

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-504044

(P2008-504044A)

(43) 公表日 平成20年2月14日 (2008.2.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-518705 (P2007-518705)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月1日 (2005.7.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年2月27日 (2007.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/002601
 (87) 国際公開番号 W02006/003422
 (87) 国際公開日 平成18年1月12日 (2006.1.12)
 (31) 優先権主張番号 0414798.9
 (32) 優先日 平成16年7月1日 (2004.7.1)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/586,513
 (32) 優先日 平成16年7月9日 (2004.7.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 0510253.8
 (32) 優先日 平成17年5月19日 (2005.5.19)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 503166469
 パラダイム・セラピューティクス・リミテッド
 イギリス国 シービー4 オービーケー ケンブリッジ, ミルトン ロード, ケンブリッジ サイエンス パーク 418
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

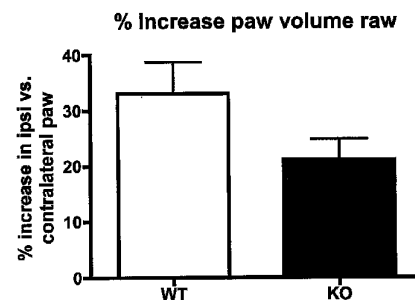
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GPR86受容体の使用

(57) 【要約】

本発明者らは、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に好適な分子の同定方法であって、候補分子がGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを判別することを含み、ただし先のGPR86ポリペプチドは配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列、その断片またはそれに少なくとも90%同一な配列を含む方法を開示する。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に好適な分子の同定方法であって、候補分子がGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを判別することを含み、ただし前記GPR86ポリペプチドは配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列、その断片またはそれに少なくとも90%同一な配列を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記GPR86ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2もしくは配列番号4に記載の核酸配列、またはそれに少なくとも90%同一な配列によりコードされる、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記候補分子をGPR86ポリペプチドに曝露すること、および該候補分子がGPR86ポリペプチドに結合するか否かを判別することを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

GPR86優先的Gタンパク質 G_i と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定すること、によりアゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項 5】

GPR86優先的Gタンパク質 G_i と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定すること、によりアンタゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

20

【請求項 6】

$G_{\alpha_{16}}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定すること、によりアゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項 7】

$G_{\alpha_{16}}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定すること、によりアンタゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

30

【請求項 8】

(a) 野生型動物または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物を用意すること；

(b) 前記野生型動物またはトランスジェニック非ヒト動物を候補分子に曝露すること；および

(c) 前記動物の生物学的パラメーターが前記接触の結果変化したか否かを測定することを含む、請求項1または2に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記生物学的パラメーターが、刺激への応答、熱への応答、光への応答、免疫応答、炎症反応、疼痛への応答、好ましくは疼痛への応答からなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

(a) 野生型細胞または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を含む細胞、好ましくは機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物から単離された細胞を用意すること；

(b) 前記細胞を候補分子に曝露すること；および

50

(c) GPR86ポリペプチドの生物学的活性が前記接触の結果変化したか否かを測定することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 1】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に用いるためのGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法における、野生型動物または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物の使用。

【請求項 1 2】

機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物またはその単離された細胞もしくは組織の、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛のモデルとしての使用。

【請求項 1 3】

前記トランスジェニック非ヒト動物が、機能破壊されたGPR86遺伝子、好ましくはGPR86遺伝子もしくはその一部分に欠失を有する機能破壊されたGPR86遺伝子を含む、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の使用または方法。

【請求項 1 4】

前記トランスジェニック非ヒト動物が、野生型動物と比較した場合に次の表現型のいずれか 1 つ以上：刺激への応答、熱への応答、光への応答、免疫応答、炎症反応、疼痛への応答、好ましくは疼痛への応答、に変化を示す、請求項 8 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の使用または方法。

【請求項 1 5】

前記トランスジェニック非ヒト動物が、少なくとも次の 1 つ：野生型動物と比較した場合の、(a)増加または減少した疼痛感受性である変更された疼痛感受性、および(b)増加または減少した炎症性疼痛感受性である変更された炎症性疼痛感受性、を示す、請求項 8 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の使用または方法。

【請求項 1 6】

前記トランスジェニック非ヒト動物が、齧歯類、好ましくはマウスである、請求項 8 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の使用または方法。

【請求項 1 7】

GPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法であって、候補化合物を請求項 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の野生型またはトランスジェニック非ヒト動物に投与すること、および請求項 9 に記載の生物学的パラメーターの変化を測定することを含む、前記方法。

【請求項 1 8】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防のためのGPR86のアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列、その断片またはそれに少なくとも90%同一な配列を含むGPR86ポリペプチドの使用。

【請求項 1 9】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防のためのGPR86のアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための、配列番号 1、配列番号 2 もしくは配列番号 4 に記載の核酸配列、もしくはその断片、またはそれに少なくとも90%同一な配列を含むGPR86ポリヌクレオチドの使用。

【請求項 2 0】

疼痛が、急性疼痛、慢性疼痛、皮膚疼痛、体性痛、内臓痛、心筋虚血、幻肢痛(phantom pain)、および神経因性疼痛(神経痛)を含む遠隔痛、損傷、疾患に起因する疼痛、頭痛、偏頭痛、癌疼痛、パーキンソン病のような神経障害に起因する疼痛、脊椎および末梢神経手術、脳腫瘍、外傷性脳損傷(TBI)、脊髄外傷、慢性疼痛症候群、慢性疲労症候群に起因する疼痛、三叉神経痛、舌咽神経痛、ヘルペス後神経痛、およびカウザルギーなどの神経痛、狼瘡、サルコイドーシス、くも膜炎、関節炎、リウマチ性疾患、生理痛、背痛、腰痛、関節痛、腹痛、胸痛、陣痛、骨格筋疾患および皮膚病、頭部外傷、ならびに線維筋痛の

10

20

30

40

50

いずれかにより生じる疼痛からなる群より選択される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

炎症性疾患が炎症性障害から選択され、好ましくは炎症性疾患(例えば慢性関節リウマチ、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、移植片対宿主拒絶反応、全身性エリテマトーデスまたはインスリン依存性糖尿病)、自己免疫疾患(例えば毒素性ショック症候群、変形性関節症、糖尿病または炎症性腸疾患)、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、接触皮膚炎、アテローム動脈硬化症、糸球体腎炎、再灌流障害、骨吸収障害、喘息、卒中、心筋梗塞、熱傷、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、外傷に続発する多器官障害、急性炎症性成分を伴う皮膚病、急性化膿性髄膜炎、壊死性腸炎、血液透析に付随する症候群、敗血症ショック、白血球搬出法、顆粒球輸血、煙吸入により引き起こされる肺の急性または慢性炎症、子宮内膜症、ベーチェット病、ブドウ膜炎、強直性脊椎炎、肺炎、癌、ライム病、経皮経管冠状動脈形成に続く再狭窄、アルツハイマー病、外傷性関節炎、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、うっ血性心不全、骨粗鬆症、悪液質、パーキンソン病、歯周病、痛風、アレルギー疾患、加齢性黄斑変性症、感染および膿胞性線維症から成る群より選択される、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法または使用により同定されたGPR86のアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項 23】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和のための、請求項 22 に記載の分子の使用。

20

【請求項 24】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患もしくは疼痛またはそれに対する易罹患性を診断するキットであって、次のいずれか 1 以上：GPR86ポリペプチドまたはその一部分；GPR86ポリペプチドに対する抗体；またはこうしたものをコードしうる核酸、を含む前記キット。

【請求項 25】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患もしくは疼痛を患っている個体の治療方法であって、前記個体におけるGPR86ポリペプチドの活性または量を増加または減少させることを含む前記方法。

30

【請求項 26】

GPR86ポリペプチド、GPR86ポリペプチドのアゴニストまたはGPR86のアンタゴニストを前記個体に投与することを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

GPR86関連疾患、特に炎症性疾患もしくは疼痛の診断方法であって、次のステップ：

(a) こうした疾患に罹患しているかまたは罹患している疑いのある動物におけるGPR86ポリペプチドの発現レベルまたは発現パターンを検出すること；および

(b) 該発現レベルまたは発現パターンを正常動物のそれと比較すること、を含む前記方法。

40

【請求項 28】

図 1 ~ 7 を参照しそれらに示されている、本明細書に実質的に記載された方法または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本発明は、核酸の新しく同定された機能、それによりコードされるポリペプチド、およびその産生と使用に関する。より詳細には、該核酸およびポリペプチドは、以下「GPR86」と言うあるGタンパク質共役型受容体(GPCR)、およびGPCRのプリノセプターファミリーのメンバーに関する。本発明はまた、こうした核酸およびポリペプチドの作用の阻害また

50

は活性化にも関する。

【背景技術】

【0002】

背景

多くの医学的に重要な生物学的プロセスは、Gタンパク質および/または第2メッセンジャー、例えばcAMPが関係するシグナル伝達経路に關与するタンパク質により仲介されることはよく知られている(Lefkowitz, Nature, 1991, 351: 353-354)。こうしたタンパク質のことを、Gタンパク質を有する経路に關与するタンパク質、または「PPGタンパク質」と言う。こうしたタンパク質のいくつかの例としては、GPC受容体、例えばアドレナリン作動薬およびドーパミンの受容体(Kobilka, B. K., ら, Proc. Natl Acad. Sci., USA, 1987, 84: 46-50; Kobilka B. K., ら, Science, 1987, 238: 650-656; Bunzow, J. R., ら, Nature, 1988, 336: 783-787)、Gタンパク質それ自体、エフェクタータンパク質、例えばホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ、ならびにアクチユエータータンパク質、例えばタンパク質キナーゼAおよびタンパク質キナーゼC (Simon, M. I., ら, Science, 1991, 252: 802-8)が挙げられる。

【0003】

例えば、シグナル伝達のある様式では、ホルモン結合の効果は、細胞内での酵素アデニル酸シクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素活性化は、ヌクレオチドGTPの存在に依存する。GTPはホルモン結合にも影響を及ぼす。Gタンパク質は、ホルモン受容体をアデニル酸シクラーゼに連結させる。Gタンパク質は、ホルモン受容体により活性化されると、GTPを結合型GDPと交換することが示されている。該GTP担持形態は次に活性化アデニル酸シクラーゼに結合する。Gタンパク質自身により触媒されるGTPのGDPへの加水分解は、Gタンパク質をその基底の不活性形態に戻す。このようにGタンパク質は二重の役割、受容体からのシグナルをエフェクターに中継する中間体としての役割およびシグナルの持続時間を制御する時計としての役割を果たす。

【0004】

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の膜タンパク質遺伝子スーパーファミリーは、7つの推定膜貫通ドメインを有すると特徴付けされている。ドメインは細胞外ループまたは細胞質ループにより接続されている膜貫通型 α -ヘリックスに相当すると考えられている。Gタンパク質共役型受容体には、広い範囲の生物学的に活性な受容体、例えばホルモン、ウイルス、増殖因子および神経の受容体が含まれる。

【0005】

Gタンパク質共役型受容体(7TM受容体としても知られている)は、これらの7つの保存された疎水性で約20~30アミノ酸のストレッチを含み、それらが少なくとも8つの異なる親水性ループに接続している、と特徴付けされている。共役型受容体のGタンパク質ファミリーには、精神障害および神経障害の治療に使用される神経遮断薬に結合するドーパミン受容体が含まれる。このファミリーの他のメンバーの例としては、限定するものではないが、カルシトニン、アドレナリン作動薬、エンドセリン、アデノシン、ムスカリン様作用薬、セロトニン、ヒスタミン、トロンビン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子-1、ロドプシン、におい物質、およびサイトメガロウイルスの受容体が挙げられる。

【0006】

殆どのGタンパク質共役型受容体は、最初の2つの細胞外ループにそれぞれ単一の保存されたシステイン残基を有し、それらはジスルフィド結合を形成して機能的なタンパク質構造を安定化すると考えられている。7つの膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、およびTM7と命名されている。TM3はシグナル伝達に関わるとされている。

【0007】

システイン残基のリン酸化および脂質化(パルミチン酸化またはファルネシル化)は、いくつかのGタンパク質共役型受容体のシグナル伝達に影響を及ぼしうる。殆どのGタンパク質共役型受容体は、潜在的リン酸化部位を第3細胞質側ループおよび/またはカルボキシ

末端に有する。いくつかのGタンパク質共役型受容体、例えば β アドレナリン受容体については、タンパク質キナーゼAおよび/または特異的受容体キナーゼによるリン酸化が受容体脱感作を仲介する。いくつかの受容体については、Gタンパク質共役型受容体のリガンド結合部位は、複数のGタンパク質共役型受容体の膜貫通ドメインにより形成される親水性ソケットを含み、該ソケットはGタンパク質共役型受容体の疎水性残基に囲まれていると考えられている。各Gタンパク質共役型受容体膜貫通ヘリックスの親水性側面は内側を向いていて極性のリガンド結合部位を形成すると考えられている。TM3は複数のGタンパク質共役型受容体においてリガンド結合部位(例えばTM3アスパラギン酸残基)を有することにより関わっている。TM5セリン、TM6アスパラギンおよびTM6またはTM7フェニルアラニンもしくはチロシンもリガンド結合に関わっている。

10

【0008】

Gタンパク質共役型受容体は、ヘテロ三量体Gタンパク質により細胞内で種々の細胞内酵素、イオンチャネルおよび輸送体に共役されうる(Johnsonら, Endoc. Rev., 1989, 10: 317-331を参照されたい)。種々のGタンパク質 α サブユニットは、特定のエフェクターを選択的に刺激して、細胞内での種々の生物学的機能をモジュレートする。Gタンパク質共役型受容体の細胞質残基のリン酸化は、一部のGタンパク質共役型受容体のGタンパク質共役の調節に重要な機構であることが特定されている。Gタンパク質共役型受容体は、哺乳動物宿主内では多数の部位に存在する。ここ15年間に渡り、7回膜貫通型(7 TM)受容体を標的とするおよそ350にも達する治療薬が成功裏に市場に導入された。

20

【非特許文献1】Lefkowitz, Nature, 1991, 351: 353-354

【非特許文献2】Kobilka, B. K., et al., Proc. Natl Acad. Sci., USA, 1987, 84: 46-50

【非特許文献3】Kobilka B. K., et al., Science, 1987, 238: 650-656

【非特許文献4】Bunzow, J. R., et al., Nature, 1988, 336: 783-787

【非特許文献5】Simon, M. I., et al., Science, 1991, 252: 802-8

【非特許文献6】Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10: 317-331

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

このことから、Gタンパク質共役型受容体には、治療薬のターゲットとしての定評のある、証明された歴史がある。明らかに、機能障害または疾患の予防、改善または修正に役割を果たしうるさらなる受容体の同定と特徴付けが必要とされている。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

概要

本発明の第1の態様において、本発明者らは、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に好適な分子の同定方法であって、候補分子がGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを判別することを含み、ただし前記GPR86ポリペプチドは配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列、その断片またはそれに少なくとも90%同一な配列を含む、前記方法を提供する。

40

【0011】

好ましくは、前記GPR86ポリペプチドは、配列番号1もしくは配列番号2もしくは配列番号4に記載の核酸配列、またはそれに少なくとも90%同一な配列によりコードされる。

【0012】

好ましくは、前記方法は、前記候補分子をGPR86ポリペプチドに曝露すること、および該候補分子がGPR86ポリペプチドに結合するか否かを決定することを含む。

【0013】

好ましくは、アゴニストは、GPR86優先的Gタンパク質 G_i と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)の

50

ようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定すること、により同定する。

【0014】

好ましくは、アンタゴニストは、GPR86優先的Gタンパク質 G_i と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定すること、により同定する。

【0015】

好ましくは、アゴニストは、 $G_{\alpha_{16}}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定すること、により同定する。

10

【0016】

好ましくは、アンタゴニストは、 $G_{\alpha_{16}}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定すること、により同定する。

【0017】

好ましくは、方法は、

(a) 野生型動物または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物を用意すること；

20

(b) 前記野生型動物またはトランスジェニック非ヒト動物を候補分子に曝露すること；および

(c) 前記動物の生物学的パラメーターが前記接触の結果変化したか否かを測定すること、を含む。

【0018】

好ましくは、前記生物学的パラメーターは、刺激への応答、熱への応答、光への応答、免疫応答、炎症反応、疼痛への応答、好ましくは疼痛への応答からなる群より選択される。

【0019】

30

好ましくは、方法は、

(a) 野生型細胞または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有する細胞、好ましくは機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物から単離された細胞を用意すること；

(b) 前記細胞を候補分子に曝露すること；および

(c) GPR86ポリペプチドの生物学的活性が前記接触の結果変化したか否かを測定すること、を含む。

【0020】

本発明の第2の態様において、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に用いるためのGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法における、野生型動物または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物の使用を提供する。

40

【0021】

機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物またはその単離された細胞もしくは組織の、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛のモデルとしての使用。

【0022】

好ましくは、前記トランスジェニック非ヒト動物は、機能破壊されたGPR86遺伝子、好ましくはGPR86遺伝子もしくはその一部分に欠失を有する機能破壊されたGPR86遺伝子、を含む。

50

【0023】

好ましくは、前記トランスジェニック非ヒト動物は、野生型動物と比較した場合に次の表現型のいずれか1つ以上に変化を示す：刺激への応答、熱への応答、光への応答、免疫応答、炎症反応、疼痛への応答、好ましくは疼痛への応答。

【0024】

好ましくは、前記トランスジェニック非ヒト動物は、少なくとも次の1つを示す：野生型動物と比較した場合の、(a)増加または減少した疼痛感受性である変更された疼痛感受性、および(b)増加または減少した炎症性疼痛感受性である変更された炎症性疼痛感受性。

【0025】

好ましくは、前記トランスジェニック非ヒト動物は、齧歯類、好ましくはマウスである。

【0026】

本発明者らは、本発明の第3の態様において、GPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法であって、先に記載したように候補化合物を野生型またはトランスジェニック非ヒト動物に投与すること、および生物学的パラメーターの変化を測定することを含む、前記方法を提供する。

【0027】

本発明の第4の態様として、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防のためのGPR86のアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための、配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列、その断片またはそれに少なくとも90%同一な配列を含むGPR86ポリペプチドの使用を提供する。

【0028】

本発明の第5の態様において、本発明者らは、GPR86関連疾患、特に炎症性疾患または疼痛の治療、予防のためのGPR86のアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための、配列番号1、配列番号2もしくは配列番号4に記載の核酸配列、その断片、またはそれに少なくとも90%同一な配列を含むGPR86ポリヌクレオチドの使用を提供する。

【0029】

好ましくは、疼痛は、急性疼痛、慢性疼痛、皮膚疼痛、体性痛、内臓痛、遠隔痛、これには心筋虚血、幻肢痛(phantom pain)、および神経因性疼痛(神経痛)も含まれる、損傷、疾患に起因する疼痛、頭痛、偏頭痛、癌疼痛、パーキンソン病のような神経障害に起因する疼痛、脊椎および末梢神経手術、脳腫瘍、外傷性脳損傷(TBI)、脊髄外傷、慢性疼痛症候群、慢性疲労症候群に起因する疼痛、三叉神経痛、舌咽神経痛、ヘルペス後神経痛、およびカウザルギーなどの神経痛、次のいずれか：狼瘡、サルコイドーシス、くも膜炎、関節炎、リウマチ性疾患、生理痛、背痛、腰痛、関節痛、腹痛、胸痛、陣痛、骨格筋疾患および皮膚病、頭部外傷、ならびに線維筋痛により生じる疼痛からなる群より選択される。

【0030】

好ましくは、炎症性疾患は炎症性障害から選択され、好ましくは次のものからなる群：炎症性疾患(例えば慢性関節リウマチ、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、移植片対宿主拒絶反応、全身性エリテマトーデスまたはインスリン依存性糖尿病)、自己免疫疾患(例えば毒素性ショック症候群、変形性関節症、糖尿病または炎症性腸疾患)、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、接触皮膚炎、アテローム動脈硬化症、糸球体腎炎、再灌流障害、骨吸収障害、喘息、卒中、心筋梗塞、熱傷、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、外傷に続発する多器官障害、急性炎症性成分を伴う皮膚病、急性化膿性髄膜炎、壊死性腸炎、血液透析に付随する症候群、敗血症ショック、白血球搬出法、顆粒球輸血、煙吸入により引き起こされる肺の急性または慢性炎症、子宮内膜症、ベーチェット病、ブドウ膜炎、強直性脊椎炎、膀胱炎、癌、ライム病、経皮経管冠状動脈形成に続く再狭窄、アルツハイマー病、外傷性関節炎、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、うっ血性心不全、骨粗鬆症、悪液質、パーキンソン病、歯周病、痛風、アレルギー疾患、加齢性黄斑変性症、感染および膿胞性線維症より選択される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

本発明は、第 6 の態様において、本明細書に記載の方法または使用により同定された GPR86 のアゴニストまたはアンタゴニストを提供する。

【 0 0 3 2 】

本発明の第 7 の態様において、炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和のためのかかる分子の使用を提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明の第 8 の態様において、本発明者らは、次のいずれか 1 以上：GPR86 ポリペプチドまたはその一部分；GPR86 ポリペプチドに対する抗体；またはこうしたものをコードする核酸、を含む炎症性疾患もしくは疼痛またはそれに対する易罹患性のための診断キットを提供する。

10

【 0 0 3 4 】

本発明の第 9 の態様において、本発明者らは、炎症性疾患もしくは疼痛を患っている個体の治療方法であって、前記個体における GPR86 ポリペプチドの活性または量を増加または減少させることを含む前記方法を提供する。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、該方法は、GPR86 ポリペプチド、GPR86 ポリペプチドのアゴニストまたは GPR86 のアンタゴニストを前記個体に投与することを含む。

【 0 0 3 6 】

本発明の第 10 の態様において、炎症性疾患もしくは疼痛の診断方法であって、次のステップ：

20

(a) かかる疾患に罹患しているかまたは罹患している疑いのある動物における GPR86 ポリペプチドの発現レベルまたは発現パターンを検出すること；および

(b) 該発現レベルまたは発現パターンを正常動物のそれと比較すること、を含む前記方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

配列表

配列番号 1 はヒト GPR86 の cDNA 配列を示す。配列番号 2 は、配列番号 1 から誘導されたオープンリーディングフレームを示す。配列番号 3 はヒト GPR86 のアミノ酸配列を示す。配列番号 4 はマウス GPR86 由来の cDNA のオープンリーディングフレームを示す。配列番号 5 はマウス GPR86 のアミノ酸配列を示す。配列番号 6 は、ヒト GPR86 の別の cDNA 配列を示す。配列番号 7 はヒト GPR86 の別のアミノ酸配列を示す。配列番号 8 ~ 20 はノックアウトプラスミドのプライマー配列を示す。配列番号 21 はノックアウトプラスミドの配列を示す。

30

【 0 0 3 8 】

使用する方法

本発明の実施には、特に断らない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換え DNA 技術および免疫学の慣用技術を用いるが、これらは当業者の能力の範囲内にある。こうした技術は刊行物に解説されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, 1-3 巻, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. ら (1995 および定期的補完物; Current Protocols in Molecular Biology, 第 9, 13, および 16 章, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O' D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (編者), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; Using Antibodies : A Laboratory Manual : Portable Protocol NO. 1 by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); Antibodies : A Laboratory Manual by Ed Harlow (編者), David Lane (編者) (198

40

50

8, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855, Lars-Inge Larsson “Immunocytochemistry: Theory and Practice”, CRC Press inc., Boca Raton, Florida, 1988, ISBN 0-8493-6078-1, John D. Pound (編); “Immunochemical Protocols, vol 80”, in the series: “Methods in Molecular Biology”, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998, ISBN 0-89603-493-3, Handbook of Drug Screening, Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes編集(2001, New York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Jane Roskams and Linda Rodgers編集, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3; およびThe Merck Manual of Diagnosis and Therapy (第17版, Beers, M. H., and Berkow, R, 編, ISBN: 0911910107, John Wiley & Sons)を参照されたい。これらの一般的教材をそれぞれ参照により本明細書に組み入れる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

詳細な説明

GPR86

本明細書は、大まかにGタンパク質共役型受容体(GPCR)、特に本発明者らがGPR86と呼ぶプリノセプター型Gタンパク質共役型受容体、ならびにそのホモログ、変異体または誘導体を記載する。

【0040】

20

本発明者らは、機能性GPR86を欠いたトランスジェニック動物が、野生型動物と比べて変更された疼痛感受性を示すことを特定した。詳細には、GPR86ノックアウト体は疼痛感受性が低下している。さらに、こうした動物は変更された炎症性疼痛感受性、特に低下した炎症性疼痛感受性を示す。

【0041】

従って、本発明者らは、疼痛の治療、軽減、または診断におけるGPR86、そのホモログ、変異体または誘導体、ならびにそのモジュレーターの使用を開示する。このことと本発明の他の実施形態とを以下にさらに詳述する。

【0042】

GPR86の発現プロフィール

30

GPR86 cDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により、GPR86の発現はヒト由来組織の骨髄、胸腺、リンパ節、白血球、骨芽細胞および軟骨細胞において種々の量で検出される。該発現は、ヒト由来細胞系Jurkat CD4+およびMyl4 CD8+(いずれもT細胞由来)にも見られた。低レベルの発現はColo720(リンパ球由来)およびTHP1細胞(単球由来)に見られた(実施例4;図7)。

【0043】

さらに、GPR86の発現は、マウス組織の脾臓、唾液腺、脊髄、舌、脂肪組織(adipose)、精巣、心臓、眼、肺、腎臓、胸腺、胃および小腸、脳、肝臓および胆嚢、血液、膀胱ならびに副腎においても検出された(実施例4;図8)。

【0044】

40

GPR86の発現プロフィールを図3に示す。

【0045】

配列番号1および6のGPR86 cDNAを用いてBLASTNでヒトESTデータソースを検索すると、ヒト心臓、胎盤、および結腸、ならびにマウス皮膚、乳房および視床下部に由来するライブラリー由来のcDNAに同一物が見出された。このことは、GPR86がこれらの正常組織または異常組織で発現されることを示す。従って、GPR86ポリペプチド、核酸、プローブ、抗体、発現ベクターおよびリガンドは、これらの組織および他の組織におけるGPR86の過剰発現、過小発現および異常発現に関連する疾患の検出、診断、治療および他のアッセイに有用である。

【0046】

50

GPR86関連疾患

本明細書に記載の方法および組成物について、GPR86 GPCRはある範囲の疾患の治療および診断に有用である。こうした疾患のことを便宜上「GPR86関連疾患」と言う。

【0047】

従って、GPR86欠失動物はGPR86関連疾患のモデルとして使用することができる。GPR86、その断片、ホモログ、変異体および誘導体、ならびにモジュレーター(特にアゴニストおよびアンタゴニストも含まれる)は、GPR86関連疾患の診断または治療に使用可能である。特にGPR86はその機能に影響を及ぼすことのできる分子のスクリーニングに使用可能であり、該分子はGPR86関連疾患の治療に使用することができる。

【0048】

本発明者らは、ヒトGPR86がホモ・サピエンス染色体3q24にマッピングされることを本明細書で実証した。従って、特定の実施形態において、GPR86は、この遺伝子座、染色体バンド、領域、アームまたは同一染色体にマッピングされる疾患を治療または診断するために使用することができる。

【0049】

GPR86の染色体位置(すなわち、ホモ・サピエンス染色体3q24)と同じ遺伝子座、染色体バンド、領域、アームまたは染色体に関連することが解明されている既知の疾患としては次のものが挙げられる(位置は括弧内): 急性骨髄性白血病(3q24)、ハーマンスキー・パドラック症候群(3q24)、血小板ADP受容体異常(3q24-q25)およびダンディー・ウォーカー症候群(3q24)。

【0050】

従って、好ましい実施形態において、GPR86およびそのモジュレーター(アゴニストやアンタゴニストなど)は、本明細書に記載の任意の手段を用いて、ドーパミン関連疾患、例えばパーキンソン病、心疾患、例えば上室性不整脈または心室性不整脈、低血圧、吐気、トゥレット症候群、ストレスおよび疼痛を診断または治療するために使用することができる。

【0051】

GPR86を欠いたノックアウトマウスは、実施例に示したように、一連の表現型を示す。

【0052】

特に、実施例5および図4は、テールフリックテスト(Tail Flick test)でテストした場合、機能性GPR86を欠いたノックアウト動物が野生型動物と比較して外的刺激および疼痛に対して感受性が低下していることを示す。同様に、実施例7および図6は、Von Frey Hairテストでテストした場合、機能性GPR86を欠いたノックアウト動物が野生型動物と比較して外的刺激および疼痛に対して感受性が低下していることを示す。

【0053】

従って、本発明の好ましい実施形態において、GPR86およびそのモジュレーター(アゴニストやアンタゴニストなど)は、本明細書に記載の任意の手段を用いて、疼痛および癌を診断または治療するために使用することができる。特に、疼痛には、神経因性、ヘルペス後神経痛、糖尿病性神経痛、三叉神経痛、アルコール(エタノール)関連神経痛、ハンセン病の神経痛、脈管性神経痛、尿毒性神経痛、ギラン・バレー症候群、多発性硬化症、急性免疫神経障害、胸郭出口症候群、手根管症候群、足根管症候群、知覚異常性大腿神経痛、複合性局所疼痛症候群、顎関節症候群、異型顔面痛、腰痛、腰椎狭窄症、椎間板疾患、頸痛、頸部脊椎症骨髄神経障害、頸部脊椎症、頸部椎間板疾患、頸部筋膜疼痛(cervical myelofacial pain)、炎症性疼痛、変形性関節症、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患が含まれる。癌の疼痛、特に癌には乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌および骨肉腫が含まれる。頭痛、偏頭痛、緊張性偏頭痛、群発性偏頭痛、慢性発作性片頭痛も含まれ、同様に内臓痛、月経困難症、非消化器性消化不良、非心因性胸痛、過敏性腸症候群、幻直腸痛(phantom rectum pain)、温熱性痛覚過敏および術後疼痛も含まれる。

【0054】

さらに、本発明者らは、実施例において、GPR86が免疫応答細胞由来の細胞中でも発現

10

20

30

40

50

されていることを実証した(実施例3および4)。機能性GPR86を欠いたトランスジェニック動物は、実施例6および図5に示すように炎症傾向の減少を示す。このことは、GPR86が、炎症反応(疼痛の炎症性および神経因性の側面に関連するものを含む)に関わっていることを示す。

【0055】

別の態様において、GPR86およびそのモジュレーター(アゴニストやアンタゴニストなど)は、本明細書に記載の任意の手段を用いて、炎症性疾患(例えば慢性関節リウマチ、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、移植片対宿主拒絶反応、全身性エリテマトーデスまたはインスリン依存性糖尿病)、自己免疫疾患(例えば毒素性ショック症候群、変形性関節症、糖尿病または炎症性腸疾患)、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、接触皮膚炎、アテローム動脈硬化症、糸球体腎炎、再灌流障害、骨吸収障害、喘息、卒中、心筋梗塞、熱傷、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、外傷に続発する多器官障害、急性炎症性成分を伴う皮膚病、急性化膿性髄膜炎、壊死性腸炎、血液透析に付随する症候群、敗血症ショック、白血球搬出法、顆粒球輸血、煙吸入により引き起こされる肺の急性または慢性炎症、子宮内膜症、ベーチェット病、ブドウ膜炎、強直性脊椎炎、膵炎、癌、ライム病、経皮経管冠状動脈形成に続く再狭窄、アルツハイマー病、外傷性関節炎、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、うっ血性心不全、骨粗鬆症、悪液質、パーキンソン病、歯周病、痛風、アレルギー疾患、加齢性黄斑変性症、感染および膿毒性線維症、を診断または治療するために使用することができる。

10

【0056】

便宜上、GPR86の使用により治療および/または診断することのできる疾患を「GPR86関連疾患」と言う。特に好ましい実施形態において、GPR86関連疾患には症状として疼痛を伴うもの(上の段落を参照されたい)が含まれる。

20

【0057】

上述のように、GPR86およびそのモジュレーター(アゴニストやアンタゴニストなど)は、本明細書に記載の任意の方法および組成物を用いて、任意のこれらの特定の疾患を診断および/または治療するために使用することができる。

【0058】

特に、本発明者らは、上述の特定の疾患の治療または診断のための、核酸、GPR86核酸を含むベクター、ポリペプチド(そのホモログ、変異体または誘導体を含む)、GPR86核酸および/またはポリペプチドを含む医薬組成物、宿主細胞ならびにトランスジェニック動物の使用を想定する。さらに、本発明者らは、上述の特定の疾患の治療または診断における、GPR86と相互作用するまたはそれに結合しかつ内在性cAMPのレベルを変更することのできる化合物の使用、GPR86に対する抗体、ならびにこれらの製造方法または同定方法を想定する。特に、本発明者らは、任意のこれらの化合物、組成物、分子などの、前記特定疾患の治療または予防のためのワクチンの製造における使用を包含する。本発明者らはまた、個体における前記特定疾患の検出のための診断キットを開示する。

30

【0059】

GPR86の使用により治療または診断することのできるこうした前記特定疾患またはさらなる特定の疾患を同定するための連鎖地図法は当技術分野で知られており、本明細書中に別途記載する。

40

【0060】

疼痛

GPR86およびその変異体ならびにそれらをコードする配列、それに対する抗体など本明細書に記載のものを、疼痛に関連する多くの疾患の診断および/または治療に使用することができる。

【0061】

急性疼痛

急性疼痛とは、短期的疼痛または容易に特定できる原因のある疼痛と定義される。急性疼痛は、組織または疾患に対するその時の損傷を体が警告しているものである。急性疼痛

50

は多くの場合、迅速で鋭く、うずく痛みがそれに続く。急性疼痛はある領域に集中しその後いくらか広がる。

【 0 0 6 2 】

慢性疼痛

慢性疼痛とは6ヶ月以上継続した疼痛と医学的に定義される。この持続性のまたは断続性の疼痛は多くの場合、体が損傷を予防するのを助けないため、時を経てその目的を失っている。慢性疼痛は多くの場合、急性疼痛よりも治療するのが困難である。一般には、あらゆる慢性化してしまった疼痛を治療するには熟練した看護が必要である。長期間オピオイドが使用される場合、薬物耐性、薬物依存症および心理的中毒症さえも生じうる。オピオイド使用者において薬物耐性および薬物依存症は一般的であるが、心理的中毒症は希である。

10

【 0 0 6 3 】

生理学的疼痛の体験は、発生源および関与する侵害受容器(疼痛感知神経)に応じて4つのカテゴリーに分類することができる。

【 0 0 6 4 】

皮膚疼痛

皮膚疼痛は、皮膚または表面組織への損傷によって引き起こされる。皮膚侵害受容器は皮膚の直ぐ下で終結しており、神経終末の密度が高いことから、明確で局在性の短期間の疼痛が生じる。皮膚疼痛を生じる損傷の例には、ペーパーカット、軽い熱傷(第1度)、および裂傷が含まれる。

20

【 0 0 6 5 】

体性痛

体性痛は、靱帯、腱、骨、血管および神経そのものさえもが起源であり、体性痛侵害受容器により感知される。こうした領域における疼痛受容体の希少性ゆえに、皮膚疼痛よりも持続時間の長い、鈍く、局在のはっきりしない疼痛が生じる；例としては足関節ねんざや骨折が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

内臓痛

内臓痛は、身体器官および内部空洞内に位置する身体器官の内臓侵害受容器が起源である。こうした領域において侵害受容器はさらに希少であることから、体性痛よりも疼(うず)きかつ持続時間の長い疼痛が生じる。内臓痛は場所を特定するのが極めて困難であり、内臓組織への複数の損傷は「遠隔痛」という、損傷の部位と全く関連しない領域に前記感覚が限定される痛みを示す。心筋虚血(心筋組織の一部への血流の喪失)は、おそらく遠隔痛の最もよく知られた例である；前記感覚は胸郭上部に束縛された感覚として、または左肩、腕または時には手に、疼きとして生じうる。

30

【 0 0 6 7 】

他の種類の疼痛

幻肢痛とは、もはやないまたはもはやそこから物理的シグナルの来ない肢からの疼痛感覚であり、これは肢切断者および四肢麻痺者がほぼ例外なく訴える体験である。神経因性疼痛(「神経痛」)は、神経組織そのものの損傷または疾患の結果生じうる。これは、感覚神経が視床に正しい情報を伝達する機能を妨害する可能性があり、それ故に脳は明らかまたは確認された生理学的疼痛原因がないにも関わらず疼痛性刺激を読み取る。

40

【 0 0 6 8 】

三叉神経痛(「疼痛性チック」)とは、三叉神経の損傷または障害によって引き起こされる疼痛を言う。三叉神経は3つの分枝を有する：V1は額と目の領域に感覚を付与し、またV2は鼻および顔面に感覚を付与し、そしてV3は顎および顎先領域に感覚を付与する。顔面のどちら側にも感覚を提供する三叉神経がある。三叉神経痛の一方だけの痛みは、頬、口、鼻および/または顎筋にまで及びうる。三叉神経痛は一般に高齢者を侵すが、若齢者または多発性硬化症を有する者も三叉神経痛を経験しうる。

【 0 0 6 9 】

50

三叉神経痛の主な症状は、額、頬、顎先または下顎輪郭のいずれかにおける疼痛である。深刻な症例では3つの領域全てまたは左右両側が影響を受けうる。疼痛の発作は、激しく、痙攣性かつ短期であり、電気ショックとでも感じられるものと似ていると述べられる。この疼痛は一般的な日常活動、例えば歯磨き、会話、咀嚼、飲むこと、髭剃り、または接吻によってさえも誘発されうる。疼痛発作の頻度は時間と共に増加し、より妨害的で無能化させるものになる。

【0070】

舌咽神経痛とは、舌咽神経の感覚分布域における疼痛の突発を特徴とする病型である。疼痛の位置および疼痛の刺激因子を除き、発作は三叉神経痛と同一である。典型的な疼痛は、扁桃腺または舌の裏の領域の片側における、激しく、刺すような、反復的な一連の電撃様の突き刺しである。さらに疼痛は耳に放散するかまたは耳を起源としうる。

10

【0071】

この疼痛を誘発する感覚刺激は嚥下であり、そして激しい発作において患者は座ったまま動かず、頭を前に曲げ、唾液が口からそのまま垂れるにまかせることがある。心臓停止、気絶(失神)、および発作(seizure)は、舌咽神経痛の発作(attack)と関連づけられている。舌咽神経痛の原因は殆どの場合不明である。しかしながら、特定数の症例は、腫瘍、椎骨動脈による舌咽神経の圧迫および血管奇形に帰される。

【0072】

ヘルペス後神経痛とは、帯状ヘルペスウイルスの感染後に続く慢性疼痛を言う。帯状ヘルペスは、帯状疱疹とも呼ばれるが、水痘帯状疱疹(水痘)ウイルス感染の反復的感染である。このウイルスは患者の免疫系が衰弱するまで神経内に潜伏状態で留まる。帯状疱疹の急性障害は疼痛を引き起こすが、その疼痛は通常治る。しかしながら、一部の患者では疼痛が慢性的に続く - これがヘルペス後神経痛である。

20

【0073】

帯状ヘルペスの症状には、電撃的で、深部の、連続的疼痛が含まれる：疼痛は胸部に65%および顔面に20%である。顔面に関わる場合、ウイルスの好発部位は三叉神経の眼分枝(まゆ毛の上の顔の頂部)である。疼痛は通常2~4週間で自然に消散する。しかしながら、少数の患者は持続性の痛みを有する。疼痛は、先の発疹の領域にあり、冒された皮膚をそっと撫でることにより悪化し、その領域に圧力を加えることにより緩和される。衣服の摩擦は多くの場合非常に痛い。この持続する疼痛のことをヘルペス後神経痛と呼ぶ。顔に及ぶ帯状ヘルペスの症例では、ヘルペス後神経痛の罹患率がより高い。

30

【0074】

カウザルギーは末梢神経の部分的な損傷後の希な症状である。該疼痛は、灼熱痛、自律神経機能障害、および栄養変化の三つを特徴とする。深刻な症例は、メジャーカウザルギーと呼ばれる。マイナーカウザルギーは、さほど深刻ではない形態の、反射交感神経性ジストロフィー(RSD)に類似したものを表す。RSDは優勢な筋肉および関節の症状を伴い、X線上では骨粗鬆症がよく見られる。

【0075】

カウザルギーは末梢神経損傷、通常は腕神経叢損傷により引き起こされる。除神経は過敏性を引き起こし結果として疼痛が増し、また、ノルエピネフリン放出の増大は交感神経の所見を引き起こす。症状としては疼痛：通常灼熱性でかつ手または足に目立つ疼痛が挙げられる。大部分の発症は、損傷から24時間以内である。正中神経、尺骨神経および坐骨神経が最も頻繁に関連する。ほとんどあらゆる感覚刺激が疼痛を悪化させる。血管変化：血管拡張による血液増加(暖かくピンク色)または血管収縮による血液減少(冷たく、まだらな青)。栄養変化：乾燥/鱗状皮膚、硬直した関節、先細りの指、硬直した切られていない爪、長い/硬い毛髪または毛髪の喪失、発汗変更。

40

【0076】

GPR86との同一性および類似性

GPR86は、Gタンパク質共役型受容体ファミリーの他のタンパク質と構造的に関連しており、このことはヒトGPR86をコードする増幅されたcDNA産物を配列決定した結果に示され

50

た通りである。配列番号1のcDNA配列はオープンリーディングフレーム(配列番号2、ヌクレオチド番号19~1084)を含み、これは配列番号3に示す354アミノ酸のポリペプチドをコードする。ヒトGPR86がホモ・サピエンス染色体3q24にマッピングされることを見出した。配列番号6の別のcDNAは、配列番号7に記載のポリペプチドをコードする。

【0077】

P2Y12血小板ADP受容体[ホモ・サピエンス]同一性 = 154/316 (48%)、陽性 = 211/316 (66%)

KIAA0001推定Gタンパク質共役型受容体; UDP-グルコースに対するGタンパク質共役型受容体; 同一性 = 140/295 (47%)、陽性 = 193/295 (64%)

血小板活性化受容体ホモログ[ホモ・サピエンス]; 同一性 = 42/144 (29%)、陽性 = 78/144 (54%)。 10

【0078】

pfamのHMM構造予測ソフトウェア (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>)を用いたGPR86ポリペプチド(配列番号3)の解析から、GPR86ペプチドは7TM-1構造クラスのGPCRであることが確認された(図1を参照)。

【0079】

ヒトGPR86のマウスホモログはクローニングされ、その核酸配列およびアミノ酸配列は配列番号4および配列番号5にそれぞれ示されている。配列番号4のマウスGPR86 cDNAは、ヒトGPR86(配列番号2)配列と高度の同一性を示し、また一方マウスGPR86のアミノ酸配列(配列番号5)はヒトGPR86(配列番号3および配列番号7)と高度の同一性および類似性を示す。 20

【0080】

ヒトおよびマウスGPR86は従って、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の大きなファミリーのメンバーである。

【0081】

GPR86ポリペプチド

本明細書において用いる、「GPR86ポリペプチド」という用語は、配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体を言うことを意図したものである。好ましくは該ポリペプチドは、配列番号3もしくは配列番号7に記載の配列を含むかまたはそのホモログ、変異体または誘導体である。最も好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号7に示す配列を含むかまたはそのホモログ、変異体または誘導体である。 30

【0082】

「ポリペプチド」とは、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわちペプチドイソスター(isostere)により互いに結合した2以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質のことを言う。「ポリペプチド」は、多くの場合ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般にタンパク質と呼ばれる長鎖の両方を言う。ポリペプチドは、いわゆる遺伝子によりコードされる20種のアミノ酸以外のアミノ酸をも含む。 40

【0083】

「ポリペプチド」は、天然のプロセス、例えば翻訳後プロセッシングにより、または化学的修飾法(当技術分野ではよく知られている)により修飾されたアミノ酸配列を含む。こうした修飾は基礎的教材、およびより詳細なモノグラフ、ならびに巻数の多い研究文献に詳しく記載されている。修飾はポリペプチド中のどこに起こってもよく、これにはペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシ末端も含まれる。同じ種類の修飾が所定のポリペプチドにおいて複数の部位で同一または異なる程度に成され得ると理解されよう。また、所定のポリペプチドは多種類の修飾を有しうる。

【0084】

ポリペプチドはユビキチン化の結果分枝し得る、また分枝を伴ってまたは伴うことなく環状であり得る。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドは、天然の翻訳後プロセシ 50

ングの結果生じ得るか、または合成法により作製され得る。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質または脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋化、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのトランスファーRNA仲介アミノ酸付加(例えばアルギニル化)、およびユビキチン化が含まれる。例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties, 第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 および Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, 編, Academic Press, New York, 1983; Seifter ら, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol (1990) 182:626-646 および Rattan ら, "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0085】

本明細書における「変異体」、「ホモログ」、「誘導体」、または「断片」は、ある配列からまたはある配列への1(以上)のアミノ酸の任意の置換、変異、修飾、置き換え、欠失、または付加を含む。特に断らない限り、「GPR86」および「GPR86 GPCR」と言う場合、GPR86のこうした変異体、ホモログ、誘導体および断片への言及がこれに含まれる。

【0086】

好ましくは、GPR86に適用するのと同様に、得られるアミノ酸配列はGPCR活性を有し、より好ましくは、配列番号3または配列番号5または配列番号7に記載されたGPR86と少なくとも同様の活性を有する。特に、「ホモログ」という用語は、得られるアミノ酸配列がGPCR活性を有するという条件で、構造および/または機能に関する同一性を包含する。配列同一性(すなわち類似性)に関して、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%配列同一性がある。より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%配列同一性がある。これらの用語はまた、GPR86核酸配列の対立遺伝子変異型のアミノ酸由来のポリペプチドをも包含する。

【0087】

GPR86のような受容体の「受容体活性」または「生物学的活性」と言うとき、これら用語は、GPR86受容体の代謝機能または生理学的機能(類似の活性もしくは改善された活性、または望ましくない副作用の低減されたこうした活性を含む)を言うことを意図する。また、GPR86受容体の抗原活性および免疫原性活性も含まれる。GPCR活性の例、およびこうした活性のアッセイ法および定量法は当技術分野で知られており、本明細書中に別途記載されている。

【0088】

本明細書において用いる「欠失」とは、それぞれ1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が不在となるヌクレオチドまたはアミノ酸配列中の変化と定義される。本明細書において用いる「挿入」または「付加」とは、それぞれ1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が、天然の物質と比較して追加されたヌクレオチドまたはアミノ酸配列中の変化である。本明細書において用いる「置換」は、1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸をそれぞれ異なるヌクレオチドまたはアミノ酸で置き換えることにより生じる。

【0089】

本明細書に記載するGPR86ポリペプチドはまた、サイレント変化を生じ、機能的に等価なアミノ酸配列が得られる欠失、挿入または置換をも有しうる。計画されたアミノ酸置換は、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性の性質の類似性に基づいて行うことができる。例えば、負に荷電されたアミノ酸にはアスパラギン酸およ

びグルタミン酸が含まれ；正に荷電されたアミノ酸にはリシンおよびアルギニンが含まれ；また類似の親水性値を有する非荷電極性頭部基を有するアミノ酸にはロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが含まれる。

【 0 0 9 0 】

保存的置換は、例えば下の表に従って行うことができる。2つ目の欄で同じ区分にあるアミノ酸、および好ましくは3つ目の欄で同じ行にあるアミノ酸は、互いに置換することができる：

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性 - 非荷電性	C S T M
		N Q
	極性 - 荷電性	D E
		K R
芳香族		H F W Y

10

20

【 0 0 9 1 】

GPR86ポリペプチドはさらに異種アミノ酸配列を典型的にはN末端またはC末端に、好ましくはN末端に含みうる。異種配列には、細胞内または細胞外タンパク質ターゲティングに影響を及ぼす配列(リーダー配列など)が含まれ得る。異種配列はまた、ポリペプチドの免疫原性を増大させる配列および/またはポリペプチドの同定、抽出および/または精製を容易にする配列を含みうる。さらなる特に好ましい異種配列は、ポリヒスチジンのようなポリアミノ酸配列であり、これは好ましくはN末端にある。少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも17アミノ酸、しかし50アミノ酸より少ないポリヒスチジン配列は特に好ましい。

【 0 0 9 2 】

30

GPR86ポリペプチドは「成熟」タンパク質の形態であるかまたは融合タンパク質のようなより大きなタンパク質の一部であってもよい。多くの場合、分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製を助ける配列(複数ヒスチジン残基など)または組換え生産中の安定性のための追加配列を含むさらなるアミノ酸配列を追加することは都合がよい。

【 0 0 9 3 】

GPR86ポリペプチドは都合良く既知の技術を利用して組換え法により製造される。しかしながらそれらはまた、固相合成のような当業者によく知られた技術を用いて合成法により製造することもできる。こうしたポリペプチドはまた、例えば抽出および精製を助けるために融合タンパク質として製造することもできる。融合タンパク質パートナーの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6xHis、GAL4 (DNA結合および/または転写活性化ドメイン)およびβガラクトシダーゼが挙げられる。融合タンパク質パートナーと対象のタンパク質配列の間にタンパク質切断部位(トロニン切断部位など)を含めることにより、融合タンパク質配列を除去できるようにすることも都合がよい場合がある。好ましくは融合タンパク質は、対象の配列のタンパク質機能を妨害しない。

40

【 0 0 9 4 】

GPR86ポリペプチドは実質的に単離された形態であり得る。この用語は、人間の手による天然の状態からの変更を言うことを意図する。「単離された」組成物または物質が、自然界に存在するものである場合、それはその元の環境から変化したもしくは移された、またはその両方である。例えば、生きた動物中に天然で存在するポリヌクレオチド、核酸またはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その自然状態の共存物質から分離さ

50

れたポリヌクレオチド、核酸またはポリペプチドは、本明細書において使用する用語の通り、「単離された」ものである。

【0095】

ところでGPR86タンパク質は、該タンパク質の意図された目的を妨害しない担体または希釈剤と混合することができ、そしてなおも実質的に単離されたとみなすことができる。こうしたポリペプチドはまた、実質的に精製された形態であり得るが、その場合それは一般に、調製物中のタンパク質の90%より多く、例えば95%、98%または99%がGPR86ポリペプチドである調製物中に該タンパク質を含む。

【0096】

本明細書はまた、GPR86ポリペプチドの一部を含むペプチドに関する。従って、GPR86の断片およびそのホモログ、変異体または誘導体が包含される。該ペプチドは長さが2~200アミノ酸、好ましくは4~40アミノ酸である。該ペプチドは、例えば適当な酵素(トリプシンなど)で消化することにより、本明細書に開示のGPR86ポリペプチドから誘導することができる。あるいはまた、該ペプチド、断片などを組換え法により製造するか、または合成法により合成することができる。

10

【0097】

「ペプチド」という用語には、当技術分野で知られている種々の合成ペプチド変異体、例えばレトロインバース型(retroinverso)Dペプチドが含まれる。ペプチドは抗原決定基および/またはT細胞エпитープであり得る。ペプチドはin vivoで免疫原性であり得る。好ましくはペプチドはin vivoで中和抗体を誘導することができる。

20

【0098】

異なる生物種からのGPR86配列をアラインメントすることにより、アミノ酸配列のどの領域が異なる生物種間で保存され(「相同領域」)、そしてどの領域が異なる生物種間で異なる(「非相同領域」)かを判別することができる。

【0099】

GPR86ポリペプチドは従って、少なくとも相同領域の一部に対応する配列を含み得る。相同領域は少なくとも2種の生物間で高度の相同性を示す。例えば相同領域は、上述の検定を用いてアミノ酸レベルで、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の同一性を示しうる。相同領域に対応する配列を含むペプチドは、以下に詳述する治療方針に使用することができる。あるいはまた、GPR86ペプチドは少なくとも非相同領域の一部に対応する配列を含みうる。非相同領域は少なくとも2種の生物間で低い程度の相同性しか示さない。

30

【0100】

GPR86ポリヌクレオチドおよび核酸

本発明者らは、GPR86ポリヌクレオチド、GPR86ヌクレオチドおよびGPR86核酸、これらの製造方法、使用方法などを、本明細書中でさらに別途詳述する。

【0101】

「GPR86ポリヌクレオチド」、「GPR86ヌクレオチド」および「GPR86核酸」という用語は、交換可能に使用され、配列番号1、配列番号2、配列番号4または配列番号6に記載の核酸配列を含むポリヌクレオチド/核酸またはそのホモログ、変異体または誘導体を意味することを意図する。好ましくは該ポリヌクレオチド/核酸は、配列番号1または配列番号2、配列番号6の、最も好ましくは配列番号2の核酸配列のホモログ、変異体または誘導体を含むかまたはそれ自体である。

40

【0102】

これらの用語はまた、本明細書に記載のポリペプチドおよび/またはペプチド、すなわちGPR86ポリペプチドをコードすることのできる核酸配列を含むことを意図する。従って、GPR86ポリヌクレオチドおよび核酸は、配列番号3、配列番号5、もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体をコードすることのできるヌクレオチド配列を含む。好ましくはGPR86ポリヌクレオチドおよび核酸は、配列番号7に記載のアミノ酸配列、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導

50

体を含むポリペプチドをコードすることのできるヌクレオチド配列を含む。

【0103】

「ポリヌクレオチド」は一般にあらゆるポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを言い、それは非修飾RNAもしくは非修飾DNAまたは修飾RNAもしくは修飾DNAであり得る。「ポリヌクレオチド」には、限定するものではないが、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合体であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、一本鎖および二本鎖領域の混合体であるRNA、一本鎖またはより典型的には二本鎖であり得るまたは一本鎖および二本鎖領域の混合体であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれる。さらに、「ポリヌクレオチド」はRNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域をも言う。ポリヌクレオチドという用語にはまた、1以上の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および、安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAが含まれる。「修飾された」塩基には、例えばトリチル化塩基およびイノシンのような特殊な塩基が含まれる。種々の修飾がDNAおよびRNAになされる；従って「ポリヌクレオチド」とは、典型的に天然に存在するような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、ならびに、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、相対的に短いポリヌクレオチド、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれるものをも包含する。

10

【0104】

遺伝暗号の縮重の結果として、多種のヌクレオチド配列が同じポリペプチドをコードすることができるのと当業者には理解されよう。

20

【0105】

本明細書に用いる「ヌクレオチド配列」という用語は、ヌクレオチド配列、オリゴヌクレオチド配列、ポリヌクレオチド配列ならびにその変異体、ホモログ、断片および誘導体(例えばその一部分)を言う。ヌクレオチド配列は、ゲノムもしくは合成もしくは組換え由来のDNAまたはRNAであり得るが、センス鎖もしくはアンチセンス鎖またはその組み合わせを表すものであれ、それは二本鎖または一本鎖であり得る。定義されたヌクレオチド配列は組換えDNA技術の使用により調製することができる(例えば組換えDNA)。

【0106】

好ましくは「ヌクレオチド配列」という用語はDNAを意味する。

【0107】

本明細書において用いる「変異体」、「ホモログ」、「誘導体」または「断片」は、GPR86ヌクレオチド配列の配列からまたはそれへの1(以上)の核酸の、任意の置換、変異、修飾、置き換え、欠失、または付加を含みうる。特に断らない限り、「GPR86」および「GPR86 GPCR」と言う場合、GPR86のこうした変異体、ホモログ、誘導体および断片への言及がこれに含まれる。

30

【0108】

好ましくは得られるヌクレオチド配列は、GPCR活性を有し、好ましくは配列番号3、配列番号5または配列番号7に記載されたGPCRと少なくとも同程度の活性を有するポリペプチドをコードする。好ましくは、「ホモログ」という用語は、結果としてのヌクレオチド配列がGPCR活性を有するポリペプチドをコードするような、構造および/または機能に関する同一物を包含することを意図する。配列同一性(すなわち類似性)に関して、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%配列同一性がある。より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%配列同一性がある。これらの用語はまた、該配列の対立遺伝子変異型をも包含する。

40

【0109】

配列相同性の計算

本明細書に記載のあらゆる配列に関して配列同一性は、1以上の配列と別の配列との単純な「視認(eyeball)」比較(すなわち厳しい比較)によって決定することができ、これによりその別の配列が例えば本配列と少なくとも70%配列同一性を有するかを調べることが

50

できる。

【0110】

相対的配列同一性はまた、同一性決定用の任意のアルゴリズムを使用し、例えば初期設定パラメーターを使用して、2以上の配列間の同一性%を計算することのできる市販のコンピュータプログラムにより決定することができる。このようなコンピュータプログラムの典型例はCLUSTALである。2配列間の同一性および類似性を決定するための他のコンピュータプログラム法には、限定するものではないが、GCGプログラムパッケージ (Devereuxら1984 Nucleic Acids Research 12: 387)およびFASTA (Atschulら1990 J Molec Biol 403-410)が含まれる。

【0111】

相同性%を、連続配列に対して計算することができる。すなわちある配列を別の配列と整列させ、ある配列中の各アミノ酸を別の配列中の対応するアミノ酸と、一残基ずつ直接比較する。これは「非ギャップ化(ungapped)」アライメントと呼ばれる。典型的にはこうした非ギャップ化アライメントは相対的に短い数の残基についてしか行われぬ。

【0112】

この方法は非常に単純で堅実な方法であるが、これは例えば、他の方法では同一である配列の対において、1つの挿入または欠失が次のアミノ酸残基を整列から外れさせてしまい、したがって全体のアライメントを行った場合に相同性%が大幅に減少してしまう可能性があることを考慮できていない。従って、殆どの配列比較法は、全体の相同性スコアを不当に不利にすることなく、ありうる挿入および欠失を考慮に入れた最適アライメントを生成するように設計されている。これは、局所的相同性を最大化しようとするために配列アライメント中に「ギャップ」を挿入することで達成される。

【0113】

他方で、これらのより複雑な方法はアライメントに生じる各ギャップに「ギャップペナルティー」を割り当てることにより、同一アミノ酸の数が同じ場合、可能な限りギャップを少なくする配列アライメント(2つの比較配列間のより高い相関性を反映する)がギャップの多いものよりも高いスコアを得るようにする。一般的に使われる「アフィン(affin)ギャップコスト」は、ギャップの存在に相対的に高いコストを課し、そしてギャップ中のそれぞれの続く残基についてはより小さいペナルティーを課す。これは最も一般的に使用されるギャップスコアシステムである。高いギャップペナルティーはむしろギャップの少ない最適化アライメントを生じる。殆どのアライメントプログラムはギャップペナルティーが変更可能である。しかしながら、こうしたソフトウェアを配列比較に用いる場合、初期設定の値を用いることが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを使用する場合にアミノ酸配列の初期設定ギャップペナルティーは、1ギャップに対して-12であり、各伸長に対して-4である。

【0114】

従って最大相同性%の計算はまずギャップペナルティーを考慮した最適アライメントの生成を必要とする。こうしたアライメントを行うのに適当なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux ら, 1984, Nucleic Acids Research 12:387)である。配列比較を行うことのできる他のソフトウェアの例には、限定するものではないが、BLASTパッケージ (Ausubelら, 1999 同上 - 第18章)、FASTA (Atschulら, 1990, J. Mol. Biol., 403-410)およびGENEWORKSパッケージソフトの比較ツールが含まれる。BLASTおよびFASTAの両方は、オフラインおよびオンライン検索について利用可能である(Ausubelら, 1999 同上, pages 7-58 to 7-60)。

【0115】

最終相同性%を同一性に関して測定することは可能だが、アライメントプロセス自体は典型的にはオール・オア・ナッシングの対比較に基づくものではない。代わりに、一般に重みをつけた類似性スコアマトリクスが使用され、それは各対ごとの比較に対して化学的類似性または進化距離に基づきスコアを割り当てる。そのような一般に使用されるマトリクスの例はBLOSUM62マトリクスというBLASTパッケージソフトのプログラムの初期設定マ

10

20

30

40

50

トリクスである。GCG Wisconsinプログラムは一般に、共通の初期設定値または提供されていればカスタムの記号比較表のいずれかを用いる。GCGパッケージについては共通の初期設定値を、または他のソフトウェアについてはBLOSUM62などの初期設定マトリクスを使用することが好ましい。

【 0 1 1 6 】

都合良く、BLASTアルゴリズムは、パラメーターを初期設定値に設定して使用する。BLASTアルゴリズムはhttp://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.htmlに詳細に記載されており、その内容を参照により本明細書に組み入れる。検索パラメーター(以下に定義する)を、都合良く所定の初期設定パラメーターに設定することができる。

【 0 1 1 7 】

都合良く、「実質的同一性」は、BLASTにより評価された場合、EXPECT値が少なくとも約7、好ましくは少なくとも約9および最も好ましくは10以上でマッチする配列と同じである。BLAST検索におけるEXPECTの初期設定閾値は通常10である。

【 0 1 1 8 】

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)は、blastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxプログラムにより実行される発見的検索アルゴリズムである；これらのプログラムは、KarlinおよびAltschulの統計的方法(Karlin and Altschul 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7; http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.htmlを参照)を少し改良して用いて、それが発見したものに対して重要性を割り当てる。BLASTプログラムは配列類似性検索用に(例えば問い合わせ配列に対するホモログを同定するために)調整されている。配列データベースの類似性検索の基礎的事項の考察については、Altschulら (1994) Nature Genetics 6:119-129を参照されたい。

【 0 1 1 9 】

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>から入手可能な5種のBLASTプログラムは、次のタスクを処理する：blastp - アミノ酸問い合わせ配列をタンパク質配列データベースと比較する；blastn - ヌクレオチド問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；blastx - ヌクレオチド問い合わせ配列の(両方の鎖の)6種のフレームの概念上の翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較する；tblastn - タンパク質問い合わせ配列を、全6種のリーディングフレーム(両方の鎖)に動的に翻訳されたヌクレオチド配列データベースと比較する；tblastx - ヌクレオチド問い合わせ配列の6種のフレームの翻訳物をヌクレオチド配列データベースの6種のフレームの翻訳物と比較する。

【 0 1 2 0 】

BLASTは以下の検索パラメーターを使用する。

【 0 1 2 1 】

HISTOGRAM - 各検索についてスコアのヒストグラムを表示する；初期設定は有である。(BLASTマニュアル中のパラメーターHを参照)。

【 0 1 2 2 】

DESCRIPTIONS - マッチング配列の短い記述の数を、特定した数に限定する；初期設定の上限は100記述である。(マニュアル頁におけるパラメーターVを参照)。

【 0 1 2 3 】

EXPECT - データベース配列に対してマッチを報告する統計的有效閾値；初期設定値は10であり、これはKarlin and Altschul (1990)による確率論的モデルによると単に確率的に10マッチは発見されることが期待されるというものである。あるマッチに帰される統計的有效性がEXPECT閾値よりも大きい場合、マッチは報告されない。より低いEXPECT閾値はよりストリンジェントであり、より少ない偶然マッチが報告される。分数値も使用可能である(BLASTマニュアル中のパラメーターEを参照されたい)。

【 0 1 2 4 】

CUTOFF - 高スコアセグメント対(HSP)を報告するためのカットオフスコア。初期設定値はEXPECT値(上記参照)から計算される。HSPは、それに帰される統計的有效性が、CUTOFF

10

20

30

40

50

値に等しいスコアを有する単独HSPに帰されるのと少なくとも同じくらい高い場合にのみデータベース配列について報告される。CUTOFF値が高くなるとストリンジェント性は増し、より少ない確率的マッチの報告をもたらす。(BLASTマニュアル中のパラメータSを参照)。典型的には、有効閾値はEXPECTを用いた方がより直感的に扱うことができる。

【 0 1 2 5 】

ALIGNMENTS - 特定した数までデータベース配列を制限する(それらについて高スコアセグメント対(HSP)が報告される)；初期設定の制限は50である。これよりも多くのデータベース配列が報告すべき統計的有効閾値を満たす(下のEXPECTおよびCUTOFFを参照)場合、最も大きい統計的有効性を帰されるマッチのみが報告される。(BLASTマニュアル中のパラメータ-Bを参照)。

【 0 1 2 6 】

MATRIX - BLASTP、BLASTX、TBLASTNおよびTBLASTXについて別のスコアリングマトリクスを特定する。初期設定のマトリクスはBLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992)である。有効な別の選択肢としては：PAM40、PAM120、PAM250およびIDENTITYが挙げられる。BLASTNについては代替のスコアリングマトリクスは提供されていない；BLASTN要求においてMATRIX指示を特定するとエラー応答が帰ってくる。

【 0 1 2 7 】

STRAND - TBLASTN検索をデータベース配列の上または下の鎖のみに限定する；あるいはBLASTN、BLASTX、もしくはTBLASTX検索を問い合わせ配列の上または下の鎖のリーディングフレームのみに限定する。

【 0 1 2 8 】

FILTER - これは組成の複雑度(Wootton & Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149-163のSEGプログラムにより決定される)が低い問い合わせ配列のセグメントをマスキングして除く、または短い周期性の内部反復からなるセグメント(Claverie & States (1993) Computers and Chemistry 17:191-201のXNUプログラムにより、もしくはBLASTNについてはTatusovおよびLipman (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)のDUSTプログラムにより決定される)をマスキングして除く。フィルタリングはプラスト出力から統計的には有効だが生物学的には興味を引かない報告(例えば一般的な酸性、塩基性またはプロリンリッチ領域に対するヒット)を排除することができ、問い合わせ配列のより生物学的に興味深い領域をデータベース配列に対する詳細なマッチングに利用可能にする。

【 0 1 2 9 】

フィルタープログラムにより発見された低複雑度配列は、ヌクレオチド配列では「N」という文字を(例えば「NNNNNNNNNNNNNNN」)およびタンパク質配列では「X」という文字を(例えば「XXXXXXXXXX」)用いて置き換える。

【 0 1 3 0 】

フィルタリングは問い合わせ配列(またはその翻訳産物)にのみ適用し、データベース配列には適用しない。初期設定フィルタリングは、BLASTNについてはDUSTであり、他のプログラムについてはSEGである。

【 0 1 3 1 】

SWISS-PROT中の配列に適用した場合、SEG、XNUまたはその両方によっても全くなにもマスキングされないことは珍しくない。そのためフィルタリングは必ず効果があると期待すべきではない。さらに、いくつかの場合、配列はその全体がマスキングされ、フィルタリングされていないその問い合わせ配列に対して報告されるあらゆるマッチの統計的有効性は疑わしいことが示唆される。

【 0 1 3 2 】

NCBI-gi - これは登録番号および / または遺伝子座名に加えて、出力結果にNCBI gi識別子が示されるようにする。

【 0 1 3 3 】

最も好ましくは、配列比較は<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>に提供される単純なBLAST検索アルゴリズムを用いて行う。いくつかの実施形態では、配列同一性を決定すると

きにギャップペナルティーを使用しない。

【0134】

ハイブリダイゼーション

本発明者らは、本明細書に記載の配列、またはその任意の断片もしくは誘導体、または前記のいずれかのものの相補配列にハイブリダイズすることのできるヌクレオチド配列をさらに記載する。

【0135】

ハイブリダイゼーションとは、「ある核酸の鎖が塩基対形成により相補鎖と一緒にになるプロセス」(Coombs J (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York NY)ならびにポリメラーゼ連鎖反応技術により行われる増幅のプロセス(Dieffenbach CW and GS Dveksler 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載)を意味する。

10

【0136】

ハイブリダイゼーション条件は核酸結合複合体の融解温度(T_m)に基づき、これはBerger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA)に教示されている通りであり、そして下に説明する定義された「ストリンジェンシー」を付与する。

【0137】

本明細書に記載のヌクレオチド配列またはその相補体を選択的にハイブリダイズすることのできるヌクレオチド配列は、一般に、少なくとも20、好ましくは少なくとも25または30、例えば少なくとも40、60または100またはそれ以上の連続ヌクレオチドの領域に渡って、対応する本明細書に記載のヌクレオチド配列に少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85または90%およびさらにより好ましくは少なくとも95%または98%相同である。好ましいヌクレオチド配列は、配列番号1、2または4に相同な領域、好ましくは該配列の1つに少なくとも70%、80%または90%およびより好ましくは少なくとも95%相同な領域を含む。

20

【0138】

「選択的にハイブリダイズ可能な」という用語は、標的ヌクレオチド配列がバックグラウンドよりも有意に高いレベルでプローブにハイブリダイズする条件下で、プローブとして使用されるヌクレオチド配列が使用されることを意味する。バックグラウンドハイブリダイゼーションは、他に存在するヌクレオチド配列(例えばスクリーニングされているcDNAまたはゲノムDNAライブラリー中に存在するもの)が原因で起こりうる。この事象において、バックグラウンドとは、プローブとライブラリーの非特異的DNAメンバーとの相互作用により生じるシグナルのレベルであって、観察される標的DNAとの特異的相互作用の強度に比べて10倍未満、好ましくは100倍未満のレベルという意味合いである。相互作用の強度は例えばプローブを(例えば ^{32}P で)放射標識することにより測定することができる。

30

【0139】

また本明細書の範囲に含まれるものとしては、中程度～最大限のストリンジェンシー条件下で本明細書に記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることのできるヌクレオチド配列がある。ハイブリダイゼーション条件は核酸結合複合体の融解温度(T_m)に基づき、これはBerger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA)に教示されている通りであり、そして下に説明する定義された「ストリンジェンシー」を付与する。

40

【0140】

最大ストリンジェンシーは典型的には約 $T_m - 5$ (プローブの T_m よりも5 低温)で；高ストリンジェンシーは T_m より約5 ~ 10 低温で；中程度のストリンジェンシーは T_m の約10 ~ 20 低温で；そして低ストリンジェンシーは T_m の約20 ~ 25 低温で見られる。当業者に理解されることとして、最大ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは同一なヌクレオチド配列を同定または検出するために使用することができ、他方中程度(または低)ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは類似または関連ヌクレオチド配列を同

50

定または検出するために使用することができる。

【0141】

好ましい実施形態において、本発明者らは、ストリンジェントな条件(例えば65 および0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 Mクエン酸Na₃ pH 7.0})下で1以上のGPR86ヌクレオチド配列にハイブリダイズすることのできるヌクレオチド配列を開示する。ヌクレオチド配列が二本鎖である場合、二重鎖の両方の鎖が、個別にまたは組み合わせとして、包含される。ヌクレオチド配列が一本鎖である場合、そのヌクレオチド配列の相補配列もまた本明細書の範囲に含まれると理解されたい。

【0142】

本発明者らはさらに、本明細書に記載の配列、またはその任意の断片もしくは誘導体に対して相補的な配列にハイブリダイズすることのできるヌクレオチド配列を記載する。同様に、本明細書に記載の配列にハイブリダイズすることのできる配列に相補的なヌクレオチド配列もまた包含される。こうした種類のヌクレオチド配列は、変異体ヌクレオチド配列の例である。これに関して、「変異体」という用語は、本明細書に記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることのできる配列に相補的な配列を包含する。しかしながら好ましくは、「変異体」という用語は、本明細書に記載のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件(例えば65 および0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 クエン酸Na₃ pH 7.0})下でハイブリダイズすることのできる配列に相補的な配列を包含する。

【0143】

GPR86およびホモログのクローニング

本発明者らは、本明細書に記載の配列またはその任意の断片もしくは誘導体に相補的なヌクレオチド配列を記載する。前記配列がその断片に相補的であれば、その配列は他の生物などで類似のGPCR配列を同定およびクローニングするためにプローブとして使用することができる。

【0144】

本発明者らの開示は従って、GPR86、そのホモログおよびヒトおよび他の種、例えばマウス、ブタ、ヒツジなどからの他の構造的または機能的に関連する遺伝子のクローニングの達成を実施可能にする。配列番号1、配列番号2、配列番号4またはその断片に含まれるヌクレオチド配列と同一または十分に同一なポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして使用することができ、適当なライブラリーからGPR86をコードする部分的または完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離することができる。こうしたプローブはまた、GPR86遺伝子に対する配列類似性、好ましくは高度の配列類似性を有する他の遺伝子(ヒト以外の種からのホモログおよびオーソログをコードする遺伝子も含まれる)のcDNAクローンおよびゲノムクローンを単離するために使用することができる。ハイブリダイゼーションスクリーニング、クローニングおよび配列決定技術は当業者に知られており、例えばSambrook ら(上記)に記載されている。

【0145】

典型的にプローブとして使用するのに適当なヌクレオチド配列は、対象の配列と70%同一、好ましくは80%同一、より好ましくは90%同一、さらにより好ましくは95%同一である。プローブは一般に少なくとも15ヌクレオチドを含む。好ましくは、こうしたプローブは少なくとも30ヌクレオチドを有し、少なくとも50ヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは150~500ヌクレオチドの範囲であり、より具体的には約300ヌクレオチドである。

【0146】

ある実施形態において、GPR86ポリペプチド(ヒト以外の種由来のホモログおよびオーソログも含む)をコードするポリヌクレオチドを得るための方法は、適当なライブラリーをストリンジェントな条件下で配列番号1、配列番号2、配列番号4またはその断片の標識されたプローブでスクリーニングするステップ、および前記ポリヌクレオチド配列を含有する部分的または完全長cDNAクローンおよびゲノムクローンを単離するステップを含む。こうしたハイブリダイゼーション技術は当業者によく知られている。ストリンジェントなハ

イブリダイゼーション条件とは、上記に定義されたもの、またはそれとは別の次の条件である：50%ホルムアミド、5XSSC (150 mM NaCl, 15mM クエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH7.6)、5Xデンハート溶液、10% 硫酸デキストラン、および20 µg/ml 変性済みせん断済みサケ精子DNAを含む溶液中で42℃で一晩インキュベートし、その後約65℃で濾紙を0.1XSSCで洗浄する。

【0147】

GPR86の機能性アッセイ

クローニングされた推定GPR86ポリヌクレオチドは、配列分析または機能性アッセイにより確認することができる。例えば、推定GPR86またはホモログは次のように受容体活性をアッセイすることができる。GPR86受容体cDNAをコードする線状化プラスミド鋳型由来のキャップ構造を付加されたRNA転写産物は、標準法に沿ってin vitroでRNAポリメラーゼを用いて合成される。In vitro転写産物は水に最終濃度0.2 mg/mlで懸濁される。成体メスヒキガエルから卵巣の葉を移し、第Vステージの濾胞除去卵母細胞を得て、RNA転写産物(10 ng/卵母細胞)をマイクロインジェクション装置を用いて50 nlボラスとして注入する。2つの電極電圧留め具を使用して、アゴニスト曝露に応答する個々のゼノパス(Xenopus)卵母細胞からの電流を測定した。記録は、(mM表示で) NaCl 115、KCl 2.5、CaCl₂ 1.8、NaOH-HEPES 10、pH7.2からなる標準媒体中で室温で行った。ゼノパス(Xenopus)系はまた、活性化リガンドを求めて既知のリガンドと組織/細胞抽出物をスクリーニングするために使用可能であり、これは下に詳述する通りである。

【0148】

GPR86の発現アッセイ

GPR86関連障害を治療するための有用な治療薬を設計するためには、(野生型であれ特定の変異型であれ)GPR86の発現プロファイルを決定することが役に立つ。このことから、当技術分野で既知の方法を、GPR86が発現される器官、組織および細胞型(ならびに発達段階)を決定するのに使用することができる。例えば、伝統的または「電子的」ノーザン分析を行うことができる。逆転写酵素PCR(RT-PCR)もまた、GPR86遺伝子または変異体の発現をアッセイするのに利用可能である。GPR86の発現プロファイルを決定するためのより高感度な方法としては、当技術分野で既知のRNaseプロテクションアッセイが挙げられる。

【0149】

ノーザン分析とは、遺伝子の転写産物の存在を検出するのに用いる研究技術であり、標識されたヌクレオチド配列を、特定の細胞型または組織由来のRNAが結合されたメンブレンへとハイブリダイゼーションさせることに関する。(Sambrook, 上記, 第7章 およびAusubel, F. M. ら 上記, 第4章および第16章)。BLASTを適用する類似のコンピューター技術(「電子的ノーザン」)は、ヌクレオチドデータベース(例えばGenBank またはLIFESEQデータベース(Incyte Pharmaceuticals))中の同一または関連分子を検索するために使用することができる。この種の分析は、複数のメンブレンに基づくハイブリダイゼーションよりも迅速であるという利点がある。さらに、コンピューター検索の感度は、任意の特定のマッチが正確なまたは相同なものに分類されるかを決定すべく、変更することができる。

【0150】

上述のプロープも含め、本明細書に記載のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、動物およびヒト疾患の治療薬および診断薬を発見するための研究試薬および材料として、本明細書に別途記載するように、用いることができる。

【0151】

GPR86ポリペプチドの発現

本発明にはさらにGPR86ポリペプチドの製造方法も含まれる。この方法は一般にGPR86ポリペプチドをコードする核酸またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体を含む宿主細胞を、適当な条件下で(すなわちGPR86ポリペプチドが発現される条件で)培養することを含む。

【0152】

生物学的に活性なGPR86を発現させるためには、GPR86をコードするヌクレオチド配列ま

たはそのホモログ、変異体、もしくは誘導体を適当な発現ベクター(すなわち挿入されるコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含んだベクター)に挿入する。

【0153】

当業者によく知られた方法を用いて、GPR86ならびに適当な転写および翻訳制御エレメントをコードする配列を含む発現ベクターを構築する。こうした方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術および*in vivo*遺伝子組み換えが含まれる。こうした技術はSambrook, J. ら (1989; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第4, 8, および 16-17章, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.) および Ausubel, F. M. ら (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, 第9, 13, および16章, John Wiley & Sons, New York, N.Y.) に記載されている。

10

【0154】

GPR86コード配列を含有させ発現させるために、種々の発現ベクター/宿主系を利用することができる。こうしたものには、限定するものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌; 酵母発現ベクターで形質転換された酵母; ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系; ウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)もしくはタバコモザイクウイルス(TMV))または細菌性発現ベクター(例えばTiもしくはpBR322プラスミド)で形質転換された植物細胞系; または動物細胞系が含まれる。どの宿主細胞を用いてもよい。

【0155】

「制御エレメント」または「調節エレメント」とは、宿主の細胞内タンパク質と相互作用して転写および翻訳を行うベクターの非翻訳領域(すなわちエンハンサー、プロモーターならびに5' および3' 非翻訳領域)のそれらである。こうしたエレメントはその強度および特異性が異なりうる。用いるベクター系および宿主に応じて、どのような数の適当な転写および翻訳エレメント(構成的プロモーターおよび誘導プロモーターも含まれる)を使用することもできる。例えば細菌系をクローニングする場合、BLUESCRIPTファージミド(Stratagene, La Jolla, Calif.) またはPSPORT1プラスミド(GIBCO/BRL)のハイブリッドlacZプロモーターのような誘導プロモーターなどを使用することができる。昆虫細胞ではバキュロウイルス・ポリヘドリンプロモーターを使用することができる。植物細胞のゲノム由来(例えばヒートショック、RUBISCOおよび貯蔵タンパク質遺伝子)または植物ウイルス由来(例えばウイルスプロモーターまたはリーダー配列)のプロモーターまたはエンハンサーを、ベクターにクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。多コピーのGPR86コード配列を含む細胞系を作製する必要がある場合、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーとともに使用してもよい。

20

30

【0156】

細菌系では、意図するGPR86の使用に応じて、多種類の発現ベクターを選択することができる。例えば、抗体の誘発のために大量のGPR86が必要なときには、容易に精製することのできる融合タンパク質を高レベルで発現させるベクターを使用することができる。こうしたベクターには、限定するものではないが、多機能性大腸菌(*E. coli*)クローニングおよび発現ベクター、例えばBLUESCRIPT (Stratagene) (この場合、GPR86コード配列はアミノ末端Metおよびそれに続く β -ガラクトシダーゼの7残基とインフレームでベクターに連結されてもよく、そのことによりハイブリッドタンパク質が生じる)、pINベクター (Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509) などが含まれる。pGEXベクター(Promega, Madison, Wis.)もまた外来ポリペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)とともに融合タンパク質として発現するために使用することができる。一般に、こうした融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させその後遊離グルタチオンの存在下で溶出させることにより溶解細胞から容易に精製することができる。こうした系で生成されるタンパク質は、ヘパリン、トロンビンまたは第XA因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計してもよく、そのことによりク

40

50

ローニングした対象のポリペプチドが任意にGST部分から解放されるようにすることができる。

【0157】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、構成的プロモーターまたは誘導プロモーター (α 因子、アルコールオキシダーゼおよびPGHなど)を含む多種のベクターを使用することができる。総説についてはAusubel (上記)およびGrant ら(1987; *Methods Enzymol.* 153:516-544)を参照されたい。

【0158】

植物発現ベクターを使用する場合、GPR86コード配列の発現は多種のプロモーターのうちどれで駆動してもよい。例えばウイルスプロモーター (CaMVの35Sおよび19Sプロモーターなど)を単独でまたはTMV由来の ω リーダー配列と併用して用いることができる。(Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311.)。あるいは、RUBISCOの小サブユニットまたはヒートショックプロモーターなどの植物プロモーターを使用することができる。(Coruzzi, G. ら(1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. ら(1984) *Science* 224:838-843; およびWinter, J. ら(1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105.)。これらの構築物は、直接DNA形質転換または病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞に導入することができる。こうした技術はいくつかの一般に入手可能な総説に記載されている。(例えばHobbs, S. or Murry, L. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196.を参照されたい)。

【0159】

昆虫系もまたGPR86の発現に使用することができる。例えば、そのような系の一つでは、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用して、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞またはトリコブラシア (*Trichoplusia*) 幼虫内で外来遺伝子を発現させる。GPR86コード配列は、該ウイルスの非必須領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) 内にクローニングすることができ、ポリヘドリンプロモーターの制御下に配置することができる。GPR86挿入が成功すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性になり、コートタンパク質を欠いた組換えウイルスが産生される。組換えウイルスは次に、例えばツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*) 細胞またはトリコブラシア (*Trichoplusia*) 幼虫を感染するために使用することができ、それらの中でGPR86を発現させることができる。(Engelhard, E. K. ら (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 3224-3227.)。

【0160】

哺乳動物宿主細胞では、多種のウイルスに基づく発現系が利用可能である。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、GPR86コード配列は、後期プロモーターおよびトリパートイト (tripartite) リーダー配列からなるアデノウイルス転写 / 翻訳複合部に連結することができる。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域への挿入もまた、感染された宿主細胞内でGPR86を発現することのできる生きたウイルスを得るために使用することができる。(Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659.)。さらに、転写エンハンサー (ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーなど) を使用して、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させることもできる。

【0161】

このことから、例えばGPR86受容体は、ヒト胚性腎臓293 (HEK293) 細胞または付着性dhfr CHO細胞において発現させることができる。受容体発現を最大化させるためには、典型的にはpCDNまたはpCDNA3ベクターへの挿入前に全ての5' および3' 非翻訳領域 (UTR) を受容体cDNAから除く。細胞はリポフェクション (lipofectin) により個別の受容体cDNAでトランスフェクトし、400 mg/ml G418の存在下で選択する。3週間の選択後、単一クローンを選択し更なる分析のために増やす。ベクターのみで形質転換したHEK293またはCHO細胞をネガティブコントロールとする。個別の受容体を安定して発現する細胞系を単離するために、典型的には約24クローンを選択し、ノーザンブロット分析で分析する。受容体mRNAは一般的には分析したG418耐性クローンの約50%から検出される。

【0162】

ヒト人工染色体(HAC)もまた、プラスミドに含有させ発現させることのできる大きなDNA断片を送達するために利用可能である。約6 kb~10 MbのHACが構築され、そして慣用の送達法(リポソーム、ポリカチオン性アミノポリマー、または小胞)を介して治療目的で送達される。

【0163】

特定の開始シグナルもまた、GPR86コード配列のより効率的翻訳を達成するために使用することができる。こうしたシグナルにはATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。GPR86コード配列およびその開始コドンおよび上流配列が適当な発現ベクターに挿入される場合は、追加の転写または翻訳制御シグナルが必要ないことがある。しかしながら、コード配列またはその断片のみが挿入される場合は、ATG開始コドンを含む外来翻訳制御シグナルを用意すべきである。その上、開始コドンは、挿入全体の翻訳を保証するために、正しい読み枠にあるべきである。外来翻訳エレメントおよび開始コドンは種々の起源、すなわち天然および合成のものであり得る。発現効率は、使用する具体的な細胞系に適切なエンハンサー(文献に記載されたものなど)を追加することにより増強することができる。(Scharf, D. ら (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162.)。

【0164】

さらに、宿主細胞株は、挿入配列の発現をモジュレートする能力、または発現タンパク質を所望の様式で処理する能力について選択することができる。こうしたポリペプチドの改変には、限定するものではないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が含まれる。タンパク質から「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折りたたみおよび/または機能を手助けするために使用することができる。翻訳後活性のための特定の細胞内機構および特徴的機構を有する種々の宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、およびWI38)は、American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, Md.)から入手可能であり外来タンパク質の正しい改変とプロセッシングが保証されるように選択することができる。

【0165】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、GPR86を安定して発現することのできる細胞系は、ウイルス性の複製起点および/または外来発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を同一または異なるベクター上に有する発現ベクターを用いて形質転換することができる。ベクターの導入の後に、細胞を約1~2日間富栄養化培地で増殖させてもよくその後選択培地に切り換える。選択マーカーの目的は選択に対する耐性を付与することであり、その存在は導入された配列を首尾よく発現する細胞の増殖と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0166】

形質転換された細胞を回収するためには、どのような数の選択系を用いてもよい。こうしたもには、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wigler, M. ら (1977) *Cell* 11:223-32)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Lowy, I. ら (1980) *Cell* 22:817-23)が含まれ、これらはそれぞれ tk^{-} または apr^{-} 細胞で用いることができる。また、代謝拮抗物質、抗生物質または除草剤耐性を選択の基として使用することができる。例えば、dhfrはメトトレキセートへの耐性を付与する(Wigler, M. ら (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); nptはアミノグリコシド類のネオマイシンおよびG-418への耐性を付与する(Colbere-Garapin, F. ら (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14); そしてalsまたはpatはそれぞれクロロスルフォンおよびホスフィントリシアセチルトランスフェラーゼへの耐性を付与する(Murry, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されており、例えば、trpB(これは細胞がインドールをトリプトファンの代わりに利用できるようにする)、またはhisD(これは細胞がヒスチノールをヒスチジンの代わりに利用できるようにする)がある。(Hartman, S. C. and R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51.)。最近では、可視化マーカーの使用が普及しており

、そうしたマーカーとしてはアントシアニン類、 β グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンなどがある。これらのマーカーは、形質転換体を同定するために使用することができるのみならず、特定のベクター系に帰することのできる一過性のまたは安定なタンパク質発現の量を定量するために使用することができる。(Rhodes, C. A. ら(1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131.)。

【0167】

マーカー遺伝子発現の存在 / 不在は対象の遺伝子も存在することを示唆はするが、その遺伝子の存在と発現を確認しなければならない場合もある。例えば、GPR86をコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入される場合は、GPR86コード配列を含む形質転換細胞はマーカー遺伝子機能の不在により同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子はGPR86コード配列とタンデムに単一のプロモーターの制御下に配置されうる。誘導または選択に応答するマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子もまた発現していることを示す。

10

【0168】

あるいは、GPR86コード核酸配列を含みかつGPR86を発現する宿主細胞は、当業者に既知の種々の方法により同定することができる。こうした手法としては、限定するものではないが、核酸もしくはタンパク質配列の検出および / または定量のための、DNA-DNAもしくはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイまたは免疫アッセイ技術(膜、溶液、またはチップに基づく技術も含まれる)が挙げられる。

20

【0169】

GPR86コードポリヌクレオチド配列の存在は、GPR86コードポリヌクレオチドのプロブまたは断片または断片を用いたDNA-DNAもしくはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅により検出することができる。核酸増幅に基づくアッセイは、GPR86をコードするDNAまたはRNAを含有する形質転換体を検出するための、GPR86コード配列に基づくオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用を伴う。

【0170】

GPR86の発現を検出するためおよび測定するための種々のプロトコルは、該タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を用いるものであれモノクローナル抗体を用いるものであれ、当技術分野で知られている。こうした技術の例としては、酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化セルソーティング(FACS)が挙げられる。GPR86上の2つの互いに干渉しないエピトープに反応するモノクローナル抗体を利用した、2部位性のモノクローナル抗体に基づく免疫アッセイが好ましいが、競合的結合アッセイ法も利用可能である。これらおよび他のアッセイ法は当技術分野で詳しく記載されており、例えばHampton, R. ら(1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual, Section I V*, APS Press, St Paul, Minn.)およびMaddox, D. E. ら(1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216)に記載されている。

30

【0171】

種々の標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、種々の核酸およびアミノ酸アッセイ法に使用することができる。GPR86コードポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識されたハイブリダイゼーション用またはPCR用プロブを作製するための手段としては、標識ヌクレオチドを用いたオリゴ標識法、ニック翻訳、末端標識、またはPCR増幅が挙げられる。あるいは、GPR86コード配列またはその任意の断片を、mRNAプロブの作製のためにベクターにクローニングすることもできる。こうしたベクターは当技術分野で既知であり、市販されており、適当なRNAポリメラーゼ(T7、T3、またはSP6など)および標識ヌクレオチドを添加することによりin vitroでRNAプロブを合成するために使用することができる。こうした手法は、種々の市販キット(例えばPharmacia & Upjohn (Kalamazoo, Mich.)、Promega (Madison, Wis.)、およびU.S. Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio)により提供されているもの)を用いて行うことができる。検出を容易にするための適当なリポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、蛍光物質、化学発光物質、または発色物質、ならびに基質、補因子、阻害剤、磁性粒子などが含まれる。

40

50

【 0 1 7 2 】

GPR86コードヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培養物からのタンパク質の発現と回収に適した条件下で培養することができる。形質転換細胞により産生されたタンパク質は、用いる配列および/またはベクターに応じて、細胞膜に存在するか、分泌されるか、または細胞内に含有され得る。当業者に理解されるように、GPR86コードポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通してGPR86が分泌されるように仕向けるシグナル配列を含有するように設計することができる。他の構築物を用いて、GPR86コード配列と、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列とを結合させることができる。こうした精製促進ドメインには、限定するものではないが、金属キレートペプチド(固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュールなど)、固定化免疫グロブリンでの精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製システム(Immunex Corp., Seattle, Wash.)に利用されるドメインが含まれる。切断可能なリンカー配列(例えば第XA因子またはエンテロキナーゼに特異的なもの(Invitrogen, San Diego, Calif.)など)を、精製ドメインとGPR86コード配列の間に追加することは、精製促進に利用される。そのような発現ベクターの一種は、GPR86およびチオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行する6ヒスチジン残基をコードするヌクレオチドを含有する融合タンパク質の発現を提供する。ヒスチジン残基は固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーでの精製を促進し(IMIAC; Porath, J. ら(1992) Prot. Exp. Purif. 3: 263-281に記載されている)、他方エンテロキナーゼ切断部位はGPR86を融合タンパク質から精製する手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターの考察はKroll, D. J. ら (1993; DN A Cell Biol. 12:441-453)に提供されている。

10

20

【 0 1 7 3 】

GPR86の断片は、組換え産生のみならず、固相技術を用いた直接ペプチド合成によっても製造することができる。(Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154.)。タンパク質合成は手動法によりまたは自動化法により行うことができる。自動合成は、例えば、Applied Biosystems 431Aペプチド合成機(Perkin Elmer)を用いて行うことができる。GPR86の種々の断片を別々に合成し、そしてその後結合させて全長分子を製造することができる。

30

【 0 1 7 4 】

バイオセンサー

GPR86ポリペプチド、核酸、プローブ、抗体、発現ベクターおよびリガンドはバイオセンサーとして(およびその製造のために)有用である。

【 0 1 7 5 】

Aizawa (1988), Anal. Chem. Symp. 17: 683によると、バイオセンサーとは、分子認識のための受容体(例えば固定化された抗体または受容体、例えばGPR86 Gタンパク質共役受容体)と、測定された値を伝達するための増幅手段とのユニークな組み合わせであると定義される。こうしたバイオセンサーの一群は、受容体と周囲の媒体との相互作用に起因して表面層の光学的性質に生じた変化を検出する。こうした技術のうち、円二色法および表面プラズモン共鳴が特に挙げられる。GPR86を組み入れたバイオセンサーはGPR86リガンド(プリンもしくはプリンアナログのようなヌクレオチドなど)またはこれらのリガンドのアナログの存在またはレベルを検出するために使用することができる。こうしたバイオセンサーの構築は当技術分野でよく知られている。

40

【 0 1 7 6 】

このことから、GPR86受容体を発現する細胞系は、受容体により促進される[3H]イノシトールリン酸または他の第2メッセンジャーの形成を介して、リガンド(ATPなど)の検出のためのリポーターシステムとして使用することができる(Wattら, 1998, J Biol Chem May 29;273(22):14053-8)。受容体-リガンドバイオセンサーは、Hoffman ら, 2000, Proc Natl Acad Sci U S A Oct 10;97(21):11215-20にも記載されている。GPR86を含む光学的バイオセンサーおよび他のバイオセンサーはまた、G-タンパク質および他のタンパク質の

50

レベルまたは存在を検出するために使用することができ、これは例えばFigler ら, 1997, Biochemistry Dec 23;36(51):16288-99およびSarrio ら, 2000, Mol Cell Biol 2000 Jul;20(14):5164-74)に記載されている通りである。バイオセンサー用のセンサーユニットは、例えばUS 5,492,840に記載されている。

【0177】

スクリーニングアッセイ

GPR86ポリペプチド(ホモログ、変異体、および誘導体も含まれる)は、天然であれ組換えであれ、受容体に結合する化合物、またはGPR86を活性化する(アゴニスト)もしくは活性化を阻害する(アンタゴニスト)化合物をスクリーニングする方法に用いることができる。

10

【0178】

従って、前記ポリペプチドはまた、小分子基質およびリガンドの、例えば細胞、無細胞調製物、化合物ライブラリー、および天然物混合物における結合性を評価するために使用することができる。これらの基質およびリガンドは天然基質および天然リガンドであってもよく、または構造的もしくは機能的擬似体であってもよい。Coligan ら, Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter 5 (1991)を参照のこと。

【0179】

GPR86ポリペプチドは多くの生物学的機能の原因であり、これには上で「GPR86関連疾患」において記載したような多くの病理が含まれる。従って、一方ではGPR86を刺激することのできる化合物、および他方ではGPR86の機能を阻害することのできる化合物および薬剤を発見することは望ましい。一般に、アゴニストおよびアンタゴニストは、ドーパミン関連疾患、例えばパーキンソン病、心疾患、例えば上室性不整脈または心室性不整脈、低血圧、吐気、トゥレット症候群、ストレスおよび疼痛などの病状のための治療および予防目的に使用される。

20

【0180】

アゴニストはGPR86受容体をあらゆる度合いで活性化し得る。同様に、アンタゴニストはGPR86をあらゆる度合いで不活性化させるかまたはその活性を阻害し得る。従ってGPR86受容体は、アンタゴニストによりその本来の、基底の、またはバックグラウンドのレベルの活性と比べてあらゆる度合いで部分的に不活性化され得る(部分的アンタゴニスト)、またはそのようなレベルまで完全に不活性化され得る(アンタゴニストまたは完全アンタゴニスト)。アンタゴニストは受容体をさらに、例えばゼロ活性まで不活性化し得る(逆作用のアゴニスト)。「アンタゴニスト」という用語は従って、完全アンタゴニスト、部分的アンタゴニストおよび逆作用アゴニストのいずれをも特に含む。

30

【0181】

また「アゴニスト」および「アンタゴニスト」という用語に含まれる分子には、GPR86の発現を転写レベルおよび/または翻訳レベルでモジュレートするもの、ならびにその活性をモジュレートするものがある。

【0182】

GPR86タンパク質と相互作用することのできる可能性のある候補化合物の合理的設計は、ポリペプチドの分子形状の構造的な研究に基づくものでありうる。特定の別タンパク質とどの部位が相互作用するかを決定する手段の一つは、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。これらはどのアミノ酸残基が分子接触領域を形成するかという指針を提供する。タンパク質構造決定の詳細な説明については、例えばBlundell and Johnson (1976) Protein Crystallography, Academic Press, New Yorkを参照されたい。

40

【0183】

合理的設計の代替案は、概略するとGPR86を候補モジュレーターに接触させそしてその影響を検出することを含むスクリーニング方法を用いる。一般に、かかる方法は、その表面にGPR86受容体ポリペプチドを(場合によりパートナータンパク質と一緒に)発現する適当な細胞を作製すること、およびGPR86または細胞またはその両方を候補モジュレーター

50

と接触させること、および関連分子の細胞内レベルの変化を検出することを含む。

【0184】

濃度がGPCR(特にGPR86)の活性の影響を受ける分子、および特にGPR86活性のマーカーとして使用可能な分子は当技術分野で知られている。これらを便宜のために「GPCR感受性マーカー」と言う。こうしたGPCR感受性マーカーの例としては細胞内カルシウムレベル、カルシウム流出、アデニル酸シクラーゼレベル、およびサイクリックAMPレベルが挙げられる。好ましい実施形態において、GPCR感受性マーカーは細胞内サイクリックAMP (cAMP)を含み、かつスクリーニングはサイクリックAMPの細胞内レベルの変化を検出することを含む。

【0185】

10

特に好ましい実施形態では、GPR86をパートナータンパク質の存在下でスクリーニングすることもできる；かかるパートナータンパク質はGPR86受容体ポリペプチドと一緒に、好ましくは細胞内で共発現させることができる。パートナータンパク質は、好ましくはGタンパク質、例えばGPR86優先的G-タンパク質 G_i または $G_{\alpha 16}$ のような無差別刺激性Gタンパク質を含み得る。

【0186】

GPR86およびGPR86優先的G-タンパク質 G_i を有する細胞を用いるスクリーニングでは、アゴニストは細胞内cAMP濃度のレベルを低下させ、これに対してアンタゴニストは細胞内cAMP濃度を増加させる。

【0187】

20

スクリーニングがGPR86および $G_{\alpha 16}$ のような無差別刺激性Gタンパク質を用いる場合、アゴニストは細胞内cAMP濃度のレベルを増加させ、これに対してアンタゴニストは細胞内cAMP濃度を低下させる。

【0188】

従って本発明者らは、GPR86優先的G-タンパク質 G_i に共役したときのGPR86のアゴニストの同定方法を開示するが、この方法は、GPR86受容体を発現する細胞を候補化合物と接触させること、および前記細胞内のサイクリックAMP (cAMP)レベルが前記接触の結果低下するか否かを測定することを含む。あるいはまた、GPR86を $G_{\alpha 16}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共発現させることができ、前記方法は、GPR86および $G_{\alpha 16}$ を発現する細胞を候補化合物と接触させること、および前記細胞内のサイクリックcAMPのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定することを含む。

30

【0189】

本発明者らはさらに、GPR86優先的G-タンパク質 G_i に共役したときのGPR86のアンタゴニストの同定方法を開示するが、この方法は、GPR86受容体を発現する細胞を候補化合物と接触させること、および前記細胞内のサイクリックAMP (cAMP)レベルが前記接触の結果増加するか否かを測定することを含む。あるいはまた、GPR86を $G_{\alpha 16}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共発現させる方法の場合、GPR86および $G_{\alpha 16}$ を発現する細胞を候補化合物と接触させること、および前記細胞内のサイクリックcAMPのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定することを含む。

【0190】

40

スクリーニングに使用することのできる細胞は種々の細胞型のものであり得る。こうした細胞には、動物由来細胞、酵母、ショウジョウバエ(*Drosophila*)または大腸菌(*E. coli*)が含まれる。受容体を発現する細胞(または発現した受容体を含有する細胞膜)を次に、試験化合物と接触させて、結合、または刺激または機能的応答の阻害を観察する。例えばゼノパス(*Xenopus*)卵母細胞にGPR86 mRNAまたはGPR86ポリペプチドを注入してもよく、そして試験化合物に曝露することにより誘導される電流を電圧留め具測定を用いて測定する(本明細書中で別途記載)。

【0191】

さらに、マイクロ生理機能測定アッセイを用いてGPR86受容体活性をアッセイすることができる。種々の第2メッセンジャー系の活性化は結果として細胞から少量の酸が押し出

50

されるようにする。形成される酸の大部分は、細胞内シグナル伝達プロセスを刺激するのに必要な増大した代謝活性の結果である。細胞を取り囲む媒体のpH変化は非常に小さいが、例えばCYTOSENSORマイクロ生理機能測定機(Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.)により検出可能である。CYTOSENSORは従って、エネルギー利用型細胞内シグナル伝達経路と共役した受容体(例えば本明細書に記載のGタンパク質共役型受容体)の活性化を検出することができる。

【0192】

各候補化合物を個別にGPR86受容体と試験する代わりに、候補リガンドのライブラリーまたはバンクを有利に作製しスクリーニングすることができる。このことから、例えば、200種を超える推定上の受容体リガンドのバンクが、スクリーニングのためにアセンブルされた。バンクは次のものを含む：ヒト7回膜貫通(7TM)受容体を介して作用することの知られている、伝達物質(transmitter)、ホルモンおよびケモカイン；ヒト7TM受容体の推定上のアゴニストであり得る天然化合物、未だに哺乳動物の対応物が同定されていない非哺乳動物性の生物学的に活性なペプチド；ならびに天然リガンドの知られていない7TM受容体を活性化させる天然には見られない化合物。このバンクは受容体を既知のリガンドについてスクリーニングするために使用されるが、これには機能的アッセイ(すなわちカルシウム、cAMP、マイクロ生理機能測定、卵母細胞電気生理学など、他を参照)および結合アッセイの両方が用いられる(他に詳述)。しかしながら、未だに、コグネイトな活性化リガンド(アゴニスト)または不活性化リガンド(アンタゴニスト)の見つからない多数の哺乳動物受容体が存在する。このことから、これらの受容体のための活性リガンドは今日までに同定されているリガンドバンク内に含まれない可能性がある。従って、GPR86受容体はまた、天然リガンドを同定するために、組織抽出物に対して機能的にスクリーニング(カルシウム、cAMP、マイクロ生理機能測定、卵母細胞電気生理学などの機能的スクリーニングを使用)する。陽性の機能的応答を生じる抽出物はその後、本明細書に記載のように画分をアッセイすることにより、活性化リガンドが単離され同定されるまで再分画(sub fractionate)することができる。

【0193】

HEK 293中で発現される7TM受容体は、PLCの活性化およびカルシウム動員および/またはcAMP刺激もしくは阻害に機能的に共役していることが示されている。従ってあるスクリーニング方法は、GPR86受容体を発現する細胞(例えば、トランスフェクトされたゼノパス(Xenopus)卵母細胞、CHOまたはHEK293細胞)の、受容体活性化により引き起こされる細胞外もしくは細胞内pH変化または細胞内カルシウム変化を測定する系における使用を含む。この技術においては、化合物を受容体ポリペプチドを発現する細胞と接触させることができる。第2メッセンジャー応答、例えばシグナル伝達、pH変化、またはカルシウムレベルの変化をその後測定して、可能性のある化合物が受容体を活性化するか阻害するかを決定する。

【0194】

こうした実験において、受容体トランスフェクト細胞またはベクターコントロール細胞のHEK 293細胞内の基底カルシウムレベルは、正常な100 nM~200 nMの範囲にあることが観察されている。GPR86または組換えGPR86を発現するHEK 293細胞にfura 2を加え、同日中に150を超える選択されたリガンドまたは組織/細胞抽出物を、アゴニスト誘導カルシウム動員について評価する。同様に、GPR86または組換えGPR86を発現するHEK 293細胞を、cAMP産生の促進または阻害について、標準cAMP定量アッセイを用いて評価する。カルシウム一過性変動またはcAMP変動を示すアゴニストをベクターコントロール細胞に試して、応答が受容体を発現するトランスフェクト細胞に特有のものが決定する。

【0195】

別の方法は、GPR86受容体仲介cAMPおよび/またはアデニル酸シクラーゼ蓄積の阻害または活性化を測定することによる受容体阻害剤のスクリーニングを含む。かかる方法は、真核細胞を受容体でトランスフェクトして、前記細胞表面に受容体を発現させることを伴う。前記細胞を次に受容体の存在下で潜在的アンタゴニストに曝露する。その後cAMPの蓄

積量を測定する。潜在的アンタゴニストが受容体に結合するならば、そしてそのことにより受容体結合を阻害するならば、受容体仲介cAMPレベルまたはアデニル酸シクラーゼ活性は低下または増加する。

【0196】

GPR86受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを検出する別の方法は、米国特許第5,482,835号明細書に記載の酵母に基づく技術であり、それを参照により本明細書に組み入れる。

【0197】

候補化合物がタンパク質、特に抗体またはペプチドである場合、ファージディスプレイ技術を用いて候補化合物のライブラリーをスクリーニングすることができる。ファージディスプレイは、組換えバクテリオファージを利用する分子スクリーニングのプロトコルである。この技術は、バクテリオファージを、候補化合物のライブラリーから1つの化合物をコードする遺伝子で形質転換して、各ファージまたはファージミドに特有の候補化合物を発現させることを伴う。形質転換バクテリオファージ(それは好ましくは固体担体に繋がれている)は、適当な候補化合物を発現し、そしてそれを自身のファージコート上に提示する。GPR86ポリペプチドまたはGPR86ペプチドに結合することのできる特定の候補化合物は、親和性相互作用に基づく選択戦略により富化される。成功した候補物質をその後特徴付けする。ファージディスプレイには、標準の親和性リガンドスクリーニング技術に優る利点がある。ファージ表面は候補物質を、その天然の配置によりよく似た三次元配置で提示する。これは、スクリーニング目的のための、より特異的で高親和性の結合を可能にする。

10

20

【0198】

化合物のライブラリーをスクリーニングする別の方法は、化合物のライブラリーを発現する組換えDNA分子で安定に形質転換された真核または原核宿主細胞を利用する。こうした細胞は、増殖可能形態であれ固定形態であれ、標準結合パートナーアッセイに使用することができる。細胞性応答を検出する高感度方法を記載したParce ら(1989) Science 246:243-247; およびOwicki ら(1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011も参照のこと。競合アッセイは特に有用であり、ここでは化合物のライブラリーを発現する細胞を、GPR86ポリペプチドに結合することの知られている標識された抗体(^{125}I -抗体など)および試験サンプル(例えば結合組成物への結合親和性が測定されている候補化合物)と接触またはインキュベートさせる。ポリペプチドの結合型および遊離の標識された結合パートナーを次に分離して、結合の程度を評価する。結合した試験サンプルの量は、ポリペプチドに結合している標識抗体の量に反比例する。

30

【0199】

多数の技術のいずれかを用いて、結合されたものから遊離型の結合パートナーを分離させて結合の程度を評価することができる。この分離ステップは典型的には、フィルターへの付着とそれに続く洗浄、プラスチックへの付着とそれに続く洗浄、または細胞膜の遠心分離のような手法を含み得る。

【0200】

さらに別のアプローチは、可溶化、未精製または可溶化精製ポリペプチドもしくはペプチド、例えば形質転換された真核または原核宿主細胞から抽出されたものを使用することである。これは、特異性が増加し、自動化することができ、そして薬剤試験スループットが高いという利点のある「分子的」結合アッセイを可能にする。

40

【0201】

候補化合物スクリーニングの別の技術は、適当な結合親和性(例えばGPR86ポリペプチドに対する結合親和性)を有する新規化合物の高スループットスクリーニングを提供するアプローチに関するものであり、これは1984年9月13日に公開された国際公開第WO 84/03564号(Commonwealth Serum Labs.)に詳細に記載されている。まず、多数の異なる小ペプチド試験化合物を固体基盤上、例えばプラスチックピンまたは他の適当な表面上に合成する; Fodor ら(1991)を参照されたい。次に、全てのピンを可溶化ポリペプチドと反応させ洗浄

50

する。次のステップは結合ポリペプチドを検出することに関する。前記ポリペプチドと特異的に相互作用する化合物が従って同定される。

【0202】

リガンド結合アッセイは、受容体薬理学を解明するための直接的方法を提供するものであり、かつ高スループット形式に適用可能である。受容体のための精製リガンドは、結合試験のために高比放射能(50-2000 Ci/mmol)へと放射標識することができる。放射標識の工程がリガンドの受容体に対する活性を消失させないことを次に確認する。バッファー、イオン、pHおよび他のモジュレーター(ヌクレオチドなど)のアッセイ条件を最適化して、膜および全細胞受容体供給源の両方の実用的なシグナル対ノイズ比を確立する。これらのアッセイにおいて、特異的受容体結合とは、全関連放射能から過剰の非標識競合リガンドの存在下で測定される放射能を減算したものと定義される。可能であれば2種以上の競合リガンドを使用して、残存非特異的結合を明らかにする。

10

【0203】

アッセイは、単純に候補化合物の結合性を検査することができ、ここで受容体を有する細胞への付着は、候補化合物と直接または間接的に結合する標識により検出される、または標識競合物との競合に関するアッセイにおいて検出される。その上、これらのアッセイは、候補化合物が受容体の活性化により生じるシグナルをもたらすか否かを、表面に受容体を有する細胞に適当な検出系を用いて検査することができる。活性化阻害剤は一般に、既知のアゴニストの存在下でアッセイし、候補化合物が存在することによる前記アゴニストの活性化の影響を観察する。

20

【0204】

さらに、アッセイは、単純に、候補化合物をGPR86ポリペプチドを含有する溶液と混合して混合液を形成させるステップ、該混合物におけるGPR86活性を測定するステップ、および該混合物のGPR86活性を標準と比較するステップを含み得る。

【0205】

GPR86 cDNA、タンパク質および該タンパク質に対する抗体もまた、細胞内でのGPR86 mRNAおよびタンパク質の産生に対する添加化合物の影響を検出するためのアッセイを構成するために使用することができる。例えば、ELISAをモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いてGPR86タンパク質の分泌レベルまたは細胞会合レベルの測定のために構築することができ(当技術分野で既知の標準法を使用)、そして該ELISAを使用して適当に操作された細胞または組織からGPR86の産生を阻害または促進し得る物質(それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)を発見することができる。スクリーニングアッセイを実施するための標準法は当技術分野でよく理解されている。

30

【0206】

潜在的GPR86アンタゴニストの例には、抗体または、ときには、ヌクレオチドおよびそのアナログ(プリンおよびプリンアナログも含まれる)、GPR86のリガンドに密接に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質(例えば該リガンドの断片)、または受容体に結合はするが応答を誘発せずそのことにより受容体の活性を阻止する小分子が含まれる。

【0207】

従って本発明者らは、GPR86ポリペプチドおよび/またはペプチドに特異的に結合することのできる化合物を提供する。

40

【0208】

「化合物」という用語は、化学的化合物(天然または合成)、例えば生物学的巨大分子(例えば、核酸、タンパク質、非ペプチド分子または有機分子)、または生物学的材料(例えば細菌、植物、菌類、または動物(特に哺乳動物)の細胞もしくは組織)から調製された抽出物、あるいは無機エレメントもしくは無機分子をも言う。好ましくは化合物は抗体である。

【0209】

こうしたスクリーニングを行うために必要な材料は、スクリーニングキットに包装することができる。このようなスクリーニングキットは、GPR86ポリペプチドに対するアゴニ

50

スト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、またはGPR86ポリペプチドの産生を低下または強化する化合物の同定に有用である。スクリーニングキットは：(a) GPR86ポリペプチド；(b) GPR86ポリペプチドを発現する組換え細胞；(c) GPR86ポリペプチドを発現する細胞膜；または (d) GPR86ポリペプチドに対する抗体を含む。スクリーニングキットは場合により使用説明書を含んでもよい。

【0210】

トランスジェニック動物

本発明者らはさらに、天然または組換えGPR86、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体を、正常な発現レベルと比較して正常レベル、増加されたレベルまたは低減されたレベルで発現することのできるトランスジェニック動物を開示する。好ましくはこうしたトランスジェニック動物は非ヒト哺乳動物、例えばブタ、ヒツジまたは齧歯類である。最も好ましくはトランスジェニック動物はマウスまたはラットである。

10

【0211】

本発明者らは、天然GPR86遺伝子の全部または一部を別の生物からのGPR86配列で置換したトランスジェニック動物を開示する。好ましくはこの生物は別の種、最も好ましくはヒトである。特に好ましい実施形態において、本発明者らは、実質的にそのGPR86遺伝子全体がヒトGPR86遺伝子で置換されたマウスを開示する。このようなトランスジェニック動物ならびにGPR86が野生型である動物を、GPR86のアゴニストおよび/またはアンタゴニストのスクリーニングに使用することができる。

20

【0212】

例えば、こうしたアッセイは、前記野生型動物またはトランスジェニック動物、もしくはその一部(好ましくは前記トランスジェニック動物の細胞、組織または器官)を候補物質に曝露し、そしてGPR86関連表現型(疼痛または炎症など)についてアッセイすることを含み得る。関連する動物由来の細胞を使用しかつ細胞内サイクリックAMP濃度に対する影響をアッセイする細胞に基づくスクリーニングも実施可能である。

【0213】

本発明者らはさらに機能破壊されたGPR86遺伝子を含むトランスジェニック動物を開示するが、該動物中では本明細書に開示のGPR86の1以上の機能は部分的にまたは完全に消滅されている。これには、GPR86遺伝子の1以上の機能喪失型突然変異(欠失も含む)の結果、機能性GPR86を発現しないトランスジェニック動物(「GPR86ノックアウト体」)が含まれる。

30

【0214】

機能性GPR86を欠いたトランスジェニック動物(GPR86ノックアウト体)は、野生型動物と比較したときに、変更された疼痛感受性を示す。具体的には、GPR86ノックアウト体はさほど疼痛感受性ではない。その上、GPR86ノックアウト動物は、変更された炎症性疼痛感受性、特に低減された炎症性疼痛感受性を示す。

【0215】

部分的に機能喪失された変異体、例えば不完全ノックアウト体もまた包含され、それは例えばGPR86遺伝子の選択された部分に欠失を有し得る。こうした動物は、GPR86配列の該当部分、例えば機能的に重要なタンパク質ドメインを選択的に置換または欠失することにより作製できる。

40

【0216】

こうした完全または部分的に機能喪失された変異体は、GPR86関連疾患、特に疼痛または炎症性疾患、のモデルとして有用である。部分的な機能喪失を示す動物を候補物質に曝露して、表現型を増強する(言い換えるとGPR86の場合については観察される低減された疼痛感受性表現型を増加させる)物質を同定することができる。他のパラメーター(例えば細胞内サイクリックAMPレベルの変化)もまた、本明細書中に他に記載する方法を用いて検出することができる。

【0217】

部分的および完全ノックアウト体はまた、GPR86の選択的アゴニストおよび/またはア

50

ンタゴニストの同定にも使用可能である。例えば、アゴニストおよび/またはアンタゴニストを野生型動物およびGPR86欠失動物(ノックアウト体)に投与することができる。GPR86の選択的アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、野生型動物に対して影響を及ぼすことが観察されても、GPR86欠失動物には観察されないことになる。詳細には、潜在的薬剤(候補リガンドまたは化合物)を評価するために特定のアッセイを設計して、該潜在的薬剤がGPR86の不在下で生理学的応答を生じるか決定する。これは、前記薬剤を上述のようなトランスジェニック動物に投与すること、およびその後該動物を特定の応答についてアッセイすることにより達成され得る。これと似た細胞に基づく方法であって、関連する動物由来の細胞を使用しかつ細胞内サイクリックAMP濃度に対する影響をアッセイする方法もまた実施可能である。かかる動物を、本明細書に記載のスクリーニングにより同定された薬剤の効率を試験するために使用することもできる。

【0218】

別の実施形態では、部分的な機能喪失表現型を有するトランスジェニック動物をスクリーニングに利用する。かかる実施形態では、スクリーニングは野生型表現型への部分的または完全な回復または復帰をアッセイすることを伴い得る。当該動物由来の細胞を使用しかつ細胞内サイクリックAMP濃度に対する影響をアッセイする、細胞に基づくスクリーニングもまた実施可能である。前記能力があることが見出された候補化合物はGPR86アゴニストまたはGPR86アナログと見なすことができる。こうしたアゴニストは、例えば刺激(例えば疼痛)に対する感受性を回復させるまたは増加させるために使用することができる。

【0219】

好ましい実施形態において、トランスジェニックGPR86動物、特にGPR86ノックアウト体(完全な機能喪失)は、実施例に記載の表現型を示し、それは好ましくはその実施例に記載の試験法により測定される。このことから、GPR86動物、特にGPR86ノックアウト体は、好ましくは次の1以上を示す：より低い疼痛感受性(痛覚鈍麻)、より低い炎症感受性。

【0220】

特に好ましい実施形態では、トランスジェニックGPR86動物、特にGPR86ノックアウト体は、対応する野生型マウスと比較して、測定パラメーターの少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%(その場合に応じて)高いまたは低い値を示す。このことから、例えばGPR86ノックアウト体は実施例に記載のテールフリックテスト(Tail Flick test)に応答する疼痛閾値が増加しており、それは野生型マウスと比較した場合それは1秒、2秒、5秒、10秒、30秒以上、または5%、10%、20%、50%以上である。

【0221】

GPR86欠失トランスジェニック動物について今や開示された表現型を、野生型動物を用いるスクリーニングに有効に使用して、GPR86の機能喪失と類似した効果を引き起こす化合物を検出することができることは明らかであろう。言い換えると、野生型動物を候補化合物に曝露すること、および関連するGPR86表現型(例えば疼痛感受性の減少など)を観察することにより、GPR86機能のモジュレーター、特にアンタゴニストを同定することができる。細胞内表現型(例えば細胞内サイクリックAMPレベルの変化)もまた、本明細書に他に特定する方法を用いて検出することができる。

【0222】

こうしたスクリーニングにより同定された化合物を、GPR86のアンタゴニストとして(例えば鎮痛剤として)特にGPR86関連疾患の治療または緩和のために使用することができる。

【0223】

上記スクリーニングは、任意の適当なパラメーター(行動、生理学的または生化学的応答など)の観察を伴うことができる。好ましい応答には次の1以上が含まれる：疾患耐性の変化；炎症応答の変更；腫瘍易罹患性の変更；血圧の変化；新血管形成；摂食行動の変化；体重の変化；骨密度の変化；体温の変化；インスリン分泌；ゴナドトロピン分泌；鼻および気管支での分泌；血管収縮；記憶喪失；精神不安症；反射低下または反射異常亢進

；疼痛応答もしくはストレス応答。

【0224】

GPR86ノックアウト動物由来の組織を受容体結合アッセイに使用して、可能性のある薬剤(候補リガンドまたは化合物)がGPR86受容体に結合するか否かを決定することができる。こうしたアッセイは、第1の受容体調製物をGPR86受容体産生が欠失するように遺伝子操作されたトランスジェニック動物から取得し、そして任意の同定されたGPR86リガンドもしくは化合物に結合することが知られている第2の受容体調製物を既知の供給源から取得することにより実施し得る。一般に、第1および第2の受容体調製物は、それらを取得した供給源以外はあらゆる面で同じである。例えば、トランスジェニック動物(上および下に記載したものなど)由来の脳組織をアッセイに使用する場合、正常(野生型)動物由来の相当する脳組織を第2の受容体調製物の供給源として使用する。各受容体調製物を、GPR86受容体に結合することが知られているリガンドと、単独でまたは候補リガンドもしくは候補化合物の存在下でインキュベートする。好ましくは候補リガンドまたは候補化合物を複数の異なる濃度で調べる。

10

【0225】

既知のリガンドによる結合が試験化合物によって置き換えられる程度を、第1のおよび第2の受容体調製物の両方について決定する。トランスジェニック動物由来の組織をアッセイに直接使用するか、または組織を加工して膜もしくは膜タンパク質を単離してそれらそのものをアッセイに使用することができる。好ましいトランスジェニック動物はマウスである。リガンドは結合アッセイと適合可能などのような手段を用いて標識してもよい。これには、限定するものではないが、放射能、酵素、蛍光または化学発光標識(および本明細書で上に詳述した他の標識技術)が含まれる。

20

【0226】

さらにGPR86受容体のアンタゴニストは、候補化合物などを機能性GPR86を発現する野生型動物に投与すること、およびGPR86受容体機能の発現の低下または消失と関連するいずれかの表現型の特徴を示す動物を特定することにより同定され得る。

【0227】

非ヒトトランスジェニック動物を作製するための詳細な方法を以下に詳述する。トランスジェニック遺伝子構築物を動物の生殖細胞系列に導入してトランスジェニック動物を作製することができる。例えば、1以上のコピーの構築物を標準トランスジェニック技術により哺乳動物の胚のゲノムに組み入れることができる。

30

【0228】

典型的実施形態において、本明細書に記載のトランスジェニック非ヒト動物は、トランスジーンを非ヒト動物の生殖細胞系列に導入することにより作製する。種々の発達段階にある胚性標的細胞をトランスジーン導入に使用することができる。胚性標的細胞の発達段階に応じて異なる手法を用いる。この目的のために使用する動物の具体的な系列は、全般的に良好な健康性、良好な胚の産生、胚における良好な前核視認性、および良好な生殖適応性について選択する。さらに、ハプロタイプは重要な因子である。

【0229】

トランスジーンの前核への導入は、当技術分野で既知の任意の方法、例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、またはリポフェクションにより達成することができる。例えば構築物を受精哺乳動物卵の前核にマイクロインジェクションすることによりGPR86受容体トランスジーンを哺乳動物に導入して、1以上の構築物のコピーを発達中の哺乳動物細胞に保持させることができる。トランスジーン構築物を受精卵に導入した後に、卵を種々の時間に渡りインキュベートすることができ、または代理宿主に再移植することもでき、または両方行ってもよい。in vitroインキュベーションによる成熟は本明細書の範囲内にある。ある一般的な方法は、胚を種に応じて約1~7日in vitroでインキュベートすること、およびその後それらを代理宿主に再移植することである。

40

【0230】

遺伝子導入操作された胚の子孫を、組織片のサザンブロット分析を利用して、構築物の

50

存在について検査することができる。1以上のコピーの外來性クローニング構築物がこうしたトランスジェニック胚のゲノムに安定に組み込まれてとどまれば、トランスジェニックに追加された構築物を保持する恒久的トランスジェニック哺乳動物系を樹立することが可能である。

【0231】

トランスジェニックに改変された哺乳動物の同腹仔を、該子孫のゲノムへの構築物の導入について出生後にアッセイすることができる。好ましくはこのアッセイは、所望の組換えタンパク質産物をコードするDNA配列またはそのセグメントに対応するプローブを子孫由来の染色体物質とハイブリダイズさせることにより行う。そのゲノム内に少なくとも1つのコピーの構築物を有することが見出された哺乳動物子孫を成熟するまで成長させる。

10

【0232】

本発明の目的において、接合体は本質的に完全な生物へと発生することのできる二倍体細胞が形成されたものである。一般的に、接合体は配偶子由来の2つのハプロイド核の融合によって、自然にまたは人為的に形成された核を含有する卵を含む。従って、配偶子の核は、そのまま適合可能な（すなわち、分化して機能する生物に発育することのできる生存接合体を生じる）核でなければならない。一般的に、正倍数体の接合体が好ましい。異数体の接合体が得られる場合には、染色体数はいずれかの配偶子が由来する生物の正倍数体の数に対して2以上変化してはならない。

【0233】

類似する生物学的考慮事項の他に、物理的考慮事項もまた、接合体核にまたは接合体核の一部を形成する遺伝物質に加えることのできる外來性遺伝物質の量（例えば容積）を左右する。遺伝物質が除かれなない場合は、添加することのできる外來性遺伝物質の量は、物理的に破壊性となることなく吸収される量により制限される。一般的に、挿入される外來性遺伝物質の容積は、約10ピコリットルを超えない。添加の物理的影響は接合体の生存を物理的に破壊するほど大きくなってはいけない。DNA配列の数と種類の生物学的限界は、個々の接合体と外來性遺伝物質の機能に応じて変化し、これは当業者には直ちに明らかになるであろう。何故ならば、得られる接合体の遺伝物質（外來性遺伝物質を含む）は、接合体の機能性生物への分化と発生を開始させかつ維持する生物学的能力が必要だからである。

20

【0234】

接合体に添加するトランスジェニック構築物のコピー数は、添加する外來性遺伝物質の総量に依存し、遺伝的形質転換を可能にする量となる。理論的には1コピーしか必要ない；しかしながら、一般的には、多数のコピー（例えば、1,000～20,000コピーのトランスジェニック構築物）を使用し、1コピーが機能的であることを確実にする。それぞれの挿入される外來性DNA配列の2以上の機能性コピーを有することが、外來性DNA配列の表現型発現を増強するためにしばしば有利であろう。

30

【0235】

その技術が細胞、核膜、または他の既存の細胞構造もしくは遺伝子構造を破壊しない限り、外來性遺伝物質を核遺伝物質中に加えることのできるいずれの技術を利用してもよい。外來性遺伝物質は、好ましくはマイクロインジェクションによって、核遺伝物質中に優先的に挿入する。細胞および細胞構造物のマイクロインジェクションは公知であり、当技術分野で使用されている。

40

【0236】

再移植は標準法を用いて行う。通常、代理宿主を麻酔し、胚を卵管中に挿入する。特定の宿主中に移植する胚の数は、種に応じて変わるが、通常はその種が天然に産生する子孫の数と同程度であろう。

【0237】

代理宿主のトランスジェニック子孫は、任意の適切な方法によってトランスジェニックの存在および/または発現についてスクリーニングすることができる。スクリーニングは、しばしば、トランスジェニックの少なくとも一部に相補的なプローブを使用して、サザンブロッ

50

ト分析またはノーザンブロット分析によって行う。トランスジーンがコードするタンパク質に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析を、トランスジーン産物の存在をスクリーニングするための代替法または追加の方法として利用してもよい。典型的には、DNAを尾組織から調製し、そしてトランスジーンについてサザン分析またはPCRによって分析する。あるいは、最高レベルでトランスジーンを発現すると考えられる組織または細胞をサザン分析またはPCRを用いてトランスジーン存在および発現について試験するが、この分析にはいずれの組織または細胞型も使用可能である。

【0238】

トランスジーン存在を評価するための代替のまたは追加の方法としては、限定するものでないが、酵素および/または免疫学的アッセイなどの適当な生化学的アッセイ、特定のマーカーまたは酵素活性に対する組織学的染色、フローサイトメトリー分析などが挙げられる。血液の分析もまた、血液中のトランスジーン産物の存在を検出するために、ならびに様々な種類の血液細胞および他の血液成分のレベルに対するトランスジーンの影響を評価するために有用であり得る。

【0239】

トランスジェニック動物の子孫は、トランスジェニック動物を適当なパートナーと交配させること、またはトランスジェニック動物から得られた卵および/または精子をin vitro受精させることにより得ることができる。パートナーとの交配を行う場合、パートナーはトランスジェニックおよび/またはノックアウト体であってもなくてもよく；トランスジェニックである場合には、パートナーは同一もしくは異なるトランスジーン、またはその両方を含有してもよい。あるいは、パートナーは親系であり得る。in vitro受精を行う場合、受精胚を代理宿主に移植するもしくはin vitroでインキュベートする、またはその両方を行うことが可能である。いずれの方法を用いるにせよ、子孫を上記方法または他の適当な方法を用いてトランスジーン存在について評価することができる。

【0240】

本明細書の記載に従い作製されるトランスジェニック動物は、外来性遺伝物質を含有する。上述のように、外来性遺伝物質は、特定の実施形態において、GPR86受容体の産生をもたらすDNA配列である。さらにこうした実施形態において前記配列は、好ましくは特定の種類の細胞でのトランスジーン産物の発現を可能にする、転写制御エレメント(例えばプロモーター)に連結されている。

【0241】

レトロウイルス感染を使用して、非ヒト動物にトランスジーンを導入することもできる。発生中の非ヒト胚を、胚盤胞期までin vitroで培養することができる。この間、卵割球をレトロウイルス感染の標的とすることができる(Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264)。透明帯を除去する酵素処理によって卵割球の効率的な感染がもたらされる(Manipulating the Mouse Embryo, Hogan編(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986))。トランスジーンを導入するために使用するウイルスベクター系は、典型的には、トランスジーンを保持する複製欠損レトロウイルスである(Jahnerら, (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Puttenら, (1985) PNAS 82:6148-6152)。トランスフェクションは、卵割球をウイルス産生細胞の単層上で培養することにより、容易にかつ効率的に行われる(Van der Putten、前掲; Stewartら, (1987) EMBO J. 6:383-388)。あるいは、感染を後期に実施してもよい。ウイルスまたはウイルス産生細胞を胞胚腔に注入することができる(Jahnerら, (1982) Nature 298:623-628)。組み込みはトランスジェニック非ヒト動物を形成する細胞のサブセットにおいてのみ起こるので、ほとんどの創始体(founder)はトランスジーンについてモザイクである。さらに、創始体は、トランスジーン様々なレトロウイルス挿入物を、一般的に子孫では分離するゲノム中の様々な位置に含みうる。さらに、妊娠中期胚の子宮内レトロウイルス感染によって生殖細胞系にトランスジーンを導入することも可能である(Jahnerら(1982)、前記)。

【0242】

トランスジーン導入のための第3の種類の標的細胞は胚性幹細胞(ES)である。ES細胞

10

20

30

40

50

をin vitro培養された着床前の胚から得て、胚と融合させる (Evansら, 1981, Nature, 292, 154-156; Bradleyら, (1984), Nature, 309, 255-258; Gosslerら, (1986), PNAS, 83, 9065-9069; およびRobertsonら, (1986), Nature, 322, 445-448)。トランスジーンを、ES細胞中にDNAトランスフェクションまたはレトロウイルス媒介形質導入により有効に導入することができる。その後、こうした形質転換ES細胞を、非ヒト動物由来の胎盤細胞と一体化させることができる。その後、ES細胞は胚をコロニー形成し、得られるキメラ動物の生殖細胞系に寄与する。総説についてはJaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474を参照のこと。

【0243】

本発明者らはまた非ヒトトランスジェニック動物を提供するが、ここで該トランスジェニック動物は、GPR86受容体機能のためのモデルとして、改変されたGPR86遺伝子(好ましくは上記のようなもの)を有することを特徴とする。遺伝子に対する改変には、欠失もしくは他の機能喪失型突然変異、標的突然変異またはランダム突然変異のあるヌクレオチドを有する外来遺伝子の導入、別の種に由来する外来遺伝子の導入、またはこれらの組み合わせが含まれる。前記トランスジェニック動物は改変に関してホモ接合またはヘテロ接合であり得る。これらの動物およびその由来細胞は、GPR86受容体機能をモジュレートする生物学的に活性な物質をスクリーニングするのに有用である。前記スクリーニング方法は、疼痛および炎症疾患(変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、過敏性腸症候群およびアレルギーなど)の可能性のある治療薬の特異性および作用を決定するのに特に有用である。前記動物は、正常な脳、心臓、脾臓および肝臓機能におけるGPR86受容体の役割を調査するためのモデルとして有用である。

【0244】

別の態様は、機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有する一方で、ゲノム内に異種GPR86タンパク質(すなわち別の種由来のGPR86)をコードするトランスジーンを保持しかつ発現するトランスジェニック非ヒト動物に関する。好ましくは、前記動物はマウスであり、異種GPR86はヒトGPR86である。ヒトGPR86によって復帰された、こうした動物またはそれに由来する細胞系は、ヒトGPR86をin vivoおよびin vitroで阻害する物質を同定するために使用することができる。例えばヒトGPR86を介したシグナル伝達を誘発する刺激を、試験する物質の存在下または不在下で前記動物または細胞系に加え、前記動物または細胞系の応答を測定することができる。ヒトGPR86をin vivoまたはin vitroで阻害する物質は、前記物質の不在下での応答と比較した前記物質の存在下での応答の低下を基に同定することができる。

【0245】

本発明者らまた、GPR86欠損トランスジェニック非ヒト動物(「GPR86ノックアウト体」)を提供する。かかる動物は(好ましくは内因性GPR86ゲノム配列が破壊もしくは欠失された結果として)GPR86活性の低下または不在を示すものである。好ましくは、かかる動物はGPR86活性を示さない。より好ましくは、前記動物は配列番号3または配列番号5に記載のGPR86の活性を示さない。GPR86ノックアウト体は、下に詳述するとおり、当技術分野で公知の種々の手法により作製することができる。

【0246】

本発明はまた、宿主細胞中のGPR86遺伝子を機能破壊するための核酸構築物に関する。前記核酸構築物は、(a)非相同置換部分;(b)非相同置換部分の上流に位置する第1相同領域であって、第1のGPR86遺伝子配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する前記第1相同領域;および(c)非相同置換部分の下流に位置し、第2のGPR86遺伝子配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する第2相同領域(ただし、第2のGPR86遺伝子配列は天然の内因性GPR86遺伝子中で前記第1のGPR86遺伝子配列より下流の位置にある)を含み得る。それに加え、第1および第2相同領域は、核酸分子を宿主細胞に導入したとき、宿主細胞中で核酸構築物と内因性GPR86遺伝子との間の相同組換えに十分な長さのものである。好ましい実施形態においては、非相同置換部分は発現レポーターを含み、好ましくはlacZおよびポジティブ選択発現カセットを含み、好ましくは調節エレメントと機能的に連

結されたネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む。

【0247】

好ましくは前記第1および第2のGPR86遺伝子配列は、配列番号1、配列番号2または配列番号4、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体由来する。

【0248】

別の態様は、本明細書に記載の核酸構築物を組み入れた組換えベクターに関する。さらに別の態様は、本明細書に記載の核酸構築物を宿主細胞に導入し、そのことにより前記核酸構築物と前記宿主細胞の内因性GPR86遺伝子とを相同組換えさせ、内因性GPR86遺伝子を機能破壊した前記宿主細胞に関する。宿主細胞はGPR86を正常に発現する、肝臓、脳、脾臓もしくは心臓由来の哺乳動物細胞、または多能性細胞、例えばマウス胚性幹細胞でありうる。前記核酸構築物が導入されかつ内因性GPR86遺伝子と相同組換えした胚性幹細胞をさらに発達させると、前記胚性幹細胞の子孫であり従ってそのゲノムにGPR86遺伝子破壊を保持する細胞を有するトランスジェニック非ヒト動物が得られる。その生殖細胞系列にGPR86遺伝子破壊を保持する動物をその後選択および繁殖させて、全ての体細胞および生殖細胞がGPR86遺伝子破壊された動物を得ることができる。こうしたマウスは次にGPR86遺伝子破壊についてホモ接合性まで繁殖させることができる。

10

【0249】

抗体

本発明の目的において「抗体」という用語には、特に断らない限り、限定するものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーにより産生されるフラグメントが含まれる。こうしたフラグメントには、標的物質に対する結合活性を保持する全抗体のフラグメント、Fv、F(ab')、およびF(ab')₂フラグメント、ならびに、一本鎖抗体(scFv)、融合タンパク質および抗体の抗原結合部位を含有する他の合成タンパク質が含まれる。抗体およびそのフラグメントはヒト化抗体(例えばEP-A-239400に記載のもの)であってもよい。さらに、完全にヒトの可変領域(またはそのフラグメント)をもつ抗体(例えば米国特許第5,545,807号および第6,075,181号に記載のもの)も使用することができる。中和抗体、すなわち、物質アミノ酸配列の生物学的活性を阻害する抗体は、診断および治療に特に好ましい。

20

【0250】

抗体は、標準法によって、例えば、免疫法によりまたはファージディスプレイライブラリーの使用により産生することができる。

30

【0251】

GPR86ポリペプチドまたはペプチドを用いて公知の技術により抗体を開発することができる。かかる抗体はGPR86タンパク質またはホモログ、断片などに特異的に結合する能力を有する。

【0252】

もしポリクローナル抗体を望むのであれば、選択した哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど)を、GPR86ポリペプチドまたはペプチドを含む免疫原性組成物を用いて免疫感作することができる。宿主の種に応じて、様々なアジュバントを用いて、免疫応答を増加させることができる。かかるアジュバントには、限定されるものではないが、フロイントのアジュバント、ミネラルゲル(例えば、水酸化アルミニウム)、および界面活性剤、例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ならびにジニトロフェノールが含まれる。BCG(Bacilli Calmette-Guerin)およびコリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)は有用である可能性のあるヒトアジュバントであり、これらは精製された物質アミノ酸配列を全身防御を刺激する目的で免疫無防備状態の個体に投与する場合に使用することができる。

40

【0253】

免疫感作した動物から血清を公知の方法で採取し処理する。GPR86ポリペプチドから得られうるエピトープに対するポリクローナル抗体を含有する血清が、他抗原に対する抗体

50

を含有する場合には、ポリクローナル抗体をイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。ポリクローナル抗血清を産生させかつ加工する技術は、当技術分野で公知である。かかる抗体を作製することができるように、本発明者らはさらに、動物またはヒトにおける免疫原として利用するためのGPR86アミノ酸配列、または他のアミノ酸配列にハプテン化されたその断片をも提供する。

【0254】

GPR86ポリペプチドまたはペプチドから得られうるエピトープに対するモノクローナル抗体も当業者により容易に作製されうる。ハイブリドーマによりモノクローナル抗体を作る一般的方法は広く知られている。不死性の抗体産生細胞株は細胞融合により作製することができ、また、他の技術、例えば腫瘍形成性DNAによるBリンパ球の直接形質転換、またはエプスタイン・バーウイルスによるトランスフェクションにより作製することができる。オービットエピトープ (orbit epitope) に対して産生されたモノクローナル抗体のパネルを、様々な特性 (すなわち、イソ型およびエピトープ親和性) についてスクリーニングしてもよい。

10

【0255】

モノクローナル抗体は、連続培養細胞株による抗体分子の産生をもたらすいずれの技術を使用して調製してもよい。これらの技術としては、限定されるものでないが、Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497) に最初に記載されたハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosborら, (1983) Immunol Today 4:72; Coteら, (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030)、およびEBV-ハイブリドーマ技術 (Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp.77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) が挙げられる。

20

【0256】

さらに、「キメラ抗体」作製のために開発された技術である、適当な抗原特異性と生物活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを利用することができる (Morrisonら, (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neubergerら, (1984) Nature 312:604-608; Takedaら, (1985) Nature 314:452-454)。あるいは、一本鎖抗体の作製について記載した技術 (米国特許第4,946,779号) を応用して、物質特異的な一本鎖抗体を作製することができる。

30

【0257】

GPR86ポリペプチドまたはペプチドから得られうるエピトープに対する抗体 (モノクローナルおよびポリクローナル共に) は、特に診断に有用であり、また、中和抗体は受動免疫療法において有用である。特にモノクローナル抗体を使用して、抗イディオタイプ抗体を誘発させることができる。抗イディオタイプ抗体とは、物質および/または薬剤 (それに対する保護が望まれる) の「内部イメージ」を保持する免疫グロブリンである。抗イディオタイプ抗体を誘発させる技術は、当技術分野で公知である。これらの抗イディオタイプ抗体は治療にも有用でありうる。

40

【0258】

抗体はまた、リンパ球集団でのin vivo産生を誘発させることにより、または組換え免疫グロブリンライブラリーもしくは高特異的結合試薬のパネルをスクリーニングすることにより作製することもでき、これはOrlandiら (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837) ならびにWinter GおよびMilstein C (1991, Nature 349:293-299) に開示される通りである。

【0259】

ポリペプチドまたはペプチドに対する特異的結合部位を含有する抗体フラグメントを作製することもできる。例えば、かかるフラグメントには、限定するものでないが、抗体分子のペプシン消化により生成可能なF(ab')₂フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋結合の還元により作製することができるFabフラグメントが含まれる。あるいは、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能にするようにFab発現ライブラリーを構築することもできる (Huse WDら, (1989) S

50

science 256:1275-1281)。

【0260】

一本鎖抗体の作製技術(米国特許第4,946,778号)を応用して、GPR86ポリペプチドに対する一本鎖抗体を作製することもできる。また、トランスジェニックマウスまたは他の生物(他の哺乳動物を含む)を用いて、ヒト化抗体を発現させることもできる。

【0261】

上述の抗体は、前記ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定するため、または前記ポリペプチドをアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製するために利用することができる。

【0262】

GPR86ポリペプチドに対する抗体はまた、疼痛および炎症性疾患、例えば変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、過敏性腸症候群およびアレルギーの治療にも利用することができる。

【0263】

診断アッセイ

本発明者らはさらに、診断試薬として診断にまたは遺伝分析に使用するための、GPR86ポリヌクレオチドおよびポリペプチド(ならびにそれらのホモログ、変異体および誘導体)の使用を記載する。GPR86核酸(ホモログ、変異体および誘導体を含む)と相補的なまたはハイブリダイズすることができる核酸、ならびにGPR86ポリペプチドに対する抗体もこうしたアッセイに有用である。

【0264】

機能障害に関連したGPR86遺伝子の突然変異型の検出は、GPR86の過小発現、過剰発現または変更された発現の結果生じる疾患または該疾患への易罹患性の診断に追加することができる、またはかかる診断を規定することができる診断ツールを提供する。GPR86遺伝子(対照配列を含む)に突然変異を保有する個体は、様々な技術によりDNAレベルで検出することができる。

【0265】

例えば、DNAを患者から単離し、GPR86のDNA多型パターンを決定することができる。同定したパターンを、GPR86の過剰、過小または異常発現に関連する疾患に罹っていることがわかっている対照の患者と比較する。すると、GPR86関連疾患に関連する遺伝的多型パターンを示す患者を同定することができる。GPR86遺伝子の遺伝分析は、当技術分野で公知のどの技術により実施してもよい。例えば、GPR86対立遺伝子のDNA配列を決定してRFLPまたはSNP解析などにより個体をスクリーニングしてもよい。患者がGPR86の過剰、過小または異常発現に関連する疾患に対する遺伝的素因を有することは、GPR86の遺伝子配列またはその発現を制御するいずれかの配列中のDNA多型の存在を検出することにより同定することができる。

【0266】

次いでこのようにして同定した患者は、GPR86関連疾患の発症を予防するために、またはさらに積極的にGPR86関連疾患の初期段階で、疾患のさらなる発症または進展を防止するために処置することができる。GPR86関連疾患には、ドーパミン関連疾患、例えばパーキンソン病、心疾患、例えば上室性不整脈または心室性不整脈、低血圧、吐気、トウレット症候群、ストレスおよび疼痛が含まれる。

【0267】

本発明者らは、さらに、GPR86関連疾患に関連する患者の遺伝的多型パターンを同定するためのキットを開示する。該キットは、DNAサンプル採取手段および遺伝的多型パターン測定手段を含み、測定した多型パターンを次いで対照サンプルと比較してGPR86関連疾患に対する患者の易罹患性を決定する。GPR86ポリペプチドおよび/またはかかるポリペプチドに対する抗体(またはそのフラグメント)を含んでなるGPR86関連疾患診断用キットも提供する。

【0268】

診断用核酸は、被験者の細胞から、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から得ることができる。好ましい実施形態では、患者の指穿刺により吸収紙上に血液を回収して得られた血球からDNAを取得する。さらに好ましい実施形態では、AmpliCard™ (University of Sheffield, Department of Medicine and Pharmacology, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, England S10 2JF) で血液を採取する。

【0269】

DNAは検出のために直接使用するか、または分析前にPCRまたは他の増幅技術を用いて酵素で増幅することができる。対象の遺伝子内の特定の多型DNA領域を標的とするオリゴヌクレオチドDNAプライマーを調製して、PCR反応で標的配列の増幅が達成されるようにする。RNAまたはcDNAを類似の様式で鋳型として用いてもよい。次いで、鋳型DNAから増幅されたDNA配列を制限酵素により分析して増幅配列中に存在する遺伝的多型を決定し、それにより患者の遺伝的多型プロファイルを得ることができる。制限断片の長さはゲル分析により同定することができる。これとは別に、またはそれと一緒に、SNP (一塩基多型) 分析などの技術を使用してもよい。

10

【0270】

欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較した増幅産物のサイズの変化により検出することができる。点突然変異は、増幅DNAを標識GPR86ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることにより同定することができる。完全にマッチした配列は、RNアーゼ消化または融解温度の差によりミスマッチの二本鎖と区別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤を用いたまたは用いないゲル中のDNA断片の電気泳動移動度の変化により、または直接的なDNA配列決定により検出することもできる。例えば、Myersら, Science (1985) 230:1242を参照のこと。特定の位置での配列の変化はまた、RNアーゼおよびS1プロテクションなどのヌクレアーゼプロテクションアッセイにより、または化学的切断法により明らかにすることもできる。Cottonら, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85:4397-4401を参照のこと。他の実施形態においては、GPR86ヌクレオチド配列またはその断片を含有するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば遺伝子突然変異の、効率的なスクリーニングを実施することもできる。アレイ技法は周知であり、いろいろな応用性を有し、これを利用して遺伝子発現、遺伝的連鎖、および遺伝的変異性を含む分子遺伝学の様々な問題に取り組むことができる。(例えば、M. Cheeら, Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)を参照のこと)。

20

30

【0271】

一本鎖コンフォメーション多型 (SSCP) を利用して、突然変異型核酸と野生型核酸の間の電気泳動移動度の相違を検出することができる (Oritaら, (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA: 86:2766; Cotton (1993) Mutat Res 285:125-144; およびHayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79も参照のこと)。サンプルおよび対照GPR86核酸の一本鎖DNA断片は変性させて、再生させることができる。一本鎖核酸の二次構造は配列によって変化し、その結果生じる電気泳動移動度の変化により1塩基の変化ですら検出が可能になる。DNA断片を標識してもよいし、標識プローブを用いてDNA断片を検出してもよい。アッセイの感度は、(DNAよりもむしろ) 二次構造が配列の変化に影響されやすいRNAを使用することで増強することができる。好ましい実施形態においては、本方法はヘテロ二本鎖分析を利用して、電気泳動移動度の変化に基づいて二本鎖形成したヘテロ二本鎖分子を分離する (Keenら, (1991) Trends Genet 7:5)。

40

【0272】

診断アッセイは、記載した方法によるGPR86遺伝子の突然変異の検出を介して、感染に対する易罹患性を診断または判定する方法を提供する。

【0273】

サンプル中のGPR86ポリペプチドおよび核酸の存在を検出することができる。従って、上記の感染症および疾患は、被験者由来のサンプルからGPR86ポリペプチドまたはGPR86 mRNAのレベルの異常な減少または増加を同定するステップを含む方法によって診断することができる。サンプルは、GPR86発現の増加、減少、さもなくば異常 (発現レベルまたはバ

50

ターンの空間的または時間的变化を含む)に関連する疾患に罹っているか罹っていると疑われる生物由来の細胞または組織サンプルを含みうる。かかる疾患に罹っているか罹っていると疑われる生物におけるGPR86の発現レベルまたはパターンは、疾患の診断手段として、正常な生物における発現レベルまたはパターンと有効に比較することができる。

【0274】

従って一般的に、本発明者らは、サンプル中のGPR86核酸を含有する核酸の存在を検出する方法であって、該サンプルを、前記核酸に特異的な少なくとも1つの核酸プローブと接触させること、および、該核酸の存在について前記サンプルをモニターすることによる前記方法を開示する。例えば、核酸プローブをGPR86核酸またはその一部と特異的に結合させて、二者間の結合を検出することができる；複合体そのものの存在を検出してもよい。さらに、本発明者らは、GPR86ポリペプチドの存在を検出する方法であって、細胞サンプルを該ポリペプチドに結合することができる抗体と接触させること、および該ポリペプチドの存在について前記サンプルをモニターすることによる前記方法を開示する。これは、抗体とポリペプチドとで形成された複合体の存在をモニターすること、またはポリペプチドと抗体の間の結合をモニターすることにより、都合よく行うことができる。二者間の結合を検出する方法は当技術分野で知られており、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）、表面プラズモン共鳴などが挙げられる。

10

【0275】

発現の減少または増加は、当技術分野で周知のいずれかのポリヌクレオチドの定量法（例えば、PCR、RT-PCR、RNアーゼプロテクション、ノーザンブロット、および他のハイブリダイゼーション法）を用いて、RNAレベルで測定することができる。宿主由来のサンプル中のタンパク質（例えばGPR86）のレベルを同定するために利用しうるアッセイ技術は当業者に周知である。かかるアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、およびELISAアッセイが含まれる。

20

【0276】

本明細書はまた、疾患または疾患に対する易罹患性(感染症も含まれる)に対する診断キットに関し、こうした疾患は例えばドーパミン関連疾患、例えばパーキンソン病、心疾患、例えば上室性不整脈または心室性不整脈、低血圧、吐気、トゥレット症候群、ストレスおよび疼痛などである。診断キットは、GPR86ポリヌクレオチドまたはその断片；相補的ヌクレオチド配列；GPR86ポリペプチドまたはその断片、またはGPR86ポリペプチドに対する抗体を含んでなる。

30

【0277】

染色体アッセイ

GPR86ヌクレオチド配列はまた、染色体同定にも有用である。該配列は、特定のヒト染色体上の特定の位置に特異的に標的化されておりかつそれとハイブリダイズすることができる。上述の様にヒトGPR86はホモ・サピエンス染色体3q24にマッピングされていることが見出されている。

【0278】

関連配列を染色体にマッピングすることはそれらの配列を遺伝子関連疾患と関連させるのに重要な最初のステップである。一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされたなら、染色体上の該配列の物理的位置を遺伝的マッピングデータと関連させることができる。そのようなデータは、例えばV. McKusick, Mendelian inheritance in Man (available on line through Johns Hopkins University Welch Medical Library)に見出される。同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患の関係を次に連鎖解析(物理的に隣接する遺伝子の共相続)により同定する。

40

【0279】

罹患および非罹患個体の間のcDNAまたはゲノム配列の違いを決定することもできる。ある突然変異が罹患個体の一部または全てに観察され、しかし正常個体では観察されなければ、該突然変異はその疾患の原因因子である可能性が高い。

【0280】

50

予防法および治療法

本発明者らは、GPR86活性の過剰と不足の両方に関係する異常状態を治療する方法を提供する。

【0281】

もしGPR86の活性が過剰であれば、いくつかの手法が利用可能である。1つの方法は、被験者に、本明細書に上述したインヒビター化合物（アンタゴニスト）を製薬上許容される担体と共に、リガンドとGPR86との結合を遮断するかまたは第2のシグナルを抑制することにより活性化を阻止するのに有効な量で投与し、それにより前記異常状態を軽減することを含む。

【0282】

別の方法では、内因性GPR86との競合においてなおもリガンドと結合することができる可溶性形態のGPR86ポリペプチドを投与してもよい。かかる競合物質の典型的な実施形態は、GPR86ポリペプチドの断片を含む。

【0283】

さらに別の方法では、内因性GPR86をコードする遺伝子の発現を、発現遮断技術を用いて抑制してもよい。かかる公知の技術はアンチセンス配列の使用を含み、アンチセンス配列は内部的に生成されるか、または別個に投与される。例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla, 1988の中のO'Connor, J Neurochem (1991) 56:560を参照のこと。あるいは、遺伝子と共に三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給してもよい。例えば、Leeら, Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooneyら, Science (1988) 241:456; Dervanら, Science (1991) 251:1360を参照のこと。これらのオリゴマーは、それ自体を投与してもよく、または関連オリゴマーをin vivoで発現させてもよい。

【0284】

GPR86およびその活性の過小発現に関連する異常状態を治療するためには、いくつかの方法が利用可能である。1つの方法は、被験者に、GPR86を活性化する化合物（すなわち、上記アゴニスト）の治療上有効な量を、製薬上許容される担体と組み合わせて投与し、それにより異常状態を軽減することを含む。あるいは、遺伝子治療を利用して、被験者の関連細胞によるGPR86の内因的産生を促してもよい。例えば、GPR86ポリヌクレオチドを、上記のように、複製欠損レトロウイルスベクターで発現するように操作することができる。次いで、レトロウイルス発現構築物を単離し、GPR86ポリペプチドをコードするRNAを含む有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージング細胞内に導入して、該パッケージング細胞が、以後、目的遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生産するようにする。このプロデューサー（ウイルス産生）細胞は、細胞をin vivo操作するため、およびポリペプチドをin vivo発現させるために、被験者に投与することができる。遺伝子治療の概説については、Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996)の第20章, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches（およびその引用文献）を参照のこと。

【0285】

製剤化および投与

ペプチド（例えば、可溶性形態のGPR86ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストペプチド）または小分子は、好適な製薬上の担体と組み合わせて製剤化することができる。かかる製剤は、治療上有効な量のポリペプチドまたは化合物および製薬上許容される担体または賦形剤を含んでなる。かかる担体には、限定するものでないが、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせが含まれる。製剤は投与様式に適合すべきであり、これは当業者に周知である。本明細書はまた、さらに、上記の組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医薬用パックおよびキットに関する。

【0286】

GPR86ポリペプチドおよび他の化合物は、単独でまたは治療用化合物のような他の化合

10

20

30

40

50

物と併用して、使用することができる。

【0287】

医薬組成物の全身投与の好ましい様式としては、注射、典型的には静脈内注射が挙げられる。皮下、筋肉内、または腹腔内など他の注射経路を利用してもよい。全身投与に代わる手段としては、経粘膜および経皮投与が挙げられ、これらには胆汁酸塩もしくはフシジン酸などの浸透剤または他の界面活性剤を用いる。さらに、腸溶性製剤またはカプセル化製剤として適切に製剤化されるのであれば、経口投与も可能である。これらの化合物を、軟膏、ペースト、ジェルなどの形態で外用投与および/または局所投与してもよい。

【0288】

必要な投与量の範囲は、ペプチドの選択、投与経路、製剤の性質、患者の症状の性質、および主治医の判断に依存する。しかしながら、好適な投与量は、0.1~100 $\mu\text{g/kg}$ (被験者の体重)の範囲である。しかし、利用可能な化合物の多様性および様々な投与経路の効率の違いを考えると、必要な投与量は大きく変化すると予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与より多い投与量を必要とすると予想される。これらの投与量レベルの変動は、最適化のための標準的な経験則を用いて調節することができ、これは当技術分野で十分に理解されている通りである。

10

【0289】

治療に使用するポリペプチドはまた、上記の通り、しばしば「遺伝子治療」と呼ばれる治療様式で、被験者内に内因的に生成させることもできる。従って、例えば、被験者由来の細胞を、DNAまたはRNAなどのポリヌクレオチドを用いて、および例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いて、*ex vivo*で、ポリペプチドをコードするように操作することができる。次いで細胞を被験者に導入する。

20

【0290】

医薬組成物

本発明者らはまた、投与するための治療上有効な量のGPR86ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ペプチドベクターまたは抗体(本明細書に記載)、および、場合により、製薬上許容される担体、希釈剤もしくは賦形剤(それらの組み合わせを含む)を含んでなる医薬組成物を提供する。

【0291】

医薬組成物はヒトおよび動物用の医薬としてヒトまたは動物に使用することができ、典型的には1以上の製薬上許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む。治療用途の許容される担体または希釈剤は製薬業界で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.(A.R. Gennaro編, 1985)に記載されている。製薬上の担体、賦形剤、または希釈剤の選択は、意図する投与経路および標準的な製薬実務を考慮して選択することができる。医薬組成物は、担体、賦形剤、もしくは希釈剤として、またはそれに加えて、任意の好適な結合剤、滑沢剤、懸濁化剤、コーティング剤、可溶化剤を含むことができる。

30

【0292】

保存料、安定剤、色素およびさらに香料を医薬組成物に加えてもよい。保存料の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤および懸濁化剤も使用可能である。

40

【0293】

異なる送達系ごとに異なる組成/製剤化の要件が存在しうる。例として、本明細書に記載の医薬組成物は、ミニポンプを使用してまたは粘膜経路により、例えば、吸入用のエアロゾルもしくは鼻腔スプレー、または経口摂取用溶液として、あるいは非経口的に(この場合組成物は注射可能な形態に製剤化される)、例えば、静脈内、筋肉内、もしくは皮下経路により、送達されるように製剤化することができる。あるいは、製剤を両方の経路から送達されるように設計することもできる。

【0294】

胃腸粘膜を介する粘膜経路で薬剤を送達する場合は、それが胃腸管を通過している間、

50

安定状態を維持する必要がある；例えば、薬剤はタンパク質分解に抵抗し、酸性pHで安定であり、かつ胆汁の界面活性効果に抵抗性であるべきである。

【0295】

適当であれば、医薬組成物は、吸入により、座剤もしくはペッサリーの形態で、ローション、溶液、クリーム、軟膏、またはダスティングパウダーの形態で局所的に、皮膚パッチの使用により、デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤を含む錠剤の形態で経口的に、または、単独もしくは賦形剤との混合物としてカプセルもしくは卵状容器（ovule）内に、または香料もしくは着色料を含有するエリキシル、溶液もしくは懸濁液の形態で投与するか、または、これらを非経口的に（例えば、静脈内、筋肉内、または皮下に）注射することができる。非経口投与用については、組成物を、他物質（例えば、溶液を血液と等張にするのに十分な塩または単糖類）を含有してもよい無菌水溶液の形態で使用するのが最良であろう。パッカルまたは舌下投与については、組成物を、通常の方法で製剤化することができる錠剤またはロゼンジの形態で投与してもよい。

【0296】

ワクチン

別の実施形態は、哺乳動物における免疫応答を誘発させる方法であって、該哺乳動物に、抗体を産生させかつ／またはT細胞免疫応答を生じて前記動物をGPR86関連疾患から保護するのに十分なGPR86ポリペプチドまたはその断片を接種することを含む前記方法に関する。

【0297】

さらに別の実施形態は、哺乳動物における免疫応答を誘発させる方法であって、前記動物を疾患から保護するために免疫応答を誘発して抗体を産生させることを目的として、*in vivo*でGPR86ポリヌクレオチドを発現させるベクターを介してGPR86ポリペプチドを送達することを含む前記方法に関する。

【0298】

さらなる実施形態は、免疫学的／ワクチン製剤（組成物）であって、哺乳動物宿主に導入したときに、その哺乳動物においてGPR86ポリペプチドに対する免疫応答を誘発する前記製剤（該組成物はGPR86ポリペプチドまたはGPR86遺伝子を含有する）に関する。ワクチン製剤はさらに適当な担体を含んでもよい。

【0299】

GPR86ポリペプチドは胃で分解されうることから、好ましくは非経口投与（皮下、筋内、静脈内、皮内などからの注射）される。非経口投与に適した製剤としては、水性および非水性滅菌注入溶液（抗酸化剤、バッファー、静菌剤および製剤を受容者の血液と等張にする溶質を含んでもよい）；ならびに水性および非水性滅菌懸濁液（懸濁剤または増粘剤を含んでもよい）が挙げられる。製剤は、単位用量または複数回用量容器（例えば密封アンプルおよび密封バイアル）として提供してもよく、使用の直前に無菌性液体担体の添加のみが必要なフリーズドライ（凍結乾燥）状態で貯蔵することができる。ワクチン製剤はまた、製剤の免疫原性を増強するアジュバント系、例えば水中油系および他の当技術分野で既知の系を含んでもよい。用量はワクチンの比活性に依存し、ルーチンな実験により容易に求めることができる。

【0300】

ワクチンは1種以上のGPR86ポリペプチドまたはペプチドから調製することができる。

【0301】

活性成分として免疫原性ポリペプチドまたはペプチドを含有するワクチンの調製は当業者に知られている。典型的には、かかるワクチンは注入可能物として、液体溶液もしくは液体懸濁液として調製する；注入前に溶液にする、または懸濁液にするのに適当な固体形態で調製してもよい。調製物はまた、乳化してもよく、またはタンパク質をリボソーム内にカプセル化してもよい。活性免疫原性成分は多くの場合、製薬上許容されかつ前記活性成分と適合可能な賦形剤と混合する。適当な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなどおよびこれらの組み合わせである。

【0302】

さらに、所望であればワクチンは、微量の補助剤、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、および/または該ワクチンの有効性を増強するアジュバントを含んでもよい。有効な可能性のあるアジュバントとしては、限定するものではないが、次のものが挙げられる：水酸化アルミニウム、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-ノル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP 11637、nor-MDPと呼ばれる)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(CGP 19835A、MTP-PEと呼ばれる)、およびRIBI(細菌から抽出された3つの成分である、モノホスホリル脂質A、トレハロースジマイコレート(trehalose dimycolate)および細胞壁骨格(MPL+TDM+CWS)を2%スクアレン/Tween 80 エマルジョン中に含有する)。

【0303】

アジュバントおよび他の物質のさらなる例としては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、アルミニウムリン酸、硫酸アルミニウムカリウム(ミョウバン)、硫酸ベリリウム、シリカ、カオリン、炭素、油中水エマルジョン、水中油エマルジョン、ムラミルジペプチド、細菌性内毒素、脂質X、コリネバクテリウム・パルバム(*Corynebacterium parvum* (プロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionobacterium acnes*))、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、ポリリボヌクレオチド、アルギン酸ナトリウム、ラノリン、リゾレシチン、ビタミンA、サポニン、リボソーム、レバミゾール(levamisole)、DEAE-デキストラン、ブロック共重合体または他の合成アジュバントが挙げられる。こうしたアジュバントは様々な供給源から市販されており、例としてはMerck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.)またはフロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Michigan)がある。

【0304】

典型的には、Amphigen (水中油)、Alhydrogel (水酸化アルミニウム)、またはAmphigenとAlhydrogelの混合物のようなアジュバントを使用する。水酸化アルミニウムのみがヒトへの使用を認められている。

【0305】

免疫源とアジュバントの比は、両方が有効量で存在する限り、広範に変化させることができる。例えば、水酸化アルミニウムは、ワクチン混合物の約0.5% (Al_2O_3 に基づき)の量で存在してもよい。都合良く、ワクチンは、0.2~200 $\mu g/ml$ 、好ましくは5~50 $\mu g/ml$ 、最も好ましくは15 $\mu g/ml$ の範囲の最終濃度の免疫源を含有するように製剤化される。

【0306】

製剤化の後、ワクチンを滅菌容器に組み入れ、次に該容器を密封し低温(例えば4℃)で貯蔵するか、または凍結乾燥することができる。凍結乾燥は、安定状態での長期保存を可能にする。

【0307】

ワクチンは慣用の方法で、非経口的に、注射により(例えば皮下または筋内に)投与することができる。他の投与様式に好適なさらなる製剤には、坐剤、およびいくつかの事例では、経口製剤、が含まれる。坐剤用の慣用の結合剤および担体は、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含んでもよく；かかる坐剤は、0.5%~10%、好ましくは1%~2%の範囲の活性成分を含む混合物から形成することができる。経口製剤は、かかる通常使用される賦形剤、例えば医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。これらの組成物は、溶液、懸濁物、錠剤、丸薬、カプセル、徐放製剤または散剤の形態であり、10%~95%、好ましくは25%~70%の活性成分を含む。ワクチン組成物を凍結乾燥する場合、凍結乾燥物を投与前に、例えば懸濁液として、用時調製することができる。用時調製はバッファー中で行うことが好ましい。

【0308】

患者への経口投与用のカプセル、錠剤および丸薬を、腸溶コーティングを伴うように調

10

20

30

40

50

製することもでき、腸溶コーティングは例えばEudragit「S」、Eudragit「L」、セルロースアセテート、セルロースアセテートフタレートまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む。

【0309】

GPR86ポリペプチドは、中性または塩の形態でワクチン中に製剤化することができる。製薬上許容される塩としては、酸付加塩(ペプチドの自由なアミノ基と塩形成)および無機酸(例えば塩酸またはリン酸)または有機酸(例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸およびマレイン酸)と形成される塩が挙げられる。自由なカルボキシル基と形成される塩もまた、無機塩基(例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは第二鉄の水酸化物)および有機塩基(例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジンおよびプロカイン)から誘導可能である。

10

【0310】

投与

典型的には、医師は、個々の被験者に最も適切な実投与量を決定するが、これはその特定の患者の年齢、体重および応答によって変化する。以下の投与量は、平均的な事例の例示である。勿論、より高いまたはより低い投与量範囲が有利である場合もありうる。

【0311】

本明細書に記載の医薬組成物およびワクチン組成物は、直接注射により投与することができる。組成物を、非経口、粘膜、筋肉内、静脈内、皮下、眼内、または経皮投与用に製剤化してもよい。典型的には、それぞれのタンパク質を、0.01~30mg/kg体重、好ましくは0.1~10mg/kg体重、より好ましくは0.1~1mg/kg体重の用量で投与することができる。

20

【0312】

「投与される」という用語は、ウイルスまたは非ウイルス技術による送達も含む。ウイルス送達機構としては、限定するものでないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびバキュロウイルスベクターが挙げられる。非ウイルス送達機構には、脂質媒介トランスフェクション、リポソーム、イムノリポソーム、リポフェクチン、カチオン性表面両親媒性物質(CFA)、およびこれらの組み合わせが含まれる。かかる送達機構の経路としては、限定するものでないが、粘膜、鼻腔内、経口、非経口、胃腸、局所、または舌下経路が挙げられる。

30

【0313】

「投与される」という用語は、限定するものでないが、粘膜経路による送達(例えば吸入用のエアロゾルもしくは鼻腔用スプレーまたは経口摂取用溶液として)；送達が生体注射様式でなされる非経口経路(例えば静脈内、筋肉内、または皮下経路など)による送達を含む。

【0314】

「共投与される」という用語は、例えば、GPR86ポリペプチドおよびアジュバントなどの追加物質のそれぞれの投与部位および投与時間が、免疫系の必要とされるモジュレーションを達成するようなものである、ことを意味する。従って、ポリペプチドおよびアジュバントを同時にかつ同一部位に投与することができる一方で、ポリペプチドをアジュバントとは異なる時間および異なる部位に投与することが好都合なこともありうる。ポリペプチドとアジュバントを同じ送達ビヒクルで送達することさえ可能であり、また、ポリペプチドおよび抗原を結合させてもさせなくてもよいし、および/または、遺伝的に結合させてもさせなくてもよい。

40

【0315】

GPR86ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、ヌクレオチド、またはその抗体、および場合によってはアジュバントを、宿主被験者に1回用量または複数回用量で、別個に投与してもよいし、共投与してもよい。

【0316】

本明細書に記載のワクチン組成物および医薬組成物は、注射(非経口、皮下、および筋

50

肉内注射を含む)、鼻腔内、粘膜、経口、膈内、尿道、または眼内投与など、多数の異なる経路により投与することができる。

【0317】

本明細書に記載のワクチンおよび医薬組成物は慣用の方法で、非経口的に、注射により(例えば皮下または筋内に)投与することができる。他の投与形態に好適なさらなる製剤には、坐剤、およびいくつかの事例では、経口製剤、が含まれる。坐剤用の慣用の結合剤および担体は、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含んでもよく;かかる坐剤は、0.5%~10%、または1%~2%の範囲の活性成分を含む混合物から形成することができる。経口製剤は、かかる通常使用される賦形剤、例えば医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。これらの組成物は、溶液、懸濁物、錠剤、丸薬、カプセル、徐放製剤または散剤の形態であり、10%~95%、好ましくは25%~70%の活性成分を含む。ワクチン組成物を凍結乾燥する場合、凍結乾燥物を投与前に、例えば懸濁液として、用時調製することができる。用時調製はバッファー中で行うことが好ましい。

10

【0318】

さらなる態様

本発明のさらなる態様および実施形態を以下に番号付けした段落に記載する;本発明はこれらの態様を包含すると理解されたい。

【0319】

段落1 配列番号3または配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むGPR86ポリペプチド、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体。

20

【0320】

段落2 段落1に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【0321】

段落3 配列番号1、配列番号2または配列番号4に記載の核酸配列、またはそのホモログ、変異体もしくは誘導体を含む段落2に記載の核酸。

【0322】

段落4 段落1に記載のポリペプチドの断片を含むポリペプチド。

【0323】

段落5 配列番号3と配列番号5で相同な1以上の領域を含むか、または配列番号3と配列番号5で非相同な1以上の領域を含む段落3に記載のポリペプチド。

30

【0324】

段落6 段落4または5に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【0325】

段落7 段落2、3、または6のいずれか1段落に記載の核酸を含むベクター。

【0326】

段落8 段落2、3、または6のいずれか1段落に記載の核酸、あるいは段落7に記載のベクターを含有する宿主細胞。

【0327】

段落9 段落2、3、または6のいずれか1段落に記載の核酸、あるいは段落7に記載のベクターを含有するトランスジェニック非ヒト動物。

40

【0328】

段落10 マウスである、段落9に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【0329】

段落11 Gタンパク質共役型受容体と特異的に相互作用することのできる化合物の同定方法における、段落1、4または5のいずれか1段落に記載のポリペプチドの使用。

【0330】

段落12 Gタンパク質共役型受容体と特異的に相互作用することのできる化合物の同定方法における、段落9または10に記載のトランスジェニック非ヒト動物の使用。

50

【0331】

段落 細胞内のサイクリックAMPの内因性レベルを増加させることのできる化合物の同定方法であって、GPR86発現細胞を候補化合物と接触させること、および前記接触の結果、該細胞におけるサイクリックAMP(cAMP)のレベルが増加するか否かを決定することを含む、前記方法。

【0332】

段落14 細胞内のサイクリックAMPの内因性レベルを低下させることのできる化合物の同定方法であって、GPR86発現細胞を候補化合物と接触させること、および前記接触の結果、該細胞におけるサイクリックAMP(cAMP)のレベルが低下するか否かを決定することを含む、前記方法。

10

【0333】

段落15 GPR86ポリペプチドに結合することのできる化合物の同定方法であって、GPR86ポリペプチドを候補化合物と接触させること、および該候補化合物がGPR86ポリペプチドに結合するか否かを決定することを含む前記方法。

【0334】

段落16 段落11～15のいずれか1段落に記載の方法により同定された化合物。

【0335】

段落17 段落1、4または5に記載のポリペプチドに特異的に結合することのできる化合物。

【0336】

段落18 段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部、あるいは段落2、3もしくは6に記載の核酸の、抗体の製造方法における使用。

20

【0337】

段落19 段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部、あるいは段落2、3もしくは6に記載のヌクレオチドによりコードされるポリペプチドまたはその一部に特異的に結合することのできる抗体。

【0338】

段落20 製薬上許容される担体または希釈剤と共に次の1以上を含む医薬組成物：段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部；段落2、3もしくは6に記載の核酸またはその一部；段落7に記載のベクター；段落8に記載の細胞；段落16または17に記載の化合物；および段落19に記載の抗体。

30

【0339】

段落21 次の1以上を含むワクチン組成物：段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部；段落2、3もしくは6に記載の核酸またはその一部；段落7に記載のベクター；段落8に記載の細胞；段落16または17に記載の化合物；および段落19に記載の抗体。

【0340】

段落22 次の1以上を含む疾患または疾患に対する易罹患性を診断するキット：段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部；段落2、3もしくは6に記載の核酸またはその一部；段落7に記載のベクター；段落8に記載の細胞；段落16または17に記載の化合物；および段落19に記載の抗体。

40

【0341】

段落23 患者にGPR86のアンタゴニストを投与することを含む、GPR86活性の増強に関連する疾患を罹患している患者の治療方法。

【0342】

段落24 患者にGPR86のアゴニストを投与することを含む、GPR86活性の低下に関連する疾患を罹患している患者の治療方法。

【0343】

段落25 GPR86が、配列番号3または配列番号5に記載の配列を有するポリペプチドを含む、段落23または24に記載の方法。

【0344】

50

段落26 患者における疾患の治療法および／または予防法であって、該患者に次の1以上を投与するステップを含む前記方法：段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部；段落2、3もしくは6に記載の核酸またはその一部；段落7に記載のベクター；段落8に記載の細胞；段落16または17に記載の化合物；段落19に記載の抗体；段落20に記載の医薬組成物；および段落20に記載のワクチン。

【0345】

段落27 疾患の治療法または予防法に使用するための薬剤であって、段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部；段落2、3もしくは6に記載の核酸またはその一部；段落7に記載のベクター；段落8に記載の細胞；段落16または17に記載の化合物；および／または段落19に記載の抗体を含む前記薬剤。

10

【0346】

段落28 疾患の治療または予防のための医薬組成物の製造における、段落1、4もしくは5に記載のポリペプチドまたはその一部；段落2、3もしくは6に記載の核酸またはその一部；段落7に記載のベクター；段落8に記載の細胞；段落16または17に記載の化合物；および段落19に記載の抗体の使用。

【0347】

段落29 改変されたGPR86遺伝子を有することを特徴とする、非ヒトトランスジェニック動物。

【0348】

段落30 前記改変が：GPR86の欠失、結果的に機能喪失されるGPR86の突然変異、標的突然変異またはランダム突然変異のあるヌクレオチド配列を有する外来遺伝子のGPR86への導入、別の種に由来する外来遺伝子のGPR86への導入、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される段落29に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

20

【0349】

段落31 機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック動物であって、異種GPR86タンパク質をコードするトランスジーンをそのゲノムに有しかつ発現する前記トランスジェニック動物。

【0350】

段落32 宿主細胞中のGPR86遺伝子を機能破壊するための核酸構築物であって：(a)非相同置換部分；(b)非相同置換部分の上流に位置する第1相同領域であって、第1のGPR86遺伝子配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する前記第1相同領域；および(c)非相同置換部分の下流に位置し、第2のGPR86遺伝子配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する第2相同領域（ただし、第2のGPR86遺伝子配列は天然の内因性GPR86遺伝子中で前記第1のGPR86遺伝子配列より下流の位置にある）を含んでなる前記核酸構築物。

30

【0351】

段落33 段落8に記載の宿主細胞を、GPR86ポリペプチドをコードする核酸が発現される条件下で培養することを含む、GPR86ポリペプチドの製造方法。

【0352】

段落34 サンプル中の段落2、3または6に記載の核酸の存在を検出する方法であって、前記サンプルを、前記核酸に特異的な少なくとも1つの核酸プローブと接触させること、および前記核酸の存在について前記サンプルをモニターすることを含む、前記方法。

40

【0353】

段落35 サンプル中の段落1、4または5に記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、サンプルを段落19に記載の抗体と接触させること、および前記ポリペプチドの存在について前記サンプルをモニターすることを含む、前記方法。

【0354】

段落36 GPR86の増加、減少またはさもなくば異常発現により引き起こされるまたはそれらに関連する疾患または症候群の診断方法であって：(a)かかる疾患に罹患しているかまたは罹患していると疑われる動物中のGPR86の発現レベルまたは発現パターンを検出するステップ；および(b)該発現レベルまたは発現パターンを正常動物のそれと比較するス

50

テップを含む前記方法。

【0355】

段落37 段落22に記載のキット、段落23～26のいずれか1段落に記載の方法、段落27に記載の薬剤、段落28に記載の使用、または段落36に記載の方法であって、前記疾患が炎症性疾患、好ましくは以下の群より選択される疾患に関連する、前記キット、方法、薬剤、または使用：炎症性疾患(例えば慢性関節リウマチ、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、移植片対宿主拒絶反応、全身性エリテマトーデスまたはインスリン依存性糖尿病)、自己免疫疾患(例えば毒素性ショック症候群、変形性関節症、糖尿病または炎症性腸疾患)、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、接触皮膚炎、アテローム動脈硬化症、糸球体腎炎、再灌流障害、骨吸収障害、喘息、卒中、心筋梗塞、熱傷、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、外傷に続発する多器官障害、急性炎症性成分を伴う皮膚病、急性化膿性髄膜炎、壊死性腸炎、血液透析に付随する症候群、敗血症ショック、白血球搬出法、顆粒球輸血、煙吸入により引き起こされる肺の急性または慢性炎症、子宮内膜症、ベーチェット病、ブドウ膜炎、強直性脊椎炎、膵炎、癌、ライム病、経皮経管冠状動脈形成に続く再狭窄、アルツハイマー病、外傷性関節炎、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、うっ血性心不全、骨粗鬆症、悪液質、パーキンソン病、歯周病、痛風、アレルギー疾患、加齢性黄斑変性症、感染および膿胞性線維症。

10

【実施例】

【0356】

実施例1 トランスジェニックGPR86ノックアウトマウス：GPR86遺伝子標的ベクターの構築

20

GPR86遺伝子を含むPACを、そのコード配列の一部から誘導した放射能標識プローブを用いてPACライブラリーから同定した。8.0kbのゲノムコンティグを、GeneWalker (Clontech)に類似するインハウス(in-house)の制限部位アンカーPCR法を用いてアセンブルした。さらなる生物情報工学的(bio-informatic)研究から、コンティグサイズを300kbまで広げた。このコンティグは、ターゲティングベクターへとクローニングする相同アームの設計を可能にするのに十分なフランキンク配列情報を提供した。

【0357】

マウスGPR86遺伝子は1つのコードエキソンを有する。ターゲティング戦略は、コード配列の大部分(膜貫通ドメイン全体も含め)を欠失させるように設計した。欠失させる領域の両側の3.9kb 5' 相同アームおよび1.2kb 3' 相同アームをPCRで増幅し、断片をターゲティングベクターにクローニングする。アームを増幅するのに用いた各オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端は、レアカッティング制限酵素用の別の制限部位(ベクターポリリンカーのクローニングサイトと両立しかつアーム自体には存在しない部位)を含むように合成する。GPR86の場合、プライマーは下のプライマーの表に示すように設計し、このとき5'アームクローニングサイトはSal/Notでありかつ3'アームクローニングサイトはAsc/Mfeである(使用したターゲティングベクターの構造を、関連する制限部位も含め、図2に示す)。

30

【0358】

(5' armF/5' armR)および(3' armF/3' armR)というアームプライマーの対の他に、GPR86遺伝子座に特異的なさらなるプライマーを次の目的のために設計した：単離された推定上の標的クローン中の標的遺伝子座のサザン分析を可能にするための、各アームの外側にありかつ各アームを超えて延長された非反復型ゲノムDNAの2つの短い150-300bp断片を増幅するための5'および3' プローブプライマー対(5' prF/5' prRおよび3' prF/3' prR)；ベクター特異的プライマー(この場合Asc350)を用いた多重PCRに使用したときに、野生型、ヘテロ接合型、およびホモ接合型マウスの区別を可能にするマウス遺伝子型判定プライマー対(hetFおよびhetR)；そして最後に、3'アーム領域の末端の下流にアニーリングし、かつベクター(TK51BLMNL)の3'末端特異的プライマー(この場合Asc236)と対にしたときに標的事象特異的1.25kb増幅産物(amplimer)を生じる標的スクリーニングプライマー(3'scr)。この増幅産物は所望のゲノム改変が生じた細胞からの鋳型DNAのみから誘導可能であり

40

50

、また、ランダムに組み込まれたベクターのコピーを含有するクローンのバックグラウンドから正しくターゲティングされた細胞の同定を可能にする。これらのプライマーの位置とターゲティング戦略に使用したGPR86遺伝子座の領域のゲノム構造を配列番号21に示す。

【表 1】

表 1 GPR86 プライマー配列

musGPR86 5' pr F	TATACATATGTTTCAGCAGTACCAACTC	配列番号 8	
musGPR86 5' pr R	ACACCAGTGATAGATAGCAAGAAGTC	配列番号 9	10
musGPR86 5' arm F	cccgtcgacATGCTTTCTTTTATGACAAAATCCTTG	配列番号 10	
musGPR86 5' arm R	aaagcggccGcGAACAGCAGCTGTGTCATCCGAGTG	配列番号 11	
musGPR86 3' arm F	aaagcgcgccAGGCAAGAACAGCAGGATCAAGCGAAG	配列番号 12	
musGPR86 3' arm R	aaacaattGTGGCTTCTGAGGCTATGGAAAGAGAG	配列番号 13	
musGPR86 3' pr F	ATATGGCACATTTGGTCCGCACTGCAC	配列番号 14	
musGPR86 3' pr R	GATGAGGAATGATGTCACACAGATGAG	配列番号 15	
musGPR86 3' scr	AAGGTCAAGATTAGCAAGTGATTCCAG	配列番号 16	20
musGPR86 hetF	ATACCATACACTTACAGTCAAACCACC	配列番号 17	
musGPR86 hetR	GGTCTTCGCTTGATCCTGCTGTTCTTG	配列番号 18	
Asc236	TTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG	配列番号 19	
Asc350	GTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTG	配列番号 20	

【 0 3 5 9 】

相同アームの位置はGPR86遺伝子を機能破壊するように選択する。欠失するGPR86領域を、該GPR86遺伝子と同じ方向に配置されたプロモーターと機能的に連結された(promoted)ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子から構成される選択カセットおよびその上流の内因性遺伝子発現レポーター(フレーム非依存性lacZ遺伝子)から構成される非相同配列で置き換えたターゲティングベクターを用意する。

【 0 3 6 0 】

一旦5' および3' 相同アームをターゲティングベクターTK51BLMNL(図2参照)にクローニングしたら、標準分子生物学技術を用いて多量の高純度DNA調製物を調製する。20 μgの新しく調製した内毒素不含DNAを別のレアカッティング制限酵素SwaIで制限するが、切断はベクター骨格のアンピシリン耐性遺伝子と細菌性複製起点の間のユニークな部位に生じる。線状化DNAを次に沈降させ、100 μlのリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁し、エレクトロポレーションに備える。

【 0 3 6 1 】

エレクトロポレーションの24時間後にトランスフェクション細胞を200 μg/mlネオマイシン含有培地で9日間培養する。クローンを選択して96ウェルプレートにのせ、複製を取って増やした後、PCR(上述のようにプライマー3'scrおよびAsc236を使用)でスクリーニングして、内因性GPR86遺伝子とターゲティング構築物の間で相同組換えが起こったクローンを同定する。ポジティブクローンを1~5%の比率で同定することができる。これらのクローンを増やしてレプリカを凍結し、また、外部5' および3' プローブを用いてターゲティング事象のサザンプロット確認をするための十分に高品質なDNAを調製できるようにするが、これは上記のように行い、全て標準法を用いる(Russら, Nature 2000 Mar 2;404(6773):95-99)。診断用制限酵素で消化したDNAのサザンプロットを外部プローブとハイブリ

ダイズさせると、変異型バンドおよび改変されていない野生型バンドの存在により、相同的にターゲティングされたES細胞クローンが確認される。例えば、5'プローブを用いると、HindIII消化ゲノムDNAは14.9kb野生型バンドおよび12.0kbターゲティングバンドを生じる；3'プローブについては、HindIII切断DNAは14.9kb野生型バンドと7.0kbターゲティングバンドを生じる。

【0362】

実施例2．トランスジェニックGPR86ノックアウトマウス：GPR86欠失マウスの作製

C57BL/6メスおよび雄マウスを交配させ、妊娠から3.5日に胚盤胞を単離した。胚盤胞1個あたりに選択したクローンからの10～12個の細胞を注入し、7～8個の胚盤胞を偽妊娠F1メスの子宮に移植した。高レベル（最高100%）の縞模様（agouti）をもつ複数の雄（縞模様の毛の色が標的クローンの子孫である細胞の寄与を示す）を含むキメラな子の同腹仔が産まれた。この雄キメラを雌MF1および129マウスと交配させ、生殖細胞系列の伝達を、それぞれ縞模様の毛の色およびPCR遺伝子型判定により確認した。

【0363】

PCR遺伝子型判定は、尾から切り取った毛の溶解物で、プライマーhetFおよびhetR、ならびに第3のベクター特異的プライマー（Asc350）を用いて行った。この多重PCRは、プライマーhetFおよびhetRにより、（もし存在すれば）野生型遺伝子座からの増幅を可能にし、207bpバンドを生じた。hetFの部位はノックアウトマウスでは欠失されているので、この増幅は標的の対立遺伝子からは起こらない。これに対して、Asc350プライマーは、3'アームのすぐ内側の領域にアニールするhetRプライマーとの組み合わせにより、380bpバンドを標的の遺伝子座から増幅する。従って、この多重PCRは同腹仔の遺伝子型を次のように明らかにする：すなわち、野生型サンプルは単一の207bpバンドを示し；ヘテロ接合体DNAサンプルは2つのバンドを207bpおよび380bpに生じ；そしてホモ接合体サンプルは標的特異的380bpバンドのみを示す。

【0364】

実施例3．生物学的データ：遺伝子発現パターンRT-PCR

RT-PCRを用いて、肝臓および白血球における該遺伝子の発現を示した（図3）。

【0365】

実施例4．生物学的データ：RT-PCRによるGPR86の発現

ヒトおよびマウスの両方からのcDNAライブラリーを使用するRT-PCRを用いてGPR86 mRNAの発現を調べた。ヒト配列については、プライマー：

フォワード 5'-GGTGTTCACATCCCCAGC-3'

リバース 5'-TGCTGCTTCCTTGTGCTC-3'

を用いて364bpの産物を得ることができる。

【0366】

反応条件は次の通りである：

85 ホットスタート

94 15秒

60 30秒を40サイクル

72 60秒

4 ホールド

【0367】

臭化エチジウムを含有するTris酢酸EDTAアガロースゲル上で産物を分離し、UV光源を使用して視た。

【0368】

ヒト由来の組織および細胞での発現は、骨髄、胸腺、リンパ節、骨芽細胞および軟骨細胞に見られた（図7）。また、発現はヒト由来細胞系Jurkat CD4+およびMyl4 CD8+（いずれもT細胞由来）にも見られた。リンパ球由来のColo720および単球由来のTHP1細胞では低レベルの発現が見られた。

【0369】

マウス組織では、発現は、脾臓、唾液腺、脊髄、舌、脂肪組織(adipose)、精巣、心臓、眼、胚、腎臓、胸腺、胃と小腸、脳、肝臓と胆嚢、血液、膀胱ならびに副腎に見られた(図8)。

【0370】

GPR86の発現は免疫応答性細胞由来の細胞にも見られたことから、GPR86は免疫細胞機能(疼痛の炎症性および神経因性の側面に関わるものも含む)に關与することが示唆された。

【0371】

実施例5 . GPR86ノックアウトマウスでの外部刺激および疼痛に対する感受性テスト(無痛覚テスト): テールフリックテスト(Tail Flick Test)

テールフリック無痛覚測定機を用いてテールフリック無痛覚テストを行った。この装置は齧歯類の疼痛感受性を正確にかつ再現性をもって決定する簡便な方法を提供する(D'Amour, F.E. and D.L. Smith, 1941, Expt. Clin. Pharmacol., 16: 179-184)。この器具にはシャッター制御ランプが熱源として付いている。ランプは動物の下に配置され、さほど監禁的ではない環境を提供する。尾を掉る行動(テールフリック)は自動感知回路により感知され、これにより使用者は手で自由に動物を扱うことができる。動物を換気されるチューブに拘束し、その尾を装置の上の感知溝の上に配置する。

10

【0372】

シャッターの開部を通して尾に当たる強力な光線を活性化させると、それはある時点で不快感を生じ、そのとき動物は尾を光線の外に掉る。自動モードでは、光感知器が尾の動きを感知して、時計を止めかつシャッターを閉じるようにする。シャッターが開いてから動物が反応するまでの総経過時間を記録する。

20

【0373】

突然変異トランスジェニックマウスの反応を、年齢および性別の一致する野生型マウスと比較する。単一の動物を異なる熱設定に供して、55℃を超えることなく尾の温度の高めることができる。

【0374】

ノックアウトおよび野生型対照動物をテールフリック装置でテストした。尾を引くまでの潜在時間はノックアウト動物(6.88 ± 0.26 秒)と野生型対照(5.95 ± 0.28)とで比較して有意の差があった。従って、ノックアウト動物は野生型動物ほど敏感ではない(図4)。

【0375】

実施例6 . GPR86ノックアウトマウスでの外部刺激および疼痛に対する感受性テスト(無痛覚テスト): ホルマリンテスト

30

ホルマリンテストは、後足に注入された有毒物質への応答を測定する。20 μ lの容量の5%ホルマリン溶液を、細い標準規格注射針を用いて一つの後足の背面に皮下注射する。後足を舐める、振る、および咬む行動を、その行動にかけた累積秒数として定量する。次の評価尺度を用いる: 1 = ホルマリン注射した足を床に軽く横たわせ体重をあまりかけない; 2 = 注射した足を持ち上げる; 3 = 注射した足を舐める、咬むまたは振る。

【0376】

ホルマリンテストには2つの応答フェーズが見られる。フェーズ1は注射の直後から始まり約10分間持続し、疼痛線維由来の活動の急性的突発を表す。フェーズ2は注射の約20分後に開始され、約1時間持続する。このフェーズは組織損傷への応答(炎症性痛覚過敏を含む)を表すようである。

40

【0377】

GPR86変異体をホルマリンテストで試験し、注射した足を舐めた、咬んだまたは振った回数から測定したところ、さほど敏感ではないことが見出された。注射したホルマリンに応答した足の炎症性浮腫も、KOマウスでは野生型の浮腫と比較して12%少なかった(図5)。

【0378】

実施例7 . GPR86ノックアウトマウスでの外部刺激および疼痛に対する感受性テスト(無痛覚テスト): Von Frey Hairテスト

50

疼痛閾値を測定するために使用される、触覚のテストはvon Frey hairを用いる。このヘアは非常に細いゲージ目盛り付きワイヤーのセットである。機械的刺激に対する離脱閾値を測定する。動物を、表面が寸法の広いワイヤーメッシュである持ち上がった台の上に立たせる。Von Freyヘアを下から、メッシュの穴の間から挿入し、後足の下部表面を突く。閾値で、マウスは足をヘアから離すようにふる反応を示し、一般にその次に足を上げる、足を舐めるおよび/または声を出す。機械的離脱閾値は、3回の連続施行中2回の離脱反応を引き起こす最小ゲージワイヤー刺激と定義される。

【0379】

ノックアウト動物および野生型対照動物をエレクトロニックVonfreyでテストした(各後足について5テスト)。足を離脱させるまでの潜在時間はノックアウト動物(5.9 ± 0.2 秒)と野生型対照(5.2 ± 0.2 , $p=0.03$, t テスト)とで比較して有意の差があった。従って、ノックアウト動物は野生型動物ほど敏感ではない(図6)。

10

【0380】

実施例8 . GPR86ノックアウトマウスでの外部刺激および疼痛に対する感受性テスト(無痛覚テスト): 神経因性疼痛

神経因性疼痛は、麻酔マウスのL5脊髄神経をきつく結紮することにより誘発させることができる(Kim and Chung 1992)。回復後、神経因性疼痛の発達と維持を、異痛(非有害刺激に対する疼痛の知覚)および痛覚過敏(有害刺激に対する応答増加)について測定することができる。

【0381】

20

異痛はvon Freyフィラメントを用いて(実施例7に記載のように)4週間に渡り測定する。それぞれの後足をテストして、同側の(損傷側)および対側の(ナীব側)足の応答を、ノックアウトマウスおよび野生型マウスで比較する。痛覚過敏は有害な熱、有害な冷たさ、および有害な機械的刺激でテストすることができる。これらの両方のテストにおいて、ノックアウトマウスは野生型対照ほど敏感ではないことが見出された。

【0382】

本明細書に記載した特許出願および特許、ならびにそれぞれの上記特許出願および特許に引用または参照されたそれぞれの文献(各特許出願および特許の審査中に引用または参照されたものも含まれる)(「出願に引用された文献」、ならびに、それぞれの特許出願および特許におよびあらゆる出願に引用された文献に引用または記載されたあらゆる製品のあらゆる製造者の説明書またはカタログを、ここに参照により本明細書に組み入れる。さらに、本明細書に記載の全ての文献、本明細書に記載の文献に引用または参照された全ての文献、および本明細書に参照または記載されたあらゆる製品のあらゆる製造者の説明書またはカタログを、参照により本明細書に組み入れる。

30

【0383】

本発明の記載された方法およびシステムの様々な改変および変法は、本発明の範囲と精神から離れることなく当業者に明らかとなるであろう。本発明を特定の好適な実施形態に関連して記載したが、特許請求の範囲に記載の発明は、かかる特定の実施形態に不当に限定されてはならず、かつ本発明への多種の改変および追加が本発明の範囲内でなされうると理解すべきである。実際に、分子生物学または関連する分野の当業者に明らかな、本発明を実施するための記載された様式の種々改変は、特許請求の範囲内にあることを意図する。さらに、従属請求項の構成の様々な組み合わせは、本発明の範囲を離れることなく独立請求項の構成を用いてなされう。

40

【0384】

配列表

配列番号 1

配列番号1にヒトGPR86のcDNA配列を示す

TCATTTGTAGGCTGAACTAATGACTGCCGCCATAAGAAGACAGAGAGAACTGAGTATCCTCCCAAAG
GTGACACTGGAAGCAATGAACACCACAGTGATGCAAGGCTTCAACAGATCTGAGCGGTGCCCCAGAG
ACACTCGGATAGTACAGCTGGTATTTCCAGCCCTCTACACAGTGGTTTTCTTGACCGGCATCCTGCTG
AATACTTTGGCTCTGTGGGTGTTTGTTCACATCCCCAGCTCCTCCACCTTCATCATCTACCTCAAAAAC
ACTTTGGTGGCCGACTTGATAATGACACTCATGCTTCCTTTCAAAATCCTCTCTGACTCACACCTGGCA
CCCTGGCAGCTCAGAGCTTTTGTGTGTCGTTTTCTTCGGTGATATTTATGAGACCATGTATGTGGGC
ATCGTGCTGTTAGGGCTCATAGCCTTTGACAGATTCTCAAGATCATCAGACCTTTGAGAAATATTTTT
CTAAAAAACCTGTTTTTGCAAAAACGGTCTCAATCTTCATCTGGTTCTTTTTGTCTTCATCTCCCTGC
CAAATATGATCTTGAGCAACAAGGAAGCAACACCATCGTCTGTGAAAAAGTGTGCTTCCTTAAAGGG
GCCTCTGGGGCTGAAATGGCATCAAATGGTAAATAACATATGCCAGTTTATTTTCTGGACTGTTTTTAT
CCTAATGCTTGTGTTTTATGTGGTTATTGCAAAAAAAGTATATGATTCTTATAGAAAGTCCAAAAGTA
AGGACAGAAAAACAACAAAAGCTGGAAGGCAAAGTATTTGTTGTCGTGGCTGTCTCTTTGTGTGT
TTTGCTCCATTTTCATTTTGCCAGAGTTCATATACTCACAGTCAAACCAACAATAAGACTGACTGTAG
ACTGCAAAATCAACTGTTTATTGCTAAAGAAAACAACTCTCTTTTGGCAGCAACTAACATTTGTATGG
ATCCCTTAATATACATATTCTTATGTAAAAAATTCACAGAAAAGCTACCATGTATGCAAGGGAGAAAG
ACCACAGCATCAAGCCAAGAAAATCATAGCAGTCAGACAGACAACATAACCTTAGGCTGACAACTGT
ACATAGGGTTAACTTCTATTTATGATGAGACTTCCGTAGATAATGTGGAAATCAAATTTAACCAAGA
AAAAAAGATTGGAACAAATGCTCTCTTACATTTTATTATCCTGGTGTACAGAAAAGATTATATAAAAT
TTAAATCCACATAGATCTATTCTATAAGCTGAATGAACCATTACTAAGAGAATGCAACAGGATACAAA
TGGCCACTAGAGGTCATTATTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTAAATTTCAAGAGCATTTCACTTTAACA
TTTTGAAAAGACTAAGGAGAAACGTATATCCCTACAAACCTCCCCTCCAAACACCTTCTCACATTCT
TTCCACAATTCACATAACACTACTGCTTTTGTGCCCTTAAATGTAGATATGTGCTGAAAGAAAAAA
AAAACGCCCAACTCTTGAAGTCCATTGCTGAAAACCTGCAGCCAGGGGTTGAAAGGGATGCAGACTTG
AAGAGTCTGAGGAACTGAAGTGGGTCAGCAAGACCTCTGAAATCCTGGGTAAAGGATTTTCTCCTTAC
AATTACAAACAGCCTCTTTACATTACAATAATATACCATAGGAGGCACAAGCACCATTATTAAGCCA
CTTTGCTTACACCTTAAGTGTGTACAATTCAAGTGTGAGAATGCTGTGTAACTATTCTTTGGAATTCT
CCTTCTGTCCAGCAAATACTCTAATGATGGTTAAACATGGCACCTACTCAGCAATGCCTTCTGGACC

10

20

30

ACAACCCCTATCCCCCTGCCCCACCCTCCTCATTAACAACTTCTACTGTTTGGGTGTGTGATA
GGGTTCTCAATGCAGATCTCCCTTTTCTAGTTAGCTATATTCTTGACTGCATCCGCTAAAAATGTTAAA
GCTTCTTGAGAGACAGACATGCCAGATTTTCTTGGTATCTCCCATAAACGACCTACAGTCCATGGTCT
ACAGATGTTTTAAATAGAATTGCTATTCTCGATACATACAAAGACGTAATTGCTGACCCACAATCAGT
AACATCCATATTGGGAGATTTTCAAAGGATGGTGACCCTGCTTGTATTTATTTACCTTGGTATTTTTT
CTTGCACTCCTTCTGTGATTCAAAAAAGTAAATGTGGCTTTCTGAAATGATGGATAAGAGTCTACATC
TTCTAGAAAAAATACATAAAGGAGTAGTTAAGCTCTGTAAATGTGCCACGAGCTCCAACACGACCAT
CGTAGGGTGAAGCCCACGTTTTCTTCCATGGCCTCAAAGGCCCTAGAACTTGCTACCTTTCTGGCCTT
ACCTCTAGCTACTTATCCATCTCTTGAACCTTATACTCTTGTATAAATTTCTAACTTTCAGAAAAATGC
CATACTCTGTTTTGGCACCACACATGTATATTTCCCCCTGGTACACTTGAAGACTCTTATCCATCTGT
GAAACCCTATGTTGTCATCACTTGGTCCATGAAATATTACCTGGCCAATATCCCACCATCACCTCAA
CCCAATCACCCCTCCTCTGTATGCTGTACACCTATATTATTAACTTATCACATTGCATTGTAATTA
CTTCTGACCTTTGTATCTACTCTTTTAGTAACTGATGTATATATCTGAAAGGAGAGATTGTTTCATTG
TGCAATCAATAAATGTTTGATAAAATAAAGCCC

10

【 0 3 8 5 】

配列番号2

20

配列番号2に配列番号1から導出したオープンリーディングフレームを示す

ATGACTGCCGCCATAAGAAGACAGAGAGAACTGAGTATCCTCCCAAAGGTGACACTGGAAGCAATG
AACACCACAGTGATGCAAGGCTTCAACAGATCTGAGCGGTGCCCCAGAGACACTC
GGATAGTACAGCTGGTATTCCCAGCCCTCTACACAGTGGTTTTCTTGACCGGCATC
CTGCTGAATACTTTGGCTCTGTGGGTGTTTGTTCACATCCCCAGCTCCTCCACCTTC
ATCATCTACCTCAAAAACACTTTGGTGGCCGACTTGATAATGACACTCATGCTTCC
TTTCAAAATCCTCTCTGACTCACACCTGGCACCCTGGCAGCTCAGAGCTTTTGTGT
GTCGTTTTTCTTCGGTGATATTTTATGAGACCATGTATGTGGGCATCGTGCTGTTAG
GGCTCATAGCCTTTGACAGATTCTCAAGATCATCAGACCTTTGAGAAATATTTTT
CTAAAAAACCTGTTTTTGCAAAAACGGTCTCAATCTTCATCTGGTTCTTTTTGTTC
TTCATCTCCCTGCCAAATATGATCTTGAGCAACAAGGAAGCAACACCATCGTCTGT
GAAAAAGTGTGCTTCCTTAAAGGGGCCTCTGGGGCTGAAATGGCATCAAATGGTA
AATAACATATGCCAGTTTATTTTCTGGACTGTTTTATCCTAATGCTTGTGTTTTAT
GTGGTTATTGCAAAAAAAGTATATGATTCTTATAGAAAGTCCAAAAGTAAGGACA
GAAAAACAACAAAAAGCTGGAAGGCAAAGTATTTGTTGTCGTGGCTGTCTTCTT
TGTGTGTTTTGCTCCATTTCAATTTGCCAGAGTCCATATACTCACAGTCAAACCAA

30

40

CAATAAGACTGACTGTAGACTGCAAAATCAACTGTTTATTGCTAAAGAAACAACCT
CTCTTTTTGGCAGCAACTAACATTTGTATGGATCCCTTAATATACATATTCTTATGT
AAAAAATTCACAGAAAAGCTACCATGTATGCAAGGGAGAAAGACCACAGCATCA
AGCCAAGAAAATCATAGCAGTCAGACAGACAACATAACCTTAGGCTGA

【 0 3 8 6 】

配列番号3

配列番号3に、ヒトGPR86のアミノ酸配列を示す

50

MTAAIRRQRELSILPKVTLEAMNTTVMQGFNRSERCPRDTRIVQLVFPALYTVVFLTGI
LLNTLALWVVFVHIPSSSTFIYLNKNTLVADLIMTLMLPFKILSDSHLAPWQLRAFVCRFS
SVIFYETMYVGVILLGLIAFDRFLKIIRPLRNIFLKKPVFAKTVSIFTWFFLFFISLPNMILS
NKEATPSSVKKCASLKGPLGLKWHQMNVNNICQFIFWTVFILMLVFYVVIKKVYDSY
RKSKSKDRKNNKKLEGKVFVVVAVFFVCFAPFHFARVPYTHSQTNKTDCLRNQLF
IAKETTLFLAATNICMDPLIYIFLCKKFTKLPKMQGRKTTASSQENHSSQTDNITLG
【 0 3 8 7 】

配列番号4

10

配列番号4にマウスGPR86のcDNAのオープンリーディングフレームを示す

ATGCTCGGGACAATCAACACCACTGGGATGCAGGGCTTCAACAAGTCTGAGCGGTGCCCCAGGGACA
CTCGGATGACACAGCTGCTGTTCCCGGTTCTCTATACTGTGGTCTTCCTGGCAGGCATCCTGCTGAACA
CCGTGGCCCTCTGGGTGTTCTGTCACATCCCCAGCAATTCCACCTTTATCGTCTACCTCAAGAACTC
TGGTGGCAGACTTGATAATGGCACATCATGCTGCCTTTCAAAATCCTTTCCGACTCACACCTTGCGCCCT
GGCAGCTCCGAGGATTTGTGTGCACGCTCTCCTCCGTGGTCTTCTATGAGACGATGTATGTGGGTATC
ATGATGCTGGGCCTCATCGCTTTGACAGGTTCTCAAGATCATCATGCCGTCAGGAAAACCTTTGT
CAAAAAGACGGCTTTTCGCAAAAACAGTCTCCATTTCCGTCTGGTCCCTGATGTTCTTCATCTCCCTGCC
AAACATGATCTTGAACAAGGAGGCAACGCCATCATCCGTGAAGAAGTGTGCATCTTTGAAGAGTCCC
CTTGGGCTGTGGTGGCATCAGGTGGTCAGTCACACCTGCCAGTTCATTTTCTGGGCTGTGTTTATTCTG
ATGCTTCTGTTTTATGCGGTGATTACCAAAAAGGTGTACAACTCCTATAGGAAGTTAGGAGTAAGGA
CAGCAGGCACAAGCGGCTGGAGGTGAAGGTATTTATCGTCATGGCTGTCTTCTTTGTCTGCITTGCCC
CACTGCATTTTGTGAGAATACCATACTTACAGTCAAACCAATAAGACTGACTGTAGGTTAGAA
AACCAGCTGTTTATTGCTAAAGAAGCAACTCTCTTTCTGGCAACAATAACATTTGTATGGACCCCTT
AATATACATAATTTTATGCAAGAAGTTCACACAAAAGGTGCCATGTGTGAGATGGGGAAAGGCAAGA

20

30

ACAGCAGGATCAAGCGAAGACCACCACAGTAGTCAGACAGACAACATCACCTAGCCTGA

【 0 3 8 8 】

配列番号5

配列番号5にマウスGPR86のアミノ酸配列を示す

MLGTINTTGMQGFNKSERCPRDTRMTQLLFPVLYTVVFLAGILLNTVALWVVFHIPS
STFIVYLNKNTLVADLIMLMLPFKILSDSHLAPWQLRGFVCTLSSVVFYETMYVGIMM
LGLIAFDRFLKIIMPFRKTFVKKTAFAKTVSISVWSLMFFISLPNMILNKEATPSSVKKC
ASLKSPLGLWWHQVVSHTCQFIFWAVFILMLLFYAVITKKVYNSYRKFRSKDSRHKR
LEVKVFIVMAVFFVCFAPLHFVRIPYTYSTTNKTDCLRNQLFLAKEATLFLATTNIC
MDPLIYIILCKKFTQKVPVVRWGKARTAGSSEDHSSQTDNITLAZ

40

【 0 3 8 9 】

配列番号6

配列番号6にヒトGPR86の別のcDNA配列を示す

TATGTTTATTGGTAACAGGTGACACTGGAAGCAATGAACACCACAGTGATGCAAGGCT
TCAACAGATCTGAGCGGTGCCCCAGAGACACTCGGATAGTACAGCTGGTATTCCC
AGCCCTCTACACAGTGGTTTTCTTGACCGGCATCCTGCTGAATACTTTGGCTCTGT
GGGTGTTTGTTCACATCCCCAGCTCCTCCACCTTCATCATCTACCTCAAAAACACT
TTGGTGGCCGACTTGATAATGACACTCATGCTTCCTTTCAAAATCCTCTCTGACTC
ACACCTGGCACCCTGGCAGCTCAGAGCTTTTGTGTGTCGTTTTTCTTCGGTGATATT
TTATGAGACCATGTATGTGGGCATCGTGCTGTTAGGGCTCATAGCCTTTGACAGAT
TCCTCAAGATCATCAGACCTTTGAGAAATATTTTTCTAAAAAACCTGTTTTTGCA
AAAACGGTCTCAATCTTCATCTGGTTCTTTTTGTTCCTTCATCTCCCTGCCAAATATG
ATCTTGAGCAACAAGGAAGCAACACCATCGTCTGTGAAAAAGTGTGCTTCCTTAA
AGGGGCCTCTGGGGCTGAAATGGCATCAAATGGTAAATAACATATGCCAGTTTAT
TTTCTGGACTGTTTTTATCCTAATGCTTGTGTTTTATGTGGTTATTGCAAAAAAAGT
ATATGATTCTTATAGAAAGTCCAAAAGTAAGGACAGAAAAACAACAAAAAGCT
GGAAGGCAAAGTATTTGTTGTCGTGGCTGTCTTCTTTGTGTGTTTTGCTCCATTCA
TTTTGCCAGAGTTCCATATACTCACAGTCAAACCAACAATAAGACTGACTGTAGA
CTGCAAAATCAACTGTTTATTGCTAAAGAAACAACCTCTCTTTTTGGCAGCAACTAA
CATTTGTATGGATCCCTTAATATACATATTCTTATGTAAAAAATTCACAGAAAAGC

10

20

TACCATGTATGCAAGGGAGAAAAGACCACAGCATCAAGCCAAGAAAATCATAGCA
GTCAGACAGACAACATAACCTTAGGCTGACAACTGTACATAGGGTTAACTTCTAT
TTATTGATGAGACTTCCGTAGATAATGTGGAAATCAAATTTAACCAAGAAAAAAA
GATTGGAACAAATGCTCTCTTACATTTTATTATCCTGGTGTACAGAAAAGATTATA
TAAAATTTAAATCCACATAGATCTATTTCATAAGCTGAATGAACCATTACTAAGAG
AATGCAACAGGATACAAATGGCCACTAGAGGTCATTATTTCTTTCTTTCTTTTTTT
TTTTTTAAATTTCAAGAGCATTTCACTTTTAACATTTTGGAAAAGACTAAGGAGAAAC
GTATATCCCTACAAACCTCCCCTCCAAACACCTTCTCACATTCTTTTCCACAATTCA
CATAACACTACTGCTTTTGTGCCCCTTAAATGTAGATATGTGCTGAAAGAAAAAA
AAAACGCCCAACTCTTGAAGTCCATTGCTGAAAAGTGCAGCCAGGGGTGAAAGG
GATGCAGACTTGAAGAGTCTGAGGAACTGAAGTGGGTCAGCAAGACCTCTGAAAT
CCTGGGTAAAGGATTTTCTCCTTACAATTACAAACAGCCTCTTTCACATTACAATA
ATATACCATAGGAGGCACAAGCACCATTATTAAGCCACTTTGCTTACACCTTAAGT
GTGTACAATTCAAGTGTGAGAATGCTGTGTTAACTATTCTTTGGAATTCTCCTTCT
GTCCAGCAAATACTCTAATGATGGTTAAACATGGCACCTACTCAGCAATGCCTTCC
TGGACCACAACCCCTATCCCCCTGCCCCACCCCTCCTCATTAAAAACAAATACTTCT
ACTGTTTGGGTGTGTGATAGGGTTCTCAATGCAGATCTCCCTTTTCTAGTTAGCTAT
ATTCTTGACTGCATCCGCTAAAAATGTTAAAGCTTCTTGAGAGACAGACATGCCA
GATTTTCTTGGTATCTCCATAATACGACCTACAGTCCATGGTCTACAGATGTTTT
AAATAGAATTGCTATTCTCGATACATACAAAGACGTAATTGCTGACCCACAATCA
GTAACATCCATATTGGGAGATTTTTCAAAGGATGGTGACCCTGCTTGTATTTATTT
ACCTTGGTATTTTTTCTTGCATCCTTCTGTGATTCAAAAAAGTAAAATGTGGCTTTC
TGAAATGATGGATAAGAGTCTACATCTTCTAGAAAAAATACATAAAGGAGTAGTT
AAGCTCTGTAAATGTGCCACGAGCTCCAACACGACCATCGTAGGGTGAAGCCCAC
GTTTTCTTCCATGGCCTCAAAGGCCCTAGAAGTGCCTACCTTTCTGGCCTTACCTC
CTAGCTACTTATCCATCTCTTGAACCTTATACTCTTGTATAAATTTCTAACTTTCAG
AAAATGCCATACTCTGTTTTGGCACCAACACATGTATATTTCCCCCTGGTACACTTG
GAAGACTCTTATCCATCTGTGAAACCCTATGTTGTCATCACTTGGTCCATGAAATA
TTACCTGGCCAATATCCCACCATCACCTCAAACCCAATCACCCCTCCTCTGTATG
CTGTCACACCTATATTATTAAGCTTATCACATTGCATTGTAATTACTTCCTGACCTT
TGTATCTACTCTTTTAGTAAGTATATATCTGAAAGGAGAGATTGTTTCATT
GTGCAATCAATAAATGTTTGATAAAATAAAGCCC

10

20

30

40

【 0 3 9 0 】

配列番号7

配列番号7にヒトGPR86の別のアミノ酸配列を示す

MNTTVMQGFNRSERCPRDTRIVQLVFPALYTVVFLTGILLNTLALWVHVHPSSSTFIY
LKNTLVADLIMTLMLPFKILSDSHLAPWQLRAFVCRFSSVIFYETMYVGIVLLGLIAFD
RFLKIRPLRNIFLKKPVFAKTVSIFIWFFLFFISLPNMILSNKEATPSSVKKCASLKGPLG
LKWHQMVNNICQFIFWTVFILMLVFYVVIKVKVYDSYRKSKSKDRKNNKKLEGKVF
VVVAVFFVCFAPFHFARVPYTHSQTNNTDCRLQNQLFIKETTFLAATNICMDPLI
YIFLCKKFTEKLPCMQRKTTASSQENHSSQTDNTTLG

【 0 3 9 1 】

配列番号8～20

10

配列番号8～20にノックアウトプラスミドプライマー配列を示す

TATACATATGTTTCAGCAGTACCAACTC – 配列番号 8

ACACCAGTGTATAGATAGCAAGAAGTC – 配列番号 9

cccgtcgacATGCTTTCTTTTATGACAAAATCCTTG – 配列番号 10

aaagcggccGcGAACAGCAGCTGTGTCATCCGAGTG – 配列番号 11

20

aaagcgcgcccAGGCAAGAACAGCAGGATCAAGCGAAG – 配列番号 12

aaacaattGTGGCTTCTGAGGCTATGGAAAGAGAG – 配列番号 13

ATATGGCACATTTGGTCCGCACTGCAC – 配列番号 14

30

GATGAGGAATGATGTCACACAGATGAG – 配列番号 15

AAGGTCAAGATTAGCAAGTGATTCCAG – 配列番号 16

ATACCATACTTACAGTCAAACCACC – 配列番号 17

GGTCTTCGCTTGATCCTGCTGTTCTTG – 配列番号 18

40

TTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG – 配列番号 19

GTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTG – 配列番号 20

【 0 3 9 2 】

配列番号21

配列番号21にノックアウトプラスミド配列を示す

20

5000
TATAAGCAAAAGGATATATATTAAAGTTAAGGGGCATTACATCAGTAAATCCTAACATATTTTAGCCAAAAGAAAATTTTACAATGTGCCATTATTT
ATAATTCGTTTCTCTATATATAAATCAATTCGCCGTATATCTAGTCATTAGGATTGTATAAAATCGGTTTCTTTTAAAAATGTACACGGTAAATAA

5100
CCCTAGAGTTAACCAACGTTCCCTGGAAACACAGTACRTTTCATTTTAAATGTCAAAATGTGGAATCAATGGATTCCAAATTCACCAAGTAATATA
GGGATCTCAATTGGTTGCAAGGGACCTTTGTGTATGTAAAGTAAATTTTACAAGTTTACACCTTAGTTACCTAAGGTTTAAAGAGTTGGTTCATTATAT

5200
GGAATTACTAGTTAGCCAAACCTTGAAGACGGTCCATCTCTACGGTAAGCGCTGSCAAGAACGGTGAAGTGAACCTTGCCATAGAGAACCACATCTCT
CCTTAATGATCAATCGGTTTGGGACTCTGCGAGGTAGAGATGCCATTCGCGCACCGTCTTGCCACTTCACTTTGAACGGTATCTCTGGTGTGTAGGA

5300
CCCCAGGATCAATCTGATTTCTCTTTCCCTTCATCTGTGCGGGCAGGGAAGCAGACTGTCCACATTTGTAJCTTTCTGCACACTCCCTGAGATTAAACG
GGGCTCTAGTAGACTAAAGGAGAAAGGSAAGTAGACAGCCGCTCCCTTCGTCTGACAGTGTGTAACTGAAGACGTGTGAGGGAGCTCAAATTTTGC

5400
AAACACTGTACCAATCTGAGGCCAGCCCTGATTTCAAACCTTCTCTAAGTCTCAAGAATGGAGGTGGTTTCCCAAAAGGGCTTCTTAAAGTGCACACTG
TTTGTGACATGTTAGACTCCGGTCCGGACTAAGTTTGAAGAGATTGAGAGTCTTACCTCCACCAAGGGTTTCCCGAAGGATTTTACGGTGTGAC

5500
TAGCTCCACTCAAACCTGGCAATTTAAGGAACCCAAAGCAATGAGCGCTGCGCATGTTTACCTTTCACTGATGTGCTTGGCTGGTCCATCGGTCCTCT
ATCGAGGTGAGTTTGAACCGTTAAGTTCTTGGGTTCGTACTCGCCGACCTACAAATCGAAAGTACTACACGGGACCCAGCCAGGTAGCCAGGGGGA

5600
CCCCCACTCTCTATGAAGTAGATGATTTCAAACCTTGTCTACATGAGAGAATGAGGTATATAGCTCTTAAACATTTGTTTAAACATAATACCGAATA
GGGGTGTGAGGATACCTCATCTACTACTAAAGTTTGAACGATGTACTCTTACTCCATATATCGAGAATTTGTAAACAAATTTGTATTTAGGCTTAT

5700
ATGCAGAGGTCCAGGAATAATAGTACCCTCTTGGGAATGTGACTCATATCTGCCACAGATCTAGGGATCAAAGACTAACGCAATGTCTGAAGA
TAGCTCTCCAGGTCTTATATCATGATGGTGAAGAACCTTTTACACTGATATAGACGGTGTCTAGATCCCTAGTTTCTGATGTGCTTACAGACTCT
^

5800
AAGGAACAAAGCAAAACAAACAGCAACCAACCAAGCCCTAGCTTTAGACATACAACTTCTTGACGCCACGGCTGTAGGGACAGAAGATGATT
TTCTTTGTATCGTTTGTGTTGTTCGTTGGTTTGGTTTTCGGATCGGATCTGTATGTTTGAAGAACGTGCGGGTCCGATTCCTGTCTTCTACTAA

5900
TGATTTTCAGATCAAGTCTTCTCTCTTCTACTTGAATTTTCATATTTCTTCACTATTTTAACTCTACTATTACATATGAAGTATCAATTAAG
ACTAAAGTCTAGTTTCAAGAGGAGGATGAACATTAAGTATGATAAAGAGTAGTAAATTTAGGATGATAATGTATACTTCTAAGTTATTC

6000
GTCCCTGAATGTGAATAATAAAAGTAAACACTTGGGCTTAGAGAAATAGTTCCGGCGGTAAAGGGATTTTCTTGCCACCCACTCCAGGCAGCTCACAGT
CAGCGACTTACACTTATTTATTTTCATTTTGTGACCCGGATCTCTTATCAAGCCGCCAATTTCCCTAAAGGACCGGTGGGTGAGGTCCGTCGAGTGTCA

6100
CACCITGGACCCAGCTCCAGGAAATCCAACTTCTGGGCTCTGAGGGCCTGAATGCAATGCGCCCTTACACATATATTTAATATATAAATAG
GTGGAACTGGGGTCGAGGTCCCTTAGGTTGTGAAGACCGGAGACTCCCGTGGACTTACGTATACGCGGGAATGTATATTAATTTATTTATTTATC

6200
ATCCATGTTAAGAAATATGGCGTGGTGGGTCCTGACAGAGCCGTGACAGCACTGGATTCAATACTCAGAACCGCAACCAATACTAGTAAATGC
TGGTGTACAAATCTTATACCGCACCCGACGGACGTCTCGGCCACTGTCTGACCTAAGTTATGAGTCTTGTGCGTTGTTATTTGATGACATTTACG

6300
TCCAAAGGTCTAAAGACAAAGAGTTCTAGAAAATGTGGTATTTACAGAGCCCAAGGGGAAATGAGGAAGGAAAGCACTATTAAGAAAGCAAGAACCT
AGGTTTCCAGATTTCTGTTTCTCCAGATCTTTTACACCCATATATGTTCTCGGTTGTTCCCTTTACTCTCTTCTGTCATATTTCTTCTGCTTTGGA

6400
TTACTTCAAGCTATTCGTGGTTGAGCTAGTAACCTGCCACAACCTATACAGCTGAGTCTCTTCCAAACAAAGGTGAGTTTAAATTTTCTTATGAATTT
AATGAAGTGTTCGATTAAGCACCCAACTCGATCAATGACGGTGTGAGTATGTCGACTCAGAGAGGTTTGTGTTCCAGTCAAATTAAGAAATTAATCTAA

————— エキソン 1 —————>

6500
TGCTTGCTATAAAAGGTAAAGGTGGTTAAATTTTCTAGAAATCTAAATTAATTTCTGTAATCACGGGCTGCAAGCATAGGTACTTCAACGCATG
ACGAACGATATTTCCATTTTCCACCAATTTAAAGATCTTTAGATTTATATTAAGACATTAGTCCCGACGTTGATTTCCATGAAGTATTCGCTAC

10

20

30

40

6600

6700

6800

6900

7000

7100

7200

7300

7400

7500

40

7600
CTATAGGAAGTTTAGGAGTAAGSACAGCAGGCACAAGCGGCTGGAGGTGAAGGTATTTATCGTCATGGCTGTCTCTTGTCTGCTTTGCCCCACTGCAT
GATATCCTTCAAAATCCTCATTCCTGTCTGTCCTGTTTCGCCGACCTCCACTTCCATAAATAGCAGTACCGACAGAAGAAACAGACGAACCGGGTGACGTA
Y R K F R S K D S R H K R L E V K V F I V M A V F F V C F A P L H>
MUSGPR86
エキソン 2

>hetF
|
|
7700
TTTGTGAGAATACCATACACTTACAGTCAAACCAACCAATAAGACTCACTGTAGGTTAGAAAACCACTGTTTATGCTAAAGAAGCAACTCTCTTTCTGG
AAACAGTCTTATGGTATGTGAATGTCAGTTTGGTGGTTATCTGACTGACATCCAATCTTTGGTGGCAAAATAACGATTTCTTGGTTGAGAGAAAGACC
F V R I P Y T Y S Q T T N K T D C R L E N Q L F I A K E A T L F L>
MUSGPR86
エキソン 2

>3'armF
|
>3'arm
|
7800
CAACAACAACTATTGTATGGACCCCTTAATATACATAATTTTATGCAAGAAGTTACACAAAAGGTGCCATGTGTGAGATGGGGAAAGGCAAGAACAGC
GTTGTGTGTTGTAACATACCTGGGGGAATATATGTATTAATAACGTCTCTTCAAGTGTGTTTCCACGGTACACACTCTACCCCTTTCCGTTCTTGTGCG
A T T N I C M D P L I Y I I L C K K F T Q K V P C V R W G K A R T A>
MUSGPR86
エキソン 2

<hetR
|
|
>ストップ
|
|
7900
AGGATCAAGCGAAGACCCACACGTAGTCAGACAGACAACATCACTAGCCTGACCACTGTGTCCACAGGTAAATTCACGCATGGCCCTCACGTCAT
TCCTAGTTCTGCTTCGGTGGTGTTCATCAGTCTGTCTGTTGTAGTGGGATCGAGCTGGTGACACAGGGTGTCCAAATTAAGTGCCTACCGGAGTGCAGATA
G S S E D H H S S Q T D N I T L A *>
MUSGPR86
エキソン 2

8000
TTATGGAATGGGATTTCAAAAGATCATTTATGCTGGAGACCTCATTTAAGCATTACAGGAAAAAGAGGGGAACAAACAGTTCCTTACATTTTATATCCTA
AATACCTACCTAAAGTTTCTAGTAATACACCTCTGGAGTAAATCGTAATGTCTTTTCTCTCCCTTGTGTTGTCAGGATGTAATAAATAGGAT
エキソン 2

8100
GTGTATGGAAAAACATATGCTCCCTTTTAAACCATAGACGTATTTATAAGCAGGATAAATTAAGAGACCATGTAATACAGCAATGGCCACTAGATGTC
CACATACCTTTTGTATACGGGTAAATTTGTATCTGCATAAATTTCTCTTATTTAATCTCTGTTACATTTATGTCGTTTACCGGTGATCTACAG
エキソン 2

8200
ACCTTTTCAAGGCAATTCATGTACTATGGAAAAGGTTAATGGGAAACAGGTTTGCCCTGAAAAATCTTCTTCTAGTTACCAACCCACCATCTCTTCACAC
TGGAAAAGTTCCCGTAAGTACATGATACCTTTTCCAATTACCTTTTGTCCAAACGGACTTTTAGAAGGAAGATCAATGGTGGGTTGTTAGAGAGAGTGTG
エキソン 2

8300
ATATATTTCCCTAAACACAGGCTGGCTTTTACAGCCTTCAGAAATGCTGACACTTGTGAACAGAAACCAACCACTTGCATATCCAGTGCCTGTGTGGAA
TATATTAAGGATTTTGTGGTCCGACCGAATAATGTCGGAAGCTTACGACTGTGAACACTTGTCTTTGGTGGTTGAACGATATAGGTCACGGACACACCTT
エキソン 2

8400
AGGCTAAGGTGGGGCTCAAAGAGATGAGTCTGAGGAACCAAGTGGSTTGGTCAAAATAACCCAGGCATCTCAAAGATTTCCTCCTTACAAAGTCA
TCCGATTTCCACCCCGAGTTTCTCTACGTACAGACTCTTGGTTTACCCCAACCAAGTTTATTTGGGCTCCGTAGAGTTTCTAAAGGAGGAATGTTTACGT
エキソン 2

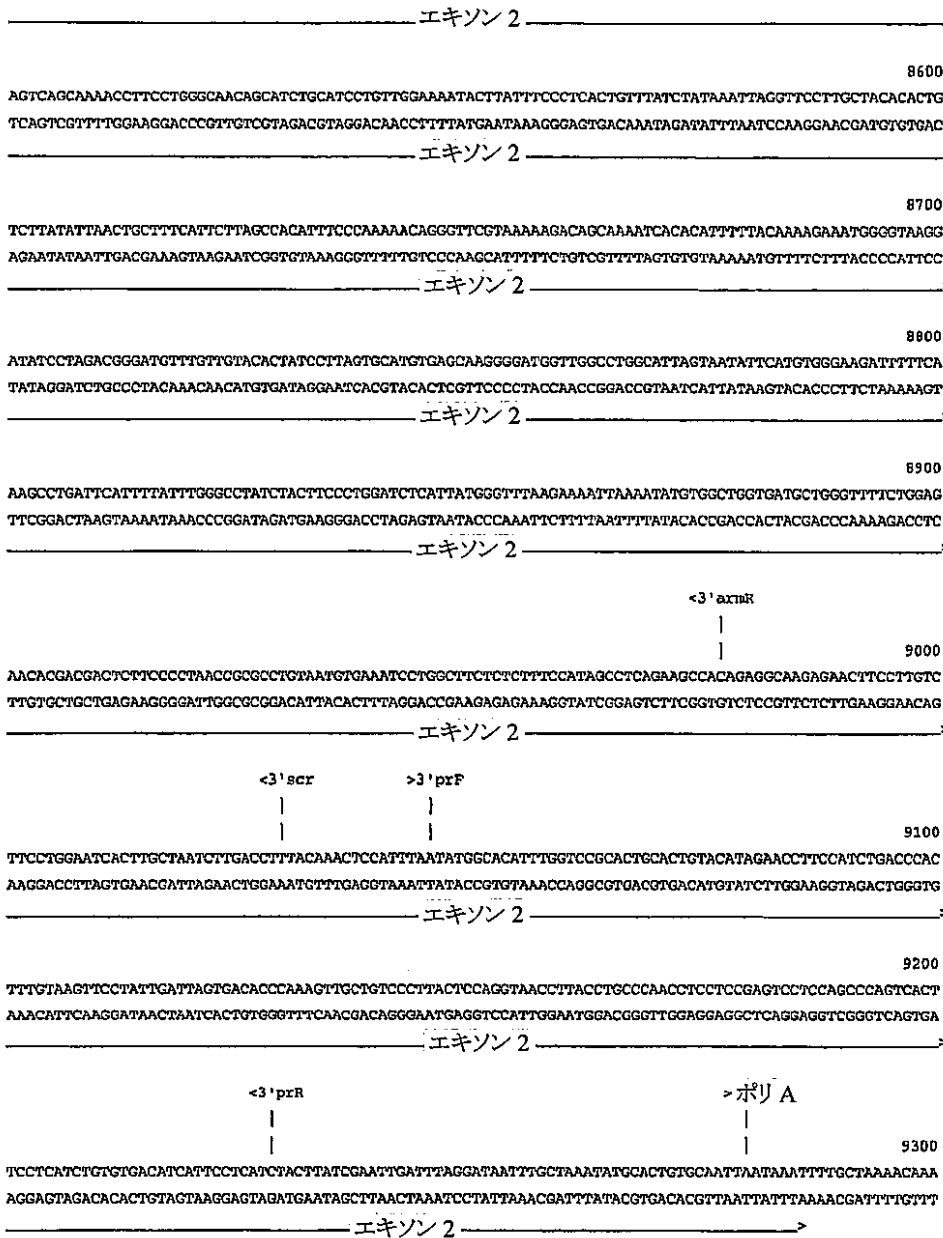
8500
AAGGGCTGCTCTACATCTAAACAGAGACCCAGAAGAGAGGCACATGCAACAGGCAAAAGCCAGTTTACAGCCATGTGCAATCCAGAGAGGGGAAGTGT
TTCCCGACGAGGATGATAGATTGTCTCTGCTGCTTCTCTCGGTACCGTGTCTCGGTTCAGGTGTCGTTACAGCTTAGGTCTCTCCCTTCACAA
エキソン 2

10

20

30

40



10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0393】

【図1】 pfamのHMM構造予測ソフトウェア (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>) を用いたヒトGPR86ポリペプチド (配列番号3) の分析結果を示す。

【図2】 ノックアウトプラスミドの説明を示す。

【図3】 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により生成させたヒトGPR86の発現プロフィールを示す。

【図4】 対比したGPR86ノックアウト体と野生型動物の結果を示す、テールフリックテスト (Tail Flick Test) からのデータのグラフを示す。

【図5】 対比したGPR86ノックアウト体 (白) と野生型動物 (黒) の足幅の増加パーセンテージで表した結果を示す、ホルマリンテストからのデータのグラフを示す。

【図6】 エレクトロニックVonfreyテスト結果 (-/-ノックアウト動物; +/+野生型対照) のグラフを示す。

【図7】 いくつかのヒト由来組織におけるGPR86発現のRT-PCR分析結果を示す。レーン1: 骨髄; レーン2: 胸腺; レーン3: リンパ節; レーン4: Jurkat CD4+; レーン5: Myla CD8+; レーン6: Colo 720; レーン7: THP1; レーン8: 骨芽細胞; レーン9: 軟骨細胞; レーン10: ネガティブコントロール; レーン11: ポジティブコントロール (脳)。

【図 8】いくつかのマウス由来組織におけるGPR86発現のRT-PCR分析結果を示す。レーン1：脾臓；レーン2：唾液腺；レーン3：脊髄；レーン4：筋肉；レーン5：舌；レーン6：卵巣；レーン7：膵臓；レーン8：脂肪組織；レーン9：精巣；レーン10：心臓；レーン11：眼；レーン12：肺；レーン13：腎臓；レーン14：胸腺；レーン15：胃+SI(小腸)；レーン16：脳；レーン17：肝臓+Gb(胆嚢)；レーン18：血液；レーン19：膀胱；レーン20：副腎；レーン21：C57BL6JゲノムDNA；レーン22：129SvEvゲノムDNA。

【図 1】

モデル	Seq-from	Seq-to	HMM-from	HMM-to	スコア	E-値	説明
7tm_2	23	214	1	268	-179.1	0.76	7 回膜貫通受容体(セクレチンファミリー)
7tm_1	40	296	1	269	109.7	2.8e-35	7 回膜貫通受容体(ロドプシンファミリー)

7tm_1 domain 1 of 1, from 40 to 296: スコア 109.7, E = 2.8e-35
 +->GKLLFVILVILTKKLTPTNFIINAAVAILLFIITLPPWALYVYV
 F L+++v++ ++ i++ N VAIL ++l lpe +l+ ++
 LKFLALVTFVH-IPSSVTLVILKFLVAILDITLILPKILSPSEL 85

クエリー 40 qsedWpfgaolCKltaladvvnaeSillltaiSiDEULAIvbfIryrrr
 E++ ++C+++ ++ sgy++i LL +i+322+I ++2lr +

クエリー 86 -APVQLNAFVCFSSVFIYETHFVGIYLLGLIAVDFILKILRELRNIFL 133
 rtsprAkvvillvWviallallpPllfswvktveegmgtlnvavtcLi
 p AK v++w++ ++slP ++2+ + ++ + C

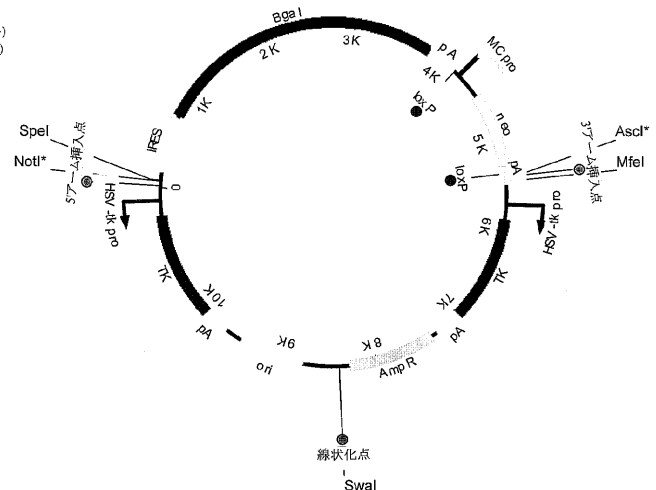
クエリー 134 KK-PFAKTVSIFZIFLFFISLFWILSNKEATPSSVK-----CAS 175
 dfpeastasvstlrcyvlstlvqll .Plvlvcltrllrtr...
 l++++ ++ F++ + +++lv+Y +I+++++

クエリー 176 LKSPLE-----LKWHTMNMICUFIetVFIILVFIYVIAKKVIdsy 218
kaaktlvvvvvFvLWLPyfiyvlldtlo.lsiims
 ++++++++k+ ++vvv vF++C++P++ + + + + +

クエリー 219 rksksdkrknkEGRKVFVVVVFVCFAPFHFAKVPYTHSqTN---NKT 266
 tCelervlptallvleLayvWscIMFIY--+
 +C L +l +a+ tl+La +N c++P+IY

クエリー 267 DCKLQNLFIARETYFLAATNMGDPLIY 296

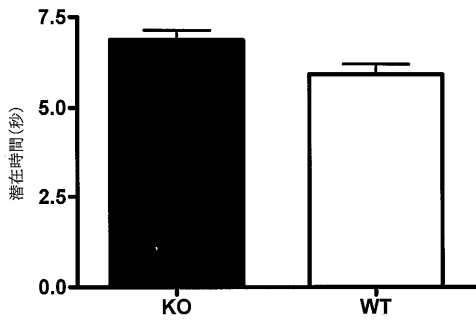
【図 2】



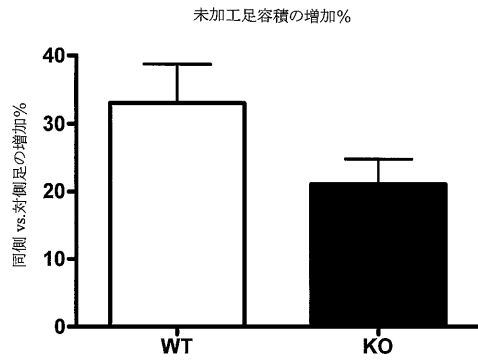
【図 3】



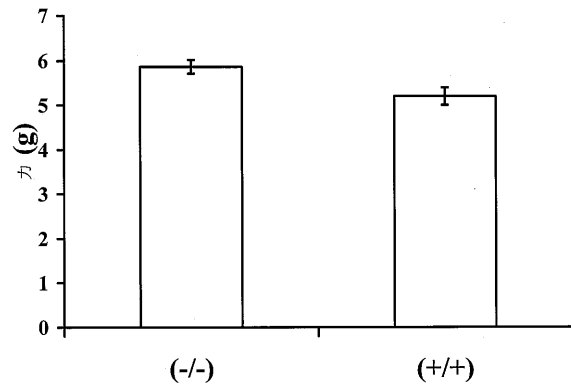
【図 4】



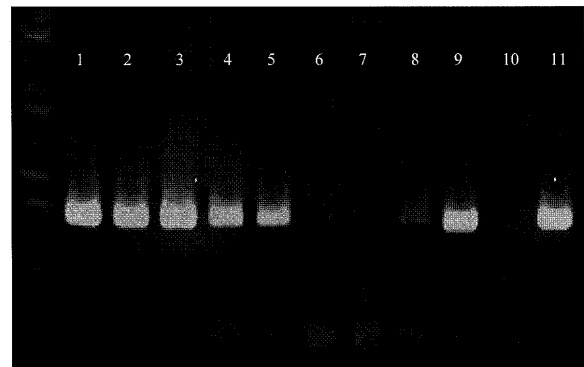
【図 5】



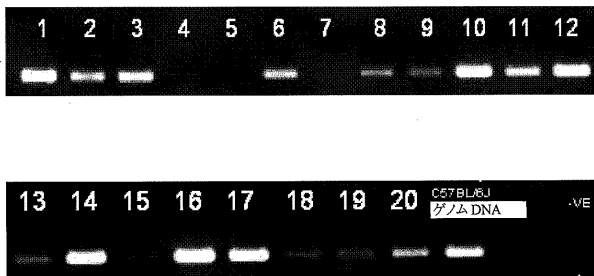
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2008504044000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月1日(2007.8.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に好適な分子の同定方法であって、候補分子が、配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含むGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを判別することを含む、前記方法。

【請求項2】

前記候補分子をGPR86ポリペプチドに曝露し、該候補分子が該GPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを判別する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記候補分子をGPR86ポリペプチド発現細胞に曝露する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

GPR86優先的Gタンパク質 G_i と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定すること、によりアゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】

GPR86優先的Gタンパク質 G_i と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定すること、によりアンタゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項6】

$G_{\alpha_{16}}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果増加するか否かを測定すること、によりアゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項7】

$G_{\alpha_{16}}$ のような無差別刺激性Gタンパク質と共役しているGPR86受容体を含む細胞を候補化合物と接触させること、および、該細胞中のサイクリックAMP(cAMP)のようなGPCR感受性マーカーのレベルが前記接触の結果低下するか否かを測定すること、によりアンタゴニストを同定する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項8】

炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和に好適な分子を同定するための、配列番号1、配列番号2もしくは配列番号4に記載の核酸配列またはそれに少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含むGPR86ポリヌクレオチドの使用。

【請求項9】

(a) 野生型動物または機能破壊された内因性GPR86遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物を用意すること、

(b) 前記野生型動物またはトランスジェニック非ヒト動物を候補分子に曝露すること、および、

(c) 前記動物の生物学的パラメーターが前記接触の結果変化したか否かを測定すること、を含み、前記生物学的パラメーターが、刺激への応答、熱への応答、光への応答、免疫応答、炎症応答および疼痛への応答からなる群より選択される、請求項 1 または 8 に記載の方法または使用。

【請求項 10】

配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む GPR86 ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法であって、候補分子を非ヒト動物に投与すること、ならびに該動物が、野生型動物と比較して、(a) 増加または減少した疼痛感受性である変更された疼痛感受性、および (b) 増加または減少した炎症性疼痛感受性である変更された炎症性疼痛感受性を示すか否かを判別することを含む、前記方法。

【請求項 11】

前記非ヒト動物が機能的な GPR86 ポリペプチドを発現する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記非ヒト動物が野生型動物である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記非ヒト動物が齧歯類である、請求項 10、11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記非ヒト動物がマウスである、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記判別がテールフリックテスト (Tail Flick Test)、ホルマリンテスト、フォンフレイハーテスト (Von Frey Hair Test) または神経因性疼痛テストを用いて行われる、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

個体における炎症性疾患もしくは疼痛の診断または炎症性疾患もしくは疼痛への感受性の判別に有用な指標を提供する方法であって、該個体由来のサンプルにおいて配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を有する GPR86 ポリペプチドの発現パターンまたは発現レベルの変化を検出することを含む、前記方法。

【請求項 17】

個体における炎症性疾患もしくは疼痛の診断または炎症性疾患もしくは疼痛への感受性の判別に有用な指標を提供する方法であって、該個体由来のサンプルにおいて配列番号 1、配列番号 2 もしくは配列番号 4 に記載の核酸配列またはそれに少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む GPR86 ポリヌクレオチドにおける多型を検出することを含む、前記方法。

【請求項 18】

前記アゴニストまたはアンタゴニストが免疫グロブリンまたは抗体を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法または使用。

【請求項 19】

前記免疫グロブリンまたは抗体が、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を有する GPR86 ポリペプチドに特異的に結合できるものである、請求項 18 に記載の方法または使用。

【請求項 20】

炎症性疾患または疼痛の治療または緩和のための、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む GPR86 ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの同定方法における、機能破壊された内因性 GPR86 遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物またはその単離された細胞もしくは組織の使用であって、前記 GPR86 遺伝子は配列番号 1、配列番号 2 もしくは配列番号 4 に記載の核酸配列またはその一部分あるいはそれに少なくとも 90% の

配列同一性を有する配列を含む、前記使用。

【請求項 2 1】

前記トランスジェニック非ヒト動物はGPR86遺伝子もしくはその一部分に欠失を有する、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

テールフリックテスト(Tail Flick Test)、ホルマリンテスト、フォンフレイヘアースト(Von Frey Hair Test)または神経因性疼痛テストにおいて測定した場合に、前記トランスジェニック非ヒト動物が、野生型動物と比較して、(a)増加または減少した疼痛感受性である変更された疼痛感受性、および(b)増加または減少した炎症性疼痛感受性である変更された炎症性疼痛感受性を示す、請求項 2 0 または 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 3】

前記トランスジェニック非ヒト動物がマウスである、請求項 2 0、2 1 または 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 4】

前記トランスジェニック非ヒト動物が機能破壊されたGPR86遺伝子を含む、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 5】

前記トランスジェニック非ヒト動物がGPR86遺伝子に欠失を含み、該GPR86遺伝子は配列番号 1、配列番号 2 もしくは配列番号 4 に記載の核酸配列またはそれに少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

炎症性疾患または疼痛用のモデルとしての、請求項 2 0 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物またはその単離された細胞もしくは組織の使用。

【請求項 2 7】

個体における炎症性疾患もしくは疼痛を治療するための医薬組成物の調製における、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも90%の配列同一性を有する配列を有するGPR86ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの使用。

【請求項 2 8】

疼痛が、急性疼痛、慢性疼痛、皮膚疼痛、体性痛、内臓痛、心筋虚血、幻肢痛(phantom pain)、および神経因性疼痛(神経痛)を含む遠隔痛、損傷、疾患に起因する疼痛、頭痛、偏頭痛、癌疼痛、パーキンソン病のような神経障害に起因する疼痛、脊椎および末梢神経手術、脳腫瘍、外傷性脳損傷(TBI)、脊髄外傷、慢性疼痛症候群、慢性疲労症候群に起因する疼痛、三叉神経痛、舌咽神経痛、ヘルペス後神経痛、およびカウザルギーなどの神経痛、狼瘡、サルコイドーシス、くも膜炎、関節炎、リウマチ性疾患、生理痛、背痛、腰痛、関節痛、腹痛、胸痛、陣痛、骨格筋疾患および皮膚病、頭部外傷、ならびに線維筋痛のいずれかにより生じる疼痛からなる群より選択される、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法または使用。

【請求項 2 9】

炎症性疾患が、炎症性疾患(例えば慢性関節リウマチ、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、移植片対宿主拒絶反応、全身性エリテマトーデスまたはインスリン依存性糖尿病)、自己免疫疾患(例えば毒素性ショック症候群、変形性関節症、糖尿病または炎症性腸疾患)、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、接触皮膚炎、アテローム動脈硬化症、糸球体腎炎、再灌流障害、骨吸収障害、喘息、卒中、心筋梗塞、熱傷、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、外傷に続発する多器官障害、急性炎症性成分を伴う皮膚病、急性化膿性髄膜炎、壊死性腸炎、血液透析に付随する症候群、敗血症ショック、白血球搬出法、顆粒球輸血、煙吸入により引き起こされる肺の急性または慢性炎症、子宮内膜症、ベーチェット病、ブドウ膜炎、強直性脊椎炎、脾炎、癌、ライム病、経皮経管冠状動脈形成に続く再狭窄、アルツハイマー病、外傷性関節炎、敗血症、慢性閉塞性肺疾患、うつ血性心不全、骨粗鬆症、悪液質、パーキンソン病、歯周病、痛風、アレルギー疾

患、加齢性黄班変性症、感染および嚢胞性線維症から成る群より選択される、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法または使用。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法または使用により同定された、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む GPR86 ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項 31】

炎症性疾患または疼痛の治療、予防または緩和のための、請求項 30 に記載の分子の使用。

【請求項 32】

炎症性疾患もしくは疼痛またはそれに対する感受性を診断するキットであって、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む GPR86 ポリペプチドまたはその一部分、該 GPR86 ポリペプチドに対する抗体、あるいはこうしたものをコードしうる核酸のいずれか 1 以上を含む、前記キット。

【請求項 33】

炎症性疾患または疼痛を患う個体を治療するための医薬組成物であって、配列番号 3 もしくは配列番号 5 もしくは配列番号 7 に記載のアミノ酸配列またはそれに少なくとも 90 % の配列同一性を有する配列を含む GPR86 ポリペプチド、該 GPR86 ポリペプチドのアゴニスト、あるいは該 GPR86 ポリペプチドのアンタゴニストを含む、前記医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB2005/002601
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/566 C07K14/705		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/040000 A (PRIMAL, INC; GAITANARIS, GEORGE, A; BERGMANN, JOHN, E; GRAGEROV, ALEXA) 13 May 2004 (2004-05-13) page 542; claim 151; sequence 554 page 542; claim 151; sequence 555 page 277 - page 359 page 295, line 6 page 317 - page 318 claims	1-27
X	WO 03/014731 A (EUROSCREEN S.A) 20 February 2003 (2003-02-20) figure 1; example 1 sequence 2 the whole document -/-	1-3, 12-14, 16, 18, 19, 24, 27
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 September 2005		Date of mailing of the international search report 08/09/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/GB2005/002601

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/059857 A1 (ZHANG FANG L ET AL) 27 March 2003 (2003-03-27) page 12 - page 13; claim 3 the whole document	1-3, 18, 19, 22, 23, 25, 26
X	US 2003/165989 A1 (AU-YOUNG JANICE ET AL) 4 September 2003 (2003-09-04) claim 2; sequence 1 the whole document	1-3, 12-14, 16, 18, 19, 22, 23, 25-27
X	US 6 358 695 B1 (SATHE GANESH MADHUSUDAN ET AL) 19 March 2002 (2002-03-19) column 12; claim 1 sequence 2 the whole document	1-3, 18, 19, 22, 23, 25-27
X	WO 01/27153 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; SMITHKLINE BEECHAM PLC) 19 April 2001 (2001-04-19) sequence 2 the whole document	1-3, 12-14, 16, 18, 19, 22, 24
X	COMMUNI DIDIER ET AL: "Identification of a novel human ADP receptor coupled to G1" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 44, 2 November 2001 (2001-11-02), pages 41479-41485, XP002342815 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-7, 18, 19, 22
X	MARTEAU F ET AL: "PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE HUMAN P2Y13 RECEPTOR" MOLECULAR PHARMACOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 64, no. 1, 2003, pages 104-112, XP008038601 ISSN: 0026-895X the whole document	1-7, 18, 19, 22

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2005/002601

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG FANG L ET AL: "P2Y13: Identification and characterization of a novel Gαphai-coupled ADP receptor from human and mouse" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 301, no. 2, May 2002 (2002-05), pages 705-713, XP002342816 ISSN: 0022-3565 the whole document	1-5,18, 19,22
P,X	WO 2004/082571 A (BAYER HEALTHCARE AG; GOLZ, STEFAN; BRUEGGEMEIER, ULF; GEERTS, ANDREAS) 30 September 2004 (2004-09-30) sequence 2 the whole document	1-7, 12-14, 16, 18-23, 25-27
P,X	FUMAGALLI MARTA ET AL: "Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y13 receptor" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 68, no. 1, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 113-124, XP002342817 ISSN: 0006-2952 the whole document	1-7,18, 19,22
A	KOSTENIS E: "Is Gαphai16 the optimal tool for fishing ligands of orphan G-protein-coupled receptors?" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 11, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 560-564, XP004320245 ISSN: 0165-6147 the whole document	6,7

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 25 and 26 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 28

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy (claims 25 and 26)

Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information (claim 28)

Continuation of Box II.2

Present claim 28 relates to a method defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the reference to the figures. In the present case, the claim so lacks support, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). Consequently no search has been carried out for claim 28.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/002601

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 25 and 26 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 International Application No
 PCT/682005/002601

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004040000	A	13-05-2004	AU 2003300776 A1 CA 2498264 A1 WO 2004040000 A2	25-05-2004 13-05-2004 13-05-2004
WO 03014731	A	20-02-2003	US 2003050235 A1 CA 2453486 A1 WO 03014731 A2 EP 1421377 A2 JP 2005500053 T US 2004005629 A1	13-03-2003 20-02-2003 20-02-2003 26-05-2004 06-01-2005 08-01-2004
US 2003059857	A1	27-03-2003	NONE	
US 2003165989	A1	04-09-2003	US 2002025555 A1 US 5955303 A AU 6447998 A CA 2282760 A1 EP 0973891 A1 JP 2001513650 T WO 9839441 A1	28-02-2002 21-09-1999 22-09-1998 11-09-1998 26-01-2000 04-09-2001 11-09-1998
US 6358695	B1	19-03-2002	US 6162899 A US 2001021509 A1 CA 2239255 A1 EP 0913471 A2 JP 11235184 A WO 0244208 A1	19-12-2000 13-09-2001 23-04-1999 06-05-1999 31-08-1999 06-06-2002
WO 0127153	A	19-04-2001	WO 0127153 A1	19-04-2001
WO 2004082571	A	30-09-2004	WO 2004082571 A2	30-09-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
	A 6 1 K 39/00	H
	A 0 1 K 67/027	

(31)優先権主張番号 60/683,471

(32)優先日 平成17年5月20日(2005.5.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ブライス, ニコラ

イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ, ミルトン ロード, ケンブリッジ サイエ ンス パーク 4 1 8, パラダイム セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 カールトン, マーク

イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ, ミルトン ロード, ケンブリッジ サイエ ンス パーク 4 1 8, パラダイム セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 ディクソン, ジョン

イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ, ミルトン ロード, ケンブリッジ サイエ

- ンス パーク 4 1 8 , パラダイム セラピューティクス リミテッド
- (72)発明者 ヘンドリック , アラン
イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ , ミルトン ロード , ケンブリッジ サイエ
ンス パーク 4 1 8 , パラダイム セラピューティクス リミテッド
- (72)発明者 マリンジ , イザベル
イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ , ミルトン ロード , ケンブリッジ サイエ
ンス パーク 4 1 8 , パラダイム セラピューティクス リミテッド
- (72)発明者 メサージェ , ソフィ
イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ , ミルトン ロード , ケンブリッジ サイエ
ンス パーク 4 1 8 , パラダイム セラピューティクス リミテッド
- (72)発明者 ザーン , デイルク
イギリス国 シービー 4 0 ピーエー ケンブリッジ , ミルトン ロード , ケンブリッジ サイエ
ンス パーク 4 1 8 , パラダイム セラピューティクス リミテッド

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB17 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 CA01 DA02 EA02 FA10 GA11 HA11

4B063 QA07 QA18 QQ08 QQ13 QR33 QR59 QR77 QR80 QS05 QS36

QX02

4C084 AA17 MA28 MA52 MA63 MA66 NA14 ZA022 ZA082 ZA152 ZA162

ZA362 ZA452 ZA592 ZA662 ZA682 ZA892 ZA962 ZA972 ZB082 ZB112

ZB132 ZB152 ZB262 ZB322 ZC422

4C085 AA03 BB11 EE01 GG03 GG08

专利名称(译)	使用GPR86受体		
公开(公告)号	JP2008504044A	公开(公告)日	2008-02-14
申请号	JP2007518705	申请日	2005-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	范式治疗有限公司		
申请(专利权)人(译)	范式治疗有限公司		
[标]发明人	ブライスニコラ カールトンマーク ディクソンジョン ヘンドリックアラン マリンジイザベル メサージェソフィ ザーンディルク		
发明人	ブライス,ニコラ カールトン,マーク ディクソン,ジョン ヘンドリック,アラン マリンジ,イザベル メサージェ,ソフィ ザーン,ディルク		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09 A61K45/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P25/04 A61P1/04 A61P17/06 A61P37/06 A61P19/02 A61P3/10 A61P19/08 A61P11/06 A61P9/10 A61P17/02 A61P11/00 A61P13/12 A61P1/18 A61P35/00 A61P25/28 A61P19/10 A61P25/16 A61P1/02 A61P37/08 A61P31/00 A61K39/00 A01K67/027 C07K14/705 G01N33/566		
CPC分类号	A61K49/0008 A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0356 C07K14/70571 C12N15/8509 G01N33/566 G01N33/6893 G01N2333/726 G01N2500/00 G01N2800/24 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A A61K45/00 A61P43/00.111 A61P29/00 A61P25/04 A61P1/04 A61P29/00.101 A61P17/06 A61P37/06 A61P19/02 A61P3/10 A61P19/08 A61P11/06 A61P9/10 A61P17/02 A61P11/00 A61P9/10.101 A61P13/12 A61P1/18 A61P35/00 A61P25/28 A61P19/10 A61P25/16 A61P1/02 A61P37/08 A61P31/00 A61K39/00.H A01K67/027		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QR33 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/MA28 4C084/MA52 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA082 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC422 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/GG03 4C085/GG08		
优先权	2004014798 2004-07-01 GB 60/586513 2004-07-09 US 2005010253 2005-05-19 GB 60/683471 2005-05-20 US		
其他公开文献	JP4926952B2 JP2008504044A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明人，GPR86相关的疾病，炎性疾病或疼痛的特别的治疗，用于识别合适的分子预防或减轻的方法，所述候选分子被确定是否GPR86多肽的激动剂或拮抗剂使其中前述GPR86多肽包含SEQ ID NO：3或SEQ ID NO：5或SEQ ID NO：7所示的氨基酸序列，其片段或与其至少90%相同的序列。点域5

