

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-72186

(P2012-72186A)

(43) 公開日 平成24年4月12日(2012.4.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 2 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	

審査請求 有 請求項の数 3 O L 外国語出願 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-289718 (P2011-289718)	(71) 出願人	597166578 メディカル リサーチ カウンシル
(22) 出願日	平成23年12月28日 (2011.12.28)		イギリス国 ダブリュー1ピー 1エイエル ロンドン, パーク クレセント 20
(62) 分割の表示	特願2000-618451 (P2000-618451) の分割	(71) 出願人	596129215 シェーリング コーポレイション Schering Corporation
原出願日	平成12年5月11日 (2000.5.11)		アメリカ合衆国, ニュージャージー O 7065, ローウェイ, アールワイ60 -30, イースト リンカーン アベニ ュー 126
(31) 優先権主張番号	9911123.9	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成11年5月13日 (1999.5.13)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	9925989.7		
(32) 優先日	平成11年11月3日 (1999.11.3)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 O X 2 レセプターホモログ

(57) 【要約】

【課題】 O X 2 と命名されたりガンドに対する新規なレセプターホモログを提供すること

【解決手段】 哺乳動物 (例えば、霊長類) の O X 2 のレセプター、精製されたタンパク質およびそのフラグメントをコードする核酸、抗体 (ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方)。診断的有用性および治療的有用性の両方のために組成物を使用する方法。本発明はまた、細胞または組織培養細胞の生理機能または発生を調節する方法を提供し、その方法は、細胞を哺乳動物 O X 2 R H のアゴニストまたはアンタゴニストと接触させる工程を包含する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

(a) 配列番号 2 0 に示す成熟アミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド、および、
(b) 配列番号 2 0 に示すアミノ酸配列からなる、単離されたポリペプチド、
からなる群から選択される O X 2 R ポリペプチドに特異的に結合して該 O X 2 R ポリペ
チドを刺激する抗体を含む、自己免疫疾患を治療するための薬学的組成物。

【請求項 2】

前記自己免疫疾患が多発性硬化症である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記自己免疫疾患が慢性関節リウマチである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、免疫系機能を含む、哺乳動物生理学に影響を及ぼすための組成物および方法に関する。詳細には、それは、発生および / または免疫系を調節し得る試薬または方法を提供する。これらの物質の診断的使用および治療的使用もまた記載される。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

O X 2 抗原 (O X 2) は、胸腺細胞、Bリンパ球、活性化Tリンパ球、ニューロン、内皮細胞、および濾胞性樹状細胞を含む種々の細胞に関して同定された細胞表面タンパク質である。非特許文献 1。配列分析は、それが 2 つの細胞外免疫グロブリン様 (I g 様) ドメインおよび短い細胞質ドメインを含む膜貫通タンパク質であるということを示す。非特許文献 2。このドメイン構成は、多くの異なる白血球表面タンパク質において共通であり、そして見出される。非特許文献 3。これらの型のタンパク質は、しばしば他の細胞の表面上の他のタンパク質と相互作用し、また、I g 様ドメインを有する。

【0003】

O X 2 抗原の分布は、O X 2 は、結合パートナー (例えば、O X 2 レセプター (O X 2 R)) を介してシグナルを、マクロファージ (そのレセプターを発現する (非特許文献 4)) を含む白血球系統内の細胞およびおそらく単球 - マクロファージ系統の他の細胞にリレーするという仮説と一致する。また、O X 2 は、マクロファージの種々の機能の調節に関係していた。例えば、このシナリオにおいて、ニューロン上の O X 2 の発現は、O X 2 R を発現し得る小グリア細胞と呼ばれる、脳の常在性マクロファージへの情報伝達の直接の手段を確立し得る。なぜなら、それらは、単球 - マクロファージ系統から発生するからである。非特許文献 5。

【0004】

一般的に、マクロファージの活性化の欠損または激化は、広い範囲の免疫学的疾患および他の疾患の病原性に寄与する。例えば、非特許文献 6 ; 非特許文献 7 ; ならびに非特許文献 8 を参照のこと。

【0005】

また、O X 2 相互作用タンパク質の同定 (例えば、O X 2 抗原に対する O X 2 R) は、難しい。なぜなら、その相互作用の親和性はしばしば非常に低いためである。このことは、細胞表面タンパク質 (例えば、O X 2) の組換え形態と、それらの結合パートナー (p a r t n e r) (相互作用タンパク質、例えば、O X 2 R) との結合は、通常の方法による検出が可能であるほど十分に安定ではないということの意味する。従って、C D 4 8 と C D 2 との間の相互作用 (両方のパートナーが、それらの細胞外領域に 2 つの I g 様ドメインを含む) は、わずか 1 秒間の半減期を有する。非特許文献 9 ; および非特許文献 1 0 を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0006】

細胞表面タンパク質の組換え形態（例えば、OX2）は、多数の方法によってマルチバレント（multivalent）が作製され得、そして新規なタンパク質を検出するために使用され得る。OX2は、CD4由来の2つのIg様ドメインのタグを含むように操作される。組換え可溶性タンパク質は、真核生物細胞における従来の発現方法によって発現される。初期の研究において、蛍光ビーズ上のマルチバレント組換えOX2タンパク質とマウスマクロファージとの間の相互作用を観察した。非特許文献4。

【0007】

上記に関わらず、ブロッキング抗体OX89の使用によるマウスマクロファージ上のOX2Rを同定する試みは、成功しなかった。非特許文献4。

10

【0008】

前述から、OX2様分子に対する新規なレセプターの発見、同定、および理解は非常に有利であることは明白である。本発明は、OX2リガンドおよび関連化合物に対する新たなレセプターホモログならびにそれらの使用のための方法を提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Barclay (1981) Immunology 44:727~736

【非特許文献2】Clarkら、(1985) EMBO J. 4:113-118

20

【非特許文献3】Barclayら、(1997) Leucocyto Antigen Factsbook (第2版) Academic Press, London

【非特許文献4】Prestonら、(1997) Eur. J. Immunol. 27:1911-1918

【非特許文献5】PerryおよびGordon (1988) Trend Neurosci. 11:273-277

【非特許文献6】McGeeら、(1992編) Oxford Textbook of Pathology Oxford University Press, Oxford

【非特許文献7】LewisおよびMcGee (1992編) The Macrophage IRL Press, Oxford

30

【非特許文献8】BockおよびGoode (1997編) The Molecular Basis of Cellular Defence Mechanism Wiley & Sons

【非特許文献9】Van der Merweら、(1993) Biochem. Soc. Trans. 21:340S

【非特許文献10】Van der merweおよびBarclay (1994) Trends Biochem. Sci. 19:345-358

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0010】

（発明の要旨）

本発明は、例えば、げっし類および霊長類の実施形態において、OX2と命名されたりガンドに対する新規なレセプターホモログに関する。これらは、種々のげっし類種および霊長類種に由来する実施形態にあつては、一般的に、OX2レセプターホモログ（OX2RH）と命名されている。それぞれの種のOX2に実際に結合するように、2つが確立されてきた。詳細には、それは、OX2RH1、OX2RH2、OX2RH3およびOX2RH4と命名されるホモログの説明を提供する。それは、ポリペプチドそれ自身をコードする核酸ならびにそれらの産生および使用のための方法を含む。本発明の核酸は、本明細書に同封されるクローン化された相補的DNA（cDNA）配列に対するそれらの相同性

50

によって、部分的に特徴付けられる。

【0011】

本発明は、OX2とOX2Rとの間の相互作用をブロックするラットマクロファージ上のOX2Rに対する新たなモノクローナル抗体(mAb)(OX102と命名される)を産生した。それらはまた、単離されて、かつ特徴付けられたラットOX2R遺伝子およびポリペプチドを有する。ラットOX2R核酸分子およびポリペプチドについての配列(推定アミノ酸配列)が、本明細書中に提供される。類似タンパク質との類似性によって、本発明者らは、ヒトOX2Rのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、対応するラットOX2R配列と少なくとも50%相同性であるということを示す。ラットOX2R cDNAおよび推定OX2Rポリペプチド配列の有用性は、公知のヒト配列のスクリーニングまたはハイブリダイゼーションもしくはPCR技術によるヒト核酸の単離のいずれかを介して、等価なヒトOX2R配列の同定を可能にすることである。

10

【0012】

OX2Rポリペプチドにおける大きな細胞質配列の存在は、OX2Rは、シグナル伝達においてか、または細胞質成分との相互作用を介してかのいずれかで、マクロファージ機能において役割を果たすということを示す。従って、本発明は、OX2Rポリペプチドまたは核酸配列(例えば、OX2R結合部位と反応するように設計される低分子実体、OX2Rに対して惹起されるmAbもしくはアンチセンス配列)を模倣するか、または認識するOX2Rに基づいた試薬を提供し、いずれかの試薬が、OX2および/またはOX2R細胞表面タンパク質を保有する細胞の機能(例えば、マクロファージ、活性化リンパ球、ニューロン、内皮細胞、樹状細胞、胸腺細胞およびBリンパ球のような細胞の機能)を、細胞活性を増強または阻害することのいずれかによって、改変するための治療的に有用な化合物を構成する。従って、OX2Rポリペプチドまたは核酸配列を模倣するか、認識するOX2Rに基づく試薬は、広範な範囲のマクロファージの機能(細菌感染、自己免疫疾患などに対する応答を含む)を制御するための潜在的用途を有する。

20

【0013】

OX2Rの細胞外ドメインは、OX2との相互作用に関する原因であると考えられているので、本発明者らは、OX2とOX2Rとの間の結合に影響を及ぼす能力(陽性または陰性に)について、候補化合物をスクリーニングする手段を提供する。従って、本発明により提供されるようなOX2Rを使用して、例えば、OX2とOX2Rとの間の相互作用を阻害する化合物を検出し得、それゆえこれはおそらく、マクロファージと免疫系の他の細胞(例えば、リンパ球または濾胞性樹状細胞)との間の相互作用に影響を及ぼす。

30

【0014】

ラットOX2Rについての核酸およびアミノ酸配列は、表1に示される。本発明の種々の局面は、以下に述べられる。他の局面は、詳細な説明から明らかである。

【0015】

従って、第1の局面において、本発明は、表1に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む物質を提供する。

【0016】

さらなる局面において、本発明は、表1に記載されるアミノ酸配列と少なくとも50%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む物質を提供する。

40

【0017】

さらなる局面において、本発明は、上記ポリペプチドの変異体、改変体、誘導体または対立遺伝子であるポリペプチドおよび全長OX2Rの特有の性質(例えば、OX2または全長OX2Rに対する抗体と結合する能力)を有するポリペプチドを提供する。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、上記ポリペプチドのフラグメント(例えば、表1に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメント)である物質を提供し、このフラグメントは、全長OX2Rタンパク質の特有の性質を示す。例えば、このフラグメントは、OX2タンパク質と結合し得るか、または全長OX2Rタンパク質に対する抗体

50

と結合し得る。1つの実施形態において、このフラグメントは、OX2Rの細胞内ドメインの一部もしくは全てを含むか、またはそのドメインの活性部分を含む。別の実施形態において、このフラグメントは、OX2Rの細胞外ドメインの一部もしくは全てを含むか、またはそのドメインの活性部分を含む。その細胞外ドメインは、OX2と相互作用するための原因であると考えられるので、細胞外ドメインの一部もしくは全てを含む、本発明に従うそのようなフラグメントは、OX2とOX2Rとの間の結合を妨害する能力について候補化合物をスクリーニングするために使用され得る。

【0019】

従って、本発明は、マクロファージと他の細胞（胸腺細胞、Bリンパ球、活性化Tリンパ球、ニューロン、内皮細胞および濾胞性樹状細胞を含む）との間のOX2/OX2R相互作用を妨害する能力をおそらく有する候補化合物をスクリーニングするための方法および材料を提供する。

10

【0020】

ポリペプチドおよびフラグメントは、上記のように、組換え体および/または単離されたポリペプチドであり得る。

【0021】

さらなる局面において、本発明は、表1のヌクレオチド配列を有する核酸を含む物質を提供する。本発明はまた、上記ポリペプチドまたはフラグメントをコードする核酸分子を含む物質を提供する。従って、表1は、OX2Rポリペプチドをコードする例示的な核酸分子のcDNA配列を示す。この核酸分子は、表1の核酸配列と、少なくとも50%の配列相同性を有し得る。

20

【0022】

本発明はまた、表1のコードヌクレオチド配列の一部を有する核酸分子を含む物質を提供する。その物質が表1のコードヌクレオチド配列の一部を含む場合、それはOX2R遺伝子の特徴付ける部分である。従って、その部分は、上記のようなポリペプチドフラグメントをコードし得、これはOX2または全長OX2Rに対する抗体と結合する。あるいは、その部分は、表1のヌクレオチド配列の少なくとも4~7個の連続コドン、しばしば少なくとも7~9個の連続コドン、代表的には少なくとも9~13個の連続コドン、および最も好ましくは、少なくとも20~30個の連続コドンを含み得る。あるいは、その部分は、表1のポリペプチド配列の少なくとも4~7個の連続アミノ酸、しばしば少なくとも7~9個の連続アミノ酸、代表的には少なくともおよそ9~13個の連続アミノ酸、および最も好ましくは、少なくともおよそ20~30個の連続アミノ酸をコードし得る。

30

【0023】

上記の核酸分子は、組換え体であり得、そして/または単離され得る。

【0024】

さらなる局面において、本発明は、本明細書中に提供されるようなOX2R核酸を含むベクター（例えば、OX2R核酸配列がその発現を方向付けるために制御配列と作動可能に連結される、発現ベクター）を提供する。また、そのようなベクターで形質転換された宿主細胞も提供される。本発明はさらに、OX2Rポリペプチドを産生する方法を含み、その方法は、そのような宿主細胞を培養する工程および産生されたOX2Rポリペプチドを単離する工程を包含する。

40

【0025】

さらなる局面において、本発明は、宿主細胞においてOX2Rを発現させる方法を提供し、その方法は、上記の核酸分子を宿主細胞内へ挿入する工程を含み、そして宿主細胞においてその核酸分子を発現させるための条件を提供する。その方法は、発現ベクターを利用し得る。

【0026】

さらなる局面において、本発明は、上記のOX2Rポリペプチドまたはフラグメントの可溶性形態を含む組成物を提供し、その組成物はまた、必要に応じてアジュバント、薬学的キャリアまたは賦形剤を含む。その組成物を使用して、例えば、OX2Rポリペプチド

50

に対して応答性の抗体を産生し得る。

【0027】

さらなる局面において、本発明は、上記OX2Rポリペプチドおよび核酸分子を、おそらく治療薬として有用である候補化合物をスクリーニングする際の使用のために提供する。本発明は、おそらく細菌感染、自己免疫疾患などの処置のために有用である物質についてスクリーニングする際の上記OX2Rポリペプチドまたはフラグメントの使用を提供する。

【0028】

本発明はまた、OX2以外のOX2Rに対するリガンドの同定のためのOX2Rポリペプチド、ポリペプチドフラグメントおよび核酸の使用を提供する。本発明はまた、OX2の模倣物の設計のためのOX2Rポリペプチド、ポリペプチドフラグメントおよび核酸の使用を提供する。

10

【0029】

さらなる局面において、本発明は、上記のOX2Rポリペプチド、ポリペプチドフラグメントおよび核酸と特異的に結合し得る抗体、ならびにそのような抗体を含む組成物を提供する。これらの抗体を、アッセイにおいて使用してOX2Rの存在を検出し、そして定量し得、ならびにOX2Rを精製する方法において使用し得る。その抗体はポリクローナル抗体であり得る。好ましくは、その抗体は、IgG抗体であり、より好ましくはモノクローナルIgG抗体である。

【0030】

20

さらなる局面において、本発明は、結合分子（例えば、OX2とOX2Rとの間の相互作用をブロックし得る1つ以上の抗体ドメインを有する物質）を産生するために、本明細書中で提供されるようなOX2Rポリペプチド、ポリペプチドフラグメントおよび核酸分子の使用を提供する。これらは、細菌感染、自己免疫疾患などの処置のための医薬の調製においておそらく有用である組成物内に含まれ得る。その結合分子が抗体である場合、それらはIgG抗体であり得、好ましくはモノクローナルIgG抗体であり得る。

【0031】

さらなる局面において、本発明は、マクロファージ細胞の集団において、OX2R発現を制限するために、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチドの内部移行および安定化を促進させ得るホスホロチオレート化（phosphorothioolated）オリゴヌクレオチドまたはコレステロール結合オリゴヌクレオチド）の設計において、上記に定義されるようなOX2R核酸の使用を提供する。

30

【0032】

さらなる局面において、本発明は、核酸試験サンプルを増幅する方法を提供し、その方法は、本明細書中に提供される配列情報から入手可能なプライマーオリゴヌクレオチドを用いる核酸ポリメラーゼ反応をプライミング（priming）する工程を包含する。その核酸試験サンプルは、ヒトOX2Rをコードする核酸がそのような方法を使用して増幅されるように、ヒト由来であり得る。

【0033】

さらなる局面において、本発明は、ラット以外の種（例えば、ヒトOX2R）に由来するOX2Rの一部または全てをコードする核酸分子を入手する方法を提供し、その方法は、本明細書中に提供される配列情報から入手可能な核酸プローブを用いて目的の種由来の核酸試験サンプルを詳しく調査する工程を包含する。

40

【0034】

さらなる局面において、本発明は、ラット以外の種（例えば、ヒトOX2R）に由来するOX2Rポリペプチド配列を入手するための方法を提供し、その方法は、本明細書中に提供されるようなOX2Rアミノ酸配列（表1）と少なくとも50%相同であるポリペプチド配列についてデータベースを検索する工程を包含する。同様に、ラット以外の種（例えば、ヒトOX2R）に由来するOX2R核酸配列は、本明細書中に提供されるようなOX2Rヌクレオチド配列と少なくとも50%相同であるヌクレオチド配列についてデータ

50

ベースを検索することによって入手され得る。

【0035】

本発明はまた、例えば、一本鎖構造多型 (SSCP) のような技術を使用して、OX2R 遺伝子内の変異についての検索において、本明細書中に提供される核酸配列情報の使用を提供する。

【0036】

本発明は、以下から選択された組成物を提供する：配列番号2のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号2のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号2を含む天然配列げっし類OX2RH1ポリペプチド；ラットOX2RH1配列を含む融合ポリペプチド；配列番号4のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号4のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号4を含む天然配列げっし類OX2RH1ポリペプチド；ヒトOX2RH1配列を含む融合ポリペプチド；配列番号6のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号6のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号6を含む天然配列げっし類OX2RH1ポリペプチド；マウスOX2RH1配列を含む融合ポリペプチド；配列番号8のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号8のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号8を含む天然配列げっし類OX2RH1ポリペプチド；ヒトOX2RH2配列を含む融合ポリペプチド；配列番号10のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号10のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号10を含む天然配列げっし類OX2RH2ポリペプチド；マウスOX2RH2配列を含む融合ポリペプチド；配列番号12のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号12のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号12を含む天然配列げっし類OX2RH3；マウスOX2RH3配列を含む融合ポリペプチド；配列番号20のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号20のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号20を含む天然配列霊長類OX2RH1、2ポリペプチド；霊長類OX2RH1、2配列を含む融合ポリペプチド；配列番号23のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；配列番号23のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；成熟した配列番号23を含む天然配列げっし類OX2RH

10

20

30

40

50

4 ポリペプチド；またはマウス O X 2 R H 4 配列を含む融合ポリペプチド。いくつかの好ましい実施形態は、異なる非重複セグメントの同一性が以下：少なくとも 8 つのアミノ酸のうち 1 つを含むか；少なくとも 4 つのアミノ酸のうち 1 つおよび少なくとも 5 つのアミノ酸のうちからもう 1 つのアミノ酸を含むか；少なくとも 4 つ、5 つ、および 6 つのアミノ酸からなる少なくとも 3 つのセグメントを含むか、または少なくとも 12 個のアミノ酸のうち 1 つを含む、実施形態を含む。他の好ましい実施形態は、以下：a) O X 2 R H 1 ポリペプチドが、表 1 または 2 の成熟配列を含み；O X 2 R H ポリペプチドの非グリコシル化形態であり；霊長類（例えば、ヒト）由来であり；げっし類（例えば、ラットもしくはマウス）由来であり；配列番号 2、4、6 または 20 の少なくとも 17 個のアミノ酸を含み；配列番号 2、4、6、または 20 の少なくとも 7 つのアミノ酸からなる少なくとも 4 つの非重複セグメントを示し；O X 2 R H 1 の天然対立遺伝子改変体であるか；少なくともおよそ 30 個のアミノ酸の長さを有するか；霊長類もしくはげっし類 O X 2 R H 1 に特異的な少なくとも 2 つの非重複エピトープを示すか；グリコシル化され；天然のグリコシル化を有する少なくとも 30 k D の分子量を有するか；合成ポリペプチドであるか；固体基板に付着されているか；別の化学部分と結合体化されているか；天然配列から 5 倍以下で置換されているか；あるいは天然配列に由来する欠失改変体または挿入改変体であり；b) O X 2 R H 2 ポリペプチドが以下：表 2 の成熟配列を含むか；O X 2 R H 2 ポリペプチドの非グリコシル化形態であるか；霊長類（例えば、ヒト）由来であるか；げっし類（例えば、マウス）由来であるか；配列番号 8 または 10 の少なくとも 17 個のアミノ酸を含むか；配列番号 8 または 10 の少なくとも 7 つのアミノ酸からなる少なくとも 4 つの非重複セグメントを示すか；O X 2 R H 2 の天然対立遺伝子改変体であるか；少なくともおよそ 30 個のアミノ酸の長さを有するか；霊長類もしくはげっし類 O X 2 R H 2 に特異的な少なくとも 2 つの非重複エピトープを示すか；グリコシル化されているか；天然のグリコシル化を有する少なくとも 30 k D の分子量を有するか；合成ポリペプチドであるか；固体基板に付着されているか；別の化学部分と結合体化されているか；天然配列から 5 倍以下で置換されているか；あるいは天然配列に由来する欠失改変体または挿入改変体であり；c) O X 2 R H 3 ポリペプチドが以下：表 3 の成熟配列を含むか；O X 2 R H 3 の非グリコシル化形態であるか；げっし類（例えば、マウス）由来であるか；配列番号 12 の少なくとも 17 個のアミノ酸を含むか；配列番号 12 の少なくとも 7 つのアミノ酸からなる少なくとも 4 つの非重複セグメントを示すか；O X 2 R H 3 の天然対立遺伝子改変体であるか；少なくともおよそ 30 個のアミノ酸の長さを有するか；げっし類 O X 2 R H 3 に特異的な少なくとも 2 つの非重複エピトープを示すか；グリコシル化されているか；天然のグリコシル化を有する少なくとも 30 k D の分子量を有するか；合成ポリペプチドであるか；固体基板に付着されているか；別の化学部分と結合体化されているか；天然配列から 5 倍以下で置換されているか；または天然配列に由来する欠失改変体または挿入改変体であるか；あるいは d) O X 2 R H 4 ポリペプチドが以下：表 2 の成熟配列を含むか；O X 2 R H 4 の非グリコシル化形態であるか；げっし類（例えば、マウス）由来であるか；配列番号 23 の少なくとも 17 個のアミノ酸を含むか；配列番号 23 の少なくとも 7 つのアミノ酸からなる少なくとも 4 つの非重複セグメントを示すか；O X 2 R H 4 の天然対立遺伝子改変体であるか；少なくともおよそ 30 個のアミノ酸の長さを有するか；げっし類 O X 2 R H 4 に特異的な少なくとも 2 つの非重複エピトープを示すか；グリコシル化されているか；天然のグリコシル化を有する少なくとも 30 k D の分子量を有するか；合成ポリペプチドであるか；固体基板に付着されているか；別の化学部分と結合体化されているか；天然配列から 5 倍以下で置換されているか；または天然配列に由来する欠失改変体または挿入改変体である。また他の実施形態において、本発明は組成物を提供し、その組成物は以下：a 1) 実質的に純粋な O X 2 R H 1 および別の I g スーパーファミリーメンバー；a 2) 実質的に純粋な O X 2 R H 2 および；別の I g スーパーファミリーメンバー、D A P 12 または D A P 10；a 3) 実質的に純粋な O X 2 R H 3 および；別の I g スーパーファミリーメンバー、D A P 12 または D A P 10；a 4) 実質的に純粋な O X 2 R H 4 および；別の I g スーパーファミリーメンバー、D A P 12 または D A P 10

10

20

30

40

50

；あるいは滅菌OX2RH1ポリペプチド；滅菌OX2RH2ポリペプチド；滅菌OX2RH3ポリペプチド；滅菌OX2RH4ポリペプチド；OX2RH1、OX2RH2、OX2RH3、またはOX2RH4ポリペプチドおよびキャリアを含み、ここでそのキャリアは、水性化合物（水、生理食塩水、および/または緩衝液を含む）であり；そして/または経口投与、直腸投与、経鼻投与、局所投与または非経口投与のために処方される。

【0037】

融合ポリペプチドもまた提供され、例えば、その融合ポリペプチドは以下：表1～3の成熟タンパク質配列；検出タグもしくは精製タグ（FLAG、His6またはIg配列を含む）；または別のIgスーパーファミリータンパク質の配列を含む。キットもまた提供され、例えば、そのキットは、OX2RHポリペプチドおよび；そのタンパク質またはポリペプチドを含む区画（compartment）；あるいはそのキット内の試薬の使用または処分についての取扱説明書を含む。

10

【0038】

本発明はまた、種々の抗体様試薬（異なる種に由来する抗体を含む）を含む。それは、例えば、天然OX2RHポリペプチド（例えば、OX2RH1、OX2RH2、OX2RH3および/またはOX2RH4）と特異的に結合する抗体に由来する抗原結合部位を含む結合化合物を提供し、ここで；その結合化合物が容器内にあるか；そのOX2RHポリペプチドが、げっし類または霊長類由来であるか；その結合化合物がFvフラグメント、FabフラグメントまたはFab2フラグメントであるか；その結合化合物が、別の化学部分と結合体化されているか；あるいはその抗体が表1～3の成熟ポリペプチドのペプチド配列に対して惹起されるか；成熟OX2RHに対して惹起されるか；精製された哺乳動物OX2RHに対して惹起されるか；免疫選択されるか；ポリクローナル抗体であるか；変性OX2RHと結合するか；抗原に対して少なくとも30μMのKdを示すか；ビーズまたはプラスチック膜を含む固体基板に付着されているか；滅菌組成物内にあるか；あるいは放射性標識または蛍光標識を含み検出可能に標識されている。それによりキットが提供され、例えば、そのキットは、そのような結合化合物および；その結合化合物を含む区画；あるいはそのキット内の試薬の使用または処分についての取扱説明書を含む。また、例えば、抗原：結合化合物または抗原：抗体複合体を産生する方法も提供され、その方法は、適切な条件下において、哺乳動物OX2RHポリペプチドと抗体とを接触させる工程を包含し、それによって複合体が形成することを可能とする。好ましくは、この方法において、その複合体は、他のサイトカインまたはIgスーパーファミリーレセプターから精製されるか；その複合体は、他の抗体から精製されるか；その接触が、哺乳動物OX2を含むサンプルを伴うか；その接触が、抗原の定量的検出を可能にするか；その接触が抗体を含むサンプルを伴うか；あるいはその接触がその抗体の定量的検出を可能にする。関連する組成物（例えば、滅菌結合化合物または結合化合物およびキャリアを含む）が使用可能であり、ここでそのキャリアは、水、生理食塩水および/または緩衝液を含む水性化合物であり；そして/または経口投与、直腸投与、経鼻投与、局所投与または非経口投与のために処方される。

20

30

【0039】

本発明は、核酸（例えば、OX2RHポリペプチドをコードする、単離された核酸または組換え核酸）をさらに提供し、ここでOX2RHは、哺乳動物由来であるか；またはその核酸は、表1～3の抗原性ペプチド配列をコードするか；表1～3の複数の抗原性ペプチド配列をコードするか；天然cDNAコードフラグメントに対して、少なくとも13個のヌクレオチドに渡って同一性を示すか；発現ベクターであるか；複製起点をさらに含むか；天然の供給源に由来するか；検出標識を含むか；合成ヌクレオチド配列を含むか；6kb未満、好ましくは3kb未満であるか；霊長類またはげっし類に由来するか；天然全長コード配列を含むか；OX2RHをコードする遺伝子に対するハイブリダイゼーションプローブであるか；DAP12またはDAP10をさらにコードするか；あるいはPCRプライマー、PCR産物または変異誘発プライマーである。組換え核酸を含む細胞もまた提供され、例えば、ここでその細胞は、原核生物細胞であるか；真核生物細胞であるか；

40

50

細菌細胞であるか；酵母細胞であるか；昆虫細胞であるか；哺乳動物細胞であるか；マウス細胞であるか；霊長類細胞であるか；またはヒト細胞である。その核酸を含むキットが提供され、例えば、そのキットは、核酸を含む区画；哺乳動物OX2RHポリペプチドをさらに含む区画；あるいはそのキット内の試薬の使用または処分についての取扱説明書を含む。

【0040】

あるいは、本発明は核酸を提供し、その核酸は、30分間40 および2M未満の塩という洗浄条件下において、配列番号1、3、5、7、9、11、19、または22のコード部分にハイブリダイズするか、または霊長類OX2RH cDNAまたはげっし類OX2RH cDNAに対して少なくともおよそ30ヌクレオチドのストレッチ(stretch)に渡って同一性を示す。好ましくは、その洗浄条件は、50 および/または500mM塩；または60 および/または150mM塩であり；そのストレッチは、少なくとも55ヌクレオチドまたは75ヌクレオチドであり；あるいはその核酸は、DAP12ペプチドまたはDAP10ペプチドをさらにコードする。

10

【0041】

例えば、細胞または組織培養細胞の生理機能または発生を調節する方法といった、他の方法もさらに包含され、その方法は、その細胞を哺乳動物OX2RHのアゴニストまたはアンタゴニストと接触させる工程を包含する。しばしば、その細胞は、OX2RHをコードする核酸で形質転換される。

上記に加えて、本発明は、以下を提供する：

20

(項目1) 組成物であって、以下：

a 1) 配列番号2のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

a 2) 配列番号2のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

a 3) 成熟した配列番号2を含む、天然配列げっ歯類OX2RH1ポリペプチド；

a 4) ラットOX2RH1配列を含む、融合ポリペプチド；

b 1) 配列番号4のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

30

b 2) 配列番号4のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

b 3) 成熟した配列番号4を含む、天然配列げっ歯類OX2RH1ポリペプチド；

b 4) ヒトOX2RH1配列を含む、融合ポリペプチド；

c 1) 配列番号6のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

40

c 2) 配列番号6のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

c 3) 成熟した配列番号6を含む、天然配列げっ歯類OX2RH1ポリペプチド；

c 4) マウスOX2RH1配列を含む、融合ポリペプチド；

d 1) 配列番号8のセグメントと同一である少なくとも4つのアミノ酸からなる少なくとも3つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

d 2) 配列番号8のセグメントと同一である少なくとも5つのアミノ酸からなる少なくとも2つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

50

リペプチド；

d 3) 成熟した配列番号 8 を含む、天然配列げっ歯類 O X 2 R H 1 ポリペプチド；

d 4) ヒト O X 2 R H 2 配列を含む、融合ポリペプチド；

e 1) 配列番号 10 のセグメントと同一である少なくとも 4 つのアミノ酸からなる少なくとも 3 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

e 2) 配列番号 10 のセグメントと同一である少なくとも 5 つのアミノ酸からなる少なくとも 2 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

e 3) 成熟した配列番号 10 を含む、天然配列げっ歯類 O X 2 R H 2 ポリペプチド；

e 4) マウス O X 2 R H 2 配列を含む、融合ポリペプチド；

f 1) 配列番号 12 のセグメントと同一である少なくとも 4 つのアミノ酸からなる少なくとも 3 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

f 2) 配列番号 12 のセグメントと同一である少なくとも 5 つのアミノ酸からなる少なくとも 2 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

f 3) 成熟した配列番号 12 を含む、天然配列げっ歯類 O X 2 R H 3 ；

f 4) マウス O X 2 R H 3 配列を含む、融合ポリペプチド；

g 1) 配列番号 20 のセグメントと同一である少なくとも 4 つのアミノ酸からなる少なくとも 3 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

g 2) 配列番号 20 のセグメントと同一である少なくとも 5 つのアミノ酸からなる少なくとも 2 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

g 3) 成熟した配列番号 20 を含む、天然配列霊長類 O X 2 R H 1 . 2 ポリペプチド；

g 4) 霊長類 O X 2 R H 1 . 2 配列を含む、融合ポリペプチド；

h 1) 配列番号 23 のセグメントと同一である少なくとも 4 つのアミノ酸からなる少なくとも 3 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

h 2) 配列番号 23 のセグメントと同一である少なくとも 5 つのアミノ酸からなる少なくとも 2 つの異なる非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチド；

h 3) 成熟した配列番号 23 を含む、天然配列げっ歯類 O X 2 R H 4 ポリペプチド；

h 4) マウス O X 2 R H 4 配列を含む、融合ポリペプチド、
から選択される組成物。

(項目 2) 抗体由来の抗原結合部位を含む結合化合物であって、該結合化合物は、
項目 1 に記載の天然 O X 2 R H ポリペプチドに特異的に結合し、ここで：

a) 該結合化合物が容器内にあるか；

b) 該 O X 2 R H ポリペプチドが、げっ歯類または霊長類由来であるか；

c) 該結合化合物が F v フラグメント、F a b フラグメントまたは F a b 2 フラグメントであるか；

d) 該結合化合物が、別の化学部分と結合体化されているか；あるいは

e) 該抗体が：

i) 表 1 ~ 3 の成熟ポリペプチドのペプチド配列に対して惹起されるか；

i i) 成熟 O X 2 R H に対して惹起されるか；

i i i) 精製された哺乳動物 O X 2 R H に対して惹起されるか；

i v) 免疫選択されるか；

v) ポリクローナル抗体であるか；

v i) 変性 O X 2 R H と結合するか；

10

20

30

40

50

v i i) 抗原に対して少なくとも30 μMのKdを示すか；

v i i i) ビーズまたはプラスチック膜を含む固体基板に付着されているか；

i x) 滅菌組成物内にあるか；または

x) 蛍光標識を含み検出可能に標識されている、

結合化合物。

(項目3) 項目1に記載の前記OX2RHポリペプチドをコードする、単離された核酸または組換え核酸であり、ここで：

a) 該OX2RHが、哺乳動物由来であるか；あるいは

b) 該核酸が以下：

i) 表1～3の抗原性ペプチド配列をコードするか；

i i) 表1～3の複数の抗原性ペプチド配列をコードするか；

i i i) 前記セグメントをコードする天然cDNAに対して少なくとも13個のヌクレオチドにわたって同一性を示すか；

i v) 発現ベクターであるか；

v) 複製起点をさらに含むか；

v i) 天然の供給源に由来するか；

v i i) 検出標識を含むか；

v i i i) 合成ヌクレオチド配列を含むか；

i x) 6 kb未満、好ましくは3 kb未満であるか；

x) 霊長類またはげっし類に由来するか；

x i) 天然の全長コード配列を含むか；

x i i) 該OX2RHをコードする遺伝子に対するハイブリダイゼーションプローブであるか；

x i i i) DAP12もしくはDAP10をさらにコードし；または

x i v) PCRプライマー、PCR産物、もしくは変異誘発プライマーである、

単離された核酸または組換え核酸。

(項目4) 核酸であって、該核酸は以下：

a) 40にて30分間および2 M未満の塩という洗浄条件下において、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, または22のコード部分とハイブリダイズするか；あるいは

b) 霊長類またはげっし類のOX2RH cDNAに対して、少なくとも約30ヌクレオチドのストレッチにわたって同一性を示す、

核酸。

(項目5) 細胞または組織培養細胞の生理機能または発生を調節する方法であって、該方法は、該細胞を哺乳動物OX2RHのアゴニストまたはアンタゴニストと接触させる工程を包含する、方法。

(項目6) 項目5に記載の方法であって、ここで：

a) 該生理機能を調節することが、以下

i) 骨髄性機能を増強させることであるか；または

i i) 免疫を増強させることであるか；

b) 該アゴニストまたは該アンタゴニストが該細胞へのOX2媒介性シグナル伝達を減弱させるか；あるいは

c) 該アンタゴニストが、以下：

i) 該OX2RHに対する抗体であるか；

i i) 可溶性OX2RH構築物であるか；

i i i) 可溶性OX2RH-Ig融合物であるか；または

i v) OX2Rアンチセンス核酸である、

方法。

(項目7) 項目6に記載の方法であって、ここで：

a) 前記生理機能の調節がインビトロにおける骨髄性細胞機能の増強であり、そして前

10

20

30

40

50

記アンタゴニストがOX2ムテインであるか；または

b) 該生理機能の調節が、該アンタゴニストで全身的に処置されている動物における免疫の増強である、

方法。

(項目8) OX2Rに対する非OX2リガンドの同定のための方法であって、該方法はOX2R-Ig融合タンパク質との結合について、OX2ノックアウトマウス由来の遺伝子のライブラリーをスクリーニングする工程、および該融合タンパク質と結合する遺伝子を同定する工程を包含する、方法。

【発明を実施するための形態】

【0042】

10

(好ましい実施形態の詳細な説明)

(概要)

I. 一般原理

II. 活性

III. 核酸

A. コードフラグメント、配列、プローブ

B. 変異、キメラ、融合体

C. 核酸作製

D. ベクター、細胞含有

IV. タンパク質、ペプチド

20

A. フラグメント、配列、免疫原、抗原

B. ムテイン

C. アゴニスト/アンタゴニスト、機能的等価物

D. タンパク質作製

V. 核酸、タンパク質作製

A. 合成

B. 組換え

C. 天然供給源

VI. 抗体

A. ポリクローナル抗体

30

B. モノクローナル抗体

C. フラグメント；Kd

D. 抗イディオタイプ抗体

E. ハイブリドーマ細胞株

VII. OX2RHを定量するためのキットおよび方法

A. ELISA

B. アッセイmRNAコード

C. 質的/量的

D. キット

VIII. 治療組成物、方法

40

A. 組換え組成物

B. 単位用量

C. 投与

IX. スクリーニング

X. リガンド

(I. 一般原理)

本発明は、哺乳動物(本明細書中の霊長類およびげっし類)のアミノ酸配列およびDNA配列、レセプター様サブユニット分子、これらの命名されたOX2レセプターホモログ(OX2RH)を提供する。これらの遺伝子は、構造的また生物学的のいずれかもしくはその両方において、特有の定義された特性を有する。これらの分子をコードする種々のc

50

DNAを、哺乳動物（例えば、ヒトおよびげっし類）、cDNA配列ライブラリーから入手した。他の哺乳動物（例えば、霊長類、げっし類）または他の対応物もまた所望される。

【0043】

OX2抗原を、モノクローナル抗体(mAb)MRC OX2を使用して、初めにラットにおいて特徴付けた。例えば、McMasterおよびWilliams(1979) Eur. J. Immunol. 9: 426-423; Barclay(1981) Immunology 44: 727-736; Barclay(1981) Immunology 42: 593-600; Bukovskýら、(1984) Immunology 52: 631-640; ならびにWebbおよびBarclay(1984) J. Neurochem. 43: 1061-1067を参照のこと。フローサイトメトリのために、組織切片または細胞懸濁物の免疫組織化学的(IHC)染色においてこの抗体を使用して、OX2抗原は、広範に種々の細胞（例えば、ニューロン、血管内皮、B細胞、活性化T細胞、濾胞性樹状細胞、平滑筋細胞およびトロホプラスト）によって発現されたということ

を明らかにした。さらに、ヒトOX2は、正常な脳細胞およびB細胞において発現され得ることは公知である。McCaughanら、(1987) Immunogenetics 25: 329-335。MRC OX2(Clarkら、(1985) EMBO J. 4: 113-118)により認識されるラットタンパク質の特徴付けは、OX2は、2つの細胞外免疫グロブリン(Ig)ドメイン、膜貫通ドメインおよび短いC末端細胞質テール(tail)を含むおよそ248個のアミノ酸から構成されるということ

を明らかにした。その分子は、6N-結合グリコシル化部位を介してグリコシル化され、それらうちの3つがN末端V様Igドメインに存在し、そしてその他は膜近位C2様Igドメインに存在する。このことは、OX2をIgスーパーファミリー(IgSF)に位置付け、そのIgスーパーファミリーは、CD2、CD48、CD58、CD80、CD86、CD90およびCD147のような分子を有する小さなIgSF分子のサブグループ(sub-group)を形成し、これらは、例えば、Ig可変領域ドメインおよび定常領域ドメイン、膜貫通セグメント、細胞内ドメインならびに特徴的なシステイン残基およびトリプトファン残基間隔に対応する免疫グロブリン様ドメインの存在によって、構造的に特徴付けられる。例えば、Cambellら、(1979) Nature 282: 341-342を参照のこと。興味深いことに、CD90はまた、ニューロンによって大いに発現される。Williamsら、(1977) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41 Pt. 1: 51-61。さらに、OX2は、CD80およびCD86の構造的ホモログであったということ(Borrielloら、(1997) J. Immunol. 158: 4548-4554)ならびにOX2遺伝子が、マウスの第16染色体上のCD80およびCD86をコードするそれらに近接して連結されていたことを示した(Borrielloら、(1998) Mamm. Genome 9: 114-118)。CD80およびCD86の両方は、同時刺激として公知のプロセスにおけるリガンドとして役に立ち、従って、おそらく、OX2は、同じようにリガンドとして作用する。OX2抗原は、本明細書中以後、OX2タンパク質またはリガンドOX2として言及される。結合パートナーは、OX2レセプターとして言及される。

【0044】

OX2に対するレセプター(OX2R)を同定するために、マルチバレント試薬を、蛍光ビーズと結合したラットOX2ラットCD4融合タンパク質を使用して、調製した。この試薬は、マウスおよびラットの腹膜マクロファージと結合することが示されており、そしてこの結合は、mAb MRC OX88によってブロックされ得る。Prestonら、(1997) Eur. J. Immunol. 27: 1911-1981。このmAbは、腹膜および脾臓の両方から単離されたマクロファージと結合することが示されており、そして脾臓切片に対するIHCにおいて、染色は、マクロファージを高い割合で含むことが公知である領域において見出された。

【0045】

10

20

30

40

50

O X 1 0 2 と命名された、B a r c l a y のグループにより惹起された二次モノクローナル抗体は、ラット種のマクロファージと結合し、そしてラット腹膜マクロファージに対する O X 2 分子の結合を特異的に妨げることも示された。O X 1 0 2 分子に結合する物質の単離および N 末端配列決定は、推定 O X 2 レセプター (O X 2 R) が新規な分子であることを示した。これを、本明細書中に記載されるようにクローン化した。O X 1 0 2 抗体によって認識されるそのタンパク質が確かにレセプターであったということが、O X 2 分子それ自体 (リガンド) に関してこの分子上のより長い細胞質テールの実証によって、支持された。C l a r k ら、(1 9 8 5) E M B O J . 4 : 1 1 3 - 1 1 8 。 O X 2 R の予備分析は、公知のシグナル伝達分子と一致する明らかなモチーフを示さなかったが、このことは O X 2 誘導シグナルを媒介する際のこの分子の潜在的役割を除外しない。

10

【 0 0 4 6 】

次いで、マウスホモログを同定し、O X 2 R H 1 と命名した。用語 O X 2 R を、O X 2 に実際に結合することが立証されたそれらのタンパク質のために留保するべきであるという理由のために、適用される最初の命名は、群 1 のレセプターホモログである。この分子のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、本明細書中に記載される。

【 0 0 4 7 】

利用可能な配列データベースのさらなる分析は、O X 2 R H の別の異なる形態の存在を明らかにした。その分子は、O X 2 R H 1 に対して、推定細胞外 I g ドメイン構造における有意な相同性を示したが、異なる膜貫通配列および細胞質配列を有していた。これらの形態は、本明細書中において O X 2 R H 2 と命名されており、そしてヒトおよびマウスの実施形態の両方が同定されている。分子の膜貫通部分にある 2 2 4 位 (ヒト) および 1 7 0 位 (マウス) のリジン (K) 部分の存在は、特に注意する。そのような残基は、この分子が、細胞活性化のためにシグナル伝達し得るモチーフを発現することが公知である分子パートナー (例えば、D A P 1 2) と関連するとうことを示唆する。例えば、L a n i e r ら、(1 9 9 8) N a t u r e 3 9 1 : 7 0 3 - 7 0 7 ; C o l o n n a (1 9 9 8) N a t u r e 3 9 1 : 6 4 2 - 3 ; C a m b e l l ら、(1 9 9 9) I n t . J . B i o c h e m . C e l l . B i o l . 3 1 : 6 3 1 - 6 3 6 ; および L o p e z - B o t e t ら、(1 9 9 9) C u r r . O p i n . I m m u n o l . 1 1 : 3 0 1 - 3 0 7 を参照のこと。さらに、そのようなことは、種々のシグナル伝達経路および関連する生化学を示唆する。例えば、L a n i e r ら、(1 9 9 8) I m m u n i t y 8 : 6 9 3 - 7 0 1 ; S m i t h ら、(1 9 9 8) J . I m m u n o l . 1 6 1 : 7 - 1 0 ; G o s s e l i n ら、(1 9 9 9) J . L e u k o c . B i o l . 6 6 : 1 6 5 - 1 7 1 ; T o m a s e l l o ら、(1 9 9 8) J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 3 4 1 1 5 - 3 4 1 1 9 ; および M c V i c a r ら、(1 9 9 8) J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 3 2 9 3 4 - 3 2 9 4 2 を参照のこと。しかし、全長マウスまたはヒト O X 2 R H 2 形態は、さらに単離されるべきである。

20

30

【 0 0 4 8 】

O X 2 R H 1 分子のマウス細胞外領域とラット細胞外領域との間には高い相同性が存在し、これらの両方は、それぞれの種の O X 2 と結合することが確認されている。従って、ラットおよびマウス O X 2 R H 1 実施形態は、機能的に O X 2 R H としても適当に言及される。両者は、代表的な細胞外ドメイン構造、膜貫通ドメイン構造および細胞内ドメイン構造を含む。ヒト O X 2 R H 1 実施形態を発見した。さらに、ラットおよびマウス O X 2 R H 1 の可溶性形態が存在し得る。

40

【 0 0 4 9 】

関連ホモログ (O X 2 R H 2 および O X 2 R H 4 と命名されている) もまた、記載されており、マウスおよびヒトにおいて種々の実施形態をもたらす。O X 2 R H 2、H 3 および H 4 実施形態は、膜貫通セグメントにおいて荷電したリジン残基を示す。ヒト O X 2 R H 2 実施形態は、シグナル配列を欠失しており、そして、いくつかのゲノム配列イママーク (e a r m a r k) を示し、このことは、天然ヒト O X 2 R H 2 の機能形態が、親密に関連しているはずであるが、提供される配列はわずかに異なることを示唆する。マウスお

50

よびヒトホモログ2および4の機能的関連性には、確認すべきことが残されている。

【0050】

さらなるOX2Rホモログもまた、マウスにおいて見出した。その相同性は、かなり相違するが、それは配列においていくらかの類似性を示す。詳細には、それは、膜貫通領域内にリジン残基を有する。従って、他のOX2RH2、H3、およびH4様分子は、この特徴を示し、それは、例えばDAP12のような会合分子を介してシグナル伝達することが予期される。本実施形態を、本明細書中においてげっし類（例えば、マウス）由来のOX2RH3と命名する。

【0051】

OX2RH1の発現パターンの継続中の分析は、ラット、マウスおよびヒトの白血球において、OX2RH1（OX102抗体および/またはPCR技術によるmRNA発現の分析を用いるフローサイトメトリ染色により決定されるように）は、単球、顆粒球、および肥満細胞によって最も強く発現され、B細胞によりわずかに発現され、そしてT細胞により微弱に発現されるということを示す。このことは、初期の研究における、マクロファージへのリガンドOX2の優先的な結合と一致する。正常なラット中枢神経系において、ある割合の常在性マクロファージ（または小グリア細胞）もまたOX2Rを発現するが、低いレベルである。

10

【0052】

いくつかの適用可能な標準的方法が記載されるか、または、例えば、Maniatisら、(1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrookら、(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (第2版)、第1~3巻、CSH Press, NY; Ausubelら、*Biology*, Greene Publishing Associate, Brooklyn, NY; または Ausubelら、(1987および定期的補遺) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, New York; (これらの各々は、本明細書中に参考として援用される)において参照される。

20

【0053】

げっし類（例えば、ラット）のOX2レセプターホモログ1（OX2RH1）コードセグメントのヌクレオチド（配列番号1）および対応するアミノ酸配列（配列番号2）が表1に示される。同様に、さらなる実施形態において、霊長類（例えば、ヒト）およびげっし類（例えば、マウス）が記載されOX2RH1、1.2、2、および4と命名される。この核酸配列は、配列番号3、19、5、7、9、および22であり；対応するアミノ酸配列は、配列番号4、20、6、8、10、および23であり、これらは表2に示される。表3は、他のげっし類（例えば、マウス）のOX2RH3の配列を提供する（配列番号11および12）。

30

【0054】

逆翻訳 (Reverse translation) 核酸配列が、表4に提供される（配列番号：13 - 14、21、15 - 17、24、および18）。表5は、ポリペプチド配列のアラインメントおよび数値比較を提供する。

40

【0055】

表1：げっし類OX2（ホモログ1）のヌクレオチド配列およびポリペプチド配列

【0056】

【表 1】

ラト OX2RH1 (配列番号 : 1 から 2):

5	agcggaggga tectgggtcat ggtcaccgct gctcccctac ctgtgaagag aaagagcacc	60	
	gagtgaagccg ctgaaaacca gaaaaccgaa atg ctc tgc ttt tgg aga act tct	114	
10			Met Leu Cys Phe Trp Arg Thr Ser
			-20
	cac gta gca gta ctc ttg atc tgg ggg gtc ttc gcg gct gag tca agt	162	
	His Val Ala Val Leu Leu Ile Trp Gly Val Phe Ala Ala Glu Ser Ser		
	-15 -10 -5 -1		
15	tgt cct gat aag aat caa aca atg cag aac aat tca tca act atg aca	210	
	Cys Pro Asp Lys Asn Gln Thr Met Gln Asn Asn Ser Ser Thr Met Thr		10
	1 5 10 15		
20	gaa gtt aac act aca gtg ttt gta cag atg ggt aaa aag gct ctg ctc	258	
	Glu Val Asn Thr Thr Val Phe Val Gln Met Gly Lys Lys Ala Leu Leu		
	20 25 30		
25	tgc tgc cct tct att tca ctg aca aaa gta ata tta ata aca tgg aca	306	
	Cys Cys Pro Ser Ile Ser Leu Thr Lys Val Ile Leu Ile Thr Trp Thr		
	35 40 45		
30	ata acc ctc aga gga cag cct tcc tgc ata ata tcc tac aaa gca gac	354	
	Ile Thr Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Ile Ile Ser Tyr Lys Ala Asp		
	50 55 60		
35	aca agg gag acc cat gaa agc aac tgc tgc gac aga agc atc acc tgg	402	
	Thr Arg Glu Thr His Glu Ser Asn Cys Ser Asp Arg Ser Ile Thr Trp		20
	65 70 75 80		
40	gcc tcc aca cct gac ctc gct cct gac ctt cag atc agt gca gtg gcc	450	
	Ala Ser Thr Pro Asp Leu Ala Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala		
	85 90 95		
45	ctc cag cat gaa ggg cgt tac tca tgt gat ata gca gta cct gac ggg	498	
	Leu Gln His Glu Gly Arg Tyr Ser Cys Asp Ile Ala Val Pro Asp Gly		
	100 105 110		
50	aat ttc caa aac atc tat gac ctc caa gtg ctg gtg ccc cct gaa gta	546	
	Asn Phe Gln Asn Ile Tyr Asp Leu Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val		
	115 120 125		
55	acc cac ttt cca ggg gaa aat aga act gca gtt tgt gag gcg att gca	594	
	Thr His Phe Pro Gly Glu Asn Arg Thr Ala Val Cys Glu Ala Ile Ala		30
	130 135 140		
60	ggc aaa cct gct gcg cag atc tct tgg acg cca gat ggg gat tgt gtc	642	
	Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val		
	145 150 155 160		
65	gct aag aat gaa tca cac agc aat ggc acc gtg act gtc cgg agc aca	690	
	Ala Lys Asn Glu Ser His Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr		
	165 170 175		

	tgc cac tgg gag cag agc cac gtg tct gtc gtg ttc tgt gtt gtc tct	738	
	Cys His Trp Glu Gln Ser His Val Ser Val Val Phe Cys Val Val Ser		
	180 185 190		
5	cac ttg aca act ggt aac cag tct ctg tct ata gaa ctg ggt aga ggg	786	
	His Leu Thr Thr Gly Asn Gln Ser Leu Ser Ile Glu Leu Gly Arg Gly		
	195 200 205		
10	ggt gac caa tta tta gga tca tac att caa tac atc atc cca tct att	834	
	Gly Asp Gln Leu Leu Gly Ser Tyr Ile Gln Tyr Ile Ile Pro Ser Ile		
	210 215 220		
15	att att ttg atc atc ata gga tgc att tgt ctt ttg aaa atc agt ggc	882	
	Ile Ile Leu Ile Ile Ile Gly Cys Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Gly		
	225 230 235 240		
20	tgc aga aaa tgt aaa ttg cca aaa tcg gga gct act cca gat att gag	930	
	Cys Arg Lys Cys Lys Leu Pro Lys Ser Gly Ala Thr Pro Asp Ile Glu		
	245 250 255		
25	gag gat gaa atg cag ccg tat gct agc tac aca gag aag agc aat cca	978	
	Glu Asp Glu Met Gln Pro Tyr Ala Ser Tyr Thr Glu Lys Ser Asn Pro		
	260 265 270		
30	ctc tat gat act gtg acc acg acg gag gca cac cca gcg tca caa ggc	1026	
	Leu Tyr Asp Thr Val Thr Thr Thr Glu Ala His Pro Ala Ser Gln Gly		
	275 280 285		
35	aaa gtc aat ggc aca gac tgt ctt act ttg tca gcc atg gga atc	1071	
	Lys Val Asn Gly Thr Asp Cys Leu Thr Leu Ser Ala Met Gly Ile		
	290 295 300		
40	tagaaccaag gaaaagaagt caagagacat cataattact gcttttcttt ctttaaactt	1131	
	ctccaatgga gggaaattag ctcttctgaa gttcttagaa agcacaaatg ttctaattgga	1191	
	tttgccctta agttcttcta tcattggaag tttggaatct ttgctgtac ctgtaattc	1251	
45	taggaagaac tgatttaatt attacaaaga aagcacattg ttatggtaaa atatcaaatt	1311	
	gtgcaataca atgatgaaaa ctgagtttcc tcaagaaata actgcagaag gaacaatcat	1371	
	tactaaagca tttcatgtga gttcttccaa aaaagaaaat ccctgtgtat acgacatgat	1431	
50	tatggatgt gtgtgccttt atagtgttgt ttacapatgt gtatatatgc acacatctga	1491	
	ttatcaagac atctctgtca aaaactcact ggcgttccag atttatgaaa gctaataaag	1551	
	tgagtattgg agatgttttt ata	1574	
55	MLCFWRTSHVAVLLIINGVFAAESSCPDKNQTMQNNSSMTTEVNTTVFVQMGKKALLCCPSISLTKVILITWTILR		
	GQPSCIISYKADTRETHERSNCSDRSITWASTPDLAPDLQISAVALQHEGRYSCDIAVPDGNFQNIYDLQVLVPEV		
	THFPGENRTAVCEAIAGKPAAQISWTPDGDVAKNESHNGTVTVRSTCHWEQSHVSVVFCVSHLTGNQSLSIE		
	LGRGGDQLLGSYIQYIIPSIILIIIGCICLLKISGRKCKLPKSGATPDIEEDEMOPYASYTEKSNPLYDTVTTT		
	EAHPASQGVNGTDCCLTSLSAMGI		

表 2 : さ ら な る O X 2 R ホ モ ロ グ の ヌ ク レ オ チ ド 配 列 お よ び ポ リ ペ プ チ ド 配 列
【 0 0 5 7 】

【表 2】

5	霊長類 (例: ヒト)	OX2RH1 (配列番号: 3 種 4):	
	cagagaaaag cttctgttcg tccaagtac taaccaggct aaaccacata gacgtgaagg	60	
	aaggggctag aaggaagggg gtgccccact gttgatgggg taagaggatc ctgtactgag	120	
10	aagttgacca gagagggctc caccatgctc acagttcctt ctgtaccagt gtggaggaaa	180	
	agtactgagt gaagggcaga aaaagagaaa acagaa atg ctc tgc cct tgg aga	234	
			Met Leu Cys Pro Trp Arg
			-25
15	act gct aac cta ggg cta ctg ttg att ttg act atc ttc tta gtg gcc	282	
	Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Phe Leu Val Ala		10
	-20	-15	-10
			-5
20	gaa gcg gag ggt gct gct caa cca aac aac tca tta atg ctg caa act	330	
	Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn Ser Leu Met Leu Gln Thr		
	-1 1	5	10
25	agc aag gag aat cat gct tta gct tca agc agt tta tgt atg gat gaa	378	
	Ser Lys Glu Asn His Ala Leu Ala Ser Ser Ser Leu Cys Met Asp Glu		
	15	20	25
30	aaa cag att aca cag aac tac tgg aaa gta ctc gca gaa gtt aac act	426	
	Lys Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val Leu Ala Glu Val Asn Thr		
	30	35	40
35	tca tgg cct gta aag atg gct aca aat gct gtg ctt tgt tgc cct cct	474	
	Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala Val Leu Cys Cys Pro Pro		20
	45	50	55
40	atc gca tta aga aat ttg atc ata ata aca tgg gaa ata atc ctg aga	522	
	Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr Trp Glu Ile Ile Leu Arg		
	65	70	75
45	ggc cag cct tcc tgc aca aaa gcc tac aag aaa gaa aca aat gag acc	570	
	Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Lys Lys Glu Thr Asn Glu Thr		
	80	85	90
50	aag gaa acc aac tgt act gat gag aga ata acc tgg gtc tcc aga cct	618	
	Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile Thr Trp Val Ser Arg Pro		
	95	100	105
55	gat cag aat tgg gac ctt cag att cgt acc gtg gcc atc act cat gac	666	
	Asp Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Thr Val Ala Ile Thr His Asp		30
	110	115	120
60	ggg tat tac aga tgc ata atg gta aca cct gat ggg aat ttc cat cgt	714	
	Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro Asp Gly Asn Phe His Arg		
	125	130	135
65	gga tat cac ctc caa gtg tta gtt aca cct gaa gtg acc ctg ttt caa	762	
	Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro Glu Val Thr Leu Phe Gln		
	145	150	155

aac agg aat aga act gca gta tgc aag gca gtt gca ggg aag cca gct 810
 Asn Arg Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala Val Ala Gly Lys Pro Ala
 160 165 170

5 gcg cat atc tcc tgg atc cca gag ggc gat tgt gcc act aag caa gaa 858
 Ala His Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Asp Cys Ala Thr Lys Gln Glu
 175 180 185

10 tac tgg agc aat ggc aca gtg act gtt aag agt aca tgc cac tgg gag 906
 Tyr Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys Ser Thr Cys His Trp Glu
 190 195 200

15 gtc cac aat gtg tct acc gtg acc tgc cac gtc tcc cat ttg act ggc 954
 Val His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His Val Ser His Leu Thr Gly
 205 210 215 220

20 aac aag agt ctg tac ata gag cta ctt cct gtt cca ggt gcc aaa aaa 1002
 Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro Val Pro Gly Ala Lys Lys
 225 230 235

atc agc aaa att ata tat tcc ata tat cat cct tac tat tat tta 1050
 Ile Ser Lys Ile Ile Tyr Ser Ile Tyr His Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Leu
 240 245 250

25 gac cat cgt ggg att cat ttg gtt gtt gaa agt caa tgg ctg cag aaa 1098
 Asp His Arg Gly Ile His Leu Val Val Glu Ser Gln Trp Leu Gln Lys
 255 260 265

30 ata taaattgaat aaaacagaat ctactccagt tgttgaggag gatgaaatgc 1151
 Ile

agccctatgc cagctacaca gagaagaaca atcctctcta tgatactaca aacaaggatga 1211

35 aggcacatctga ggcattacaa agtgaagttg acacagacct ccatacttta taagttgttg 1271
 gactctagta ccaagaaca acaacaaacg agatacatta taattactgt ctgattttct 1331
 tacagttcta gaatgaagac ttatattgaa attaggtttt ccaaggttct tagaagacat 1391

40 tttaatggat tctcattcat acccttgat aattggaatt tttgattctt agctgctacc 1451
 agctagttct ctgaagaact gatgttatta caaagaaaat acatgcccac gaccaaatat 1511
 tcaaattgtg caggacagta aataatgaaa accaaatttc ctcaagaaat aactgaagaa 1571

45 ggagcaagtg tgaacagttt cttgtgtatc ctt 1604

50 MLCPWRTANLGLLLILTI FLVAEAEAGAAQPNNSIMLQTSKENHALASSSLCMDEKQITQNYSKVLAEVNTSWPVKM
 ATNAVLCCPPIALRNLIITWEIILRGQPSCTKAYKNETKETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRTVAITHDGY
 YRCIMVTPDGNFHRGYHLQVLVTPVTLFQNRNRRTAVCKAVAGKPAHI SWIPEGDCATKQEYWSNGTIVTKSTCH
 WEVHNVSTVTVCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKISKIYIYHPYYYLDHRGIHLVVESQWLQKI

霊長類(例:ヒト) OX2RH1.2 (配列番号 : 19 株/20):

5	atg ctc tgc cct tgg aga act gct aac cta ggg cta ctg ttg att ttg 48 Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu -25 -20 -15	
10	act atc ttc tta gtg gcc gaa gcg gag ggt gct gct caa cca aac aac 96 Thr Ile Phe Leu Val Ala Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn -10 -5 -1 1 5	
15	tca tta atg ctg caa act agc aag gag aat cat gct tta gct tca agc 144 Ser Leu Met Leu Gln Thr Ser Lys Glu Asn His Ala Leu Ala Ser Ser 10 15 20	
20	agt tta tgt atg gat gaa aaa cag att aca cag aac tac tcg aaa gta 192 Ser Leu Cys Met Asp Glu Lys Ser Trp Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val 25 30 35	10
25	ctc gca gaa gtt aac act tca tgg cct gta aag atg gct aca aat gct 240 Leu Ala Glu Val Asn Thr Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala 40 45 50	
30	gtg ctt tgt tgc cct cct atc gca tta aga aat ttg atc ata ata aca 288 Val Leu Cys Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr 55 60 65 70	
35	tgg gaa ata atc ctg aga ggc cag cct tcc tgc aca aaa gcc tac agg 336 Trp Glu Ile Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg 75 80 85	
40	aaa gaa aca aat gag acc aag gaa acc aac tgt act gat gag aga ata 384 Lys Glu Thr Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile 90 95 100	20
45	acc tgg gtc tcc aga cct gat cag aat tcg gac ctt cag att cgt cca 432 Thr Trp Val Ser Arg Pro Asp Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Pro 105 110 115	
50	gtg gcc atc act cat gac ggg tat tac aga tgc ata atg gta aca cct 480 Val Ala Ile Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro 120 125 130	
55	gat ggg aat ttc cat cgt gga tat cac ctc caa gtg tta gtt aca cct 528 Asp Gly Asn Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro 135 140 145 150	
60	gaa gtg acc ctg ttt caa aac agg aat aga act gca gta tgc aag gca 576 Glu Val Thr Leu Phe Gln Asn Arg Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala 155 160 165	30
65	gtt gca ggg aag cca gct gcg cag atc tcc tgg atc cca gag ggc gat 624 Val Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Asp 170 175 180	
70	tgt gcc act aag caa gaa tac tgg agc aat gcc aca gtg act gtt aag 672 Cys Ala Thr Lys Gln Glu Tyr Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys 185 190 195	

agt aca tgc cac tgg gag gtc cac aat gtg tct acc gtg acc tgc cac 720
 Ser Thr Cys His Trp Glu Val His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His
 200 205 210

5 gtc tcc cat ttg act ggc aac aag agt ctg tac ata gag cta ctt cct 768
 Val Ser His Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro
 215 220 225 230

10 gtt cca ggt gcc aaa aaa tca gca aaa tta tat att cca tat atc atc 816
 Val Pro Gly Ala Lys Lys Ser Ala Lys Leu Tyr Ile Pro Tyr Ile Ile
 235 240 245

15 ctt act att att att ttg acc atc gtg gga ttc att tgg ttg ttg aaa 864
 Leu Thr Ile Ile Ile Leu Thr Ile Val Gly Phe Ile Trp Leu Leu Lys
 250 255 260

20 gtc aat ggc tgc aga aaa tat aaa ttg aat aaa aca gaa tct act cca 912
 Val Asn Gly Cys Arg Lys Tyr Lys Leu Asn Lys Thr Glu Ser Thr Pro
 265 270 275

gtt gtt gag gag gat gaa atg cag ccc tat gcc agc tac aca gag aag 960
 Val Val Glu Glu Asp Glu Met Gln Pro Tyr Ala Ser Tyr Thr Glu Lys
 280 285 290

25 aac aat cct ctc tat gat act aca aac aag gtg aag gca tct cag gca 1008
 Asn Asn Pro Leu Tyr Asp Thr Thr Asn Lys Val Lys Ala Ser Gln Ala
 295 300 305 310

30 tta caa agt gaa gtt gac aca gac ctc cat act tta taa 1047
 Leu Gln Ser Glu Val Asp Thr Asp Leu His Thr Leu
 315 320

10

20

35 MLCPWRTANLGLLLILTI FLVAEAEAGAAQPNNLSMLQTSKENHALASSSLCMDEKQITQNYSKVLAEVNTSWFVKM
 ATNAVLCPPIALRNLIITWEIILRGQPSCTKAYRKETNETKETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRPVAITHDGY
 YRCIMVTFDGNFHRGYHLQVLVTPVTLFQNRNRRTAVCKAVAGKPAAQISWIPEGDCATKQEYWSNGTIVTVKSTCH
 WEVHNVTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSARKLYIPYIILTIILTIIVGFIWLLKVNCGCRKYKLNKTESTP
 VVEEDEMOPYASYTEKNNFLYDFTNKVKASQALQSEVDTDLHTLZ

酵母類(例:バネコ) OX2RH1 (配列番号 : 5 番 6):

5	aaaaccgaa atg ttt tgc ttt tgg aga act tct gcc cta gca gtg ctc tta 51 Met Phe Cys Phe Trp Arg Thr Ser Ala Leu Ala Val Leu Leu 1 5 10	
10	ata tgg ggg gtc ttt gtg gct ggg tca agt tgt act gat aag aat caa 99 Ile Trp Gly Val Phe Val Ala Gly Ser Ser Cys Thr Asp Lys Asn Gln 15 20 25 30	
15	aca aca cag aac aac agt tca tct cct ctg aca caa gtg aac act aca 147 Thr Thr Gln Asn Asn Ser Ser Pro Leu Thr Gln Val Asn Thr Thr 35 40 45	
20	gtg tct gta cag ata ggt aca aag gct ctg ctc tgc tgc ttt tct att 195 Val Ser Val Gln Ile Gly Thr Lys Ala Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ile 50 55 60	10
25	cca ctg aca aaa gca gta tta atc aca tgg ata ata aag ctc aga ggc 243 Pro Leu Thr Lys Ala Val Leu Ile Thr Trp Ile Ile Lys Leu Arg Gly 65 70 75	
30	ctg cca tcc tgc aca ata gca tac aaa gta gat aca aag acc aat gaa 291 Leu Pro Ser Cys Thr Ile Ala Tyr Lys Val Asp Thr Lys Thr Asn Glu 80 85 90	
35	acc agc tgc ttg ggc agg aac atc acc tgg gcc tcc aca cct gac cac 339 Thr Ser Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro Asp His 95 100 105 110	
40	agt cct gaa ctt cag atc agt gca gtg acc ctc cag cat gag ggg act 387 Ser Pro Glu Leu Gln Ile Ser Ala Val Thr Leu Gln His Glu Gly Thr 115 120 125	20
45	tac aca tgt gag aca gta aca cct gaa ggg aat ttt gaa aaa aac tat 435 Tyr Thr Cys Glu Thr Val Thr Pro Glu Gly Asn Phe Glu Lys Asn Tyr 130 135 140	
50	gac ctc caa gtg ctg gtg ccc cct gaa gta acc tac ttt cca gag aaa 483 Asp Leu Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Pro Glu Lys 145 150 155	
55	aac aga tct gca gtc tgt gag gca atg gca ggc aag cct gct gca cag 531 Asn Arg Ser Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln 160 165 170	
60	atc tct tgg tct cca gat ggg gac tgt gtc act acg agt gaa tca cac 579 Ile Ser Trp Ser Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Thr Ser Glu Ser His 175 180 185 190	30
65	agc aat ggc act gtg act gtc agg agc aca tgc cac tgg gag cag aac 627 Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu Gln Asn 195 200 205	
70	aat gtg tct gat gtg tcc tgc att gtc tct cat ttg act ggt aac caa 675 Asn Val Ser Asp Val Ser Cys Ile Val Ser His Leu Thr Gly Asn Gln 210 215 220	

tct ctg tcc ata gaa ctg agt aga ggt ggt aac caa tca tta cga cca 723
 Ser Leu Ser Ile Glu Leu Ser Arg Gly Gly Asn Gln Ser Leu Arg Pro
 225 230 235

5 tat att cca tac atc ata cca tca att atc att ttg atc atc ata gga 771
 Tyr Ile Pro Tyr Ile Ile Pro Ser Ile Ile Ile Leu Ile Ile Ile Gly
 240 245 250

10 tgc att tgt ctt ttg aaa atc agt ggc ttc aga aaa tgc aaa ttg cca 819
 Cys Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Gly Phe Arg Lys Cys Lys Leu Pro
 255 260 265 270

15 aaa tta gaa gct act tca gct att gag gag gat gaa atg cag cct tat 867
 Lys Leu Glu Ala Thr Ser Ala Ile Glu Glu Asp Glu Met Gln Pro Tyr
 275 280 285

gct agc tat aca gag aag agc aat cca ctc tat gat act gtg act aag 915
 Ala Ser Tyr Thr Glu Lys Ser Asn Pro Leu Tyr Asp Thr Val Thr Lys
 290 295 300

20 gtg gag gca ttt cca gta tca caa ggc gaa gtc aat ggc aca gac tgc 963
 Val Glu Ala Phe Pro Val Ser Gln Gly Glu Val Asn Gly Thr Asp Cys
 305 310 315

25 ctt act ttg tcg gcc att gga atc tagaaccaag aaaaaagaag tcaagagaca 1017
 Leu Thr Leu Ser Ala Ile Gly Ile
 320 325

30 tcataattac tgctttgctt tctttaaaat tcgacaatgg aaggactact tggaattag 1077
 ctcttccaaa gctattaaaa agcacaaatg ttctaatagaa attgcattta aattctatca 1137
 ttggaagtgtt ggaatctctg ctgctacctg ttaattttag gaagaactga ttaattatt 1197

35 acaaagaag cacatggtta tggatgaata tcaagtgtg caataaagta tgatgaaaac 1257
 tgagtttctt caagaaataa ctgcaggagg aacaatcatc actaaagaat ttcattgtgag 1317
 ttcttacaaa aaaattccta tgtatacatg actatggtat gtgtgtccaa ttacatgttt 1377

40 atttacaaat gtgtatatat gcacacattt gcttttcagg acatctcctt gtaaaaaaca 1437
 cactggagtt ttggatttat aaaagcttat aaagtgagca ttggagatat ttt 1490

45 MFCFWRTSALAVLLIWGVFVAGSSCTDKNQTTQNSSSPLTQVNTTVSVQIGTKALLCCFSIPLTKAVLITWIKIL
 RGLPSCTIAYKVDTKNETSCLGRNITWASTPDHSPQLQISAVTLQHEGTYTCETVTPEGNFEKNYDLQVLVPEV
 TYFPEKNSAVCEAMAGKPAAQISWSPDGCVTTSSEHSNGTIVRSTCHWEQNNVSDVSCIVSHLTGNQSLIEL
 SRGGNQSLRPYIPYIIPSIILIIIGCICLLKISGFRKCKLPKLEATSAJEEDEMOPYASYTEKSNPLYDTVTKVE
 50 AFPVSGEVNGTDCLTSLAIGI

10

20

30

変長換 (例: 10' C) OX2RH2 (配列番号 7 およ 8):

5	atg ggt gga aag cag atg aca cag aac tat tca aca att ttt gca gaa Met Gly Gly Lys Gln Met Thr Gln Asn Tyr Ser Thr Ile Phe Ala Glu	48	
	1 5 10 15		
10	ggt aac att tca cag cct gta ctg atg gat ata aat gct gtg ctt tgt Gly Asn Ile Ser Gln Pro Val Leu Met Asp Ile Asn Ala Val Leu Cys	96	
	20 25 30		
15	tgc cct cct att gca tta aga aat ttg atc ata ata aca tgg gaa ata Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr Trp Glu Ile	144	
	35 40 45		
20	atc ctg aga ggc cag cct tcc tgc aca aaa gcc tac aag aaa gaa aca Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Lys Lys Glu Thr	192	10
	50 55 60		
25	aat gag acc aag gaa acc aac tgt act gtt gag aga ata acc tgg gtc Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Val Glu Arg Ile Thr Trp Val	240	
	65 70 75 80		
30	tct aga cct gat cag aat tcg gac ctt cag att cgt ccg gtg gac acc Ser Arg Pro Asp Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Pro Val Asp Thr	288	
	85 90 95		
35	act cat gac ggg tat tac aga ggc ata gtg gta aca cct gat ggg aat Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ile Val Val Thr Pro Asp Gly Asn	336	
	100 105 110		
40	ttc cat cgt gga tat cac ctc caa gtg tta gtt aca ccc gaa gtg aac Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro Glu Val Asn	384	20
	115 120 125		
45	cta ttt caa agc agg aat ata act gca gta tgc aag gca gtt aca ggg Leu Phe Gln Ser Arg Asn Ile Thr Ala Val Cys Lys Ala Val Thr Gly	432	
	130 135 140		
50	aag cca gct gcc cag atc tcc tgg atc cca gag gga tct att ctt gcc Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala	480	
	145 150 155 160		
55	act aag caa gaa tac tgg ggc aat ggc aca gtg acg gtt aag agt aca Thr Lys Gln Glu Tyr Trp Gly Asn Gly Thr Val Thr Val Lys Ser Thr	528	
	165 170 175		
60	tgc ccc tgg gag ggc cac aag tct act gtg acc tgc cat gtc tcc cat Cys Pro Trp Glu Gly His Lys Ser Thr Val Thr Cys His Val Ser His	576	30
	180 185 190		
65	ttg act ggc aac aag agt ctg tcc gta aag ttg aat tca ggt ctc aga Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Ser Val Lys Leu Asn Ser Gly Leu Arg	624	
	195 200 205		
70	acc tca gga tct cca gcg ttg tcc tta ctg atc att ctt tat gtg aaa Thr Ser Gly Ser Pro Ala Leu Ser Leu Leu Ile Ile Leu Tyr Val Lys	672	
	210 215 220		

ctc tct ctt ttt gtg gtc att ctg gtc acc aca gga ttt gtt ttc ttc 720
 Leu Ser Leu Phe Val Val Ile Leu Val Thr Thr Gly Phe Val Phe Phe
 225 230 235 240

5 cag agg ata aat cat gtc aga aaa gtt ctt taaagaagaa ggaagggtct 770
 Gln Arg Ile Asn His Val Arg Lys Val Leu
 245 250

10 tcttttgctt ctccctcttg tctctggact gcaacattgg tgagatgagt gatgggtccag 830
 cagtgaactt gggccatgga tgatgttaag gatagaagcc actcagtagg atagaagaaa 890
 agaaagatgg aagaaggatc ctgggcttga tgaccatgaa gtttccctat aaaccctcaa 950

15 ccacctattc attgacttct tttgtgtag agtgaataaa attttgttca tgccagtgtt 1010

20 MGGKQMTQNSTIFAEGNISQFVLMNDINAVLCCPPIALRNLIITWEIILRGQPSCTKAYKKEKNETKETNCTVER
 ITWVSRPDQNSDLQIRPVDTHDGYRGIWVTPDGNFHRGYHLQVLVTPVNLFQSRNITAVCKAVTGKPAQISW
 IPEGSLATKQEYWGNGTIVTKSTCPWEGHKSTVTVCHVSHLTGNKLSLVKLSNGLRTSGSPALSLLIILYVKLSLF
 WVILVTTGFVFFQRINHVRKVL

10

蛋白質類 (例) OX2RH2 (配列番号 : 9 番 10):

25 aga ggc cag cct tcc tgc ata atg gcc tac aaa gta gaa aca aag gag 48
 Arg Gly Gln Pro Ser Cys Ile Met Ala Tyr Lys Val Glu Thr Lys Glu
 1 5 10 15

30 acc aat gaa acc tgc ttg ggc agg aac atc acc tgg gcc tcc aca cct 96
 Thr Asn Glu Thr Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro
 20 25 30

35 gac cac att cct gac ctt cag atc agt gcg gtg gcc ctc cag cat gag 144
 Asp His Ile Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala Leu Gln His Glu
 35 40 45

40 ggg aat tac tta tgt gag ata aca aca cct gaa ggg aat ttc cat aaa 192
 Gly Asn Tyr Leu Cys Glu Ile Thr Thr Pro Glu Gly Asn Phe His Lys
 50 55 60

45 gtc tat gac ctc caa gtg ctg gtg ccc cct gaa gta acc tac ttt ctc 240
 Val Tyr Asp Leu Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Leu
 65 70 75 80

50 ggg gaa aat aga act gca gtt tgt gag gaa atg gca ggc aag cct gct 288
 Gly Glu Asn Arg Thr Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala
 85 90 95

55 gca cag atc tct tgg act cca gat ggg gac tgt gtc act aag agt gag 336
 Ala Gln Ile Ser Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Lys Ser Glu
 100 105 110

55 tca cac agc aat ggc act gtg act gtc agg agc act tgc cac tgg gag 384
 Ser His Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu
 115 120 125

cag aac aat gtg tct gct gtg tcc tgc att gtc tct cat tcg act ggt 432
 Gln Asn Asn Val Ser Ala Val Ser Cys Ile Val Ser His Ser Thr Gly
 130 135 140

20

30

aat cag tct ctg tcc ata gaa ctg agt aga ggt acc acc agc acc acc 480
 Asn Gln Ser Leu Ser Ile Glu Leu Ser Arg Gly Thr Thr Ser Thr Thr
 145 150 155 160
 5 cct tcc ttg ctg acc att ctc tac gtg aaa atg gtc ctt ttg ggg att 528
 Pro Ser Leu Leu Thr Ile Leu Tyr Val Lys Met Val Leu Leu Gly Ile
 165 170 175
 10 att ctt ctt aaa gtg gga ttt gct ttc ttc cag aag aga aat gtt acc 576
 Ile Leu Leu Lys Val Gly Phe Ala Phe Phe Gln Lys Arg Asn Val Thr
 180 185 190
 15 aga aca tgaatatcca gatttctgga agctcattag tctgatgaca cataccagaa 632
 Arg Thr
 aacagcattt gtaatcaact ttctcattgg aatccagctt acccgtccct gctgtcttca 692
 20 tgtttgtag acactcacct ccaaattctt aactgagaag ggctcctgtc taaaggaaat 752
 atggggacaa attgtggagc atagacaaa agaaaggcca tccagagact gccccaccta 812
 aggaccatc ccatatacag acaccaaac cagacactac tgaagatgct gcgaagcgtt 872
 25 tgctgacagg agcctgttat agctgtctcc tgagaggctc agccagagcc tgacaaatac 932
 ataggtagat gcttgacgcc aacaactgga ctgagcaaaa aatctccatt ggaggagtta 992
 gagaaaggac tgaagagggt gaaagggttt gcagcccat aggaagaaca acaatatcaa 1052
 30 ccaaccagat ctcccagagc tcccaggagc taa 1085

10
20
30

35 RGQPSCIMAYKVKETKETNETCLGRNITWASTPDHIFDLQISAVALOHEGNYLCEITTPEGNFHKVYDLQVLVPEV
 TYFLGENRTAVCEAMAGKPAAQISWTFDGDVTKSESHSNGTIVTVRSTCHWEQNNVSAVSCIVSHSTGNQSLIEL
 SRGTTSTTPSLLTILYVMVLLGIILLKVGFAFFQKRNVRT

40 げん 類 (例マウス) OX2RH4 (配列番号 : 22 及び 23):

atg cat gct ctg ggg agg att ccg act ttg act ttg ctg atc ttc atc 48
 Met His Ala Leu Gly Arg Ile Pro Thr Leu Thr Leu Leu Ile Phe Ile
 -25 -20 -15 -10
 45 aat att ttt gtg tct ggg tca agt tgt aet gat gag aat caa aca ata 96
 Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser Ser Cys Thr Asp Glu Asn Gln Thr Ile
 -5 -1 1 5
 50 cag aat gac agt tca tct tct ctg aca caa gtt aac act aca atg tct 144
 Gln Asn Asp Ser Ser Ser Ser Leu Thr Gln Val Asn Thr Thr Met Ser
 10 15 20
 55 gta cag atg gat aaa aag gct ctg ctc tgc tgc ttt tct agt cca ctg 192
 Val Gln Met Asp Lys Lys Ala Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Pro Leu
 25 30 35
 ata aat gca gta tta atc aca tgg ata ata aaa cac aga cac ctg cct 240
 Ile Asn Ala Val Leu Ile Thr Trp Ile Ile Lys His Arg His Leu Pro
 40 45 50 55

30

	tcc tgc aca ata gca tac aac cta gat aaa aag acc aat gaa acc agc	288	
	Ser Cys Thr Ile Ala Tyr Asn Leu Asp Lys Lys Thr Asn Glu Thr Ser		
	60 65 70		
5	tgc ttg ggc agg aac atc acc tgg gcc tcc aca cct gac cac agt cct	336	
	Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro Asp His Ser Pro		
	75 80 85		
10	gaa ctt cag atc agt gca gtg gcc ctc cag cat gag ggg act tac aca	384	
	Glu Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala Leu Gln His Glu Gly Thr Tyr Thr		
	90 95 100		
15	tgt gag ata gta aca cct gaa ggg aat tta gaa aaa gtc tat gac ctc	432	10
	Cys Glu Ile Val Thr Pro Glu Gly Asn Leu Glu Lys Val Tyr Asp Leu		
	105 110 115		
20	caa gtg ctg gtg ccc cct gag gta acc tac ttt cca ggg aaa aac aga	480	
	Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Pro Gly Lys Asn Arg		
	120 125 130 135		
25	act gca gtc tgt gag gca atg gca ggc aag cct gct gca cag atc tct	528	
	Thr Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser		
	140 145 150		
30	tgg act cca gat ggg gac tgt gtc act aag agt gag tca cac agc aat	576	
	Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Lys Ser Glu Ser His Ser Asn		
	155 160 165		
35	ggc act gtg act gtc agg agc acg tgc cac tgg gag cag aac aat gtg	624	20
	Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu Gln Asn Asn Val		
	170 175 180		
40	tct gtt gtg tcc tgc tta gtc tct cat tcg act ggt aat cag tct ctg	672	
	Ser Val Val Ser Cys Leu Val Ser His Ser Thr Gly Asn Gln Ser Leu		
	185 190 195		
45	tcc ata gaa ctg agt caa ggt aca atg acc acc ccc cgt tcc ttg ctg	720	
	Ser Ile Glu Leu Ser Gln Gly Thr Met Thr Thr Pro Arg Ser Leu Leu		
	200 205 210 215		
50	acc att ctc tat gtg aaa atg gcc ctt ttg gtg att att ctt ctt aac	768	
	Thr Ile Leu Tyr Val Lys Met Ala Leu Leu Val Ile Ile Leu Leu Asn		
	220 225 230		
50	gta gga ttt gct ttc ttc cag aag aga aat ttt gcc aga aca tga	813	30
	Val Gly Phe Ala Phe Phe Gln Lys Arg Asn Phe Ala Arg Thr		
	235 240 245		
50	MHALGRIPTLLLLIFINIFVSGSSCTDENQTIQNDSSSSLTQVNTTMSVQMDKKALLCCFSSPLINAVLIT WIKHRHLPSTCIAYNLDKKTNETSCLGRNITWASTPDHSPQLQISAVALQHEGTYTCEIVTPEGNLEKVV DLQVLVPEVITYFPKGNRTAVCEAMAGKPAAQISWTPDGDVCVTKSESHSNGTIVRSTCHWEQNNVSVVSC LVSHSTGNQSLIELSQGTMTTPRSLLTILYVQIALLVIIILNVGFAFFQKRNFA		

表3：げっし類（例えば、マウス）OX2RH3（配列番号11および12）
【0058】

【表 3】

	ggc	cag	gag	tt	acg	att	ttg	tg	ctt	aac	ctg	ctc	act	cca	g	atg	cat	gct	ttg	ggg	56	
																	Met	His	Ala	Leu	Gly	
5																						-25
	agg	act	ctg	gct	ttg	atg	tta	ctc	atc	ttc	atc	act	att	ttg	gtg	cct						104
	Arg	Thr	Leu	Ala	Leu	Met	Leu	Leu	Ile	Phe	Ile	Thr	Ile	Leu	Val	Pro						
	-20						-15				-10											-5
10																						
	gag	tca	agt	tgt	tca	gtg	aaa	gga	cgg	gag	gag	atc	cca	ccg	gat	gat						152
	Glu	Ser	Ser	Cys	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Glu	Glu	Ile	Pro	Pro	Asp	Asp						
				-1	1				5					10								
15																						
	tca	ttt	cct	ttt	tca	gat	gat	aat	atc	ttc	cct	gat	gga	gtg	ggc	gtc						200
	Ser	Phe	Pro	Phe	Ser	Asp	Asp	Asn	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Val	Gly	Val						
			15					20					25									
20																						
	acc	atg	gag	att	gag	att	atc	act	cca	gtg	tct	gta	cag	ata	ggc	atc						248
	Thr	Met	Glu	Ile	Glu	Ile	Ile	Thr	Pro	Val	Ser	Val	Gln	Ile	Gly	Ile						
		30					35					40										
25																						
	aag	gct	cag	ctt	ttc	tgt	cat	cct	agt	cca	tca	aaa	gaa	gca	aca	ctt						296
	Lys	Ala	Gln	Leu	Phe	Cys	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Lys	Glu	Ala	Thr	Leu						
		45				50						55				60						
30																						
	aga	ata	tgg	gaa	ata	act	ccc	aga	gac	tgg	cct	tcc	tgc	aga	cta	ccc						344
	Arg	Ile	Trp	Glu	Ile	Thr	Pro	Arg	Asp	Trp	Pro	Ser	Cys	Arg	Leu	Pro						
					65					70					75							
35																						
	tac	aga	gca	gag	ttg	cag	cag	atc	agt	aaa	aaa	atc	tgt	act	gag	aga						392
	Tyr	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Gln	Ile	Ser	Lys	Lys	Ile	Cys	Thr	Glu	Arg						
				80					85					90								
40																						
	gga	acc	act	agg	gtc	cct	gca	cat	cac	cag	agt	tct	gac	ctt	ccc	atc						440
	Gly	Thr	Thr	Arg	Val	Pro	Ala	His	His	Gln	Ser	Ser	Asp	Leu	Pro	Ile						
				95				100					105									
45																						
	aaa	tca	atg	gcc	ctc	aag	cat	gat	ggg	cat	tac	tca	tgt	cgg	ata	gaa						488
	Lys	Ser	Met	Ala	Leu	Lys	His	Asp	Gly	His	Tyr	Ser	Cys	Arg	Ile	Glu						
			110				115						120									
50																						
	aca	aca	gat	ggg	att	ttc	caa	gag	aga	cat	agc	atc	caa	gtg	cca	ggg						536
	Thr	Thr	Asp	Gly	Ile	Phe	Gln	Glu	Arg	His	Ser	Ile	Gln	Val	Pro	Gly						
				125		130					135					140						
55																						
	gaa	aat	aga	act	gta	ggt	tgt	gag	gca	att	gca	agc	aag	cct	gct	atg						584
	Glu	Asn	Arg	Thr	Val	Val	Cys	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	Lys	Pro	Ala	Met						
					145					150					155							
60																						
	cag	atc	ttg	tgg	act	cca	gat	gag	gac	tgt	gtc	act	aag	agt	aaa	tca						632
	Gln	Ile	Leu	Trp	Thr	Pro	Asp	Glu	Asp	Cys	Val	Thr	Lys	Ser	Lys	Ser						
				160					165						170							
65																						
	cac	aat	gac	acc	atg	att	gtc	agg	agc	aag	tgc	cac	agg	gag	aaa	aac						680
	His	Asn	Asp	Thr	Met	Ile	Val	Arg	Ser	Lys	Cys	His	Arg	Glu	Lys	Asn						
				175				180						185								

	aat ggc cac agt gtg ttc tgc ttt atc tcc cat ttg act gat aac tgg	728	
	Asn Gly His Ser Val Phe Cys Phe Ile Ser His Leu Thr Asp Asn Trp		
	190 195 200		
5	att ctc tcc atg gaa cag aat cga ggt aca acc agc atc ctg cct tcc	776	
	Ile Leu Ser Met Glu Gln Asn Arg Gly Thr Thr Ser Ile Leu Pro Ser		
	205 210 215 220		
10	ttg ctg agc att ctc tat gtg aaa ctg gct gta act gtt ctc atc gta	824	
	Leu Leu Ser Ile Leu Tyr Val Lys Leu Ala Val Thr Val Leu Ile Val		
	225 230 235		
15	gga ttt gct ttt ttc cag aag aga aat tat ttc aga gtg cca gaa ggc	872	
	Gly Phe Ala Phe Phe Gln Lys Arg Asn Tyr Phe Arg Val Pro Glu Gly		10
	240 245 250		
	tcc tgaggagagt ggtctgtggt taagatgaga ttaccacca tctgaaagac	925	
	Ser		
20	atcttgtcta ccgcgagcgt tgctgagatt ccgagaagca gccacagaac ctactaggaa	985	
	gacaaatctg atgtggttgt caatcctttc aatggacctg agtacttcta taaacccgag	1045	
25	tgaggttctg ctggaccag gagccaggct aggtcatata tgttgatttt tgctgcaaga	1105	
	cctcatggtt tatctacaaa tcctaaattc tttcacttcc agttttaaaa cttttggccc	1165	
	aagcatttta tccacagcat aacaccttta aagaaactct cccacggaaa ctgctggttc	1225	
30	catggaatgg aaaattgcaa catggtttac aagacagtgc aaaccaagca gcattccaag	1285	
	atatgagcct cagaaagtta caggaactgt cttgggacga gaaagaagga ttaaatagtt	1345	20
	cccagtccc	1354	
35	MHALGRTLALMLLIFITILVPESSCSVKGREIIPDDSFPPSDDNIFPDGVGVIMEIEIITPVSVQIGIKAQLFCH		
	PSPSKEATLRIWEITPRDWPCRLPYRAELQIQISKKICTERGTTRVPAHQSSDLPIKSMALKHGDGHYSCRIETTD		
	GIFQERHSIQVGENRTVVCEAIASKPAMQILWTPEDCVTKSKSHNDTMIIVRSKCHREKKNNGHSVFCFISHLTDN		
40	WILSMEQNRGTTILPSSLISILYVKLAVTVLIVGFAFFQKRNYFRVPEGS		

表 4 : O X 2 R ホモログの逆翻訳
【 0 0 5 9 】

【表 4】

竹 齒類(例13) OX2RH1 (配列番号 : 13):

5	atgytntgyt	tytggmgnac	nwsncaygtn	gcngtntytn	tnathtgggg	ngtnttygcn	60
	gcngarwsnw	sntgyccnga	yaaraaycar	acnatgcara	ayaaywsnws	nacnatgacn	120
	gargtnaaya	cnaacngntt	ygtncaratg	gnaaraarg	cnytnytntg	ytgyccnwsn	180
	athwsnytna	cnaargtnat	hytnathacn	tggacnatha	cnytnmgngg	ncarccnwsn	240
	tgyathathw	sntayaargc	ngayacnmgn	garacncayg	arwsnaaytg	ywsngaymgn	300
10	wsnathacnt	ggcnwsnac	nccngayytn	gcncngayy	tncarathtws	ngcngtngcn	360
	ytncarcayg	arggnmgnta	ywsntgygay	athgcngtnc	cngayggnaa	yttycaraay	420
	athtaygayy	tncargtnyt	ngtncncncn	gargtnacnc	ayttycngg	ngaraaymgn	480
	acngcngtnt	gygargcnat	hgcnggnaar	ccngcngcnc	arathwsntg	gacnccngay	540
	ggngaytgyg	tngcnaaraa	ygarwsncay	wsnaayggna	cngtnacngt	nmgwnsnacn	600
15	tgycaytggg	arcarwsnca	ygtnwsngtn	gtnttytgyg	tngtnwsnca	yytnacnacn	660
	ggnaaycarw	snytnwsnat	hgarytnggn	mgngggngng	aycarytnyt	nggnwsntay	720
	athcartaya	thathccnws	nathathath	ytathathath	thggntgyat	htgyytnytn	780
	aarathwsng	gntgymgnaa	rtgyaarytn	ccnaarwsng	gngcncncnc	ngayathgar	840
	gargaygara	tgcarccnta	ygcnwsntay	acngaraarw	snaayccmyt	ntaygayacn	900
20	gtnacnacna	cngargcncn	yccngcnwsn	carggnaarg	tnaayggnac	ngaytgyytn	960
	acnytnwsng	cnatgggnat	h				981

10

25 重長類(例14) OX2RH1 (配列番号 : 14):

25	atgytntgyt	cntggmgnac	ngcnaayytn	ggnytnytny	tnathytnac	nathttyytn	60
	gtngcngarg	cngarggngc	ngcncarccn	aayaaywsny	tnatgytnca	racnwsnaar	120
	garaaycayg	cnytnngcnws	nwsnwsnytn	tgyatggayg	araarcarat	hacncaraay	180
	taywsnaarg	tnytnngcng	rgtnaayacn	wsntggccng	tnaaratggc	nacnaaygcn	240
30	gtnytnntgyt	gyccnccnat	hgcmynmgm	aayytnatha	thathacntg	ggarathath	300
	ytnmgnggnc	arccnwsntg	yacnaargcn	tayaaraarg	aracnaayga	racnaargar	360
	acnaaytgya	cngaygarng	nathacntgg	gtnwsnmgnc	cngaycaraa	ywsngayytn	420
	carathmgna	cngtngcnat	hacncaygay	ggntaytaym	gntgyathat	ggtnacncnc	480
	gayggnaayt	tycaymngg	ntaycayytn	cargtntytn	tnacnccnga	rgtnacnytn	540
35	ttycaraaym	gnaaymgnac	ngcngtntgy	aargcngtng	cnggnaarcc	ngcngcncay	600
	athwsntgga	thccngargg	ngaytgygcn	acnaarcarg	artaytggws	naayggnacn	660
	gtnacngttna	arwsnacntg	ycaytgggar	gtncayaayg	tnwsnacngt	nacntgygay	720
	gtnwsncayy	tnacnggnaa	yaarwsnytn	tayathgary	tnytnccngt	nccnggngcn	780
	aaraarathw	snaarathat	htaywsnath	taycayccnt	aytaytayta	yytngaycay	840
40	mgnggnathc	ayytngtngt	ngarwsncar	tggytncara	arath		885

20

霊長類 (例として) OX2RH1.2 (配列番号 : 21):

	atgytntgyc	cntggmgnc	ngcnaaytn	ggnytnytn	tnathytnac	nathttytn	60
	gtngcngarg	cngarggnc	ngcncarcn	aayaaywsny	tnatgytnca	racnwsnaar	120
5	garaaycayg	cnytnngcws	nwsnwsnytn	tgyatggayg	araarcarat	hacncaraay	180
	taywsnaarg	tnytnngcng	rgtnaayacn	wsntggccng	tnaaratggc	nacnaaygcn	240
	gtntytngyt	gyccnccnat	hgcnymnmg	aaytnatha	thathacntg	ggarathath	300
	ytngmgngnc	arccnwsntg	yacnaargcn	taymgnaarg	aracnaayga	racnaargar	360
	acnaaytgya	cngaygarmg	nathacntgg	gtnwsnmngc	cngaycaraa	ywsngayytn	420
10	carathmgnc	cngtnngcnat	hacncaygay	ggntaytaym	gntgyathat	ggtnacnccn	480
	gayggnaayt	tycaymgngg	ntaycayytn	cargtnytn	tnacnccnga	rgtnacnytn	540
	ttycaraaym	gnaaymgnc	ngcngntgy	aargcngtn	cnggnaarcc	ngcngcncar	600
	athwsntgga	thccngargg	ngaytgygcn	acnaarcarg	artaytggws	naayggnaacn	660
	gtnacngtna	arwsnacntg	ycaytggarg	gtncayaayg	tnwsnacngt	nacntgyacay	720
15	gtawsncayy	tnacnggnaa	yaarwsnytn	tayathgary	tnytnccngt	nccngngcnc	780
	aaraarwsng	cnaarytna	yathccntay	athathytna	cnathathat	hytnacnath	840
	gtnggnttya	thtgyytnyt	naargtnaay	ggntgymgna	artayaaryt	naayaaracn	900
	garwsnacnc	cngtngtnga	rgargaygar	atgcarcnt	aygcnwsnta	yacngaraar	960
	aayaayccny	tnayggayac	nacnaayaar	gtnaarqcnw	sncargcnyt	ncarwngar	1020
20	gtngayacng	ayytncaayac	nytn				1044

10

細菌類 (例として) OX2RH1 (配列番号 : 15):

25	atgttytgyt	tytggmgnc	nwsngcnytn	gcngtnytn	tnathtgggg	ngtnttygtn	60
	gcnggnwsnw	sntgyacng	yaaraaycar	acnacncara	ayaaywsnws	nwsnccnytn	120
	acncargtna	ayacnacngt	nwsngtncar	athggnacna	argcnytnyt	ntgytgytty	180
	wsnathccny	tnacnaargc	ngtnytnath	acntggatha	thaarytnmg	nggnytnccn	240
	wsntgyacna	thgcntayaa	rgtngayacn	aaacnaayg	aracnwsntg	yytnggnmgn	300
30	aayathacnt	ggcncwnac	nccngaycay	wsnccngary	tncarathws	ngcngtnacn	360
	ytncarcayg	arggnacnta	yacntgygar	acngtnacnc	cngarggnaa	yytygaraar	420
	aaytaygayy	tnarcgtnyt	ngtnccnccn	gargtnacnt	aytyccnga	raaraaymgn	480
	wsngcngnt	gygargcnat	ggcnggnar	ccngcngcnc	arathwsntg	gwsnccngay	540
	ggngaytgyg	tnacnacnws	ngarwsncay	wsnaayggna	cngtnacngt	nmgnwsnacn	600
35	tygcaytggg	arcarayaay	ygtnwsngay	gtnwsntgya	thgtnwsnca	yytnacnggn	660
	aaycarwsny	tnwsnathga	rytnwsnmgn	ggnggnaayc	arwsnytnmg	nccntayath	720
	ccntayatha	thccnwsnat	hathathytn	athathathg	gntgyathtg	yytnytnaar	780
	athwsngnt	tymgnaartg	yaarytnccn	aarytnarg	cnacnwsngc	nathgargar	840
	gaygaratgc	arccntaygc	nwsntayacn	garaarwsna	ayccnytna	ygayacngtn	900
40	acnaargtn	argcnttycc	ngtnwsncar	ggngargtna	ayggnacnga	ytgyytnacn	960
	ytnwsngcna	thggcnath					978

20

霊長類 (例として) OX2RH2 (配列番号 : 16):

45	atggngngna	arcaratgac	ncaraaytay	wsnacnatht	tygcngargg	naayathwsn	60
	carccngtny	tnatggayat	haaygcngtn	ytntgytgyc	cncnathgc	nytnmgnaay	120
	ytnathatha	thacntggga	rathathytn	mgnggncarc	cnwsntgyac	naargcntay	180
	aaraargara	cnaaygarac	naargaracn	aaytgyacng	tngarmgnat	hacntgggtn	240
50	wsnmgnccng	aycaraayws	ngayytnar	athmgncng	tngayacnac	ncaygayggn	300
	taytaymgng	gnathgtngt	nacnccngay	ggnaayttyc	aymgnggnta	ycayytnar	360
	gtnytngtna	cncnccngargt	naayytnnty	carwsnmgna	ayathacngc	ngtnygyaar	420
	gcngtnacng	gnaarccngc	ngcncarath	wsntggathc	cngarggnws	nathytnngcn	480
	acnaarcarg	artaytgggg	naayggnacn	gtnacngtna	arwsnacntg	ycntgggar	540
55	ggncayaarw	snacngtnac	ntgycaygtn	wsncayytna	cnggnaayaa	rwsnytnwsn	600
	gtnaarytna	aywsnggny	nmgnacnwsn	ggnwsnccng	cnytnwsny	nytnathath	660
	ytntaygtna	arytnwsny	nttygtngtn	athytngtna	cnacnggntt	ygtnttyty	720
	carmgnatha	aycaygtnmg	naargtnytn				750

30

	げっ歯類 (例: マウス)	OX2RH2 (配列番号 : 17):	
5	mqnggncarc	cnwsntgyat	hatggcntay aargtngara cnaargarac naaygaracn 60
	tgyytnggnm	gnaayathac	ntggcnwns acncngayc ayathccnga yytnccarath 120
	wsngcngtng	cnytnccarca	ygarggnaay tayytnngyg arathacnac nccngarggn 180
	aayttycaya	argtntayga	yytnccargtn ytnngtncnc cngargtnac ntayttyytn 240
	ggngaraaym	gnacngcngt	ntgygargcn atggcnggna arccngcngc nccarathwn 300
	tggacncng	ayggngaytg	ygtnacnaar wsgarwsnc aywsnaaygg nacngtnacn 360
10	gtnmgnwsna	cntgycaytg	ggarcaraay aaygtwnsng cngtnwsntg yathgtwnsn 420
	caywsnacng	gnaaycarws	nytnwsnath garytnwsnm gnggnacnac nwsnacnacn 480
	ccnwsnytny	tnacnathyt	ntaygtnaar atggtnytny tnggnathat hytnytnaar 540
	gtnggnttyg	cnttytyca	raarmgnaay gtnacnmgna cn 582
15			
	げっ歯類 (例: マウス)	OX2RH4 (配列番号 : 24):	
	atgcaygcny	tnggnmgnt	hccnacnytn acnytnytna thttiyathaa yathttygtn 60
	wsnggnwnw	sntgyacnga	ygaraaycar acnathcara aygaywsnws nwsnwsnytn 120
20	acncargtna	ayacnacnat	gwsngtncar atggayaara argcnytnyt ntgytgytgy 180
	wsnwsnccny	tnathaaygc	ngtnytnath acntggatha tharccaymg ncayytnccn 240
	wsntgyacna	thgcntayaa	yytngayaar aaracnaayg aracnwsntg yytnggnmgn 300
	aayathacnt	gggcwnsnac	nccngaycay wsncngary tncarathws ngcngtngcn 360
	ytncarcayg	arggnacnta	yacntgygar athgtnacnc cngarggnaa yytngaraar 420
25	gtntaygayy	tnccargtny	ngtncncncn gargtnacnt aytyccngg naaraaymgn 480
	acngcngtnt	gygargcnat	ggcnggnaar ccngcngcnc arathwsntg gacncngay 540
	ggngaytgyg	tnacnaarws	ngarwsncay wsnaayggna cngtnacngt nmgnwsnacn 600
	tgycaytggg	arcaraayaa	ygtnwsngtn gtnwsntgyy tngtnwsnca ywsnacnggn 660
	aaycarwsny	tnwsnathga	rytnwsncar ggnacnatga cnacncnmg nwsnytnytn 720
30	acnathytnt	aygtnaarat	ggcnytnytn gtnathathy tnytnaaygt nggnttygcn 780
	ttytycara	armgnaayt	ygcnmgnacn 810
	げっ歯類 (例: マウス)	OX2RH3 (配列番号 : 18):	
35	atgcaygcny	tnggnmgnc	nytnngcnytn atgytnytna thttiyathac nathyngtn 60
	ccngarwsnw	sntgywsngt	naarggnmgn gargarathc cncngayga ywsnttyccn 120
	ttywsngayg	ayaayathht	ycncngaygn gtnggngtna cnatggarat hgarathath 180
	acnccngtnw	sngtncarat	hggnaathaar gcncarytny tytgycaycc nwsnccnwn 240
40	aargargcna	cnytnmgnt	htgggarath acnccnmgn aytgccnws ntgyngnytn 300
	ccntaymgng	cngarytnca	rcarathwsn aaraaratht gyacngarmg nggnacnacn 360
	mgngtncng	cncaycayca	rwsnwsngay ytnccnatha arwsnatggc nytnaarca 420
	gayggncayt	aywsntgyng	nathgaracn acngayggna thttycarga mgncaywsn 480
	athcargtn	cnggnarara	ymgnacngtn gtntgygarg cnathgcnws naarccngcn 540
45	atgcarathy	tntggacncc	ngaygaray gyggnacna arwsnaarws ncayaaaygay 600
	acnatgathg	tnmgnwsnaa	rtgycaymgn garaaraaya ayggncayws ngtnttytgy 660
	ttyathwsnc	ayytnacnga	yaaytgath ytnwsnatgg arcaraaymg nggnacnacn 720
	wsnathytnc	cnwsnytny	nwsnathytn taygtnaary tngcngtnac ngtnytnath 780
50	gtnggnttyg	cnttytyca	raarmgnaay taytymgng tncngargg nwsn 834

表 5 : さまざまな種の O X 2 R ホモログ 1 および 2 のアラインメント

またはこのファミリーのメンバーの種々のサブセットにわたって保存されている位置である。

【0060】

機能的には、ラットおよびマウスH1は、OX2に結合することが示された。このことは、ヒトH1については未だ確認されていないが、容易に試験され得る。H2、H4およびH3群に対して適合するリガンドは、以下に記載される。

【0061】

げっ歯類H3は、予測されるように、DAP12と関連することが示された。組換え発現されたエピトプタグ化DAP12は、シャペロン(chaperone)パートナーの同時発現がない場合、膜結合型ではない。例えば、Bakkerら(1999) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:9792-9796を参照のこと。マウスH3は、シャペロンパートナーとして働き得る。しかし、DAP12を通じたシグナル経路は、H3リガンドに結合することを必要とする。このH3リガンドは、未だ同定されていないが、適切なスクリーニングストラテジー(例えば、生化学的または物理的方法)を用いて見出され得る。H2およびげっ歯類H4の配列類似性は、DAP12または(可能であれば)DAP10のいずれかとの類似の関連性を示唆する。

【0062】

マウスH2およびH4およびヒトH2はまた、このような特性を有する可能性が高い(例えば、DAP12(活性化)またはDAP10との関連性)。シグナル伝達経路は、NK細胞上の関連レセプターのいくつかを用いて決定された。例えば、Lanierら(1998) Immunity 8:693-701; Smithら(1998) J. Immunol. 161:7-10; Gosseleinら(1999) J. Leukoc. Biol. 66:165-171; Tomaselloら(1998) J. Biol. Chem. 273:34115-34119; およびMcVicarら(1998) J. Biol. Chem. 273:32934-32942を参照のこと。細胞外ドメインとH1メンバーとが類似しているので、OX2様遺伝子(特にOX2)は、リガンドであるようである。

【0063】

本明細書中で使用される場合、用語OX2RH1、OX2RH2またはOX2RH4は、例えば表1~2に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質を記載するために使用される。多くの場合、実質的なそのフラグメントは、機能的に等価であるか、または構造的に等価である(例えば、細胞外または細胞内ドメインを含む)。本発明はまた、配列が提供されているそれぞれのOX2RH対立遺伝子のタンパク質改変体を含む(例えば、ムテインまたは可溶性細胞外構築物)。代表的には、このようなアゴニストまたはアンタゴニストは、約10%未満の配列差を示し、従って、これはしばしば、1~11残基の置換(例えば、2、3、5、7など)を有する。これは、記載されたタンパク質の対立遺伝子改変体および他の改変体(例えば、天然の多型)を含み得る。代表的には、このレセプターは、例えば、少なくとも約100nM、通常は約30nMより良好に、好ましくは約10nMより良好に、そしてより好ましくは約3nMより良好に高親和性を有する対応するよう生物学的リガンドに結合する。この用語はまた、関連する天然に存在する形態(例えば、対立遺伝子、多型改変体、および哺乳動物タンパク質の代謝改変体)をいうために本明細書中で使用される。レセプター複合体の好ましい形態は、リガンド-レセプター相互作用について適切な親和性および選択性を有する適切なリガンドを結合する。

【0064】

本発明はまた、表1~3におけるアミノ酸配列と実質的なアミノ酸配列相同性を有するタンパク質またはペプチドの組み合わせを包含する。これは、比較的少ない置換(例えば、好ましくは約3~5未満)を有する配列改変体を含む。

【0065】

実質的なポリペプチド「フラグメント」または「セグメント」は、少なくとも約8アミノ酸、一般には少なくとも10アミノ酸、より一般には少なくとも12アミノ酸、しばし

10

20

30

40

50

ば少なくとも14アミノ酸、よりしばしば少なくとも16アミノ酸、代表的には少なくとも18アミノ酸、より代表的には少なくとも20アミノ酸、通常は少なくとも22アミノ酸、より通常には少なくとも24アミノ酸、好ましくは少なくとも26アミノ酸、より好ましくは少なくとも28アミノ酸、そして特に好ましい実施形態においては、少なくとも約30以上のアミノ酸のアミノ酸残基のストレッチである。異なるタンパク質の配列またはセグメントは、適切な長さのストレッチにわたって互いに比較され得る。多くの状況において、フラグメントは、インタクトなサブユニットの機能的特性を示し得る。例えば、膜貫通レセプターの細胞外ドメインは、リガンド結合特徴を保持し得、そして可溶性レセプター様複合体を調製するために使用され得る。

【0066】

アミノ酸配列相同性または配列同一性は、残基の適合を最適化することにより決定される。いくつかの比較において、必要であれば、ギャップが導入され得る。例えば、Needlehamら(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoffら(1983) *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*の第1章, Addison-Wesley, Reading, MA; ならびにIntelliGenetics, Mountain View, CA; およびUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WIのソフトウェアパッケージを参照のこと; その各々は、本明細書中に参考として援用される。このギャップを、保存的置換を考慮する場合、適合するように変化させる。保存的置換は、代表的には、以下の群内の置換を含む: グリシン、アラニン; バリン、イソロイシン、ロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸; アスパラギン、グルタミン; セリン、スレオニン; リジン、アルギニン; およびフェニルアラニン、チロシン。相同性アミノ酸配列は、レセプターホモログ配列における天然の対立遺伝子改変体および種間改変体を含むことが意図される。代表的な相同性タンパク質またはペプチドは、表1~3のアミノ酸配列セグメントと50~100%相同性(ギャップが導入され得る場合)、60~100%相同性(保存的置換が含まれる場合)を有する。相同性尺度は、少なくとも約70%、一般には少なくとも76%、より一般的には少なくとも81%、しばしば少なくとも85%、よりしばしば少なくとも88%、代表的には少なくとも90%、より代表的には少なくとも92%、通常少なくとも94%、より通常少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、そして特に好ましい実施形態において、少なくとも98%以上である。相同性の程度は、比較されるセグメントの長さとともに変化する。相同性タンパク質またはペプチド(例えば、対立遺伝子改変体)は、表1~3に記載の実施形態と大部分の生物学的活性を共有する。

【0067】

本明細書中で使用される場合、用語「生物学的活性」は、レセプター様タンパク質による炎症性応答、先天免疫、および/または形態形成発生に対する効果を限定することなく記載するために使用され得る。例えば、これらのレセプターは、ホスファターゼまたはホスホリラーゼ活性を通じたそれらの効果を媒介するようである。これらの活性は、標準的な手順により容易に測定される。例えば、Hardieら(1995編) *The Protein Kinase Fact Book* 第1巻および2巻, Academic Press, San Diego, CA; Hanksら(1991) *Meth. Enzymol.* 200:38-62; Hunterら(1992) *Cell* 70:375-388; Lewin(1990) *Cell* 61:743-752; Pinesら(1991) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56:449-463; およびParkerら(1993) *Nature* 363:736-738を参照のこと。レセプターホモログまたはその部分は、一般的または特異的基質を標識するためにホスフェート標識酵素として有用であり得る。サブユニットはまた、認識抗体を誘発するための機能的免疫原または抗体を結合し得る抗原であり得る。

10

20

30

40

50

【0068】

用語リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト、およびアナログ（例えば、OX2RHの）は、OX2タンパク質の結合に対する特徴的細胞応答を調節する分子、ならびにリガンド-レセプター相互作用（例えば、アンタゴニストがレセプターホモログまたは抗体の可溶性細胞外ドメインである場合）のより標準的な構造的結合競合特徴を有する分子を含む。細胞応答は、代表的には、レセプターチロシンキナーゼ経路を通じて媒介されるようである。

【0069】

また、レセプターホモログは、このリガンドが結合する天然のレセプターもしくはそのアナログのいずれかとして働く分子、または天然のレセプターの機能的アナログである分子であり得る。機能的アナログは、構造的改変を有するレセプター分子であり得るか、または適切なリガンド結合決定基と相互作用する分子形状を有する全く関連しない分子であり得る。このリガンドはアゴニストまたはアンタゴニストとして働き得る。例えば、Goodmanら（1990編）Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, Pergamon Press, New Yorkを参照のこと。

10

【0070】

合理的な薬物設計はまた、レセプターホモログ、抗体または他のエフェクターもしくはレセプターホモログ関連実体の分子形状の構造研究に基づき得る。例えば、Herzら（1997）J. Recept. Signal Transduct. Res. 17: 671-776; およびChaikenら（1996）Trends Biotechnol. 14: 369-375を参照のこと。エフェクターは、リガンド結合に応答して他の機能を媒介する他のタンパク質、またはレセプターホモログと正常に相互作用する他のタンパク質であり得る。どの部位が特定の他のタンパク質と相互作用するかを決定するための1つの手段は、物理的構造決定（例えば、x線結晶学または二次元NMR技術）である。これらは、アミノ酸残基が分子接触領域を形成するような指針を提供する。タンパク質構造決定の詳細な説明については、例えば、BlundellおよびJohnson（1976）Protein Crystallography, Academic Press, New York（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

20

【0071】

（II. 活性）

レセプター様タンパク質は、多くの異なる生物学的活性（例えば、細胞増殖を調節する（すなわち、リン酸代謝において）、特異的基質（代表的には、タンパク質）に付加されるか、あるいは除去される）を有する。このようなレセプター様タンパク質は、一般に、炎症性機能、他の先天免疫応答、または形態形成効果の調節を生じる。レセプターホモログは、記載されるように、おそらくリガンドに対する特異的低親和性結合を有する。

30

【0072】

OX2RH1は、レセプターチロシンキナーゼ経路を通じたレセプターシグナル伝達系を連想させるモチーフを有する。例えば、Ihleら（1997）: Stem Cells 15（補遺1）: 105-111; Silvennoinenら（1997）APMIS 105: 497-509; Levy（1997）Cytokine Growth Factor Review 8: 81-90; WinstonおよびHunter（1996）Current Biol. 6: 668-671; Barrett（1996）Baillieres

40

Clin. Gastroenterol. 10: 1-15; およびBriscoeら（1996）Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 351: 167-171を参照のこと。

【0073】

OX2Rホモログの生物学的活性は、代表的には、特異的様式であるが、ときおり非特異的様式で、基質に対するリン酸部分の付加または除去に関連するようである。基質が同

50

定され得るか、または酵素活性についての条件が標準的方法（例えば、Hardieら（1995編）The Protein Kinase Fact Book 第1巻および2巻，Academic Press，San Diego，CA；Hanksら（1991）Meth. Enzymol. 200：38-62；Hunterら（1992）Cell 70：375-388；Lewin（1990）Cell 61：743-752；Pinesら（1991）Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 56：449-463；およびParkerら（1993）Nature 363：736-738に記載）によりアクセスされ得る。

【0074】

レセプターホモログは、1つ以上の他のタンパク質と組合わさって、機能的複合体を形成し得る（例えば、この複合体は、リガンドを結合するためまたは抗体を調製するために有用であり得る）。これらは、実質的診断用途（検出または定量を含む）を有する。

【0075】

（III. 核酸）

本発明は、単離された核酸またはフラグメントの使用を含む。例えば、このフラグメントは、例えば、対応するポリペプチドをコードするように、これらの関連タンパク質または非常に関連するタンパク質あるいはそのフラグメントをコードする。好ましくは、これらのうちの1つは生物学的に活性である。さらに、本発明は、このようなタンパク質または特徴的配列を有するポリペプチドの（例えば、ホモログの）組合わせをコードする単離されたDNAあるいは組換えDNAを含む。代表的には、核酸は、適切な条件下で表1～3に示される核酸配列セグメントとハイブリダイズし得るが、他の公知のIgスーパーファミリーレセプターの対応するセグメントとはハイブリダイズし得ない。この生物学的に活性なタンパク質またはポリペプチドは、全長タンパク質、またはフラグメントであり得、そして代表的には、非常に相同的な（例えば、表1～3に示された1つに対して有意な同一性のストレッチを示す）アミノ酸配列のセグメントを有する。さらに、本発明は、OX2Rタンパク質に等価なフラグメントを有するタンパク質をコードする単離された核酸または組換え核酸あるいはそのフラグメントの使用を含む。単離された核酸は、5'および3'隣接においてそれぞれの調節配列を有し得る（例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、および天然の遺伝子に由来する他のもの）。

【0076】

単離された核酸分子は、天然にはネイティブな配列に付随する他の成分（例えば、由来している種からのリボソーム、ポリメラーゼ、および隣接ゲノム配列）から分離された、実質的に純粋な核酸（例えば、RNA、DNA、または混合ポリマー）である。この用語は、その天然に存在する環境から取り出された核酸配列を含み、そして組換えDNA単離物、もしくはクローニングされたDNA単離物（これらは、このことにより天然に存在する組成物とは区別可能である）および化学的に合成されたアナログまたは異種系により生物学的に合成されたアナログを含む。実質的に純粋な分子は、完全に純粋または実質的に純粋のいずれかでこの分子の単離された形態を含む。

【0077】

単離された核酸は、一般に均質な組成の分子であり得るが、いくつかの実施形態においては、不均質性（好ましくはわずか）を含む。この不均質性は、代表的にはポリマー末端または所望の生物学的機能もしくは活性に重要ではない部分で見られる。

【0078】

「組換え」核酸は、代表的には、その生成方法またはその構造のいずれかによって規定される。その生成方法に対する言及（例えば、プロセスにより生成された産物）において、このプロセスは、組換え核酸技術（例えば、ヌクレオチド配列におけるヒトの介入を含む）の使用である。

【0079】

代表的には、この介入は、インビトロ操作を包含するが、特定の環境下で、これは、よ

10

20

30

40

50

り古典的な動物育種技術を包含し得る。あるいは、これは、互いに天然には連続していない2つのフラグメントの融合物を含む配列を生成することによって生成された核酸であり得るが、天然の産物（例えば、それらの天然の状態で見出される天然に存在する変異体）を排除することが意味される。従って、例えば、天然には存在しないベクターで細胞を形質転換することにより生成された産物が含まれ、任意の大部分の合成オリゴヌクレオチドプロセスを用いて誘導された配列を含む核酸も同様である。このようなプロセスは、しばしば、コドン、同じかまたは保存的アミノ酸をコードするげっ歯類コドンで置換する一方で、代表的には、制限酵素配列認識部位を導入するか、または除去するために行われる。あるいは、このプロセスは、所望の機能の核酸セグメントを共に連結して、一般には利用可能な天然の形態において見出されない機能の所望の組み合わせを含む（例えば、融合タンパク質をコードする）1つの遺伝的実体を生成するために行われる。制限酵素認識部位は、しばしば、このような人工的操作の標的であるが、他の部位特異的標的（例えば、プロモーター、DNA複製部位、調節配列、制御配列、または他の有用な特徴）は設計に組み込まれ得る。同様の概念は、組換え（例えば融合物）ポリペプチドについて意図される。これは、ダイマー反復を含む。特に、遺伝コード縮重による、OX2レセプターホモログのフラグメントおよび種々の異なる関連分子からの配列（例えば、他のIgスーパーファミリーメンバー）の融合物に等価なポリペプチドをコードする合成核酸が含まれる。

10

【0080】

核酸の状況における「フラグメント」は、少なくとも約17ヌクレオチド、一般には少なくとも21ヌクレオチド、より一般には少なくとも25ヌクレオチド、通常には少なくとも30ヌクレオチド、より通常には少なくとも35ヌクレオチド、しばしば少なくとも39ヌクレオチド、よりしばしば少なくとも45ヌクレオチド、代表的には少なくとも50ヌクレオチド、より代表的には少なくとも55ヌクレオチド、普通には少なくとも60ヌクレオチド、より普通には少なくとも66ヌクレオチド、好ましくは少なくとも72ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも79ヌクレオチドの連続するセグメントであり、そして特に好ましい実施形態においては少なくとも85ヌクレオチド以上の連続するセグメントである。代表的には、異なる遺伝子配列のフラグメントは、適切な長さのストレッチ、以下に記載のドメインのような特に規定されたセグメントにわたり互いに比較され得る。

20

【0081】

OX2Rホモログをコードする核酸は、遺伝子、mRNA、およびcDNA種（これらは、OX2Rホモログ自体、または密接に関連したタンパク質をコードする）、ならびに多型変異体、対立遺伝子変異体または他の遺伝的変異体（例えば、異なる個体または関連種に由来）をコードするDNAを同定するために特に有用である。このようなスクリーニングのための好ましいプローブは、異なる多型変異体の間で保存されているか、または特異性を欠如したヌクレオチドを含むレセプターホモログの領域であり、そして好ましくは、全長またはほぼ全長である。他の状況において、多型変異体特異的配列は、より有用である。定量または特異的配列分析は、疾患または医学的状態についてのマーカーとして、あるいは特定の治療適所値を選択する際に有用であり得る。

30

【0082】

本発明は、本明細書中で記載される単離されたDNAセットに対して同一な核酸配列またはこのセットに対して非常に相同な核酸配列を有する組換え核酸分子およびフラグメントをさらに含む。特に、この配列は、しばしば、転写、翻訳および/またはDNA複製を制御するDNAセグメントに作動可能に連結される。これらのさらなるセグメントは、代表的には、所望の核酸セグメントの発現を補助する。

40

【0083】

相同な、または高度に同一性の核酸配列（例えば、OX2RH配列）は、互いに比較される場合、有意な類似性を示す。核酸における相同性についての標準は、配列比較により当該分野で一般に使用される相同性についての尺度、またはハイブリダイゼーション条件に基づくかのいずれかである。匹敵するハイブリダイゼーション条件は、以下により詳細

50

に記載される。

【0084】

核酸配列比較関係における実質的な同一性は、比較すると、適切なヌクレオチド挿入または欠失を有して必要に応じて整列される場合、セグメントまたはそれらの相補鎖が、少なくとも約60%のヌクレオチド、一般には少なくとも66%、通常少なくとも71%、多くの場合少なくとも76%、より多くの場合80%、大抵84%、より大抵88%、典型的には91%、より典型的には少なくとも約93%、好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96~98%以上、そして特定の実施形態では約99%以上程度のヌクレオチド（例えば、以下に記載されるセグメントのような構造ドメインをコードするセグメントが挙げられる）であることのいずれかを意味する。あるいは、典型的には表1~3から導かれる配列を使用して、このセグメントが選択的なストリンジェントな条件下で鎖またはその相補鎖にハイブリダイズする場合、実質的な同一性が存在する。典型的には、選択的なハイブリダイゼーションは、少なくとも約14ヌクレオチドの伸長にわたる少なくとも約55%の相同性、より典型的には少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約75%、そしてより好ましくは少なくとも約90%である場合に生じる。Kanehisa(1984) *Nucl. Acids Res.* 12: 203-213（これは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。記載されるように、相同性比較の長さは、より長い伸長を超え得、そして特定の実施形態では、少なくとも約17ヌクレオチド、一般には少なくとも約20ヌクレオチド、通常少なくとも約24ヌクレオチド、大抵少なくとも約28ヌクレオチド、典型的には少なくとも約32ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約40ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約50ヌクレオチドそしてより好ましくは少なくとも約75~100以上のヌクレオチドの伸長を超える。これは、例えば、125、150、175、200、225、246、273、300、325、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900および他の長さを含む。

10

20

【0085】

ストリンジェントな条件は、ハイブリダイゼーションの関係における相同性に関して、塩、温度、有機溶媒およびハイブリダイゼーション反応において典型的に制御される他のパラメーターの、ストリンジェントな組み合わせ条件である。ストリンジェントな温度条件は、大抵約30を超え、より大抵は約37を超え、典型的には約45を超え、より典型的には約50を超え（例えば、55または60）、好ましくは約65を超え、そしてより好ましくは約70を超える温度を含む。ストリンジェントな塩条件は、通常約1M未満、より通常は約500mM未満、大抵約400mM未満、より大抵は約300mM未満、典型的には約200mM未満、好ましくは約100mM未満、そしてより好ましくは、約80mM未満（例えば、50mM未満、約20mM未満にもなお下がる）である。しかし、パラメーターの組み合わせは、任意の1つのパラメーターの測定よりも非常に重要である。例えば、WetmurおよびDavidson(1968) *J. Mol. Biol.* 31: 349-370（これは本明細書中で参考として本明細書により援用される）を参照のこと。

30

【0086】

単離されたDNAは、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入およびヌクレオチド伸長の逆転により容易に改変され得る。これらの改変は、一般には、このタンパク質またはその誘導体をコードする新規DNA配列を生じる。これらの改変された配列は、変異体タンパク質（ムテイン）を産生するため、または変種の発現を増強するために使用され得る。タンパク質またはそのフラグメントの所定の変異または部位特異的変異を含むこのような変異体OX2Rホモログ誘導体としては、遺伝コードの縮重を使用するサイレントな変異体が挙げられる。本明細書中で使用される場合、「変異体OX2レセプターホモログ」は、上記のようなOX2レセプターホモログの定義とは別に分類されるポリペプチドを意図するが、欠失、置換または挿入の様式に関わらず、天然に見出されるような他のIgスーパーファミリーのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する。特に

40

50

「部位特異的変異体 O X 2 レセプターホモログ」は、表 1 ~ 3 のタンパク質との実質的な配列同一性を有するタンパク質を意図し、そして典型的には、本明細書中で開示される形態の生物学的活性または生物学的効果（例えば、免疫原性）のいくつかまたはそのほとんどを共有する。

【0087】

部位特異的変異部位は、予め決定されるが、変異が部位特異的である必要はない。哺乳動物 O X 2 レセプターホモログ変異誘発は、発現と合わされた、遺伝子におけるアミノ酸挿入または欠失を作製することにより達成され得る。置換、欠失、挿入または多くの組み合わせが生成され得、最終構築物に達し得る。挿入は、アミノ末端融合またはカルボキシ末端融合を含む。次いで、無作為な変異誘発は、標的コドンにおいて誘導され得、そして発現された哺乳動物 O X 2 R H 変異体は、次いで所望の活性についてスクリーニングされ得、構造 - 活性の関係のいくつかの局面を提供し得る。既知の配列を有する DNA における所定の部位において置換変異を作製するための方法（例えば、M 1 3 一次変異原性による）は、当該分野で周知である。Sambrookら（1989）および Ausubelら（1987 および定期的な補遺）をも参照のこと。

10

【0088】

DNA における変異は、正常には、リーディングフレームの外のコード配列に位置すべきではなく、そして好ましくは、ハイブリダイズしてループまたはヘアピンのような二次的な mRNA 構造を作製する相補領域を作成しない。

【0089】

ホスホラミダイト法（Beaucage および Carruthers（1981）Tetra. Letts. 22: 1859 - 1862 により記載される）は、適切な合成 DNA フラグメントを作製する。二本鎖フラグメントは、しばしば、相補鎖を合成しそして適切な条件下で一緒に鎖をアニーリングすることによるか、または適切なプライマー配列と共に DNA ポリメラーゼを使用して相補鎖を添加することのいずれかにより得られる。

20

【0090】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術は、しばしば、変異誘発において適用され得る。あるいは、変異誘発プライマーは、所定の部位において規定された変異を生成するための方法に通常使用される。例えば、Innisら（1990, 編）PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA; ならびに Dieffenbach および Dveksler（1995; 編）PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, CSH, NY. を参照のこと。

30

【0091】

本発明の特定の実施形態は、記載されるレセプターホモログまたはリガンド配列を含む組み合わせ化合物に関する。他の実施形態では、配列の機能部分は、融合タンパク質をコードするように接続され得る。他の形態では、記載する配列の変異体が、置換され得る。

【0092】

（IV. タンパク質、ペプチド）

上記のように、本発明は、哺乳動物 O X 2 R H ポリペプチド（例えば、その配列は、表 1 ~ 3 に開示されかつ上に記載される）を含む。対立遺伝子変異体および他の改変体ポリペプチドもまた意図され、これらとしては、例えば、他の配列（例えば、エピトープタグ、機能ドメインおよび DAP 1 2 または DAP 1 0 の配列を含む配列）を有するこのような配列の部分と結合される、融合タンパク質が挙げられる。

40

【0093】

本発明はまた、組換えタンパク質（例えば、これらの霊長類またはげっ歯類のタンパク質由来のセグメントを使用する異種融合タンパク質）を提供する。異種融合タンパク質は、天然においては同じ様式では正常に融合しないタンパク質またはセグメントの融合物である。従って、2つの O X 2 R H の融合産物は、代表的なペプチド連結において融合され

50

る配列を有する連続するタンパク質分子であり、代表的には、単一の翻訳産物として作成され、そして特性（例えば、各供給源ペプチドに由来する配列または抗原性）を示す。同様の概念が異種核酸配列に適用される。種々の、複合体へと設計されたタンパク質の組み合わせもまた提供され得る。

【0094】

さらに、新規の構築物は、他の関連するタンパク質（例えば、種の改変体を含むレセプターを含む他のITIM、ITAM、またはYxxMモチーフ）由来の同様の機能または構造ドメインを組み合わせることから作製され得る。例えば、リガンド結合セグメントまたは他のセグメントは、異なる新規の融合ポリペプチドまたはフラグメントの間で「交換（swapped）」され得る。例えば、Cunninghamら（1989）*Science* 243:1330-1336；およびO'Downら（1988）*J. Biol. Chem.* 263:15985-15992（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。従って、特異性の新規の組み合わせを示す新規のキメラポリペプチドは、レセプター-結合特異性の機能的連結から生じ得る。例えば、他の関連するレセプターホモログ分子由来のリガンド結合ドメインは、このタンパク質または関連するタンパク質のほかのドメインについて付加されてもよいしまたは置換されてもよい。得られるタンパク質は、しばしばハイブリッド機能および特性を有する。例えば、融合タンパク質は、標的ドメインを含み得、このドメインは、特定の細胞下のオルガネラに融合タンパク質の隔絶を提供するように機能し得る。

10

【0095】

候補融合パートナーおよび配列は、種々の配列データベース（例えば、GeneBank, c/o IntelliGenetics, Mountain View, CA；およびBCG, University of Wisconsin Biothchnology Computing Group, Madison, WI（これらは、各々、本明細書中で参考として援用される））から選択され得る。特に、表1~3において提供されるポリペプチド配列の組み合わせは、特に好ましい。特性の種々の形態は、記載される組み合わせにおいて置換され得る。

20

【0096】

本発明は、特にムテインを提供する。このムテインは、OX2様リガンドに結合し、そして/またはシグナル伝達に影響する。OX2レセプターホモログファミリーの種々のメンバーの構造アラインメントは、保存された特色/残基を示す。例えば、表5を参照のこと。OX2Rホモログ配列のアラインメントは、種々の構造の特色および機能的に共有された特色を示す。Bazanら（1996）*Nature* 379:591；Lodiら（1994）*Science* 263:1762-1766；SayleおよびMilner-White（1995）*TIBS* 20:374-376；ならびにGronenbergら（1991）*Protein Engineering* 4:263-269もまた参照のこと。

30

【0097】

マウス配列またはヒト配列を伴う置換が特に好ましい。逆に、リガンド結合相互作用領域から離れた保存的置換は、恐らくほとんどのシグナル伝達活性を保存し；そして細胞内ドメインから離れた保存的置換は、恐らくほとんどのリガンド結合特性を保存する。

40

【0098】

哺乳動物OX2RHの「誘導体」としては、アミノ酸配列変異体、グリコシル化改変体、代謝誘導体および他の化学部分との共有結合体または凝集接合体が挙げられる。共有結合誘導体は、例えば、当該分野で周知の手段により、OX2RHアミノ酸側鎖かまたはN末端もしくはC末端において見出される基への官能基の連結により調製され得る。これらの誘導体は、限定することなく、脂肪族エステルまたはカルボキシル末端のアミドもしくはカルボキシル側鎖を含む残基のアミド、水酸基含有残基のO-アシル誘導体、ならびにアミノ末端のアミノ酸またはアミノ基含有残基（例えば、リジンまたはアルギニン）のN-アシル誘導体が挙げられる。アシル基は、C3~C18の通常のアルキルを含むアルキ

50

ル部分の基から選択され、これによりアルカノイルアロイル種を形成する。

【0099】

特に、グリコシル化変更が含まれ、例えば、その合成およびプロセッシングの間、またはさらなるプロセッシング工程においてポリペプチドのグリコシル化パターンを改変することにより為される。このことを達成するための特に好ましい手段は、このようなプロセッシングを正常に提供する細胞由来のグリコシル化酵素（例えば、哺乳動物グリコシル化酵素）にポリペプチドを曝すことによる。脱グリコシル化酵素もまた、意図される。同じ初期のアミノ酸配列のバージョンもまた含まれる。このアミノ酸配列は、他の少数の改変（リン酸化アミノ酸残基（例えば、リン酸チロシン、リン酸セリンまたはリン酸スレオニン）が挙げられる）を有する。

10

【0100】

誘導体の主な群は、レセプターホモログまたはポリペプチドの他のタンパク質を有するそれらのフラグメントの共有結合接合体である。これらの誘導体は、N末端融合またはC末端融合のような組換え培養物中または当該分野で公知の薬剤（反応性側鎖を介する架橋タンパク質におけるそれらの有用性のために）の使用により合成され得る。架橋剤との好ましい誘導体部位は、遊離アミノ基、炭化水素部分およびシステイン残基に存在する。

【0101】

レセプターホモログと他のホモログまたは同種タンパク質との間の融合ポリペプチドもまた提供される。同種ポリペプチドは、異なるレセプター間で融合され得、例えば、複数の異なるOX2関連リガンドについての結合特異性を示すハイブリッドタンパク質または基質効果の幅広化されたか弱められた特異性を有し得るレセプターを生じ得る。同様に、異種融合物が構築され得、これは、誘導体タンパク質の特性または活性の組み合わせを示す。典型的な例は、レセプターポリペプチドの融合（例えば、レセプターのセグメントまたはドメイン（例えば、リガンド結合セグメント）を有するルシフェラーゼ）であり、その結果、所望のリガンドの存在または位置が容易に決定され得る。例えば、Dullら、米国特許代4,859,609号を参照のこと（これは本明細書により参考として本明細書中で援用される）。他の遺伝子融合パートナーとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GTS）、細菌性 - ガラクトシダーゼ、trpE、プロテインA、 - ラクタマーゼ、アミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよび酵母 接合因子が挙げられる。例えば、Godowskiら（1988）Science 241:812-816を参照のこと。標識タンパク質はしばしば、タンパク質の記載される組み合わせにおいて置換される。

20

30

【0102】

BeaucageおよびCarruthers（1981）Tetra. Letts. 22:1859-1862により記載されるホスホロアミダイド方法は、適切な合成DNAフラグメントを生成する。二本鎖フラグメントは、しばしば、相補鎖を合成しそして適切な条件下で鎖と一緒にアニリングするか、または適切なプライマー配列を有するDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を添加するかのいずれかにより得られる。

【0103】

このようなポリペプチドはまた、リン酸化、硫酸化、ビオチン化、または他の部分の付加もしくは除去により化学的に改変されたアミノ酸残基（特に、リン酸基に類似する分子の形を有する部分を有するアミノ酸残基）を有し得る。いくつかの実施形態では、この改変は、有用な常識試薬であるか、または精製標的（例えば、アフィニティリガンド）として機能する。

40

【0104】

融合タンパク質は、典型的には組換え核酸法かまたは合成ポリペプチド法のいずれかにより作成され得る。核酸操作および発現のための技術は、一般的には例えば、Sambrookら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）第1～3巻、Cold Spring Harbor LaboratoryおよびAusubelら（1987編、および定期的な補遺）Curre

50

nt Protocols in Molecular Biology, Greene / Wiley, New York (これらは、各々、本明細書中で参考として援用される)に記載される。ポリペプチドの合成のための技術は、例えば、Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149 - 2156; Merrifield (1986) Science 232: 341 - 347; および Athertonら (1989) Solid Phase Peptide Syntheses: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (これらは、本明細書中で参考として援用される)に記載される。より大きいポリペプチドを作成するための方法については、Dawsonら (1994) Science 266: 776 - 779もまた参照のこと。

10

【0105】

本発明はまた、アミノ酸配列における改変またはグリコシル化ではなく、OX2RHの誘導体の使用を意図する。このような誘導体は、化学部分との共有結合的な会合または凝集会合を含み得る。これらの誘導体は、一般に以下の3つのクラスに分類される；(1)塩、(2)側鎖および末端残基の共有結合改変体、ならびに(3)吸着複合体(例えば、細胞膜との吸着複合体)。このような共有結合誘導体または凝集誘導体は、免疫原として、免疫アッセイにける試薬としてまたは免疫アッセイまたは精製方法(例えば、レセプターまたは他の結合分子(例えば、抗体)のアフィニティー精製)において有用である。例えば、OX2リガンドは、OX2RH、抗体または他の類似の分子のアッセイまたは精製における使用のために、当該分野で周知の方法により、固体支持体(例えば、臭化シアン活性化セファロス)に共有結合により固定され得るか、またはポリオレフィン表面上にグルタルアルデヒド架橋を伴ってかまたは伴わずに吸着され得る。リガンドはまた、診断アッセイにおける使用のために、検出可能な基(例えば、クロラミンT手順により放射性標識された基、希土類キレートに共有結合された基、または他の蛍光部分と結合体化された基)で標識され得る。

20

【0106】

本発明の組み合わせ(例えば、OX2RHが挙げられる)は、例えば、他のOX2レセプターホモログ間を識別し得る抗血清または抗体特異性の産生のための免疫原としてか、または所望の組み合わせ特異性についての免疫原として使用され得る。このOX2RHを使用して、タンパク質を含む種々の形態の不純な調製物での免疫により調製されるモノクローナル抗体または抗原結合フラグメントをスクリーニングし得る。特に、用語「抗体」はまた、天然の抗体のフラグメント(例えば、Fab、Fab2、Fvなど)に結合する抗原を意図する。精製されたOX2RHはまた、内在性レセプターホモログに対する抗体の産生を生じる上昇したレベルの発現または免疫学的障害の存在に対する応答において生成する抗体を検出する試薬として使用され得る。さらに、OX2RHフラグメントはまた、直下に記載されるように本発明の抗体を産生するための免疫原として機能し、。例えば、本発明は、表1~3において示されるアミノ酸配列、それらのフラグメントまたは種々の相同ペプチドもしくはサブセットに対する結合親和性を有する抗体、あるいはそれらに対して誘起された抗体を意図する。特に、本発明は、特定のフラグメントに対する結合親和性を有するか、または特定のフラグメントに対して誘起された抗体を意図し、この特定のフラグメントは、ネイティブなOX2RHのタンパク質の外側表面において曝されたことが推定されるか、実際に曝される。タンパク質の組み合わせの複合体はまた有用であり、そしてそれらに対する抗体調製物が作成され得る。

30

40

【0107】

レセプターリガンドに対する生理学的応答のブロックは、恐らくは競合阻害を介してか、または多分、抗体結合に起因するレセプター発現の下方制御を介して、レセプターへのリガンドの結合の阻害から生じ得る。従って、本発明のインビトロアッセイは、しばしば、これらの抗体もしくはこれらの抗体の抗原結合セグメントまたは固相基質に付着されたフラグメントを使用する。これらのアッセイはまた、リガンド結合領域の変異および改変、または他の変異および改変(例えば、シグナル伝達もしくは酵素機能に影響する変

50

異および改変)のいずれかの効果の診断的決定を可能にする。

【0108】

本発明はまた、競合的薬物スクリーニングアッセイ(例えば、リガンドまたは他の抗体への結合について、試験化合物と競合するレセプター複合体またはフラグメントに対する抗体を中和するアッセイ)の使用を意図する。この様式で、中和抗体またはフラグメントを使用して、レセプターに対する1以上の結合部位を共有するポリペプチドの存在を検出し得る。そしてまたこれを使用して、リガンドとそれ以外に結合し得るレセプター上の結合部位を占有する。

【0109】

(V. 核酸およびタンパク質の作製)

タンパク質コードするDNAまたはそのフラグメントは、化学合成、cDNAライブラリーのスクリーニング、または幅広い種々の細胞株または組織サンプルから調製されるゲノムライブラリーのスクリーニングによって得られ得る。天然の配列は、標準的な方法を使用して単離され得、そしてその配列は、本明細書中において、例えば、表1~3に提供され得る。逆翻訳配列は、表4に提供される。他の種の対の部分は、ハイブリダイゼーション技術、または種々のPCR技術によって、配列データベース(例えば、GenBank)と組み合わせて、またはこれらのデータベースから探すことによって同定され得る。抗体は、種の対応部分に対する発現クローニングの試みにおいて使用され得る。

【0110】

このDNAは、全長レセプターまたはフラグメント(これは、例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を生成するために使用され得る)の合成のため;結合研究のため;改変リガンド結合ドメインまたはキナーゼ/ホスファターゼドメインの構築および発現のため;および構造/機能研究のために幅広い種々の宿主細胞において発現され得る。改変体またはフラグメントは、適切な発現ベクターを用いて形質転換されるかまたはトランスフェクトされる宿主細胞において発現され得る。これらの分子は、タンパク質または細胞性混入物、組換え宿主から誘導されるもの以外のものを実質的に含み得ず、従って、薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤と組み合わせた場合、薬学的組成物において特に有用である。タンパク質、またはその部分は、他のタンパク質の融合物として発現され得る。記載のタンパク質、またはそれらをコードする核酸の組み合わせは、特に興味深い。

【0111】

発現ベクターは、典型的には、所望のレセプターホモログ遺伝子またはそのフラグメントを含む自己複製DNAまたはRNA構築物であり、通常、適切な宿主細胞において認識される適切な遺伝子制御エレメントに作動可能に連結される。これらの制御エレメントは、適切な宿主内で発現を行い得る。複数の遺伝子が協調的に発現され得、ポリシストロニックメッセージ上に存在し得る。発現を行うのに必要な特定のタイプの制御エレメントは、使用される最終的な宿主細胞に依存する。一般的に、遺伝子制御エレメントは、原核生物プロモーター系または真核生物プロモーター発現制御系を含み得、典型的には、転写プロモーター、転写の開始を制御するための任意のオペレータ、mRNA発現のレベルを高めるための転写エンハンサー、適切なりボソーム結合部位をコードする配列、および転写および翻訳を終結する配列を含む。発現ベクターはまた、通常、複製起点を含み、この複製起点によってベクターが宿主細胞に独立して複製し得る。

【0112】

本発明のベクターは、上記のようなタンパク質の組み合わせ、または生物学的に活性化等価なポリペプチドをコードするDNAを含むベクターである。DNAは、ウイルスプロモーターの制御下であり得、選択マーカーをコードし得る。本発明は、さらに原核生物宿主または真核生物宿主においてこのようなタンパク質をコードする原核生物cDNAを発現し得るような発現ベクターの使用を意図し、ここで、このベクターは、宿主と適合性であり、そして真核生物cDNAは、ベクターを含む宿主の増殖が問題のcDNAを発現するようにベクターに挿入される。通常、発現ベクターは、それらの宿主細胞における安定

10

20

30

40

50

な複製のため、または細胞当たりの所望の遺伝子の総コピー数を大きく増加させるための増幅のために設計される。発現ベクターが宿主細胞において複製されることは、必ずしも必要ではない。例えば、宿主細胞によって認識される複製起点を含まないベクターを使用して種々の宿主においてタンパク質またはそのフラグメントの一過性発現を行うことが可能である。タンパク質をコードするタンパク質を宿主DNAに組換えによって組み込ませるベクターを使用することもまた可能である。

【0113】

ベクターは、本明細書で使用される場合、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組込み可能DNAフラグメント、およびDNAフラグメントを宿主のゲノムに組み込み得る他のビヒクルを含む。発現ベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を行う遺伝子制御エレメントを含む特殊化されたベクターである。プラスミドは、最も通常使用される形態のベクターであるが、等価な機能に役立ち、当該分野において公知であるか、公知になる他の形態のベクターの全てが本明細書中での使用に適切である。例えば、Powellsら、(1985 and Supplements) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., および Rodriguezら、(編、1988) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Bostonを参照のこと。これらは本明細書中において参考として援用される。

10

【0114】

形質転換された細胞は、組換えDNA技術を使用して構築されたベクターを用いて形質転換されたかまたはトランスフェクトされた細胞(好ましくは、哺乳動物)である。形質転換された宿主細胞は、通常、所望のタンパク質を発現するが、そのDNAをクローニング、増幅、および操作するために、対象のタンパク質を発現する必要はない。本発明は、さらに、形質転換された細胞を栄養性培地において培養する工程、従って、タンパク質を蓄積させる工程を包含する。タンパク質は、培養物から、または特定の場合には、培養培地からのいずれかから回収され得る。

20

【0115】

本発明の目的のために、核酸配列は、それらが互いに機能的に関連する場合、作動可能に連結する。例えば、プレシーケンス(presence)または分泌リーダーに対するDNAは、ポリペプチドを細胞膜に指向させる際またはポリペプチドの分泌の際に、プレタンパク質として発現されるかまたは関与する場合、ポリペプチドに作動可能に連結される。プロモーターは、ポリペプチドの転写を制御する場合、コード配列に作動可能に連結され; リボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように位置付けられる場合、コード配列に作動可能に連結される。通常、作動可能に連結されるとは、連続し、リーディングフレーム内にあることを意味するが、抑制遺伝子のような特定の遺伝子エレメントは、連続的に連結されないが、オペレータ配列に結合し、次いで、これは発現を制御する。適切な宿主細胞には、原核生物細胞、下等真核生物細胞、および高等真核生物細胞が挙げられる。原核生物には、グラム陰性生物およびグラム陽性生物の両方、例えば、E. coli. および B. subtilis が挙げられる。下等真核生物には、酵母(例えば、S. cerevisiae および P. pinchiae) ならびに Dictyostelium 属の種が挙げられる。高等真核生物には、非哺乳動物起源(例えば、昆虫細胞、および鳥類)と哺乳動物起源(例えば、ヒト、霊長類、およびげっ歯類)との両方の動物細胞由来の、樹立組織培養細胞株が挙げられる。

30

40

【0116】

原核生物宿主-ベクター系は、多くの異なる種に対する幅広い種々のベクターを含む。E. coli およびそのベクターが記載されるが、等価なベクターおよび宿主が、一般的に置換され得る。DNAを増幅するための代表的なベクターは、pBR322またはその誘導体の多くである。レセプターホモログまたはそのフラグメントを発現するために使用され得るベクターには、以下が挙げられるがこれらに限定されない: lacプロモーター

50

(pUCシリーズ); trpプロモーター(pBR322-trp); Ippプロモーター(pINシリーズ); -pPまたはpRプロモーター(pOTS); またはptac(pDR540)のようなハイブリッドプロモーターを含むようなベクター。Brosiusら、(1998)「Expression Vectors Employing Lambda-、trp-、lac-、and Ipp-derived Promoters」、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses (編、RodriguezおよびDenhardt)、Butterworth, Boston, Chapter 10、205-236頁を参照のこと。これは、本明細書中に参考として援用される。

【0117】

下等真核生物(例えば、酵母およびDictyostelium)は、ベクターを含むOX2RH配列によって形質転換され得る。最も一般的な下等真核生物は、パン酵母、Saccharomyces cerevisiaeである。多くの他の菌株および種がまた利用可能であるが、これは、下等真核生物を例示するために使用される。酵母ベクターは、典型的に、複製起源(組込み型でない場合)、選択遺伝子、プロモーター、レセプターホモログまたはそのフラグメントをコードするDNA、ならびに翻訳終結、ポリアデニル化および転写終結のための配列からなる。酵母についての適切な発現ベクターには、3-ホスホグリセレートキナーゼのような構成性プロモーター、および種々の他の解糖酵素遺伝子プロモーターまたはアルコールデヒドロゲナーゼ2プロモーターまたはメタロチオネイン(metallothionein)プロモーターのような誘導性プロモーターが挙げられる。適切なベクターには、以下のタイプの誘導体が挙げられる: 自己複製低コピー数(例えば、YRpシリーズ)、自己複製高コピー数(例えば、YEpシリーズ); 組込みタイプ(例えば、YIpシリーズ)またはミニ染色体(例えば、Y Cpシリーズ)。

【0118】

高等真核組織培養細胞は、通常、機能的に活性なOX2RHタンパク質の発現について好ましい宿主細胞である。特に、多くの高等真核生物組織培養細胞株(例えば、昆虫バキュロウイルス発現系)は、無脊椎供給源が脊椎動物供給源に関わらず、操作可能である。しかし、哺乳動物細胞が好ましい。このような細胞の形質転換またはトランスフェクションおよび増殖は、慣用的な手順である。有用な細胞株の例には、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、乳児ラット腎臓(BRK)細胞株、昆虫細胞株、トリ細胞株、およびサル(COS)細胞株が挙げられる。このような細胞株についての発現ベクターは、通常、複製起源、プロモーター、翻訳開始部位、RNAスプライス部位(ゲノムDNAが使用される場合)、ポリアデニル化部位、および転写終結部位が挙げられる。これらのベクターはまた、通常、選択遺伝子または増幅遺伝子を含む。適切な発現ベクターは、例えば、アデノウイルス、SV40、パルボウイルス、ワクシニア、ウイルス、またはサイトメガロウイルスからのような供給源から誘導されるプロモーターを保有するプラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスであり得る。適切な発現ベクターの代表的な例としては、pCDNA1; pCD(Okayamaら、(1985)Mol. Cell Biol. 5: 1136-1142; pMC1neo PolyA(Thomasら、(1987)Cell 51: 503-512; およびpAC373またはpAC610のようなバキュロウイルスベクターが挙げられる。

【0119】

分泌されたタンパク質およびいくつかの膜タンパク質について、オープンリーディングフレームは、通常、そのN末端において単一のペプチドに共有結合的に連結される成熟産物または分泌産物からなるポリペプチドをコードする。シグナルペプチドは、成熟、または活性なポリペプチドの分泌の前に切断される。切断部位は、経験則から高い程度の正確性をもって予測され得る。例えば、von-Heijne(1986)Nucleic Acids Research 14: 4683-4690、およびNielsenら、(1997)Protein Eng. 10: 1-12。単一のペプチドの正確なアミノ酸組成は、しばしば、その機能に対して決定的であるようではない。例えば、Randa

10

20

30

40

50

11ら、(1989) *Science* 243: 1156 - 1159; Kaiserら、(1987) *Science* 235: 312 - 317。本発明の成熟タンパク質は、標準的な方法を使用して容易に決定され得る。

【0120】

特定または規定のグリコシル化パターンを提供する系においてこれらのペプチドを発現することが、しばしば望ましい。この場合、通常のパターンは、発現系によって天然に提供されるパターンである。しかし、このパターンは、ポリペプチド(例えば、グリコシル化されていない形態)を、異種発現系に導入された適切なグリコシル化タンパク質に曝露することによって改変可能である。例えば、OX2RH遺伝子は、哺乳動物または他のグリコシル化酵素をコードする1つ以上の遺伝子を用いて同時形質転換され得る。このアプローチを使用して、特定の哺乳動物グリコシル化パターンが、原核生物細胞または他の細胞において達成可能である。原核生物細胞における発現は、典型的に、タンパク質の非グリコシル化形態を導く。

10

【0121】

OX2RHの供給源は、例えば上記のように、組換えポリペプチドを発現する原核生物宿主または真核生物宿主であり得る。供給源はまた、細胞株であり得るが、他の哺乳動物細胞株もまた、本発明に意図され、好ましい細胞株はヒト由来である。

【0122】

配列が公知である以上は、霊長類OX2RH、そのフラグメント、または誘導体は、ペプチドを合成するための従来のプロセスによって調製され得る。これらには、StewartおよびYoung(1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; BodanszkyおよびBodanszky(1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; およびBodanszky(1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New Yorkに記載されるようなプロセスが挙げられる。それぞれは全て本明細書中において参考として援用される。例えば、アジドプロセス、酸塩化物プロセス、酸無水物プロセス、混合無水物プロセス、活性エステルプロセス(例えば、p-ニトロフェニルエステル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、またはシアノメチルエステル)、カルボジイミダゾールプロセス、酸化-還元プロセス、またはジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCD)/添加物プロセスが使用され得る。固相合成および液相合成は、ともに、前記プロセスに適用可能である。同様な技術は、部分的なOX2RH配列とともに使用され得る。

20

30

【0123】

OX2RHタンパク質、フラグメントまたは誘導体は、典型的にはペプチド合成に使用されるような上記プロセスに従って適切に調製され、一般的には、いわゆる逐次プロセス(アミノ酸を末端アミノ酸に1つずつ順に縮合する工程を包含する)によってか、または末端アミノ酸にペプチドフラグメントを結合することによるかのいずれかによる。カップリング反応に使用されないアミノ基は、典型的に、間違った位置でのカップリング反応を防ぐように保護されなければならない。

40

【0124】

固相合成が適合する場合、C末端アミノ酸は、そのカルボキシル基を介して不溶性のキャリアまたは支持体に結合される。不溶性のキャリアは、反応性カルボキシル基に結合する能力を有するべきであり、例えば、ハロメチル樹脂(例えば、クロロメチル樹脂またはプロモメチル樹脂)、ヒドロキシメチル樹脂、フェノール樹脂、tert-アルキルオキシカルボニルヒドラジデート樹脂などである。

【0125】

アミノ基保護アミノ酸は、ペプチドを逐次的に合成するために、その活性化されたカルボキシル基および以前に形成されたペプチドまたは鎖の反応性アミノ基の縮合によって、順に結合する。完全な配列を合成した後に、ペプチドは、ペプチドを作製するために不溶

50

性キャリアから分離される。この固相アプローチは、一般的に、Merrifieldら、(1963)、J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2156によって記載され、これは本明細書中において参考として援用される。

【0126】

調製されたタンパク質およびそのフラグメントは、例えば、抽出、沈澱、電気泳動、種々の形態のクロマトグラフィーなどによって、ペプチド分離によって反応混合物から単離および精製され得る。本発明のレセプターアナログは、所望の用途に依存して種々の程度の純度で得られ得る。精製は、標準的なタンパク質精製技術または本明細書中で免疫吸収剤アフィニティークロマトグラフィー方法で記載される抗体を使用して達成され得る。典型的には、アフィニティークロマトグラフィーは、最初に抗体を固体支持体に連結し、次いで、連結された抗体を、適切な細胞の可溶化された溶解物、OX2RHを発現する他の細胞の溶解物、あるいはDNA技術の結果としてタンパク質を産生する細胞の溶解物または上清（以下を参照のこと）と接触させることによって、実施され得る。

10

【0127】

一般的に、精製されたタンパク質は、少なくとも40%純粋、普通少なくとも約50%純粋、通常少なくとも約60%純粋、典型的には少なくとも70%純粋、より典型的には少なくとも約80%純粋、好ましくは少なくとも90%純粋、そしてより好ましくは少なくとも95%純粋、そして特定の実施形態においては、97% - 99%またはそれ以上である。純度は、通常、重量基準であるが、モル基準でもあってもよい。異なるアッセイは、適切に適用される。個々のタンパク質は、精製され得、その後合わせられ得る。

20

【0128】

(VI. 抗体)

抗体は、種々の哺乳動物（例えば霊長類）において、OX2RHタンパク質およびそのフラグメントを、天然のネイティブな形態とそれらの変性した形態の両方で惹起され得る。ネイティブなOX2RHに対して惹起された抗体は、ネイティブなコンフォメーションでのみ存在するエピトープを認識する傾向が強い。変性された抗原検出はまた、例えば、ウェスタン分析において有用であり得る。抗イディオタイプ抗体がまた意図され、これは、例えば、診断試薬として有用である。

【0129】

タンパク質の所定のフラグメントに対する抗体（結合フラグメントおよび一本の鎖の場合を含む）は、免疫原タンパク質とフラグメントの結合体を用いて動物を免疫することによって惹起され得る。モノクローナル抗体は、所望の抗体を分泌する細胞から調製される。これらの抗体は、正常または欠損したタンパク質に結合するためにスクリーニングされ得るか、またはアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性についてスクリーニングされ得る。これらのモノクローナル抗体は、通常、少なくとも約1 mM、より通常では少なくとも約300 μ M、典型的には少なくとも約100 μ M、より典型的には少なくとも約30 μ M、好ましくは少なくとも約10 μ M、そしてより好ましくは少なくとも約3 μ Mまたはそれより良い K_D で結合する。

30

【0130】

本発明の抗体（抗原結合フラグメントを含む）は、有意な診断的または治療的価値を有し得る。これらは、レセプターホモログに結合する強力なアンタゴニストであり得、リガンドに対する結合を阻害し得るかまたは生物学的応答を誘発するレセプターホモログの能力を阻害し得る（例えば、その基質に作用する）。これらはまた、非中和抗体として有用であり得、そしてOX2RH産生細胞に結合するために毒素または放射性核種に結合され得る。さらに、これらの抗体は、例えば、直接的または間接的（例えば、リンカーによって）のいずれかで、薬物または他の治療剤に結合し得る。

40

【0131】

本発明の抗体はまた、診断的用途に有用であり得る。捕捉または非中和抗体として、これらは、リガンドまたは基質結合を阻害することなく、OX2RHに結合し得る。抗体を中和する場合、これらは、競合結合アッセイにおいて有用であり得る。これらはまた、リ

50

ガンドを検出または定量する際に有用である。これらは、ウェスタンブロット分析、あるいは免疫沈降またはそれぞれのタンパク質の免疫精製のための試薬として使用され得る。同様に、核酸およびタンパク質は、アフィニティー精製または検出方法のために固体基板に固定化され得る。この基板は、例えば、固体樹脂ビーズ、プラスチックのシート、または誘導体ガラスであり得る。

【0132】

タンパク質フラグメントは、他の物質、特にポリペプチドに融合ポリペプチドまたは共有結合ポリペプチドとして結合され得、免疫原として使用される。哺乳動物OX2RHポリペプチドおよびフラグメントは、種々の免疫原、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin)、ウシ血清アルブミン、破傷風トキソイドなどのような種々の免疫原に融合または共有結合され得る。Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper および Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; ならびに Williamsら、(1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 1, Academic Press, New Yorkを参照のこと。これらのそれぞれは、本明細書中に参考として援用される。典型的な方法は、抗原を用いる動物の超免疫化を含む。次いで、動物の血液は、繰り返される免疫化のすぐ後に回収され、血清またはガンマグロブリンが単離される。

10

20

【0133】

いくつかの場合において、マウス、げっ歯類、霊長類、ヒトなどのような種々の哺乳動物宿主からモノクローナル抗体を調製することが望ましい。このようなモノクローナル抗体を調製するための技術の説明は、例えば、Stitesら(編) Basic and Clinical Immunology (第4版) Lange Medical Publications, Los Altos, CA、Lange Medical Publications, Los Altos, CA、およびそれに引用される参考文献; Harlowおよび Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual

30

CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第2版) Academic Press, New York, NY; ならびに特に Kohler および Milstein (1975) Nature 256: 495 - 497を参照のこと(これらの各々は、本明細書中で参考として援用される)。簡単には、免疫原を、免疫応答を引き起こすために、動物に注射する。次いで、動物を屠殺し、そして細胞をその脾臓から採取し、ミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを生成させる。次いで、ハイブリドーマの集団をスクリーニングして、個々のクローンを単離し、これらは免疫原に結合する抗体を分泌する。

【0134】

他の適切な技術には、抗原性ポリペプチドに対するリンパ球のインビトロでの曝露、またはファージまたは類似のベクターにおいて抗体のライブラリーの選択を伴う。Huseら(1989)「Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda」Science 246: 1275 - 1281; および Wardら(1989) Nature 341: 544 - 546を参照のこと(これらの各々は、本明細書中で参考として援用される)。キメラ抗体またはヒト化抗体が、産生され得るか(米国特許第4, 816, 567号を参照のこと); またはマウスにおいて作製され得る(Mendezら、(1997) Nature Genetics 15: 146 - 156を参照のこと)。これらの参考文献は、本明細書中で参考として援用される。

40

50

【0135】

ポリペプチドおよび抗体は、頻りに標識される。広範な種々の標識および結合技術が公知であり、そして科学および特許文献の両方に広く報告される。適切な標識としては、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光部分、化学発光部分、磁性粒子などが挙げられる。このような標識の使用を教示する特許には、例えば、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号が挙げられる。

【0136】

本発明の抗体はまた、OX2RHタンパク質またはペプチドを単離する際のアフィニティークロマトグラフィーのために使用され得る。カラムが調製され得、ここで、抗体は、固体支持体、例えば、粒子（例えば、アガロース、Sephadexなど）に連結され、ここで、細胞溶解物がカラムを通過し得、カラムが洗浄され、次いで穏和な変性剤の濃度を上昇させ、それによって精製したタンパク質が放出される。あるいは、タンパク質を用いて抗体を生成し得る。適切な交叉吸着または枯渇が適用され得る。

10

【0137】

抗体はまた、特定の発現産物について発現ライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。通常、このような手順で使用される抗体を部分で標識し、抗体結合による抗原の存在の検出を容易にし得る。

【0138】

OX2RHタンパク質に対する抗体はまた、抗イディオタイプ抗体を惹起するために用いられる。これらは、このタンパク質の発現またはこのタンパク質を発現する細胞に関する種々の免疫学的状態を検出または診断するために有用である。これらはまたリガンドのアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である。これらは、インヒビターと競合し得るか、または天然に存在するリガンドに置換される。

20

【0139】

配列番号2のアミノ酸配列からなる免疫原のような、規定された免疫原に対して産生された抗体に特異的に結合するか、または特異的に免疫反応性であるレセプターホモログタンパク質は、代表的には、イムノアッセイで決定される。イムノアッセイは、代表的には、例えば、配列番号2のタンパク質に対して惹起されたポリクローナル抗血清を使用する。この抗血清を、他のIgスーパーファミリーレセプターメンバー（例えば、NKGD2D、好ましくは、同じ種由来）に対する低い交叉反応性を有するように選択し、そして任意のこのような交叉反応性を、イムノアッセイでの使用前に免疫吸着によって取り出す。

30

【0140】

イムノアッセイにおける使用のための抗血清を産生するために、例えば、配列番号2のタンパク質を、本明細書に記載のように単離する。例えば、組換えタンパク質は、哺乳動物細胞株で産生され得る。BALB/cのような近交系のマウスに、代表的には、フロイントアジュバントのような標準的アジュバント、および標準的マウス免疫プロトコル（HarlowおよびLane、前出を参照のこと）を使用して、選択されたタンパク質で免疫接種する。あるいは、本明細書に開示された配列に由来しそしてキャリアタンパク質に結合した合成ペプチドを、免疫原に使用し得る。ポリクローナル血清を回収し、そしてイムノアッセイ、例えば、固体支持体に固定した免疫原との固相イムノアッセイにおいて、免疫原タンパク質に対して滴定する。10⁴以上の力価のポリクローナル抗血清を選択し、HarlowおよびLane、前出の570～573頁に記載のような競合結合イムノアッセイを使用して、Igスーパーファミリーレセプターメンバーに対する交叉反応性についてテストする。好ましくは、少なくとも2つのレセプターファミリーメンバーをこの決定に使用する。これらのレセプターファミリーメンバーを、組換えタンパク質として産生し、そして本明細書に記載のように標準的分子生物学技術およびタンパク質化学技術を使用して単離し得る。

40

【0141】

50

競合結合形式におけるイムノアッセイを、交差反応性決定について使用し得る。例えば、配列番号2のタンパク質を、固体支持体に固定し得る。アッセイに添加されるタンパク質は、固定された抗原への抗血清の結合と競合する。固定されたタンパク質への抗血清の結合と競合する上記タンパク質の能力を、このタンパク質と比較する。上記タンパク質のパーセント交差反応性を、標準的計算を使用して計算する。上記に列挙したタンパク質のそれぞれと10%未満の交差反応性を有する抗血清を選択しそしてプールの。次いで、交差反応する抗体を、上記のタンパク質との免疫吸着によって、プールした抗血清から取り出す。

【0142】

次いで、免疫吸着しそしてプールした抗血清を、免疫原タンパク質（例えば、配列番号2のOX2RH1様タンパク質）に対して第2のタンパク質を比較するために、上記のように競合結合イムノアッセイで使用する。この比較を作成するために、2つのタンパク質を、広範な濃度でそれぞれアッセイし、そして固定されたタンパク質への抗血清の結合の50%を阻害するために必要とされる各タンパク質の量を決定する。必要とされる第2のタンパク質の量が、必要とされる選択されたタンパク質のタンパク質の量の2倍未満である場合、第2のタンパク質は、免疫原に対して産生された抗体に特異的に結合するといわれる。

【0143】

これらのOX2レセプターホモログタンパク質は、少なくとも6のこれまで同定された遺伝子を含むホモログタンパク質のファミリーのメンバーであることが理解される。特定のOX2RH1のような遺伝子産物について、この用語は、本明細書中に開示されるアミノ酸配列をいうのみならず、対立遺伝子改変体、非対立遺伝子改変体、または種改変体である他のタンパク質もまたいう。この用語は、単一の部位の変異のような従来の組換え技術を用いる故意の変異より、あるいはそれぞれのタンパク質をコードするDNAの短いセクションを切除することにより、あるいは新規のアミノ酸を置換すること、または新規のアミノ酸を付加することにより、導入された非天然のタンパク質を含む。このようなマイナーな変化は、代表的には、本来の分子の免疫原性および/またはその生物学的活性を実質的に維持する。従って、これらの変化は、設計された天然に存在するOX2RHタンパク質に特異的に免疫反応性であるタンパク質を含む。変化したタンパク質の生物学的活性は、適切な細胞株においてタンパク質を発現させ、そして例えば、トランスフェクトさせたタンパク質に対する適切な効果を測定することによって、決定され得る。マイナーとみなされる特定のタンパク質修飾は、全体としてレセプターホモログファミリーについて上記に記載されるような、アミノ酸の類似の化学特性での保存的置換を含む。必要に応じて、レセプターホモログのタンパク質とあるタンパク質を整列させることにより、および免疫同一性を決定するために本明細書中に記載される従来のイムノアッセイを用いることにより、本発明のタンパク質組成物を決定し得る。

【0144】

(VII. キットおよび定量)

本発明のレセプター様分子の天然に存在するおよび組換えの両方の形態とも、キットおよびアッセイ方法に、特に有用である。例えば、これらの方法はまた、結合活性（例えば、これらのタンパク質に対するリガンド）についてスクリーニングするために適用される。自動化アッセイのいくつかの方法は、年間、数万の化合物のスクリーニングを可能にするように、近年開発されている。例えば、BIOMEK自動化ワークステーション、Beckman Instruments, Palo Alto, California、およびFodorら(1991) Science 251: 767-773を参照のことこれらは本明細書中で参考として援用される)。後者は、固体基材上で合成された複数の規定されたポリマーにより結合を試験するための手段を記載する。アゴニスト/アンタゴニストホモログタンパク質をスクリーニングするための適切なアッセイの開発は、本発明によって提供されるような大量の精製された、活性状態での可溶性レセプターの利用可能性によって、非常に容易にされ得る。

10

20

30

40

50

【0145】

精製されたOX2RHは、上記のリガンドスクリーニング技術における使用のためにプレート上に直接コーティングされ得る。しかし、これらのタンパク質に対する非中和抗体は、例えば、診断用途において有用である、固体支持体上のそれぞれのレセプターホモログを固定するための捕捉抗体として用いられ得る。

【0146】

本発明はまた、タンパク質またはそのリガンドの存在を検出するための種々の診断キットおよび方法における、これらのOX2RH、そのフラグメント、ペプチド、およびそれらの融合産物の使用を意図する。あるいは、この分子に対する抗体は、キットおよび方法に取り込まれ得、OX2RHまたはそれを発現する細胞を定量する際に用いられ得る。代表的には、キットは、OX2RHペプチドまたは遺伝子セグメントまたは1つもしくは他を認識する試薬のいずれかを含むコンパートメントを有する。代表的には、認識試薬は、ペプチドの場合、レセプターホモログまたは抗体であるか、あるいは、遺伝子セグメントの場合、通常、ハイブリダイゼーションプローブである。

10

【0147】

サンプルにおけるOX2RHの濃度を決定するための好ましいキットは、代表的には、標識化合物（例えば、リガンドまたは抗体（これらは、OX2RHに対する公知の結合アフィニティーを有する））、陽性コントロールとしてのOX2RHの供給源（天然または組換え）、および遊離の標識リガンドから結合体を分離する手段（例えば、試験サンプル中のOX2RHを固定するための固相）を備える。試薬および指示書を含むコンパートメントは、通常提供される。適切な核酸またはタンパク質を含むキットもまた提供される。

20

【0148】

哺乳動物OX2RHまたはフラグメント、あるいはレセプターホモログフラグメントに特異的な、抗原結合フラグメントを含む、抗体は、ホモログおよび/またはフラグメントの上昇したレベルの存在を検出するための診断適用において有用である。診断アッセイは、均質（遊離の試薬と抗原-抗体複合体との間の分離工程を伴わない）または不均質（分離工程を伴う）であり得る。種々の市販のアッセイが存在し、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相酵素免疫検定法（ELISA）、酵素免疫検定法（EIA）、多元酵素免疫検定法（EMIT）、基質標識蛍光イムノアッセイ（SLFIA）などである。例えば、非標識抗体を、標識され、そしてレセプターホモログまたはその特定のフラグメントに対する抗体を認識する、第二の抗体を使用することによって、用い得る。これらのアッセイはまた、文献で広く議論されている。例えば、HarlowおよびLane（1988）Antibodies: A Laboratory Manual, CSH、およびColigan（1991編および定期的補遺）Current Protocols In Immunology Greene/Wiley, New York。

30

【0149】

抗イデオタイプ抗体は、レセプターホモログのアゴニストまたはアンタゴニストとしての役割を果たすための類似の用途を有し得る。これらは、適切な環境下での治療薬として有用である。

【0150】

頻繁に、診断アッセイのための試薬は、そのアッセイの感度を最適にするように、キット中に供給される。本発明については、アッセイの性質に依存して、プロトコル、および標識、標識されたまたは標識されていない抗体のいずれか、あるいは標識されたリガンドが提供される。これは、通常、緩衝剤、安定化剤、酵素に対する基質のようなシグナル産生に必要な物質などのような、他の添加物とともに存在する。好ましくは、このキットはまた、適切な使用および使用後の内容物の処理についての指示書を含む。代表的には、このキットは、各有用な試薬のためのコンパートメントを有し、そして試薬の適切な使用および使用後の内容物の処理についての指示書を含む。望ましくは、この試薬が、アッセイを行うための試薬の適切な濃度を有する水性媒体中で再構成され得る場合、試薬は、凍結乾燥した粉末として提供される。

40

50

【0151】

薬物スクリーニングの上記の構成成分は、改変なしで使用され得るか、あるいは種々の方法で改変され得る。例えば、標識することは、検出可能なシグナルを直接または間接的に提供する部分を共有結合または非共有結合によって達成され得る。これらのアッセイの多くでは、試験化合物、レセプターホモログ、またはそれに対する抗体は、直接にまたは間接的にのいずれかで標識され得る。直接的に標識するための可能性は、以下の標識群を包含する：¹²⁵Iのような放射性標識、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼのような酵素（米国特許第3,645,090号）、および蛍光強度、波長シフト、または蛍光極性化の変化をモニタリングし得る蛍光標識（米国特許第3,940,475号）。これらの特許の両方は、本明細書中に参考として援用される。間接的に標識するための可能性は、1つの構成成分のビオチン化、次いで上記の標識群の1つにカップリングしたアビジンに結合することを包含する。

10

【0152】

また、遊離のリガンドから結合したものを、あるいは遊離の試験化合物から結合したものを分離する多くの方法がある。レセプターホモログは、種々のマトリクス上に固定され得、続いて洗浄され得る。適切なマトリクスには、ELISAプレートのようなプラスチック、フィルター、およびビーズが挙げられる。マトリクスにレセプターホモログを固定する方法には、限定することなく、プラスチックへの直接付着、捕獲抗体の使用、化学的カップリング、およびビオチン-アビジンが挙げられる。このアプローチの最後の工程は、例えば、ポリエチレングリコールのような有機溶媒、または硫酸アンモニウムのような塩を利用する方法を含む、いくつかの方法のいずれかによって、抗体/抗原複合体の沈降を包含する。他の適切な分離技術には、限定することなく、Rattleら（1984）Clin. Chem. 30:1457-1461に記載のフルオレセイン抗体磁化粒子方法、および米国特許第4,659,678号に記載のような二重抗体磁性粒子分離方法が挙げられる（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。

20

【0153】

種々の標識ヘタンパク質またはそのフラグメントを連結する方法は、文献に広く報告されており、そして本明細書での詳細な議論の必要はない。その技術の多くは、ペプチド結合を形成するためにカルボジイミドまたは活性エステルのいずれかの使用により活性化されたカルボキシル基の使用、連結のためのクロロアセチルのような活性化ハロゲンまたはマレイミドのような活性化オレフィンとメルカプト基の反応によるチオエーテルの形成などを包含する。融合タンパク質はまた、これらの適用における使用を見い出す。

30

【0154】

本発明の別の診断局面は、レセプターホモログの配列から得たオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列の使用を包含する。これらの配列は、免疫学的障害を有する疑いのある患者においてそれぞれのレセプターホモログのレベルを検出するためのプローブとして使用され得る。RNAおよびDNAの両方のヌクレオチド配列の調製、配列の標識化、およびその配列の好ましいサイズは、文献において広い説明および議論を受け入れている。通常は、オリゴヌクレオチドプローブは、少なくとも約14ヌクレオチド、通常は少なくとも約18ヌクレオチドを有するべきであり、そしてポリヌクレオチドプローブは、数千塩基までであり得る。種々の標識は、最も普通には、放射性核種、特に³²Pを用い得る。しかし、他の技術もまた、例えば、ポリヌクレオチドへの導入のためのビオチン改変ヌクレオチドを使用して、用いられ得る。次いで、そのビオチンは、アビジンまたは抗体に結合するための部位として作用し、これは、放射性核種、蛍光団、酵素などのような広範な種々の標識で標識され得る。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖、DNA-RNAハイブリッド二重鎖、またはDNA-タンパク質二重鎖を含む、特定の二重鎖を認識し得る抗体が用いられ得る。次いで、その抗体が標識され得、そして二重鎖が表面に結合される場合、その結果、表面上の二重鎖の形成の際に、二重鎖へ結合した抗体の存在が検出され得るアッセイを行い得る。新規のアンチセンスRNAに対するプローブの使用は、核酸ハイブリダイゼーション、プラスおよびマイナススクリーニング、組換えプロー

40

50

ピング、ハイブリッド放出翻訳 (HRT)、およびハイブリッド停止翻訳 (HART) のような従来の任意の技術において行われ得る。これはまた、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような増幅技術を包含する。

【0155】

他のマーカーの定性的または定量的な存在についてもテストする診断キットも意図される。診断または予後は、マーカーとして使用される多数の指標の組み合わせに依存し得る。したがって、キットは、マーカーの組み合わせについてテストし得る。例えば、Vialletら (1989) Progress in Growth Factor Res. 1: 89-97を参照のこと。

【0156】

(VII. 治療的有用性)

本発明は、有意な治療的価値を有する試薬を提供する。例えば、Levitzi (1996) Curr. Opin. Cell Biol. 8: 239-244を参照のこと。レセプターホモログ (天然に存在するまたは組換え)、そのフラグメント、ムテインレセプター、および抗体は、レセプターホモログまたは抗体に結合親和性を有すると同定された化合物と共に、骨髄系統細胞の機能の調節が所望される状態の処置において有用である。このような異常は、代表的には、免疫学的障害により、また骨髄細胞活性が生理学的プロセス (例えば、CNS成熟または発達など) に影響する状態によりまた明かとなる。さらに、本発明は、異常な発現またはリガンドに対する応答の異常な誘発と関連する種々の疾患または障害において、治療的価値を提供する。

【0157】

マクロファージ/骨髄系統細胞を含み、OX2Rを発現する白血球が症状に関与し、かつ疾患プロセスに寄与する場合は、これらの細胞の機能を阻害することが所望され得る。これは、レセプターシグナル伝達の細胞阻害活性が動員されるような、OX2Rの適切な刺激により達成され得る。このことは、例えば、リガンドOX2アゴニストまたはレセプターに対するアゴニスト活性を有するOX2Rに対する抗体を用いて達成され得る。適切な状態は、動物が炎症、白血球増殖、または外傷後の状態の兆候または症状である。好ましい実施形態では、この兆候または症状は、天然の組織；リンパ組織；骨髄組織；脾臓；胃腸組織；甲状腺組織；筋組織；または皮膚もしくはコラーゲン組織においてである。特定の実施形態は、動物が自己免疫；炎症状態；組織特異的自己免疫；変性自己免疫；慢性関節リウマチ；アテローム性動脈硬化症；多発性硬化症；脈管炎；遅延型過敏症；皮膚移植；移植；脊椎損傷；発作；神経変性；または虚血の兆候または症状を経験している。投与する薬剤は、抗炎症性サイトカインアゴニストまたはアンタゴニスト；鎮痛薬；抗炎症剤；またはステロイドとの組合わせであり得る。

【0158】

対照的に、白血球 (マクロファージ/骨髄系列細胞を含む) の場合、OX2Rを発現することは、免疫化およびワクチン化、修復機構、病理特定、または感染制御 (特に細菌感染) のプロセスに関与する。これらの細胞の機能を増強することが望まれ得る。これは、OX2Rの適切な刺激により治療上獲得され得、その結果、レセプターシグナル伝達の細胞活性化が動員されるか、またはOX2-OX2Rの相互作用を完全にブロックすることにより細胞活性化を進行させ得る。後者はリガンドOX2遺伝子ノックアウトマウスにおいて生じる。このマウスではリガンドOX2を欠き、骨髄細胞活性化が導かれる。これは、例えば以下を用いて獲得され得る：リガンドOX2アンタゴニスト (例えば、リガンドOX2に対する抗体) OX2-OX2R相互作用を阻害するOX2Rに対する抗体、OX2R発現を阻害し得るアンチセンス核酸、細胞結合OX2が細胞結合OX2Rと相互作用する能力を (例えば、競合結合により) ブロックするIg-OX2R融合タンパク質、または低分子アンタゴニスト。この様式が骨髄細胞機能の促進においてインビボで適用を有するということは、実験により実証されている。この実験とは、例えば、ヒトIgGマウスOX2RH1融合タンパク質 (マウスOX2に結合することが公知) を産生するアデノウイルス構築物のマウスへの静脈注射が、これらのマウスにおいて自己免疫疾患実験

10

20

30

40

50

の自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発現を、ヒトIgG融合タンパク質骨格のみを産生するアデノウイルス構築物を投与されたマウスを比べて、加速することである。疾患加速の程度は、OX2R（OX2と名付けられる）のリガンドを遺伝子標的化により不活性化したマウスにおいてみられる加速の程度に匹敵した。

【0159】

あるいは、本明細書において記載される種々のOX2R分子が、活性化対阻害の機能を有する場合、細胞活性化を誘導するOX2Rの特異的活性化が適切であり得る。これは、例えば、所与のOX2Rのアゴニスト活性を有する特異的抗体の使用により達成され得る。種々の実施形態において、動物が創傷治癒または血餅形成の兆候または症状（ここでは、マクロファージ活性化の増強が所望され得る）を経験する方法、または動物が細菌感染（ここでは、顆粒球および/またはマクロファージによる食細胞活性の増強が好ましい）を経験する方法が適用される。投与は、しばしば以下と組み合わせられる：脈管形成因子；増殖因子（FGFまたはPDGFを含む）；抗生物質；または凝固因子。組換えレセプター、ムテイン、それに対するアゴニストまたはアンタゴニストの抗体、または抗体が精製され得、次いで患者に投与される。これらの試薬は、治療用途のためにさらなる活性成分とともに組み合わせられ得る（例えば、生理学的に無害の安定化剤および賦形剤とともに、従来を受容可能なキャリアまたは希釈剤中で）。これらの組み合わせは、例えば、濾過により滅菌され得、そして投与バイアル中の凍結乾燥により投薬形態に入れられ得、または安定化水性調製物中に貯蔵され得る。本発明はまた、抗体またはその結合フラグメント（補体結合ではない）の使用を意図する。

10

20

【0160】

レセプターまたはそのフラグメントを用いるリガンドスクリーニングを実行して、レセプターに対する結合親和性を有する分子を同定し得る。次いで、引き続く生物学的アッセイを利用して、推定リガンドが競合結合（内因性刺激活性をブロックし得る）を提供し得るか否かを決定し得る。レセプターフラグメントは、ブロッカーまたはアンタゴニストとして用いられ得る。すなわち、レセプターフラグメントは、リガンドの活性をブロックする。同様に、内因性刺激活性を有する化合物は、レセプターを活性化し得、従って、アゴニストである。すなわち、この化合物はリガンドの活性を刺激する（例えば、シグナル伝達を誘導する）。本発明はさらに、アンタゴニストとして、レセプターに対する抗体の治療的使用を意図する。

30

【0161】

効果的な治療に必要な試薬の量は、多くの異なる因子に依存する。この因子としては、投与手段、標的部位、試薬の生理学的寿命、薬理学的寿命、患者の生理学的状態、および投与される他の医薬が挙げられる。従って、処置投薬量を滴定して、安全性および効率を最適化すべきである。代表的には、インビトロで用いられる投薬量は、これらの試薬のインサイチュ投与に有用な量で、有用なガイダンスを提供し得る。特定の障害の処置のために有効な用量の動物試験により、ヒト投薬量のさらなる予想的指標を提供する。例えば、Gilmanら（1990編）Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Pergamon Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版（1990）, Mack Publishing Co., Easton, Penn.; （これらそれぞれは、本明細書において参考として援用されている）において、種々の考察が記載されている。投与の方法は、それらおよび以下において考察されている（例えば、経口投与、静脈投与、腹腔内投与、または筋肉内投与、経皮拡散、などについて）。薬学的に受容可能なキャリアとしては、水、生理食塩水、緩衝液、および他の化合物（例えば、Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jerseyが挙げられる。投薬範囲は、適切なキャリアとともに、濃度100mM未満、代表的には約1mM濃度未満、通常、約100μM未満、好ましくは、約1μM未満、そして最も好ましくは、約10nM未満の量であることが通常、期待される。徐放性処方物または徐放性装置は、しばしば持続投与のために利用

40

50

される。

【0162】

レセプターホモログ、そのフラグメント、および抗体またはそのフラグメント、アンタゴニスト、およびアゴニストが、処置されるべき宿主に直接投与され得る、または化合物のサイズに依存して、それらを、投与の前に、オボアルブミンまたは血清アルブミンのようなキャリアタンパク質と結合体化することが所望され得る。治療的処方物は、多くの従来の投薬処方物中で投与され得る。活性成分が単独で投与されることは可能であるが、薬学的処方物として存在することが好ましい。処方物は、1つ以上のその受容可能なキャリアとともに、上記で規定されたように、少なくとも1つの活性成分を含む。各々のキャリアは、他の成分と適合するという意味で薬学的に受容可能かつ生理学的に受容可能の両方であり、そして患者に無害でなければならない。処方物は、経口投与、直腸投与、経鼻投与、または非経口投与（皮下、筋肉内、静脈および皮内を含む）に適切な処方物を含む。処方物は、単位投薬形態中に都合よく存在し得、そして製薬の当業者に周知の方法により調製され得る。例えば、Gilmanら（1990編）Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版、Pergamon

Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版（1990）、Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avisら、（1993編）Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Liebermanら（編、1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; および Liebermanら（1990編）Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NYを参照のこと。本発明の治療は、他の治療剤と組み合わせられ得るか、または他の治療剤（特に他のレセプターファミリーメンバーのアゴニストまたはアンタゴニスト）と関連して用いられ得る。

【0163】

（IX. スクリーニング）

OX2RHまたはそのフラグメントを用いる薬物スクリーニングを実行して、レセプターホモログに対する結合親和性を有する化合物を同定し得る。この工程には関連コンポーネントの単離を含む。次いで引き続く生物学的活性を利用して、この化合物が固有の刺激活性を有するか否か、従ってブロッカーまたはアンタゴニスト（すなわち、この化合物がリガンドの活性をブロックする）であるか否かを決定し得る。同様に、固有の刺激活性を有する化合物は、レセプターを活性化し得、従ってアゴニストである。すなわち、この化合物はリガンド（例えば、OX2）の活性を刺激する。本発明はさらに、アゴニストまたはアンタゴニストとして、レセプターに対する抗体の治療的使用を意図する。

【0164】

同様に、複数のタンパク質を含む複合体を用いて、この複合体を認識し得るリガンドまたは試薬をスクリーニングし得る。いくつかのレセプターは、少なくとも2つのサブユニット（同じであっても異なっても良い）を含む。あるいは、膜貫通レセプターは、別の可溶性タンパク質（例えば、第二のレセプターサブユニットとして働く）に会合するリガンドを含む複合体に結合し得る。

【0165】

薬物スクリーニングの1つの方法には、別のレセプターサブユニットと組み合わせて、OX2RHを発現する組換えDNA分子で安定に形質転換されている、真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。他の機能的レセプターからの単離物中にレセプターを発現する細胞を単離し得る。このような細胞（生存に適した形態または固定形態のいずれか）を、標準的抗体/抗原、またはリガンド/レセプター結合アッセイに用い得る。また、Parceら（1989）Science 246: 243~247; および Owickiら（1990）Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 400

10

20

30

40

50

7 ~ 4011 (細胞性応答を検出する敏感な方法を記載する)を参照のこと。競合アッセイは、特に有用である。競合アッセイでは、細胞(推定リガンドの供給源)を、リガンドに対する既知の結合親和性を有する、標識したレセプターまたは抗体(例えば、 ^{125}I 抗体)、ならびに試験サンプル(結合組成物に対するその結合親和性が測定されている)と接触させ、一緒にインキュベートする。次いで、結合された標識化結合組成物および遊離の標識化結合組成物を分離して、リガンド結合の程度を評価する。試験化合物結合の量は、公知の供給源への標識化レセプター結合の量に対して逆比例する。多くの技術を用いて遊離のリガンドからの結合を分離し、リガンド結合の程度を評価する。この分離工程は代表的に、フィルターへの結合、その後の洗浄、プラスチックに対する結合その後の洗浄、または細胞膜の遠心分離のような手順を包含する。生存細胞はまた、OX2媒介機能への薬物の効果(例えば、セカンドメッセンジャーレベル、すなわち、 Ca^{++} ;細胞増殖;イノシトールリン酸プール変化;など)についてスクリーニングするために用いられ得る。いくつかの検出方法により、分離工程(例えば、近接鋭敏検出システム)の排除が可能になる。カルシウム感受性色素は、蛍光定量計または蛍光発光細胞ソーティング装置を用いて Ca^{++} レベルを検出するのに有用である。

10

【0166】

(X.リガンド)

本明細書のOX2Rの記載により、上記のようにリガンド同定のための手段を提供する。このようなリガンドは、かなり高い親和性を有するそれぞれのレセプターに対して特異的に結合するはずである。種々の利用可能な構築物が作製される。これは、リガンドを検出するためのレセプターのいずれかの標識化を可能にする。例えば、二次標識化のためのマーカー(例えば、FLAGまたは他のエピトープタグなど)に融合する、直接標的化レセプターは、レセプターの検出を可能にする。この工程は、発現クローニングアプローチにおける、組織学的(生化学的アフィニティー精製方法)、または標識化もしくは選択であり得る。ツーハイブリッド選択システムもまた、利用可能なレセプター配列を有する適切な構築物を作製するのに適用され得る。例えば、FieldおよびSong(1989)Nature 340:245~246を参照のこと。

20

【0167】

本発明の広範な範囲は以下の実施例を参考して最も理解される。以下の実施形態は、特定の実施形態に対して本発明が限定されることを意図しない。

30

【0168】

(実施例)

(I.一般的方法)

いくつかの標準的方法が、以下において記載されるかまたは参照される:Maniatisら(1982)Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook,ら(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (第2版)、第1~3巻、CSH Press, NY;またはAusubelら、(1987および補遺)Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York。タンパク質精製の方法としては、硫酸アンモニウム沈殿、カラムクロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、結晶化などのような方法が挙げられる。例えば、Ausubelら(1987および定期補遺); Coliganら(1996編)および定期補遺、「Current Protocols in Protein Science」Greene/Wiley, New York; Deutscher(1990)「Guide to Protein Purification」Methods in Enzymology、182巻およびこのシリーズの他の巻;およびタンパク質精製産物の使用における製造業者の文献、例えば、Pharmacia, Piscataway, N.J., またはBioRad, Richmond, CAを参照のこと。組み換え技術との組み合わせ

40

50

により、適切なセグメント（例えば、プロテアーゼ切り取り可能配列を介して融合され得る、FLAG配列または等価物）に対する融合が可能になる。例えば、Hichuli (1990)「Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent」Setlow (編) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87~98、Plenum Press, N.Y.; and Croweら (1992) OIA express: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CAを参照のこと。

【0169】

コンピューター配列分析を、例えば、利用可能なソフトウェアプログラム (GCG (U. Wisconsin) を含む) および GenBank 供給源を用いて実行する。公的な配列データベースをまた、GenBank などから用いる。

【0170】

IL-10レセプターに対して適用可能な多くの技術を、例えば、参考として本明細書に援用されるUS SN 08/110,683 (IL-10レセプター) に記載のように、OX2RHに適用し得る。

【0171】

(II. マクロファージへのラットOX2/OX2RHの相互作用をブロックするモノクローナル抗体)

組換えOX2-CD4タンパク質およびラット腹膜マクロファージを用いてビーズアッセイをセットアップする。Prestonら (1997) Eur. J. Immunol. 27:1911~1918を参照のこと。マクロファージは、組換えOX2-CD4タンパク質で被覆された蛍光ビーズに結合した。6週齢のBALB/cマウスを、0.1~0.25mgの粗膜画分 (WilliamsおよびBarclay (1986) Handbook of Experimental Immunology 第1巻、22.1-22.24, Blackwell Scientific Publications) がまたは常在ラット腹膜滲出細胞 (5百万) のいずれかで、6回免疫した。間接的免疫蛍光およびフローサイトメトリーによって、マクロファージの標識化について種々の稀釈の血清を試験することにより、マクロファージを認識する高力価の抗体について、マウスをスクリーニングした。ラットマクロファージに対する良好な免疫反応を生じるマウスを、腹膜滲出細胞の注射により最終的にブーストした。4日後、脾臓を取り出し、そしてNS-1骨髄細胞に融合してハイブリドーマを生成した。スクリーニング前の最終注射は、脾臓内に行った。ハイブリドーマ上清を、ラットマクロファージに対する標識化能について、およびマクロファージとのラットOX2相互作用をブロックする能力について、スクリーニングした。1つの抗体 (OX102と命名された) を獲得して、クローニングした。この抗体は、明白なブロックを付与した。このハイブリドーマをバルク中で増殖させ、そして標準的手順を用いて抗体を精製した。

【0172】

(III. OX102 mAbについての抗原の精製)

精製したOX102 mAbを、製造業者により推薦されたように、CNBr活性化セファロース-4B (Pharmacia) に共有結合する。Tween 40およびデオキシコール酸ナトリウムを用いて、膜タンパク質を可溶化し、そしてOX102 mAbに結合したSephroseビーズとともに70時間インキュベートした。Williams

およびBarclay、Handbook of Experimental Immunology 第1巻、22.1~22.24、Blackwell Scientific Publications. OX102 mAb結合Sephroseビーズを遠心分離により沈殿させ、そして0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 中で洗浄し、そして最終的に0.5% SDS中で55で15分間溶出した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によ

10

20

30

40

50

り、この溶出した画分を分析した。

【0173】

(IV. OX102 mAb についての抗原の N 末端配列)

Applied Biosystems Procise 494 A タンパク質シーケンサー (Perkin-Elmer Ltd., UK) での、自動化 Edman 分解を用いて、アミノ末端配列決定を行った。N 末端配列を、表 1 に示すように確認した。ブランクサイクルは、N 連結グリコシル化により改変されたアスパラギンの存在に起因して、アスパラギンであると推定された。精製したポリペプチドは、OX102 mAb についての抗原の N 末端の 20 アミノ酸を用いて公知のタンパク質データベースをスクリーニングすることにより、新規であると確認された。このタンパク質はラット OX2RH1 である。

10

【0174】

(V. OX102 mAb の抗原をコードする cDNA クローンの単離)

総 RNA を、製造業者によって推奨されるように RNazol B (Biogenesis) を使用して、ラット腹膜滲出液細胞から抽出し、次いで、製造業者によって推奨されるようにオリゴ dT ビーズ (Oligotex, GIBCO) と使用して、ポリ-A 画分を精製した。約 50 ng のポリ A + 精製 mRNA を、選択された 1 μM のセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド、1 mM dNTPs、および 2 mM DTT、50 mM Tris-HCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂ の存在下で、200 U の Superscript II 逆転写酵素 (GIBCO BRL) で処理し、そして 42 °C で 1 時間インキュベートした。

20

【0175】

次いで、この cDNA を、PCR 反応物 (例えば、供給された 40 μl の 10 × Advantage Taq 好熱性 PCR 緩衝液 (Clontech より供給); 8 μl の 10 mM dNTPs; 8 μl の Advantage Taq (Clontech); 2 μl の cDNA (上記のように調製); 318 μl の蒸留水; N 末端ペプチドに対応する、16 μl のアンチセンス縮重オリゴヌクレオチド (10 μM); および 8 μl の 10 μM のセンスオリゴヌクレオチド) 中におけるテンプレートとして使用した。両方のオリゴヌクレオチドプライマーを、クローニングを容易にするために、5' 末端ホスフェートを付けて合成した (Genosys)。

【0176】

この PCR 混合物を、8 × 50 μl のサンプルに等分し、そして Robocycler PCR 機器 (Stratagene) において、PCR 条件に供した。この Robocycler PCR 機器 (Stratagene) は、同時に、個々のサンプルにおけるアニーリング温度を変動させるように操作することが可能である。例示的なパラメーターは、以下の通りである: 93 °C で 30 秒間; 次いで、以下の 35 サイクル: 93 °C で 30 秒間; 42 ~ 56 °C で 1 分間; 72 °C で 30 秒間; そして、最終サイクルの 72 °C で 8 分間。

30

【0177】

10 μl の PCR 産物を、標準的な手順によって、アガロースゲル電気泳動により分析した。約 42 bp、44 bp、および 46 bp のアニーリング温度を有した 3 つのサンプル中の 100 塩基対と 300 塩基対との間の範囲の長さの PCR 産物をゲルから摘出し、そして QIAquick (QIAGEN) を用いて、その核酸を精製した。これらの精製産物を、標準的な手順を使用して、約 16 °C にて 48 時間で、PCR Script ベクター (Stratagene) (これは、SmaI で消化され、そしてホスファターゼ処理されている) 中に連結した。

40

【0178】

形質転換体を、最初にコロニー PCR によってスクリーニングし、そして適切なサイズの挿入物を含む 20 個のコロニーを、50 μg/ml アンピシリンの存在下で LB ブロス中において増殖し、そしてプラスミドを QIAGEN ロボットによって精製した。BIG DYE 蛍光ジデオキシターミネーション技術および ABI-PRISM モデル 377 (Perkin-Elmer Ltd., UK) を使用して、挿入物を配列決定した。OX1

50

02 mAbに対する抗原のN末端配列をコードするヌクレオチド配列を含む挿入物を使用して、3' RACE反応のためのオリゴヌクレオチドを設計した。

【0179】

OX102に対する抗原の完全cDNA配列を、3' RACE PCR（上記と同じプロトコルを使用）（ただし、各々0.2 μMの最終濃度で、適切なオリゴヌクレオチドを使用することによって改変された）によって得た。PCR条件は、例えば、以下の通りであった：93 で30秒間；次いで、以下の30サイクル：93 で30秒間；51～65 で1分間；72 で3.5分間；そして最終サイクルの72 で12分間。

【0180】

約2.3 Kbのバンドを、標準的な手順を使用して、65 でのPCR反応から抽出し、ゲル精製し、NotIおよびXhoIで消化し、そしてNotI/XhoI消化ベクター（PCRScrip t、Stratagene）中に連結した。挿入物を、上記のように配列決定した。

10

【0181】

OX102タンパク質（本明細書中で、ラットOX2RH1としても言及される）のcDNA配列を、表1に示す。他のホモログの実施形態の全長単離物を、同様に、クローン化し、そして配列を確認した。標準的な方法が、容易に適用可能である。

【0182】

（VI.他のOX2RH cDNAの獲得）

ラットOX2RH1ヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列の見識により、配列類似性に基づき、そしてラットOX2RH1はこのような等価物の単離のためのツールを提供することが理由で、他の種由来の相同な機能的等価物（マウスまたはヒトのOX2RH1を含む）を得ることが可能である。

20

【0183】

従って、ヒトOX2RH1を同定するために、正体未定のポリペプチドについてのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の既存のデータベース（例えば、ヒトゲノムプロジェクトから得られた配列を蓄えたデータベース）を、本明細書中に提供されたラットOX2RH1の核酸配列およびアミノ酸配列に対して相同性を有する配列について検索し得る。多くのサイトで蓄えられ、そしてアップデートされているデータベース（European Bioinformatics Centre (<http://www.ebi.ac.uk/>)およびNational Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を含む）が、汎用性プログラム（例えば、FASTAまたはBLAST）によってアクセスされ得る。これらのデータベースは、発現配列タグ（EST）の配列を含み、このESTは、無作為なcDNAクローンから配列決定されたヌクレオチド配列の短い領域である。これは、本明細書中に提供されるラットOX2RH配列情報と比較することによって、マウスまたはヒトのOX2RHについての部分的cDNAクローンを単離することを可能にする。次いで、マクロファージcDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリーをスクリーニングすることによってか、またはプライマー伸長技術（例えば、全長ラットOX2RH1クローンを得るために本明細書中に記載された技術）によって、全長クローンを単離し得る。

30

40

【0184】

ラットOX2RH1に関連したマウス配列およびヒト配列を、例えば、BLASTサーバー（Altschulら（1994）Nature Genet. 6:119-129）を使用して、ゲノム配列データベースから同定した。標準的な分析プログラム（例えば、PHD（RostおよびSander（1994）Proteins 19:55-72）およびDSC（KingおよびSternberg（1996）Protein Sci. 5:2298-2310））を使用して、構造を評価し得る。標準的な比較ソフトウェアは、例えば、以下を含む：Altschulら（1990）J. Mol. Biol. 215:403-10；Waterman（1995）Introduction t

50

o Computational Biology: Maps, Sequences, and Genomes Chapman & Hall; Lander および Waterman (1995 版) Calculating the Secrets of Life: Applications of the Mathematical Sciences in Molecular Biology, National Academy Press; ならびに、Speed および Waterman (1996 版) Genetic Mapping and DNA Sequencing (IMA Volumes in Mathematics and Its Applications, 第 81 巻) Springer Verlag.

【0185】

ラットおよびヒトの OX2RH1 の核酸配列は、例えば、表 5 で見られ得るように、50 ~ 98 % の相同性を有する。他のホモログについては、特にホモログ 3 とは、類似性は低くあり得る。

【0186】

データベーススクリーニングに対する代替として、本明細書中に提供されるラット OX2RH1 核酸配列を使用して、マクロファージ cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングし、適切なストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするに十分に相同なヒト配列を同定し得る。このアプローチを使用し、プローブとしてラット OX2 核酸を用いてヒト OX2 遺伝子を単離した。McCaughan ら (1987) Immunogenetics 25: 329 - 335。テンプレートとして、cDNA、ゲノム DNA、cDNA クローン、またはゲノムクロンのテンプレートを使用する PCR に基づく方法もまた広範に使用されており、一般的なアプローチが、cDNA からのマウス OX2 の単離によって例示される。Preston ら (1997) Eur. J. Immunol. 27: 1911 - 1918 を参照のこと。

【0187】

提供された OX2RH 配列に由来する PCR プライマーを使用して、ヒトまたは他の種もしくは組織の cDNA ライブラリーを探索する。配列は、例えば、表 1 ~ 4 から導き出され得る (好ましくは、配列の末端に隣接する配列)。霊長類、げっ歯類または他の種の OX2RH の全長 cDNA を、例えば、gt10 フェージの DNA ハイブリダイゼーションスクリーニングによってクローン化する。PCR 反応を、適切な条件下で、Taq aquaticus Taqplus DNA ポリメラーゼ (Stratagene) を使用して実施する。

【0188】

さらに、ラット OX2RH1 配列を使用して、対応するマウス OX2RH1 配列を単離し得、そしてそれらの間で保存された領域を同定し得る。特に、一群のホモログの発見によって、類似性の領域を同定し得る。保存された領域の配列は、一定範囲の種において所定の遺伝子を同定するための有用な試薬を提供する。例えば、マウスおよびラットの OX2 のドメイン 1 は、同じヒトドメインとラットドメインとの間の 77 % 同一性と比較して、アミノ酸レベルで 90 % 同一である。Preston ら (1997) Eur. J. Immunol. 27: 1911 - 1918。

【0189】

さらに別の方法は、発現クローンに対する抗体を使用するか、または適切な細胞型 (例えば、マクロファージ) 由来もしくは他の種由来の cDNA ライブラリーにおいて発現される交差反応するタンパク質を同定する。

【0190】

(VII. 染色体位置付け)

遺伝子をマッピングする。例えば、染色体スプレッド (spread) を調製する。インサイチュハイブリダイゼーションを、例えば、72 時間培養されたヒト由来のフィトヘマグルチニン刺激を与えたリンパ球から得られる染色体調製物において実施する。5-ブromoデオキシウリジンを、培養の最後の 7 時間に添加して (60 μ g/ml の培地)、良

10

20

30

40

50

好な質のハイブリダイゼーション後染色体バンディングを確実にする。

【0191】

プライマーの補助により増幅されたPCRフラグメントを、適切なベクター中にクローン化する。ベクターを、³Hでのニックトランスレーションによって標識する。放射性標識化プローブを、Matteiら(1985)Hum. Genet. 69:327-331に記載されるように、最終濃度200ng/mlのハイブリダイゼーション溶液で、中期スプレッドに対してハイブリダイズさせる。

【0192】

核追跡(track)エマルジョン(KODAK NTB₂)でのコーティングの後、スライドを露光する。バンディング手順の間の銀粒子のいかなるスリップをも回避するために、最初に染色体スプレッドを緩衝化ギームザ溶液で染色し、そして中期写真撮影した。次いで、R-バンディングを、蛍光色素-光分解-ギームザ(FPG)法によって実施し、分析前に中期を再撮影する。

10

【0193】

類似のアプローチ方法が、他の種に使用される。

【0194】

(VII. 種々のOX2RH mRNAの位置付け)

OX2RH1の予期される発現パターンは、主にマクロファージ、顆粒球、および肥満細胞であるが、ホモログH2、H3、および/またはH4は、機能的にそれほど密接に関連していない可能性がある。従って、これらの分布は、特に興味深い。分布は、例えば、ハイブリダイゼーション方法もしくはPCR方法によって、核酸レベルで評価され得るか、または例えば、組織学的方法もしくは免疫化学的方法によって、タンパク質レベルで評価され得る。

20

【0195】

ヒト複数組織(カタログ番号1、2)および癌細胞株プロット(カタログ番号7757-1)(1レーンあたり約2μgのポリ(A)⁺RNAを含む)を、Clontech(Palo Alto, CA)から購入する。プローブを、例えば、Amersham Rediprimeランダムプライマー標識化キット(RPN1633)を用いて、[³²P]dATPで放射性標識する。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、例えば、0.5M Na₂HPO₄、7%SDS、0.5M EDTA(pH8.0)中で65にて実施する。高ストリンジェンシーの洗浄は、例えば、65で、2×SSC、0.1%SDSで40分間の最初の2回の洗浄、次いで、0.1×SSC、0.1%SDSで20分間の引き続く洗浄で実施される。次いで、メンブランを、増感スクリーンの存在下で、X線フィルム(Kodak)に-70で露光する。cDNAライブラリーザンによるより詳細な研究を、選択した適切な哺乳動物OX2RH1クローンで実施して、造血細胞サブセットまたは他の細胞サブセットにおけるそれらの発現を試験する。

30

【0196】

あるいは、2つの適切なプライマーを、例えば、表1~4から選択する。RT-PCRを、メッセージの存在について選択された適切なmRNAサンプル(例えば、この遺伝子を発現するサンプル)において実施して、cDNAを産生する。

40

【0197】

全長クローンを、PCRシグナルによって予め選択された適切な組織から、cDNAライブラリーのハイブリダイゼーションによって単離し得る。ノーザンプロットを、実施し得る。

【0198】

OX2RHをコードする遺伝子についてのメッセージを、適切な技術(例えば、PCR、イムノアッセイ、ハイブリダイゼーション、または他の技術)によってアッセイする。組織および器官のcDNA調製物は、例えば、Clontech、Mountain View、CAから入手可能である。天然に発現する供給源の同定は、記載されるように有

50

用である。

【0199】

マウスでの分布について、例えば、サザン分析は、以下の通りに実施し得る：一次増幅されたcDNAライブラリー由来のDNA(5µg)を、適切な制限酵素で消化して、挿入物を放出し、1%アガロースゲルにおいて泳動し、そしてナイロンメンブラン(Schleicher and Schuell、Keene、NH)に転写する。

【0200】

マウスmRNA単離のためのサンプルとしては、以下が挙げられ得る：休止マウス線維芽細胞L細胞株(C200)；Braf：ER(エストロゲンレセプターへのBraf融合物)でトランスフェクトされた細胞；コントロール(C201)；T細胞、TH1偏光化(Mel14光明、脾臓由来CD4+細胞、IFN- および抗IL-4で7日間偏光化；T200)；T細胞、TH2偏光化(Mel14光明、脾臓由来CD4+細胞、IL-4および抗IFN- で7日間偏光化；T201)；T細胞、高度にTH1偏光化(Openshawら(1995)J. Exp. Med. 182:1357-1367を参照のこと；2、6、16時間プールについて抗CD3で活性化；T202)；T細胞、高度にTH2偏光化(Openshawら(1995)J. Exp. Med. 182:1357-1367を参照のこと；2、6、16時間プールについて抗CD3で活性化；T203)；胸腺から選別される、CD44- CD25+プレT細胞(T204)；抗原での最後の刺激後3週間休止中、TH1 T細胞クローンD1.1(T205)；10µg/mlのCon Aで15時間刺激された、TH1 T細胞クローンD1.1(T206)；抗原での最後の刺激後3週間休止中、TH2 T細胞クローンCDC35(T207)；10µg/mlのCon Aで15時間刺激された、TH2 T細胞クローンCDC35(T208)；休止中、脾臓由来Mel14+ナイティブT細胞(T209)；6、12、24時間プールについてIFN- /IL-12/抗IL-4でTh1に偏光化された、Mel14+ T細胞(T210)；6、13、24時間プールについてIL-4/抗IFN- でTh2に偏光化された、Mel14+ T細胞(T211)；刺激されていない成熟B細胞白血病細胞株A20(B200)；刺激されていないB細胞株CH12(B201)；刺激されていない、脾臓細胞由来ラージB細胞(B202)；LPSで活性化された、全脾臓由来B細胞(B203)；休止中、脾臓由来メトリザミド富化樹状細胞(D200)；休止中、骨髄由来樹状細胞(D201)；；LPSで4時間活性化された、単球細胞株RAW264.7(M200)；GMおよびM-CSFで誘導された、骨髄マクロファージ(M201)；休止中、マクロファージ細胞株J774(M202)；0.5、1、3、6、12時間プールでのマクロファージ細胞株J774+LPS+抗IL-10(M203)；0.5、1、3、5、12時間プールでのマクロファージ細胞株J774+LPS+IL-10(M204)；エアロゾルチャレンジしたマウス肺組織、Th2プライマー、エアロゾルOVAチャレンジ7、14、23時間プール(Garlisら(1995)、Clinical Immunology and Immunopathology 75:75-83を参照のこと；X206)；ブラジル鉤虫(Nippostrongylus)感染肺組織(Coffmanら(1989)Science 245:308-310を参照のこと；X200)；全成人肺、正常(O200)；全肺、rag-1(Schwarzら(1993)Immunodeficiency 4:249-252を参照のこと；O205)；IL-10 K.O.脾臓(Kuhnら、(1991)Cell 75:263-274を参照のこと；X201)；全成人脾臓、正常(O201)；全脾臓、rag-1(O207)；IL-10 K.O.パイア一斑(O202)；全パイア一斑、正常(O210)；IL-10 K.O.腸間膜リンパ節(X203)；全腸間膜リンパ節、正常(O211)；IL-10 K.O.結腸(X203)；全結腸、正常(O212)；NODマウス脾臓(Makinoら(1980)Jikken Dobutsu 29:1-13を参照のこと；X205)；全胸腺、rag-1(O208)；全腎、rag-1(O209)；全心臓、rag-1(O202)；全脳、rag-1(O203)；精巢、rag-1(O204)；全肝臓、rag

- 1 (O 2 0 6) ; ラット正常結合組織 (O 3 0 0) ; およびラット関節炎結合組織 (X 3 0 0) 。

【 0 2 0 1 】

ヒト mRNA 単離のためのサンプルとしては、以下が挙げられ得る：末梢血単核細胞（単球、T細胞、NK細胞、顆粒球、B細胞）、休止中（T100）；末梢血単核細胞、2、6、12時間プールについて抗CD3で活性化（T101）；T細胞、TH0クローンMot72、休止中（T102）；3、6、12時間プールについて抗CD28および抗CD3で活性化されたT細胞、TH0クローンMot72（T103）；2、7、12時間プールについて特異的ポリペプチドでアネルギー処理されたT細胞、TH0クローンMot72（T104）；T細胞、TH1クローンHY06、休止中（T107）；3、6、12時間プールについて抗CD28および抗CD3で活性化されたT細胞、TH1クローンHY06（T108）；2、6、12時間プールについて特異的ポリペプチドでアネルギー処理されたT細胞、TH1クローンHY06（T109）；T細胞、TH2クローンHY935、休止中（T110）；2、7、12時間プールについて抗CD28および抗CD3で活性化されたT細胞、TH2クローンHY935（T111）；T細胞CD4 + CD45RO - T細胞（抗CD28、IL-4、および抗IFN- γ において27日間偏光化）、TH2偏光化、抗CD3および抗CD28で4時間活性化（T116）；T細胞腫瘍株JurkatおよびHut78、休止中（T117）；T細胞クローン、プールされたAD130.2、Tc783.12、Tc783.13、Tc783.58、Tc782.69、休止中（T118）；T細胞無作為（random）T細胞クローン、休止中（T119）；脾細胞、休止中（B100）；抗CD40およびIL-4で活性化された脾細胞（B101）；プールされたB細胞EBV株WT49、RSB、JY、CVIR、721.221、RM3、HSY、休止中（B102）；1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化されたB細胞株JY（B103）；プールされたNK20クローン、休止中（K100）；プールされたNK20クローン、PMAおよびイオノマイシンで6時間活性化（K101）；NKLクローン、LGL白血病患者の末梢血由来、IL-2処理（K106）；NK細胞傷害性クローン640-A30-1、休止中（K107）；1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化された造血前駆体株TF1（C100）；U937前単球株、休止中（M100）；U937前単球株、1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化（M101）；溶出単球、1、2、6、12、24時間プールについてLPS、IFN- γ 、抗IL-10で活性化（M102）；溶出単球、1、2、6、12、24時間プールについてLPS、IFN- γ 、抗IL-10で活性化（M103）；溶出単球、4、16時間プールについてLPS、IFN- γ 、抗IL-10で活性化（M106）；溶出単球、4、16時間プールについてLPS、IFN- γ 、抗IL-10で活性化（M107）；溶出単球、1時間LPSで活性化（M108）；溶出単球、6時間LPSで活性化（M109）；DC70%CD1a+、CD34+

GM-CSF由来、TNF α 12日間、休止中（D101）；DC70%CD1a+、CD34+ GM-CSF由来、TNF α 12日間、1時間PMAおよびイオノマイシンで活性化（D102）；DC70%CD1a+、CD34+ GM-CSF由来、TNF α 12日間、6時間PMAおよびイオノマイシンで活性化（D103）；DC95%CD1a+、CD34+ GM-CSF由来、TNF α 12日間FACS分類、1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化（D104）；DC95%CD1a+、CD34+ GM-CSF由来、TNF α 12日間FACS分類、1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化（D105）；DC95%CD1a+、CD86+、CD34+ GM-CSF由来、TNF α 12日間FACS分類、1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化（D106）；単球GM-CSF由来DC、IL-45日間、休止中（D107）；単球GM-CSF由来DC、IL-45日間、休止中（D108）；単球GM-CSF由来DC、IL-45日間、4、6時間プールにLPS活性化（D109）；単球GM-CSF由来DC、IL-45日間

10

20

30

40

50

、TNF 活性化、4、16時間プールについて単球上清 (supernatant) (D110) ; 平滑筋腫瘍 L11 良性腫瘍 (X101) ; 正常子宮筋層 M5 (O115) ; 悪性平滑筋肉腫 GS1 (X103) ; 1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化された肺線維芽細胞肉腫株 MRC5 (C101) ; 腎臓上皮癌細胞株、CHA、1、6時間プールについてPMAおよびイオノマイシンで活性化 (C102) ; 腎臓胎児28週目雄 (O100) ; 肺胎児28週目雄 (O101) ; 肝臓胎児28週目雄 (O102) ; 心臓胎児28週目雄 (O103) ; 脳胎児28週目雄 (O104) ; 胆嚢胎児28週目雄 (O106) ; 小腸胎児28週目雄 (O107) ; 脂肪組織胎児28週目雄 (O108) ; 卵巣胎児25週目雌 (O109) ; 子宮胎児25週目雌 (O110) ; 精巣胎児28週目雄 (O111) ; 脾臓胎児28週目雄 (O112) ; 成体胎盤28週目 (O113) ; および炎症扁桃、12歳齢から (X100)。

【0202】

類似のサンプルが、評価のために他の種から単離され得る。組織学もまた、実施し得る。

【0203】

(IX. 哺乳動物 OX2RH タンパク質の産生)

適切な、例えば、GSTの融合タンパク質を、発現のために、例えば、E. coliにおいて操作する。例えば、マウス OX2RH pGex プラスミドを構築し、そして E. coli に形質転換する。新鮮な形質転換細胞を、例えば、50 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地中で増殖し、そして IPTG (Sigma, St. Louis, MO) で誘導する。一晩のインキュベーションの後、細菌を回収し、そして OX2RH タンパク質を含むペレットを単離する。このペレットを、例えば、TE 緩衝液 (50 mM Tris 塩基 (pH 8.0)、10 mM EDTA および 2 mM ペファブロック (pefabloc)) 2 リットル中でモジネートする。この物質を、3 回マイクロフィリューダイザー (Microfluidics, Newton, MA) を通過させる。この流動体化した上清を、Sorvall GS-3 ローターにおいて、1 時間 13,000 rpm にてスピンドウンする。結果として生じた OX2RH タンパク質を含む上清を、濾過し、そして 50 mM Tris 塩基 (pH 8.0) で平衡化したグルタチオン-SEPHAROSE カラムに対して通過させる。OX2RH-GST 融合タンパク質を含む画分をプールし、そして トロンピン (Enzyme Research Laboratories, Inc., South Bend, IN) で切断する。次いで、切断されたプールを、50 mM Tris 塩基で平衡化した Q-SEPHAROSE カラムに対して通過させる。OX2RH を含む画分をプールし、そして冷却蒸留水において、より低い伝導率まで希釈し、そして新鮮な Q-Sepharose カラム (単独、または免疫親和性抗体カラムに続いて) に対して通過させる。OX2RH タンパク質を含む画分をプールし、等分し、そして -70 °C のフリーザーにおいて保存する。

【0204】

種々の融合構築物が、OX2RH を用いて作製される。従って、例えば、OX2RH2、H3、または H4 の細胞外部分の融合は、DAP12 の細胞内部分または IgG ドメイン、あるいは他の標識ドメインまたは機能的ドメインに融合され得る。適切な遺伝子の部分は、エピトプタグ (例えば、FLAG タグ) または ツーハイブリッド系構築物に融合される。例えば、Fields および Song (1989) Nature 340:245-246 を参照のこと。

【0205】

抗 FLAG 抗体での検出を用いる発現クローニング手順において、このエピトプタグは使用され得、結合パートナー (例えば、それぞれのレセプター相同体についてのリガンド) を検出する。ツーハイブリッド系はまた、OX2RH に特異的に結合するタンパク質を単離するために使用され得る。

【0206】

類似の Ig スーパーファミリーレセプタータンパク質での CD スペクトルの比較は、タ

ンパク質が正確にフォールディングされたことを示唆し得る。Hazudaら、(1969) *J. Biol. Chem.* 264: 1689 - 1693; およびCambellら(1979) *Nature* 282: 341 - 342を参照のこと。

【0207】

結合特性(例えば、速度論および機能的効果)についてのOX2/OX2Rの反応性が研究され得る。優れて確立された免疫沈降法または遺伝的方法(例えば、酵母ツーハイブリッド系)を使用してOX2R細胞質ドメインの相互作用が決定され得る。タンパク質を通常発現しない細胞へのOX2RHのトランスフェクションは、生理学的研究およびシグナル伝達研究において有用であり得る。

【0208】

(X・OX2HRに特異的な抗体の調製)

適切な種または株(例えば、近交系のBalb/cマウス)を、組換え形態のタンパク質(例えば、精製OX2RHまたは安定にトランスフェクトされたNIH-3T3細胞)を用いて腹腔内で免疫した。タンパク質(付加的なアジュバントを有するか有さない)を用いて適切な時点で、動物をブーストし、さらに抗体産生を刺激する。血清を収集するか、または収集された脾臓を用いてハイブリドーマが産生される。

【0209】

あるいは、遺伝子またはそのフラグメントで形質転換された細胞、または内因性細胞あるいは外因性細胞のいずれか、または抗原の発現のために濃縮された単離された膜で、動物(例えば、Balb/cマウス)が免疫される。適切な時点(代表的には、多数のさらなる投与後に)、血清を収集する。種々の遺伝子療法技術が有用であり得る(例えば、インサイチュでタンパク質を産生する際に、免疫応答を産生するために)。血清または抗体調製物は、交差吸着または免疫選択され得、定義された特異性および高親和性の実質的に精製された抗体を調整する。従って、種々の種の対応物を認識する抗体、または特異的な種の部分集合または群(例えば、げっ歯類、エンボディメント(enbodiment))を認識する抗体、が調製され得る。

【0210】

モノクローナル抗体が作製され得る。例えば、適切な融合パートナーと脾細胞は融合され、そしてハイブリドーマは、標準手順によって増殖培地中で選択される。ラットOX2RH1に結合する抗体の存在について、ハイブリドーマ上清はスクリーニングされる(例えば、ELISAまたは他のアッセイによって)。特定のOX2RHエンボディメントを特異的に認識する抗体はまた、選択され得るか、または調整され得る。

【0211】

別の方法において、合成ペプチドまたは精製タンパク質は、免疫系に提示され、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が産生される。例えば、Coligan(編、1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; およびHarlowおよびLane(1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。適切な状況において、結合試薬は、上記のように(例えば、蛍光または他で)標識されるか、パンニング方法のために基板に固定化されるかのいずれかである。核酸はまた、動物内の細胞に導入され得、抗原を産生する。その抗原は、免疫応答を惹起するために役立つ。例えば、Wangら、(1993) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 90: 4145 - 4160; Barryら、(1994) *BioTechniques* 16: 616 - 619; およびXiangら、(1995) *Immunity* 2: 129 - 135を参照のこと。

【0212】

(XI・リガンドの結合およびパートナーの特異性)

結合選択性および親和性の試験のための手段は、容易に入手可能である。表面プラスモン共鳴(製造者のプロトコル; BIAcoreマニュアル、Pharmacia Biosensorを参照のこと)または他の方法が、OX2RHに対するリガンドを決定する

10

20

30

40

50

ために使用され得る。ラットおよびマウスH1は、それらの種の対照物のリガンド、OX2に結合する；ヒトH1は、同様に試験される。類似の潜在的なリガンドに対して、H2は同様に試験されるが、既知のレセプター（ラットおよびマウスH1）に対するH2の細胞外ドメインの類似性は、同じリガンドまたは密接に関連したリガンドを示唆する。

【0213】

レセプターは、特異的な結合試薬として使用され得、その結合の特異性を利用することによって、その結合パートナーを同定する（抗体が使用されるのと同様に）。結合レセプターは、OX2RHであり得るか、または、例えば別のサブユニットを有するOX2RHの複合体を含み得る。結合試薬は、上記のように標識されるか（例えば、蛍光または他で）、またはパンニング方法のために基板に固定化される。

10

【0214】

この結合組成物は、発現ライブラリーのスクリーニングに使用される。このライブラリーは、結合パートナー（例えば、リガンド）、好ましくは膜に結合した結合パートナーを発現する細胞株から作製される。標準染色手順は、表面で発現されたリガンドを検出または分類するために使用されるか、または、表面で発現された形質転換された細胞が、パンニングによってスクリーニングされる。細胞内発現のスクリーニングは、種々の染色または免疫蛍光手順によって行われる。McMahanら、(1991)EMBO J. 10: 2181-2832を参照のこと。

【0215】

あるいは、レセプター試薬は、アフィニティー精製、または推定リガンドを発現する細胞の選別に使用される。例えば、Sambrookら、またはAusubelらを参照のこと。

20

【0216】

別の戦略は、リガンドが結合した膜について、パンニングによってスクリーニングすることである。レセプターcDNAは、上記のように構築される。適切な抗体（例えば、OX2RH融合構築物上のFLAG配列を認識する）の使用、または第1抗体に対して惹起された抗体の使用によって、固定化は達成され得る。選択および増幅の反復サイクルは、適切なクローンの濃縮およびクローンを発現するレセプターの結果的な単離を導く。

【0217】

ファージ発現ライブラリーは、哺乳動物OX2RH（例えば、標識された形態）によってスクリーニングされ得る。適切な標識技術（例えば、抗FLAG抗体）は、適切なファージクローンの特異的な標識を可能にする。

30

【0218】

OX2-OX2RH結合の確認の際、または他の相同体についての代替のリガンドの同定の際、シグナル伝達経路が試験される。例えば、Prestonら、(1997)Eur. J. Immunol. 27: 1911-1918を参照のこと。DAP12の関与の暗示はまた、明白である。例えば、Bakkerら(2000)Human Immunology 61: 18-27; Lanierら、(1998)Immunity 8: 693-701; Smithら、(1998)J. Immunol. 161: 7-10; Gosselinら、(1999)J. Leukoc. Biol. 66: 165-171; Tomaselloら、(1998)J. Biol. Chem. 273: 34115-34119; およびMcVicarら、(1998)J. Biol. Chem. 273: 32934-32942を参照のこと。同様に、またはあるいは、DAP10は含まれ得る。例えば、Wu Jら、(1999)Science 285: 730-732; およびBauerら、(1999)Science 285: 727-729を参照のこと。

40

【0219】

特に、DAP12補助受容体(coreceptor)のパートナーは、T細胞レセプターサブユニットおよびFcRと同じファミリーであり、ITIMモチーフを保持し、そしてsyk/zap70タンパク質チロシンキナーゼに関与する経路を通じてシグ

50

ナル伝達する。DAP10は、YxxMモチーフを有し、PI3キナーゼ経路を通じてか、またはPI3キナーゼ経路に類似して、シグナル伝達する。

【0220】

NK細胞のMHCクラスIレセプターの特定のアイソフォームは、細胞質のドメインにITIM配列を欠き、そしてこれらのアイソフォームは、NK細胞を阻害するよりむしろ活性化すると提案されている。これらの活性化レセプターは、非常に短い細胞内領域(シグナル伝達モチーフを欠く)を有し、そしてそれらはすべて膜貫通ドメイン内の正に荷電した残基を共有する。このことは、シグナル伝達可能なアダプタ分子との結合を示唆する。DAP12、ITAMを含むタイプIジスルフィド結合ホモダイマーは、ヒトKIR2DSレセプターと非共有結合的に結合する。DAP12は、膜貫通領域に負に荷電されたアスパラギン酸残基を有し、そしてKIR2DSと共免疫沈降することが見出された、報告された12~13kDのリタンパク質に一致する。

10

【0221】

レセプターの係合の際に、DAP12はリン酸化され、そしてSykキナーゼを補充し、従って、T細胞レセプターに類似のシグナル伝達カスケードを誘導する。KIR2DSと結合されることに加えて、HLA-Cについてのレセプター、DAP12はまた、NK細胞の細胞表面で発現される。NK細胞は、H-2を認識する活性化マウスLy49DおよびLy49Hレセプターと結合し、そしてHLA-Eを認識するヒトCD94/NKG2Cヘテロダイマーレセプター複合体に結合する。

20

【0222】

ESTデータベースを検索することによって潜在的な膜シグナル伝達タンパク質を同定するための最近の努力は、DAP10、新規の10-kDの表面アダプタ(主に、造血細胞で発現される)の同定を導いた。DAP10は、DAP12との限定された相同性を有するのみであるが、その膜貫通ドメインは、DAP12の膜貫通領域およびTCRのCD3サブユニットのすべてに保存される領域負に荷電された残基を含む。さらに、DAP12およびCD3鎖の細胞外ドメイン内に保存されたシステイン残基はまた、DAP10に存在する。興味深いことに、ヒトDAP10およびDAP12遺伝子は、転写方向の反対に染色体19q13.1に隣接し、そしておそらく遺伝子複製の結果として約130塩基対のみ離れる。DAP10の1つの独特の特徴は、その短い保存された細胞質尾部であり、YxxMシグナル伝達モチーフ、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3-キナーゼ)のp85制御サブユニットについての潜在的なsrc相同性2(SH2)ドメイン結合部位を含む。種々のOX2RHの、DAP12またはDAP10との物理的および機能的結合が決定され得る。

30

【0223】

(XII. 遺伝子分析、動物研究)

配列は、染色体マッピングの決定、疾患マーカー相関関係、およびそれぞれの遺伝子の遺伝的な構造の単離および決定のために、利用可能な情報および試薬を有用にする。イントロン/エキソン構造が決定され、そしてトランスジェニックおよび欠損動物が調製される。例えば、Goodnow(1992)「Transgenic Animals」Roitt(編)Encyclopedia of Immunology, Academic Press, San Diego, 第1502~1504頁; Travis(1992)Science 256:1392-1394; Kuhnら、(1991)Science 254:707-710; Capeocchi(1989)Science 244:1288; Robertson(編、1987)Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells; A Practical Approach, IRL Press, Oxford; Rosenberg(1992)J. Clinical Oncology 10:180-199; およびCournoyerおよびCaskey(1993)Ann. Rev. Immunol. 11:297-329を参照のこと。

40

【0224】

50

インビトロおよびインビボでのOX2 - OX2Rの相互作用の機能を決定するために、可溶性形態で産生されるアデノウイルス構築物を調整し、OX2RH1の細胞外領域は、ヒトIgGに融合された。ヒトIgGバックボーンのみが可溶性形態で産生されるように、コントロール構築物を調製した。第1の例において、インビトロでの細胞性感染によって、これらの融合タンパク質を含む上清を産生し、正常に発現されたマウスOX2に対する結合に基づいて、OX2R融合タンパク質が生物学的機能を有するかどうか試験した。第1の研究において、正常マウスならびにOX2遺伝子ノックアウト(KO)マウスからのマウスの脾臓の組織断片を調製し、そしてOX2Rまたはコントロール融合タンパク質を添加し、そして融合タンパク質のヒトFc部分に結合する抗体の添加によって、これらの試薬を検出し、そして結合を明らかにするために、引き続いて免疫ペルオキシダーゼ染色手順を行った。OX2R融合タンパク質の弱い結合のみが、かつOX2 KOマウスではなく、正常マウスにおいてのみ、濾胞性樹状細胞および内皮細胞上で検出された。両方の細胞型は、非常に高レベルのリガンドOX2を発現することが既知である。従って、試薬は、OX2の生理学的な形態に結合し、そして脾臓(リガンドOX2は、遺伝子標的化に起因して存在しない)における結合は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【0225】

B細胞は、リガンドOX2を発現するが、濾胞性樹状細胞および内皮細胞よりも、より低いレベルで発現することが既知である。免疫組織化学は、特に感受性の技術ではない。従って、第2の研究において、同じ融合タンパク質は、正常マウスおよびOX2 KOマウスから単離された脾臓白血球に適用され、そしてB細胞のB220分子に対して特異的なmAbを使用するフローサイトメトリー分析によってB細胞への結合が決定され、そして融合タンパク質は、フィコエリトリンに結合したヒトIgGに対する第2抗体によって、より感受性に検出される。この場合、正常マウスにおけるすべてのB細胞は、OX2R融合タンパク質で標識されるが、コントロール融合タンパク質ではされない。OX2R融合タンパク質とB細胞との相互作用は、mAb(OX90と呼ばれ、OX2Rと相互作用するマウスOX2分子の一部に結合することが既知である)の添加によってブロックされた。さらに、OX2R融合タンパク質をOX2 KOマウス由来のB細胞に添加した際には、コントロール融合タンパク質で見られたバックグラウンドレベル以上の結合は、観察されなかった。

【0226】

これらの研究の結果は以下である：(1)OX2R融合タンパク質は、生物学的に活性であり、そして造血細胞および非造血細胞のOX2に結合する；および(2)OX2Rに結合される主要なリガンドは、リガンドOX2と実際に同定される(抗OX2(OX90)結合阻害およびOX2 KOマウス由来のB細胞への検出可能な結合の欠如に基づく)。これらのデータは、以下の可能性を排除し得ない。既知のリガンドOX2に加えて、OX2Rに結合される他のリガンドが存在する可能性。なぜなら、フローサイトメトリーでさえも、非常に低レベルで発現される細胞表面分子を検出しないからである。

【0227】

トランスジェニックマウスは、標準方法によって作製され得る。このような動物は、特定の組織においてか、または器官の全体にわたって遺伝子の欠失の影響を決定するのに有用である。このようなものは、種々の段階の動物の発生または特定の組織の発生における興味深い洞察を提供し得る。さらに、生物学的ストレスに対する種々の応答への影響が評価され得る。例えば、Hoganら、(1995) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (第2編) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。同様に、欠失マウス(例えば、ノックアウトマウス)が作製され得る。

【0228】

これらの動物は、インビボでの遺伝子の機能を研究するために、動物モデルに供される。例えば、Gorczyńskiら、(1999) J. Immunol. 163: 1654 - 1600; Mankooら、(1999) Nature 400: 69 - 73; Go

rczynskiら、(1999) *Transplant. Proc.* 31: 577-578; および Gorczynski Lら、(1999) *J. Immunol.* 162: 774-781を参照のこと。特に興味深いのは、マクロファージまたは他の骨髄性細胞集団の、例えば、血液中、リンパ組織または固体器官(神経系における小神経膠細胞を含む)における役割である。感染、自己免疫炎症および神経変性の感受性の試験が示される。アンタゴニストおよびアゴニストの両方は、記載されるか、または利用可能にされるインビトロモデルまたはインビボモデルでの有用な試薬である。

【0229】

(XIII. 治療価値を有しそうな物質のスクリーニング)

OX2R/OX2R相互作用の生物学的な効果は、OX2R(OXについての実験的な置換体)に反応性の抗体の使用によって研究され得る。OX2Rは、マクロファージ細胞表面膜のOX2R分子を架橋し、そして例えば、一酸化窒素の産生またはシグナル伝達タンパク質のリン酸化における変化を捜すことによって研究され得る。

10

【0230】

OX2R/OX2相互作用を乱す効果は、OX2Rを保持するマクロファージを使用して試験され得る。マクロファージを架橋結合パートナー(例えば、OX2R(例えば、OX102)についてのmAb)、または組換え多価バージョンのOX2に曝露することによって(候補物質の存在下または非存在下で)試験され得る。候補化合物の存在下または非存在下でのマクロファージの活性(例えば、一酸化窒素の産生またはシグナル伝達タンパク質のリン酸化)の比較は、候補物質が調節効果(例えば、阻害または増強)を有するかどうかを示す。

20

【0231】

候補物質はまた、マクロファージが関連する疾患(例えば、自己免疫)の病理学の疾患の優れて確立されたモデルにおいて試験され得る。例えば、先に記載され、かつ例示されたように、確立されたモデル(例えば、実験的アレルギー脳脊髄炎)(例えば、マウスにおける自己免疫疾患の実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)の促進された発症を示すモデル)が使用され得る。OX2R擬症は、慢性条件(例えば、慢性肉芽腫症)下で有利であり得る。OX2/OX2シグナル伝達のアゴニストまたはアンタゴニストの組み合わせは、このような条件に対する存在する療法と組み合わせられ得る。Physicians' Desk Reference Medical Economics Co, Montvale, NJを参照のこと。

30

【0232】

例えば、上記のような分析は、OX2R/OX2相互作用の摂動が治療的に有益であり得る方法を示す。例えば、本発明は、OX2RHの組換えバージョンの作製手段を提供する。OX2RXは、利用可能なOX2タンパク質と関連して使用され得、相互作用をブロックする可能な薬理的な試薬をスクリーニングする。相互作用するタンパク質の有効性は、薬理的産業で使用されるようなハイスループットな低分子スクリーニングプログラムの手段を提供する。例えば、High Throughput Screeningについての会議, International Business Communications, Southborough, MA 01772-1749を参照のこと。OX2RHの細胞質領域を介した相互作用は、治療標的でありそうであり、そして配列の知識およびその相互作用は、類似のスクリーニング方法を通じた薬理的試薬を発達するための手段を提供する。

40

【0233】

(XIV. 構造活性関連性)

特定の残基の臨界に関する情報は、標準手順および分析を使用して決定され得る。標準変異導入分析は、例えば、決定された位置(例えば、上記で同定された位置)で多くの異なる変異体を産生することによって行われ、そして変異体の生物学的活性を評価することによって行われる。これは、活性を変化する位置を決定する程度まで行われ得るか、または生物学的活性を保持、ブロックまたは調節する、のいずれかのために置換され得る残基

50

を決定するために特定の位置に注目するまで行われる。

【 0 2 3 4 】

あるいは、天然の変異体の分析は、天然の変異に耐性である位置を示し得る。これは、個体の間、または株あるいは集団にわたる変異の集団分析より生じる。個体から選択されたサンプルは、例えば、P C R分析および配列決定によって分析される。これは、集団の多形の評価を可能にする。

【 0 2 3 5 】

本明細書中のすべての引用は、本明細書中で参考として援用される。各個々の刊行物または特許出願が、具体的にかつ個別に参考として援用されるように示される場合と同程度まで援用される。

【 0 2 3 6 】

本発明の多くの修飾および改変が、その精神および範囲から逸脱することなくなされ得る。なぜなら、当業者には明らかであるので。本明細書中に記載される特定の実施形態は、例の目的のみで提供され、そして本発明は、添付の請求項（このような請求項が表題を付けられた等価物の全体の範囲内に沿って）に関して限定される。；そして本発明は、例示のために本明細書中に提示された特定の実施形態によって限定されない。

【化 1】

1

SEQUENCE SUBMISSION

SEQ ID NO: 1 is rodent OX2R nucleotide sequence.
 SEQ ID NO: 2 is rodent OX2R polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 3 is primate OX2R homolog 1 nucleotide sequence.
 SEQ ID NO: 4 is primate OX2R homolog 1 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 5 is rodent OX2R homolog 1 nucleotide sequence.
 SEQ ID NO: 6 is rodent OX2R homolog 1 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 7 is primate OX2R homolog 2 nucleic acid sequence. 10
 SEQ ID NO: 8 is primate OX2R homolog 2 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 9 is rodent OX2R homolog 2 nucleic acid sequence.
 SEQ ID NO: 10 is rodent OX2R homolog 2 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 11 is rodent OX2R homolog 3 nucleic acid sequence.
 SEQ ID NO: 12 is rodent OX2R homolog 3 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 13 is rodent OX2R polypeptide encoding sequence.
 SEQ ID NO: 14 is primate OX2R homolog 1 polypeptide encoding sequence.
 SEQ ID NO: 15 is rodent OX2R homolog 1 polypeptide encoding sequence.
 SEQ ID NO: 16 is primate OX2R homolog 2 polypeptide encoding sequence.
 SEQ ID NO: 17 is rodent OX2R homolog 2 polypeptide encoding sequence.
 SEQ ID NO: 18 is rodent OX2R homolog 3 polypeptide encoding sequence.
 SEQ ID NO: 19 is primate OX2R homolog 1.2 nucleotide sequence.
 SEQ ID NO: 20 is primate OX2R homolog 1.2 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 21 is primate OX2R homolog 1.2 polypeptide encoding sequence. 20
 SEQ ID NO: 22 is rodent OX2R homolog 4 nucleic acid sequence.
 SEQ ID NO: 23 is rodent OX2R homolog 4 polypeptide sequence.
 SEQ ID NO: 24 is rodent OX2R homolog 4 polypeptide encoding sequence.

<110> Medical Research Council
Schering Corporation

<120> Mammalian Proteins; Related Reagents and Methods

<130> DX01052K1 PCT

<140>

<141>

30

<150> GB 9911123.9

<151> 1999-05-13

<150> GB 9925989.7

<151> 1999-11-03

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1574

<212> DNA

<213> Unknown

40

<220>

<223> Description of Unknown Organism:rodent; surmised
rattus rattus

<220>

<221> CDS

【化 2】

2

<222> (91)..(1071)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (162)..(1071)

<400> 1

agcggaggga tcctgggtcat ggtcaccgct gctcccctac ctgtgaagag aaagagcacc 60

gagtgagccg ctgaaaacca gaaaaccgaa atg ctc tgc ttt tgg aga act tct 114
 Met Leu Cys Phe Trp Arg Thr Ser
 -20

10

cac gta gca gta ctc ttg atc tgg ggg gtc ttc gcg gct gag tca agt 162
 His Val Ala Val Leu Leu Ile Trp Gly Val Phe Ala Ala Glu Ser Ser
 -15 -10 -5 -1

tgt cct gat aag aat caa aca atg cag aac aat tca tca act atg aca 210
 Cys Pro Asp Lys Asn Gln Thr Met Gln Asn Asn Ser Ser Thr Met Thr
 1 5 10 15

gaa gtt aac act aca gtg ttt gta cag atg ggt aaa aag gct ctg ctc 258
 Glu Val Asn Thr Thr Val Phe Val Gln Met Gly Lys Lys Ala Leu Leu
 20 25 30

20

tgc tgc cct tct att tca ctg aca aaa gta ata tta ata aca tgg aca 306
 Cys Cys Pro Ser Ile Ser Leu Thr Lys Val Ile Leu Ile Thr Trp Thr
 35 40 45

ata acc ctc aga gga cag cct tcc tgc ata ata tcc tac aaa gca gac 354
 Ile Thr Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Ile Ile Ser Tyr Lys Ala Asp
 50 55 60

aca agg gag acc cat gaa agc aac tgc tgc gac aga agc atc acc tgg 402
 Thr Arg Glu Thr His Glu Ser Asn Cys Ser Asp Arg Ser Ile Thr Trp
 65 70 75 80

30

gcc tcc aca cct gac ctc gct cct gac ctt cag atc agt gca gtg gcc 450
 Ala Ser Thr Pro Asp Leu Ala Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala
 85 90 95

ctc cag cat gaa ggg cgt tac tca tgt gat ata gca gta cct gac ggg 498
 Leu Gln His Glu Gly Arg Tyr Ser Cys Asp Ile Ala Val Pro Asp Gly
 100 105 110

aat ttc caa aac atc tat gac ctc caa gtg ctg gtg ccc cct gaa gta 546
 Asn Phe Gln Asn Ile Tyr Asp Leu Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val
 115 120 125

acc cac ttt cca ggg gaa aat aga act gca gtt tgt gag gcg att gca 594
 Thr His Phe Pro Gly Glu Asn Arg Thr Ala Val Cys Glu Ala Ile Ala
 130 135 140

40

ggc aaa cct gct gcg cag atc tct tgg acg cca gat ggg gat tgt gtc 642
 Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val
 145 150 155 160

gct aag aat gaa tca cac agc aat ggc acc gtg act gtc cgg agc aca 690
 Ala Lys Asn Glu Ser His Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr

【化 3】

		3																
		165			170		175											
tgc	cac	tgg	gag	cag	agc	cac	gtg	tct	gtc	gtg	ttc	tgt	gtt	gtc	tct			738
Cys	His	Trp	Glu	Gln	Ser	His	Val	Ser	Val	Val	Phe	Cys	Val	Val	Ser			
			180					185					190					
cac	ttg	aca	act	ggt	aac	cag	tct	ctg	tct	ata	gaa	ctg	ggt	aga	ggg			786
His	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Glu	Leu	Gly	Arg	Gly			
			195				200						205					
ggt	gac	caa	tta	tta	gga	tca	tac	att	caa	tac	atc	atc	cca	tct	att			834
Gly	Asp	Gln	Leu	Leu	Gly	Ser	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Ile	Ile	Pro	Ser	Ile			
		210				215					220							
att	att	ttg	atc	atc	ata	gga	tgc	att	tgt	ctt	ttg	aaa	atc	agt	ggc			882
Ile	Ile	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Cys	Ile	Cys	Leu	Leu	Lys	Ile	Ser	Gly			
		225				230				235					240			
tgc	aga	aaa	tgt	aaa	ttg	cca	aaa	tcg	gga	gct	act	cca	gat	att	gag			930
Cys	Arg	Lys	Cys	Lys	Leu	Pro	Lys	Ser	Gly	Ala	Thr	Pro	Asp	Ile	Glu			
			245						250					255				
gag	gat	gaa	atg	cag	ccg	tat	gct	agc	tac	aca	gag	aag	agc	aat	cca			978
Glu	Asp	Glu	Met	Gln	Pro	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Thr	Glu	Lys	Ser	Asn	Pro			
			260					265						270				
ctc	tat	gat	act	gtg	acc	acg	acg	gag	gca	cac	cca	gcg	tca	caa	ggc			1026
Leu	Tyr	Asp	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Gln	Gly			
			275				280						285					
aaa	gtc	aat	ggc	aca	gac	tgt	ctt	act	ttg	tca	gcc	atg	gga	atc				1071
Lys	Val	Asn	Gly	Thr	Asp	Cys	Leu	Thr	Leu	Ser	Ala	Met	Gly	Ile				
		290				295					300							
tagaaccaag	gaaaagaagt	caagagacat	cataattact	gcttttcttt	ctttaaactt													1131
ctccaatgga	gggaaattag	ctcttctgaa	gttcttagaa	agcacaaatg	ttctaattgga													1191
tttgccctta	agttcttcta	tcattggaag	tttggaatct	ttgctgctac	ctgttaattc													1251
taggaagaac	tgatttaatt	attacaaaga	aagcacattg	ttatggtaaa	atatcaaatt													1311
gtgcaataca	atgatgaaaa	ctgagtttcc	tcaagaaata	actgcagaag	gaacaatcat													1371
tactaaagca	tttcatgtga	gttcttccaa	aaaagaaaat	cctgtgtat	acgacatgat													1431
tatggatatgt	gtgtgccttt	atatgtttgt	ttacaaatgt	gtatatatgc	acacatctga													1491
ttatcaagac	atctctgtca	aaaactcact	ggcgttcag	atztatgaaa	gctaataaag													1551
tgagtattgg	agatgttttt	ata																1574

<210> 2
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 2

【化5】

5

Thr Leu Ser Ala Met Gly Ile
300

<210> 3

<211> 1604

<212> DNA

<213> Unknown

10

<220>

<223> Description of Unknown Organism:primate; surmised
homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (217)..(1101)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (295)..(1101)

<400> 3

cagagaaaag cttctgttcg tccaagttac taaccaggct aaaccacata gacgtgaagg 60

20

aaggggctag aaggaagggga gtgccccact gttgatgggg taagaggatc ctgtactgag 120

aagttgacca gagaggggtct caccatgcgc acagtccctt ctgtaccagt gtggaggaaa 180

agtactgagt gaagggcaga aaaagagaaa acagaa atg ctc tgc cct tgg aga 234
Met Leu Cys Pro Trp Arg
-25

act gct aac cta ggg cta ctg ttg att ttg act atc ttc tta gtg gcc 282
Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Phe Leu Val Ala
-20 -15 -10 -5

30

gaa gcg gag ggt gct gct caa cca aac aac tca tta atg ctg caa act 330
Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn Ser Leu Met Leu Gln Thr
-1 1 5 10

agc aag gag aat cat gct tta gct tca agc agt tta tgt atg gat gaa 378
Ser Lys Glu Asn His Ala Leu Ala Ser Ser Ser Leu Cys Met Asp Glu
15 20 25

aaa cag att aca cag aac tac tcg aaa gta ctc gca gaa gtt aac act 426
Lys Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val Leu Ala Glu Val Asn Thr
30 35 40

tca tgg cct gta aag atg gct aca aat gct gtg ctt tgt tgc cct cct 474
Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala Val Leu Cys Cys Pro Pro
45 50 55 60

40

atc gca tta aga aat ttg atc ata ata aca tgg gaa ata atc ctg aga 522
Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr Trp Glu Ile Ile Leu Arg
65 70 75

ggc cag cct tcc tgc aca aaa gcc tac aag aaa gaa aca aat gag acc 570
Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Lys Lys Glu Thr Asn Glu Thr

【化 6】

															6															
80					85					90																				
aag	gaa	acc	aac	tgt	act	gat	gag	aga	ata	acc	tgg	gtc	tcc	aga	cct	618														
Lys	Glu	Thr	Asn	Cys	Thr	Asp	Glu	Arg	Ile	Thr	Trp	Val	Ser	Arg	Pro															
95					100					105																				
gat	cag	aat	tcg	gac	ctt	cag	att	cgt	acc	gtg	gcc	atc	act	cat	gac	666														
Asp	Gln	Asn	Ser	Asp	Leu	Gln	Ile	Arg	Thr	Val	Ala	Ile	Thr	His	Asp															
110					115					120																				
ggg	tat	tac	aga	tgc	ata	atg	gta	aca	cct	gat	ggg	aat	ttc	cat	cgt	714	10													
Gly	Tyr	Tyr	Arg	Cys	Ile	Met	Val	Thr	Pro	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Arg															
125					130					135					140															
gga	tat	cac	ctc	caa	gtg	tta	gtt	aca	cct	gaa	gtg	acc	ctg	ttt	caa	762														
Gly	Tyr	His	Leu	Gln	Val	Leu	Val	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Leu	Phe	Gln															
145					150					155																				
aac	agg	aat	aga	act	gca	gta	tgc	aag	gca	gtt	gca	ggg	aag	cca	gct	810														
Asn	Arg	Asn	Arg	Thr	Ala	Val	Cys	Lys	Ala	Val	Ala	Gly	Lys	Pro	Ala															
160					165					170																				
gcg	cat	atc	tcc	tgg	atc	cca	gag	ggc	gat	tgt	gcc	act	aag	caa	gaa	858	20													
Ala	His	Ile	Ser	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Asp	Cys	Ala	Thr	Lys	Gln	Glu															
175					180					185																				
tac	tgg	agc	aat	ggc	aca	gtg	act	gtt	aag	agt	aca	tgc	cac	tgg	gag	906														
Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Ser	Thr	Cys	His	Trp	Glu															
190					195					200																				
gtc	cac	aat	gtg	tct	acc	gtg	acc	tgc	cac	gtc	tcc	cat	ttg	act	ggc	954														
Val	His	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Cys	His	Val	Ser	His	Leu	Thr	Gly															
205					210					215					220															
aac	aag	agt	ctg	tac	ata	gag	cta	ctt	cct	gtt	cca	ggt	gcc	aaa	aaa	1002														
Asn	Lys	Ser	Leu	Tyr	Ile	Glu	Leu	Leu	Pro	Val	Pro	Gly	Ala	Lys	Lys															
225					230					235						30														
atc	agc	aaa	att	ata	tat	tcc	ata	tat	cat	cct	tac	tat	tat	tat	tta	1050														
Ile	Ser	Lys	Ile	Ile	Tyr	Ser	Ile	Tyr	His	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Leu															
240					245					250																				
gac	cat	cgt	ggg	att	cat	ttg	gtt	gtt	gaa	agt	caa	tgg	ctg	cag	aaa	1098														
Asp	His	Arg	Gly	Ile	His	Leu	Val	Val	Glu	Ser	Gln	Trp	Leu	Gln	Lys															
255					260					265																				
ata taaattgaat aaaacagaat ctactccagt tgttgaggag gatgaaatgc															1151															
Ile																														
agccctatgc cagctacaca gagaagaaca atcctctcta tgatactaca aacaaggtga															1211	40														
aggcatctga ggcattacaa agtgaagtgt acacagacct ccatacttta taagttggtg															1271															
gactctagta ccaagaaaca acaacaaacg agatacatta taattactgt ctgattttct															1331															
tacagttcta gaatgaagac ttatattgaa attaggtttt ccaaggttct tagaagacat															1391															
tttaatggat tctcattcat acccttgtat aattggaatt tttgattctt agctgotacc															1451															

【化 7】

7

agctagttct ctgaagaact gatgttatta caaagaaaat acatgcccat gaccaaatat 1511
 tcaaattgtg caggacagta aataatgaaa accaaatttc ctcaagaaat aactgaagaa 1571
 ggagcaagtg tgaacagttt cttgtgtatc ctt 1604

<210> 4
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Unknown

10

<400> 4
 Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu
 -25 -20 -15

Thr Ile Phe Leu Val Ala Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn
 -10 -5 -1 1 5

Ser Leu Met Leu Gln Thr Ser Lys Glu Asn His Ala Leu Ala Ser Ser
 10 15 20

Ser Leu Cys Met Asp Glu Lys Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val
 25 30 35

20

Leu Ala Glu Val Asn Thr Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala
 40 45 50

Val Leu Cys Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr
 55 60 65 70

Trp Glu Ile Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Lys
 75 80 85

Lys Glu Thr Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile
 90 95 100

30

Thr Trp Val Ser Arg Pro Asp Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Thr
 105 110 115

Val Ala Ile Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro
 120 125 130

Asp Gly Asn Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro
 135 140 145 150

Glu Val Thr Leu Phe Gln Asn Arg Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala
 155 160 165

Val Ala Gly Lys Pro Ala Ala His Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Asp
 170 175 180

40

Cys Ala Thr Lys Gln Glu Tyr Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys
 185 190 195

Ser Thr Cys His Trp Glu Val His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His
 200 205 210

Val Ser His Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro

【化 1 0】

10

ttggaagttt ggaatctctg ctgctacctg ttaatttttag gaagaactga ttttaattatt 1197
 acaaagaaag cacatgggta tgggtgaaata tcaagttgtg caataaagta tgatgaaaac 1257
 tgagtttcct caagaaataa ctgcaggagg aacaatcatc actaaagaat ttcatgtgag 1317
 ttcttacaaa aaaattccta tgtatacatg actatgggat gtgtgtccaa ttacatgttt 1377
 atttacaat gtgtatatat gcacacattt gcttttcagg acatctcctt gtaaaaaaca 1437
 cactggagtt ttggatttat aaaagcttat aaagtgagca ttggagatat ttt 1490

10

<210> 6

<211> 326

<212> PRT

<213> Unknown

<400> 6

Met Phe Cys Phe Trp Arg Thr Ser Ala Leu Ala Val Leu Leu Ile Trp
 -25 -20 -15 -10

Gly Val Phe Val Ala Gly Ser Ser Cys Thr Asp Lys Asn Gln Thr Thr
 -5 -1 1 5

20

Gln Asn Asn Ser Ser Ser Pro Leu Thr Gln Val Asn Thr Thr Val Ser
 10 15 20

Val Gln Ile Gly Thr Lys Ala Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ile Pro Leu
 25 30 35

Thr Lys Ala Val Leu Ile Thr Trp Ile Ile Lys Leu Arg Gly Leu Pro
 40 45 50 55

Ser Cys Thr Ile Ala Tyr Lys Val Asp Thr Lys Thr Asn Glu Thr Ser
 60 65 70

30

Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro Asp His Ser Pro
 75 80 85

Glu Leu Gln Ile Ser Ala Val Thr Leu Gln His Glu Gly Thr Tyr Thr
 90 95 100

Cys Glu Thr Val Thr Pro Glu Gly Asn Phe Glu Lys Asn Tyr Asp Leu
 105 110 115

Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Pro Glu Lys Asn Arg
 120 125 130 135

Ser Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser
 140 145 150

40

Trp Ser Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Thr Ser Glu Ser His Ser Asn
 155 160 165

Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu Gln Asn Asn Val
 170 175 180

Ser Asp Val Ser Cys Ile Val Ser His Leu Thr Gly Asn Gln Ser Leu

【化 1 4】

14

<222> (1)..(582)

<400> 9

aga ggc cag cct tcc tgc ata atg gcc tac aaa gta gaa aca aag gag	48	
Arg Gly Gln Pro Ser Cys Ile Met Ala Tyr Lys Val Glu Thr Lys Glu		
1 5 10 15		
acc aat gaa acc tgc ttg ggc agg aac atc acc tgg gcc tcc aca cct	96	
Thr Asn Glu Thr Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro		
20 25 30		10
gac cac att cct gac ctt cag atc agt gcg gtg gcc ctc cag cat gag	144	
Asp His Ile Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala Leu Gln His Glu		
35 40 45		
ggg aat tac tta tgt gag ata aca aca cct gaa ggg aat ttc cat aaa	192	
Gly Asn Tyr Leu Cys Glu Ile Thr Thr Pro Glu Gly Asn Phe His Lys		
50 55 60		
gtc tat gac ctc caa gtg ctg gtg ccc cct gaa gta acc tac ttt ctc	240	
Val Tyr Asp Leu Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Leu		
65 70 75 80		
ggg gaa aat aga act gca gtt tgt gag gca atg gca ggc aag cct gct	288	20
Gly Glu Asn Arg Thr Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala		
85 90 95		
gca cag atc tct tgg act cca gat ggg gac tgt gtc act aag agt gag	336	
Ala Gln Ile Ser Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Lys Ser Glu		
100 105 110		
tca cac agc aat ggc act gtg act gtc agg agc act tgc cac tgg gag	384	
Ser His Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu		
115 120 125		
cag aac aat gtg tct gct gtg tcc tgc att gtc tct cat tcg act ggt	432	30
Gln Asn Asn Val Ser Ala Val Ser Cys Ile Val Ser His Ser Thr Gly		
130 135 140		
aat cag tct ctg tcc ata gaa ctg agt aga ggt acc acc agc acc acc	480	
Asn Gln Ser Leu Ser Ile Glu Leu Ser Arg Gly Thr Thr Ser Thr Thr		
145 150 155 160		
cct tcc ttg ctg acc att ctc tac gtg aaa atg gtc ctt ttg ggg att	528	
Pro Ser Leu Leu Thr Ile Leu Tyr Val Lys Met Val Leu Leu Gly Ile		
165 170 175		
att ctt ctt aaa gtg gga ttt gct ttc ttc cag aag aga aat gtt acc	576	
Ile Leu Leu Lys Val Gly Phe Ala Phe Phe Gln Lys Arg Asn Val Thr		
180 185 190		40
aga aca tgaatatcca gatttctgga agctcattag tctgatgaca cataccagaa	632	
Arg Thr		
aacagcattt gtaatcaact ttctcattgg aatccagctt acccgtcctt gctgtcttca	692	
tgtttgtag acactcacct ccaaattctt aactgagaag ggctcctgtc taaaggaaat	752	
atggggacaaa attgtggagc atagacccaaa agaaaggcca tccagagact gccccaccta	812	

【化 1 5】

15

aggacccatc ccatatacag acaccaaacc cagacactac tgaagatgct gcgaagcggt 872
 tgctgacagg agcctgttat agctgtctcc tgagaggctc agccagagcc tgacaaatac 932
 ataggtagat gcttgcagcc aacaactgga ctgagcaaaa aatctccatt ggaggagtta 992
 gagaaaggac tgaagagggt gaaagggttt gcagcccat aggaagaaca acaatatcaa 1052
 ccaaccagat ctcccagagc tcccaggac taa 1085

10

<210> 10
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 10
 Arg Gly Gln Pro Ser Cys Ile Met Ala Tyr Lys Val Glu Thr Lys Glu
 1 5 10 15
 Thr Asn Glu Thr Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro
 20 25 30
 Asp His Ile Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala Leu Gln His Glu
 35 40 45
 Gly Asn Tyr Leu Cys Glu Ile Thr Thr Pro Glu Gly Asn Phe His Lys
 50 55 60
 Val Tyr Asp Leu Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Leu
 65 70 75 80
 Gly Glu Asn Arg Thr Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala
 85 90 95
 Ala Gln Ile Ser Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Lys Ser Glu
 100 105 110
 Ser His Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu
 115 120 125
 Gln Asn Asn Val Ser Ala Val Ser Cys Ile Val Ser His Ser Thr Gly
 130 135 140
 Asn Gln Ser Leu Ser Ile Glu Leu Ser Arg Gly Thr Thr Ser Thr Thr
 145 150 155 160
 Pro Ser Leu Leu Thr Ile Leu Tyr Val Lys Met Val Leu Leu Gly Ile
 165 170 175
 Ile Leu Leu Lys Val Gly Phe Ala Phe Phe Gln Lys Arg Asn Val Thr
 180 185 190
 Arg Thr

20

30

40

<210> 11

【化 1 6】

16

<211> 1354
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> Description of Unknown Organism:rodent; surmised
mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (42)..(875)

10

<220>
<221> mat_peptide
<222> (117)..(875)

<400> 11
ggcaccgagtt acgatttgtg cttaacctga ctccactcca g atg cat gct ttg ggg 56
Met His Ala Leu Gly
-25

agg act ctg gct ttg atg tta ctc atc ttc atc act att ttg gtg cct 104
Arg Thr Leu Ala Leu Met Leu Leu Ile Phe Ile Thr Ile Leu Val Pro
-20 -15 -10 -5 20

gag tca agt tgt tca gtg aaa gga cgg gag gag atc cca ccg gat gat 152
Glu Ser Ser Cys Ser Val Lys Gly Arg Glu Glu Ile Pro Pro Asp Asp
-1 1 5 10

tca ttt cct ttt tca gat gat aat atc ttc cct gat gga gtg ggc gtc 200
Ser Phe Pro Phe Ser Asp Asp Asn Ile Phe Pro Asp Gly Val Gly Val
15 20 25

acc atg gag att gag att atc act cca gtg tct gta cag ata ggt atc 248
Thr Met Glu Ile Glu Ile Ile Thr Pro Val Ser Val Gln Ile Gly Ile
30 35 40 30

aag gct cag ctt ttc tgt cat cct agt cca tca aaa gaa gca aca ctt 296
Lys Ala Gln Leu Phe Cys His Pro Ser Pro Ser Lys Glu Ala Thr Leu
45 50 55 60

aga ata tgg gaa ata act ccc aga gac tgg cct tcc tgc aga cta ccc 344
Arg Ile Trp Glu Ile Thr Pro Arg Asp Trp Pro Ser Cys Arg Leu Pro
65 70 75

tac aga gca gag ttg cag cag atc agt aaa aaa atc tgt act gag aga 392
Tyr Arg Ala Glu Leu Gln Gln Ile Ser Lys Lys Ile Cys Thr Glu Arg
80 85 90

gga acc act agg gtc cct gca cat cac cag agt tct gac ctt ccc atc 440
Gly Thr Thr Arg Val Pro Ala His His Gln Ser Ser Asp Leu Pro Ile
95 100 105 40

aaa tca atg gcc ctc aag cat gat ggg cat tac tca tgt cgg ata gaa 488
Lys Ser Met Ala Leu Lys His Asp Gly His Tyr Ser Cys Arg Ile Glu
110 115 120

aca aca gat ggg att ttc caa gag aga cat agc atc caa gtg cca ggg 536
Thr Thr Asp Gly Ile Phe Gln Glu Arg His Ser Ile Gln Val Pro Gly

【化 1 9】

19

<222> (1)..(981)

<223> n may be a, c, g, or t

<400> 13

atgytntgyt tytggmgnac nwsncaygtn gcngtntytny tnathtgggg ngtnnttygcn 60

gcngarwsnw sntgyccnga yaaraaycar acnatgcara ayaaywsnws nacnatgacn 120

gargtnaaya cnacngtntt ygtncaratg ggnaaraarg cnytnytntg ytgycnwnsn 180

athwsnytna cnaargtnat hytnathacn tggacnatha cnytnmgngg ncarccnwnsn 240

tgyathathw sntayaargc ngayacnmgn garacncayg arwsnaaytg ywsngaymgn 300

wsnathacnt gggcnwnsnac ncengayytn gcncengayy tncarathws ngcngtngcn 360

ytnarcayg arggnmgnta ywsntgygay athgcngtnc cngayggnaa yttycaraay 420

athtaygayy tncargtnyt ngtnccnccn gargtnacnc ayttycngg ngaraaymgn 480

acngcngtnt gygargcnat hgcnggnaar ccngcngcnc arathwsntg gacncngay 540

ggngaytgyg tngcnaaraa ygarwsncay wsnaaygna cngtnacngt nmgnwnsnacn 600

tgycaytggg arcarwsnca ygtnwsngtn gtnttytgyg tngtnwsnca yytnacnacn 660

ggnaaycarw snytnwsnat hgarytnggn mgngggngng aycarytnyt nggnwsntay 720

athcartaya thathccnws nathathath ytnathatha thggntgyat htgyytnytn 780

aarathwsng gntgymgnaa rtgyaarytn ccnaarwsng gngcnaacnc ngayathgar 840

gargaygara tgcarcnta ygcnwsntay acngaraarw snaaycnytnaygayacn 900

gtnacnacna cngargcnca yccngcnwnsn carggnaarg tnaayggnac ngaytgyytn 960

acnytnwsng cnatgggnat h 981

10

20

30

<210> 14

<211> 885

<212> DNA

<213> reverse translation

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(885)

<223> n may be a, c, g, or t

<400> 14

atgytntgyt cntggmgnac ngcnaayytn ggnytnytny tnathtytnac nathttyytn 60

gtngcngarg cngarggngc ngcncarccn aayaaywsny tnatgytnca racnwsnaar 120

garaaycayg cnytnngcnws nwsnwsnytn tgyatggayg araarcarat hacncaraay 180

taywsnaarg tnytnngcnga rgtnaayacn wsntggccng tnaaratggc nacnaaygcn 240

gtnytnntgyt gyccnccnat hgcnytnmgn aayytnatha thathacntg ggarathath 300

40

【化 2 0】

20

ytnmgnggnc arccnwsntg yacnaargcn tayaaraarg aracnaayga racnaargar 360
 acnaaytgya cngaygarmg nathacntgg gtnwsnmgnc cngaycaraa ywsngayytn 420
 carathmgna cngtngcnat hacncaygay ggntaytaym gntgyathat ggtnacnccn 480
 gayggnaayt tycaymgngg ntaycayytn cargtnytng tnacnccnga rgtnacnytn 540
 ttycaraaym gnaaymgnc ngcngtntgy aargcngtng cnggnaarcc ngcngcncay 600 10
 athwsntgga thccngargg ngaytgygcn acnaarcarg artaytggws naayggnaacn 660
 gtnacngtna arwsnacntg ycaytgggar gtncayaayg tnwsnacngt nacntgygay 720
 gtnwsncayy tnacnggnaa jaarwsnytn tayathgary tnytnccngt nccngngcn 780
 aaraarathw snaarathat htaywsnath taycayccnt aytaytayta yytngaycay 840
 mgnggnathc ayytngtngt ngarwsncar tggytncara arath 885

<210> 15 20
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> reverse translation

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(978)
 <223> n may be a, c, g, or t

<400> 15
 atgttytgyt tytggmgnc nwsngcnytn gcngtnytny tnathtgggg ngnttyygn 60
 gcnggnwsnw sntgyacnga yaaraaycar acnacncara ayaaywsnws nwsnccnytn 120 30
 acncargtna ayacnacngt nwsngtncar athgggnacna argcnytnyt ntgytgytty 180
 wsnathccny tnacnaargc ngtnytath acntggatha thaarytnmg nggnytnccn 240
 wsntgyacna thgcntayaa rgtngayacn aaracnaayg aracnwsntg yytngngmgn 300
 aayathacnt gggcnwsnac nccngaycay wsncngary tncarathws ngcngtnacn 360
 ytnarcayg arggnacnta yacntgygar acngtnacnc cngarggnaa yttygaraar 420
 aaytaygay tncargtnyt ngtnccnccn gargtnacnt aytyccnga raaraaymgn 480
 wsngcngtnt gygargcnat ggcnggnaar ccngcngcnc arathwsntg gwsnccngay 540 40
 ggngaytgyg tnacnacnws ngarwsncay wsnaayggna cngtnacngt nmgnwsnacn 600
 tgycaytggg arcaraayaa ygtnwsngay gtnwsntgya thgtnwsnca yytnacnggn 660
 aaycarwsny tnwsnathga rytnwsnmgn ggnggnaayc arwsnytnmg nccntayath 720
 ccntayatha thccnwsnat hathathytn athathathg gntgyathtg yytnytnaar 780

【化 2 1】

21

athwsnggnt tymgnaartg yaarytnccn aarytngarg cnacnwsngc nathgargar 840
 gaygaratgc arccontaygc nwsntayacn garaarwsna ayccnyntnta ygayacngtn 900
 acnaargtng argenttycc ngtnwsncar ggngargtna ayggnacnga ytgyytnacn 960
 ytnwsngcna thgggnath 978

<210> 16
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> reverse translation

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(750)
 <223> n may be a, c, g, or t

<400> 16
 atgggnggna arcaratgac ncaraaytay wsnacnatht tygcngargg naayathwsn 60
 carccngtny tnatggayat haaygcngtn ytntgytgyc cnccnathgc nytnmgnaay 120
 ytnathatha thacntggga rathathytn mgnggncarc cnwsntgyac naargcntay 180
 aaraargara cnaaygarac naargaracn aaytgyacng tngarmgnat hacntgggtn 240
 wsnmgncng aycaraayws ngayytncar athmgncng tngayacnac ncaygayggn 300
 taytaymgng gnathgtngt nacncngay ggnaayttyc aymgnggnta ycayytncar 360
 gtnyngtna cncngargt naayytntty carwsnmgna ayathacngc ngtnngyaar 420
 gcngtnacng gnaarcngc ngcncarath wsntggathc engarggnws nathytngcn 480
 acnaarcarg artaytgggg naayggnacn gtnacngtna arwsnacntg yccntgggar 540
 ggncayaarw snacngtnac ntgycaygtn wsncaaytna cnggnaayaa rwsnytnwsn 600
 gtnaarytna aywsnggnyt nmgnacnwsn ggwnsnccng cnytnwsnyt nytnathath 660
 ytntaygtna arytnwsnyt ntttygtngtn athytngtna cnacnggntt ygtnttytty 720
 carmgnatha aycaygtnmg naargtnytn 750

20

30

<210> 17
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> reverse translation

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(582)
 <223> n may be a, c, g, or t

<400> 17
 mgnggncarc cnwsntgyat hatggcntay aargtngara cnaargarac naaygaracn 60

【化 2 2】

22

tgyytnggnm gnaayathac ntgggcnwsn acnccngayc ayathccnga yytncarath 120
 wsngcngtng cnytnarca ygarggnaay tayytnngyg arathacnac nccngarggn 180
 aayttycaya argtntayga yytncargtn ytngtncnc cngargtnac ntayttyytn 240
 ggngaraaym gnacngcngt ntgygargcn atggcnggna arccngcngc ncarathwsn 300
 tggacnccng ayggngaytg ygtnacnaar wsgarwsnc aywsnaaygg nacngtnacn 360 10
 gtnmgnwsna cntgycaytg ggarcaraay aaygtnewsng cngtnwsntg yathgtnwsn 420
 caywsnacng gnaaycarws nytnwsnath garytnwsnm gnggnacnac nwsnacnacn 480
 ccnwsnytny tnacnathyt ntaygtnaar atggtnytny tnggnathat hytnytnaar 540
 gtnggnattyg cnttyttyca raarmgnaay gtnacnmgna cn 582

<210> 18
 <211> 834
 <212> DNA
 <213> reverse translation 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(834)
 <223> n may be a, c, g, or t

<400> 18
 atgcaygcny tnggnmgnac nytngcnytn atgytnytna thttyathac nathytngtn 60
 ccngarwsnw sntgywsngt naarggnmgn gargarathc cncngayga ywsnttyccn 120
 ttywsngayg ayaayathht ycngaygggn gtnggngtna cnatggarat hgarathath 180 30
 acnccngtnw sngtncarat hggathaar gcncarytnt tytgycaycc nwsnccnwsn 240
 aargargcna cnytnmgnat htgggarath acnccnmngng aytggccnws ntgymgnytn 300
 ccntaymgng cngarytnca rcarathwsn aaraaratht gyacngarmg nggnacnacn 360
 mgngtncng cncaycayca rwsnwsngay ytnccnatha arwsnatggc nytnaarcay 420
 gayggncayt aywsntgymg nathgaracn acngayggna thttycarga rmgnacaywsn 480
 athcargtnc cngngaraa ymgnacngtn gtntgygarg cnathgcnws naarccngcn 540
 atgcarathy tntggacncc ngaygargay tgygtnacna arwsnaarws ncayaaygay 600 40
 acnatgathg tnmgnwsnaa rtgycaymgn garaaraaya ayggncayws ngtnttytgy 660
 ttyathwsnc ayytnacnga yaaytgath ytnwsnatgg arcaraaymg nggnacnacn 720
 wsnathytn cnewsnytny nwsnathytn taygtnaary tngcngtnac ngtnytnath 780
 gtnggnattyg cnttyttyca raarmgnaay taytymgng tncngargg nwsn 834

【化 2 3】

23

<210> 19
 <211> 1047
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Description of Unknown Organism:primate; surmised
 homo sapiens

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1044)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (79)..(1044)

<400> 19
 atg ctc tgc cct tgg aga act gct aac cta ggg cta ctg ttg att ttg 48
 Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu
 -25 -20 -15

act atc ttc tta gtg gcc gaa gcg gag ggt gct gct caa cca aac aac 96
 Thr Ile Phe Leu Val Ala Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn
 -10 -5 -1 1 5

tca tta atg ctg caa act agc aag gag aat cat gct tta gct tca agc 144
 Ser Leu Met Leu Gln Thr Ser Lys Glu Asn His Ala Leu Ala Ser Ser
 10 15 20

agt tta tgt atg gat gaa aaa cag att aca cag aac tac tcg aaa gta 192
 Ser Leu Cys Met Asp Glu Lys Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val
 25 30 35

ctc gca gaa gtt aac act tca tgg cct gta aag atg gct aca aat gct 240
 Leu Ala Glu Val Asn Thr Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala
 40 45 50

gtg ctt tgt tgc cct cct atc gca tta aga aat ttg atc ata ata aca 288
 Val Leu Cys Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr
 55 60 65 70

tgg gaa ata atc ctg aga ggc cag cct tcc tgc aca aaa gcc tac agg 336
 Trp Glu Ile Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg
 75 80 85

aaa gaa aca aat gag acc aag gaa acc aac tgt act gat gag aga ata 384
 Lys Glu Thr Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile
 90 95 100

acc tgg gtc tcc aga cct gat cag aat tcg gac ctt cag att cgt cca 432
 Thr Trp Val Ser Arg Pro Asp Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Pro
 105 110 115

gtg gcc atc act cat gac ggg tat tac aga tgc ata atg gta aca cct 480
 Val Ala Ile Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro
 120 125 130

20

30

40

【化 2 4】

24

gat ggg aat ttc cat cgt gga tat cac ctc caa gtg tta gtt aca cct	528	
Asp Gly Asn Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro		
135	140	145 150
gaa gtg acc ctg ttt caa aac agg aat aga act gca gta tgc aag gca	576	
Glu Val Thr Leu Phe Gln Asn Arg Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala		
	155	160 165
gtt gca ggg aag cca gct gcg cag atc tcc tgg atc cca gag ggc gat	624	
Val Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Asp		10
	170	175 180
tgt gcc act aag caa gaa tac tgg agc aat ggc aca gtg act gtt aag	672	
Cys Ala Thr Lys Gln Glu Tyr Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys		
	185	190 195
agt aca tgc cac tgg gag gtc cac aat gtg tct acc gtg acc tgc cac	720	
Ser Thr Cys His Trp Glu Val His Asn Val Ser Thr Val Thr Cys His		
	200	205 210
gtc tcc cat ttg act ggc aac aag agt ctg tac ata gag cta ctt cct	768	
Val Ser His Leu Thr Gly Asn Lys Ser Leu Tyr Ile Glu Leu Leu Pro		20
	215	220 225 230
gtt cca ggt gcc aaa aaa tca gca aaa tta tat att cca tat atc atc	816	
Val Pro Gly Ala Lys Lys Ser Ala Lys Leu Tyr Ile Pro Tyr Ile Ile		
	235	240 245
ctt act att att att ttg acc atc gtg gga ttc att tgg ttg ttg aaa	864	
Leu Thr Ile Ile Ile Leu Thr Ile Val Gly Phe Ile Trp Leu Leu Lys		
	250	255 260
gtc aat ggc tgc aga aaa tat aaa ttg aat aaa aca gaa tct act cca	912	
Val Asn Gly Cys Arg Lys Tyr Lys Leu Asn Lys Thr Glu Ser Thr Pro		
	265	270 275
gtt gtt gag gag gat gaa atg cag ccc tat gcc agc tac aca gag aag	960	
Val Val Glu Glu Asp Glu Met Gln Pro Tyr Ala Ser Tyr Thr Glu Lys		30
	280	285 290
aac aat cct ctc tat gat act aca aac aag gtg aag gca tct cag gca	1008	
Asn Asn Pro Leu Tyr Asp Thr Thr Asn Lys Val Lys Ala Ser Gln Ala		
	295	300 305 310
tta caa agt gaa gtt gac aca gac ctc cat act tta taa	1047	
Leu Gln Ser Glu Val Asp Thr Asp Leu His Thr Leu		
	315	320
<210> 20		40
<211> 348		
<212> PRT		
<213> Unknown		
<400> 20		
Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu		
-25	-20	-15
Thr Ile Phe Leu Val Ala Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn		

【化 2 6】

26

Leu Gln Ser Glu Val Asp Thr Asp Leu His Thr Leu
315 320

<210> 21
<211> 1044
<212> DNA
<213> reverse translation

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1044)
<223> n may be a, c, g, or t

10

<400> 21
atgytntgyc cntggmgnac ngcnaayytn ggnytnytny tnathytnac nathttyytn 60
gtngcngarg cngarggngc ngcncarccn aayaaywsny tnatgytnca racnwsnaar 120
garaaycayg cnytnngcnws nwsnwsnytn tgyatggayg araarcarat hacncaraay 180
taywsnaarg tnytnngcnga rgtnaayacn wsntggccng tnaaratggc nacnaaygen 240
gtnytnytny gyccnccnat hgcnynmgn aayytnatha thathacntg ggarathath 300
ytnmgnggnc arccnwsntg yacnaargcn taymgnaarg aracnaayga racnaargar 360
acnaaytgya cngaygarmg nathacntgg gtnwsnmgnc cngaycaraa ywsngayytn 420
carathmgnc cngtngcnat hacncaygay ggntaytaym gntgyathat ggtnacnccn 480
gayggnaayt tycaymngg ntaycayytn cargtnytny tnacnccnga rgtnacnytn 540
tтыcaraaym gnaaymgnac ngcngtntgy aargcngtng cnggnaarcc ngcngcnear 600
athwsntgga thccngargg ngaytgygn acnaarcarg artaytggws naayggnacn 660
gtnacngtna arwsnacntg ycaytgggar gtncayaayg tnwsnacngt nacntgycay 720
gtnwsncayy tnacnggnaa yaarwsnytn tayathgary tnytnccngt nccnggngcn 780
aaraarwsng cnaarynta yathccntay athathytna cnathathat hytnacnath 840
gtnggnnttya thtgyytny naargtnaay ggntgymgna artayaaryt naayaaracn 900
garwsnacnc cngtngtnga rgargaygar atgcarccnt aygcnwsnta yacngaraar 960
aayaayccny tntaygayac nacnaayaar gtnaargcnw sncargcnyt ncarwsngar 1020
gtngayacng ayytncaayac nytn 1044

20

30

40

<210> 22
<211> 813
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> Description of Unknown Organism:rodent; surmised

【化 2 7】

27

mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(810)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (76)..(810)

<400> 22

atg cat gct ctg ggg agg att ccg act ttg act ttg ctg atc ttc atc 48
 Met His Ala Leu Gly Arg Ile Pro Thr Leu Thr Leu Leu Ile Phe Ile
 -25 -20 -15 -10

aat att ttt gtg tct ggg tca agt tgt act gat gag aat caa aca ata 96
 Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser Ser Cys Thr Asp Glu Asn Gln Thr Ile
 -5 -1 1 5

cag aat gac agt tca tct tct ctg aca caa gtt aac act aca atg tct 144
 Gln Asn Asp Ser Ser Ser Ser Leu Thr Gln Val Asn Thr Thr Met Ser
 10 15 20

gta cag atg gat aaa aag gct ctg ctc tgc tgc ttt tct agt cca ctg 192
 Val Gln Met Asp Lys Lys Ala Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Pro Leu
 25 30 35

ata aat gca gta tta atc aca tgg ata ata aaa cac aga cac ctg cct 240
 Ile Asn Ala Val Leu Ile Thr Trp Ile Ile Lys His Arg His Leu Pro
 40 45 50 55

tcc tgc aca ata gca tac aac cta gat aaa aag acc aat gaa acc agc 288
 Ser Cys Thr Ile Ala Tyr Asn Leu Asp Lys Lys Thr Asn Glu Thr Ser
 60 65 70

tgc ttg ggc agg aac atc acc tgg gcc tcc aca cct gac cac agt cct 336
 Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro Asp His Ser Pro
 75 80 85

gaa ctt cag atc agt gca gtg gcc ctc cag cat gag ggg act tac aca 384
 Glu Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala Leu Gln His Glu Gly Thr Tyr Thr
 90 95 100

tgt gag ata gta aca cct gaa ggg aat tta gaa aaa gtc tat gac ctc 432
 Cys Glu Ile Val Thr Pro Glu Gly Asn Leu Glu Lys Val Tyr Asp Leu
 105 110 115

caa gtg ctg gtg ccc cct gag gta acc tac ttt cca ggg aaa aac aga 480
 Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Pro Gly Lys Asn Arg
 120 125 130 135

act gca gtc tgt gag gca atg gca ggc aag cct gct gca cag atc tct 528
 Thr Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser
 140 145 150

tgg act cca gat ggg gac tgt gtc act aag agt gag tca cac agc aat 576
 Trp Thr Pro Asp Gly Asp Cys Val Thr Lys Ser Glu Ser His Ser Asn
 155 160 165

10

20

30

40

【化 2 8】

28

ggc act gtg act gtc agg agc acg tgc cac tgg gag cag aac aat gtg 624
 Gly Thr Val Thr Val Arg Ser Thr Cys His Trp Glu Gln Asn Asn Val
 170 175 180

tct gtt gtg tcc tgc tta gtc tct cat tcg act ggt aat cag tct ctg 672
 Ser Val Val Ser Cys Leu Val Ser His Ser Thr Gly Asn Gln Ser Leu
 185 190 195

tcc ata gaa ctg agt caa ggt aca atg acc acc ccc cgt tcc ttg ctg 720
 Ser Ile Glu Leu Ser Gln Gly Thr Met Thr Thr Pro Arg Ser Leu Leu 10
 200 205 210 215

acc att ctc tat gtg aaa atg gcc ctt ttg gtg att att ctt ctt aac 768
 Thr Ile Leu Tyr Val Lys Met Ala Leu Leu Val Ile Ile Leu Leu Asn
 220 225 230

gta gga ttt gct ttc ttc cag aag aga aat ttt gcc aga aca tga 813
 Val Gly Phe Ala Phe Phe Gln Lys Arg Asn Phe Ala Arg Thr
 235 240 245

<210> 23
 <211> 270 20
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 23
 Met His Ala Leu Gly Arg Ile Pro Thr Leu Thr Leu Leu Ile Phe Ile
 -25 -20 -15 -10
 Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser Ser Cys Thr Asp Glu Asn Gln Thr Ile
 -5 -1 1 5
 Gln Asn Asp Ser Ser Ser Ser Leu Thr Gln Val Asn Thr Thr Met Ser
 10 15 20
 Val Gln Met Asp Lys Lys Ala Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Pro Leu 30
 25 30 35
 Ile Asn Ala Val Leu Ile Thr Trp Ile Ile Lys His Arg His Leu Pro
 40 45 50 55
 Ser Cys Thr Ile Ala Tyr Asn Leu Asp Lys Lys Thr Asn Glu Thr Ser
 60 65 70
 Cys Leu Gly Arg Asn Ile Thr Trp Ala Ser Thr Pro Asp His Ser Pro
 75 80 85
 Glu Leu Gln Ile Ser Ala Val Ala Leu Gln His Glu Gly Thr Tyr Thr 40
 90 95 100
 Cys Glu Ile Val Thr Pro Glu Gly Asn Leu Glu Lys Val Tyr Asp Leu
 105 110 115
 Gln Val Leu Val Pro Pro Glu Val Thr Tyr Phe Pro Gly Lys Asn Arg
 120 125 130 135
 Thr Ala Val Cys Glu Ala Met Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser
 140 145 150

【配列表】

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
	C 0 7 K 16/28	
(74)代理人 100062409 弁理士 安村 高明		
(74)代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹		
(72)発明者 エイ. ネイル バークレイ イギリス国 オーエックス4 1エルワイ オックスフォード, ミニスター ロード 44		
(72)発明者 マリオン エイチ. ブラウン イギリス国 オーエックス2 0ピーエイ オックスフォード, オスネイ, ブリッジ ストリート 28		
(72)発明者 ダニエル エム. ゴーマン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94560, ニューアーク, セントラル アベニュー 6371		
(72)発明者 ルイス エル. ラニア アメリカ合衆国 カリフォルニア 94024, ロス アルトス, フロンテロ アベニュー 1528		
(72)発明者 ギャビン ジェイ. ライト イギリス国 エイチディー7 2エクスピー ウェスト ヨークシャー, ハッダースフィールド, ホルムファース, ネザーソング, セント マリーズ クレセント 18		
(72)発明者 ホリー シェルウィンスキ アメリカ合衆国 カリフォルニア 95006, ボルダー クリーク, ツー バー ロード 17100		
(72)発明者 ジョセフ エイチ. フィリップス アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, ウォルナット ドライブ 1511		
(72)発明者 ロバート エム. ホーク アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040, マウンテン ビュー, ナンバー308, マウント パーモン コート 1943		
(72)発明者 ジョナサン ディー. セッジウィック アメリカ合衆国 カリフォルニア 94301, パロ アルト, ノース カリフォルニア アベニュー 365		
F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA43 CA04 CA12 DA06 EA04 GA03 4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 DD62 EE01 4H045 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA22 FA74		

【外国語明細書】

2012072186000001.pdf

专利名称(译)	OX 2受体同源物		
公开(公告)号	JP2012072186A	公开(公告)日	2012-04-12
申请号	JP2011289718	申请日	2011-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	医药研究委员会 先灵公司 先灵葆雅有限公司		
申请(专利权)人(译)	医学研究理事会 先灵公司		
[标]发明人	エイネイルパークレイ マリオンエイチブラウン ダニエルエムゴーマン ルイスエルラニアー ギャビンジェイライト ホリーシェルウインスキ ジョセフエイチフィリップス ロバートエムホーク ジョナサンディーセッジウィック		
发明人	エイ. ネイル パークレイ マリオン エイチ. ブラウン ダニエル エム. ゴーマン ルイス エル. ラニアー ギャビン ジェイ. ライト ホリー シェルウインスキ ジョセフ エイチ. フィリップス ロバート エム. ホーク ジョナサン ディー. セッジウィック		
IPC分类号	A61K39/395 A61P37/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P19/02 C12N15/09 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/50 A61K31/711 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P37/02 C12N15 /12 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37 /08 C07K14/705		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/06 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P19/02 C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/113.Z C12N15/12 C12N15/63.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6876.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	1999011123 1999-05-13 GB 1999025989 1999-11-03 GB		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：为称为OX2的配体提供新的受体同源物。解决方案：提供编码OX2的哺乳动物（例如灵长类）受体的核酸，纯化的蛋白质及其片段，以及抗体（多克隆和单克隆抗体）。提供了将该组合物用于诊断和治疗用途的方法。提供了用于调节生理功能或产生细胞或组织培养细胞的方法。该方法包括使细胞与哺乳动物OX2RH的激动剂或拮抗剂接触的过程。