provides customized microarrays that have binding sites corresponding to fewer, specifically selected genes. Microarrays with fewer binding sites are cheaper, smaller and easier to produce. In particular, the invention provides microarrays customized for the determination of graft status. In preferred

WO 02/053743

PCT/US02/00070

embodiments customized microarrays comprise binding sites for fewer than 4000, fewer than 1000, fewer than 200 or fewer than 50 genes, and comprise binding sites for at least 2, preferably at least 3, 4, 5 or more genes of any of clusters A, B, C, D, E, F or G. Preferably, the microarray has binding sites for genes relevant to testing and confirming a biological network model of interest. Several exemplary human microarrays are publically available. The Affymetrix GeneChip HUM 6.8K is an oligonucleotide array composed of 7,070 genes. A microarray with 8,150 human cDNAs was developed and published by Research Genetics (Bittner et al., 2000, Nature 406:443-546).

The probes to be affixed to the arrays are typically polynucleotides. These DNAs can be obtained by, e.g., polymerase chain reaction (PCR) amplification of gene segments from genomic DNA, cDNA (e.g., by RT-PCR), or cloned sequences. PCR primers are chosen, based on the known sequence of the genes or cDNA, that result in amplification of unique fragments (i.e. fragments that do not share more than 10 bases of contiguous identical sequence with any other fragment on the microarray). Computer programs are useful in the design of primers with the required specificity and optimal amplification properties. See, e.g., Oligo pl version 5.0 (National Biosciences). In the case of binding sites corresponding to very long genes, it will sometimes be desirable to amplify segments near the 3' end of the gene so that when oligo-dT primed cDNA probes are hybridized to the microarray, less-than-full length probes will bind efficiently. Random oligo-dT priming may also be used to obtain cDNAs corresponding to as yet unknown genes, known as ESTs. Certain arrays use many small oligonucleotides corresponding to overlapping portions of genes. Such oligonucleotides may be chemically synthesized by a variety of well known methods. Synthetic sequences are between about 15 and about 500 bases in length, more typically between about 20 and about 50 bases. In some embodiments, synthetic nucleic acids include non-natural bases, e.g., inosine. As noted above, nucleic acid analogues may be used as binding sites for hybridization. An example of a suitable nucleic acid analogue is peptide nucleic acid (see, e.g., Egholm et al., 1993, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, Nature 365:566-568; see also U.S. Pat. No. 5,539,083).

In an alternative embodiment, the binding (hybridization) sites are made from plasmid or phage clones of genes, cDNAs (e.g., expressed sequence tags), or inserts therefrom (Nguyen et al., 1995, Differential gene expression in the murine thymus assayed

WO 02/053743

PCT/US02/00070

by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones, *Genomics* 29:207-209). In yet another embodiment, the polynucleotide of the binding sites is RNA.

The nucleic acids or analogues are attached to a solid support, which may be made from glass, plastic (e.g., polypropylene, nylon), polyacrylamide, nitrocellulose, or other materials. A preferred method for attaching the nucleic acids to a surface is by printing on glass plates, as is described generally by Schena et al., 1995, *Science* 270:467-470. This method is especially useful for preparing microarrays of cDNA. (See also DeRisi et al., 1996, *Nature Genetics* 14:457-460; Shalon et al., 1996, *Genome Res.* 6:639-645; and Schena et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10539-11286). Each of the

5 10 15 20

10 15 20 25 30

A second preferred method for making microarrays is by making high-density oligonucleotide arrays. Techniques are known for producing arrays containing thousands of oligonucleotides complementary to defined sequences, at defined locations on a surface using photolithographic techniques for synthesis in situ (see, Fodor et al., 1991, *Science* 251:767-773; Pease et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5022-5026; Lockhart et al., 1996, *Nature Biotech* 14:1675; U.S. Pat. Nos. 5,578,832; 5,556,752; and 5,510,270, each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes) or other methods for rapid synthesis and deposition of defined oligonucleotides (Blanchard et al., 1996, 11: 687-90). When these methods are used, oligonucleotides of known sequence are synthesized directly on a surface such as a derivatized glass slide. Usually, the array produced is redundant, with several oligonucleotide molecules per RNA. Oligonucleotide probes can be chosen to detect alternatively spliced mRNAs.

Other methods for making microarrays, e.g., by masking (Maskos and Southern, 1992, *Nuc. Acids Res.* 20:1679-1684), may also be used. In principal, any type of array, for example, dot blots on a nylon hybridization membrane (see Sambrook et al., *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, which is incorporated in its entirety for all purposes), could be used, although, as will be recognized by those of skill in the art, very small arrays will be preferred because hybridization volumes will be smaller.

The nucleic acids to be contacted with the microarray may be prepared in a variety of ways. Methods for preparing total and poly(A)⁺ RNA are well known and are described generally in Sambrook et al., *supra*. Labeled cDNA is prepared from mRNA by oligo dT-primed or random-primed reverse transcription, both of which are well known in the art

WO 02/053743

PCT/US02/00070

(see e.g., Klug and Berger, 1987, *Methods Enzymol.* 152:316-325). Reverse transcription may be carried out in the presence of a dNTP conjugated to a detectable label, most preferably a fluorescently labeled dNTP. Alternatively, isolated mRNA can be converted to labeled antisense RNA synthesized by in vitro transcription of double-stranded cDNA in the presence of labeled dNTPs (Lockhart et al., 1996, *Nature Biotech.* 14:1675). The cDNAs or RNAs can be synthesized in the absence of detectable label and may be labeled subsequently, e.g., by incorporating biotinylated dNTPs or rNTP, or some similar means (e.g., photo-cross-linking a psoralen derivative of biotin to RNAs), followed by addition of labeled streptavidin (e.g., phycoerythrin-conjugated streptavidin) or the equivalent.

10 When fluorescent labels are used, many suitable fluorophores are known, including fluorescein, lissamine, phycoerythrin, rhodamine (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham) and others (see, e.g., Kricka, 1992, *Academic Press San Diego, Calif.*).

In another embodiment, a label other than a fluorescent label is used. For example, a radioactive label, or a pair of radioactive labels with distinct emission spectra, can be used (see Zhao et al., 1995, *Gene* 156:207; Pietu et al., 1996, *Genome Res.* 6:492). However, use of radioisotopes is a less-preferred embodiment.

Nucleic acid hybridization and wash conditions are chosen so that the population of labeled nucleic acids will specifically hybridize to appropriate, complementary nucleic acids affixed to the matrix. As used herein, one polynucleotide sequence is considered complementary to another when, if the shorter of the polynucleotides is less than or equal to 25 bases, there are no mismatches using standard base-pairing rules or, if the shorter of the polynucleotides is longer than 25 bases, there is no more than a 5% mismatch. Preferably, the polynucleotides are perfectly complementary (no mismatches).

25 Optimal hybridization conditions will depend on the length (e.g., oligomer versus polynucleotide greater than 200 bases) and type (e.g., RNA, DNA, PNA) of labeled nucleic acids and immobilized polynucleotide or oligonucleotide. General parameters for specific (i.e., stringent) hybridization conditions for nucleic acids are described in Sambrook et al., supra, and in Ausubel et al., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, which is incorporated in its entirety for all purposes. Non-specific binding of the labeled nucleic acids to the array can be decreased by treating the array with a large quantity of non-specific DNA -- a so-called "blocking" step.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

When fluorescently labeled probes are used, the fluorescence emissions at each site of a transcript array can be, preferably, detected by scanning confocal laser microscopy. When two fluorophores are used, a separate scan, using the appropriate excitation line, is carried out for each of the two fluorophores used. Alternatively, a laser can be used that

5 allows simultaneous specimen illumination at wavelengths specific to the two fluorophores and emissions from the two fluorophores can be analyzed simultaneously (see Shalon et al., 1996, Genome Research 6:639-645). In a preferred embodiment, the arrays are scanned with a laser fluorescent scanner with a computer controlled X-Y stage and a microscope objective. Sequential excitation of the two fluorophores is achieved with a multi-line, mixed

10 gas laser and the emitted light is split by wavelength and detected with two photomultiplier tubes. Fluorescence laser scanning devices are described in Schena et al., 1996, Genome Res. 6:639-645 and in other references cited herein. Alternatively, the fiber-optic bundle described by Ferguson et al., 1996, Nature Biotech. 14:1681-1684, may be used to monitor mRNA abundance levels at a large number of sites simultaneously. Fluorescent microarray

15 scanners are commercially available from Affymetrix, Packard BioChip Technologies, BioRobotics and many other suppliers.

Signals are recorded, quantitated and analyzed using a variety of computer software. In one embodiment the scanned image is despeckled using a graphics program (e.g., Hijaak Graphics Suite) and then analyzed using an image gridding program that creates a

20 spreadsheet of the average hybridization at each wavelength at each site. If necessary, an experimentally determined correction for "cross talk" (or overlap) between the channels for the two fluors may be made. For any particular hybridization site on the transcript array, a ratio of the emission of the two fluorophores is preferably calculated. The ratio is independent of the absolute expression level of the cognate gene, but is useful for genes

25 whose expression is significantly modulated by drug administration, gene deletion, or any other tested event.

According to the method of the invention, the relative abundance of an mRNA in two samples is scored as a perturbation and its magnitude determined (i.e., the abundance is different in the two sources of mRNA tested), or as not perturbed (i.e., the relative

30 abundance is the same). As used herein, a difference between the two sources of RNA of at least a factor of about 25% (RNA from one source is 25% more abundant in one source than the other source), more usually about 50%, even more often by a factor of about 2 (twice as abundant), 3 (three times as abundant) or 5 (five times as abundant) is scored as a

WO 02/053743

PCT/US02/00070

perturbation. Present detection methods allow reliable detection of difference of an order of about 2-fold to about 5-fold, but more sensitive methods are expected to be developed.

Preferably, in addition to identifying a perturbation as positive or negative, it is advantageous to determine the magnitude of the perturbation. This can be carried out, as
5 noted above, by calculating the ratio of the emission of the two fluorophores used for differential labeling, or by analogous methods that will be readily apparent to those of skill in the art.

In one embodiment of the invention, transcript arrays reflecting the transcriptional state of a cell of interest are made by hybridizing a mixture of two differently labeled sets
10 of cDNAs, to the microarray. One cell is a cell of interest, while the other is used as a standardizing control. The relative hybridization of each cell's cDNA to the microarray then reflects the relative expression of each gene in the two cell. For example, to assess gene expression in a variety of breast cancers, Perou et al. (2000, supra) hybridized
15 fluorescently-labeled cDNA from each tumor to a microarray in conjunction with a standard mix of cDNAs obtained from a set of breast cancer cell lines. In this way, gene expression in each tumor sample was compared against the same standard, permitting easy comparisons between tumor samples.

In preferred embodiments, the data obtained from such experiments reflects the relative expression of each gene represented in the microarray. Expression levels in
20 different samples and conditions may be compared using a variety of statistical methods.

A variety of statistical methods are available to assess the degree of relatedness in expression patterns of different genes. The statistical methods may be broken into two related portions: metrics for determining the relatedness of the expression pattern of one or more gene, and clustering methods, for organizing and classifying expression data based on
25 a suitable metric (Sherlock, 2000, Curr. Opin. Immunol. 12:201-205; Butte et al., 2000, Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, World Scientific, p.418-29).

In one embodiment, Pearson correlation may be used as a metric. In brief, for a given gene, each data point of gene expression level defines a vector describing the deviation of the gene expression from the overall mean of gene expression level for that
30 gene across all conditions. Each gene's expression pattern can then be viewed as a series of positive and negative vectors. A Pearson correlation coefficient can then be calculated by comparing the vectors of each gene to each other. An example of such a method is

WO 02/053743

PCT/US02/00070

described in Eisen et al. (1998, supra). Pearson correlation coefficients account for the direction of the vectors, but not the magnitudes.

In another embodiment, Euclidean distance measurements may be used as a metric. In these methods, vectors are calculated for each gene in each condition and compared on the basis of the absolute distance in multidimensional space between the points described by the vectors for the gene.

In a further embodiment, the relatedness of gene expression patterns may be determined by entropic calculations (Butte et al. 2000, supra). Entropy is calculated for each gene's expression pattern. The calculated entropy for two genes is then compared to determine the mutual information. Mutual information is calculated by subtracting the entropy of the joint gene expression patterns from the entropy for calculated for each gene individually. The more different two gene expression patterns are, the higher the joint entropy will be and the lower the calculated mutual information. Therefore, high mutual information indicates a non-random relatedness between the two expression patterns.

The different metrics for relatedness may be used in various ways to identify clusters of genes. In one embodiment, comprehensive pairwise comparisons of entropic measurements will identify clusters of genes with particularly high mutual information. In preferred embodiments, expression patterns for two genes are correlated if the normalized mutual information score is greater than or equal to 0.7, and preferably greater than 0.8, greater than 0.9 or greater than 0.95. In alternative embodiments, a statistical significance for mutual information may be obtained by randomly permuting the expression measurements 30 times and determining the highest mutual information measurement obtained from such random associations. All clusters with a mutual information higher than can be obtained randomly after 30 permutations are statistically significant. In a further embodiment, expression patterns for two genes are correlated if the correlation coefficient is greater than or equal to 0.8, and preferably greater than 0.85, 0.9 or, most preferably greater than 0.95.

In another embodiment, agglomerative clustering methods may be used to identify gene clusters. In one embodiment, Pearson correlation coefficients or Euclidean metrics are determined for each gene and then used as a basis for forming a dendrogram. In one example, genes were scanned for pairs of genes with the closest correlation coefficient. These genes are then placed on two branches of a dendrogram connected by a node, with the distance between the depth of the branches proportional to the degree of correlation.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

This process continues, progressively adding branches to the tree. Ultimately a tree is formed in which genes connected by short branches represent clusters, while genes connected by longer branches represent genes that are not clustered together. The points in multidimensional space by Euclidean metrics may also be used to generate dendrograms.

5 In yet another embodiment, divisive clustering methods may be used. For example, vectors are assigned to each gene's expression pattern, and two random vectors are generated. Each gene is then assigned to one of the two random vectors on the basis of probability of matching that vector. The random vectors are iteratively recalculated to generate two centroids that split the genes into two groups. This split forms the major
10 branch at the bottom of a dendrogram. Each group is then further split in the same manner, ultimately yielding a fully branched dendrogram.

In a further embodiment, self-organizing maps (SOM) may be used to generate clusters. In general, the gene expression patterns are plotted in n-dimensional space, using a metric such as the Euclidean metrics described above. A grid of centroids is then placed
15 onto the n-dimensional space and the centroids are allowed to migrate towards clusters of points, representing clusters of gene expression. Finally the centroids represent a gene expression pattern that is a sort of average of a gene cluster. In certain embodiments, SOM may be used to generate centroids, and the genes clustered at each centroid may be further represented by a dendrogram. An exemplary method is described in Tamayo et al., 1999,
20 PNAS 96:2907-12. Once centroids are formed, correlation must be evaluated by one of the methods described supra.

In another aspect, the invention provides probe sets. Preferred probe sets are designed to detect expression of multiple genes and provide information about the status of a graft. Preferred probe sets of the invention comprise probes that are useful for the
25 detection of at least two genes belonging to gene clusters A, B, C, D, E, F or G. Particularly preferred probe sets will comprise probes useful for the detection of at least three, at least four or at least five genes belonging to gene clusters A, B, C, D, E, F or G. Certain probe sets may additionally comprise probes that are useful for the detection of one or more genes of gene cluster H. Probe sets of the invention do not comprise probes useful
30 for the detection of more than 10,000 gene transcripts, and preferred probe sets will comprise probes useful for the detection of fewer than 4000, fewer than 1000, fewer than 200, and most preferably fewer than 50 gene transcripts. Probe sets of the invention are particularly useful because they are smaller and cheaper than probe sets that are intended to

WO 02/053743

PCT/US02/00070

detect as many genes as possible in a particular genome. The probe sets of the invention are targeted at the detection of gene transcripts that are informative about transplant status. Probe sets of the invention may comprise a large or small number of probes that detect gene transcripts that are not informative about transplant status. Such probes are useful as
 5 controls and for normalization. Probe sets may be a dry mixture or a mixture in solution. In preferred embodiments, probe sets of the invention are affixed to a solid substrate to form an array of probes. It is anticipated that probe sets may also be useful for multiplex PCR.

5. Examples

10 Example 1: Cloning and Identification of Inflammatory Pathway Genes

In order to identify novel genes involved in proinflammatory cytokine signaling, we have developed an expression screen to isolate gene products having the capacity to modulate the activity of a cytokine responsive reporter (Kiss-Toth, E. et al. (2000) *Journal of Immunological Methods* 239:125-135). The promoter of the IL-8 chemokine gene
 15 regulating the expression of the firefly luciferase gene was used as a readout. The promoter fragment (-79 to +45; pIL8) contains an AP-1, a C/EBP and an NF κ B site, a typical structure for inflammatory signal responsive promoters. We have also found that the level of secretion of human IL-8 into the medium in this system is correlated with the activity of the reporter systems; thus the reporters are a valid surrogate measure of the activity of the
 20 endogenous gene. We have isolated both repressors and activators of signaling and have derived a lower bound estimate of the number of gene products that play a role in controlling transcription of the IL-8 gene.

30 pools of ca 300 clones from an oligo-dT primed human peripheral blood mononuclear cell cDNA expression library in pCDM8 were screened in vivo against the
 25 reporter pIL-8 - firefly luciferase with an internal control pTK (HSV Thymidine Kinase promoter) -Renilla luciferase, using a dual luciferase assay in HeLa cells. On pool (p) was positive, with a markedly elevated ratio of pIL-8/pTK activity compared to the other 29. We analyzed this and one negative pool in a single cell pIL-8-EGFP transcription assay, as described previously. The positive pool was active (Figure 1B), with 5-10% of the cells in
 30 the transfected population showed induction of the reporter, compatible with the number expected to be productively transfected with one of the 300 clones in the pool. After pool breakdown, sequencing revealed that the active insert contained the entire coding region (ORF) for interferon- γ , in the sense orientation. This finding is compatible with reports that

WO 02/053743

PCT/US02/00070

IFN- γ activates NF- κ B. Further, despite the expected secretion of the cytokine, no paracrine "spreading" of the signal was seen in the GFP assay, and those cells that express it are apoptotic as judged by the fact that they are a small and bright and annexin V positive in two colour confocal fluorescence micrographs (data not shown). This is compatible with previous findings that IFN- γ can cause apoptosis, via up-regulation of FasL/Fas or Trail/Trail-R and that it induces NF κ B activation, possibly synergistically after induction of TNF/TNFR family members.

The data from the screen provide a lower limit estimate for the number of genes involved in controlling pIL-8 luc function. The hit rate is 1/8000 and the library contains approximately 5×10^6 independent clones, suggesting that the screen will detect about 600 clones encoding inhibitors or activators of pIL-8 luc transcription. The library is non-directional and oligo dT primed, with an average insert size of 2-3 kb. Clearly half the clones will be antisense and many will contain only 3' UTRs. It is difficult to estimate what fraction of the clones in the library contain inserts encoding expressible proteins and indeed our results (see below) suggest that a full length coding region is not always required for the detection of relevant clones. Screening of a random primed human B-cell line (CB23) library for type II IL-1 receptor yielded an estimate of 1/300,000 for clones with a full length ORF. The frequency in our library is likely to be lower since it was prepared from a complex cell population, activated peripheral blood mononuclear cells, rather than a cell line and is oligo dT primed. Given this, and bearing in mind the SKIP result (see below), we estimate no more than 5 expressible clones for a rare mRNA (<1/25,000 in a clonal population), suggesting that a minimum of 100 distinct gene products, detectable by overexpression, play a role in regulating the IL-8 promoter. This number is reasonable, given the estimate of 40 genes on chromosome 3 in *D. melanogaster*, involved in controlling Df and Dorsal translocation in fat body cells (see Wu & Anderson (1998) Nature 392: 93-7). This is likely only a subset of all components, since not all relevant gene products may alter activity when overexpressed. Indeed, we have found that IL-1RI and TLR4 do not activate pIL8, when over expressed in HeLa cells, unless exogenous ligand is added to the cultures.

Two of the clones obtained were active in altering levels of IL-8 - one as an activator and the other as an inhibitor of IL-8 mediated transcription. The activator was a full length RelA cDNA clone in the sense orientation; an expected finding given the structure of the IL-8 promoter. The inhibitor cDNA clone encodes NAK-1, the human

WO 02/053743

PCT/US02/00070

homolog of the murine orphan steroid hormone receptor Nur77, in the sense orientation. Nur77/N10/NAK-1/NGFI-B (a member of the NR4 subfamily) was previously identified as an immediate-early gene induced by a variety of stimuli in PC12 cells and fibroblasts [it is expressed in many cell types after activation by mitogens, for example]. A large body of literature implicates Nur77 and the closely related transcription factors NOR-1 and Nurr1 as playing a central role in apoptosis in many cell types, for example in T cell activation induced cell death (AICD) negative selection. Nur77/N10 transgenic mice show a dramatic reduction in both double and single positive thymocytes due to extensive early onset apoptosis. A recent report shows that Nur77 is one of a limited set of immediate early genes up-regulated (1 hour post-induction) in response to hen egg lysozyme stimulation of naive I_g^{H2EL} B lymphocytes.

Transient overexpression of NAK-1 inhibited both the basal and IL-1 stimulated activity of the IL-8 promoter. In addition, stimulation of AP-1, NFkB and CRE reporters was suppressed by NAK-1. It also blocked activation of a synthetic LHRE promoter. Thus the inhibitory activity of NAK-1 is broad, possibly a consequence of overexpression. However, it is not a general inhibitor of transcription or translation, since the activity of the internal control reporter was not inhibited. Nur77 has been shown to facilitate AICD by a mechanism, which is only partially understood, and our data suggest that NAK-1 can act as an inhibitor of cytokine signaling. Steroid hormone receptors can block transactivation by NFkB and the activity of Nur77/NAK-1 can be potentiated by heterodimerisation with Nor-1, Nurr1 and RXRs. Retinoids have also been shown to block cytokine gene expression by acting through NFkB. Our data suggest that NAK-1/Nur77 may be pro-apoptotic due in part in part to blockade of survival signals such as NFkB.

A second repressor clone encoded a 3' UTR fragment in the sense orientation terminating in the poly-A tract. The sequence of the corresponding full-length transcript was deduced by searching human genomic and cDNA sequence databases. The partial sequence has been previously reported (GenBank AJ000480). The full length cDNA sequence was confirmed by sequencing ests obtained from the IMAGE collection. We have termed the gene product Stress Kinase Inhibitory Protein-1 (SKIP-1).

Screening pools from the cDNA expression library made from PBMC (Hamann, J. et al. (1993) *Journal of Immunology* 150:4920-27) further led us to identify a cDNA of previously unknown function. A homologous *Drosophila* gene, tribbles, has been described recently (Grosshans, J. et al. (2000) *Cell* 101:523-31; Seher, T.C. et al. (2000) *Curr. Biol.*

WO 02/053743

PCT/US02/00070

10:623-29; Mata, J. et al. (2000) Cell 101:511-22). Therefore we suggest the name human tribbles homologue-1 (htrb-1) for the isolated mammalian protein encoded by our clone.

Example 2: Analysis of htrb-1 Repression Specificity

Figure 1 A show the effect of htrb-1 overexpression on IL-8 reporter activity. HeLa cells were transfected with the IL-8 luciferase reporter with or without a htrb-1 expression construct. Black bars indicate reporter activation without htrb-1 cotransfection, while gray bars show the reporter activation in the presence of 50ng htrb-1 expression construct. Cells were stimulated with proinflammatory cytokines and the reporter activity was determined. B-D htrb-1 is a specific inhibitor of stress kinase signalling. HeLa cells were transiently transfected with AP-1 (B), NFkB (C) and human growth hormone (D) signalling pathway specific transcription reporters and were activated in the presence (gray bars) or absence (black bars) of htrb-1 expression plasmid by a MEKK-1 expression construct (B, C) or human growth hormone (D). E pAP-1 luc was stimulated with V12 Ras expression plasmid and the effect of htrb-1 and htrb-3 co-expression was investigated. F AP-1 reporter (diamonds) was stimulated with MEKK-1 expression plasmid (squares) and the effect of htrb-1 overexpression (triangles) on the stimulation was studied. The activity of constitutively active TK-Rluc versus the inducible AP-1 luc was plotted. G The p38 responsive pFR-luc + pFA-CHOP reporter was stimulated with MEK-3 expression construct. htrb-3 was co-transfected with the reporter in the presence or absence of the stimulus, as indicated.

Upon overexpression, htrb-1 was found to inhibit the basal activity of the IL-8 reporter, while the induction of this promoter by IL-1 and TNFalpha was not affected (Fig. 1A). The IL-8 promoter fragment used in this assay contains binding sites for NFkB and AP-1 and most of the cytokine inducible activity is mediated through to the NFkB site, while the AP-1 site contributes significantly to the basal promoter activity (Mukaidea, N. et al. (1994) Journal of Leukocyte Biology 56:554-58). To determine which signaling pathway is inhibited by htrb-1, a cDNA encoding the full length htrb-1 ORF was tested against transcription reporters containing multiple copies of NFkB or AP-1 binding sites. The reporters were activated by MEKK-1. Overexpression of the htrb-1 protein suppressed the activation of the AP-1 but not of the NFkB reporter (Fig. 1B and C) nor of a JAK/STAT pathway specific promoter (Fig. 1D). These data suggest that the observed negative effect of htrb-1 on signaling is specific for stress kinase pathways.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

To confirm that the observed AP-1 inhibition is not restricted to MEKK-1 overexpression, V12 Ras was co-transfected with the AP-1 reporter in the absence or presence of htrb-1 or htrb-3 expression constructs (see below) (Fig. 1E). Ras-mediated activation was also blocked by elevated htrb levels. The effect of htrb overexpression on the activity of the constitutive HSV-TK promoter (Fig. 1F) and the possible involvement in activation of p38 mediated general stress responses (Fig. 1G) were assessed. Our data show that the effect of htrb-1 on the inhibition of MEKK-1 mediated AP-1 activation was specific for the inducible reporter, while the activity of the TK-control reporter was not affected by the treatments (Fig. 1F).

10 Example 3: Identification and Analysis of Other htrb Genes

Figure 2 shows multiple alignment of htrb protein family. Searching public DNA databases revealed 3 human htrb genes and further est-s, encoding trb homologs in vertebrates and insects. Putative protein sequences of human htrb family and the identified trb homologs have been aligned by ClustalX, using default parameters. Positions of htrb mutations are indicated by arrows. Abbreviations: h- Homo sapiens, m- Mus musculus, r- Rattus norvegicus, c- Canis canis, b- Bos taurus, x- Xenopus laevis, o- Onchocerca mykiss, a- Aedes aegypti.

Public database searching with the htrb-1 sequence identified two further human genes, htrb-2 and htrb-3, 41 and 51% identical to htrb-1 respectively. In addition, several putative trb gene products were found in vertebrate species and in insects (Fig. 2). All these proteins share a central similar kinase-like domain. In addition, each possesses short N-terminal (approx. 70-100 residues) and a C-terminal (approx. 25 residues) domains which are neither closely related to any other sequence in the databases, nor to each other. A partial human htrb-1 sequence has been reported (Wilkin, F. et al. (1997) European Journal of Biochemistry 248:660-68). Canine trb-2 has been described to be a highly labile cytoplasmic phosphoprotein lacking kinase activity: the mRNA is up-regulated by mitogens (Wilkin, F. et al. (1997) European Journal of Biochemistry 248:660-68; Wilkin, F. et al. (1996) Journal of Biological Chemistry 271:28451-57). A rat homologue of htrb-3 has been identified as a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death (Mayumi-Matsuda, K. et al. (1999) Biochemical and Biophysical Research Communications 258:260-64). A Drosophila homologue is tribbles, which regulates mitosis and morphogenesis by regulating string/CDC25 (Grosshans, J. et al. (2000) Cell 101:523-31; Seher, T.C. et al. Curr. Biol. 10:623-29; Mata, J. et al. (2000) Cell 101:511-22; Rorth, P. et

WO 02/053743

PCT/US02/00070

al. (2000) Mol. Cell 6:23-30). The trb kinase-like domain shows homology to protein serine-threonine kinases in general, and to calcium calmodulin kinases and SNF1 kinases in particular. However the trbs lack the active site lysine, and are predicted to be kinase dead, as shown for Canine trb-2 (Wilkin, F. et al. (1997) European Journal of Biochemistry 248:660-68) and tribbles (Grosshans, J. et al. (2000) Cell 101:523-31).

To determine whether htrb-3 has transcriptional regulatory activities similar to those of htrb-1, the effect of htrb-3 expression on activation of the AP-1 reporter was investigated. The two mammalian homologs had similar activities (see Figures 3A) and, furthermore, the observed AP-1 inhibition was not restricted to MEKK-1 overexpression, because V12 Ras mediated AP-1 activation was similarly affected by the expression of htrb-1 or htrb-3 expression constructs (Fig. 1E). In addition, the basal activity of a p38 responsive reporter was not influenced by htrb-3 and the activation of these kinases was slightly inhibited by overexpressing htrb-3 (Fig. 1G).

To further investigate the effect of htrb expression levels on stress kinase signalling, an antisense construct, expressing the htrb-1 or htrb-3 5'UTR and the region corresponding to the N-terminal variable region in reverse orientation was co-transfected into HeLa cells with AP-1 or NFkB reporters and a MEKK-1 or NIK expression construct as an activator (Fig. 3A, B). As observed with the full length sense cDNA, these constructs strongly inhibited AP-1 activation while having little effect on NFkB.

Figure 3 shows expression of antisense htrb-1 and htrb-3 RNA inhibits stress kinase activation. Effects of cotransfected antisense htrb-1 or htrb-3 construct were measured on activation of AP-1 (A) and NFkB responsive reporters (B) by MEKK-1 or NIK expression plasmids, respectively. (C) HeLa cells were transfected with sense or antisense htrb-3 expression constructs, the cell size was measured by flow cytometry and the forward scatter was plotted. (D) Mock- and htrb-3 transfected HeLa cells were permeabilised, RNase treated, and stained with propidium iodide. The DNA content of the cells was measured by flow cytometry.

Example 4: Investigation of htrb Cell Cycle Regulation

It has been shown that trb ^{-/-} genotype or overexpression of tribbles in Imaginal Disc Cells causes a G2 block and an increase in cell size (Grosshans, J. et al. (2000) Cell 101:523-31; Mata, J. et al. (2000) Cell 101:511-22). This effect was cell-type specific (Grosshans, J. et al. (2000) Cell 101:523-31; Seher, T.C. (2000) Curr. Biol. 10:623-29). As htrbs are the closest known mammalian homologs to tribbles, the effect of htrb expression

WO 02/053743

PCT/US02/00070

levels in HeLa cells on the cell size and cell cycle was investigated. As observed with tribbles, elevated or suppressed htrb-3 (and htrb-1, data not shown) levels resulted in an increase in the cell size (Fig. 3C). In contrast, cell cycle distribution was not affected by overexpressed htrb-3 (Fig. 3D). These observations suggest that vertebrate cell size may be controlled by trb proteins, just as *Drosophila* imaginal disc cell size is under the control of tribbles (Grosshans, J. et al. (2000) Cell 101:523-31; Mata, J. et al. (2000) Cell 101:511-22).

Example 5: Analysis of htrb-1 Mediated Repression

Table 1 shows that htrb-3 inhibits AP-1, but not NF- κ B, induction by a variety of cytokines. 10nM final concentration of each cytokine and 50ng/ml PMA were used to stimulate HeLa cells for 4hrs. Activation is expressed as relative to the PBS control. Those with the capacity to activate AP-1 reporter were studied for the effect of htrb-3. Results are expressed as percent inhibition caused by the cotransfected htrb-3 construct. Abbreviations: IL- Interleukin, bFGF- Basic Fibroblast Growth Factor, EGF- Epidermal Growth Factor, Ins. like GF- Insulin-like Growth Factor, TGF β - Transforming Growth Factor Beta-1, M-CSF- Macrophage Colony Stimulating Factor, G-CSF- Granulocyte Colony Stimulating Factor, GM-CSF- Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, PDGF-BB- Platelet-derived Growth Factor-BB, LIF- Leukemia Inhibitory Factor, PMA- Tetradececanoylphorbol Acetate.

Overexpression of htrb-1 inhibits MEKK-1 mediated AP-1 but not NF κ B activation in HeLa cells. A similar effect was seen when the AP-1 reporter was stimulated by PMA (Fig. 4A, B) or by a panel of human cytokines (see Table 1). To characterise the possible site of htrb action, we tested whether increasing the dose of MEKK-1 could bypass the effect of htrb-3 (Fig. 4C). Our data show that this is not the case, suggesting that htrb-3 interacts with a rate-limiting factor downstream of MEKK-1. According to our current understanding, MEKK-1 phosphorylates two downstream kinases, MKK4 (SEK1) and MKK7 (Foltz, I.N. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:9344-51; Holland, P.M. et al. (1997) Journal of Biological Chemistry 272:24994-98). Activation of these kinases leads to phosphorylation of several transcription factors, including c-Jun and CREB2 via Jun kinases (Davis, R.J. (1999) Biochemical Society Symposia 64:1-12). To further characterise the point of action of htrb genes, expression constructs for MKK4 and MKK7 were cotransfected with or without a htrb-1 expression plasmid (Fig. 4E). MKK7-mediated AP-1 activation was inhibited upon co-expression of htrb-1. Furthermore, activation of AP-

WO 02/053743

PCT/US02/00070

1 by PMA was potentiated by overexpressing MKK7 and this activity was blocked upon cotransfection of htrb-1 or htrb-3 (Fig. 4F). The MKK4 construct used did not stimulate the AP-1 reporter (Fig. 4E) nor did it potentiate PMA activation, under the conditions used (Fig. 4F). To examine the possible involvement of MKK4 in htrb action, HeLa cells were
 5 transfected with htrb-1 or htrb-3 expression constructs, and stimulated with PMA (Fig. 4D). The phosphorylation level of the endogenous MKK4 protein was not influenced either by PMA or by htrbs. In summary, our data suggest that MKK7 but not MKK4 contributes to AP-1 activation in this system and the inhibitory effect of htrbs is exerted at or downstream of MKK7. To test this, phosphorylation of an effector transcription factor, c-Jun was
 10 determined in cell extracts from PMA stimulated HeLa cells (Fig. 5A). While the maximal level of activation was comparable, the kinetics of c-Jun phosphorylation were significantly altered upon htrb-3 overexpression, resulting in a more rapid down-regulation of the stress-kinase response.

Figure 4 shows that htrb-1 inhibits MEKK-1 and MKK7 mediated AP-1 activation.
 15 HeLa cells were transfected with AP-1 reporter (diamonds) and constant doses (50ng/well) of htrb-1 (triangles) or htrb-3 (squares) expression construct and stimulated with PMA. A Increasing dose of PMA was used to stimulate for 4hrs. B The effect of 50ng/ml PMA was followed for 6hrs. C increasing amount of MEKK-1 expression plasmid (black bars) and constant doses (50ng/well) of htrb-3 expression construct (gray bars) were cotransfected to
 20 study whether overexpression of MEKK-1 can bypass the htrb-3 inhibition. D HeLa cells were transfected with htrb-1 or htrb-3 expression constructs and stimulated 24hrs post-transfection by 50ng/ml PMA. pMKK4 levels were followed by western blotting equal amount of total cell lysates. E The activity of AP-1 reporter was measured in response to co-transfection of MKK4 or MKK7 expression constructs in the presence (gray bars) or
 25 absence (black bars) of htrb-1 expression plasmid. F HeLa cells transfected with AP-1 reporter, MKK4 or MKK7 expression plasmids +/- htrb-1 expression construct were stimulated with 2ng/ml PMA and the reporter activity was determined.

The overall cellular response to an external MAPK activation stimulus depends on the extent to which individual MAPK pathways are activated. This is a precisely regulated
 30 process, which involves many factors, including the micro-environment, cell cycle state, co-stimulatory signals. To investigate whether other MAPK pathways are influenced by overexpression of htrbs, HeLa cells were co-transfected with htrb-3 expression constructs and ERK, JNK or p38 responsive reporters and stimulated by overexpressing upstream

WO 02/053743

PCT/US02/00070

MAP kinases, which specifically activate these effector kinases. An increasing dose of htrb-3 was cotransfected (Fig. 5B). As our data demonstrate, a low dose of htrb-3 was able to promote the activation of JNK and ERKs, while p38 activation was suppressed. High htrb doses (>20ng) inhibited the activation of all MAPK pathways. Furthermore, the optimal

5 htrb-3 dose for facilitating MAPK activation was different for ERKs and JNKs, suggesting that regulation of htrb levels might be a sensitive mechanism to change the balance between the activation of individual MAPK pathways.

Example 6: htrb Potentiates ERK Activation

The effect of htrb overexpression on ERK activation was studied. HeLa cells were

10 activated with PMA and the level of phosphorylated ERKs was monitored by western blot (Fig. 5C, D). Our results show that basal level of phospho-ERK was increased by htrb-3 and the maximal stimulation was strongly enhanced as a result of htrb-1 and htrb-3 overexpression. Similarly, increased ERK activity was detected in kinase assays, performed by using PMA activated cell extracts from HeLa cells, where htrb-1 or htrb-3 was

15 overexpressed (Fig. 5E). In contrast to the observed effect of htrb on JNK and ERK phosphorylation levels and kinase activity, p38 kinase activity was suppressed upon overexpressing these proteins (Fig. 5F).

In Figure 5 (A) HeLa cells were transfected with htrb-1 or htrb-3 expression constructs and stimulated by 50ng/ml PMA. Phospho-cJun levels were determined by

20 western blotting equal amount of total cell lysates and quantitated by NIH Image. (B) pFR luc reporter was transfected into HeLa cells together with pFA-CHOP, activated by pMEK-3 (a p38 activator) (triangles) or with pFA2-Elk-1, activated by pMEK-1 (an ERK activator) (diamonds). AP-1 luc was stimulated by cotransfection with pMEKK-1 to activate the stress kinase cascade (squares). (C) HeLa cells were transfected and treated as

25 on Fig. 5(A). The total and phospho-ERK levels were determined by western blotting. (D) Phospho-ERK levels were quantitated: mock transfected (diamonds), htrb-1 co-transfected (squares), htrb-3 co-transfected (triangles). Kinase assays were performed on PMA stimulated cell extract to measure ERK (E) or p38 (F) activity.

Example 7: Analysis of htrb Protein Domain Function

30 Multiple alignment of trb proteins suggests the existence of three structurally distinct modules (Fig. 2). To investigate the role of these domains in trb function, htrb-1 deletion mutants were generated lacking one or two domains (Fig. 6A). The resulted constructs were expressed HeLa cells as GFP fusion proteins to determine the intracellular

WO 02/053743

PCT/US02/00070

localisation of full-length htrb-1 and the deletion mutants, respectively. htrb-1 was found to be localised in the nucleus but excluded from the nucleoli. While deletion of the C-terminal variable domain had no effect on the intracellular distribution (not shown), deleting the N-terminal variable region yielded in a protein which was no longer preferentially localised in the nucleus (Fig. 6B upper panels). Deletion mutants lacking both termini showed a uniform intracellular distribution (not shown). Similar intracellular localisation was found when full length or N-terminal deletion mutant htrb-3-GFP fusion proteins were expressed (Fig. 6B lower panels). The relevance of the different htrb domains in stress kinase signalling was investigated in transient transfection assays. HeLa cells were transfected with the full length and the htrb-1 deletion constructs, with an MEKK-1 expression plasmid as an activator and the effect of htrb mutants on AP-1 activation were determined (Fig. 6C). All htrb-1 deletion mutants showed strong inhibition of MEKK-1 mediated AP-1 activation, suggesting that overexpression of the htrb kinase-like domain is sufficient to inhibit stress kinase signalling. Although the overall protein sequence of htrbs is remarkably similar to tribbles, the proline-rich N-terminal domain, which is responsible for targeting htrb-1 and htrb-3 to the nucleus show the lowest level of homology. This raises the possibility that the mammalian homologs can be targeted to different cellular organelles than the *Drosophila* protein and/or interact with different proteins.

Figure 6 shows deletion mutagenesis of htrb-1. (A) trbs share a highly conserved central domain and variable terminal regions. Deletion constructs of htrb-1 were generated lacking one or both variable domains and expressed as a GFP fusion protein. (B) HeLa cells were transfected with expression constructs, expressing the full length or truncated htrb-1 or htrb-3 forms. Truncated constructs lack the N-terminal variable region. 24hrs after transfection cells were fixed with 5% formaldehyde and counterstained with propidium iodide (PI). Confocal micrographs were taken by exciting PI and GFP. Micrographs were transferred to PowerMacintosh and overlaid. (C) Ability of htrb-1-GFP truncated mutants to inhibit MEKK-1 mediated AP-1 activation was tested in transiently transfected HeLa cells.

We have further shown that an htrb-1 3'UTR construct alone is capable of increasing htrb-1 protein levels, because the steady state levels of expression of endogenous htrb-1 message are increased following overexpression of the htrb-1 3'UTR (data not shown). The mechanism of this regulation may involve a negative regulator of htrb-1 translation that is titrated away in the presence of excess 3'UTR RNA.

Example 8: htrb Tissue Specificity of Expression and Cell Specificity of Function

WO 02/053743

PCT/US02/00070

- Although htrb proteins show high primary sequence homology to each other, their in vivo function may not be redundant. Specificity is often achieved by tissue specific expression of the individual family members (e.g. JNK or JIP genes). This possibility was tested by determining the mRNA expression profile of all three htrb genes in HeLa cells and quiescent human tissues. HeLa cells express all three htrb genes (Fig. 7C). In contrast, all three htrb genes show restricted expression patterns suggesting tissue specific roles (Fig. 7A). This hypothesis was confirmed by cotransfecting HeLa cells, NIH 3T3 fibroblasts and RAW 264.7 macrophages with htrb-1 or htrb-3 expression constructs and an AP-1 luciferase reporter, and activating them by overexpressing MEKK-1 (Fig. 7B). While both htrb genes disrupted AP-1 activation in HeLa cells, only htrb-3 had an inhibitory effect in RAW cells. Activation of AP-1 in NIH 3T3 cells was not affected by overexpression of either of the htrbs. These results demonstrate that the downstream components of MEKK-1 mediated AP-1 activation and the observed inhibitory effect of htrbs on this signalling cascade are cell type and htrb family member specific.
- Figure 7 shows that htrb genes are expressed and act in a tissue-specific manner. A Multi-tissue PCR was performed to characterise the expression profile of htrb genes by using "Human Rapid-Scan panel" (OriGene). The following tissues were screened: 1.Brain, 2.Heart, 3.Kidney, 4.Spleen, 5.Liver, 6.Colon, 7.Lung, 8.Small Intestine, 9.Muscle, 10.Stomach, 11.Testis, 12.Placenta, 13.Salivary Gland, 14.Thyroid Gland, 15.Adrenal Gland, 16.Pancreas, 17.Ovary, 18.Uterus, 19.Prostate, 20.Skin, 21.PBL, 22.Bone Marrow, 23.Fetal Brain, 24.Fetal Liver. B HeLa, NIH 3T3 and RAW 264.7 cells were transiently transfected with AP-1 reporter, MEKK-1 expression vector and htrb-1 or htrb-3 expression constructs. C Total RNA was purified from HeLa cells and expression of the htrb genes was tested by RT-PCR. D Working hypothesis for mechanism of the trb action.
- Example 9: htrb Scaffolding Function
- Scaffolding proteins have been demonstrated to be indispensable for the activation of the NFkB and MAPK activation cascades in yeast and mammals (Yamaoka, S. et al. (1998) Cell 93:1231-40; Rudolph, D. et al. (2000) Genes Dev. 14:854-62; Harhaj, E.W. et al. (1999) Journal of Biological Chemistry 274:22911-14; Schaeffer, H.J. et al (1998) Science 281:1668-71; Whitmarsh, A.J. et al. (1998) Science 281:1671-74). Here we describe a family human homologs of Drosophila tribbles. Our data suggest that expression levels of htrb-1 and/or htrb-3 control the amplitude of MAPK activation. According to our hypothesis (Fig. 7D), htrb proteins ("T") are essential in the assembly of active MAPK

WO 02/053743

PCT/US02/00070

- complexes ("A", and "B"). Overexpression or suppression of htrb levels results in the enrichment of inactive complexes and, in turn, reduced MAPK mediated activation. The proposed model of trb action (Fig 7D), explains both our observations and those in the *Drosophila* experiments (Grosshans, J. et al. (2000) *Cell* 101:523-31; Seher, T.C. et al. (2000) *Curr. Biol.* 10:623-29; Mata, J. et al. (2000) *Cell* 101:511-22) (Fig. 5B), since scaffolds can facilitate or inhibit signalling responses depending on their concentration (Ferrell, J.E. (2000) www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/52/pel).

- Figure 8 shows the detection of htrb-1 and htrb-3 expression by confocal microscopy. A HeLa cells were transiently transfected with htrb-3-GFP expression plasmid, in combination with antisense htrb-3 and antisense htrb-1 expression constructs. 24 hrs later, confocal micrographs were taken using 10x air lenses and htrb-GFP expressing cells were detected by using NIH image (for details of the analysis see: Kiss-Toth, E. et al., *Journal of Immunological Methods* 239, 125-135 (2000)). The brightness vs. the area of the detected particles is plotted. Red spots indicate cells having the fluorescence above the background level, thus representing htrb-GFP expressors. B HeLa cells were transfected with plasmids expressing full length or truncated htrb-1-GFP proteins. Similarly to panel 8A, expressors were detected on a single cell level.

- Figure 9 shows the titration of sense vs. antisense htrb-3. HeLa cells were transfected with the indicated reporter and expression constructs and activated by either PMA (A) or co-transfection of MEKK-1 expression vector (B).

Example 10: Materials and Methods

The Human trb sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database: htrb-1 (AF250310), and htrb-3 (AF250311).

- SEQ ID No. 1 = complete cDNA sequence of htrb-1
 SEQ ID No. 2 = htrb-1 polypeptide sequence
 SEQ ID No. 3 = htrb-3 polypeptide sequence
 SEQ ID No. 4 = htrb-3 polypeptide sequence.
- Plasmids, PCR: MKK4, MKK7 (Holland, P.M. et al. (1997) *Journal of Biological Chemistry* 272:24994-98), IL-8-luc (Wyllie, D.H. et al. (2000) *Journal of Immunology* 165:7125-32) and LHRE-TK-luc (Maamra, M. et al. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274:14791-98) were described earlier. V12 Ras was a kind gift of Dr. J.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Downward. pAP-1 luc, pNF- κ B luc, pFR luc, pFA-CHOP, pFA2-Elk-1, pMEKK-1 pMEK-1 and pMEK-3 were part of the PathDetect (Stratagene) signal transduction reporter system.

htrb clones: Deletion constructs lacking the variable regions were made by PCR using the following primers: htrb-1 5' deletion primer: 5'-

- 5 CCGGATCCACCATGATCGCCGACTACCTGCTG-3', 3' deletion primer: 5'-
CCGGTACCTTACGGCCGAAACCAGGGGTGCAGTAG-3' htrb-3 5' deletion primer:
5'-CCGGATCCATCCATCCATGATTGGGCCCTATGTCCTCCTGGAG-3'. PCR
products were subcloned into PCR 2.1 TOPO (Invitrogen) and sequenced. For constructing
GFP fusion proteins, htrb mutants were subcloned into pEGFPN1 or pEGFPN2 (Clontech),
10 as appropriate.
- Cell cultures, transfections: HeLa (ECACC, 85060701) and NIH 3T3 cells were maintained
in DMEM with 10% fetal calf serum (FCS) and penicillin-streptomycin. Raw cells were
cultured in RPMI supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin. Cells (1.5x10⁴
per well) were seeded into 96-well tissue culture plates 24h prior to transfection.
- 15 Transfections were performed using SuperFect (Qiagen) according to the manufacturer's
advice; each well received 500ng of inducible reporter construct (pIL-8 luc, pAP-1 luc,
pNF κ B luc or pLHRE-TK luc) 100ng of pTK-RLuc (Promega) for normalization of
transfection efficiency, and 50ng of htrb-1 or htrb-3 expression vectors under investigation,
unless stated otherwise in the appropriate figure legend. 500ng pFR luc, 100ng of pTK-
20 RLuc and 10 ng pFA-CHOP or pFA2-Elk-1, 25ng pMEK-1 or pMEK-3 plasmids were
transfected to specifically activate p38 or ERK and to study the effect of htrb-3 on the
activation. Sufficient pCDNA3.1 (Invitrogen) ("empty vector") was added to keep the total
DNA dose constant at 700ng/well. 2 hrs after transfection, cells were washed and 100 μ l of
fresh medium added. Triplicate wells were transfected for each treatment. Stimulations
25 were performed for 4 hrs (unless indicated otherwise), twenty-four hours later. 2nM IL-
1 β or 10ng/ml TNF α , 0.5 μ g/ml human growth hormone, 50ng/ml PMA or 10nM of
the other cytokines, listed on Table 1 was used (unless stated otherwise on the figure).
Agonists were prepared and added as 10x stocks in 11 μ l of PBS. Reporter levels were
measured following 4 hours stimulation using the Dual-Luciferase system (Promega) as
30 recommended by the manufacturer.
- Cytokines: IL-1 β was a kind gift from the Immunex Corporation. The other human
cytokine preparations were kindly provided by Dr. Steve Poole, NIBSC.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Western blotting: For detection of pJun, pERK and pMKK4, polyclonal antibodies were purchased from Sigma. Protein concentrations of cell lysates were determined and an equal amount of total protein was loaded in each lane. Kinase assays were performed by using the appropriate kits from New England Biolabs.

5 Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

10

WO 02/053743

PCT/US02/00070

1. An isolated htrb-1 encoding nucleic acid comprising a nucleotide sequence which is at least about 90% identical to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 1 or the complement thereof.
2. The nucleic acid of claim 1, wherein the nucleic acid comprises a nucleotide sequence at least about 95% identical to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 1 or the complement thereof.
3. The nucleic acid of claim 1, wherein the nucleic acid comprises a nucleotide sequence at least about 99% identical to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 1 or the complement thereof.
4. The nucleic acid of claim 1, wherein the nucleic acid comprises a nucleotide sequence at least about 95% identical to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 1 or the complement thereof, and encodes an AP-1 inhibitory activity.
5. The nucleic acid of any of claims 1, 2, 3 or 4 which hybridize to an htrb-1 ORF encoding nucleic acid corresponding to nucleotides 282 to 1400 of SEQ ID No. 1.
6. The isolated nucleic acid of claim 1, which further encodes an htrb polypeptide that is at least about 75% identical to the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2.
7. The isolated nucleic acid of claim 6, which further encodes an AP-1 inhibitory activity.
8. The isolated nucleic acid of any of claims 1, 2, 3, or 6, wherein the nucleic acid encodes an htrb bioactivity selected from the group consisting of: an inhibition of IL-8 basal expression, an inhibition of AP-1 transcriptional activation, an inhibition of MEKK-1 kinase signaling, an inhibition of MKK-7 kinase signaling, a cellular hypertrophy-promoting activity, an activation of ERK kinase signaling, and an inhibition of JNK kinase signaling.
9. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to a htrb-1 nucleotide sequence selected from the group consisting of: nucleotides 283 to 730 of SEQ ID No. 1; nucleotides 1 to 729 of SEQ ID No. 1; and nucleotides 1500 to 1916 of SEQ ID No. 1.
10. The nucleic acid of claim 9, which further encodes an htrb polypeptide that is at least about 50% identical to the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2.
11. The nucleic acid of claim 10, which further encodes an htrb-1 bioactivity.
12. The nucleic acid of claim 9, which further includes at least 25 contiguous nucleotides that are identical to said htrb nucleotide sequence.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

13. An isolated nucleic acid that encodes the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2.
14. An isolated polypeptide comprising a polypeptide sequence of at least 10
- 5 contiguous amino acids from the htrb-1 sequence spanning amino acid residues 1 to 150 of SEQ ID No. 2.
15. The polypeptide of claim 14 comprising at least 20 contiguous amino acids from the htrb-1 sequence spanning amino acid residues 1 to 150 of SEQ ID No. 2.
16. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 70%
- 10 identical to the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2.
17. The polypeptide of claim 16, wherein the polypeptide sequence is at least 80% identical to the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2.
18. The polypeptide of claim 16, wherein the polypeptide sequence is at least 90% identical to the htrb-1 polypeptide sequence set forth in SEQ ID No. 2.
- 15 19. The polypeptide of claim 13, 14, 15, 16, 17 or 18 having at least one htrb-1 bioactivity.
20. The polypeptide of claim 19, wherein the htrb-1 bioactivity is selected from the group consisting of: an inhibition of IL-8 basal expression, an inhibition of AP-1 transcriptional activation, an inhibition of MEKK-1 kinase signaling, an inhibition of
- 20 MKK-7 kinase signaling, a cellular hypertrophy-promoting activity, an activation of ERK kinase signaling, and an inhibition of JNK kinase signaling.
21. An isolated htrb-1 polypeptide having the sequence set forth in SEQ ID No. 2.
22. A method of modulating an AP-1 mediated inflammatory signal in a cell comprising providing the cell with a htrb agonist or antagonist.
- 25 23. The method of claim 22 wherein the htrb agonist or antagonist is a htrb polypeptide, a htrb peptidomimetic or a htrb nucleic acid.
24. The method of claim 23 wherein the htrb agonist or antagonist is selected from the group consisting of: htrb-1, htrb-1 N htrb-1 C, htrb-1 N C, htrb-3, an htrb-1 5' UTR and N-terminal variable region antisense construct, an htrb-3 5' UTR and N-terminal
- 30 variable region antisense construct, an htrb-1 3'UTR sense construct.
25. The method claim 22, wherein the AP-1 mediated inflammatory signal is selected from the group consisting of: a TNF induced inflammatory signal, and an interleukin induced inflammatory signal.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

26. A method of inhibiting an AP-1 mediated inflammatory signal in a cell comprising contacting the cell with an htrb polypeptide of any of claims 14, 15, 16, 17, 18, 20 or 21.
27. The method of claim 26, wherein the htrb polypeptide is selected from the group consisting of: htrb-1, htrb-1 N htrb-1 C, htrb-1 N C, htrb-3, htrb-3 N htrb-3 C, and htrb-3 N C.
28. A method of activating an ERK-mediated signal in a cell comprising providing the cell with an htrb agonist activity.
29. The method of claim 28, wherein the htrb agonist activity is provided by an htrb-1 polypeptide of any of claims 13, 14, 15, 16, 17 or 20.
30. The method of claim 29, wherein the htrb polypeptide is selected from the group consisting of: htrb-1, htrb-1 N htrb-1 C, htrb-1 N C, htrb-3, htrb-3 N htrb-3 C, and htrb-3 N C.
31. The method of claim 28, wherein the ERK-mediated signal is selected from the group consisting of: an AP-1-mediated gene activation signal, an estrogen receptor-mediated gene activation signal, an FGF induced signal, and a PMA induced signal.
32. A method of identifying an interleukin regulatory gene comprising:
- (a) transfecting a mammalian reporter cell comprising an interleukin gene reporter with a low-complexity pool of a mammalian cDNA vector library;
 - (b) screening the transfected reporter cell for positive clones by identifying transfected cells with either an increase or decrease in the interleukin gene reporter activity relative to the mammalian reporter cell transfected with the vector alone; and
 - (c) identifying the interleukin regulatory gene from the positive clones by retransfecting the low complexity pool from said positive clones and sequencing the cDNA inserts from the positive clones obtained upon retransfection,
- thereby identifying an interleukin regulatory gene.
33. The method of claim 32, wherein the interleukin gene reporter is selected from the group consisting of: an IL-1A gene reporter, an IL-1B gene reporter, an IL-1RN gene reporter, and IL-8 gene reporter.
34. The method of claim 32, wherein the mammalian cell is selected from the group consisting of: a HeLa cell, an NIH 3T3 cell, a Raw cell, a peripheral blood lymphocyte.
35. The method of claim 32, wherein the mammalian cDNA library is selected from the group consisting of: a PBMC library, a HeLa cell library, a PMA-induced mammalian cell library, and a cytokine-induced mammalian cell library.

WO 02/053743

PCT/US02/00070

36. A method of identifying the gene targets of an interleukin regulatory gene in an inflammatory signaling network comprising:
- (a) expressing an interleukin regulatory gene clone, comprising an interleukin regulatory gene cDNA and an expression vector, in a population of mammalian cells;
- 5 (b) isolating a population of nucleic acids representing expressed genes from said cells;
- (c) determining the gene expression profile of the interleukin regulatory gene expressing cells by microarray analysis of the population of nucleic acids representing expressed genes from said cells; and
- 10 (d) comparing the gene expression pattern of mRNA expression from the cells transfected with the interleukin regulatory gene clone with that obtained by transfecting the vector alone in order to identify genes, other than the said interleukin regulatory gene, which are either up-regulated or down-regulated in the interleukin regulatory gene expressing cells, thereby identifying the gene targets of an interleukin regulatory gene in an
- 15 inflammatory signaling network.
37. The method of claim 32 further comprising the method of claim 36.
38. The method of claim 36, wherein the mammalian cell is selected from the group consisting of: a HeLa cell, an NIH 3T3 cell, a Raw cell, a peripheral blood lymphocyte.
39. The method of claim 36, wherein the population of nucleic acids representing
- 20 expressed genes is an mRNA population.
40. The method of claim 36, wherein the population of nucleic acids representing expressed genes is a cDNA population.
41. The method of claim 36, wherein the microarray analysis provides a gene transcription profile or gene expression fingerprint.
- 25
- 30

WO 02/053743

PCT/US02/00070

Table 1

A

Cytokine	fold AP-1 activation	fold NFkB activation
Interferon- α	3.35 $\pm$ 6%	1.23 $\pm$ 13%
Interferon- γ	1.67 $\pm$ 5%	1.25 $\pm$ 6%
IL-2	1.02 $\pm$ 17%	1.00 $\pm$ 34%
IL-3	1.91 $\pm$ 7%	1.22 $\pm$ 11%
IL-4	1.40 $\pm$ 26%	0.95 $\pm$ 8%
IL-5	8.24 $\pm$ 8%	1.74 $\pm$ 2%
IL-6	0.96 $\pm$ 11%	1.05 $\pm$ 6%
IL-7	0.76 $\pm$ 24%	1.10 $\pm$ 6%
IL-9	1.36 $\pm$ 16%	0.86 $\pm$ 2%
IL-10	0.78 $\pm$ 5%	0.89 $\pm$ 5%
IL-11	0.69 $\pm$ 8%	0.76 $\pm$ 9%
IL-12	2.14 $\pm$ 11%	0.69 $\pm$ 13%
IL-13	0.84 $\pm$ 10%	1.08 $\pm$ 21%
IL-15	1.34 $\pm$ 10%	1.76 $\pm$ 7%
bFGF	0.72 $\pm$ 14%	1.14 $\pm$ 9%
EGF	0.84 $\pm$ 4%	1.28 $\pm$ 6%
Ins. like GF	0.69 $\pm$ 16%	1.07 $\pm$ 3%
TGF- β	13.37 $\pm$ 13%	6.61 $\pm$ 5%
Oncostatin M	0.72 $\pm$ 18%	0.87 $\pm$ 6%
M-CSF	1.52 $\pm$ 5%	1.20 $\pm$ 16%
G-CSF	0.96 $\pm$ 14%	1.06 $\pm$ 15%
GM-CSF	1.04 $\pm$ 15%	1.38 $\pm$ 21%
PDGF-BB	9.06 $\pm$ 6%	0.76 $\pm$ 18%
LIF	0.73 $\pm$ 7%	0.85 $\pm$ 10%
Scatter factor	3.30 $\pm$ 8%	1.03 $\pm$ 4%
PMA	10.37 $\pm$ 9%	5.16 $\pm$ 15%

B

Cytokine	AP-1 inhibition	NFkB inhibition
Scatter factor	34%	-
IL-5	46%	-1.5%
TGF- β	30%	2%
Interferon- α	31%	-
IL-12	16%	-
PDGF-BB	29%	-
PMA	39%	0.8%

WO 02/053743

1/12

PCT/US02/00070

Fig. 1

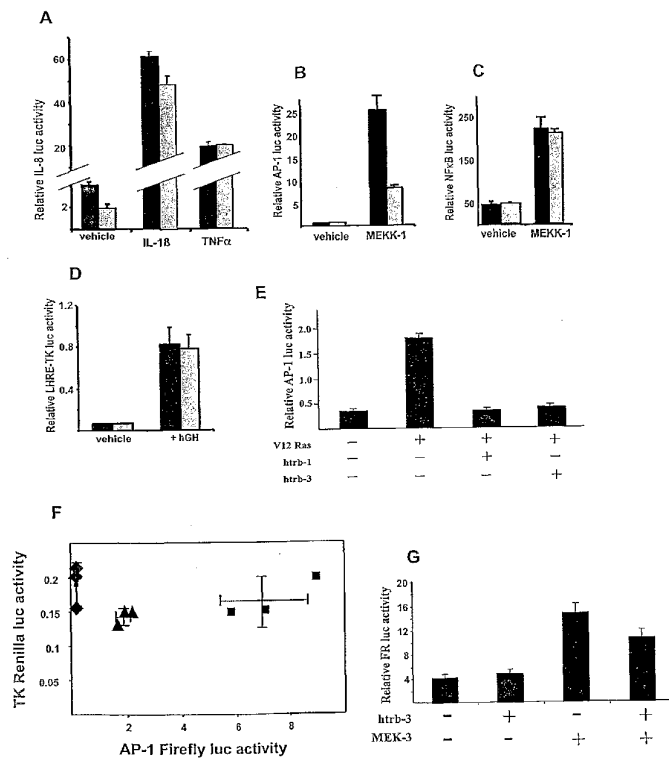


Fig. 2

N-terminal variable region

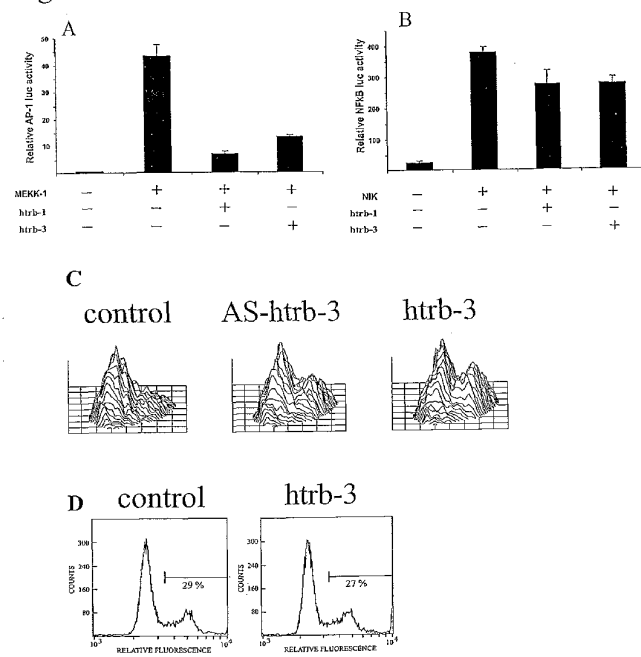
[illegible]

WO 02/053743

3/12

PCT/US02/00070

Fig. 3

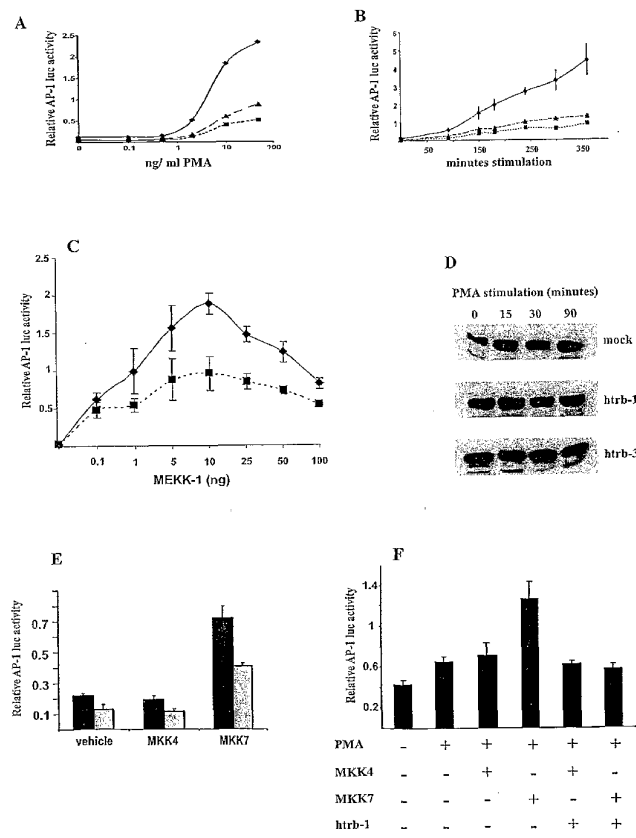


WO 02/053743

4/12

PCT/US02/00070

Fig. 4



WO 02/053743

5/12

PCT/US02/00070

Fig. 5

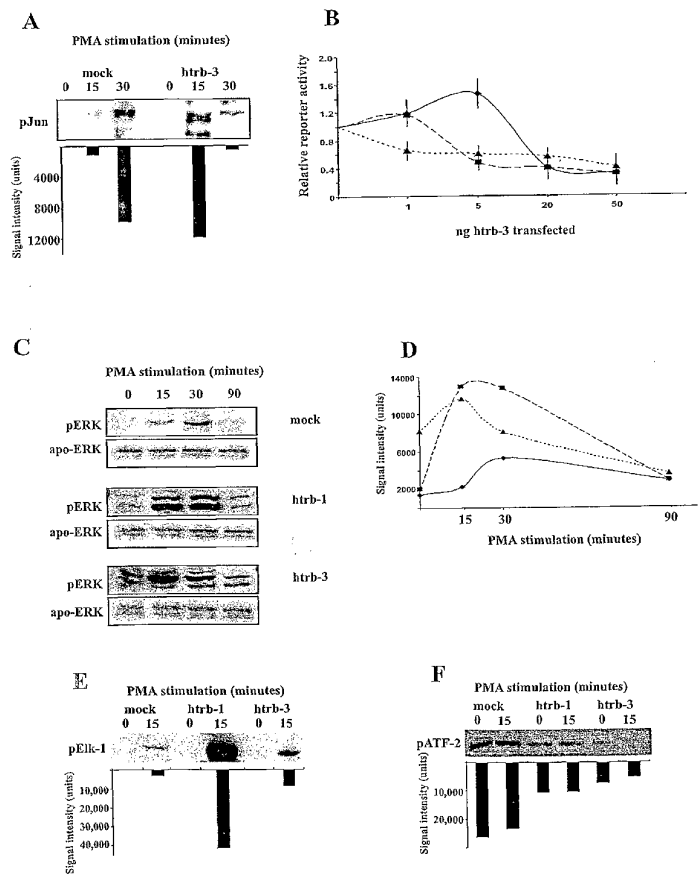
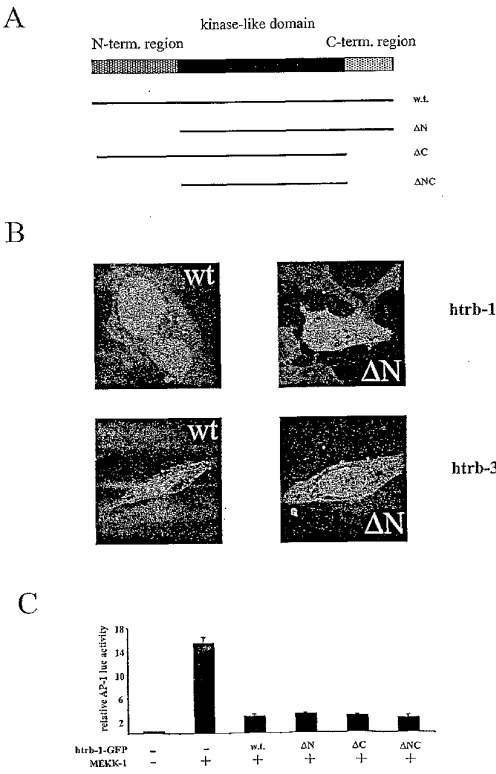


Fig. 6

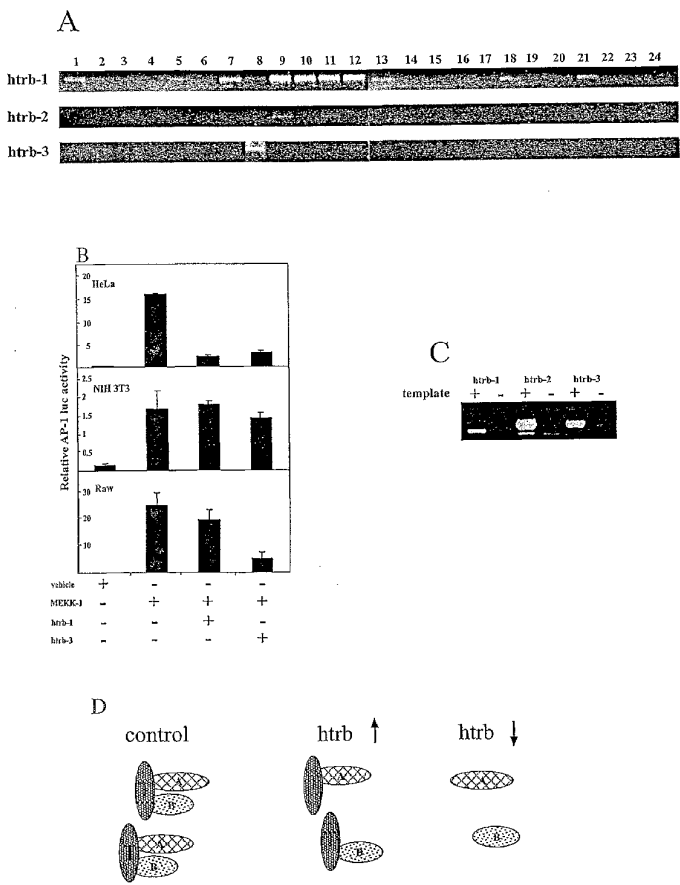


WO 02/053743

7/12

PCT/US02/00070

Fig. 7

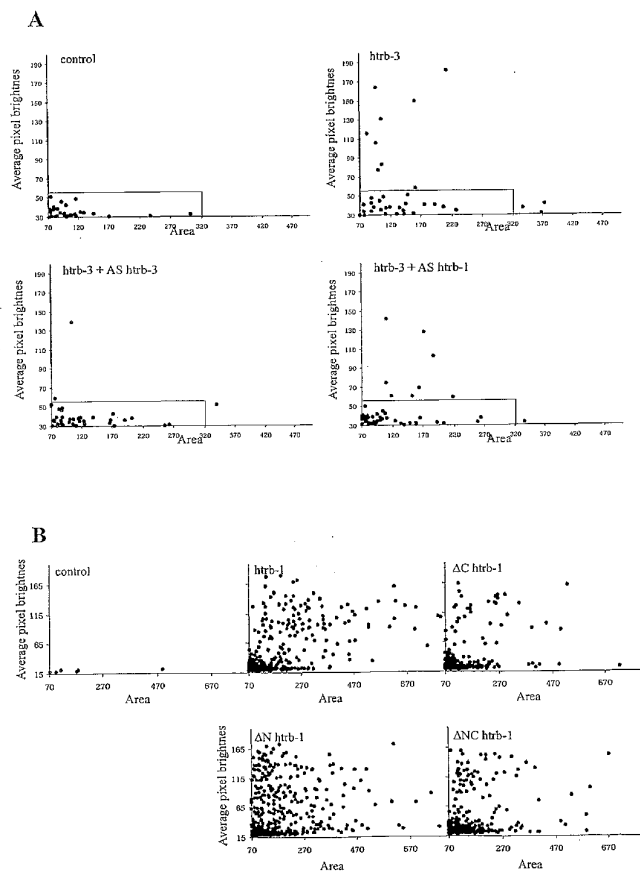


WO 02/053743

8/12

PCT/US02/00070

Fig. 8

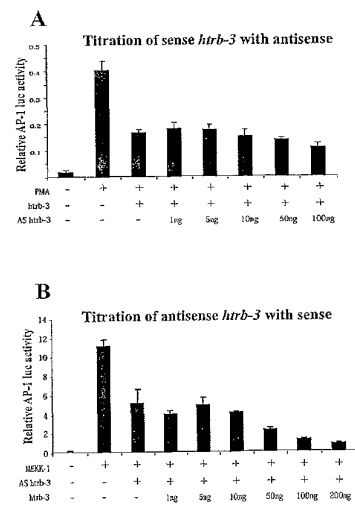


WO 02/053743

9/12

PCT/US02/00070

Fig. 9



WO 02/053743

10/12

PCT/US02/00070

Figure 10

A

```

1 GCGGCGCGCC CCAGCGAGGC TCGGGAGGC CTGCGCTGGG GGGTCCGGG GACTCGAGCC
61 GGCCTCGGCC CCCGCGAGCG ACAGCCAGCG TGCTCCCGCG GTSCAACGG AGCGCGGGG
121 AGTGGCTGCT GCTTGGCCCG TCGTGGGGGC CGAGCCAGGA CCGTCTCGA AACTCCATCC
181 CGCCGGCTGG AAGAGTCCGC GAGCGCGGCA CCAAACCGCG AGCGTCTTCC CGCGCGGATC
241 CGCGGACTTA AAGCGCGGG GCCACCCCGG CCCAGGACGG GATCGGGTC GGTCCGGTGC
301 GCTCTGCGAT GAGCGCGGCC TCGCAGCCCG GCGGCCCGCG CCTGCTCTTC CAGGCCAACC
361 GAGCGGTCCC GCGCAACGCG CTGCTGGAGC CGGACGACGC GCGGGCTGTG GCGGCCAAGT
421 GCGCGCGCCT CTCGAGTGC TCCAGCCCGC CGGACTACCT CAGCCCCCCC GGTCTGCCCC
481 GCGCGCGGCA GCGCGCGCT GCGCTCCCGG GGGCGCGCG AGGCTCCGG AGCGCGCGGG
541 GCGCGCGCGG CATCGCGGAC TACCTGCTGC TGCCCTAGC CGAGCGCGAG CATGTGTCCC
601 GCGCGCTGTG CATCCACACT GAGCGCGAGC TGCGCTGCAA GGTCTTTCCT ATTAAACACT
661 ACCAGGACAA AATCAGGCGT TACATCCAGC TGCCATCGCA CAGCAACATT ACTGGCATTG
721 TGGAGTGAT CCTTGGGGA ACCAAGGCGT ATGCTTCTTT TGGAAGAGC TTTGGGGACA
781 TGCACCTCTA TGTGGGAGC CGGAGAGGCG TCCGGGAGA GGAAGCGCC CGGCTCTTCA
841 AGCAGATTGT CTCGCGCTC GCGCACTGCG ACCGCTCAGC CATCGCTCG GCGGACCTTA
901 AGCTTAGGAA GTTGTCTTTC TCCAGCGAG AGGGAACCCA GCTTAGACTA GAATGCTTAG
961 AAGACACACA CATATGAGG GGGGAAGATG ATGCTTTGTC AGACAAACAT GGTGCCCCAG
1021 CCTACGTGAG CCTGAGATC CTCACACCA CTGGGACCTA CTCGGAAG GCTCGCGAGC
1081 TTTGGAGCCT GGGGGTGATG CTCACACCC TTCTGGTTGG ACGATACCC TTCCATGACT
1141 CAGACCCGAG TGCCCTTTTC TCCAAAATC GCGCTGGACA GTTCTGCAIT CCGTGGACAC
1201 TTTCCCCCAA AGCCAGGTGC CTCATTGCGA GCGCTTGGAG ACGGAGGCC TCCGAGAGAC
1261 TCAGTGGCCC CGAGTCTCTA CTGACCCCTT GGTTTGAGTC CGCTTGGAA CCCGCTTACA
1321 TCGACTCAGA AATAGGAAC TCGAGCCAGA TTCTTCGAGA GTACCGAGG GACAGTGACA
1381 TTAGTTCCCTT CTCTGCTTAA TCCCCAAAC CTCAGAAACC TCATAMTCT TAACACCTGG
1441 CATTTCCATT TCTAAGATG GACAGGCCCT TTGGCGTGGT ACCACCCAGA TAATGACTGC
1501 ATCAGGATGA AAGCTGCTGA CCTGGGATG GTGCTCTCTC TTCTCGGGA TGAGTACTTT
1561 ATTGATTGGA CGAGCATATC TGTGATTGCT GCGCTGCAA TTTGTTCCC TTAGGAGACC
1621 CTCACACACT AATCTCTGCT GATTTGCGA GTTCCGATC TTTTGGGAG GCGAGGTATA
1681 GACACACTTA CACCCGTTGG TCAAGTGGT AATAACTTGG AGCATTCGAA TGGGAGAAAA
1741 AGCAAAATCGC ACAATGACAT ATTTGAGTA ATAACGGTAT TTTTCACAG GTGCAAAATT
1801 GGGCCAAATA ATCTGCCAT TTTGAATCA TCTTGGTGG CTAGACTGCT ACGGAGCTTT
1861 CTCTGATGGG AAGTTCCTT TTTTGGCTTA ACATTCACCC TTCTTCACA CTCACATTTA
1921 CCAATGACTC TGCTCCGTTT TGGAGCAGA CTGTTTAAAG TTGCTCAGGA GCGTGTGGA
1981 ACCATGAACC GAGACTCTTC TCTGTTTCTT GCCAAGACCT CATCTGCACT AATGCTTCT
2041 CCTGACCTT GACACTTCCC CCTTTAGCTA TAAAGCACT TACCAGCYGA ACGTGGAAAC
2101 GTATCACAAA AGATTCATC TCCCAACGAT TTCAGACTC TGAGCTCAGA GAGACTCCAG
2161 ATTTAAAAAA ATAATTGAG TGCTTGGAAA CTATTAGCTT TTTAGTTCC TTCCAAATAT
2221 GTTAGTACCT ACCCTTACT TTTTCCCCAA GACCATCTCA GGTGGAGCA TTCTGTCTAA
2281 GAGAAGAAAG ATAGGAGGC TCCCACCCAC CTCTCCCAAG AGCAGACATT AAACATCTTT
2341 GTGCTTTGAA GAAGTGAAT TTTGATAGT CTTGTGATTC TCAGACTAAC TTCAAGATT
2401 ATACTTTAAC CCTTCCAGA TATGTCGCG CTTTGGCATT GTGTGACAT CTGAGTTT
2461 GCATGGTGGG TTGTTAATAT TCGAATGTG TGGTTATGA ATAGCTCTGT ATATCTGGCT
2521 TCTGGAGTGA AACAGCAAC CCCAATCTT CAAAGTTGGA AGGAACCTTA AAAATCATCC
2581 GGTCCCATCT CTTCCTCTT TCTGCCACT CCCAAGGCGA AAATCCCTC TTCAGCTTCT
2641 TTTGTAGTGT GGAATCCAGC CTCGTGTTGA TATGTCCAGA GATGAAACT CACTCCCTTA
2701 CAAAGATGG AGCTTAATGG AGAAATTGCA ACTTTCATTA AAAACCAAT TCAGATGAAA
2761 TATCAGTAAC TGTCTTGGAC AGTGTGAAA TCAGGTGGTT AAACGGTAA ACAAAATATA
2821 CTGTATTTTG AGAATGGCA CAAAACAGG CAGTCATCTT TAAGGGCTAT GCTTAGSCAA
2881 ACTACTAACA TGCATTGTGA GAATGCCGTG TATACCTCAC GTACTGTGA CTTTGTACAT
2941 ATATTTTACC TTTTATACCT ATGTTGCAAT TTTGTTTGT TTTGTTGTC TTTGAGGCTT
3001 GTTTTGTGT CTGTCTCTG CTGAATAACC TGGGTGTTTA AAACCACTG AAATGTGAAT
3061 GATTAATTGGC AATATTACCT TGACAGAAAT ATGGGACTTT GAGAGAGGG AGGACAGAGG
3121 CTCTGTGCGC ACTAAGGCTC TCGTGGTTGC TCGACTGTG TACTGTGAT ACATATCCG
3181 ACTAAGGACT CTGGCTGCGC AGGGCTTCTT CCGGGAAG CTAGAAACAG TAGGTCTTTC
3241 CTGTACATAC GTGTATATAT GTGACAGTGC AGATGGCCGT TTCTGACTTG TAGAGAAATT

```

WO 02/053743

11/12

PCT/US02/00070

3301 TTAATAAACC TGGTTCGT

B

MRVGPVRSAMSGASQPRGPALLFPATRGVPAKRLLDADDAAVA
AKCPRLSECSPPDYLSPPGSPCSPPPPAAPGAGGSGSAPGPSRIADYLLPLAER
EHVSRALCIHTGRRLRCKVFDIKHYQDKIRPYIQLPSHSNITGIVEVILGETKAYVFP
EKSFGDMHSYVRSRKRRLREEEAARLFKQIVSAVAHCHQSAIVLGLKLRKPFVSTBER
TQLRLESLEDTTHIMKGEDDALSDKHGCPAYVSPILNTTGTYSGKAADVSLGVMLYT
LLVGRYPFHDSDFALFSKIRRGQFCIPSHISPKARCLIRSLRRPSPRLTAPETLL
HPWFESVLEPGYIDSRIQTSDQIVFEYQEDSDISSFFC

WO 02/053743

12/12

PCT/US02/00070

Figure 11

A

```
1  ATGOGAGCCA CCCCTCTGGC TGCTCTGCG GGTTCCTGT CCAGGAAGAA GCGTTGGAG
61  TTGGATGACA ACTTAGATAC CGAGCGTCCC GTCCAGAAAC GAGCTCGAG TGGGCCCCAG
121 CCCAGACTGC CCCCTCTGCT GTTGGCCCTG AGCCCACTTA CTGCTCCAGA TGTGCAACT
181 GCTGTGGCCA CTGCTCCCG TCTTGGGCC TATGTCTTC TGGAGCCGA GGAGGCCGG
241 GGGCCTTACC AGGCCCTGCA CTGCTTACA GGCACTGAGT ATACCTGCA GGTGTACCC
301 GTCCAGGAG CCCCTGCTCT GTTGGAGCCC TATGCGCGG TGGCTCCCA CAGCATCTG
361 GCTCGGCCCA CTGAGTCTCT GCTGTGACC CAGCTCCTCT ACGCCCTTTT CACTGGGACC
421 CATGGGGACA TGCACAGCTT GGTGCGAAG CCGCACCGTA TCCCTGAGCC TGAAGCTGCC
481 GTGCTCTTCC GCCAGATGGC CACCGCCCTG GCGCACTGTC ACCAGCAGG TCTGTCTCTG
541 CGTGATCTCA AGCTGTGTC CTTTGTCTT GCTGACGCTG ACCGTGAGAA GAGGAGCTG
601 GTGCTGGAGA ACCTGGAGGA CTCTGCTTG CTGACTGGGC CAGATGATTC CCTGTGGAC
661 AAGCACGCGT GCCCAGCCTA CTTGGGACT GAGATCTCA GCTCACGGGC CTCATACTG
721 GGCAAGGCAG CCGATGTCTG GAGCCTGGGC GTGGCGCTCT TCACCATGCT GGCCGGCCAC
781 TACCCCTTCC AGGACTCGGA GCCTGTCTG CTCTTCGGCA AGATCCGCC GCGGCGCTAC
841 GCCTTGCCTG CAGGCTCTC GGGCCCTGCC CGCTGTCTGG TTGCTGCTCT CCTTGTCTG
901 GAGCCAGCTG AACGGCTCAC AGCCACAGGC ATCTTCTGC ACCCTTGGCT GCGACAGGAC
961 CGATGCTCT TAGCCCCAAC CGATCCCAT CTCTGGAGG CTGCCAGGT GGTCTCTGAT
1021 GGAAGTGGG TGGACGAAGC CAGGGAAGAG GAGGGAGACA GAGAAGTGT TCTGTATGG
1081 TAG
```

B

```
MRATPLAAPAGSLSRKKRLELDNLDTERPVQXRARSGPQPLP
PCLLPSPPTAFDRATAVATASRLGPYVLLSEPEBGGRAYQALHCPTGTEYTCRVVPVQ
BALAVLEPYARVPPIKHVARPTEVLACTQLLYAFPTRTHGDMHSLVRSRHRIPPEAA
VLFRQMATALAHCHQHGLVLRDLKLCRFVFADRDREKKLVLENLEDSCVLTGPDDSL
NDKHACPAYVGPPIILSSRASYSKADVWSLGVLFMTLAGHYPPQDSEFVLLFGKIR
RGAYALPAGLSAPARCLVRCLLRREPAERLTATGILLHPWLRQDPMPLAPTRSHLWEA
AQVVPDGLGLDEARREEDREVVLVG
```

【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 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053743 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/50
- (21) International Application Number: PCT/US02/00070
- (22) International Filing Date: 8 January 2002 (08.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/260,294 8 January 2001 (08.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): INTERLEUKIN GENETICS, INC. [US/US]; 135 Beaver Street, Waltham, MA 02452 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): DOWER, Steven [GB/GB]; Hopwood House, High Moscar, Sheffield S6 6GR (GB); QUANSTROM, Eva [SE/GB]; Hopwood House, High Moscar, Sheffield S6 6GR (GB); KISS-TOOTH, Endre [HU/GB]; 3 Greystones Rise, Sheffield S11 7JP (GB).
- (74) Agents: OLESEN, James, T. et al.; Foley, Hoag LLP, 155 Seaport Boulevard, Boston, MA 02210-2698 (US).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, HU, 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: 9 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/053743 A3

(54) Title: MAMMALIAN TRIBBLES SIGNALING PATHWAYS AND METHODS AND REAGENTS RELATED THERETO

(57) Abstract: The invention provides methods and reagents for modulating mitogen activated protein kinase pathways using mammalian tribbles homologs (htrb).

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/00070
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/11 C12Q1/68 G01N33/50		
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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 3 December 2000 (2000-12-03) MAYHAUS ET AL.: "Homo sapiens G-protein-coupled receptor induced protein GIG2 mRNA, complete cds." Database accession no. AF205437 XP002217012 the whole document	1-21
A	DATABASE EMBL 'Online! 20 September 2000 (2000-09-20) SUGANO ET AL.: "Homo sapiens cDNA: FLJ23292 fis, clone HEP10334." Database accession no. AK026945 XP002217013 the whole document	22-31
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 October 2002		25.03.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 951 apo NL Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Seroz, T

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 02/00070

C (Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE SWALL 'Online! 1 October 2000 (2000-10-01) BLAKEY S: "Novel protein kinase domains containing protein similar to phosphoprotein C8FW and rat NIPK." Database accession no. Q9NLD2 XP002217014 the whole document	22-31
A	DATABASE SWALL 'Online! 1 February 1997 (1997-02-01) OHNO ET AL.: "Homo sapiens GS3955 protein." Database accession no. Q92519 XP002217015 the whole document	1-31
A	RORTH PERNILLE ET AL.: "The level of C/EBP protein is critical for cell migration during Drosophila oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation." MOLECULAR CELL, vol. 6, no. 1, July 2000 (2000-07), pages 23-30, XP002217009 ISSN: 1097-2765 abstract page 23, left-hand column, line 11-15 page 23, right-hand column, paragraph 2 page 29, left-hand column, last paragraph -page 29, right-hand column, paragraph 2	1-31
A	ONDREY FRANK & ET AL.: "Constitutive activation of transcription factors NF-kappaB, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines." MOLECULAR CARCINOGENESIS, vol. 26, no. 2, October 1999 (1999-10), pages 119-129, XP001117625 ISSN: 0899-1987	
A	HAN SEUNG H ET AL.: "Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) promotes IL-2 mRNA expression through the up-regulation of NF-kappaB, AP-1 and NF-AT in EL4 cells." JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 287, no. 3, December 1998 (1998-12), pages 1105-1112, XP002217011 ISSN: 0022-3565	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/00070
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. ☒	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 22-31 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.	
2. ☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. ☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-31 (all completely)	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 02/00070

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-31 (all completely)

Polynucleotide encoding a mammalian Tribbles homolog, htrb-1, polypeptide encoded by the same, method for modulating an AP-1 mediated inflammatory signal or an ERK mediated signal by using htrb-1 agonists or antagonists.

2. Claims: 32-35 (all completely), 37 (completely)

Method for identifying an interleukin regulatory gene.

3. Claims: 36 (completely), 38-41 (all completely)

Method for identifying the gene targets of an interleukin regulatory gene in an inflammatory signaling network.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 17/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 0 1	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00 B	
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,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,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 クワンストロム, エヴァ

イギリス国 エス 6 6 ジーアール シェフィールド ハイ モスカー ホップウッド ハウス

(72)発明者 キーストス, エンドル

イギリス国 エス 1 1 7 ジェイピー シェフィールド グレイストーンズ ライズ 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB07
 FB09 FB12
 4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 CA12 DA02 GA11 HA12
 4B063 QA01 QA12 QA13 QA18 QQ08 QQ13 QQ43 QQ53 QR32 QR55
 QR59 QR62 QR77 QR80 QR82 QS12 QS25 QS34
 4B065 AA90X AA93X AB01 AC15 AC20 BA02 BD35 BD39 CA46 CA60
 4C084 AA01 AA02 AA06 AA13 AA17 BA01 BA02 BA08 CA18 CA26
 DC50 MA13 MA17 MA23 MA34 MA35 MA37 MA44 MA52 MA55
 MA56 MA66 MA67 NA14 ZA162 ZA892 ZB112 ZB152 ZC412
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA13 MA17 MA23 MA34 MA35
 MA37 MA44 MA52 MA55 MA56 MA66 MA67 NA14 ZA16 ZA89
 ZB11 ZB15 ZC41
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005506038A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002555250	申请日	2002-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	英特利金遗传学有限公司		
申请(专利权)人(译)	白细胞介素遗传学公司		
[标]发明人	ダウアースティーヴン クワンストロムエヴァ キストスエンドル		
发明人	ダウアー,スティーヴン クワンストロム,エヴァ キストス,エンドル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P25/28 A61P29/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K14/54 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P17/06 A61P25/28 A61P29/00 A61P43/00 C07K14/4703 C12N15/1034		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P43/00.101 C07K14/47 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB09 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC15 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BD35 4B065/BD39 4B065/CA46 4B065/CA60 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/CA18 4C084/CA26 4C084/DC50 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA34 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C084/ZA892 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA23 4C086/MA34 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA44 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA66 4C086/MA67 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C086/ZA89 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	佐久间刚		
优先权	60/260294 2001-01-08 US		
其他公开文献	JP2005506038A		

摘要(译)

本发明提供了使用哺乳动物三联体同源物 (htrb) 来调节有丝分裂原活化的蛋白激酶途径的方法和试剂。

