

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-518414

(P2004-518414A)

(43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/40	C O 7 K 16/40		4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15		4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19		4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 155 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-535531 (P2002-535531)	(71) 出願人	503139315
(86) (22) 出願日	平成13年10月17日 (2001.10.17)		トリュデュ インスティテュート, インク
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月14日 (2003.4.14)		.
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/032383		アメリカ合衆国 1 2 9 3 8 ニューヨー
(87) 国際公開番号	W02002/032288		ク州, サラナク レイク, アルゴンキン
(87) 国際公開日	平成14年4月25日 (2002.4.25)		アヴェニュー 1 0 0, ピー. オー. ボッ
(31) 優先権主張番号	60/241,065		クス 5 9
(32) 優先日	平成12年10月17日 (2000.10.17)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD38により調節される走化性

(57) 【要約】

本発明は、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、病原性生物による感染、及び移植拒絶反応を含む（ただしこれらに限定されない）障害を治療するための、CD38を発現する細胞の遊走活性を調節する方法に関する。このような細胞としては、例えば好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ、及び樹状細胞が挙げられる。本発明はさらに、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性を調節する化合物を同定するよう設計された薬物スクリーニングアッセイ、ならびにCD38により調節される細胞遊走が関係する障害の治療におけるこのような化合物の使用に関する。本発明は、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性が走化性にとって必要であるという発見に基づく。さらに、本発明は、マンソン住血吸虫CD38相同体の酵素活性を調節する化合物を同定する方法、ならびに蠕虫感染により引き起こされる病原性障害の治療におけるこれらの化合物の使用に関する。これは、マンソン住血吸虫等の蠕虫がCD38相同体を発現する、という発見に基づく。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 1 4 に記載されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 2】

図 1 4 の D N A 配列を含む請求項 1 記載の単離核酸分子。

【請求項 3】

図 1 4 の D N A 配列を含む単離核酸分子。

【請求項 4】

図 1 4 に記載されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む請求項 3 記載の単離核酸分子。

10

【請求項 5】

ストリンジェントな条件下において請求項 1 又は請求項 3 記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズし且つ機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子。

【請求項 6】

中程度のストリンジェント条件下において請求項 1 又は請求項 3 記載の核酸にハイブリダイズし且つ機能的に同等な S M 3 8 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 7】

S M 3 8 アンチセンス分子である単離核酸分子。

20

【請求項 8】

図 1 4 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 9】

図 1 4 のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 10】

ストリンジェントな条件下において請求項 1 又は請求項 3 記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズし且つ機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチド。

【請求項 11】

中程度のストリンジェント条件下において請求項 1 又は請求項 3 記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズし且つ機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチド。

30

【請求項 12】

S M 3 8 タンパク質のシクラーゼドメインを含む S M 3 8 タンパク質の精製フラグメント。

【請求項 13】

少なくとも 6 個のアミノ酸からなる S M 3 8 タンパク質のフラグメントが共有結合を介して S M 3 8 タンパク質ではない第 2 のタンパク質のアミノ酸配列に融合したものを含むキメラタンパク質。

【請求項 14】

S M 3 8 タンパク質に結合することができる抗体。

40

【請求項 15】

請求項 5 又は請求項 6 記載の核酸を含む組換え細胞。

【請求項 16】

請求項 5 又は請求項 6 記載の核酸を含む組換え細胞を、コードされる S M 3 8 タンパク質が該細胞によって発現されるように培養する工程、及び発現された S M 3 8 タンパク質を回収する工程を含む、S M 3 8 タンパク質の産生方法。

【請求項 17】

(i) 基質の存在下で C D 3 8 を発現する細胞をテスト化合物に接触させて C D 3 8 活性レベルを測定する工程、(i i) 別の実験で、基質の存在下で C D 3 8 タンパク質を発現

50

する細胞を対照ビヒクルに接触させてC D 3 8 活性レベルを測定する工程、この際の条件は工程 (i) の条件と本質的に同じである、ならびに (i i i) 工程 (i) で測定したC D 3 8 活性レベルを工程 (i i) で測定したC D 3 8 活性レベルと比較する工程を含み、テスト化合物の存在下でのC D 3 8 活性レベルが高ければ、そのテスト化合物がC D 3 8 活性化物質であることを示すものである、C D 3 8 酵素活性を活性化する化合物の同定方法。

【請求項 1 8】

(i) 化学誘引物質及び基質の存在下でC D 3 8 を発現する細胞をテスト化合物に接触させてC D 3 8 活性レベルを測定する工程、(i i) 別の実験で、C D 3 8 タンパク質を発現する細胞及び基質を接触させてC D 3 8 活性レベルを測定する工程、この際の条件は工程 (i) の条件と本質的に同じである、ならびに (i i i) 工程 (i) で測定したC D 3 8 活性レベルを工程 (i i) で測定したC D 3 8 活性レベルと比較する工程を含み、テスト化合物の存在下でのC D 3 8 活性レベルが低ければ、そのテスト化合物がC D 3 8 阻害物質であることを示すものである、C D 3 8 酵素活性を阻害する化合物の同定方法。

10

【請求項 1 9】

さらに、工程 (i) 及び (i i) において化学誘引物質が存在し、C D 3 8 を発現する前記細胞が化学誘引物質受容体を発現する、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

C D 3 8 A D P - リボシルシクラーゼ活性を測定する、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の方法。

20

【請求項 2 1】

c A D P R のレベルを測定する、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 2】

N A A D P のレベルを測定する、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 3】

化学誘引物質受容体の後に細胞内カルシウムレベルを測定する、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 4】

C D 3 8 により媒介される細胞遊走を測定する、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 5】

(i) テスト化合物をC D 3 8 タンパク質に接触させる工程、
(i i) 前記化合物がC D 3 8 タンパク質に結合するか否かを決定する工程、及び
(i i i) 前記C D 3 8 タンパク質に結合するテスト化合物を、C D 3 8 タンパク質の活性を調節するために使用することができる化合物として選択する工程を含む、C D 3 8 の活性を調節する化合物の同定方法。

30

【請求項 2 6】

(i) 基質の存在下でS M 3 8 を発現する細胞をテスト化合物に接触させてS M 3 8 活性レベルを測定する工程、(i i) 別の実験で、基質の存在下でS M 3 8 タンパク質を発現する細胞を対照ビヒクルに接触させてS M 3 8 活性レベルを測定する工程、この際の条件は工程 (i) の条件と本質的に同じである、ならびに (i i i) 工程 (i) で測定したS M 3 8 活性レベルを工程 (i i) で測定したS M 3 8 活性レベルと比較する工程を含み、テスト化合物の存在下でのS M 3 8 活性レベルが高ければ、そのテスト化合物がS M 3 8 活性化物質であることを示すものである、S M 3 8 酵素活性を活性化する化合物の同定方法。

40

【請求項 2 7】

(i) 化学誘引物質及び基質の存在下でS M 3 8 を発現する細胞をテスト化合物に接触させてS M 3 8 活性レベルを測定する工程、(i i) 別の実験で、S M 3 8 タンパク質を発現する細胞及び基質を接触させてS M 3 8 活性レベルを測定する工程、この際の条件は工程 (i) の条件と本質的に同じである、ならびに (i i i) 工程 (i) で測定したS M 3 8 活性レベルを工程 (i i) で測定したS M 3 8 活性レベルと比較する工程を含み、テス

50

ト化合物の存在下での S M 3 8 活性レベルが低ければ、そのテスト化合物が S M 3 8 阻害物質であることを示すものである、S M 3 8 酵素活性を阻害する化合物の同定方法。

【請求項 2 8】

c A D P R のレベルを測定する、請求項 2 6 又は請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

N A A D P のレベルを測定する、請求項 2 6 又は請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 0】

細胞内のカルシウムレベルを測定する、請求項 2 6 又は請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 1】

C D 3 8 により媒介される細胞遊走を測定する、請求項 2 6 又は請求項 2 7 記載の方法。 10

【請求項 3 2】

(i) テスト化合物を S M 3 8 タンパク質に接触させる工程、

(i i) 前記化合物が S M 3 8 タンパク質に結合するか否かを決定する工程、及び

(i i i) 前記 S M 3 8 タンパク質に結合するテスト化合物を、S M 3 8 タンパク質の活性を調節するために使用することができる化合物として選択する工程、を含む、S M 3 8 の活性を調節する化合物の同定方法。

【請求項 3 3】

C D 3 8 を発現する細胞を C D 3 8 阻害物質と接触させる工程を含む、C D 3 8 発現細胞の遊走活性の調節方法。

【請求項 3 4】

C D 3 8 を発現する細胞を C D 3 8 活性化物質と接触させる工程を含む、C D 3 8 発現細胞の遊走活性の調節方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

1. はじめに

本発明は、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、寄生虫等の病原性生物による感染、及び移植拒絶反応を含む（ただしこれらに限定されない）障害を治療するために、C D 3 8 を発現する細胞の遊走活性（m i g r a t o r y a c t i v i t y）を調節する方法に関する。このような細胞としては、例えば好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ、及び樹状細胞が挙げられる。本発明はさらに、C D 3 8 の A D P - リボシルシクラーゼ活性を調節する化合物を同定するよう設計された薬物スクリーニングアッセイ、ならびに C D 3 8 により調節される細胞遊走（c e l l m i g r a t i o n）を伴う障害の治療におけるこのような化合物の使用に関する。さらに、本発明は寄生性扁虫であるマンソン住血吸虫に由来する C D 3 8 相同体の単離及び特徴付けに関する。このような相同体（本明細書において S M 3 8 と呼ばれる）を同定することにより、病原性生物における関連酵素をスクリーニングするように設計された組成物及びアッセイ、ならびに S M 3 8 の活性及び / 又は発現を調節する化合物をスクリーニングするための組成物及びアッセイが提供される。このような化合物は、このような寄生虫による感染により生じる病原性障害（p a t h o g e n i c d i s o r d e r）を治療するために使用することができる。本発明は、C D 3 8 の A D P - リボシルシクラーゼ活性が走化性にとって必要であるという発見、及びマンソン住血吸虫が寄生虫におけるカルシウム応答を調節することができる C D 3 8 相同体を発現するという発見に基づく。 30 40

【0002】

2. 発明の背景

好中球、単球、樹状細胞、好酸球及びリンパ球等の細胞を含む造血由来細胞（h e m a t o p o i e t i c a l l y - d e r i v e d c e l l s）は、炎症反応の重要な媒介細胞（c e l l u l a r m e d i a t o r）であり、組織の損傷部位もしくは感染部位に移動してそこで新しく到着した細胞がエフェクター機能を発揮することによって、可溶性炎症媒介物質に反応する。

【0003】

循環している白血球集団の40～50%を占める好中球は、免疫及び炎症の両方にとって特に重要である。好中球は、普段は静止細胞であるが、刺激を受けると、種々の炎症活動を媒介することができる。様々な作用物質が好中球を活性化することができ、この活性化は通常、活性化物質が好中球の表面に発現される特定の受容体に結合することによって媒介される。好中球は、活性化されると、内皮細胞に結合して、組織の損傷部位、病原体又は外来物質に向かって移動することができる。同様に、好酸球も強力な炎症エフェクター細胞であるが、これらの細胞は喘息等のアレルギー性疾患にもっとも関係がある。好中球と同様に、好酸球は、炎症反応を起こしこれを持続させることができる炎症性分子 (proinflammatory molecule) の強力な兵器工場を有する。

【0004】

好酸球や好中球等の集中した細胞 (recruited cell) は、炎症部位に到着すると、炎症性産物 (inflammatory product) を放出して他の造血由来細胞を該部位に集合する (recruit) ことにより、さらに炎症を誘導する。あるケースでは、特異的に集合した造血由来細胞によって媒介される炎症反応は、感染物質を取り除くことによって宿主を疾病又は死から守る。他のケース (すなわち自己免疫、虚血/再灌流、移植、アレルギー) では、炎症反応は組織にさらにダメージを与え、病気をもたらす。このように、炎症又は細胞の集合化を変化させる作用物質は、病状を制御するのに有用である可能性がある。

【0005】

CD38の発現は、はじめはB細胞系列の細胞に限られると考えられていたが、後に多くのグループが行った実験により、CD38が造血由来細胞及び非造血由来細胞の両方において広く発現されることが分かった。また、CD38の相同体も、哺乳動物のストローマ細胞 (Bst-1) において及び無脊椎動物ジャンボアメフラシ (Aplysia californica) から単離した細胞において発現されることが分かった (ADP-リボシルシクラーゼ酵素) (Prasad GS, 1996, nature Structural Biol 3:957-964)。

【0006】

さらに最近になって、CD38がNAD⁺グリコヒドロラーゼ (glycohydrolase) 活性及びADP-リボシルシクラーゼ活性 (これらの活性によってCD38はその基質であるNAD⁺及びNADPからニコチンアミド、ADP-リボース (ADPR)、サイクリックADPR (cADPR) 及びニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸塩 (NAADP) を生成することができる) を有する多機能性細胞外酵素であることが分かった (Howardら, 1993 Science 252:1056-1059; Leeら, 1999 Biol. Chem. 380:785-793)。CD38により生成される代謝産物のうちcADPR及びNAADPの2つは、植物、無脊椎動物及び哺乳動物の組織から単離した細胞において細胞内カルシウムの放出を誘導することが判明した。このことは、これらの代謝産物がカルシウム応答の包括的な調節因子 (modulator) である可能性があるを示唆している (Leeら, 1999 Biol. Chem. 380:785-793)。

【0007】

cADPR及びNAADPはいずれも、IP³受容体により制御されるものとは異なるカルシウム貯蔵からのカルシウム放出を誘導することが知られている (Clapper, DLら, 1987, J. Biological Chem. 262:9561-9568)。その代わりに、リアノジン受容体のアゴニストはcADPRにより媒介されるカルシウム放出の感度を高め (sensitize)、リアノジン受容体のアンタゴニストはcADPR依存性カルシウム放出を遮断するので、cADPRはリアノジン受容体により調節される貯蔵からのカルシウム放出を調節すると考えられている (Galione Aら, 1991, Science 253:143-146)。このように、cADPRは、リアノジン受容体が発現される筋肉や膵臓等の組織においてカルシウム応答を調節するようである、と提唱されてきた。興味深いことに、寄生性扁虫であるマンソン住血吸虫

10

20

30

40

50

の筋繊維がリアノジン受容体を発現すること、及びカフェイン等のリアノジン受容体のアゴニストが、寄生虫において細胞内カルシウム放出及び筋収縮を誘導し得ることが最近になって分かった (Dayら, 2000 Parasitol 120: 417-422; Silvaら, 1998, Biochem. Pharmacol 56: 997-1003)。哺乳動物の平滑筋細胞において、アセチルコリンに応答したカルシウム放出は、リアノジン受容体のアンタゴニストによってのみならず、8-NH²-cADPRや8-Br-cADPR等のcADPRの特異的アンタゴニストによっても遮断され得る (Guse, AH, 1999, Cell. Signal. 11: 309-316)。

【0008】

これら及び他の知見は、cADPRを含むリアノジン受容体のアゴニスト/アンタゴニストが、蠕虫から哺乳動物に至るまで様々な種から単離した細胞においてカルシウム応答を調節することができることを示すが、CD38やSM38等のADP-リボシルシクラーゼ酵素が、in vivoでのcADPRの産生に必要であるか否かははっきりしていない。さらに、CD38の酵素活性を、カルシウム放出、増殖、アポトーシス、遊走、又は他のエフェクター機能等の下流の反応に結びつける直接的な証拠はなかった。したがって、多くの細胞型でCD38が高レベルで発現されるにもかかわらず、免疫反応におけるCD38酵素活性についての明確な役割は、明確に確立されていなかった。

10

【0009】

3. 発明の概要

本発明は、CD38酵素活性のアゴニスト又はアンタゴニストの投与を含む、CD38を発現する細胞の遊走活性を調節する方法、ならびに小分子、巨大分子及び抗体が関与するcADPR媒介性シグナル伝達経路に関する。また本発明は、CD38遺伝子発現を調節するために使用することができる化合物及びヌクレオチド配列も提供する。

20

【0010】

本発明はさらに、寄生性扁虫マンソン住血吸虫に由来するCD38相同体(本明細書中においてSM38と呼ばれる)の単離及び特徴付けに関する。このような相同体を同定することにより、病原性微生物(蠕虫等)における関連酵素をスクリーニングするよう設計された組成物及びアッセイ、ならびにSM38の活性を調節する化合物をスクリーニングするための組成物及びアッセイが提供される。このような化合物は、このような病原性微生物による感染により生じる病原性障害を治療するために使用することができる。

30

【0011】

本発明は、CD38及び/又はSM38(CD38/SM38)の酵素活性を調節する化合物、すなわちCD38酵素活性のアゴニスト及びアンタゴニストとして機能する化合物をスクリーニングするように設計されたアッセイに関する。さらに、本発明のスクリーニングは、cADPRが関与するシグナル伝達経路のアンタゴニスト又はアゴニストへと変換されるCD38/SM38の基質を同定するために使用してもよい。また本発明のスクリーニングは、cADPRが関与するシグナル伝達経路のアゴニスト又はアンタゴニストを直接同定するために使用してもよい。

【0012】

また本発明は、CD38/SM38遺伝子発現を調節する化合物をスクリーニングするよう設計されたアッセイにも関する。例えば、細胞系のアッセイを用いて、CD38/SM38転写を調節する化合物(例えばCD38/SM38遺伝子発現に関与する転写因子の発現、産生又は活性を調節する化合物等)、CD38/SM38 mRNAの翻訳を調節するアンチセンス及びリボザイムポリヌクレオチド、ならびにCD38/SM38調節領域と共に三重らせん構造を形成してCD38/SM38遺伝子の転写を阻害するポリヌクレオチド等をスクリーニングすることができる。

40

【0013】

同定された化合物は、造血由来細胞等のCD38発現細胞の遊走活性が発病の一因となる障害の治療において使用してもよい。このような障害としては、例えばCD38アンタゴニストを用いて遊走活性を阻害することが望ましい、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、

50

糖尿病、関節炎、アレルギー、又は移植拒絶反応が挙げられるがこれらに限定されない。対照的に、病原性微生物に感染した被験者又は免疫抑制された被験者においては、例えばCD38のアゴニストを用いて造血由来細胞の遊走活性を誘導することが望ましい場合がある。さらに、同定された化合物は、SM38又は構造的に関連する相同タンパク質を発現する病原性微生物による感染により生じる病原性障害を治療するために使用してもよい。

【0014】

4. 図面の簡単な説明

図面の簡単な説明については後述する。

【0015】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、CD38 ADP-リボシルシクラーゼ活性の調節を含む、細胞の遊走活性を調節する方法に関する。本発明は、CD38 KOマウス由来の好中球や好酸球等の顆粒球が、体内の炎症及び感染部位に効率的に集合することができないという発見に基づく。本発明は、CD38 ADP-リボシルシクラーゼ活性は好中球等の顆粒球の初期活性化 (*initial activation*) にとって必須ではないが、*in vivo* 及び *in vitro* の両方において好中球の走化性を調節するのに非常に重要であるという発見に基づく。特に、CD38 ADP-リボシルシクラーゼ活性の産物である cADPR は、好中球の中に存在するカルシウム貯蔵からのカルシウム放出を誘導するのに必要である。この特殊な貯蔵 (*specialized store*) からのカルシウムの放出は、血漿膜チャンネルを活性化させ及び開かせてカルシウムの容量性流入をもたらすのに必要であり、この流入は、化学誘引物質及び/又は炎症性産物への好中球の直接的な移動を媒介する。

【0016】

本発明は、CD38 酵素活性のアゴニストやアンタゴニスト等の調節因子ならびに/又は cADPR 依存性カルシウム応答及び走化性の調節因子を同定するために設計されたスクリーニングアッセイを包含する。本発明はさらに、CD38 により制御された、化学誘引物質及び炎症性産物への細胞の遊走活性に基づいた、障害の治療におけるこのような調節因子の使用に関する。このような障害としては、炎症、虚血、自己免疫疾患、喘息、糖尿病、関節炎、アレルギー、感染症、及び臓器移植拒絶反応が挙げられるが、これらに限定されない。

【0017】

また本発明は、寄生虫マンソン住血吸虫に由来するCD38 相同体であるSM38の同定、単離及び特徴付けにも関する。本発明は、蠕虫等の他の病原性微生物における関連酵素を同定するためのスクリーニングアッセイ、ならびにSM38の活性及び発現を調節する化合物をスクリーニングするための組成物及びアッセイを包含する。本発明はさらに、SM38又はこれに構造的に関係のある分子を発現する生物に感染した動物及びヒトにおける病原性障害を治療するためのこのような調節因子の使用に関する。

【0018】

以下のサブセクションにおいて、本発明の様々な態様についてさらに詳細に記載する。

【0019】

5.1. SM38 遺伝子

マンソン住血吸虫SM38のcDNA配列及び推定アミノ酸配列を図14に示す(ATCC寄託番号:)。SM38 cDNAの全てのリーディングフレームが翻訳され、303個のアミノ酸からなるオープンリーディングフレームが同定された。開始コドンは71位ヌクレオチドに位置し、停止コドンは981位ヌクレオチドに見られる。

【0020】

本発明のSM38ヌクレオチド配列には、(a)図14に記載されたDNA配列、(b)図14に記載されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、(c)(i)ストリンジェントな条件[例えばフィルタに結合したDNAに0.5M NaHPO₄, 7%ドデ

10

20

30

40

50

シル硫酸ナトリウム (SDS), 1 mM EDTA 中で 65 にてハイブリダイズさせ、
0.1 x SSC / 0.1 % SDS 中で 68 にて洗浄する (Ausubel F. M. ら
編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates,
Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York, at p. 2.10.3)] 下において (a) 又は (b) に記載されたヌクレオチド配列
にハイブリダイズし且つ (ii) 機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列、
ならびに (d) よりストリンジェンシーの低い条件 [例えば 0.2 x SSC / 0.1
% SDS 中で 42 にて洗浄する (Ausubel ら, 1989 (前掲)) 等の中程度の
ストリンジェント条件] 下で図 14 に記載されたアミノ酸配列をコードする DNA 配列
にハイブリダイズし且つ機能的に同等な SM38 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列
が含まれる。SM38 タンパク質の機能的同等物としては、マンソン住血吸虫以外の種
に存在する天然の SM38 が挙げられる。また本発明は、配列 (a) ~ (d) の縮重変異
体も含む。また本発明は、例えば (SM38 遺伝子の核酸配列の増幅反応のため及び / 又
は該増幅反応のアンチセンスプライマーとして) SM38 遺伝子調節において有用な、
SM38 アンチセンス分子をコードし得るもしくは該分子として機能し得る核酸分子も含む
。

10

【0021】

上記 SM38 ヌクレオチド配列以外にも、過度の実験を行うことなく、当分野において周
知である分子生物学的技法により、他の種の中に存在する SM38 遺伝子の相同体を同定
して簡単に単離することができる。例えば、cDNA ライブラリー、又は目的の生物から
得たゲノム DNA ライブラリーを、本明細書中においてハイブリダイゼーションプローブ
又は増幅プローブとして記載されるヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションにより
、スクリーニングすることができる。

20

【0022】

また本発明は、突然変異型 SM38、SM38 のペプチドフラグメント、トランケート型
SM38、及び SM38 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列も包含する。これ
らのヌクレオチド配列としては、SM38 のシクラーゼドメインもしくはこのドメインの
一部に対応するポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列、該ドメインが
欠失したトランケート型 SM38 (例えばシクラーゼ領域の全てもしくは一部が欠けてい
る機能的 SM38 等) をコードするヌクレオチド配列が挙げられるがこれらに限定されな
い。これらのトランケート型もしくは突然変異型 SM38 タンパク質のうちあるものは、
天然 SM38 タンパク質のドミナントネガティブ阻害物質として機能し得る。融合タンパ
ク質をコードするヌクレオチドとしては、完全長 SM38、トランケート型 SM38、又
は SM38 のペプチドフラグメントが、マーカーとして使用することができる酵素、蛍光
タンパク質又は発光タンパク質等の無関係のタンパク質もしくはペプチドに融合されたも
のが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0023】

SM38 ヌクレオチド配列は、当業者に公知である種々の方法を用いて単離することがで
きる。例えば、SM38 を発現することが分かっている細胞又は組織に由来する RNA を
用いて構築された cDNA ライブラリーを、標識した SM38 プローブを用いてスクリー
ニングすることができる。あるいは、ゲノムライブラリーをスクリーニングして、SM3
8 タンパク質をコードする核酸分子を得ても良い。さらに、本明細書中に開示される SM
38 ヌクレオチド配列に基づいて設計された 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを用い
て PCR を行うことにより、SM38 核酸配列を得ることができる。この反応に使う鋳型
は、SM38 を発現することが分かっている細胞系又は組織から調製した mRNA の逆転
写によって得た cDNA であってもよい。

40

【0024】

また本発明は、(a) 前記 SM38 配列及び / 又はその相補体 (即ちアンチセンス) のい
ずれかを含む DNA ベクター、(b) SM38 コード配列の発現を指令する調節エレメン

50

トに機能的に連結された前記SM38配列のいずれかを含むDNA発現ベクター、(c) 宿主細胞の中でSM38コード配列の発現を指令する調節エレメントに機能的に連結された前記SM38配列のいずれかを含む遺伝子操作された宿主細胞、ならびに(d) 前記SM38配列のいずれかを含むトランスジェニックマウスもしくは他の生物も包含する。本明細書中で使用される調節エレメントとしては、誘導可能及び誘導不可能なプロモーター、エンハンサー、オペレーター、ならびに当業者に公知である発現を駆動及び調節する他のエレメントが挙げられるがこれらに限定されない。

【0025】

5.1.2. SM38タンパク質及びポリペプチド

SM38タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドフラグメント、SM38の突然変異形、トランケート形もしくは欠失形、ならびに/又はSM38融合タンパク質は、種々の用途(抗体の作製、SM38活性の調節に関与する他の細胞性遺伝子産物(cel l u l a r g e n e p r o d u c t)の同定、及びSM38の活性を調節するために用いることができる化合物のスクリーニング等を含むがこれらに限定されない)のために調製することができる。

【0026】

図14は、SM38タンパク質の推定アミノ酸配列を表す。本発明のSM38アミノ酸配列は、図14に示すアミノ酸配列を含む。さらに、他の種のSM38も本発明により包含される。実際に、上記SM38ヌクレオチド配列によってコードされるあらゆるSM38タンパク質は、本発明の範囲内に含まれる。

【0027】

また本発明は、幾つかの判断基準(カルシウムを動員する第二メッセンジャー(c a l c i u m m o b i l i z i n g s e c o n d m e s s e n g e r)であるcADPRの産生を触媒することによりカルシウム応答を調節する能力を含むがこれらに限定されない)のいずれかによって判断した際に5.1節に記載されるヌクレオチド配列によってコードされるSM38と機能的に同等であるようなタンパク質も包含する。このような機能的に同等なSM38タンパク質としては、上記5.1節に記載したSM38ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の中にアミノ酸残基の付加又は置換を有するタンパク質であってこのような付加又は置換がサイレント変化をもたらす従って機能的に同等な遺伝子産物を産生するようなものであるタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

また、SM38の1つ以上のドメインに対応するペプチド、及び完全長SM38、SM38ペプチド、又はトランケート型SM38が無関係のタンパク質に融合されたものである融合タンパク質も本発明の範囲内に含まれ、これらは本明細書中に開示されるSM38ヌクレオチド及びSM38アミノ酸配列を元に設計することができる。このような融合タンパク質は、マーカー機能を果たす酵素、蛍光タンパク質又は発光タンパク質との融合体を含む。

【0029】

SM38ポリペプチド及びペプチドは化学的に合成することができるが(例えばCreighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y.を参照されたい)、SM38遺伝子配列及び/又はコード配列を含む核酸を発現するための当分野で周知である技法を用いて、組換えDNA技法によって、SM38に由来する大きなポリペプチド及び完全長SM38そのものを作製することも有益である。このような方法を用いて、第5.1節に記載されているSM38ヌクレオチド配列と、適当な転写制御シグナルと、適当な翻訳制御シグナルとを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、例えばin vitro組換えDNA技法、合成技法、及びin vivo遺伝子組換え法を含む(例えばSambrookら, 1989(前掲)及びAusubelら, 1989(前掲)に記載されている技法を参照されたい)。

【0030】

本発明のSM38ヌクレオチド配列を発現させるために、様々な宿主発現ベクター系を用いてもよい。SM38ペプチドもしくはポリペプチドが可溶性誘導体として発現され、分泌されない場合、該ペプチドもしくはポリペプチドは宿主細胞から回収することができる。あるいは、SM38ペプチドもしくはポリペプチドが分泌される場合、該ペプチドもしくはポリペプチドは、培養基から回収することができる。このような発現系からのSM38の精製もしくは濃縮は、当業者に周知である適当な洗浄剤、脂質ミセル、及び方法を用いて行うことができる。このような遺伝子操作された宿主細胞自体は、SM38の構造的特徴及び機能的特徴を保つことだけでなく生物学的活性を評価することも重要である場合に（即ち薬物スクリーニングアッセイにおいて）使用することができる。

10

【0031】

本発明の目的のために用いることができる発現系としては、SM38ヌクレオチド配列を含む組換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌等の微生物、SM38ヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母、又は哺乳動物細胞のゲノムもしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

SM38タンパク質の正しい修飾、プロセッシング及び細胞内の局在(sub-cellular localization)が起こるように、適当な発現系を選択することができる。このためには、SM38タンパク質を厳密に修飾及びプロセッシングする能力を持つ宿主細胞が好ましい。組換えSM38タンパク質の長期的な収率の高い産生（例えばスクリーニング目的の細胞系の開発に望ましいもの）を行うためには、安定な発現が好ましい。複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメントにより制御されるDNA及び選択マーカー遺伝子（即ち幾つか例を挙げるとtk、hgprt、dhfr、neo及びhygro遺伝子等）を用いて、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作された細胞を濃縮培地の中で1~2日間培養した後、選択培地に切りかえてもよい。このように遺伝子操作された細胞系は、SM38遺伝子産物の内因活性(endogenous activity)を調節する化合物のスクリーニング及び評価において特に有用である。

20

30

【0033】

5.1.3. トランスジェニック動物

SM38遺伝子産物は、トランスジェニック動物の体内で発現させることもできる。任意の種の動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、マイクロブタ(micro-pig)、ヤギ及び非ヒト霊長類（例えばヒヒ、サル及びチンパンジー等）を含むがこれらに限定されない）を用いて、SM38トランスジェニック動物を作製することができる。

【0034】

当分野で公知である任意の方法を用いて、SM38導入遺伝子を動物の体内に導入して、トランスジェニック動物の創始者系列(founder line)を作製することができる。このような技法としては、前核微量注入法(pronuclear microinjection) (Hoppe, P. C. 及びWagner, T. E., 1989, 米国特許第4,873,191号)、レトロウイルスを媒体とした生殖細胞系への遺伝子導入法(Vander Puttenら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152)、胚幹細胞における遺伝子ターゲティング(Thompsonら, 1989, Cell, 56:313-321)、胚のエレクトロポレーション(Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:1803:1814)、及び精子を媒体とした遺伝子導入法(Lavitranoら, 1989, Cell 57:717:723)等が挙げられるが、これらに限定されない。このような技法の概説については、Gordon, 1989, Transgeni

40

50

c Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (本明細書中に参考として全て組み込まれる)を参照されたい。

【0035】

本発明は、全ての細胞の中にSM38導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物、ならびに全ての細胞ではなく一部の細胞の中に該導入遺伝子を保有する動物(すなわちモザイク動物)を提供する。また、導入遺伝子は、例えばLasakoらの教示(Lasako, M.ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236)に従って、特定の細胞型の中に選択的に導入して活性化することもできる。このような細胞型特異的活性化に必要な調節配列は、具体的な目的の細胞型によって異なり、当業者には自明である。SM38導入遺伝子を内因性SM38遺伝子の染色体部位の中に組み込みたい場合は、遺伝子ターゲティングが好ましい。要約すると、このような技法を用いる場合、内因性SM38遺伝子に相同な幾つかのヌクレオチド配列を含むベクターは、染色体配列との相長的組換えによって内因性SM38遺伝子のヌクレオチド配列の中に組み込んでその機能を妨害する目的で設計される。

10

【0036】

トランスジェニック動物を作製したら、標準的な技法を用いて組換えSM38遺伝子の発現を評価することができる。一回目のスクリーニングは、動物組織を分析して導入遺伝子の組み込みが起こったか否かを評価するために、サザンブロット分析又はPCR技法によって行うことができる。トランスジェニック動物の組織中における導入遺伝子のmRNA発現のレベルも、その動物から得た組織サンプルのノーザンブロット分析、in situ

20

【0037】

5.4. SM38タンパク質に対する抗体

SM38の1つ以上のエピトープ、SM38の保存型変異体(conserved variant)のエピトープ、又はSM38のペプチドフラグメントを特異的に認識する抗体も、本発明により包含される。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、ヒト化もしくはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成されるフラグメント、抗-イデオタイプ(抗-Id)抗体、及び上記抗体のいずれかのエピトープ結合性フラグメントが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0038】

本発明の抗体を、以下に記載するように例えば化合物スクリーニング法と一緒に用いて、SM38遺伝子産物の発現及び/又は活性に対してテスト化合物が及ぼす影響を評価することができる。

【0039】

抗体を作製するために、SM38タンパク質又はSM38ペプチドを注射して種々の宿主動物を免疫することができる。このような宿主動物には、幾つか例を挙げると、ウサギ、マウス及びラットが含まれるが、これらに限定されない。宿主の種に応じて、種々のアジュバント(フロイントの完全アジュバント及び不完全アジュバント、水酸化アルミニウム等の無機ゲル(mineral gel)、リゾレシチン等の界面活性剤、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤(oil emulsion)、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(カルメット-گران杆菌)やコリネバクテリウム-パルヴム(Corynebacterium parvum)等のヒトに利用できる可能性のあるアジュバントを含むがこれらに限定されない)を用いて免疫反応を強化することができる。

40

【0040】

不均質な抗体分子の集団を含むポリクローナル抗体は、免疫化した動物の血清から得るこ

50

とができる。モノクローナル抗体は、培養中の連続的な細胞系 (continuous cell lines in culture) により抗体分子を作製する任意の技法によって得ることができる。これらの技法としては、Kohler及びMilsteinのハイブリドーマ技法 (1975, Nature 256: 495 - 497 及び米国特許第4, 376, 110号)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kosborら, 1983, Immunology Today 4: 72; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026 - 2030)、及びEBV-ハイブリドーマ技法 (Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96) が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びこれらのサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであってもよい。この発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroで培養してもin vivoで培養してもよい。in vivoでMabが高力価で産生されるので、この方法は、現在のところ好適な産生方法である。

10

20

30

40

50

【0041】

さらに、適当な抗原特異性を有するマウス抗体分子から得た遺伝子を適当な生物学的活性を有するヒト抗体分子から得た遺伝子と一緒にスプライシングすることにより「キメラ抗体」を作製するために開発された技法を用いることができる (Morrissonら, 1984, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 81: 6851: - 6855; Neubergerら, 1984, Nature, 312: 604 - 608; Takedaら, 1985, Nature 314: 452 - 454)。あるいは、ヒト化抗体 (米国特許第5, 585, 089号) 又は一本鎖抗体 (米国特許第4, 946, 778、Bird, 1988, Science 242: 423 - 426; Hustonら, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85: 5879 - 5883; 及びWardら, 1989, Nature 334: 544 - 546) を作製するために開発された技法を用いて、SM38の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗体を作製することができる。

【0042】

5.2. CD38 / SM38の活性を調節するのに有用な化合物のスクリーニングアッセイ

本発明は、MC38 / SM38 酵素活性、cADPRを媒介としたシグナル伝達、もしくはCD38 / SM38 遺伝子発現を調節し従って細胞遊走の調節又は感染症の治療に有用である化合物又は組成物を同定するために設計されたスクリーニングアッセイシステムに関する。

【0043】

5.2.1. CD38の組換え発現

CD38 / SM38 活性を調節する化合物又は組成物を同定するために設計されたスクリーニングアッセイを開発するためには、CD38 / SM38 タンパク質を組換えにより発現させることが必要である。Jackson, D.G.ら, 1990, J. Immunol. 151: 3111 - 3118; Koguma, T.ら, 1994, Biochim Biophys Acta 1224: 160 - 162 及びHarada Nら, 1993, J. Immunol 151: 3111 - 3118 (本明細書中に参考として組み込まれる) に記載されているように、ヒト、マウス及びラットを含む幾つかの種から、CD38のcDNA配列及び推定アミノ酸配列が特徴付けられている。さらに、本明細書中に記載されるマンソン住血吸虫のcDNA配列及び推定アミノ酸配列を用いて、CD38 相同体タンパク質であるSM38 タンパク質を組換え発現することができる。

【0044】

CD38 / SM38ヌクレオチド配列は、当業者に公知である様々な方法を用いて単離することができる。例えば、標識したCD38 / SM38 プローブを用いて、CD38 / SM38を発現することが知られている組織から得たRNAを用いて構築したcDNAライ

ブラリーをスクリーニングすることができる。あるいは、ゲノムライブラリーをスクリーニングして、CD38/S M38タンパク質をコードする核酸分子を得ても良い。さらに、既知のCD38/S M38ヌクレオチド配列に基づいて設計された2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより、CD38/S M38核酸配列を得てもよい。この反応に使われる鋳型は、CD38/S M38を発現することが知られている細胞系又は組織から調製したmRNAの逆転写によって得たcDNAであってもよい。

【0045】

CD38/S M38タンパク質、ポリペプチド及びペプチドフラグメント、CD38/S M38の突然変異形態、トランケート形態、もしくは欠失形態、ならびに/又はCD38/S M38融合タンパク質は、抗体の作製、CD38/S M38を媒介とした細胞遊走の調節に關与する他の細胞性遺伝子産物の同定、及び細胞遊走を調節するために用いることができる化合物のスクリーニングを含む(ただしこれらに限定されない)様々な用途のために調製することができる。CD38/S M38融合タンパク質は、マーカー機能を果たす酵素、蛍光タンパク質、ポリペプチドタグ、又は発光タンパク質との融合体を含む。

10

【0046】

CD38/S M38ポリペプチド及びペプチドは化学的に合成することができるが(例えばCreighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y. を参照されたい)、CD38/S M38から得た大きなポリペプチド及び完全長CD38/S M38そのものは、CD38/S M38遺伝子配列及び/又はコード配列を含む核酸を発現させるために当分野において周知である技法を用いて組換えDNA技術により産生するのが有利である。このような方法を用いて、CD38/S M38ヌクレオチド配列、適当な転写制御シグナル、及び適当な翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば*in vitro*組換えDNA技法、合成技法、及び*in vivo*遺伝子組換え法が挙げられる(例えばSambrookら, 1989(前掲)及びAusubelら, 1989(前掲)に記載された技法を参照されたい)。

20

【0047】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、CD38/S M38ヌクレオチド配列を発現することができる。CD38/S M38ペプチド又はポリペプチドが可溶性タンパク質又は誘導体(例えば細胞内もしくは細胞外ドメインに対応するペプチド)として発現されて分泌されない場合、該ペプチド又はポリペプチドは、宿主細胞から回収することができる。あるいは、CD38ペプチド又はポリペプチドが分泌される場合、該ペプチド又はポリペプチドは、培養基から回収することができる。しかし、発現系は、細胞膜に固定されたCD38/S M38又は機能的同等物を発現する遺伝子操作された宿主細胞も含む。このような発現系からのCD38/S M38の精製又は濃縮は、当業者に周知である適当な洗浄剤、脂質ミセル及び方法を用いて行うことができる。このような遺伝子操作された宿主細胞自体は、CD38/S M38の構造的特徴及び機能的特徴を保つことだけでなく生物学的活性を評価することも重要である場合に(即ち薬物スクリーニングアッセイにおいて)用

30

40

【0048】

本発明の目的のために使用することができる発現系としては、CD38/S M38ヌクレオチド配列を含む組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌等の微生物、CD38/S M38ヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母、あるいは、哺乳動物、蠕虫、もしくは昆虫細胞のゲノムから又は哺乳動物もしくは昆虫ウイルスから得たプロモーターを含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物、蠕虫、又は昆虫細胞系が挙げられるがこれらに限定されない。

【0049】

50

CD38 / SM38 タンパク質の正しい修飾、プロセッシング及び細胞内の局在が起こるように、適切な発現系を選択することができる。このために、CD38 / SM38 タンパク質を適切に修飾及びプロセッシングする能力を有する真核宿主細胞が好ましい。組換えCD38 / SM38 タンパク質の長期的な収率の高い産生（例えばスクリーニング目的の細胞系の開発に望ましいもの）を行うためには、安定な発現が好ましい。複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメントにより制御されるDNA及び選択マーカー遺伝子（即ち幾つか例を挙げるとtk、hgprt、dhfr、neo及びhygro遺伝子等）を用いて、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作された細胞を濃縮培地の中で1～2日間増殖させた後、選択培地に切りかえることができる。このように遺伝子操作された細胞系は、CD38 / SM38 遺伝子産物の内因活性を調節する化合物のスクリーニング及び評価において特に有用である。

【0050】

5.2.2. 非細胞系アッセイ

本発明に従って、非細胞系のアッセイシステムを用いて、CD38と相互作用し（即ちCD38に結合し）てCD38の酵素活性を調節する化合物を同定することができる。このような化合物は、CD38酵素活性のアンタゴニスト又はアゴニストとして機能することができ、細胞遊走（造血由来細胞を含むがこれに限定されない）を調節するために用いることができる。さらに、このような化合物を用いて、SM38又は構造的に関係のある相同志体を発現する病原性微生物の成長、筋収縮性、分化、成熟及び繁殖を調節することができる。組換えCD38 / SM38（異なる機能的ドメインに対応するペプチド又はCD38 / SM38融合タンパク質を含む）を発現させて、CD38 / SM38と相互作用する化合物を同定するためのアッセイにおいて使用することができる。

【0051】

このためには、可溶性CD38 / SM38を組換え発現させ、CD38 / SM38に結合する化合物を同定するための非細胞系のアッセイで用いることができる。組換え発現させたCD38 / SM38ポリペプチド又はCD38 / SM38の機能的ドメインのうちの1つ以上を含む融合ペプチドを上記のように調製し、非細胞系のスクリーニングアッセイで用いることができる。例えば、完全長CD38 / SM38、可溶性のトランケート型CD38 / SM38（例えば該分子から細胞質ドメイン及び膜貫通ドメインのうちの1つ以上が欠失したもの）、細胞外ドメインに対応するペプチド、又はこのアッセイシステムにおいて利益（例えば標識、得られる複合体の単離等）をもたらすタンパク質もしくはポリペプチドに融合されたCD38 / SM38の細胞外ドメインを含む融合タンパク質を用いることができる。細胞質ドメインと相互作用する化合物を同定したい場合、CD38の細胞質ドメインに対応するペプチド及びCD38細胞質ドメインを含む融合タンパク質を用いることができる。

【0052】

またCD38 / SM38タンパク質は、細胞膜からもしくは細胞の細胞質ゾルから完全に又は部分的に単離されたものであっても、粗抽出物又は半精製抽出物の一部として存在するものであってもよい。非限定的な例として、CD38タンパク質は細胞膜の調製物の中に存在しても良く、SM38タンパク質は細胞の細胞質ゾルの調製物の中に存在してもよい。本発明の特定の実施形態において、このような細胞膜は、当業者に公知である方法を用いて調製することができる。

【0053】

CD38 / SM38に結合する化合物を同定するために用いられるアッセイの原理は、CD38 / SM38とテスト化合物との反応混合物を、これら2つの成分が相互作用及び結合して複合体（これは反応混合物からの除去及び/又は反応混合物中での検出が可能である）を形成することができる程度に十分な条件及び時間で調製する、というものである。次に、結合したテスト化合物の正体を決定する。

【0054】

10

20

30

40

50

このスクリーニングアッセイは、一般に知られている様々な方法のいずれかによって行われる。例えば、このようなアッセイを行う1つの方法は、CD38 / SM38タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質又はテスト物質を固相に結合させ、反応終了時にこの固相に結合したCD38 / テスト化合物複合体又はSM38 / テスト化合物複合体を検出するものである。このような方法の1つの実施形態において、CD38 / SM38反応体 (reactant) を固相表面に結合させ、結合させていないテスト化合物を直接もしくは間接的に標識してもよい。

【0055】

実際には、マイクロタイタープレートを固相として用いるのが便利である。固定化成分は、非共有結合又は共有結合により固定される。該固相表面は、前もって作製して、保存しておくことができる。このアッセイを実施するために、固定化成分を含むコーティング表面に非固定化成分を加える。反応完了後、形成された複合体がその固相表面上に固定されたままとなるような条件下で、(例えば洗浄により)未反応成分を除去する。固相表面に固定された複合体の検出は、様々な方法で行うことができる。予め固定化されていない成分を前もって標識する場合、表面上に固定化された標識が検出されれば、複合体が形成されたことを示す。予め固定化されていない成分を前もって標識しない場合、固相表面上に固定された複合体を検出するために、間接的な標識を用いる(例えばこの予め固定化されていない成分に特異的な標識した抗体を用いる等)ことができる。

10

【0056】

あるいは、液相において反応を行い、CD38 / SM38タンパク質、融合タンパク質又はテスト化合物に特異的な固定化された抗体を用いて未反応成分から反応精製物を分離し、そして形成されたであろうと推定される複合体の他の成分に特異的な標識した抗体を用いて、固定化された複合体を検出することにより、複合体を検出する。

20

【0057】

本発明に従って、非細胞系のアッセイは、CD38 / SM38に関係する酵素活性を直接阻害又は活性化する化合物をスクリーニングするために用いることもできる。このような活性としては、ADP-リボシルシクラーゼ活性、グリコシル転移活性、及びNAD+グリコヒドロラーゼ活性が挙げられるがこれらに限定されない。このために、CD38 / SM38とテスト化合物との反応混合物を基質の存在下にて調製し、CD38 / SM38の酵素活性を、テスト化合物の不在下で観察される活性と比較する。CD38 / SM38酵素活性を検出するアッセイで用いられる基質としては、NAD+、NADP、及びそれらを標識したものが挙げられるがこれらに限定されない。さらに、ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド(NGD)及びニコチンアミド1、N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド(1, N⁶-エテノ-NAD)等のNADの誘導体を用いてもよい。

30

【0058】

本発明の非限定的な実施例において、CD38 / SM38とテスト化合物と基質との反応混合物を調製し、CD38 / SM38の活性を、テスト化合物の不在下で観察される活性と比較する。この際、テスト化合物の存在下でのCD38 / SM38酵素活性のレベルが低ければ、CD38 / SM38アンタゴニストが同定されたことを示す。あるいは、CD38 / SM38とテスト化合物と基質との反応混合物を調製し、CD38 / SM38の活性を、テスト化合物の不在下で観察される活性と比較する。この際テスト化合物の存在下でのCD38 / SM38酵素活性のレベルが高ければ、CD38 / SM38アゴニストが同定されたことを示す。

40

【0059】

CD38 / SM38の酵素活性は様々な方法で検出することができる。例えば、放射能標識したNAD、NADP又はNA等の基質の使用と組み合わせ、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)又は薄層クロマトグラフィー(TLC)(Aarhus Rら, 1995, J. Biochem. Chem. 270:30327-30333; Muller-Steffner HM, J. Biol. Chem. 271:23967-23972; 及びLund FEら, 1999, J. Immunology 162:

50

2693-2702; Higashida, H.ら, 1997, J. Biol. Chem. 272:3127-3177)を用いて、サイクリックアデノシンリン酸リボース(cADPR)、アデノシンリン酸リボース(ADPR)、及び/又はニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸(NAADP)のレベルを測定することができる。さらに、ラジオイムノアッセイ(Takahashi Kら, 1995, FEBS Lett 371:204-208; Vu CQら, 1997, Biochem Biophys Res Commun 236:723-726; Vuら, Adv Exp Med Biol 419:381-388;及びGraeff RMら, 1997, Methods Enzymol 280:230-241)、バイオアッセイ(Aarhus Rら, 1995, J. Biol Chem. 270:30327-30333; Clapper DLら, J. Biol. Chem. 262:9561:-9568;及びLeeら, J. Biol. Chem. 264:1608-1615)、及び/又は蛍光アッセイ(Graeff RMら, 1996, Biochem. 35:379-:386; Graeffら, 1994, J. Biol. Chem. 269:30260-30267;及びGadangi Pら, 1996, J. Immunol. 156:1937-1941)を用いて、cADPR、ADPR又はNAADPレベルを測定してもよい。本発明のさらに他の実施形態において、NGD(ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド)やニコチンアミド¹, N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド(1, N⁶エテノ-NAD)等のNADの誘導体を用いて、CD38/SM38酵素活性を測定することができる。1, N⁶エテノ-NADがCD38により加水分解される場合、得られる生成物のうちの1つは蛍光を発する(Mullerら, 1983, Biochem. J. 212:459-464;及びCockayne Dら, 1998, Blood 92:1324-1333)。類似体NGDがCD38/SM38のADP-リボシル活性を介して環化される場合、生成物は蛍光化合物を形成し、この蛍光化合物は蛍光計によって検出することができる(Graeffら, 1996, Biochem 35:379-386;及びGraeffら, 1994, J. Biol. Chem. 269:30260-30267)。

【0060】

本発明の他の実施形態において、コンピュータモデリング及び検索技術により、CD38/SM38酵素活性の潜在的な調節因子を同定することが可能である。例えば、アメフラシシクラーゼ活性部位(Munshi C.ら, 1999, J. Biol. Chem. 274:30770-30777)及びCD38活性部位(Lund FEら, 1999, J. Immunology 162:2693-2702; Munshi, Cら, 2000, J. Biol. Chem. 275:21566-21571; Graeff Rら, 2001, J. Biol. Chem. 276:12169-12173)についての知識及びCD38/SM38基質と基質類似体との複合体の研究に基づいて、CD38/SM38活性の潜在的な調節因子を同定することができる。

【0061】

活性部位の3次元幾何学構造は、完全な分子構造を決定することができるX線結晶学等(例えば、アフラシADPリボシルシクラーゼの結晶構造について記載しているPrasad GSら, Nature Struct. Biol. 3:957-964を参照されたい)の既知の方法を用いて決定することができる。他方、固相又は液相NMRを用いて、一定の分子内距離(intramolecular distance)を決定することができる。他の実験的な構造決定方法を用いて、CD38活性部位の部分的もしくは完全な幾何学構造を得ることができる。

【0062】

CD38/SM38活性部位の構造を決定したら、化合物及びその分子構造についての情報を含むデータベースを検索することにより、候補の調節化合物(modulating compound)を同定することができる。このような検索は、決定した活性部位構造と一致する構造を持つ化合物及びその活性部位を画定する基と相互作用する構造を持つ

化合物を検索する。このような検索はマニュアルによるものであってもよいが、好ましくはコンピュータ支援によるものである。この検索から見つけ出されたこれらの化合物は、潜在的なCD38調節化合物である。

【0063】

あるいは、これらの方法を用いて、既に知られている調節化合物からより優れた調節化合物を同定することができる。例えば、基質としてNAD/NADPを利用する他の酵素の酵素活性を調節する沢山の化合物（即ちPARPファミリー相同体）が既に同定されている。既知の化合物の組成は変更することができ、変更が与える構造的影響は、その新しい組成に適應させた実験及びコンピュータモデリング方法を用いて決定することができる。次に、この変更した構造をその化合物の活性部位構造と比較して、フィット又は相互作用が改善されるか否かを決定する。このようにして、システムティックな組成変更（例えば側基を変更することによるもの等）を素早く評価し、優れた特異性もしくは活性を有する改変された調節化合物もしくは基質を得ることができる。

10

【0064】

5.2.3. 細胞系のアッセイ

本発明に従って、細胞系のアッセイシステムを用いて、CD38/SM38の活性を調節する化合物をスクリーニングすることができる。本発明に従って、細胞系のアッセイシステムを用いて、CD38の活性を調節することにより化学誘引物質誘導型のCa²⁺流入及び細胞の遊走を調節する化合物をスクリーニングすることができる。さらに、この細胞系のシステムを用いて、SM38の活性を調節することにより細胞内カルシウム放出及び/又は細胞内の筋収縮性を調節する化合物をスクリーニングすることができる。このためには、内因的にCD38/SM38を発現する細胞を用いて化合物をスクリーニングすることができる。このような細胞には、例えば好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ及び樹状細胞が含まれる。さらに、SM38を発現するマンソン住血吸虫細胞を用いて化合物をスクリーニングすることができる。あるいは、CD38/SM38を発現するように遺伝子操作された、293細胞、COS細胞、CHO細胞、線維芽細胞等の細胞系を、スクリーニング目的で用いることが可能である。機能的CD38タンパク質を発現するように遺伝子操作された宿主細胞を利用したスクリーニングでは、化学誘引物質又は炎症性刺激（inflammatory stimuli）に反応することができる宿主細胞を使用することが好ましい。SM38を発現するように遺伝子操作された宿主細胞を利用したスクリーニングでは、筋収縮を誘導するアセチルコリンや高濃度のK⁺等の様々な刺激に反応することができるマンソン住血吸虫起源の細胞を使用することが好ましい。さらに、CD38/SM38タンパク質を発現するように遺伝子操作された卵母細胞やリボソームは、CD38/SM38活性の調節因子を同定するために開発されたアッセイにおいて用いることができる。

20

30

【0065】

本発明は、CD38/SM38の酵素活性（NADグリコヒドロラーゼ活性、ADP-リボシルシクラーゼ活性及び/又はグリコシル転移（交換）活性を含むがこれらに限定されない）のうちの1つ以上を変更する化合物を同定する方法を提供する。特に、CD38/SM38酵素活性を促進する化合物（即ちアゴニスト）又はCD38/SM38酵素活性を阻害する化合物（即ちアンタゴニスト）を同定することができる。CD38酵素活性を阻害する化合物は、化学誘引物質誘導型のカルシウム応答及び細胞遊走に対して阻害性である（図2）。CD38酵素活性を活性化する化合物は、化学誘引物質誘導型のカルシウム応答及び細胞遊走を促進する。SM38酵素活性を活性化又は阻害する化合物は、SM38を発現する病原性生物の生存率又は機能的活性を変更する。このような化合物は、CD38/SM38の活性化部位と相互作用することにより酵素活性を調節する化合物、又はCD38/SM38への基質の結合を競合/促進する又は基質の触媒反応を競合/阻害する化合物であってもよい（図2）。あるいは、CD38/SM38タンパク質を修飾する（即ちリン酸化する、リボシル化する等）タンパク質の活性を調節することによりCD38の活性を調節する化合物を同定することができる（図3）。このようなタンパク質と

40

50

しては、例えば、CD38 / SM38をリボシル化してCD38 / SM38を酵素的に不活性とするADP-リボシルトランスフェラーゼが挙げられる。さらに、CD38 / SM38発現を調節することにより細胞内の酵素活性レベルを調節する化合物を同定することができる(図4)。

【0066】

本発明は、(i)基質の存在下でCD38 / SM38及び化学誘引物質受容体を発現する細胞をテスト化合物に接触させてCD38 / SM38活性のレベルを測定する工程、(ii)別の実験で、基質の存在下でCD38 / SM38タンパク質及び化学誘引物質受容体を発現する細胞を対照ビヒクル(vehicle control)に接触させてCD38 / SM38活性のレベルを測定する工程、この際の条件は工程(i)と本質的に同じ条件である、ならびに次に(iii)工程(i)で測定したCD38 / SM38活性レベルを工程(ii)で測定したCD38 / SM38活性レベルと比較する工程を含み、この際テスト化合物の存在下でのCD38 / SM38活性レベルが高ければ、そのテスト化合物がCD38 / SM38活性化物質であることを示すものである、CD38 / SM38酵素活性を活性化する化合物の同定方法を提供する。

10

【0067】

また本発明は、(i)化学誘引物質及び基質の存在下でCD38 / SM38及び化学誘引物質受容体を発現する細胞をテスト化合物に接触させてCD38 / SM38活性のレベルを測定する工程、(ii)別の実験で、CD38 / SM38及び化学誘引物質受容体を発現する細胞を化学誘引物質及び基質に接触させてCD38 / SM38活性のレベルを測定する工程、この際の条件は工程(i)と本質的に同じ条件である、ならびに次に(iii)工程(i)で測定したCD38 / SM38活性レベルを工程(ii)で測定したCD38 / SM38活性レベルと比較する工程を含み、この際テスト化合物の存在下でのCD38 / SM38活性レベルが低ければ、そのテスト化合物がCD38 / SM38阻害物質であることを示すものである、CD38 / SM38酵素活性を阻害する化合物の同定方法も提供する。

20

【0068】

CD38 / SM38活性を検出するために用いられるアッセイに応じて、上記に記載したCD38 / SM38の活性化物質及び阻害物質の同定方法は、工程(i)及び(ii)において化学誘引物質を含んでも含まなくても良い。例えば、CD38 / SM38 ADP-リボシルシクラーゼ活性を直接分析する場合又はCD38 / SM38代謝産物の生成を分析する場合、化学誘引物質が存在したり、テスト細胞上に化学誘引物質受容体が発現されたりする必要はない。しかし、例えばCD38発現細胞において走化性又は細胞内カルシウムレベルの変化を測定する場合、化学誘引物質を含む必要がある。あるいは、SM38発現細胞において筋収縮性又は細胞内カルシウムレベルの変化を測定する場合、筋収縮及び/又はカルシウム放出を活性化する刺激物質(例えばアセチルコリン、セロトニン(Dayら, 1994, Paristol. 108: 425-432)、FMRF-アミド関連ペプチド(FaRP)(Dayら, 1994, Paristol. 109: 455-459)又は培地中における高いK⁺濃度(Dayら, 1993, Paristol. 106: 471-477)等を含むがこれらに限定されない)を含む必要がある場合もある。さらに、使用した刺激物質に特異的な受容体を発現する宿主細胞を用いてこれらの実験を行うことが必要であろう。当業者であれば、常套実験を用いることにより、効果的且つ最適なアッセイ条件を決定することができるであろう。

30

40

【0069】

本明細書中で定義される「化学誘引物質」とは、CD38によるcADPR産生に依存するメカニズムを介して細胞の遊走を誘導する化合物又は分子複合体である。このような化学誘引物質の例としては、fMet-leu-Phe(fMLP)が挙げられるが、これらに限定されない。使用可能な他の化学誘引物質としては、エオタキシン(eotaxin)、GRO-1、IP-10、SDF-1、BLC、Rantes、MIP-1A、MCP-3、MIP3a、IL-8、CLS、ELC、Lymphotactin、PAF

50

、L t b 4、補体 c 5 a 及びヒスタミンが挙げられる。

【0070】

上記細胞系を利用する際には、このような細胞系（CD38 / SM38 タンパク質を発現する細胞）を、テスト化合物又は対照ピヒクル（例えば偽薬等）に曝露させる。曝露後、細胞を分析してCD38 / SM38の活性を測定したり、又はCD38依存性シグナル伝達経路自体の活性を分析したりすることができる。

【0071】

標準的な生化学的技法及び生理学的技法を用いて、テスト分子がCD38 / SM38の活性を調節する能力を測定することができる。CD38 / SM38 ADP - リボシルシクラーゼ活性の活性化もしくは抑制又はcADPR及び/もしくはNAADP等のCD38 / SM38代謝産物の生成等の応答を測定することができる。cADPR、ADPR及び/又はNAADPのレベルは、放射能標識したNAD、NADP又はNA等の基質の使用と組み合わせてHPLC又はTLCを用いることにより、測定することができる。さらに、上記第5.1.1節に記載したアッセイ等のような、ラジオイムノアッセイ、バイオアッセイ及び/又は蛍光アッセイを用いて、cADPR又はNAADPレベルを測定することができる。本発明のさらに他の実施形態において、NGD（ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド）及びニコチンアミド1, N⁶ - エテノ - アデニンジヌクレオチド（1, N⁶ - エテノ - NAD）等のNADの誘導体を用いて、CD38 / SM38活性を測定することができる。

10

【0072】

また、細胞系のカルシウム及び/又は遊走アッセイを用いてテスト化合物を分析し、化学誘引物質誘導型のCD38依存性カルシウム応答及び細胞遊走を阻害又は活性化することができる化合物を同定することもできる。本発明の非限定的な実施形態において、Ca²⁺指示薬染料（例えばIndo、Fluo-3及びFura-Red等）の蛍光によって、細胞内のCa²⁺レベルの変化をモニターしてもよい。さらに、CD38 / SM38酵素活性の調節により得られる膜電位の変化は、電位固定法又はパッチ記録法（patch recording method）を用いて測定することができる。また、方向性を持った細胞の移動は、改良型のポイデンチャンパー又はスライドにおいて標準的な走化性アッセイによってモニターしてもよい。このようなアッセイシステムは、本明細書の実施例の中にさらに詳細に説明されている（実施例6を参照されたい）。また筋収縮性は、文献の中に詳細に記載されている標準的なアッセイによって測定することもできる（例えば（Dayら, 1994, Parasitology 109: 455 - 9）及び当該文献に引用された文献等）。

20

30

【0073】

テスト化合物に曝露した後、又はテスト化合物の存在下において、fMLP等の化学誘引物質又は高濃度のK⁺等の筋肉活性化因子（muscle activator）で細胞を刺激することができ、そして細胞内のカルシウムレベル、cADPRもしくはNAADPレベル、筋収縮性及び/又は細胞遊走の変化を測定することができる。これらの測定値を、対照ピヒクルで処理した細胞と比較する。テスト化合物の存在下における細胞内Ca²⁺レベルの増加、cADPRの生成量の増加、筋収縮性の増大、及び/又は化学誘導物質への細胞遊走の増加は、その化合物がアゴニストとして機能して、Ca²⁺応答を増加させ、筋収縮性を増大させ、及び化学誘引物質誘導型CD38依存性細胞遊走を増加させることを示す。テスト化合物の存在下における、細胞内Ca²⁺のレベルの減少、cADPRの生成量の減少、筋収縮性の低下、及び/又は化学誘引物質への細胞遊走の減少は、その化合物がアンタゴニストとして機能して、Ca²⁺応答を阻害し、筋収縮性を低下させ、及び化学誘引物質誘導型CD38依存性細胞遊走を阻害することを示す（例えば図2及び図3を参照されたい）。

40

【0074】

さらに、本発明のアッセイを用いて、(i) CD38 / SM38酵素活性の基質として機能し、cADPR依存性Ca²⁺シグナル伝達経路のアゴニスト又はアンタゴニストへと

50

変換される化合物を同定することができる(図5)。これらの仕様に合致する化合物は、本明細書の実施例(実施例6、図11)にさらに詳細に記載されている。あるいは、本発明のアッセイは、(ii) cADPR媒介性Ca²⁺シグナル伝達経路を特異的に妨げる化合物を同定するために用いても良い(図6)。本発明の非限定的な実施形態において、テスト化合物は、CD38/SM38の公知もしくは未知の基質の化学的誘導体を含み得る(例えば基質類似体8-Br-NADは、cADPR媒介性Ca²⁺シグナル伝達のアゴニストとして機能する改変型生成物8-Br-cADPRへと変換される)。化学誘引物質又は筋肉刺激物質の存在下で、CD38/SM38及び適当な化学誘引物質受容体を発現する細胞に、このテスト基質を投与してもよい。cADPRの活性を調節することができる改変型生成物への改変型テスト基質の変換は、上記方法を利用して測定することができる。またテスト基質を分析して、これらがカルシウム流入、筋収縮性及び/又は細胞遊走に対して及ぼす影響を決定することもできる。テスト基質及び化学誘引物質で処理した細胞において、細胞内でのCa²⁺の蓄積及び化学誘引物質への遊走を測定し、非改変基質(すなわちNAD及び化学誘引物質)を与えた細胞と比較することができる。改変型生成物即ち8-Br-cADPRに変換されてcADPR誘導型カルシウム応答、筋収縮性又は方向性を持った遊走を競合的もしくは非競合的に阻害する化合物は、cADPR Ca²⁺シグナル伝達経路のアンタゴニストとして同定され、cADPR Ca²⁺のシグナル伝達経路の競合的もしくは非競合的アゴニストである改変型生成物に変換される化合物は、アゴニスト又は活性化因子として定義される。

10

【0075】

20

本発明のさらに他の実施形態において、cADPRの活性(即ち誘導型のカルシウム放出及び細胞遊走)を直接変更する(すなわち活性化もしくは不活化する)化合物を、アッセイにおいてテストすることができる。このようなアゴニスト又はアンタゴニストは、細胞内へのCa²⁺の流入を調節して細胞の遊走活性又は収縮能を変化させると期待される。アンタゴニストであれば、化学誘引物質の存在下において、Ca²⁺応答を低下させ、収縮性を低下させ、及び/又は遊走を減少させるであろう。アンタゴニストの例としては、8-NH₂-cADPR、8-Br-cADPR、8-CH₃-cADPR、8-OCH₃-cADPR及び7-Deaza-8-Br-cADPRが挙げられるがこれらに限定されない。これらの仕様に合致する化合物は、本明細書の実施例(実施例6、図10)にさらに詳しく記載されている。アゴニストは、化学誘引物質の存在下において、Ca²⁺応答を増加させ、収縮性を増大させ、及び/又は遊走を増加させるであろう。アゴニストの例としては、2'-デオキシ-cADPR、3'-デオキシ-cADPR及び2'-ホスホ-cADPRが挙げられるがこれらに限定されない。cADPR活性を直接測定するアッセイとしては、Howardら(1995, Science 262:1056); Galioneら(1993, Nature 365:456-459)ならびにLee及びAarhus(1991, Cell Regulation 2:203-209)により記載されたもの等のバイオアッセイが挙げられる。

30

【0076】

さらに、本発明のアッセイは、CD38/SM38酵素活性を活性化することができ(即ちアゴニスト)且つ細胞内カルシウム貯蔵の枯渇によってカルシウム経路の感度を低下させる(desensitize)化合物を同定することができる。このような感度の低下(desensitization)は、ときには、カルシウム貯蔵の枯渇による細胞遊走又は筋収縮の阻害につながる場合がある。このように、CD38/SM38酵素アッセイにおいてアゴニストとして機能するが走化性又は筋収縮アッセイにおいてアンタゴニストとして機能する化合物を同定することができる。このようなアッセイ及び化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

40

【0077】

5.2.4. CD38/SM38の発現を調節する化合物のアッセイ

本発明に従って、細胞系のアッセイシステムを用いて、細胞内でCD38/SM38の発現を調節する化合物をスクリーニングすることができる。アッセイは、転写もしくは翻訳

50

レベルでCD38 / SM38発現を調節する化合物をスクリーニングするように設計することができる。1つの実施形態において、レポーター分子をコードするDNAを、CD38 / SM38遺伝子の調節エレメントに連結して、適当な無傷の細胞、細胞抽出物又は細胞ライゼートの中で、CD38 / SM38遺伝子発現を調節する化合物を同定するために用いることができる。このようなレポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、 β -グルクロニダーゼ (GUS)、成長ホルモン、又は胎盤性アルカリホスファターゼ (SEAP) が挙げられるがこれらに限定されない。このような構築物を細胞内に導入することにより、CD38 / SM38遺伝子発現の調節因子を同定するように設計されたスクリーニングアッセイに有用な組換え細胞を提供する。

10

【0078】

細胞をテスト化合物に曝露した後、レポーター遺伝子の発現レベルを定量して、CD38 / SM38発現を調節するそのテスト化合物の能力を測定することができる。アリカリホスファターゼは細胞から分泌されるので、アリカリホスファターゼアッセイは本発明の実施において特に有用である。従って、組織培養上清を、分泌されたアリカリホスファターゼについて分析することができる。さらに、アリカリホスファターゼ活性は、熱量、生物発光、又は化学発光アッセイ (例えばBronstein, I.ら (1994, Biotechniques 17: 172 - 177) に記載されたもの等) によって測定することができる。このようなアッセイは、創薬スクリーニングのための、単純且つ感度の高い、簡単に自動化可能な検出システムを提供する。

20

【0079】

CD38 / SM38の翻訳を調節する化合物を同定するために、CD38 / SM38転写産物を含む細胞又は*in vitro*細胞溶解液を、CD38 / SM38 mRNA翻訳の調節についてテストすることができる。CD38 / SM38翻訳の阻害物質について分析するために、テスト化合物を、*in vitro*翻訳抽出物においてCD38 / SM38 mRNAの翻訳を調節するその能力について分析する。

【0080】

本発明の実施形態において、CD38 / SM38 mRNA転写産物の翻訳を阻害するもしくは妨げるためのアンチセンス法又はリボザイム法、あるいはCD38 / SM38遺伝子の転写を阻害する三重らせん法を用いて、CD38 / SM38の発現レベルを調節することができる。このような方法を利用して、炎症やアレルギー等の障害を治療することができる。この場合、骨髄由来細胞の遊走を妨げるためにCD38 / SM38発現の阻害が設計されるか、又は Manson 住血吸虫の生理機能及び病理発生を変えるためにSM38の阻害が設計される。

30

【0081】

アンチセンス法は、CD38 / SM38 mRNAに相補的なオリゴヌクレオチド (DNA又はRNA) の設計を行うものである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的なmRNA転写産物に結合して翻訳を妨げる。完全に相補的であることが好ましいが、その必要はない。当業者であれば、ハイブリダイズした複合体の解離温度 (melting point) を決定するための標準的な手法を用いることにより、ミスマッチの許容度を

40

【0082】

本発明のさらに他の実施形態において、CD38 / SM38 mRNA転写産物を酵素的に切断するよう設計されたリボザイム分子を用いて、CD38 / SM38 mRNAの翻訳及びCD38 / SM38の発現を妨げることもできる。(例えば1990年10月4日に公開された国際特許出願公開第WO90 / 11364号; Sarverら, 1990, Science 247: 1222 - 1225を参照されたい)。あるいは、体内の標的とされる造血由来細胞の中で、CD38 / SM38遺伝子の調節領域 (すなわちCD38プロモーター及び/又はエンハンサー) に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列をターゲティングして、CD38 / SM38遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成す

50

ることにより、内因性CD38 / SM38 遺伝子発現を減少させることができる。(一般にHelene, C.ら, 1991, Anticancer Drug Des. 6: 569-584 及びMaher, L.J., 1992, Bioassays 14: 807-815を参照されたい)。

【0083】

本発明のオリゴヌクレオチド(即ちアンチセンス、リボザイム、及び三重らせんを形成するオリゴヌクレオチド)は、当分野で公知である標準的な方法により、例えば自動DNA合成装置(Biosearch, Applied Biosystemsから市販されているもの等)を用いることにより、合成することができる。あるいは、本発明のオリゴヌクレオチドの発現を指令するために、組換え発現ベクターを構築してもよい。このようなベクターは、当分野において標準的である組換えDNA技術の方法によって構築することができる。特定の実施形態において、目的が標的細胞内での阻害性オリゴヌクレオチドの*in vivo*発現であるような遺伝子療法に用いるために、ウイルスベクター等のベクターを設計してもよい。

【0084】

5.2.5. 本発明に従ってスクリーニングすることができる化合物

上記アッセイは、CD38 / SM38 活性を調節する化合物を同定することができる。例えば、CD38 / SM38 活性に影響を及ぼす化合物としては、CD38 / SM38 に結合して、酵素活性を活性化する化合物(アゴニスト)又は酵素活性を遮断する化合物(アンタゴニスト)が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、CD38 / SM38 に直接結合しないが、CD38 酵素活性を調節するタンパク質の活性を変化させることによりCD38 / SM38 酵素活性を変化させることができる化合物を同定することができる(図3を参照されたい)。また、cADPR Ca²⁺シグナル伝達経路を活性化又は阻害する改変型生成物へと変換されるCD38の基質となる化合物も、本発明のスクリーニングによって同定することができる。また、細胞内でcADPR Ca²⁺シグナル伝達経路を直接活性化もしくは阻害する化合物も、同定することができる。さらに、CD38 / SM38 酵素活性を活性化してカルシウム経路の感度を低下させる化合物を同定することもできる。このような感度を低下させる化合物は、細胞遊走を阻害すると期待される。さらに、本発明のスクリーニングを用いて、(CD38 / SM38 遺伝子発現に影響を及ぼすことにより)CD38 / SM38 遺伝子活性に影響を及ぼす化合物(例えば転写に影響を及ぼしたり又はスプライシングを妨害したりして完全長もしくはトランケート型のCD38 / SM38の発現を調節することができるタンパク質や小さな有機分子等の分子を含む)を同定することができる。

【0085】

本発明に従ってスクリーニングすることができる化合物としては、CD38 / SM38 に結合して、CD38 / SM38の公知もしくは未知の基質のいずれかにより誘発される活性を模倣する(すなわちアゴニスト)又はCD38 / SM38の公知もしくは未知の基質のいずれかにより誘発される活性を阻害する(すなわちアンタゴニスト)、小さな有機もしくは無機化合物、ペプチド、抗体及びそのフラグメント、ならびに他の有機化合物(例えばペプチド模倣体等)が挙げられるがこれらに限定されない。化学誘引物質又は筋肉刺激物質の存在下又は不在下で、CD38 / SM38 に結合して、CD38 / SM38 酵素活性(即ちADP-リポシルシクラーゼ活性、NADグリコヒドロラーゼ活性、グリコシル転移活性)を強める化合物(即ちアゴニスト)、又はCD38 / SM38 酵素活性を阻害する化合物(即ちアンタゴニスト)が同定される。CD38 / SM38の酵素活性を変更/調節するタンパク質に結合する化合物が同定される。天然基質(即ちNAD(P))を模倣する化合物であって、CD38 / SM38 酵素活性によってcADPR誘導型カルシウム放出経路のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能する生成物へと変換される化合物を同定することができる。細胞内でcADPR Ca²⁺シグナル伝達経路を直接活性化又は阻害する化合物を同定することができる。

【0086】

10

20

30

40

50

化合物には、例えば以下に挙げるものを含む（ただしこれらに限定されない）可溶性ペプチド等のペプチドが含まれるが、これらに限定されない：ランダムペプチドライブラリーのメンバー（例えば Lam, K. S.ら, 1991, Nature 354: 82-84; Houghten, Rら, Nature 354: 84-86を参照されたい）；ならびに立体配置がD形及び/又はL形であるアミノ酸、ホスホペプチド（phosphopeptide）（ランダムな又は一部変性した特異的（directed）ホスホペプチドライブラリーのメンバーを含むがこれらに限定されない）（例えば Songyang, Z.ら, 1993, Cell 72: 767-778を参照されたい）、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗-イデオタイプ抗体、キメラ抗体、又は一本鎖抗体、Fab、F(ab')₂及びFAb発現ライブラリーフラグメント、ならびにこれらのエピトープ結合性フラグメントを含むがこれらに限定されない）、及び小さな有機もしくは無機分子で構成されたコンビナトリアル化学により得た分子ライブラリーのメンバー。

【0087】

本発明に従ってスクリーニングすることができる他の化合物としては、（例えば遺伝子発現に関わる調節領域又は転写因子に相互作用することによって）CD38/SM38遺伝子又はCD38/SM38シグナル伝達経路に関与するある他の遺伝子の発現に影響を及ぼす小さな有機分子、あるいはCD38/SM38の酵素活性もしくはCD38/SM38酵素活性の調節に関わるある他の因子（例えばCD38/SM38をリボシル化することによりCD38/SM38酵素活性を不活化するタンパク質等）の活性に影響を及ぼすこのような化合物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0088】

5.3. CD38/SM38の調節因子を含む組成物及びその使用

本発明は、CD38を発現する細胞を有効量のCD38調節化合物（例えば上記第5.1節に記載されたアッセイを用いて同定されるCD38アゴニスト又はアンタゴニスト等）に接触させる工程を含む、細胞遊走の調節方法を提供する。さらに、本発明は、SM38を発現する細胞を有効量のSM38調節化合物（例えば上記第5.1節に記載されたアッセイを用いて同定されるSM38アゴニスト又はアンタゴニスト等）に接触させる工程を含む、カルシウム応答及び/又は筋収縮性の調節方法を提供する。CD38/SM38阻害物質（即ちアンタゴニスト）の「有効量」とは、化学誘引物質誘導型の細胞遊走を減少させ、細胞内カルシウムレベルを低下させ、筋収縮を減少させ、及び/又は上記アッセイのいずれかによって測定したCD38/SM38酵素活性の検出可能な低下に關係する量である。CD38/SM38活性化物質（即ちアゴニスト）の「有効量」とは、本質的に、化学誘引物質誘導型の細胞遊走を増加させ、細胞内カルシウムレベルを増加させ、筋収縮を増大させ、及び/又は上記アッセイのいずれかによって測定したCD38/SM38酵素活性の検出可能な増加に關係する量である。また本発明の組成物には、改変型CD38/SM38基質、CD38/SM38発現の調節因子、及びcADPRのアゴニスト/アンタゴニストも含まれる。

【0089】

本発明はさらに、上記第5.1節に記載したように同定されるCD38酵素活性を調節する化合物を含む組成物を被験者に投与する工程を含む、被験者の体内において細胞遊走を調節する方法を提供する。該組成物は、ある量のCD38酵素の活性化物質もしくは阻害物質、CD38発現の調節因子、改変型CD38基質、又はcADPRにより制御されるCa²⁺応答の直接的なアゴニスト/アンタゴニストを含み得る。したがって、本発明は、CD38の活性化物質及び阻害物質を含む組成物を提供する。

【0090】

本発明は、CD38の活性、CD38の発現、及び/又はcADPRの活性を調節することにより細胞の遊走活性を調節することができる有効量の化合物と薬学的に許容可能な担体とを含む組成物を提供する。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物、特にヒトへの使用が、連邦政府もしくは州政府の取締機関により承認され

ている、又は米国薬局方もしくは他の一般に認可された薬局方に記載されている、という意味である。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。好適な薬学的担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。

【0091】

本発明は、CD38の発現又は活性を調節する化合物の投与による、細胞遊走に関する様々な疾患及び障害の治療又は予防法を提供する。このような化合物には、CD38抗体、CD38アンチセンス核酸、CD38のアゴニスト及びアンタゴニスト(図2~3を参照されたい)、改変型CD38基質(図5を参照されたい)、ならびにcADPRのアゴニスト及びアンタゴニスト(図6を参照されたい)が含まれるがこれらに限定されない。本発明の非限定的な実施形態において、造血由来細胞の遊走に関する障害は、CD38活性を調節する化合物を投与することにより治療又は予防される。このような障害としては、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、アレルギー、感染症、関節炎、及び臓器移植拒絶反応が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0092】

本発明の化合物は、ヒトに使用する前に、所望の治療活性又は予防活性について*in vitro*でテストした後、*in vivo*でテストするのが好ましい。例えば、特定の治療薬の投与を必要とするか否かを決定するために使用することができる*in vitro*アッセイとしては、CD38を発現する細胞を治療的化合物に曝露するか、さもなくば、該細胞に該化合物を投与してこのような治療薬がCD38活性に対して及ぼす影響を観察する*in vitro*細胞培養アッセイが挙げられる。本発明の特定の実施形態において、化合物が細胞遊走を調節する(即ち活性化もしくは阻害する)能力を分析することができる。

20

【0093】

本発明はさらに、 Manson 住血吸虫等の蠕虫に感染した被験者に、上記第5.1節に記載したように同定されるSM38酵素活性を調節する化合物を含む組成物を投与することにより、蠕虫において筋収縮又は他の生理学的パラメータを調節する方法を提供する。この組成物は、ある量のSM38酵素活性化物質もしくは阻害物質、SM38発現の調節因子、改変型SM38基質、又はcADPRにより制御されるCa²⁺応答の直接的なアゴニスト/アンタゴニストを含み得る。従って、本発明は、SM38活性化物質及び阻害物質を含む組成物を提供する。

30

【0094】

本発明は、SM38の活性、SM38の発現及び/又はcADPRの活性を調節することによって寄生生物の活動及び生存率を調節することができる有効量の化合物と、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物を提供する。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物、特にヒトへの使用が、連邦政府もしくは州政府の取締機関により承認されている、又は米国薬局方もしくは他の一般に認可された薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。好適な薬学的担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。

40

【0095】

本発明は、蠕虫感染に関する様々な疾患及び障害の治療又は予防法を提供する。このような化合物としては、SM38抗体、SM38アンチセンス核酸、SM38のアゴニスト及びアンタゴニスト(図2~3を参照されたい)、改変型SM38基質(図5を参照されたい)、ならびにcADPRのアゴニスト及びアンタゴニスト(図6を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の非限定的な実施形態において、蠕虫感染に関する障害は、SM38活性を調節する化合物の投与により治療又は予防される。このような障害としては、肝臓及び肺における肉芽腫形成及び線維症が挙げられるが、これ

50

らに限定されない。

【0096】

本発明の化合物は、ヒトに使用する前に、所望の治療活性又は予防活性について *in vitro* でテストした後、*in vivo* でテストするのが好ましい。例えば、特定の治療薬の投与を必要とするか否かを決定するために使用することができる *in vitro* アッセイとしては、SM38を発現する細胞を治療的化合物に曝露するかさもなくば該細胞に該化合物を投与してこのような治療薬がSM38活性に対して及ぼす影響を観察する *in vitro* 細胞培養アッセイが挙げられる。本発明の特定の実施形態において、化合物が筋収縮性又は細胞内カルシウム蓄積を調節する（即ち活性化もしくは阻害する）能力を分析することができる。さらに、マンソン住血吸虫感染のマウスモデルにおいて、本発明の化合物がマンソン住血吸虫の病理発生、成長、分化、及び繁殖に対して及ぼす影響について分析することができる。このようなアッセイは、寄生生物の増殖、雌蠕虫の成熟、肝臓及び肺における肉芽腫の量、肝臓、肺、膀胱及び腸管内の卵の量、肺及び肝臓内の蠕虫の量、ならびに尿及び便の中で検出されるミラキジウムの量に及ぼす影響についてのテストを含む。

10

【0097】

さらに、本発明の化合物がマンソン住血吸虫の病理発生、成長、分化及び繁殖に及ぼす影響について分析することができる。このような化合物は、マンソン住血吸虫感染のマウスモデルにおいてテストすることができる。このようなアッセイは、寄生生物の増殖、肝臓及び肺における肉芽腫の量、肝臓、肺、膀胱及び腸管内の卵の量、ならびに尿及び便の中で検出されるミラキジウムの量に及ぼす影響についてのテストを含む。

20

【0098】

本発明は、有効量の本発明の化合物を被験者に投与することによる治療及び/又は予防方法を提供する。好適な態様において、該化合物は実質的に精製されたものである。被験者は好ましくは動物であり、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトである。

【0099】

様々な送達系が公知であり、これらは、CD38活性、cADPR、又はCD38発現を調節することができる化合物を投与するために用いることができる（例えばリポソームへのカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、該化合物を発現することができる組換え細胞、受容体を媒介とするエンドサイトーシス等）（例えばWu及びWu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照されたい）。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外及び経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。化合物は、任意の便利な経路から、例えば注入もしくはボーラス注射、上皮もしくは粘膜皮膚の内張り（例えば口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜等）を介した吸収により投与することができ、また、他の生体活性因子と一緒に投与してもよい。投与は全身投与であっても局所投与であってもよい。例えば吸入器又はネブライザーを使用し、エアロゾル化剤と一緒に製剤化して、肺投与を用いることもできる。

30

【0100】

特定の実施形態において、本発明の組成物を身体の特定の領域に局所投与することが望ましい。これは、限定する訳ではないが、例えば外科手術中の局所注入、表面塗布（例えば外科手術後の創傷包帯と一緒に）、注射により、カテーテルを用いて、坐剤を用いて、又は移植片（多孔性、非多孔性、又はゲル状の材料で構成されたシラスチック膜等の膜や繊維等）を用いて、行うことができる。

40

【0101】

また本発明は、医薬組成物も提供する。このような組成物は、CD38活性、cADPR活性又はCD38発現を調節することができる治療的有効量の化合物と、薬学的に許容可能な担体とを含む。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物、特にヒトへの使用が、連邦政府又は州政府の取締機関により承認されている、又は米国薬局方もしくは他の一般に認可された薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒク

50

ルを指す。このような薬学的担体は、水又は油等の滅菌液であってもよく、例えば石油、動物、植物又は合成起源のものが含まれる（落花生油、大豆油、鉱油、ごま油等）。水は、医薬組成物を静脈内に投与する場合に、好適な担体である。また、特に注射用溶液としては、食塩水、デキストロス水溶液、及びグリセロール水溶液を液体担体として使用することもできる。組成物は、伝統的な結合剤及び担体（グリセリド等）と一緒に坐剤として製剤化することができる。経口投与用製剤としては、医薬品レベルのマンニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、糖ナトリウム（sodium saccharine）、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的担体を含み得る。好適な薬学的担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。このような組成物は、治療的有効量の治療的化合物（好ましくは精製されたもの）を、患者に適切に投与される形状にするような適当な量の担体と一緒に含む。製剤は投与方法に合ったものでなければならない。

【0102】

特定の障害又は症状の治療に効果的な本発明の化合物の量は、その障害又は症状の性質によって異なり、標準的な臨床技法によって決定することができる。さらに、最適な投薬量範囲を同定するために、場合により *in vitro* アッセイを補助的に使用してもよい。製剤中に使用される正確な用量は、投与経路、及び疾患又は障害の重症度によっても異なり、現場の医師の判断及び各患者の状況に従って決定すべきである。有効な用量は、*in vitro* もしくは動物モデルのテストシステムから得た用量 - 反応曲線から外挿法により決定することができる。さらに、*in vitro* 及び *in vivo* 研究により、該化合物と他の公知の効力のある薬物とを組み合わせるときに相乗作用的もしくは付加的な治療効果が得られることが分かった場合、これらを組み合わせると投与することができる。

【0103】

また本発明は、本発明の医薬組成物の成分のうちの1種以上を充填した1個以上の容器を含む医薬パックもしくはキットも提供する。場合により、このような容器には、医薬品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を取り締まる政府当局により規定された様式で書かれた注意書き（ヒト投与のための製造、使用又は販売を取り締まる管轄機関による認可を表す）が添付されていてもよい。

【0104】

6. 実施例：好中球は、走化性、容量性Ca⁺流入（capacitative Ca⁺ entry）及び細菌浄化のためにCD38を必要とする

以下のサブセクションは、化学誘引物質により活性化された好中球へのカルシウムの流入が、CD38酵素反応により得られる生成物、cADPRにより制御されることを示すデータを表す。容量性カルシウム流入（CD38により生成されるcADPRにより制御される）は、好中球が化学誘引物質に向かって効率良く移動するのに必要である。

【0105】

6.1. 材料及び方法

6.1.1. マウス

C57BL/6J x 129CD38KO F2動物（Cockayneら, 1998, Blood 92:1324-1333）を、C57BL/6Jに6世代（N6）戻し交配した後、同系交配させて、ホモ接合性類似遺伝子系C57BL/6J.129CD38KOマウスを作製した。C57BL/6J.129（N6）CD38KOマウスをC57BL/6J.129（N8）Rag-2KOマウスとかけあわせた後（Shin Kaiら, 1992 Cell 68:855-867）、その子孫をかけあわせてホモ接合性二重KO動物を得ることにより、CD38-Rag-2二重KO（dKO）マウスを作製した。WTマウス又はCD38KOマウスから単離した1 x 10⁷個の無傷の骨髄細胞を、致死量の放射線（950rad）を照射したWT宿主に移植することによって、骨髄キメラマウスを作製した。全てのマウスを飼育し、Trudeau Institute Animal Breeding Facilityで保管した。

【0106】

6.1.2. cADPR含有量の測定

全身灌流したWTマウス又はCD38KOマウスからマウス組織を単離し、液体窒素の中で瞬間冷凍した。Rag-2KOもしくはRag-2-CD38dKOマウスの脛骨及び大腿骨から骨髓細胞を取り出した。次に、過去に記載されているように(Vuら, 1997 Biochem Biophys Res Commun 236:723-726)、マウス組織及び骨髓細胞の中のcADPR含有量を測定した。

【0107】

肺炎連鎖球菌感染。American Type Tissue Culture (Rochville, Maryland)から入手した100又は1000CFUの肺炎連鎖球菌4型(Klein株)を気管内に投与して、マウスを感染させた。感染マウスから、血液、気管支肺胞洗浄液(BAL)及び肺組織を回収した(Garvyら, 1996 Inflammation 20:499-512)。肺ホモジェネート及び血液中の細菌力価を、肺あたり又は血液mlあたりで計算した。細胞遠心分離調製物(cytocentrifuge preparation)からBAL細胞の数を数えた。

【0108】

6.1.3. in vitro走化性アッセイ

ビオチン結合GR-1(PharMingen)及びMACSストレプトアビジンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Auburn CA)を用いた正の選択により、骨髓好中球を精製した(純度95%)。孔サイズ3µmのポリカーボネートフィルタを備えた24ウェル-トランスウェルプレート(24-well transwell plate)(Costar, Cambridge, MA)を用いて、走化性アッセイ(Falkら, 1980, J. Immunol. Methods 33:239-247)を行った。培地(HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺)、fMLP(1µM, Sigma, St. Louis, MO)、又はIL-8(100nM, Sigma)を、チェッカーボードフォーマットの下側及び/又は上側のチャンバーに入れた。1×10⁵個の好中球を上側のチャンバーの中に入れ、プレートを37℃にて45分間インキュベートした。移行した(transmigrated)細胞を下側のチャンバーから回収し、固定し、フローサイトメーター(FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose CA)でカウントした。各サンプル中の細胞の絶対数を決定するために、標準個数のサイズ20µmの蛍光マイクロスフィア(PolyScience, Inc. Warrington, PA)を各試験管に加え、細胞と一緒にカウントした。移行した細胞の総数=カウントした好中球の数×ビーズの総数/カウントしたビーズである。幾つかの実験では、好中球を、EGTA(2mM)中でインキュベートするか、又は8-Br-cADPR(25~100µM, Sigma)もしくはN(8-Br-A)D+(1.0mM)で20分間、前処理した。

【0109】

6.1.4. CD38発現

WTマウス又はCD38KOマウスから、骨髓、血液又は腹膜腔細胞を単離し、抗-マウスGR-1 FITC、抗-マウスMAC-1 PE及び抗-マウスCD38 APC(PharMingen, San Diego CA)で染色した。フィコール勾配でヒト末梢血好中球を単離した後、抗-hCD15-FITC(Becton Dickinson, San Jose CA)及び抗-hCD38-ビオチン(Caltag Laboratories, Burlingame CA)で染色した。フローサイトメトリーによりマウス及びヒト好中球を分析した(マウス好中球の場合はMAC-1⁺GR-1⁺及びヒト好中球の場合はCD15⁺)。炎症反応を誘導するために、マウスに1mlの3%チオグリコール酸塩培地(Becton Dickinson, Cockeysville MD)を腹腔内注射した。注射の12時間後にこれらの動物を犠牲にし、腹膜腔に浸潤している細胞を回収した。

【0110】

10

20

30

40

50

6.1.4. CD38シクラーゼ活性の測定

CD38シクラーゼ活性の測定。 1×10^6 個の精製した骨髄好中球を、96ウェルマイクロプレート中の $100 \mu\text{l}$ HBSS中で 37°C にて20分間インキュベートした。NGD ($40 \mu\text{M}$) (Sigma)を加え、次の10分間、NGD⁺ からcGDP Rへの酵素的変換を、蛍光定量法 (Graeffら, 1994 J. biol. Chem. 269:30260-30267)により測定した (415 nm 発光及び 300 nm 励起)。

【0111】

6.1.5. 好中球の中におけるRyR-3 mRNA発現

精製した骨髄好中球又は脳組織から単離したRNAからcDNAを調製した。投入量 $0.03 \sim 2 \mu\text{g}$ のcDNA及びRyR-3特異的プライマーを用いて、RT-PCRを30サイクル (アニーリング温度 61°C) 行った (Guseら, 1999 Nature 398:70-73)。

【0112】

N(8-Br-A)D⁺の合成。以前記載されたように (Abdallahら, 1975 Eur. J. Biochem 50:475-481)、N(8-Br-A)D⁺を合成した。

【0113】

6.1.6. 細胞内カルシウムの測定

精製した骨髄好中球を、細胞充填入培地 (cell loading media) (Ca^{2+} 及び $\text{Mg}^{2+} + 1\% \text{ FBS} + 4 \text{ mM}$ プロベネシドを加えたHBSS)の中に 1×10^7 細胞/mlの濃度で再懸濁した。蛍光染料Fluo-3 AM ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$)及びFura Red AM ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Molecular Probes, Eugene OR)と一緒に細胞を 37°C にて30分間インキュベートした後、2回洗浄し、細胞充填入培地又はカルシウムを含まない培地中に 1×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁した。幾つかの実験では、 $5 \mu\text{M}$ ジギトニンを含むカルシウムを含まない培地中で細胞を透過性とした。他の実験では、EGTA (2 mM)、8-Br-cADPR ($10 \sim 100 \mu\text{M}$)、ルテニウムレッド (Sigma)又はN(8-Br-A)D⁺ (1 mM)と一緒に細胞を予めインキュベートしておいた後、対照担体 (DMSO 0.01%)、fMLP ($1 \mu\text{M}$)、IL-8 (100 nM)、リアノジン ($1 \mu\text{M}$)、cADPR ($100 \mu\text{M}$)又はタブシガーギン ($1 \mu\text{M}$)で刺激した。フローサイトメトリーにより、FL-1チャンネルの中ではFluo-3の蛍光発光を、及びFL-3チャンネルの中ではFura-Redの蛍光発光を測定して、個々の細胞の中の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の蓄積を評価した。FlowJo 3.2 (Tree Star, Inc. San Carlos, CA)を用いて、データを分析した。相対的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、一定時間のFluo-3及びFura Redの平均蛍光強度の比率で表した。

【0114】

6.2. 結果

CD38は、リンパ組織の中で発現される主要なADP-リボシルシクラーゼである。in vivoでのカルシウム感受性免疫反応におけるCD38及びcADPRの必要性を直接テストするために、CD38ノックアウト (CD38 KO) マウスを作成した (Cockkayneら, 1998 Blood 92:1324-1333)。CD38がマウス中で発現される主要なシクラーゼであるか否かを決定するために、CD38 KO及びC57BL/6 J野生型 (WT) マウスから単離した組織及び細胞の中のcADPR含有量を比較した (表1)。

【0115】

【表1】

表1：CD38KO及びWT動物から単離した組織の中のcADPR含有量の比較

組織	cADPR含有量 (WT組織) (pmol/mg タンパク質)	cADPR含有量 (CD38KO組織) (pmol/mg タンパク質)
脾臓	2.108±0.334	0.298±0.091*
胸腺	0.769±0.182	0.335±0.088**
BM 骨髄性細胞	0.633±0.111	0.257±0.032*
肺	0.847±0.213	0.480±0.069
腎臓	0.488±0.119	0.418±0.070
心臓	1.249±0.324	1.014±0.237
脳	3.865±0.866	3.127±0.316

10

8～12週齢のCD38KOもしくはWTマウスから単離した組織から、又はRag-2KOもしくはRag-2-CD38二重KOマウスから単離した骨髄(BM)骨髄性細胞から抽出物を調製し、cADPR含有量について分析した。1回の分析あたり3匹のマウスから単離した組織について精製及び分析を3回別個に行った。*P=0.01、**P=0.07; Anova分析。検出の限界、0.2pmol/mgタンパク質。

20

【0116】

主にリンパ系細胞又は骨髄性細胞を含むWT組織(例えば脾臓、胸腺及びリンパ系細胞不足骨髄(骨髄性細胞)等)は、簡単に検出できるレベルのcADPRを有していた。これに対し、CD38KOマウスから単離したリンパ組織又は骨髄組織ではcADPRは検出されなかった。しかし、脳、腎臓及び心臓等のCD38KO組織のcADPR含有量は、同じWT組織のcADPR含有量とほぼ等しかった。従って、脳及び心臓等の器官におけるcADPR産生には他の未知のシクラーゼが関与しているに違いが、CD38は、骨髄性細胞及びリンパ系細胞により発現される優勢なADP-リボシル-シクラーゼである。

【0117】

CD38欠陥マウスは、細菌感染によりかかりやすい。先天性の炎症性免疫反応におけるCD38及びcADPRの必要性をテストするために、CD38KO及びWTマウスを肺炎連鎖球菌に感染させ、生存率を評価した(図7A)。CD38KO動物のLD50はWTマウスよりも少なくとも10倍低いという観察結果を得た。つまり100コロニー形成単位(CFU)は感染後2.5日以内にCD38KOマウスの50%を殺傷したが、同じ期間内にWT動物の50%を殺傷するには1000CFUが必要であった。

30

【0118】

CD38は反応している免疫細胞及び気管支上皮から発現されるので(Fernandez JEら, J. Biol. Reg. Homeost. Agents 12:81-91)、WT又はCD38KO骨髄を、放射線照射したWT宿主に移植して、肺及び/又は免疫系におけるCD38発現が防御に必要であるか否かをテストした。再構成したキメラ動物はCD38+又はCD38-欠陥骨髄由来細胞を保有していたが、気管支上皮を含む他の全ての細胞型は、いずれのグループの動物においてもWT起源のものであった。次に、再構成マウスを肺炎連鎖球菌に感染させ、生存率をモニターした(図7B)。CD38KO骨髄を受容した再構成動物は、WT骨髄を受容したマウスに比べてはるかに感染しやすかった。このことは、肺炎連鎖球菌感染へのCD38KOマウスの高い罹病性が、骨髄由来リンパ系細胞及び/又は骨髄性細胞におけるCD38の欠陥によるものであることを示している。

40

【0119】

肺炎連鎖球菌へのCD38KO動物の高い罹病性が、細菌の成長及び全身部位への広がり

50

を抑制できないことによるものであるか否かを決定するために、CD38 KO及びWTマウスを1000 CFUの肺炎連鎖球菌に感染させ、感染後12時間で、肺及び血液中の細菌力価を評価した(図7C)。CD38 KOマウスの肺中の細菌力価は対照WTと比較して5倍高かった。しかし、CD38 KOマウスの血液中の細菌負荷量は、WTマウスに比べて200~500倍高かった。このことは、この細菌がCD38 KOマウスにおいて急速に広まることを示している。

【0120】

骨髄性細胞又はリンパ系細胞が細菌の蔓延促進の一因になるか否かを決定するために、Rag-2 KOマウス(Shin Kaiら, 1992 Cell 68:855-867) (リンパ球が不足しているが全ての骨髄性細胞上にCD38を発現することができる)及びCD38-Rag-2二重ノックアウトマウス(リンパ球が不足しており且つ骨髄性細胞上にCD38を発現することができない)を1000 CFUの肺炎連鎖球菌に感染させた後、12時間後に肺及び血液中の細菌力価を測定した(図7C)。リンパ系細胞不足CD38-Rag-2二重KOマウスの肺及び血液中の細菌力価はCD38 KOマウスに見られる細菌力価と同じくらい高く、Rag-2 KO又はWTマウスに比べて有意に高かった。従って、CD38欠陥骨髄性細胞は、肺炎連鎖球菌へのCD38 KOマウスの高い罹病性の一因である。

【0121】

CD38欠陥好中球は感染部位及び炎症部位に蓄積されない。骨髄性細胞が肺炎連鎖球菌に感染したCD38 KO動物の肺に適切に漸増されるか否かをテストするために、CD38 KO及びWTマウスを感染させた後、感染後に肺気道に漸増された細胞を数えた。CD38 KO及びWT動物の気道内の細胞の総数は、感染後6~18時間、同等に増加した(図8A)。しかし、好中球は、感染後12~18時間でWT動物の肺の中に見られる優性な細胞型であったが、CD38 KO動物の肺の中の浸潤細胞は、主にマクロファージから構成されていた(図8B~C)。従って、CD38は、感染部位及び炎症部位への好中球の漸増維持に必要であると思われる。

【0122】

CD38欠陥好中球は、化学誘引物質fMLPに対する不完全な走化性反応を起こす。好中球は、局所細胞及び侵入病原体により生成されるケモカイン及び化学誘引物質の勾配に反応して感染部位に移動する(Hubら, 1996 Chemoattractant Ligands and Their Receptors (Horuk編)301-325 (CRC Press, Boca Raton, FL); Servant G.ら, 2000 Science 287:1037-1040; Gao, J. L., 1999 J. Exp. Med 189:657-662)。化学誘引物質は好中球を速やかに活性化し、ランダムな遊走を誘導する(ケモキネシス)。走化性勾配が存在する場合、活性化された好中球の前縁は、その勾配の最も高い濃度に向かって分極し、方向性を持って移動する(走化性)。好中球は、ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニアラニン(phenylalanine)(fMLP)等の細菌由来ホルミル化ペプチドによりそのN-ホルミルペプチド受容体(FPR)が刺激されると、感染部位に向かって移動することは、既に証明されている。CD38 KO好中球がfMLPに向かって移動する能力に欠陥があるか否かをテストするために、トランスウェルチェッカーボードアッセイ(transwell checkerboard assay)にてCD38 KO好中球及びWT好中球がケモキネシス及び走化性により遊走する能力を測定した(Falkら, 1980 J. Immunol. Methods 33:239-247)(図8D)。上側及び下側のチャンバーにfMLPがなかった場合、又はfMLPが上側のチャンバーのみにあった場合、少ない(<2300細胞)が同等数のCD38 KO及びWT好中球が下側のチャンバーへと遊走した。等濃度のfMLPが上側及び下側のチャンバーにあった場合(ケモキネシス条件)、数は増加したが同等数のWT及びCD38 KO好中球が下側のチャンバーに遊走した。このことは、活性化により誘導されるfMLPへのケモキネシスが、CD38 KO及びWT好中球では等しかったことを示している。fMPLが下側のチャンバーのみ

10

20

30

40

50

に在った場合（走化性条件）、下側のチャンバーへのWT好中球の移動はさらに増加した。しかし、CD38KO好中球は、fMLP勾配の不在下に比べて走化性勾配の存在下では遊走性が僅かに高かっただけであった。このことは、CD38KO好中球が、細菌性化学誘引物質によって活性化されて遊走することができるが、走化性勾配には従うことができないことを示している。これがCD38KO好中球の一般的特性であるか否かを決定するために、ケモカインIL-8（好中球の強力な活性化物質である）を用いて同じ実験を行った（Baggioliniら, 1989 J. Clin. Invest 84:1045-1049）。fMLPで観察されたものとは対照的に、IL-8により誘導されたCD38KO及びWT好中球の走化性は同等であった（図8D）。このように、これらのデータは、CD38KO好中球が、幾つか（ただし全てではない）の化学誘引物質に対して不完全な走化反応を起こすことを示している。

【0123】

CD38は、好中球上に発現され、酵素的に活性である。CD38KO好中球は走化性において本質的な欠陥を有すると思われるので、マウス及びヒト好中球におけるCD38の発現及び酵素活性を測定した。WTマウスの骨髄及び血液から単離した好中球は、CD38を明らかに発現し（図9A）、同様に、ヒト末梢血好中球もCD38を発現した（図9B）。興味深いことに、WTマウスに炎症性物質であるチオグリコール酸塩を腹腔内注射したところ、血液及び腹膜腔から単離した好中球においてCD38発現が有意に増加した（図9D）。次に、CD38を発現する好中球がシクラーゼ反応を触媒することができるか否かをテストするために、WT及びCD38KO好中球を、NAD+類似体であるニコチンアミドグアニンジヌクレオチド（NGD）と一緒にインキュベートした後、NGDが環化して蛍光化合物サイクリックGDP-リボース（Graeffら, 1994 J. Biol. Chem 269:30260-30267）（cGDP R）となる様子を測定した。図9Cに示すように、NGDと一緒にインキュベートすると、WT好中球はcGDP Rを速やかに生成したが、CD38KO好中球はこれを生成しなかった。このことは、CD38を発現する好中球が、サイクリックヌクレオチドを生成する能力を持つことを示している。

【0124】

cADPR及びリアノジンは、好中球の中で細胞内カルシウム放出を誘導する。cADPRはリアノジン受容体（RyR）依存性貯蔵（Galioneら, 1991 Science 253:1143-1146）を介して細胞内カルシウム放出を誘導するので、RyR/cADPRカルシウムシグナル伝達経路が好中球において機能的であるか否かをテストした。RT-PCR分析を行ったところ、好中球はRyR3のmRNAを発現するが（Sorrentino, V.ら, 1993 TIPS 14:98-103; Hakamata Y.ら, 1992 FEBS Lett 312:229-235）、脳内で見られるものに比べてはるかに低レベルであることが分かった（図9D）。好中球により発現されるRyRが機能的であるか否かをテストするために、カルシウムを含まない緩衝液中で透過性とした後にリアノジンで刺激した好中球において、細胞内カルシウムレベル（ $[Ca^{2+}]_i$ ）を測定した（図9E）。リアノジンで刺激した好中球において少量ではあるが再現性のある $[Ca^{2+}]$ の増加（これはRyR阻害物質であるルテニウムレッドにより遮断することができる）が観察された（Galioneら, 1991 Science 253:1143-1146）。次に、好中球の中でcADPRが細胞内カルシウム放出を誘導することができるか否かをテストするために、カルシウムを含まない緩衝液中で好中球を透過性とした後、精製したcADPRで該細胞を刺激した（図9F）。僅かではあるが簡単に検出することができる細胞内遊離カルシウムの増加が観察された。cADPRをまず熱不活化により加水分解した場合（Leeら, 1989 J. Biol. Chem. 264:1608-1615）又は細胞を8-Br-cADPR（RyRへのcADPRの結合を競合的に拮抗するcADPRの不活性類似体）（Guseら, 1994 Annu. Rev. Immunol 12:593-633）で前処理した場合、カルシウム放出は観察されなかった。cADPR媒介性カルシウム放出に対するアン

タゴニスト 8 - Br - c A D P R の特異性はさらに、8 - Br - c A D P R が タブシガー
ギンにより媒介される細胞内遊離カルシウムの蓄積を遮断することができないことを示す
ことによって証明された (図 9 G)。まとめると、これらのデータは、R y R 及び c A D
P R を媒介としたメカニズムにより好中球の中で細胞内カルシウムが放出され得ること示
す。

【 0 1 2 5 】

C D 3 8 により触媒された c A D P R は、f M L P により活性化された好中球の中への細胞
外カルシウムの流入に必要である。ケモカイン / 化学誘引物質 G - タンパク質共役型受
容体 (例えば F P R や I L - 8 受容体等) を介したシグナル伝達により、細胞内カルシウム
放出と細胞外カルシウムの流入とが組み合わさることにより、 $[Ca^{2+}]_i$ が増大する
(Murphy, P. M., 1994 Annu. Rev. Immunol 12 :
593 - 633 ; Demaurex N. ら, 1994 Biochem J. 297 :
595 - 601 ; Schorr W. ら, 1999 Eur. J. Immunol 29
: 897 - 904 ; Lew ら, 1989 Eur. J. Clin. Invest. 19
: 338 - 346)。C D 3 8 K O 好中球は、f M L P への走化性アッセイにおいて欠
陥があり、カルシウムを動員する代謝産物である c A D P R を生成する能力を持たないの
で、C D 3 8 K O 好中球において f M L P に反応したカルシウム動員に欠陥があるという
仮説がたてられた。これをテストするために、カルシウムを含まない培地中で、C D 3 8
K O 又は W T 好中球を f M L P 又は I L - 8 で刺激し、細胞内カルシウム放出を測定した
(図 10 A)。f M L P で刺激した W T 好中球では、すぐに細胞内カルシウムの急激な上
昇が観察され、その後 5 分間かけて徐々に減少した。これに対して、f M L P で刺激した
C D 3 8 K O 細胞では、f M L P で刺激した後の $[Ca^{2+}]_i$ の量は約 20% 減少し、
この $[Ca^{2+}]_i$ は、少なくとも 2 分早く、基準線まで減少した。f M L P で刺激した
C D 3 8 K O 好中球において見られる $[Ca^{2+}]_i$ の低さとは異なり、I L - 8 で刺激
した C D 3 8 K O 及び W T 好中球の $[Ca^{2+}]_i$ は同じであった。従って、これらのデ
ータは、C D 3 8 が f M L P 刺激後の最適な細胞内カルシウム放出に必要なであるが、I L
- 8 刺激後には必要ではないことを示した。

【 0 1 2 6 】

次に、C D 3 8 が細胞外カルシウムの流入に必要であるか否かを評価するために、カルシ
ウム含有培地の中で、刺激した C D 3 8 K O もしくは W T 好中球を f M L P 又は I L - 8
で刺激した (図 10 B)。f M L P を W T 好中球に加えた場合、細胞内カルシウム放出に
よる $[Ca^{2+}]_i$ の急激な上昇が観察されると同時に、細胞外カルシウムの流入によっ
て、2 度目の長い $[Ca^{2+}]_i$ の上昇も観察された。極めて対照的に、この反応のカル
シウム流入期は、f M L P で刺激した C D 3 8 K O 好中球においてほぼ皆無であった。興
味深いことに、カルシウム含有培地中において W T 及び C D 3 8 K O 好中球を I L - 8 で
刺激した場合、I L - 8 は、W T 及び C D 3 8 K O 好中球の両方において $[Ca^{2+}]_i$
の同等の急激な上昇を誘導し、これは急速に基準線レベルまで減少することが分かった
。このことは、W T 又は C D 3 8 K O 好中球のいずれにおいても I L - 8 が細胞外カルシ
ウムの流入を誘導しなかったことを示している。

【 0 1 2 7 】

c A D P R が f M L P により刺激された好中球においてカルシウム動員を調節するか否か
を決定するために、C D 3 8 K O 及び W T 好中球を、濃度を段階的に高くした c A D P R
アンタゴニスト、8 - Br - c A D P R と一緒に予めインキュベートさせておいた後、f
M L P 又は I L - 8 で刺激した (図 10 C)。8 - Br - c A D P R で処理した W T 細胞
を f M L P で刺激した場合、細胞内カルシウムの放出ならびに細胞外カルシウムの流入は
用量依存式に C D 3 8 K O 細胞内で見られるレベルにまで低下した。これに対し、I L -
8 で刺激した好中球に 8 - Br - c A D P R を加えても、W T 又は C D 3 8 K O 好中球い
ずれの $[Ca^{2+}]_i$ に対しても全く影響を及ぼさなかった。まとめると、これらのデー
タは、C D 3 8 により生成された c A D P R が f M L P に反応した細胞内カルシウム放出
及び細胞外カルシウム流入を調節すること、ならびに C D 3 8 と c A D P R はいずれも、

10

20

30

40

50

IL - 8 で刺激した好中球におけるカルシウム動員には必要でないことを示す。

【0128】

CD38 により触媒される cADPR は、fMLP への好中球の走化性に必要であるが、IL - 8 への走化性には必要ではない。cADPR により媒介されるカルシウム動員が fMLP への走化性に必要であるか否かをテストするために、WT 好中球を、EGTA 又は 8 - Br - cADPR と一緒に予めインキュベートした後、チェッカーボード走化性アッセイにおいて fMLP 又は IL - 8 への走化性を測定した (図 10D)。WT 好中球 (前処理なし) を、上側のチャンバーの中で培地と一緒に、及び下側のチャンバーの中で fMLP 又は IL - 8 と一緒にインキュベートした場合、細胞は下側のチャンバーに効率良く遊走した。しかし、細胞外カルシウムを EGTA でキレートした場合又は細胞を cADPR 10
アンタゴニストである 8 - Br - cADPR で前処理した場合、fMLP への WT 好中球の走化性は、80% 以上減少した。重要なことは、EGTA 又は 8 - Br - cADPR で処理しても、好中球が IL - 8 に向かって遊走する能力に対して全く影響を及ぼさなかった。従って、cADPR 媒介性細胞内カルシウム放出によって調節される細胞外カルシウムの流入は、好中球の fMLP 誘導型走化性に必要である。

【0129】

NAD⁺ の類似体は、IL - 8 ではなく fMLP への好中球の走化性を CD38 - 依存式に阻害する。CD38 により触媒される cADPR は、fMLP への好中球の走化性にとって必要であると思われたので、この走化性は、CD38 により cADPR シグナル伝達経路のアンタゴニストへと変換され得る NAD⁺ 類似体で好中球を処理することによって 20
阻害することができるであろう、と予想された。この仮説をテストするために、好中球を、CD38 によって、本発明者らの初期の実験で使用した cADPR アンタゴニストである 8 - Br - cADPR へと変換されることができる基質、ニコチンアミド 8 - プロモアデニンジヌクレオチド (N - (8 - Br - A) D⁺) で前処理した。fMLP により活性化された好中球において N (8 - Br - A) D⁺ が細胞外カルシウムの流入を変化させるか否かをまずテストするために、WT 好中球を N (8 - Br - A) D⁺ で前処理しておき、細胞を fMLP で刺激した後、[Ca²⁺]_i を測定した (図 11A)。N (8 - Br - A) D⁺ で前処理したところ、fMLP で処理した好中球の中への細胞外カルシウムの入り込みを阻害した。次に、WT 及び CD38 KO 好中球を N (8 - Br - A) D⁺ で前 30
処理するか又は培地のみの中に入れておいた後、これらが fMLP (図 11B) 又は IL - 8 (図 11C) に向かって遊走する能力についてテストした。未処理の WT 好中球は fMLP 及び IL - 8 の両方に向かって移動し、一方、未処理の CD38 KO 好中球は fMLP へ向かって移動することはできなかったが IL - 8 へは移動することができた。興味深いことに、WT 好中球を N (8 - Br - A) D⁺ で前処理したところ、fMLP への好中球の走化性を著しく低下させたが、IL - 8 へ向かって遊走する能力には全く影響を及ぼさなかった。N (8 - Br - A) D⁺ で CD38 KO 好中球の前処理を行ったところ、fMLP 又は IL - 8 への CD38 KO 好中球の走化性には全く影響を及ぼさなかった。このことは、N (8 - Br - A) D⁺ により誘導された、fMLP により媒介される走化性の阻害は、CD38 依存性であることを示している。まとめると、これらのデータは、 40
NAD⁺ 類似体が、CD38 依存式にカルシウム応答及び好中球の走化性を調節することができることを示している。

【0130】

7. 実施例：アレルギー性肺疾患のマウスモデル及び CD38 の役割

以下のサブセクションは、CD38 欠陥好酸球が、アレルゲンにより誘導される気道炎症部位に漸増されることができないことを示すデータについて記載する。

【0131】

7. 1. 材料及び方法

OVA による初回抗原刺激及び感作：C57BL/6 WT マウスを、ミョウバンに吸着させた 20 µg のニワトリオボアルブトニン (ovalbumin, OVA) の腹腔内投与により免疫した。免疫したマウスを免疫後 30 日で犠牲にし、抗 CD4 に直接結合 50

させたM A C S磁気ビーズを用いて、O V Aで初回抗原刺激したC D 4 T細胞を脾臓から精製した。抗C D 4結合M A C Sビーズを用いて、免疫していないC 5 7 B L / 6 W Tマウスから、ナイーブC D 4 T細胞を精製した。ナイーブなもしくはO V Aで初回抗原刺激したT細胞を、C 5 7 B L / 6 W Tマウス又はC D 3 8 K O受容マウスに、マウス1匹あたり 1×10^7 個のC D 4 T細胞の割合で静脈内注射し、それぞれ10匹のマウスで構成される4つのグループを作製した(図11A及びBに図示)。次に受容マウスを、T細胞移植の直後から7日間連続して、O V A(10 μ g)のP B S溶液中の気道内投与により感作した。T細胞移植後8日目にマウスを犠牲にし、上記第6.2.2節に記載したように気管支肺胞(b r o n c h e o a l v e o l a r)洗浄により肺の気道及び肺胞から浸潤細胞を取り出した。次に、血球計でカウントすることにより細胞の総数を数え、細胞を遠心分離してスライドガラスに載せ、D i f f - Q u i c kで染色し、倍率400xでスライド1枚あたり少なくとも200個の細胞を同定することにより、分画細胞のカウント(d i f f e r e n t i a l c e l l c o u n t)を行った。

10

【0132】

7.2. 結果

C D 3 8が、好中球以外の細胞の肺への漸増を制御するか否かを決定するために、ヒト喘息の特性の多くに似た特性を示すアレルギー性疾患のマウスモデルを用いた(L l o y d C Mら, 2001, A d v . I m m u n o l . 77:263-295)。喘息の重要な構成要素は、気道の炎症であり、これは、肺に漸増された好酸球の活性によって誘導されるもしくは悪化すると考えられる。好酸球は主に喘息の病理を担当するが(B r o i d e, D Hら, 1991, J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . 88:637-648)、これらの漸増及び機能は、アレルギー性の抗原により初回抗原刺激されたT細胞によって制御されるようである(G a v e t tら, 1994, R e s p i r . C e l l M o l . B i o l . 10:587-593)。このようなT細胞はしばしば、I L - 4、I L - 5及びI L - 13等の2型サイトカインならびにエオタキシン等のケモカインを生成する(C o h n, L.ら, 1988, J . I m m u n o l . 161:3813-3816; D r a z e n J Mら, 1996, J . E x p e r M e d . 183:1-5)。T細胞の活性化に対するC D 3 8のあらゆる影響とは無関係にC D 3 8が好酸球の漸増を調節する能力を検証するために、W Tマウスを抗原O V Aで免疫した。30日後、これらのO V Aで初回抗原刺激したマウスから得たC D 4 T細胞を、W TもしくはC D 3 8 K O受容マウスに移植した。対照として、免疫していないW TマウスからナイーブC D 4 T細胞をW TもしくはC D 3 8 K O受容マウスに移植した。次に受容マウスを、T細胞移植直後から8日間連続してO V A(10 μ g)のP B S溶液の気道内投与により感作した。T細胞移植後9日目にマウスを犠牲にし、肺の気道内の細胞数を数えた。

20

30

【0133】

図12Aに見られるように、ナイーブC D 4 T細胞を受容したか又は初回抗原刺激したC D 4 T細胞を受容したかにかかわらず、実質的な数の好中球がW Tマウスの気道に漸増された。これとは対照的に、初回抗原刺激したT細胞を受容したC D 3 8 K Oマウス(t r i c e)は、ナイーブT細胞を受容したC D 3 8 K Oマウスに比べてかなり多くの好中球を気道内に有していたが、W Tマウスの気道に比べてC D 3 8 K Oマウスの気道には比較的少ない数の好中球が漸増された。このように、アレルギー性気道疾患のモデルにおける肺への好中球の漸増も、C D 3 8の発現に依存する。

40

【0134】

O V Aで感作したマウスの気道への好酸球の漸増は、初回抗原刺激されたC D 4 T細胞及びC D 3 8の発現の両方の存在に顕著に依存する。図12Bに見られるように、初回抗原刺激を受けたC D 4 T細胞を受容したC D 3 8 K Oマウスの肺に漸増された好酸球の数は初回抗原刺激を受けたC D 4 T細胞を受容したW Tマウスのそれに比べて30倍少なく、ナイーブC D 4 T細胞を受容したC D 3 8 K Oマウスの気道に漸増された好酸球の数はナイーブC D 4 T細胞を受容したW Tマウスのそれに比べて10倍少なかった。

50

従って、アレルギー性気道疾患のモデルにおける肺への好酸球の漸増も、CD38に依存する。

【0135】

8. 実施例：マンソン住血吸虫CD38相同体のクローニング

以下のサブセクションは、SM38と呼ばれるマンソン住血吸虫CD38相同体のクローニング及び配列決定について記載する。マンソン住血吸虫等の蠕虫は、多くの無脊椎動物、脊椎動物、及び植物種に感染して病理発生を引き起こし得る寄生虫として広く定義されている。住血吸虫属は、生息場所が温血脊椎動物の血流に限定されている寄生性扁虫から構成される。マンソン住血吸虫を含む住血吸虫属に属する4つの種は、年間2～4億人に疾患を引き起こし、毎年多い年で100万人の死者を出している（WHO、1996）。さらに、住血吸虫属に属する種のうち少なくとも2種は、家畜のウシ及びヒツジに感染して深刻な経済的損失を引き起こしている。従って、感染したヒト及び/又は動物を治療するために使用することができる効果的な抗生物質を開発することが有益である。住血吸虫感染の病理発生は、主に、ヒト及び動物の様々な組織及び器官に成虫が入り込んで卵を産みつけ、その後そこに肉芽腫が形成されて線維症及び組織の損傷をもたらすことにより引き起こされる。しかし、セルカリア（未成熟蠕虫）及び完全に成熟した蠕虫も、同じく免疫性炎症反応を誘導し得る沢山のタンパク質及び脂質性炎症媒介因子（mediator）を放出する（Fusco, ACB, 1991, J. Paristol. 77: 649-657）。住血吸虫症のとおきの治療薬は、筋収縮及び麻痺を即時に引き起こす蠕虫の外皮を通るカルシウムの流入を誘導すると思われる薬物プラジカンテルである（Kohn, AB, 2001, J. Biol. Chem 276: 36873-36876）。従って、住血吸虫のカルシウム応答（特に筋肉内）を調節する薬物が、この疾患の治療において効果的であろう。

10

20

【0136】

8.1. 材料及び方法

8.1.1. マンソン住血吸虫CD38相同体のクローニング

Genbank受託番号AW017229で提供されるEST配列に対応するプライマーを作製した。（5'側プライマー：acatctttgtggtaactgaatggctcgg及び3'側プライマー：tgagtaatgtctcgcgactttgacctc）。PhillipLoVerde博士（SUNY, Buffalo）からマンソン住血吸虫cDNAライブラリーを入手し、上記プライマーを用いてPCRにかけた。このライブラリー（1～20μl）及びdH₂Oを70μlまで10分間加熱した後、PCR試薬の残りと一緒にPCRサイクルを繰り返した。PCRサイクルは以下の通りであった：95℃にて5分間を1回行った後、95℃にて1分間、65℃にて1分間、及び72℃にて2分間を35回繰り返した後、72℃にて5分間を1回。ESTAW017229に対応する推定330bpバンドを単離し、TOPOクローニングを行った後、プローブとして用いて、マンソン住血吸虫cDNAライブラリーから250,000プラークをスクリーニングした。5つの陽性クローンを単離した後、プラーク純粋クローン（plaque pure clone）を作製するために、さらに3回スクリーニングにかけた。全ての5つのクローンの両鎖を全て配列決定した。これらのクローンのうち4つのヌクレオチド配列及びアミノ酸翻訳は全く同じであった（SM38と呼ばれる）。停止コドン及びポリアデニル化部位は、これらのSM38クローンの全てにおいて同定されたが、開始メチオニンはこれらのクローンのいずれにも存在しなかった。SM38遺伝子の5'側末端を得るために、単一プライマー伸長法（NAR, 1994, vol 22, No. 16, p. 3427-3428）を用いた。PCRの第1ラウンドは、外側SM38プライマー（5'catcgaataaccctgatttcataacac）及びBluescript用の万能逆方向プライマー（universal reverse primer）を用いて行った。次にこの反応物2μlを、内側nested SM38プライマー（5'gataaagtaagaactcgtgcc）及び万能逆方向プライマーを用いたPCRにかけた。この反応物から200bpバンド及び300bpバンドを同定し

30

40

50

、直接配列決定を行った。得られた配列は、SM38クローンの5'側末端と124bp重複しており、さらに153bpの追加配列を含んでいたが、停止コドンは検出されず、このことは、本発明者らがこの遺伝子の5'側末端をまだ得ていなかったことを示している。従って、マンソン住血吸虫蠕虫の成虫から単離したRNAから調製したcDNAを用いて、古典的な5'RACE(PNAS vol 85 pp 8998-9002, Dec. 1998)を行った(RNAはP. Lo Verde博士(SUNY Buffalo)により提供された)。10xTaq緩衝剤、dNTP、cDNA及びExpand High Fidelity TaqをdT-APプライマーと合わせ(詳細についてはref.を参照されたい)、以下のサイクルを行った: 95にて5分間の後、50にて2分間及び72にて40分間。この40分間のインキュベーションの後、5'側の外側SM38プライマー(上記を参照されたい)及びAPプライマーを加え、以下の条件下において35サイクルを繰り返した: 95にて15秒間、47にて30秒間、72にて2分間の後、72にて5分間伸長。これらの反応物を1.5%アガロースゲル上で泳動させ、Qiagen Gel Kitを用いて300bpバンドを単離した。AP及び5'外側SM38プライマーを用いて5'RACE生成物を直接配列決定した。その配列の中で2つの潜在的な開始メチオニンが同定され、これらのメチオニン残基の13~19アミノ酸上流に2つの停止コドンが見つかった。続いてRACE生成物をクローニングした。SM38配列を含む全ての3つのクローン(PCRにより作製した2つのクローン及びマンソン住血吸虫cDNAライブラリーから得た1つのクローン)は隙間なく重複していた。アセンブルしたところ、SM38配列は、5'側非翻訳配列、2つの潜在的開始メチオニン、303アミノ酸タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム、停止コドン、3'側非翻訳配列、及びポリアデニル化部位を含む1049bpの配列を含んでいた。

【0137】

8.2. 結果

住血吸虫の筋線維においてカルシウム応答を調節する薬物は、有効な抗蠕虫試薬であると思われるので(Kohnら, 2001, J. Biol. Chem. 276:36873-36876)、本発明者等は、住血吸虫の特定のカルシウム調節標的の同定に着手した。最近になって、住血吸虫がその筋線維の中でリアノジン受容体(RyR)を発現することが分かった(Dayら, 2000, Parasitol. 120:417-420; Silvaら, 1998, Biochem. Pharmacol. 56:997-1003)。脊椎動物の平滑筋及び骨格筋において発現されるRyRのアゴニストは、細胞内カルシウム放出、電圧依存性カルシウム流入及び筋収縮性を調節することが知られている。興味深いことに、カフェイン等のRyRアゴニストでマンソン住血吸虫筋線維を処理したところ、細胞内カルシウムの放出を誘導し、筋線維の収縮を誘導した。カフェイン等の薬物はRyR依存性カルシウム応答を調節することができるが、(少なくとも脊椎動物の筋線維において)RyRの生理的調節因子(physiological modulator)は、サイクリックADP-リボース(cADPR)である。cADPRは、哺乳動物CD38タンパク質等のADP-リボシルシクラーゼ酵素及び無脊椎動物アメフラシシクラーゼ酵素によって生成される公知のカルシウムを動員する代謝産物である。住血吸虫がカルシウムを動員する2次メッセンジャーであるcADPRを生成することができる酵素を発現するか否かを決定するために、翻訳されたときに哺乳動物CD38及びアメフラシ酵素と相同性を有する住血吸虫配列を求めて、一般利用可能なEST配列の検索を行った。隙間なく重複する配列へとアセンブルすることができる3つのEST配列(EST AI067047、EST AW017229及びEST N20756)を同定した(図13)。このアセンブルされた配列は、CD38及びアメフラシシクラーゼ酵素の両方と、限定的ではあるが有意な相同性を共有していた。

【0138】

アセンブルされたESTが事実上、原物に忠実なcDNA(authentic cDNA)を表すか否かを決定するために、EST AW017229の配列からプライマーを

調製し、マンスン住血吸虫 cDNA ライブラリーに対して PCR を行った。PCR 反応物から 330 塩基対のフラグメントを単離し、配列決定した。予想通り、このフラグメントの配列は EST の配列と一致した。次にこのフラグメントをプローブとして用い、マンスン住血吸虫 cDNA ライブラリーから 250,000 個のプラークをスクリーニングした。EST プローブにハイブリダイズした 5 つの独立したプラークを単離し、プラークを精製し、両方の DNA 鎖の配列決定を行った。次に、この配列の情報を用いてさらなるプライマーを設計し、該 cDNA の 5' 側末端を単離した(「方法」を参照されたい)。次に、マンスン住血吸虫ライブラリーから単離した完全な cDNA 配列をアセンブルして、EST と比較した。図 13 に示すアラインメントは、EST 配列の隙間のないアセンブリが正しいこと、及びクローニングされた cDNA (SM38 と呼ばれる)が、どの EST にも見られない少なくとも 421 塩基対の異なる配列を含んでいたことを示す。この DNA 配列が翻訳されると、シクラーゼ酵素に典型的な構造モチーフを含む 299 アミノ酸配列が生成する(図 14)(Prasad, GS, 1996 Nature Struct. biol. 3:957-964)。特に、SM38 タンパク質は、アメフラシシクラーゼ酵素(Munshi C ら, 1999, J. Biol. Chem. 274:30770-30777)及び哺乳動物 CD38(Munshi C ら, 2000, J. Biol. Chem. 275:21566-21571; Graeff R. 2001, J. Biol. Chem. 276:12169-12173)に見られる重要な触媒部位及び活性部位の残基とアラインメントされる、保存されたアミノ酸残基を含む(図 15A~B)。さらに、シクラーゼ酵素の 3 次構造のアセンブリにとって重要なシステイン残基(Prasad GS ら, 1996, Nature Struct. biol. 3:957-964)もまた SM38 において保存されている(図 15A~B)。重要なことに、SM38 cDNA 配列は完全なシクラーゼ酵素ドメインをコードする(図 16)。

【0139】

これらの結果に基づいて、本発明者等は、マンスン住血吸虫等の住血吸虫が、カルシウム動員の 2 次メッセンジャーである cADPR の産生を触媒することができる酵素に、構造レベルで高い相同性を有するタンパク質(SM38)をコードすることを証明した。また住血吸虫は、cADPR に反応して細胞内カルシウムを放出する RyR も発現するので、SM38 は住血吸虫においてカルシウム応答を調節できると推測される。さらに、特に住血吸虫の筋線維におけるカルシウム流入の調節は、蠕虫の麻痺及び浄化をもたらすことができるので、本発明者等は、住血吸虫において SM38 及び RyR 経路のアゴニスト/アンタゴニストが抗蠕虫薬として有効であると予想している。

【0140】

本発明は、本明細書中に記載された特定の実施形態によってその範囲を限定されるものではなく、これらの実施形態は、本発明の個々の態様の一例として記載されるのであって、機能的に同等な方法及び構成要素は、本発明の範囲内に含まれる。実際に、本明細書中に示され記載されたもの以外にも、前述の説明及び添付の図面から、当業者には、本発明の様々な変更が自明となろう。このような変更は特許請求の範囲内に含まれるものとする。様々な出版物が本明細書中に引用されているが、これらの内容は本明細書中に参考として全て組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、化学誘引物質のシグナル伝達に対する正常な細胞応答を示す。(1)化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する。(2)CD38 が NAD を加水分解して cADPR を生じ、cADPR は Ca^{2+} の内部貯蔵からの放出を促進する。(3)cADPR により制御される内部貯蔵から Ca^{2+} が放出され、これにより外部の Ca^{2+} チャンネルを活性化する。(4)細胞外 Ca^{2+} が細胞内に流れ込み、遊走を可能にする。

【図 2】

図 2 は、CD38 による cADPR 産生の阻害物質は、容量性 Ca^{2+} 流入及び化学誘引

物質誘導型遊走を妨げることについて示す（スクリーニングはこのような化合物を同定する）。（１）化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する。（２）CD38の阻害物質が、NADの加水分解を妨げる（酵素は不活性であり生成物は作られない）、又はcADPRの生成を特異的に阻害する（ADP-リボシルシクラーゼ活性を遮断するが酵素は不活性でない場合がある）。（３）cADPRの欠乏により、内部貯蔵からのcADPRを媒介としたCa²⁺放出が起こらない。（４）容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図３】

図３は、CD38酵素活性を調節するタンパク質について示す（スクリーニングはこれらのタンパク質を活性化もしくは不活化する化合物を同定する）。（１）化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する。（２）タンパク質XがCD38を修飾してCD38酵素活性を不活化する。（３）cADPRの欠乏により、内部貯蔵からのcADPRを媒介としたCa²⁺放出が起こらない。（４）容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

10

【図４】

図４は、CD38発現を調節するタンパク質について示す（スクリーニングはこれらのタンパク質を活性化もしくは不活化する化合物を同定する）。（１）化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する。（２）タンパク質XがCD38遺伝子の転写を抑制する。（３）CD38の欠乏によりcADPRがなくなるため、内部貯蔵からのcADPRを媒介としたCa²⁺放出が起こらない。（４）容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

20

【図５】

図５は、CD38の代替りとなる基質は、cADPRの阻害物質を生成して容量性Ca²⁺放出を妨げ得ることについて示す（スクリーニングはこのような化合物を同定する）。（１）化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する。（２）CD38が改変された基質（例えば8-BrNAD）を加水分解し、改変型生成物（例えば8-Br-cADPR）を生成する。（３）改変型生成物が、内部貯蔵からのcADPR誘導型Ca²⁺放出を競合的もしくは非競合的に阻害する。（４）容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図６】

図６は、cADPR結合の阻害物質は容量性Ca²⁺流入を遮断することを示す。（１）化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する（スクリーニングはこのような化合物を同定する）。（２）CD38がNADを加水分解してcADPRを生成する。（３）cADPRの阻害物質（8-Br-cADPR）は、内部貯蔵からのcADPR誘導型Ca²⁺放出を競合的もしくは非競合的に遮断する。（４）容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

30

【図７】

図７は、CD38 KOマウスは、肺炎連鎖球菌感染にかかりやすいことを示す。（a）C57BL/6WTマウス（白い円）及びCD38 KOマウス（黒い円）に肺炎連鎖球菌を2回気管内投与して感染させた。その後4日間、感染マウスの生存率をモニターした。（b）放射線照射し、WT骨髄（白い四角形）又はCD38 KO骨髄（黒い四角形）で再構成したWTマウスに肺炎連鎖球菌を2回投与して感染させ、4日間モニターした。データは、少なくとも5回の独立した実験を行った結果を表す。n = 10マウス/グループ。（c）WT又はRag-2 KOマウス（白いバー）及びCD38 KO又はCD38-RAG-2二重KOマウス（黒いバー）に肺炎連鎖球菌を気管内投与して感染させ、感染の12時間後に、肺及び末梢血中の細菌力価を測定した。データは3回の独立した実験を行った結果を表す。n = 10マウス/グループ。* P < 0.001; スチューデントt検定。

40

【図８】

図８は、CD38 KO好中球は感染部位に集合せず、細菌由来化学誘引物質に向かって遊走することができないことを示す。（a）WTマウス及びCD38 KOマウスに肺炎連鎖

50

球菌を気管内投与して感染させ、感染後の複数の経過時間ポイントにおいて、気道の中の浸潤細胞を回収してカウントした（パネル a、WT = 白いバー及びCD38KO = 黒いバー）。(b) 感染したWTマウス及びCD38KOMマウスの肺の中の浸潤細胞の正体及び頻度を、顕微鏡検査（倍率×400）及びDiff-Quick染色した細胞遠心分離調製物のカウントによって決定した。(c) WTマウス（白いバー）及びCD38KOMマウス（黒いバー）の肺洗浄における分画した細胞の数を、細胞の平均数×10⁶ + (SE) として表す。5回の独立した実験において同様の結果が得られた。n = 5マウス/グループ/経過時間ポイント。*P < 0.01 **P = 0.01; スチューデントt検定。(d) 従来の特ランスウェルチェッカーボードケモキネシス/走化性アッセイにおいて、WTマウス（白いバー）及びCD38KOMマウス（黒いバー）から精製した骨髓好中球の、培地fMLP又はIL-8に反応して遊走する能力についてテストした。何の刺激も与えない時に、特ランスウェルの下側のチャンバーに移動する細胞の数は、CD38KO好中球とWT好中球とでは大きな差はなく、1500~2300細胞であった（図示せず）。同等の濃度の刺激に反応して両方のチャンバーに移動する（ケモキネシス）好中球の数及び走化性勾配（chemotactic gradient）に反応して遊走する好中球の数（走化性）を表す。図示した値は、4回の異なる実験の平均 + S.E. である。*P < 0.001; スチューデントt検定。

10

【図9】

図9は、好中球を発現するCD38はcADPRを産生し、cADPR及びリアノジンに反応して細胞内カルシウムを放出することを示す。(a) WTマウス及びCD38KOMマウス、又は12時間前にチオグリコール酸塩を腹腔内注射しておいたWTマウス及びCD38KOMマウスから、骨髓細胞、末梢血細胞及び腹膜腔細胞を単離した。Mac-1^{hi}GR-1^{hi}好中球上でのCD38発現をフローサイトメトリーにより分析した。WT好中球上（実線ヒストグラム）及びCD38KOM好中球上（破線ヒストグラム）でのCD38の発現を表す。(b) CD15+ヒト末梢血好中球を、抗-CD38mAb（黒く塗りつぶしたヒストグラム）又はアイソタイプの対照Ab（破線）で染色することにより、CD38発現について評価した。(c) WT及びCD38KOMの骨髓好中球におけるシクラーゼ活性を測定した。WTもしくはCD38KOMの好中球を単独で（WT = 円及びCD38KOM = 四角形）又はNGDの存在下で（WT = 三角形及びCD38KOM = ダイヤモンド形）10分間インキュベートした。蛍光分析により生成物cGDPの蓄積を測定した。(d) RT-PCRによりRyR3 mRNA発現レベルを測定した。精製したWT骨髓好中球（PMN）又は脳組織からcDNAを単離した。cDNAの投入量が示されている。(e~g) Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球においてFACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。(e) 好中球をジギトニンで透過性とした後、ルテニウムレッドの存在下（オレンジのライン）又は不在下（ブルーのライン）においてリアノジンで刺激した。(f) 好中球をジギトニン中で透過性とした後、cADPR（ブルーのライン）、熱不活化cADPR（緑色のライン）又は8-Br-cADPR+cADPR（赤いライン）で刺激した。(g) 好中球をタブシガーギン（ブルーのライン）又はタブシガーギン+8-Br-cADPR（赤のライン）で刺激した。パネルe~gの中の全てのデータは、少なくとも3回の独立した実験を行った結果を表す。

20

30

40

【図10】

図10は、CD38の触媒作用により生成したcADPRは、好中球における細胞内カルシウム放出、細胞外カルシウムの流入及び走化性を調節することを示す。(a~c) Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球においてFACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。(a) CD38KOM（赤いライン）及びWT（ブルーのライン）の好中球を、カルシウムを含まない緩衝液の中でfMLP又はIL-8で刺激した。(b) CD38KOM（赤いライン）及びWT（ブルーのライン）の好中球を、カルシウム含有緩衝液の中でfMLP又はIL-8で刺激した。(c) CD38KOM（赤いライン）及びWT（ブルーのライン）の好中球を、カルシウム含有培地+8-Br-cADPRの中で予めインキュベートした後、fMLP又はIL-8で刺激した。パネルa~cの中の

50

全てのデータは、少なくとも5回の独立した実験を行った結果を表す。(d) WT好中球を培地EGTA又は8-Br-cADPRと一緒に予めインキュベートした後、下側チャンパーの中にfMLP又はIL-8を含むトランスウェルの上側チャンパーの中に入れた。走化性勾配に反応して下側のチャンパーに移動した細胞を回収し、フローサイトメトリーにより数えた。図示した値は、各実験条件当たり3ウェルを用いて3回の別々の実験から得た平均 \pm S.E.である。 $**P = 0.008$; Mann Whitney Rank Sum検定。

【図11】

図11は、NAD+類似体は、fMLPで活性化した好中球においてカルシウムの流入及び走化性を調節することを示す。(a)染料を負荷したWTマウス由来精製骨髄好中球を、培地(ブルーのライン)又は濃度の異なるN(8-Br-A)D+(赤いライン)の中で予めインキュベートした後、fMLPで刺激した。フローサイトメトリーにより細胞内カルシウムレベルの変化を測定した。データは、3回の独立した実験を行った結果を表す。(b~c)WT好中球(左側のパネル)及びCD38KO好中球(右側のパネル)を、培地(黒いバー)又はN(8-Br-A)D+(白いバー)と一緒に予めインキュベートした後、下側チャンパーの中にfMLP(パネルb)又はIL-8(パネルc)を含むトランスウェルの上側チャンパーの中に入れた。走化性勾配に反応して下側チャンパーに移動した細胞を回収し、フローサイトメトリーにより数えた。図示した数値は、3ウェル/実験条件を用いて3回の別々の実験から得た平均 \pm S.E.である。 $*P < 0.001$ スチューデントt検定。

10

20

【図12】

図12A及び図12Bは、アレルギー性喘息のモデルにおける好中球及び好酸球の肺への集合は、CD38KOマウスにおいて損なわれていることを示す。WT C57BL/6マウスから得た未感作(naive)CD4T細胞又はWT C57BL/6マウスから得たOVAで初回免疫刺激を行ったCD4T細胞を、示されているようにWT C57BL/6マウス又はCD38KO-C57BL/6マウスに移植した。次に受容マウスを連続7日間、OVA(10 μ g)のPBS溶液の気管内点滴注入によりチャレンジした。一回目のチャレンジを行った後8日目に、Diff-Quick染色した細胞遠心分離調製物の顕微鏡検査(倍率400 \times)により、肺洗浄における好中球(A)及び好酸球(B)を数えた。

30

【図13】

図13は、マンソン住血吸虫SM38 cDNAとマンソン住血吸虫ESTとの比較結果を示す。「方法」に記載されるように、マンソン住血吸虫 cDNAライブラリーからSM38 cDNAを単離し、クローニングした。SM38のcDNAは、5'側非翻訳配列(グレーのボックス)、開始メチオニン(下線部)、303アミノ酸タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(白いボックス)、停止コドン(下線部)、3'側非翻訳配列(グレーのボックス)、及びポリアデニル化部位(下線部)を含む。完全長cDNAを、公表されているマンソン住血吸虫EST配列と比較したところ、SM38配列の一部と同一である3つの別々のEST配列が見つかった。SM38 cDNAは、一般データベースには見られない421塩基対のユニークな配列(70bpの5'側非翻訳配列及び351bpのオープンリーディングフレーム)を含む。

40

【図14】

図14は、SM38 cDNAの翻訳産物を示す。SM38 cDNAは全てのリーディングフレームにおいて翻訳され、303個のアミノ酸からなるオープンリーディングフレームが同定された。開始コドンは71位~73位のヌクレオチドに位置し、停止コドンは980~983位のヌクレオチドに見られる。

【図15】

図15は、SM38はアメフラシADP-リボシルシクラーゼ及びヒトCD38シクラーゼと相同であることを示す。SM38のタンパク質配列を、アメフラシADP-リボシルシクラーゼ(パートa)及びヒトADP-リボシルシクラーゼCD38(パートb)のタ

50

ンパク質配列とアラインメントした。アメフラシタンパク質とSM38との間には21%の同一性、及びヒトCD38とSM38との間には23%の同一性という、高い相同性(ボックスで囲まれた残基)が観察された。シクラーゼタンパク質ファミリーの全てのメンバーの中に存在する保存された10個のシステイン残基も、SM38中に存在する(影付きのボックス)。SM38ではまた、CD38の中に見られる2個の更なるシステイン(下線部)(アメフラシには見られない)が欠失している。しかし、SM38タンパク質は、CD38にもアメフラシシクラーゼにも見られないユニークな2個の更なるシステイン残基を含む(下線部)。最も重要なことに、CD38及びアメフラシ酵素について同定された活性部位触媒残基(星印がついた残基)も、SM38の中に存在する。

【図16】

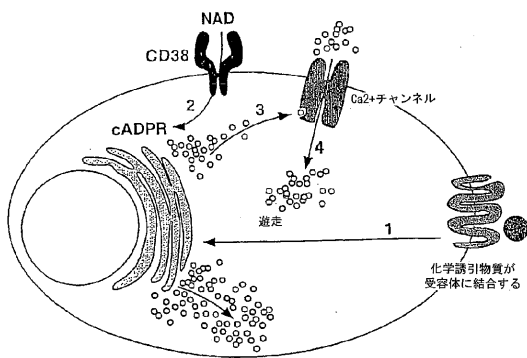
図16は、SM38は可溶性タンパク質であることを示す。SM38タンパク質が、CD38のようなII型膜結合タンパク質であるか、アメフラシシクラーゼのような可溶性タンパク質であるか、他のシクラーゼファミリータンパク質のようなGPI結合型タンパク質(GPI-linked protein)であるか、又は分泌タンパク質であるかを決定するために、SM38のタンパク質配列を調べた。保存された酵素ドメイン(図15を参照されたい)には影をつけてある。SM38は、該酵素ドメインの5'側にたった22個のアミノ酸しか含まない。これらの22個のアミノ酸は疎水性ではないので、該酵素ドメインの5'側にはリーダー配列を同定することができなかった。このことは、SM38が分泌タンパク質やGPI結合型タンパク質ではないことを示している。さらに、5'側膜貫通ドメインは同定されなかった。このことは、SM38がII型膜タンパク質ではないことを示している。従って、SM38はアメフラシシクラーゼのような可溶性細胞質タンパク質である可能性が最も高い。

【図17】

図17は、SM38の逆翻訳産物を示す。SM38タンパク質をコードする縮重DNA配列を同定するために、SM38の303アミノ酸コード領域を逆翻訳した。

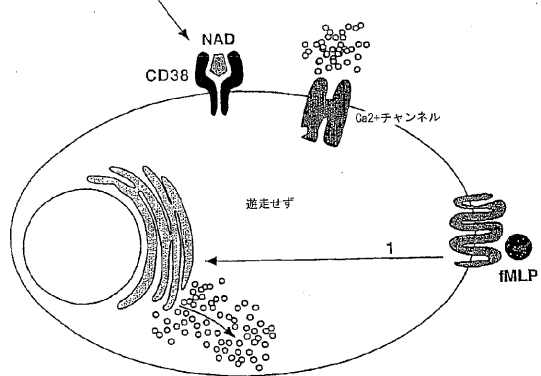
【図1】

化学誘引物質のシグナル伝達に対する正常な細胞応答



【図2】

CD38によるcADPR産生の阻害物質は、容量性CD2+流入及び化学誘引物質により誘導される遊走を妨げる

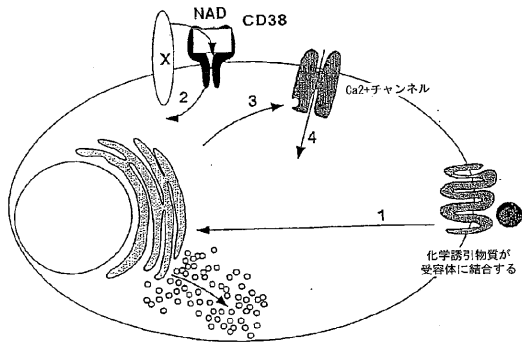


10

20

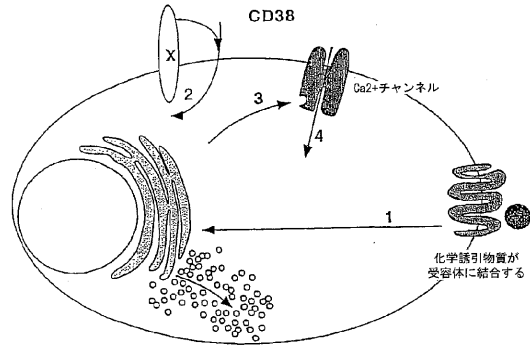
【 図 3 】

CD38 酵素活性を調節するタンパク質 (スクリーニングは、これらのタンパク質を活性化又は不活化する化合物を同定する)



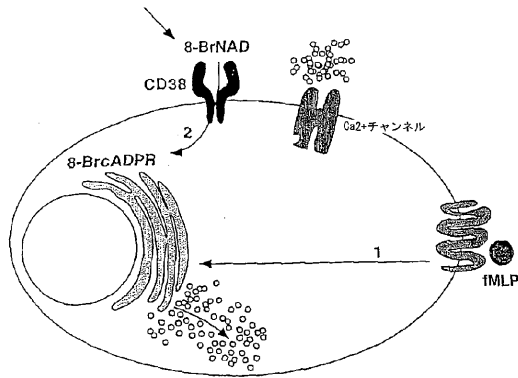
【 図 4 】

CD38 の発現を調節するタンパク質 (スクリーニングは、これらのタンパク質を活性化又は不活化する化合物を同定する)



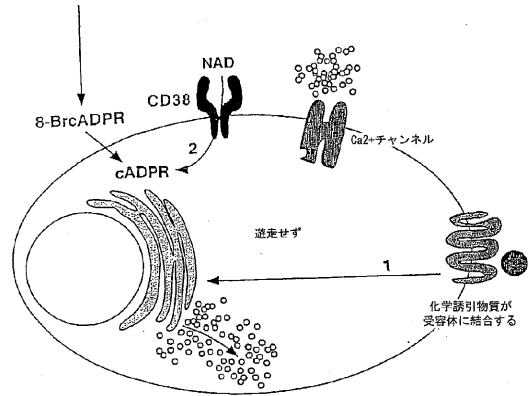
【 図 5 】

CD38 の代わりとなる基質は、cADPR の阻害物質を産生して容量性 Ca2+ 放出を妨げ得る

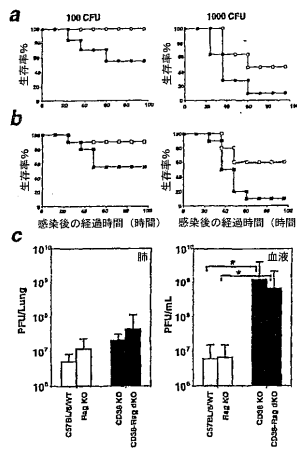


【 図 6 】

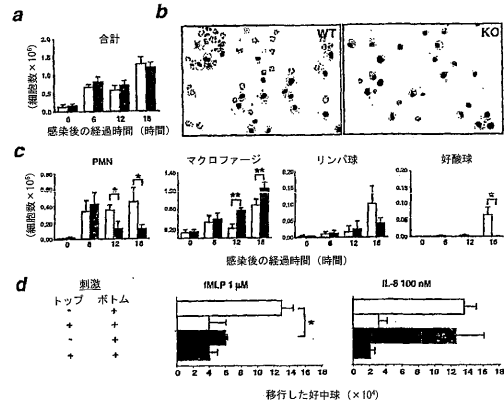
cADPR 結合の阻害物質は、容量性 Ca2+ の流入を遮断する



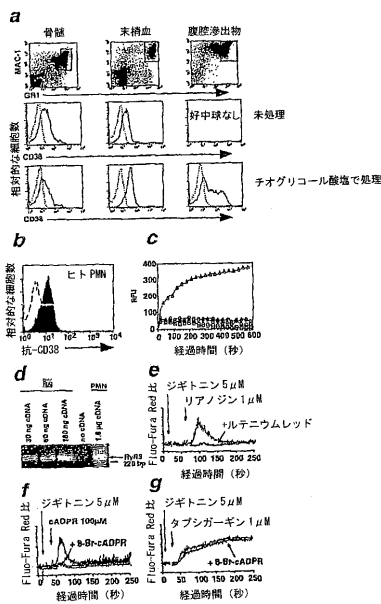
【 図 7 】



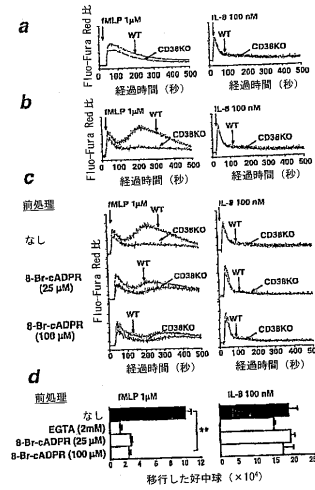
【 図 8 】



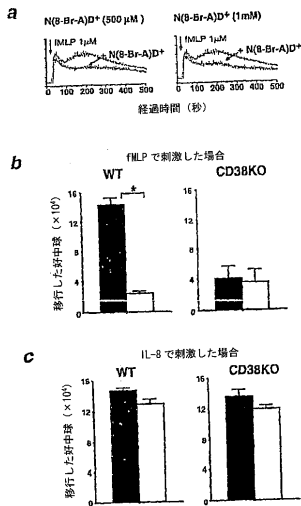
【 図 9 】



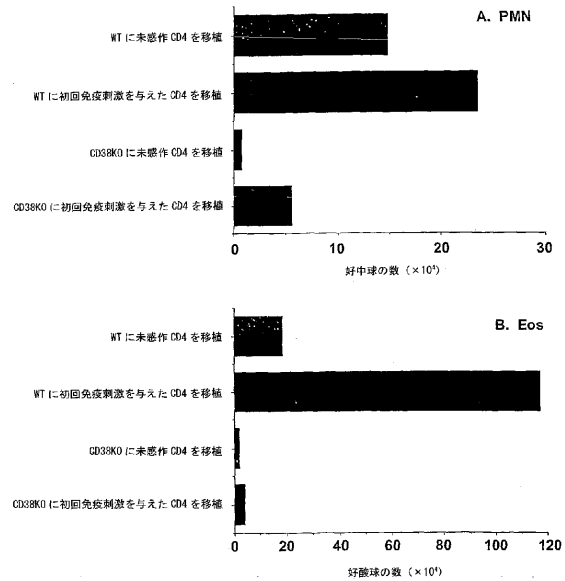
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

コンセンサス	50	GGAAAGACG TAGACATATA TTGTTATATA GATTGTGCA GTTATTTTC
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	100	ACAATCTTT AATCAAAATA ATGATGACG TAATATGTT TCTACTTTA
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	150	TCAAATATT TTGCTTTAA CYCTGCACAA CATCAATAA ACTACTTAG
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	200	TGAAATAGTA CAATCAAGAT GTACTGATG GAAGTTTGA CATGGACGA
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	250	CTAATATAG TTGTAGTGA ATCTGGGATT GATTGAAAG CATTTACTT
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	300	TCAACTCATA CTAATCAGC ATGCTTATG AAATCAGGGT TATTCGATGA
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	350	TTTTGTTAT CAATGTTTG AATGGACAA ACACAAGAA CAGGACACC
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	400	ACACAATTCA AAGGAAACA TACTTCCATT CTGAGTGTAT GAACATCATT
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	450	CGTGAATGT GTAACGCTT TGGAGTATGT CTTTCTCTAG AAACATCATT
EST AW017229 comp	
EST A1067047 comp	
EST N20756 comp	
SM38	
コンセンサス	29GAGTATGT CTTTCTCTAG AAACATCATT
EST AW017229 comp	450	CGTGAATGT GTAACGCTT TGGAGTATGT CTTTCTCTAG AAACATCATT

コンセンサス	500	TCGAGGATAT CTGTTGATG AATTGAATC GTGTAATGGC AGTTAACAG
EST AW017229 comp	79
EST A1067047 comp	80
EST N20756 comp	700	TCGAGGATAT CTGTTGATG AATTGAATG GTGCAATGGC AGTTAACAG
SM38	500	TCGAGGATAT CTGTTGATG AATTGAATG GTGTAATGGC AGTTAACAG
コンセンサス	560	GCACACAAA ATACGGGACT GTATGTGAT GGGATTATA AGTAATGCTT
EST AW017229 comp	129
EST A1067047 comp	550	GCACACAAA ATACGGGACT GTATGTGAT GGGATTATA AGTAATGCTT
EST N20756 comp	550	GCACACAAA ATACGGGACT GTATGTGAT GGGATTATA AGTAATGCTT
SM38	550	GCACACAAA ATACGGGACT GTATGTGAT GGGATTATA AGTAATGCTT
コンセンサス	600	GTTCATGGT ICTGGCAAAG TGTTCGGCT GAGTATGCA GGAGGACATC
EST AW017229 comp	24GCCT GAGTATGCA GGAGGACATC
EST A1067047 comp	176	GTTCATGGT ICTGGCAAAG TGTTCGGCT GAGTATGCA GGAGGACATC
EST N20756 comp	600	GTTCATGGT ICTGGCAAAG TGTTCGGCT GAGTATGCA GGAGGACATC
SM38	600	GTTCATGGT ICTGGCAAAG TGTTCGGCT GAGTATGCA GGAGGACATC
コンセンサス	650	TGTTAATATC TTGTGCTAC TGAATGCTC GGTCAAAGCT CCATTAAATG
EST AW017229 comp	74
EST A1067047 comp	229	TGTTAATATC TTGTGCTAC TGAATGCTC GGTCAAAGCT CCATTAAATG
EST N20756 comp	650	TGTTAATATC TTGTGCTAC TGAATGCTC GGTCAAAGCT CCATTAAATG
SM38	650	TGTTAATATC TTGTGCTAC TGAATGCTC GGTCAAAGCT CCATTAAATG
コンセンサス	700	AAATTAAGC TTGTGAAA ATAGAATC CATTGTTA ACATCCTCG
EST AW017229 comp	123
EST A1067047 comp	279	AAATTAAGC TTGTGAAA ATAGAATC CATTGTTA ACATCCTCG
EST N20756 comp	699	AAATTAAGC TTGTGAAA ATAGAATC CATTGTTA ACATCCTCG
SM38	699	AAATTAAGC TTGTGAAA ATAGAATC CATTGTTA ACATCCTCG
コンセンサス	750	AGTACAACA TTAACAGTGA AATTAGTCA TAGTTTGGAA GATTAATAA
EST AW017229 comp	173
EST A1067047 comp	240	AGTACAACA TTAACAGTGA AATTAGTCA TAGTTTGGAA GATTAATAA
EST N20756 comp	749	AGTACAACA TTAACAGTGA AATTAGTCA TAGTTTGGAA GATTAATAA
SM38	749	AGTACAACA TTAACAGTGA AATTAGTCA TAGTTTGGAA GATTAATAA
コンセンサス	800	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTG AAGAATCTG AAACAAGCTG
EST AW017229 comp	223
EST A1067047 comp	280	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTG AAGAATCTG AAACAAGCTG
EST N20756 comp	799	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTG AAGAATCTG AAACAAGCTG
SM38	799	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTG AAGAATCTG AAACAAGCTG
コンセンサス	850	AACTCTGAC ATATCCTTT TGGTGCATT GAGCATCTT TAGACTTCAG
EST AW017229 comp	273
EST A1067047 comp	280	AACTCTGAC ATATCCTTT TGGTGCATT GAGCATCTT TAGACTTCAG
EST N20756 comp	849	AACTCTGAC ATATCCTTT TGGTGCATT GAGCATCTT TAGACTTCAG
SM38	849	AACTCTGAC ATATCCTTT TGGTGCATT GAGCATCTT TAGACTTCAG
コンセンサス	900	ACATTATCA TGCATTGAAA ATCTTGGCAA ACACATATGT CAGTTTTCAG
EST AW017229 comp	323
EST A1067047 comp	37ATTTGAAA ATCTTGGCAA ACACATATGT CAGTTTTCAG
EST N20756 comp	280	ACATTATCA TGCATTGAAA ATCTTGGCAA ACACATATGT CAGTTTTCAG
SM38	899	ACATTATCA TGCATTGAAA ATCTTGGCAA ACACATATGT CAGTTTTCAG

コンセンサス	CTTCGACGAG GTCAAAAGCTC GAGACATTAC TCATACITTTT TCCGCTAGTC	950
EST A0017229 comp	CTTCGACGAG GTCAAAAGCTC GAGACATTAC TCATACITTTT TCCGCTAGTC	373
EST A1067047 comp	CTTCGACGAG GTCAAAAGCTC GAGACATTAC TCATACITTTT TCCGCTAGTC	87
EST N20756 comp	CTTCGACGAG GTCAAAAGCTC GAGACATTAC TCATACITTTT TCCGCTAGTC	200
SM38	CTTCGACGAG GTCAAAAGCTC GAGACATTAC TCATACITTTT TCCGCTAGTC	949
コンセンサス	ATTGTTTAA CTTTTTATC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCAGAACI	1000
EST A0017229 comp	ATTGTTTAA CTTTTTATC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCAGAACI	423
EST A1067047 comp	ATTGTTTAA CTTTTTATC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCAGAACI	137
EST N20756 comp	ATTGTTTAA CTTTTTATC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCAGAACI	260
SM38	ATTGTTTAA CTTTTTATC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCAGAACI	999
コンセンサス	AAACTTTGAA CAGAGAAGA GAACAATGAT AATAAGGAA TAGGCATTA	1050
EST A0017229 comp	AAACTTTGAA CAGAGAAGA GAACAATGAT AATAAGGAA TAGGCATTA	473
EST A1067047 comp	AAACTTTGAA CAGAGAAGA GAACAATGAT AATAAGGAA TAGGCATTA	145
EST N20756 comp	AAACTTTGAA CAGAGAAGA GAACAATGAT AATAAGGAA TAGGCATTA	280
SM38	AAACTTTGAA CAGAGAAGA GAACAATGAT AATAAGGAA TAGGCATTA	1049

【 14 】

GGAAAGACGTAGACATATATGTTATATAGATTTGTCAGTATTTTTCACAATCTTTTAACTCAATA	70
ERT . . . T Y I V I . . . I C S V I F H N L L I Q I	
ATCGAAGCTAATATGTTTCTTACTTTATCAATATTTTGTCTTAACTGCAACAACATCAATAA	140
M H M N V J L F L T L S N I F Y F N S A Q H Q I	
ACTTACTAGTAAATAGTACAATCAGATGTACTCAGTGAAGSTGCAACTGACCTACTAATAAG	210
N L L S E I V G S R C T Q W K V E H G A T N I S	
TTGTAGTGAATCTGGAATTCATTTGAAAGCATTTACTTTCAACTACTAAATCAGCATGTGTTATG	280
C S E I W N S F E S I L L S T H T K S A C V M	
AAATCAGGTTATTCGATGATTTTGTATCAATTTTGAATGGAACAACAACAACACGACCAAC	350
K S G L F D D F V Y O L F E L E O O O Q O R H	
ACACAATCAACGGAACAATCTTCCATTCACAGTGAATCAATCTCGTGAATGTGAAACGCT	420
H T I D T E Q Y F H S Q V M N I I R G M C K R L	
TGAGTATGTCGCTCTGAAACTACATTTCCAGGATATCTGTTGATGAATGGAATTTGCTAATGCG	490
C V C R S L E T T F P G Y L F D E L N W C N G	
AGTTAACAGCCCAACAATAATGCGGACTGTATGCGATGCGATTATAAAGTAATGTTGTCATGCT	560
S L T G N T K Y G T V C G C D Y K S N Y V H A	
CTCGCAAGTCTTCCGCTGAGTATGCGAGGAGCATCTGGTAACTCTTTGCTACTGAATGCTC	630
F W O S A S A E Y A R R A S G N I F V Y L N G S	
GGTCAAGTCTCATTTAATGAAAATAAACTTTGGAAAAATAGAATCAGCTTGTAAACATCTCGA	700
V K A P F N E N K T F G K I E L P L L K H P R	
GTACAACAATTAACAGTCAATTCATAGTTTGAAGATGTAATAACCGACAACATGCAATGCT	770
V Q D L T V K L V H S L E D V N N R O T C E S	
GGAGTCTGCAAGACTGCAACAAGCTGAACTGTACATATTCCTTTGCTGTCAGTATGCGATCTT	840
W S L Q E L A N K L N S Y H I P F R C I D D P L	
AGATTCACACATTAATGCAATGAAAATCTGGCAACAATATGTCAGTTTTCAGCTTCGACGAGS	910
E F R H Y O C I E N P G K O L C O F S A S T R	
TCAAGTCTGAGACTTACTACATTTTCCGCTAGTCAATTTTAACTTTTATACTGCAATGAA	980
S N Y E T L L L I L F P L V I C L T F Y T S M N	
GAAATAACTTTTCAGAACTAACTTTGACAGAGAAGSAGAACAATGATAAATAAGGAATGACATTA	1050
N N F S E L N F E O R K R T M I I K E . D I N	
TGAAAAAATAAAAAAAAAA 1073	
E K K K K K K	

【 15 】

A.	コンセンサス	M.....L.....S.....L.....RC.....	60
	アメラシc d38p	MSPAIWAV CLAVLTKIS FSGAIFPTE LQWFLGCA DVEIIRKTI	60
	SM38p	M--MNVILFL TLSNIFVNS KQDI--NL LSEIVQSDI QWYEH----	41
	コンセンサスC...W..F.....K..C...G...DF.....	100
	アメラシc d38p	LRPKVLSGA LWTNFKAFS F--RATPHI DLGSKYDFQ RAGDLPVHK	97
	SM38p	-GATNISEE IHWSESILL STHMSZAM KSLGDFDFVY QLFLEOQQQ	90
	コンセンサスL.E.T.PGV.....L.WC.....	150
	アメラシc d38p	VHWGAVDE --NIIDF-- ADGGRYI--GRTLPPI MINSVHID	138
	SM38p	GRHHTIQEQ VHSQAMMI KQCKRLVC KLELTPPEI LFDVWVDS	140
	コンセンサスVC.....D.....FW..A.S..YA..A.G.....GS.....	200
	アメラシc d38p	RQKPGNK- VDPDFKDPV QAFESVITA SSVYRREG DVTYVDSV	187
	SM38p	SLTQNTKYGT VQ--GCDVKS NVNVAQSA SAEYRREG NIFVNLKES	186
	コンセンサスPGR.ELP.L.....V.....H.L.L.....C...SL.....	250
	アメラシc d38p	PKPVAVPOS PPKVELMCI TM--TKAVY IYRDLQKI L--E--S--S--L	235
	SM38p	-VWVFNENK TGRKELPDI KRPKQDLY KLUSLEEVY NROTQESQL	236
	コンセンサスL.....F.C...P.....C...NP.....CQ.....	300
	アメラシc d38p	LLEAVVAKK RFRGKVENP KSLVLLPAD RINAREOLA KRYRIA--	282
	SM38p	QELANLNSV HIRKIDDP LFRVYQIE HIKRLEQFS ASTRSWTEL	285
	コンセンサス	317
	アメラシc d38p	LILPLVICL TFYTSVM	305
	SM38p		305
B.	コンセンサス	M.....L.....L.....L.....L.....D.....	50
	ヒト C038	MANGESPVS GHPGCOLSR RAQLQCVSI LVLVAVLA VVWRBQDM	50
	SM38p	M-----MNVILFLTS NIFVNSAQ-	20
	コンセンサスE.V..RC.....C...W..F.....S.H.K.....	100
	ヒト C038	SGPSTKRP ETVLAKVYV TEHPMBRY CQSVDAKIC GAFIS--RH	97
	SM38p	--KHNLIS EIVGSDIOM -RVEGATNI SESEHWSDI SILLSTHNS	66
	コンセンサスC.....YD.....S.....	150
	ヒト C038	PHITED--KQPLMKA GTOTVQNKI L--LGRRI KQLAQFTOV	138
	SM38p	KQMSLFD DFVQLELE QGQRHHTI QTEQYFHYR MNIHGMCKR	116
	コンセンサスL.E.T.PGV.....L.WC.....T.....Y.....C.....L.....N.V.....	200
	ヒト C038	GRMPTLSTI LRLADNTY RRFENFSKI HYS--PDRW KCL--SNRPV	185
	SM38p	LVGKSLRSTI PRLFDLQI KMSLSTGT KYTGS--LTKSHWV	161
	コンセンサスFR...S...A..A.....V.LNS.....F..M.TG.....E...L...V.....	250
	ヒト C038	ENFKYGR RFRGKVDVH VILLESKSI FDKNSTFVY VAVHDPENI	235
	SM38p	HAVQASAE YSRSDNIF VYLKSVKAP FNEKTKCI ELPLIKRPL	211
	コンセンサス	Q.L.....H.....R..C.....EL.....I.F..C.....	300
	ヒト C038	OTLEAVHIC GRE-DSRDLI DPTIKLES IISKRIEFS CNVYRDFK	284
	SM38p	QDLTWLHIS LEDVNRQTI ESWSLQAN KLSVHIFER QIDDFLEFR	261
	コンセンサス	..QC..AP...C.....TS..	342
	ヒト C038	LQSWHNS GR-----TS EI	300
	SM38p	VQI LKGRKO LDFASSTRS NVETLILFL LVGLTFYTS NI	306

【 16 】

MNVILFLTL SNIFVNSAQ HQINLLSEIV QSRCTQWKE HGATNISCSE	50
IWNFSFESILL STHTKSACVM KSLGDFDFVY QLFLEOQQQ QRHHTIQTEQ	100
IWNFSVMNII RGMCKRLGVC RSLETTFPGY LFDLWNGV SLTGNTKYGT	150
VGCDYKSNV VHAFWQSASA EYARRASGN I FVNLGSKVA PFENKTFGK	200
LELPLKHPR VQQLTVKLVH SLEDVNRQT CESWSLQELA NKLSNVHIFP	250
RCIDDPLEFR HYQCIENPGK QLCQFSASTR SNVETLLILF PLYICLTFYI	300
SMN-	303

【 17 】

ATGATGAAYG TNATHYNTTT YYTNACNYTN WSNAAAYATH TYGNTTYAA	50
YWSNGNCAR CAYCARATHA AYYNTYTNWS NGARATHGTN CARWSNMGNT	100
GYACNCARTG GAARGTNGAR CAYGGNGCNA CNAAYATHWS NTGYWSNGAR	150
ATHFGGAAYW SNTTYGARWS NATHYNTYTN WSNACNCAYA CNAARWSNGC	200
NTGYGTNATG AARWSNGNY NNTTYGAYGA YTTYGTNTAY CARYTNTTYG	250
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	300
TAYTTYCAYW SMCARGTNAV GAAYATHATH MGNNGNATGT GYAARMGNVT	350
NGNGTNTGY MGNWSNYTNG ARACNACNTT YCCNGGNTAY YNTTYGAYG	400
ARYTNAAYTG GTGYAAYGNG WSNYTNACNG GNAAYACNAA RTAYGGNACN	450
GTNTGYGGNT GYGAYTAYAA RWSNAAAYGN GTNACAYCNT TYTGGCARWS	500
NGCNSWNGCN GARTAYGCNM GNMNGCNCWS NGGNAAAYATH TTYGTNCTNY	550
TNAAAYGNGWS NGTNAARGCN CCNTTYAAYG ARAAYAAARAC NTTYGGNAAR	600
ATHGARYTNC CNYNTYNAAA RCAYCCNMGN GTNCARCARY TNACNGTNA	650
RYTNGTNCAY WSNYTNACNG AYGTAAAYAA YMGNCARACN TGYGARWSNT	700
GWNSYTNCA RGARYTNGCN AAYAARYTNA AYWSNGTNC A YATHCCNTTY	750
MNGTYATHG AYGAYCCNYT NGARTTYMGN CAYTAYCART GYATHGARAA	800
YCCNGGNAAR CARYTNTGYC ARTTYWSNGC WSNACNMGN WSNAAAYGNTG	850
ARACNYNTY NATHYNTTY CNYTNGTNA THTYTYTACN NTTYTAYACN	900
WSNATGAAY	909

【国際公開パンフレット】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/32288 A2

- (51) International Patent Classification: **A61B**
- (21) International Application Number: PCT/US01/32383
- (22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/241,065 17 October 2000 (17.10.2000) US
- (71) Applicant: **TRUDEAU INSTITUTE, INC.** [US/US];
100 Algonquin Avenue, P.O. Box 59, Saranac Lake, NY
12938 (US).
- (72) Inventors: **LUND, Frances, E.**, P.O. Box 59, 100 Algonquin Avenue, Saranac Lake, NY 12938 (US). **RANDALL, Troy, D.**, P.O. Box 59, 100 Algonquin Avenue, Saranac Lake, NY 12938 (US). **PARTIDA-SANCHEZ, Santiago**, P.O. Box 59, 100 Algonquin Avenue, Saranac Lake, NY 12938 (US).
- (74) Agent: **STEPHENS, Carmella, L.**; Baker Botts, LLP, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112-0228 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/32288 A2

(54) Title: CD38 MODULATED CHEMOTAXIS

(57) Abstract: The present invention relates to methods for modulating the migratory activity of cells expressing CD38 for the treatment of disorders including, but not limited to, inflammation, ischemia, asthma, autoimmune disease, diabetes, arthritis, allergies, infection with pathogenic organisms and transplant rejection. Such cells include, for example, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages and dendritic cells. The invention further relates to drug screening assays designed to identify compounds that modulate the ADP-ribosyl cyclase activity of CD38 and the use of such compounds in the treatment of disorders involving CD38 modulated cell migration. The invention is based on the discovery that CD38 ADP-ribosyl cyclase activity is required for chemotaxis. Furthermore, the invention relates to methods for identifying compounds that modulate the enzyme activity of the *S. mansoni* CD38 homologue and using those compounds in the treatment of pathologic disorders caused by helminth infection. This is based on the discovery that helminths such as *S. mansoni* express CD38 homologues.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

BAKER & BOTTS, L.L.P.
30 ROCKEFELLER PLAZA
NEW YORK, NEW YORK 10112

TO ALL WHOM IT MAY CONCERN:

Be it known that WE, Frances E. Lund and Troy D. Randall, citizens of the United States and Santiago Partida-Sánchez, a citizen of Mexico, whose post office addresses are PO Box 59, Saranac Lake, N.Y. have invented an improvement in

CD38 MODULATED CHEMOTAXIS

of which the following is a

SPECIFICATION

1. INTRODUCTION

[0001] The present invention relates to methods for modulating the migratory activity of cells expressing CD38 for the treatment of disorders including, but not limited to, inflammation, ischemia, asthma, autoimmune disease, diabetes, arthritis, allergies, infection with pathogenic organisms, such as parasites, and transplant rejection. Such cells include, for example, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages and dendritic cells. The invention further relates to drug screening assays designed to identify compounds that modulate the ADP-ribosyl cyclase activity of CD38 and the use of such compounds in the treatment of disorders involving CD38 modulated cell migration. Additionally, the invention relates to the isolation and characterization of a CD38 homologue from the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*. The identification of such a homologue, referred to

WO 02/32288

PCT/US01/32383

herein as SM38, provides compositions and assays designed to screen for related enzymes in pathogenic organisms as well as compositions and assays to screen for compounds that modulate the activity and/or expression of SM38. Such compounds can be used to treat pathogenic disorders resulting from infection with such parasites. The invention is based on the discoveries that CD38 ADP-ribosyl cyclase activity is required for chemotaxis and that *S. mansoni* expresses a CD38 homologue that can regulate calcium responses in the parasite.

2. BACKGROUND OF INVENTION

[0002] Hematopoietically-derived cells, including cells such as neutrophils, monocytes, dendritic cells, eosinophils and lymphocytes, are important cellular mediators of the inflammatory response and respond to soluble inflammatory mediators by migration to the site of tissue injury or infection where the newly arrived cells perform their effector functions.

[0003] Neutrophils which represent 40-50 % of the circulating leukocyte population are particularly important to both immunity and inflammation. Neutrophils are normally quiescent cells but upon stimulation can mediate a variety of different inflammatory activities. A large number of different agents are capable of activating neutrophils and this activation is normally mediated by binding of the activating agent to specific receptors expressed on the surface of neutrophils. Once activated, the neutrophils are capable of binding to endothelial cells and migrating to the site of tissue damage, a pathogen or a foreign material. Similarly, eosinophils are also potent inflammatory effector cells, although these cells are most often associated with allergic diseases such as asthma. Like neutrophils, eosinophils have a potent armory of proinflammatory molecules that can initiate

WO 02/32288

PCT/US01/32383

and maintain inflammatory responses.

[0004] Once at the inflammatory site, recruited cells such as eosinophils and neutrophils induce further inflammation by releasing inflammatory products and recruiting other hematopoietically-derived cells to the site. In some cases, the inflammatory response mediated by the specifically recruited hematopoietically-derived cells protects the host from morbidity or mortality by eliminating the infectious agent. In other cases (*i.e.*, autoimmunity, ischemia/reperfusion, transplantation, allergy), the inflammatory response further damages the tissue resulting in pathology. Thus, agents which alter inflammation or recruitment of cells may be useful in controlling pathology.

[0005] Although CD38 expression was at first believed to be restricted to cells of the B cell lineage, subsequent experiments by a number of groups have demonstrated that CD38 is widely expressed on both hematopoietic and non-hematopoietically-derived cells. Homologues of CD38 have also been found to be expressed in mammalian stromal cells (Bst-1) and in cells isolated from the invertebrate *Aplysia californica* (ADP-ribosyl cyclase enzyme) (Prasad GS, 1996, *nature Structural Biol* 3:957-964)

[0006] More recently, CD38 was shown to be a multifunctional ecto-enzyme with NAD^+ glycohydrolase activity and ADP-ribosyl cyclase activity, enabling it to produce nicotinamide, ADP-ribose (ADPR), cyclic-ADPR (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) from its substrates NAD^+ and NADP (Howard et al., 1993 *Science* 252:1056-1059; Lee et al., 1999 *Biol. Chem.* 380:785-793). Two of the metabolites produced by CD38, cADPR and NAADP, have

WO 02/32288

PCT/US01/32383

been shown to induce the release of intracellular calcium in cells isolated from tissues of plants, invertebrates and mammals, suggesting that these metabolites may be global regulators of calcium responses (Lee et al., 1999 Biol. Chem. 380:785-793).

[0007] Both cADPR and NAADP are known to induce calcium release from calcium stores that are distinct from those controlled by IP^3 receptors (Clapper, DL et al., 1987, J. Biological Chem. 262:9561-9568). Instead, cADPR is believed to regulate calcium release from ryanodine receptor regulated stores, as agonists of ryanodine receptors sensitize cADPR mediated calcium release and antagonists of ryanodine receptors block cADPR dependent calcium release (Galione A et al., 1991, Science 253:143-146). Thus, it has been proposed that cADPR is likely to regulate calcium responses in tissues such as muscle and pancreas where ryanodine receptors are expressed. Interestingly, it was recently shown that the muscle fibers of the parasitic flatworm, *S. mansoni*, express ryanodine receptors and that agonists of ryanodine receptors such as caffeine can induce intracellular calcium release and muscle contraction in the parasite (Day et al., 2000 Parasitol 120:417-422; Silva et al., 1998, Biochem. Pharmacol 56:997-1003). In mammalian smooth muscle cells, the calcium release in response to acetylcholine can be blocked not only with ryanodine receptor antagonists, but also with specific antagonists of cADPR such as 8-NH²-cADPR or 8-Br-cADPR (Guse, AH, 1999, Cell. Signal. 11:309-316).

[0008] These findings, as well as others, indicate that ryanodine receptor agonists/antagonists including cADPR can regulate calcium responses in cells isolated from species as diverse as helminths to mammals, however, it is unclear whether ADP-ribosyl cyclase enzymes such as CD38

WO 02/32288

PCT/US01/32383

or SM38 are required for the production of cADPR *in vivo*. Additionally, there has been no direct evidence to link CD38 enzyme activity with downstream responses such as calcium release, proliferation, apoptosis, migration or other effector functions. Thus, despite the high level expression of CD38 on many cell types, no clear defining role for CD38 enzyme activity in immune responses has been established.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present invention relates to methods for modulating the migratory activity of cells expressing CD38 involving the administration of agonists or antagonists of CD38 enzyme activity, and the cADPR mediated signal transduction pathway, including small molecules, large molecules, and antibodies. The invention also provides for compounds and nucleotide sequences that can be used to modulate CD38 gene expression.

[0010] The present invention further relates to the isolation and characterization of a CD38 homologue from the parasitic flatworm *Shistosoma mansoni*, herein referred to as SM38. The identification of such a homologue provides compositions and assays designed to screen for related enzymes in pathogenic micro-organisms (such as helminths) as well as compositions and assays to screen for compounds that modulate the activity of SM38. Such compounds can be used to treat pathogenic disorders resulting from infection with such pathogenic micro-organisms.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0011] The invention relates to assays designed to screen for compounds that modulate the enzymatic activity of CD38 and/or SM38 (CD38/SM38), *i.e.*, compounds that act as agonists and antagonists of CD38 enzyme activity. In addition, the screens of the invention may be used to identify substrates of CD38/SM38 that are converted into antagonists or agonists of signal transduction pathways involving cADPR. The screens of the invention also may be used to directly identify agonists and antagonists of signal transduction pathways involving cADPR.

[0012] The invention also relates to assays designed to screen for compounds that modulate CD38/SM38 gene expression. For example, cell-based assays can be used to screen for compounds that modulate CD38/SM38 transcription such as compounds that modulate expression, production or activity of transcription factors involved in CD38/SM38 gene expression; antisense and ribozyme polynucleotides that modulate translation of CD38/SM38 mRNAs and polynucleotides that form triple helical structures with the CD38/SM38 regulatory regions and inhibit transcription of the CD38/SM38 gene.

[0013] Identified compounds may be used in the treatment of disorders where the migratory activity of CD38-expressing cells, such as hematopoietically-derived cells, contributes to the development of such disorders. Such disorders include, but are not limited to inflammation, ischemia, asthma, autoimmune disease, diabetes, arthritis, allergies or transplant rejection where inhibition of migratory activity using, for example, CD38 antagonists would be desired. In contrast, in subjects infected with pathogenic microorganisms or immunosuppressed subjects it may be desirable to induce the migratory activity of hematopoietically-derived cells using, for example,

WO 02/32288

PCT/US01/32383

agonists of CD38. Additionally, identified compounds may be used to treat pathogenic disorders resulting from infection with pathogenic micro-organisms expressing SM38 or structurally related homologous proteins.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0014] Figure 1. Normal Cellular Response to Chemoattractant Signaling. (1) Chemoattractant binds to receptor and initiates signaling. (2) CD38 hydrolyzes NAD and produces cADPR, which facilitates Ca²⁺ release from internal stores. (3) Ca²⁺ is released from cADPR-controlled internal stores which activates external Ca²⁺ channel. (4) Extracellular Ca²⁺ flows into the cell and allows migration.

[0015] Figure 2. Inhibitors of cADPR Production by CD38 Prevent Capacitative Ca²⁺ Entry and Chemoattractant Induced Migration (Screens will identify such compounds). (1) Chemoattractant binds to receptor and initiates signaling. (2) Inhibitor of CD38 prevents either hydrolysis of NAD (enzyme is inactive and no products are made) or specifically inhibits production of cADPR (blocks ADP-ribosyl cyclase activity, but enzyme may not be inactive). (3) Lack of cADPR results in no cADPR-mediated Ca²⁺ release from internal stores. (4) No capacitative Ca²⁺ influx and no migration.

[0016] Figure 3. Proteins that Regulate CD38 Enzyme Activity (Screens will identify compounds that activate or inactivate these proteins). (1) Chemoattractant binds to receptor and initiates

WO 02/32288

PCT/US01/32383

signaling. (2) Protein X modifies CD38 and inactivates CD38 enzyme activities. (3) Lack of cADPR results in no cADPR-mediated Ca²⁺ release from internal stores. (4) No capacitative Ca²⁺ influx and no migration.

[0017] Figure 4. Proteins that Regulate CD38 Expression (Screens will identify compounds that activate or inactivate these proteins). (1) Chemoattractant binds to receptor and initiates signaling. (2) Protein X represses CD38 gene transcription. (3) Lack of CD38 results in absence of cADPR which results in no cADPR-mediated Ca²⁺ release from internal stores. (4) No capacitative Ca²⁺ influx and no migration.

[0018] Figure 5. Alternate Substrates for CD38 may generate inhibitors of cADPR and prevent capacitative Ca²⁺ release (Screens will identify such compounds). (1) Chemoattractant binds to receptor and initiates signaling. (2) CD38 hydrolyzes modified substrate (8-BrNAD, for example) and produces modified product (8-Br-cADPR, for example) (3) Modified product competitively or non-competitively inhibits cADPR induced Ca²⁺ release from internal stores. (4) No capacitative Ca²⁺ influx and no migration.

[0019] Figure 6. Inhibitors of cADPR binding block capacitative Ca²⁺ influx. (1) Chemoattractant binds to receptor and initiates signaling (Screens will identify such compounds). (2) CD38 hydrolyzes NAD and produces cADPR. (3) Inhibitor of cADPR (8-Br cADPR) competitively or non-competitively blocks cADPR induced Ca²⁺ release from internal stores. (4) No capacitative Ca²⁺ influx and no migration.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0020] Figure. 7. CD38KO mice are more susceptible to *S. pneumoniae* infection. (a) C57BL/6 WT (open circles) and CD38KO (filled circles) mice were infected intra-tracheally with two doses of *S. pneumoniae*. The survival of infected animals was monitored over the next 4 days. (b) WT mice that had been irradiated and reconstituted with WT bone marrow (open squares) or CD38KO bone marrow (filled squares) were infected with two doses of *S. pneumoniae* and monitored for four days. The data are representative of at least 5 independent experiments. n=10 mice/group. (c) WT or Rag-2 KO (open bars) and CD38KO or CD38-Rag-2 double KO (filled bars) mice were infected intra-tracheally with *S. pneumoniae* and bacterial titers in lung and peripheral blood were determined at 12 hours post-infection. The data are representative of 3 independent experiments. n=10 mice/group. *P<0.001; Student's t test.

[0021] Figure. 8. CD38KO neutrophils are not recruited to the infection site and are unable to chemotax toward bacterially-derived chemoattractants. WT and CD38KO mice were infected intra-tracheally with *S. pneumoniae*, and the cellular infiltrate in the airways was collected and counted (panel a, WT=open bars and CD38KO=closed bars) at multiple timepoints post-infection. (b) The identity and frequency of the infiltrating cells in the lungs of infected WT and CD38KO mice was determined by microscopic examination (400X magnification) and counting of Diff-Quick stained cytocentrifuge preparations. (c) Differential cell counts in the lung lavage of WT (open bars) and CD38KO (closed bars) mice are presented as the mean number of cells $\times 10^6 \pm$ (SE). Similar results were obtained in 5 independent experiments. n=5 mice/group/timepoint. *P<0.01 **P=0.01; Student's t Test. (d) Purified bone marrow neutrophils from WT (open bars) and CD38KO mice

WO 02/32288

PCT/US01/32383

(filled bars) were tested for their ability to migrate in response to medium, fMLP or IL-8 in a conventional transwell checkerboard chemokinesis/chemotaxis assay. The number of cells migrating to the bottom chamber of the transwell in the absence of any stimulation was not significantly different between CD38KO and WT neutrophils and ranged from 1500-2300 cells (not shown). The number of neutrophils migrating in response to equivalent concentrations of stimuli in both chambers (chemokinesis) and the number of neutrophils migrating in response to a chemotactic gradient (chemotaxis) is shown. The values shown are the mean \pm S.E. of four different experiments. *P <0.001; Student's t Test.

[0022] Figure 9. CD38 expressing neutrophils produce cADPR and release intracellular calcium in response to cADPR and ryanodine. (a) Bone marrow, peripheral blood and peritoneal cavity cells were isolated from WT and CD38KO mice or WT and CD38KO mice that received an intraperitoneal injection of thioglycollate 12 hrs previously. CD38 expression on the Mac-1^{hi}GR-1^{hi} neutrophils was analyzed by flow cytometry. Expression of CD38 on WT neutrophils (solid line histogram) and CD38KO neutrophils (dotted line histogram) is shown. (b) CD15+ human peripheral blood neutrophils were assessed for CD38 expression by staining with anti-CD38 mAb (filled histogram) or an isotype control Ab (dotted line). (c) Cyclase activity was measured in WT and CD38KO bone marrow neutrophils. WT or CD38KO neutrophils were incubated alone (WT=circles and CD38KO=squares) or in the presence of NGD (WT=triangles and CD38KO=diamonds) for 10 minutes. The accumulation of the product, cGDPR, was measured fluorometrically. (d) RyR3 mRNA expression levels were determined by RT-PCR. cDNA was isolated from purified WT bone

WO 02/32288

PCT/US01/32383

marrow neutrophils (PMN) or brain tissue. The amount of input cDNA is indicated. (e-g) Intracellular free calcium levels were measured by FACS in Fluo-3/Fura Red loaded bone marrow neutrophils. (e) Neutrophils were permeabilized with digitonin and then stimulated with ryanodine in the presence (orange line) or absence (blue line) of ruthenium red. (f) Neutrophils were permeabilized in digitonin and then stimulated with cADPR (blue line), heat inactivated cADPR (green line) or 8-Br-cADPR + cADPR (red line). (g) Neutrophils were stimulated with thapsigargin (blue line) or thapsigargin + 8-Br-cADPR (red line). All data in panels e-g are representative of at least three independent experiments.

[0023] Figure 10. CD38 catalyzed cADPR regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils. (a-c) Intracellular free calcium levels were measured by FACS in Fluo-3/Fura Red loaded bone marrow neutrophils. (a) CD38KO (red line) and WT (blue line) neutrophils were stimulated with fMLP or IL-8 in calcium-free buffer. (b) CD38KO (red line) and WT (blue line) neutrophils were stimulated with fMLP or IL-8 in calcium-containing buffer. (c) CD38KO (red line) and WT (blue line) neutrophils were preincubated in calcium-containing medium \pm 8-Br-cADPR and then stimulated with fMLP or IL-8. All data in panels a-c are representative of at least five independent experiments. (d) WT neutrophils were pre-incubated with medium, EGTA or 8-Br-cADPR and then placed in the top chamber of a transwell that contained fMLP or IL-8 in the bottom chamber. The cells that migrated to the bottom chamber in response to the chemotactic gradient were collected and enumerated by flow cytometry. Values shown are mean \pm S.E. from three separate experiments with three wells/experimental condition.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

**P=0.008; Mann Whitney Rank Sum Test.

[0024] Figure 11. An NAD⁺ analogue regulates calcium influx and chemotaxis in fMLP-activated neutrophils. (a) Dye-loaded purified bone marrow neutrophils from WT mice were preincubated in medium (blue line) or increasing concentrations of N(8-Br-A)D⁺ (red line) and then stimulated with fMLP. Changes in intracellular calcium levels were measured by flow cytometry. The data are representative of three independent experiments. (b-c) WT (left panel) and CD38KO (right panel) neutrophils were preincubated with medium (filled bars) or N(8-Br-A)D⁺ (open bars) and then placed in the top chamber of a transwell which contained fMLP (panel b) or IL-8 (panel c) in the bottom chamber. The cells that migrated to the bottom chamber in response to the chemotactic gradient were collected and enumerated by flow cytometry. Values shown are mean \pm S.E. from three separate experiments with three wells/experimental condition. *P<0.001 Student's t Test.

[0025] Figure 12 A-B. The recruitment of neutrophils and eosinophils to the lungs in a model of allergic asthma is impaired in CD38 KO mice. Naive CD4 T cells from WT C57BL/6 mice or OVA-primed CD4 T cells from WT C57BL/6 mice were transferred to either WT C57BL/6 mice or to CD38KO-C57BL/6 mice as indicated. Recipient mice were subsequently challenged on 7 consecutive days by intratracheal instillation of 10 μ g OVA in PBS. Neutrophils (A) and eosinophils (B) in the lung lavage on the eighth day after initial challenge were enumerated by microscopic examination (400X) of Diff-Quick stained cytocentrifuge preparations

[0026] Figure 13. Comparison of *S. mansoni* SM38 cDNA with *S. mansoni* ESTs. The SM38

WO 02/32288

PCT/US01/32383

cDNA was isolated and cloned from an *S. mansoni* cDNA library as described in methods. The cDNA for SM38 includes 5' untranslated sequence (gray box), an initiation methionine (underlined), an open reading frame encoding a 303 amino acid protein (clear box), a stop codon (underlined), 3' untranslated sequence (gray box) and a poly-adenylation site (underlined). The full-length cDNA was compared to published *S. mansoni* EST sequences and three separate EST sequences were found that were identical to portions of the SM38 sequence. The SM38 cDNA includes 421 base pairs of unique sequence (70 bp 5' untranslated and 351 bp of open reading frame) not found in any public database.

[0027] Figure 14. Translation of SM38 cDNA. The SM38 cDNA was translated in all reading frames and an open reading frame of 303 amino acids was identified. The initiation codon is located at nucleotide position 71-73 and the termination codon is found at nucleotide position 980-983.

[0028] Figure 15. SM38 is homologous to *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase and human CD38 cyclase. The protein sequence of SM38 was aligned with the protein sequences for *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase (part a) and human ADP-ribosyl cyclase CD38 (part b). A high degree of homology (boxed residues) was observed with 21% identity between the *Aplysia* protein and SM38 and 23% identity between human CD38 and SM38. The conserved 10 cysteine residues present in all members of the cyclase protein family are also present in SM38 (shaded boxes). The two additional cysteines found in CD38 (underlined), but not in *Aplysia*, are also lacking in SM38. However, the SM38 protein contains two additional cysteine residues that are unique and are not found in either CD38 or *Aplysia* cyclase (underline). Most importantly, the active site catalytic residues identified for CD38 and

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Aplysia enzyme (starred residues) are also present in SM38.

[0029] Figure 16. SM38 is a soluble protein. The protein sequence of SM38 was examined to determine if the protein is a type-II membrane bound protein like CD38, a soluble protein like the Aplysia cyclase, a GPI-linked protein like other cyclase family proteins, or a secreted protein. The conserved enzyme domain (see previous figure) is shaded. SM38 contains only 22 amino acids 5' of the enzyme domain. These 22 amino acids are not hydrophobic, thus, no leader sequence 5' of the enzyme domain could be identified, indicating that SM38 is not secreted or GPI-linked. Additionally, no 5' transmembrane domain could be identified, indicating that SM38 is not a type-II membrane protein. Therefore, SM38 is most likely a soluble cytoplasmic protein like Aplysia cyclase.

[0030] Figure 17. Reverse translation of SM38. The 303 amino acid coding region of SM38 was reverse-translated to identify a degenerate DNA sequence that would encode the SM38 protein.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0031] The present invention relates to methods for modulating the migratory activity of cells involving the regulation of CD38 ADP-ribosyl cyclase activity. The invention is based on the discovery that granulocytes such as neutrophils and eosinophils from CD38KO mice cannot be efficiently recruited to sites of inflammation and infection in the body. The invention is based on the discovery that although CD38 ADP-ribosyl cyclase activity is not essential for the initial

WO 02/32288

PCT/US01/32383

activation of granulocytes such as neutrophils, it is critically important in regulating neutrophil chemotaxis both *in vivo* and *in vitro*. In particular, cADPR, a product of CD38 ADP-ribosyl cyclase activity, is required to induce calcium release from calcium stores present within neutrophils. The release of calcium from this specialized store is necessary for activation and opening of plasma membrane channels resulting in a capacitative influx of calcium that subsequently mediates the direct migration of neutrophils toward chemoattractants and/or inflammatory products.

[0032] The present invention encompasses screening assays designed for the identification of modulators, such as agonists and antagonists, of CD38 enzyme activity and/or modulators of cADPR dependent calcium responses and chemotaxis. The invention further relates to the use of such modulators in the treatment of disorders based on the CD38 controlled migratory activity of cells to chemoattractants and inflammatory products. Such disorders include, but are not limited to, inflammation, ischemia, autoimmune disease, asthma, diabetes, arthritis, allergies, infections and organ transplant rejection.

[0033] The present invention also relates to the identification, isolation and characterization of the CD38 homologue, SM38, from the parasite *S. mansoni*. The invention encompasses screening assays to identify related enzymes in other pathogenic micro-organisms, such as helminths, as well as compositions and assays to screen for compounds that modulate the activity and expression of SM38. The invention further relates to the use of such modulators to treat pathogenic disorders in animals and humans infected with organisms expressing SM38 or structurally related molecules.

[0034] Various aspects of the invention are described in greater detail in the subsections below.

5.1. THE SM38 GENE

[0035] The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *S. mansoni* SM38 is shown in Figure 14 (ATCC Deposit No:). The SM38 cDNA was translated in all reading frames and an open reading frame of 303 amino acids was identified. The initiation codon is located at nucleotide position 71 and the termination codon is found at nucleotide position 981.

[0036] The SM38 nucleotide sequences of the invention include: (a) the DNA sequences shown in Figure 14; (b) a nucleotide sequences that encodes the amino acid sequence shown in Figure 14; (c) any nucleotide sequence that (i) hybridizes to the nucleotide sequence set forth in (a) or (b) under stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York, at p. 2.10.3) and (ii) encodes a functionally equivalent gene product; and (d) any nucleotide sequence that hybridizes to a DNA sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 14 under less stringent conditions, such as moderately stringent conditions, e.g., washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C (Ausubel et al., 1989 supra), yet which still encodes a functionally equivalent SM38 gene product. Functional equivalents of the SM38 protein include naturally occurring SM38 present in species other than *S. mansoni*. The invention also includes degenerate variants of sequences (a) through (d). The invention also includes nucleic acid molecules, that may encode or act as SM38 antisense molecules, useful, for example, in SM38 gene

WO 02/32288

PCT/US01/32383

regulation (for and/or as antisense primers in amplification reactions of *SM38* gene nucleic acid sequences).

[0037] In addition to the *SM38* nucleotide sequences described above, homologs of the *SM38* gene present in other species can be identified and readily isolated, without undue experimentation, by molecular biological techniques well known in the art. For example, cDNA libraries, or genomic DNA libraries derived from the organism of interest can be screened by hybridization using the nucleotides described herein as hybridization or amplification probes.

[0038] The invention also encompasses nucleotide sequences that encode mutant *SM38*s, peptide fragments of the *SM38*, truncated *SM38*, and *SM38* fusion proteins. These include, but are not limited to nucleotide sequences encoding polypeptides or peptides corresponding to the cyclase domain of *SM38* or portions of this domain; truncated *SM38*s in which the domain is deleted, e.g., a functional *SM38* lacking all or a portion of the cyclase region. Certain of these truncated or mutant *SM38* proteins may act as dominant-negative inhibitors of the native *SM38* protein. Nucleotides encoding fusion proteins may include but are not limited to full length *SM38*, truncated *SM38* or peptide fragments of *SM38* fused to an unrelated protein or peptide such as an enzyme, fluorescent protein, luminescent protein, etc., which can be used as a marker.

[0039] *SM38* nucleotide sequences may be isolated using a variety of different methods known to those skilled in the art. For example, a cDNA library constructed using RNA from cells or tissue known to express *SM38* can be screened using a labeled *SM38* probe. Alternatively, a genomic

WO 02/32288

PCT/US01/32383

library may be screened to derive nucleic acid molecules encoding the SM38 protein. Further, *SM38* nucleic acid sequences may be derived by performing PCR using two oligonucleotide primers designed on the basis of the *SM38* nucleotide sequences disclosed herein. The template for the reaction may be cDNA obtained by reverse transcription of mRNA prepared from cell lines or tissue known to express SM38.

[0040] The invention also encompasses (a) DNA vectors that contain any of the foregoing *SM38* sequences and/or their complements (i.e., antisense); (b) DNA expression vectors that contain any of the foregoing *SM38* sequences operatively associated with a regulatory element that directs the expression of the SM38 coding sequences; (c) genetically engineered host cells that contain any of the foregoing *SM38* sequences operatively associated with a regulatory element that directs the expression of the SM38 coding sequences in the host cell; and (d) transgenic mice or other organisms that contain any of the foregoing SM38 sequences. As used herein, regulatory elements include but are not limited to inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators and other elements known to those skilled in the art that drive and regulate expression.

5.1.2. SM38 PROTEINS AND POLYPEPTIDES

[0041] SM38 protein, polypeptides and peptide fragments, mutated, truncated or deleted forms of the SM38 and/or SM38 fusion proteins can be prepared for a variety of uses, including but not limited to the generation of antibodies, the identification of other cellular gene products involved in the regulation of SM38 activity, and the screening for compounds that can be used to modulate the activity of SM38.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0042] Figure 14 shows the deduced amino acid sequence of the SM38 protein. The SM38 amino acid sequences of the invention include the amino acid sequence shown in Figure 14. Further, SM38s of other species are encompassed by the invention. In fact, any SM38 protein encoded by the SM38 nucleotide sequences described above is within the scope of the invention.

[0043] The invention also encompasses proteins that are functionally equivalent to the SM38 encoded by the nucleotide sequences described in Section 5.1, as judged by any of a number of criteria, including but not limited to the ability to catalyze the production of the calcium mobilizing second messenger, cADPR and thereby regulate calcium response. Such functionally equivalent SM38 proteins include but are not limited to proteins having additions or substitutions of amino acid residues within the amino acid sequence encoded by the SM38 nucleotide sequences described, above, in Section 5.1, but which result in a silent change, thus producing a functionally equivalent gene product.

[0044] Peptides corresponding to one or more domains of SM38 as well as fusion proteins in which the full length SM38, a SM38 peptide or a truncated SM38 is fused to an unrelated protein are also within the scope of the invention and can be designed on the basis of the SM38 nucleotide and SM38 amino acid sequences disclosed herein. Such fusion proteins include fusions to an enzyme, fluorescent protein, or luminescent protein which provide a marker function.

[0045] While the SM38 polypeptides and peptides can be chemically synthesized (e.g., see Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y.), large

WO 02/32288

PCT/US01/32383

polypeptides derived from SM38 and the full length SM38 itself may be advantageously produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art for expressing a nucleic acid containing *SM38* gene sequences and/or coding sequences. Such methods can be used to construct expression vectors containing the *SM38* nucleotide sequences described in Section 5.1 and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. (See, for example, the techniques described in Sambrook et al., 1989, *supra*, and Ausubel et al., 1989, *supra*).

[0046] A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the *SM38* nucleotide sequences of the invention. Where the SM38 peptide or polypeptide is expressed as a soluble derivative and is not secreted, the peptide or polypeptide can be recovered from the host cell. Alternatively, where the SM38 peptide or polypeptide is secreted the peptide or polypeptides may be recovered from the culture media. Purification or enrichment of the SM38 from such expression systems can be accomplished using appropriate detergents and lipid micelles and methods well known to those skilled in the art. Such engineered host cells themselves may be used in situations where it is important not only to retain the structural and functional characteristics of the SM38, but to assess biological activity, *i.e.*, in drug screening assays.

[0047] The expression systems that may be used for purposes of the invention include but are not limited to microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid or cosmid DNA expression vectors containing *SM38* nucleotide sequences; yeast transformed with

WO 02/32288

PCT/US01/32383

recombinant yeast expression vectors containing *SM38* nucleotide sequences or mammalian cell systems harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells or from mammalian viruses.

[0048] Appropriate expression systems can be chosen to ensure that the correct modification, processing and sub-cellular localization of the SM38 protein occurs. To this end, host cells which possess the ability to properly modify and process the SM38 protein are preferred. For long-term, high yield production of recombinant SM38 protein, such as that desired for development of cell lines for screening purposes, stable expression is preferred. Rather than using expression vectors which contain origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements and a selectable marker gene, *i.e.*, *tk*, *hgpvt*, *dhfr*, *neo*, and *hygro* gene, to name a few. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in enriched media, and then switched to a selective media. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that modulate the endogenous activity of the SM38 gene product.

5.1.3. TRANSGENIC ANIMALS

[0049] The SM38 gene products can also be expressed in transgenic animals. Animals of any species, including, but not limited to, mice, rats, rabbits, guinea pigs, pigs, micro-pigs, goats, and non-human primates, e.g., baboons, monkeys, and chimpanzees may be used to generate SM38 transgenic animals.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0050] Any technique known in the art may be used to introduce the *SM38* transgene into animals to produce the founder lines of transgenic animals. Such techniques include, but are not limited to pronuclear microinjection (Hoppe, P.C. and Wagner, T.E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); retrovirus mediated gene transfer into germ lines (Van der Putten et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148-6152); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson et al., 1989, *Cell*, 56:313-321); electroporation of embryos (Lo, 1983, *Mol Cell. Biol.* 3:1803-1814); and sperm-mediated gene transfer (Lavitano et al., 1989, *Cell* 57:717-723); etc. For a review of such techniques, see Gordon, 1989, *Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229, which is incorporated by reference herein in its entirety.

[0051] The present invention provides for transgenic animals that carry the *SM38* transgene in all their cells, as well as animals which carry the transgene in some, but not all their cells, *i.e.*, mosaic animals. The transgene may also be selectively introduced into and activated in a particular cell type by following, for example, the teaching of Lasko et al., (Lasko, M. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236). The regulatory sequences required for such a cell-type specific activation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art. When it is desired that the *SM38* transgene be integrated into the chromosomal site of the endogenous *SM38* gene, gene targeting is preferred. Briefly, when such a technique is to be utilized, vectors containing some nucleotide sequences homologous to the endogenous *SM38* gene are designed for the purpose of integrating, via homologous recombination with chromosomal sequences, into and disrupting the function of the nucleotide sequence of the endogenous *SM38* gene.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0052] Once transgenic animals have been generated, the expression of the recombinant *SM38* gene may be assayed utilizing standard techniques. Initial screening may be accomplished by Southern blot analysis or PCR techniques to analyze animal tissues to assay whether integration of the transgene has taken place. The level of mRNA expression of the transgene in the tissues of the transgenic animals may also be assessed using techniques which include but are not limited to Northern blot analysis of tissue samples obtained from the animal, *in situ* hybridization analysis, and RT-PCR. Samples of *SM38* gene-expressing tissue may also be evaluated immunocytochemically using antibodies specific for the *SM38* transgene product.

5.4. ANTIBODIES TO SM38 PROTEINS

[0053] Antibodies that specifically recognize one or more epitopes of SM38, or epitopes of conserved variants of SM38, or peptide fragments of SM38 are also encompassed by the invention. Such antibodies include but are not limited to polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mAbs), humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above.

[0054] The antibodies of the invention may be used, for example, in conjunction with compound screening schemes, as described, below, for the evaluation of the effect of test compounds on expression and/or activity of the SM38 gene product.

[0055] For production of antibodies, various host animals may be immunized by injection with

WO 02/32288

PCT/US01/32383

a SM38 protein, or SM38 peptide. Such host animals may include but are not limited to rabbits, mice, and rats, to name but a few. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (Bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*.

[0056] Polyclonal antibodies comprising heterogeneous populations of antibody molecules, may be derived from the sera of the immunized animals. Monoclonal antibodies may be obtained by any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique of Kohler and Milstein, (1975, *Nature* 256:495-497; and U.S. Patent No. 4,376,110), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclasses thereof. The hybridoma producing the mAb of this invention may be cultivated *in vitro* or *in vivo*. Production of high titres of Mabs *in vivo* makes this the presently preferred method of production.

[0057] In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes

WO 02/32288

PCT/US01/32383

from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used (Morrison et al., 1984, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, **81**:6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature*, **312**: 604-608; Takeda et al. 1985, *Nature* **314**: 452-454). Alternatively, techniques developed for the production of humanized antibodies (U.S. Patent No. 5,585,089) or single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778 Bird, 1988, *Science* **242**: 423-426; Huston et al., 1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA*, **85**: 5879-5883; and Ward et al., 1989, *Nature* **334**: 544-546) may be used to produce antibodies that specifically recognize one or more epitopes of SM38.

5.2. SCREENING ASSAYS FOR COMPOUNDS USEFUL IN
MODULATING THE ACTIVITY OF CD38/SM38

[0058] The present invention relates to screening assay systems designed to identify compounds or compositions that modulate CD38/SM38 enzyme activity, cADPR mediated signal transduction, or CD38/SM38 gene expression, and thus, may be useful for modulation of cell migration or treatment of infection.

5.2.1. RECOMBINANT EXPRESSION OF CD38

[0059] For purposes of developing screening assays designed to identify compounds or compositions that modulate CD38/SM38 activity it may be necessary to recombinantly express the CD38/SM38 proteins. The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of CD38 has been characterized from several species including human, murine and rat as described in Jackson, D.G. et al., 1990, *J. Immunol.* 151:3111-3118; Koguma, T. et al., 1994, *Biochim Biophys Acta* 1224:160-162 and Harada N et al., 1993, *J Immunol* 151:3111-3118, incorporated herein by reference. In

WO 02/32288

PCT/US01/32383

addition, the cDNA and deduced amino acid sequence of *Shistosoma mansoni*, as described herein may be utilized to recombinantly express the CD 38 homologue, SM38, protein.

[0060] *CD38/SM38* nucleotide sequences may be isolated using a variety of different methods known to those skilled in the art. For example, a cDNA library constructed using RNA from a tissue known to express *CD38/SM38* can be screened using a labeled *CD38/SM38* probe. Alternatively, a genomic library may be screened to derive nucleic acid molecules encoding the *CD38/SM38* protein. Further, *CD38/SM38* nucleic acid sequences may be derived by performing a polymerase chain reaction (PCR) using two oligonucleotide primers designed on the basis of known *CD38/SM38* nucleotide sequences. The template for the reaction may be cDNA obtained by reverse transcription of mRNA prepared from cell lines or tissue known to express *CD38/SM38*.

[0061] *CD38/SM38* protein, polypeptides and peptide fragments, mutated, truncated or deleted forms of *CD38/SM38* and/or *CD38/SM38* fusion proteins can be prepared for a variety of uses, including but not limited to the generation of antibodies, the identification of other cellular gene products involved in the regulation of *CD38/SM38* mediated cell migration, and the screening for compounds that can be used to modulate cell migration. *CD38/SM38* fusion proteins include fusions to an enzyme, fluorescent protein, a polypeptide tag or luminescent protein which provide a marker function.

[0062] While the *CD38/SM38* polypeptides and peptides can be chemically synthesized (e.g., see Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y.), large

WO 02/32288

PCT/US01/32383

polypeptides derived from CD38/SM38 and the full length CD38/SM38 itself may be advantageously produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art for expressing a nucleic acid containing CD38/SM38 gene sequences and/or coding sequences. Such methods can be used to construct expression vectors containing the CD38/SM38 nucleotide sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. (See, for example, the techniques described in Sambrook et al., 1989, *supra*, and Ausubel et al., 1989, *supra*).

[0063] A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the CD38/SM38 nucleotide sequences. Where the CD38/SM38 peptide or polypeptide is expressed as a soluble protein or derivative (*e.g.*, peptides corresponding to the intracellular or extracellular domain) and is not secreted, the peptide or polypeptide can be recovered from the host cell. Alternatively, where the CD38 peptide or polypeptide is secreted the peptide or polypeptides may be recovered from the culture media. However, the expression systems also include engineered host cells that express CD38/SM38 or functional equivalents, anchored in the cell membrane. Purification or enrichment of the CD38/SM38 from such expression systems can be accomplished using appropriate detergents and lipid micelles and methods well known to those skilled in the art. Such engineered host cells themselves may be used in situations where it is important not only to retain the structural and functional characteristics of the CD38/SM38, but to assess biological activity, *i.e.*, in drug screening assays.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0064] The expression systems that may be used for purposes of the invention include but are not limited to microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid or cosmid DNA expression vectors containing *CD38/SM38* nucleotide sequences; yeast transformed with recombinant yeast expression vectors containing *CD38/SM38* nucleotide sequences or mammalian, helminth or insect cell systems harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian, helminth or insect cells or from mammalian or insect viruses.

[0065] Appropriate expression systems can be chosen to ensure that the correct modification, processing and sub-cellular localization of the CD38/SM38 protein occurs. To this end, eukaryotic host cells which possess the ability to properly modify and process the CD38/SM38 protein are preferred. For long-term, high yield production of recombinant CD38/SM38 protein, such as that desired for development of cell lines for screening purposes, stable expression is preferred. Rather than using expression vectors which contain origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements and a selectable marker gene, *i.e.*, *tk*, *hgppt*, *dhfr*, *neo*, and *hygro* gene, to name a few. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in enriched media, and then switched to a selective media. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that modulate the endogenous activity of the CD38/SM38 gene products.

5.2.2. NON-CELL BASED ASSAYS

[0066] In accordance with the invention, non-cell based assay systems may be used to identify compounds that interact with, *i.e.*, bind to CD38, and regulate the enzymatic activity of CD38. Such compounds may act as antagonists or agonists of CD38 enzyme activity and may be used to regulate cell migration including but not limited to hematopoietically derived cells. Additionally, such compounds may be used to regulate the growth, muscle contractility, differentiation, maturation and reproduction of pathogenic micro-organisms expressing SM38 or structurally related homologues. Recombinant CD38/SM38, including peptides corresponding to different functional domains or CD38/SM38 fusion proteins may be expressed and used in assays to identify compounds that interact with CD38/SM38.

[0067] To this end, soluble CD38/SM38 may be recombinantly expressed and utilized in non-cell based assays to identify compounds that bind to CD38/SM38. Recombinantly expressed CD38/SM38 polypeptides or fusion proteins containing one or more of the CD38/SM38 functional domains may be prepared as described above, and used in the non-cell based screening assays. For example, the full length CD38/SM38, or a soluble truncated CD38/SM38, *e.g.*, in which the one or more of the cytoplasmic and transmembrane domains is deleted from the molecule, a peptide corresponding to the extracellular domain, or a fusion protein containing the CD38/SM38 extracellular domain fused to a protein or polypeptide that affords advantages in the assay system (*e.g.*, labeling, isolation of the resulting complex, etc.) can be utilized. Where compounds that interact with the cytoplasmic domain are sought to be identified, peptides corresponding to the CD38

WO 02/32288

PCT/US01/32383

cytoplasmic domain and fusion proteins containing the CD38 cytoplasmic domain can be used.

[0068] The CD38/SM38 protein may also be one which has been fully or partially isolated from cell membranes or from the cytosol of cells, or which may be present as part of a crude or semi-purified extract. As a non-limiting example, the CD38 protein may be present in a preparation of cell membranes and the SM38 protein may be present in a preparation of cell cytosol. In particular embodiments of the invention, such cell membranes may be prepared using methods known to those of skill in the art.

[0069] The principle of the assays used to identify compounds that bind to CD38/SM38 involves preparing a reaction mixture of the CD38/SM38 and the test compound under conditions and for time sufficient to allow the two components to interact and bind, thus forming a complex which can be removed and/or detected in the reaction mixture. The identity of the bound test compound is then determined.

[0070] The screening assays are accomplished by any of a variety of commonly known methods. For example, one method to conduct such an assay involves anchoring the CD38/SM38 protein, polypeptide, peptide, fusion protein or the test substance onto a solid phase and detecting CD38/test compound or SM38/test compound complexes anchored on the solid phase at the end of the reaction. In one embodiment of such a method, the CD38/SM38 reactant is anchored onto a solid surface, and the test compound, which is not anchored, may be labeled, either directly or indirectly.

[0071] In practice, microtitre plates conveniently can be utilized as the solid phase. The anchored

WO 02/32288

PCT/US01/32383

component is immobilized by non-covalent or covalent attachments. The surfaces may be prepared in advance and stored. In order to conduct the assay, the non-immobilized component is added to the coated surfaces containing the anchored component. After the reaction is completed, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously non-immobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the previously non-immobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the solid surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific for the previously non-immobilized component.

[0072] Alternatively, a reaction is conducted in a liquid phase, the reaction products separated from unreacted components using an immobilized antibody specific for CD38/SM38 protein, fusion protein or the test compound, and complexes detected using a labeled antibody specific for the other component of the possible complex to detect anchored complexes.

[0073] In accordance with the invention, non-cell based assays may also be used to screen for compounds that directly inhibit or activate enzymatic activities associated with CD38/SM38. Such activities include but are not limited to ADP-ribosyl cyclase activity, transglycosidation activity, and NAD⁺ glycohydrolase activity. To this end, a reaction mixture of CD38/SM38 and a test compound is prepared in the presence of substrate and the enzymatic activity of CD38/SM38 is compared to the activity observed in the absence of test compound. Substrates that may be used in

WO 02/32288

PCT/US01/32383

the assays for detection of CD38/SM38 enzyme activity include but are not limited to NAD⁺ and NADP and labeled forms thereof. Additionally, derivatives of NAD such as Nicotinamide guanine dinucleotide (NGD) and Nicotinamide 1, N⁶-etheno-adenine dinucleotide (1,N⁶ etheno-NAD) may be used.

[0074] In non-limiting embodiments of the invention, a reaction mixture of CD38/SM38, a test compound and substrate is prepared and the activity of CD38/SM38 is compared to the activity observed in the absence of the test compound wherein decrease in the level of CD38/SM38 enzyme activity in the presence of the test compound indicates that a CD38/SM38 antagonist has been identified. Alternatively, a reaction mixture of CD38/SM38, a test compound and substrate is prepared and the activity of CD38/SM38 is compared to the activity observed in the absence of the test compound wherein an increase in the level of CD38/SM38 enzyme activity in the presence of the test compound indicates that a CD38/SM38 agonist has been identified.

[0075] The enzymatic activity of CD38/SM38 may be detected in a variety of different ways. For example, levels of cyclic adenosine diphosphate ribose (cADPR) adenosine diphosphate ribose (ADPR) and/or nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) can be measured using high performance liquid chromatography (HPLC) or thin layer chromatography (TLC) (Aarhus R et al., 1995, *J. Biochem. Chem.* 270:30327-30333; Muller-Steffner HM, *J. Biol. Chem.* 271:23967-23972; and Lund FE et al., 1999, *J. Immunology* 162:2693-2702; Higashida, H. et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:3127-3177) in conjunction with the use of radio-labeled substrates such as NAD or NADP or NA. Additionally, radioimmunoassays (Takahashi K et al., 1995, *FEBS Lett* 371:204-208; Vu CQ

WO 02/32288

PCT/US01/32383

et al., 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 236:723-726; Vu et al., *Adv Exp Med Biol* 419:381-388; and Graeff RM et al., 1997, *Methods Enzymol* 280:230-241), bioassays (Aarhus R et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270:30327-30333; Clapper DL et al., *J. Biol. Chem.* 262:9561-9568; and Lee et al., *J. Biol. Chem.* 264:1608-1615) and/or fluorescent assays (Graeff RM et al., 1996, *Biochem.* 35:379-386; Graeff et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:30260-30267; and Gadangi P et al., 1996, *J. Immunol.* 156:1937-1941) may be used for measuring cADPR, ADPR or NAADP levels. In yet another embodiment of the invention, derivatives of NAD such as NGD (Nicotinamide guanine dinucleotide) and Nicotinamide 1, N⁶-etheno-adenine dinucleotide (1,N⁶ etheno-NAD) may be used to measure CD38/SM38 enzyme activity. When the 1,N⁶ etheno-NAD is hydrolysed by CD38, one of the resulting products will fluoresce (Muller et al., 1983, *Biochem. J.* 212:459-464; and Cockayne D et al., 1998, *Blood* 92:1324-1333). When the analog NGD is cyclized through the ADP-ribosyl activity of CD38/SM38 the product forms a fluorescent compound that can be detected by fluorimeter (Graeff et al., 1996, *Biochem* 35:379-386; and Graeff et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:30260-30267).

[0076] In another embodiment of the invention, computer modeling and searching technologies will permit identification of potential modulators of CD38/SM38 enzyme activity. For example, based on the knowledge of the Aplysia cyclase active site (Munshi C. et al., 199, *J. Biol. Chem.* 274:30770-30777) and the CD38 active site (Lund FE et al., 1999, *J. Immunology* 162:2693-2702; Munshi, C et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275:21566-21571; Graeff R et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:12169-12173) and the study of complexes between CD38/SM38 substrates and substrate analogs, potential modulators of CD38/SM38 activity may be identified.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0077] The three dimensional geometric structure of the active site may be determined using known methods, including x-ray crystallography, which can determine a complete molecular structure (see, for example, Prasad GS et al., *Nature Struc. Biol.* 3:957-964 which describes the crystal structure of Aplysia ADP ribosyl cyclase). On the other hand, solid or liquid phase NMR can be used to determine certain intramolecular distances. Any other experimental method of structure determination can be used to obtain the partial or complete geometric structure of the CD38 active site.

[0078] Having determined the structure of the CD38/SM38 active site, candidate modulating compounds can be identified by searching databases containing compounds along with information on their molecular structure. Such a search seeks compounds having structures that match the determined active site structure and that interact with the groups defining the active site. Such a search can be manual, but is preferably computer assisted. These compounds found from this search are potential CD38 modulating compounds.

[0079] Alternatively, these methods can be used to identify improved modulating compounds from an already known modulating compounds. For example, a number of compounds that modulate the enzyme activity of other enzymes that utilize NAD/NADP as substrates (*i.e.*, PARP family homologues) have already been identified. The composition of the known compound can be modified and the structural effects of modification can be determined using experimental and computer modeling methods applied to the new composition. The altered structure is then compared to the active site structure of the compound to determine if an improved fit or interaction results.

In this manner systematic variations in composition, such as by varying side groups, can be quickly evaluated to obtain modified modulating compounds or substrates of improved specificity or activity.

5. 2. 3. CELL BASED ASSAYS

[0080] In accordance with the invention, a cell based assay system can be used to screen for compounds that modulate the activity of CD38/SM38. In accordance with the invention, a cell-based assay system can be used to screen for compounds that modulate the activity of CD38 and thereby, modulate the chemoattractant induced Ca^{2+} influx and the migration of cells. Additionally, this cell based system can be used to screen for compounds that modulate the activity of SM38, and thereby, modulate intracellular calcium release and/or muscle contractility in cells. To this end, cells that endogenously express CD38/SM38 can be used to screen for compounds. Such cells include, for example, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages and dendritic cells. In addition, *S. mansoni* cells that express SM38, may be used to screen for compounds. Alternatively, cell lines, such as 293 cells, COS cells, CHO cells, fibroblasts, and the like, genetically engineered to express CD38/SM38 can be used for screening purposes. For screens utilizing host cells genetically engineered to express a functional CD38 protein, it would be preferred to use host cells that are capable of responding to chemoattractants or inflammatory stimuli. For screens utilizing host cells genetically engineered to express SM38, it would be preferable to use cells of *S. mansoni* origin that are capable of responding to a variety of stimuli such as acetylcholine or high concentrations of K^+ to induce muscle contraction. Further, oocytes or liposomes engineered to express the CD38/SM38

WO 02/32288

PCT/US01/32383

protein may be used in assays developed to identify modulators of CD38/SM38 activity.

[0081] The present invention provides methods for identifying compounds that alter one of more of the enzymatic activities of CD38/SM38, including but not limited to, NAD glycohydrolase activity, ADP-ribosyl cyclase activity and/or transglycosidation (exchange) activity. Specifically, compounds may be identified that promote CD38/SM38 enzyme activities, *i.e.*, agonists, or compounds that inhibit CD38/SM38 enzyme activities, *i.e.*, antagonists. Compounds that inhibit CD38 enzyme activities will be inhibitory for chemoattractant induced calcium responses and cell migration (Figure 2). Compounds that activate CD38 enzyme activity will enhance chemoattractant induced calcium responses and cell migration. Compounds that either activate or inhibit SM38 enzyme activities will alter the viability or functional activities of pathogenic organisms expressing SM38. Such compounds may be compounds that interact with the active site of CD38/SM38 thereby modulating enzyme activity, or compounds that compete/facilitate substrate binding to CD38/SM38 or compete/inhibit catalysis of substrate (Figure 2). Alternatively, compounds may be identified that modulate the activity of proteins that modify the CD38/SM38 protein, *i.e.*, phosphorylate, ribosylate, etc., and thereby regulate the activity of CD38 (Figure 3). Such proteins include for example, ADP-ribosyl transferases which ribosylate CD38/SM38 and render CD38/SM38 enzymatically inactive. In addition, compounds may be identified that regulate CD38/SM38 expression and thereby regulate the level of enzyme activity within a cell (Figure 4).

[0082] The present invention provides for methods for identifying a compound that activates CD38/SM38 enzyme activity comprising (i) contacting a cell expressing CD38/SM38 and

WO 02/32288

PCT/US01/32383

chemoattractant receptors with a test compound in the presence of substrate and measuring the level of CD38/SM38 activity; (ii) in a separate experiment, contacting a cell expressing CD38/SM38 protein and chemoattractant receptors with a vehicle control in the presence of substrate and measuring the level of CD38/SM38 activity where the conditions are essentially the same as in part (i), and then (iii) comparing the level of CD38/SM38 activity measured in part (i) with the level of CD38/SM38 activity in part (ii), wherein an increased level of CD38/SM38 activity in the presence of the test compound indicates that the test compound is a CD38/SM38 activator.

[0083] The present invention also provides for methods for identifying a compound that inhibits CD38/SM38 enzyme activity comprising (i) contacting a cell expressing CD38/SM38 and chemoattractant receptors with a test compound in the presence of a chemoattractant and substrate and measuring the level of CD38/SM38 activity; (ii) in a separate experiment, contacting a cell expressing CD38/SM38 and chemoattractant receptors with a chemoattractant and substrate and measuring the level of CD38/SM38 activity, where the conditions are essentially the same as in part (i) and then (iii) comparing the level of CD38/SM38 activity measured in part (i) with the level of CD38/SM38 activity in part (ii), wherein a decrease level of CD38/SM38 activity in the presence of the test compound indicates that the test compound is a CD38/SM38 inhibitor.

[0084] Depending on the assays used to detect CD38/SM38 activity, the methods described above for identifying activators and inhibitors of CD38/SM38 may include the presence or absence of a chemoattractant in steps (i) and (ii). For example, when assaying directly for CD38/SM38 ADP-ribosyl cyclase activity or the production of CD38/SM38 metabolites, the presence of a

WO 02/32288

PCT/US01/32383

chemoattractant or the expression of a chemoattractant receptor on the test cell may not be required. However, in instances where, for example, chemotaxis or changes in intracellular calcium levels are measured in CD-38-expressing cells it may be necessary to include chemoattractants. Alternatively, when muscle contractility or changes in intracellular calcium levels are measured in SM38-expressing cells, it may be necessary to include stimulants to activate muscle contraction and/or calcium release including, but not limited to, acetylcholine, serotonin (Day et al., 1994, *Paristol.* 108:425-432), FMRF-amide related peptides (FaRPs) (Day et al., 1994, *Paristol.* 109:455-459) or high K⁺ concentrations in the media (Day et al., 1993, *Paristol.* 106:471-477). Additionally, it will be necessary to perform these experiments with host cells that express the receptors specific for the stimulants utilized. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions by employing routine experimentation.

[0085] A "chemoattractant", as defined herein, is a compound or molecular complex that induces the migration of cells via a mechanism that is dependent on the production of cADPR by CD38.

An example of such a chemoattractant includes, but is not limited to, fMet-leu-Phe (fMLP). Other chemoattractants that may be used include, eotaxin, GRO-1, IP-10, SDF-1, BLC, Rantes, MIP-1A, MCP-3, MIP3a, IL-8, CLS, ELC, Lymphotactin, PAF, Ltb4, complement c5a and histamine.

[0086] In utilizing the cell systems described above, such cell systems, the cells expressing the CD38/SM38 protein are exposed to a test compound or to vehicle controls (e.g., placebos). After exposure, the cells can be assayed to measure the activity of CD38/SM38 or the activity of the CD38 dependent signal transduction pathway itself can be assayed.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0087] The ability of a test molecule to modulate the activity of CD38/SM38 may be measured using standard biochemical and physiological techniques. Responses such as activation or suppression of CD38/SM38 ADP-ribosyl cyclase activity or the production of CD38/SM38 metabolites such as cADPR and/or NAADP can be measured. Levels of cADPR, ADPR and/or NAADP can be measured using HPLC or TLC in conjunction with the use of radio-labeled substrates such as NAD or NADP or NA. Additionally, radioimmunoassays, bioassays and/or fluorescent assays, such as those discussed in Section 5.1.1, *supra*, may be used for measuring cADPR or NAADP levels. In yet another embodiment of the invention, derivatives of NAD such as NGD (Nicotinamide guanine dinucleotide) and Nicotinamide 1, N⁶-etheno-adenine dinucleotide (1, N⁶ etheno-NAD) may be used to measure CD38/SM38 activity.

[0088] Test compounds may also be assayed utilizing cell based calcium and/or migration assays to identify compounds that are capable of inhibiting or activating chemoattractant induced CD38 dependent calcium responses and cell migration. In non-limiting embodiments of the invention, changes in intracellular Ca²⁺ levels may be monitored by the fluorescence of Ca²⁺ indicator dyes such as Indo, Fluo-3 and Fura-Red, etc. Further, changes in membrane potential resulting from modulation of the CD38/SM38 enzyme activity can be measured using a voltage clamp or patch recording methods. Directed migration of cells may also be monitored by standard chemotaxis assays in modified Boyden chambers or on slides. Such assay systems are described in further detail in the working example of the present specification (See, Example 6). Muscle contractility may also be measured by standard assays described in detail in the literature (for example: (Day et al., 1994

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Parasitology 109:455-9) and references therein).

[0089] After exposure to the test compound, or in the presence of a test compound, cells can be stimulated with a chemoattractant such as fMLP or a muscle activator such as high K⁺ concentrations, and changes in intracellular calcium levels, cADPR or NAADP levels, muscle contractility and/or cell migration may be measured. These measurements will be compared to cells treated with the vehicle control. Increased levels of intracellular Ca²⁺, increased production of cADPR, increases in muscle contractility and/or increased migration of cells toward a chemoattractant in the presence of a test compound indicates that the compound acts as an agonists to increase the Ca²⁺ response increase muscle contractility and increase chemoattractant induced CD38 dependent cell migration. Decreased levels of intracellular Ca²⁺, decreased production of cADPR, decreased muscle contractility and/or decreased migration of cells toward a chemoattractant in the presence of a test compound indicates that the compound acts as an antagonist and inhibits the Ca²⁺ response, decreases muscle contractility and inhibits chemoattractant induced CD38 dependent cell migration (see, for example, Figures 2 and 3).

[0090] In addition, the assays of the invention may be used to identify compounds that (i) function as substrates of CD38/SM38 enzymatic activity and are converted into agonists or antagonists of cADPR dependent Ca²⁺ signal transduction pathway (Figure 5). A compound fitting these specifications is described in further detail in the working example of the present specification (Example 6, Figure 11). Alternatively, the assays of the invention may be used (ii) to identify compounds that specifically interfere with the cADPR mediated Ca²⁺ signal transduction pathways

WO 02/32288

PCT/US01/32383

(Figure 6). In a non-limiting embodiment of the invention, test compounds may include chemical derivatives of any known and unknown substrates of CD38/SM38 (for example, the substrate analog 8-Br- β NAD is converted into the modified product 8-Br-cADPR which acts as an antagonist of cADPR mediated Ca^{2+} signal transduction). The test substrate may be administered to cells expressing CD38/SM38 and the appropriate chemoattractant receptors in the presence of the chemoattractant or muscle stimulant. Conversion of the modified test substrate into a modified product that is capable of modulating the activity of cADPR can be measured utilizing the methods described above. Test substrates may also be assayed to determine their effect on calcium influx, muscle contractility and/or cell migration. Intracellular Ca^{2+} accumulation and directed migration to a chemoattractant can be measured in cells treated with the test substrate and the chemoattractant and compared to cells receiving the non-modified substrate. *i.e.*, NAD and a chemoattractant. Compounds which are converted into modified products, *i.e.*, 8-Br-cADPR, and competitively or non-competitively inhibit cADPR induced calcium responses, muscle contractility or directed migration will be identified as antagonists of the cADPR Ca^{2+} signaling pathway, while compounds that are converted into modified products that are competitive or non-competitive agonists of the cADPR Ca^{2+} signaling pathway will be defined as agonists or activators.

[0091] In yet another embodiment of the invention, compounds that directly alter (*i.e.*, activate or inactivate) the activity of cADPR, *i.e.*, induced calcium release and cell migration, can be tested in assays. Such agonists or antagonists would be expected to modulate the influx of Ca^{2+} into the cell resulting in changes in the cell's migratory activity or ability to contract. Antagonists would have

WO 02/32288

PCT/US01/32383

reduced Ca²⁺ responses, reduced contractility and/or reduced migration in the presence of a chemoattractant. Examples of antagonists include, but are not limited to 8-NH₂-cADPR, 8-Br-cADPR, 8-CH₃-cADPR, 8-OCH₃-cADPR and 7-Deaza-8-Br-cADPR. A compound fitting these specifications is described in further detail in the working example of the present specification (Example 6, Figure 10). Agonists would have increased Ca²⁺ responses, increased contractility and/or increased migration in the presence of chemoattractants. Examples of agonists include but are not limited to 2'-deoxy-cADPR, 3'-deoxy-cADPR and 2'-phospho-cADPR. Assays for direct measurement of cADPR activity include the bioassays such as those described by Howard et al. (1995, Science 262:1056); Galione et al. (1993, Nature 365:456-459) and Lee and Aarhus (1991, Cell Regulation 2:203-209).

[0092] Further, the assays of invention may identify compounds that are capable of activating CD38/SM38 enzyme activity, *i.e.*, agonists, but which desensitize the calcium pathway by depletion of intracellular calcium stores. Such desensitization may, in some instances, lead to inhibition of cell migration or muscle contraction due to the depletion of calcium stores. Thus compounds may be identified that function as agonists in CD38/SM38 enzyme assays but function as antagonists in chemotaxis or muscle contraction assays. Such assays and compounds are within the scope of the present invention.

5.2.4. ASSAY FOR COMPOUNDS THAT REGULATE THE EXPRESSION OF CD38/SM38

[0093] In accordance with the invention, a cell based assay system can be used to screen for

WO 02/32288

PCT/US01/32383

compounds that modulate the expression of CD38/SM38 within a cell. Assays may be designed to screen for compounds that regulate CD38/SM38 expression at either the transcriptional or translational level. In one embodiment, DNA encoding a reporter molecule can be linked to a regulatory element of the CD38/SM38 gene and used in appropriate intact cells, cell extracts or lysates to identify compounds that modulate CD38/SM38 gene expression. Such reporter genes may include but are not limited to chloramphenicol acetyltransferase (CAT), luciferase, β -glucuronidase (GUS), growth hormone, or placental alkaline phosphatase (SEAP). Such constructs are introduced into cells thereby providing a recombinant cell useful for screening assays designed to identify modulators of CD38/SM38 gene expression.

[0094] Following exposure of the cells to the test compound, the level of reporter gene expression may be quantitated to determine the test compound's ability to regulate CD38/SM38 expression. Alkaline phosphatase assays are particularly useful in the practice of the invention as the enzyme is secreted from the cell. Therefore, tissue culture supernatant may be assayed for secreted alkaline phosphatase. In addition, alkaline phosphatase activity may be measured by calorimetric, bioluminescent or chemiluminescent assays such as those described in Bronstein, I. et al. (1994, *Biotechniques* 17: 172-177). Such assays provide a simple, sensitive easily automatable detection system for pharmaceutical screening.

[0095] To identify compounds that regulate CD38/SM38 translation, cells or *in vitro* cell lysates containing CD38/SM38 transcripts may be tested for modulation of CD38/SM38 mRNA translation. To assay for inhibitors of CD38/SM38 translation, test compounds are assayed for their ability to

WO 02/32288

PCT/US01/32383

modulate the translation of CD38/SM38 mRNA in *in vitro* translation extracts.

[0096] In an embodiment of the invention, the level of CD38/SM38 expression can be modulated using antisense or ribozyme approaches to inhibit or prevent translation of CD38/SM38 mRNA transcripts or triple helix approaches to inhibit transcription of the CD38/SM38 gene. Such approaches may be utilized to treat disorders such as inflammation and allergies where inhibition of CD38/SM38 expression is designed to prevent hematopoietically-derived cell migration or inhibition of SM38 is designed to alter *S. mansoni* physiology and pathogenesis.

[0097] Antisense approaches involve the design of oligonucleotides (either DNA or RNA) that are complementary to CD38/SM38 mRNA. The antisense oligonucleotides will bind to the complementary mRNA transcripts and prevent translation. Absolute complementarity, although preferred, is not required. One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

[0098] In yet another embodiment of the invention, ribozyme molecules designed to catalytically cleave CD38/SM38 mRNA transcripts can also be used to prevent translation of CD38/SM38 mRNA and expression of CD38/SM38. (See, e.g., PCT International Publication WO90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225). Alternatively, endogenous CD38/SM38 gene expression can be reduced by targeting deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the CD38/SM38 gene (*i.e.*, the CD38 promoter and or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the CD38/SM38 gene in

WO 02/32288

PCT/US01/32383

targeted hematopoietically-derived cells in the body. (See generally, Helene, C. et al., 1991, *Anticancer Drug Des.* 6:569-584 and Maher, LJ, 1992, *Bioassays* 14:807-815).

[0099] The oligonucleotides of the invention, *i.e.*, antisense, ribozyme and triple helix forming oligonucleotides, may be synthesized by standard methods known in the art, *e.g.*, by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Bioscience Resource, Applied Biosystems, etc.). Alternatively, recombinant expression vectors may be constructed to direct the expression of the oligonucleotides of the invention. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. In a specific embodiment, vectors such as viral vectors may be designed for gene therapy applications where the goal is *in vivo* expression of inhibitory oligonucleotides in targeted cells.

5.2.5. COMPOUNDS THAT CAN BE SCREENED IN ACCORDANCE WITH THE INVENTION

[0100] The assays described above can identify compounds which modulate CD38/SM38 activity. For example, compounds that affect CD38/SM38 activity include but are not limited to compounds that bind to CD38/SM38, and either activate enzyme activities (agonists) or block enzyme activities (antagonists). Alternatively, compounds may be identified that do not bind directly to CD38/SM38 but are capable of altering CD38/SM38 enzyme activity by altering the activity of a protein that regulates CD38 enzyme activity (see, Figure 3). Compounds that are substrates of CD38 that are converted into modified products that activate or inhibit the cADPR/Ca²⁺ signal transduction pathway can also be identified by the screens of the invention.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Compounds that directly activate or inhibit the cADPR Ca²⁺ signal transduction pathway in cells can also be identified. Additionally, compounds that activate CD38/SM38 enzyme activity resulting in desensitization of the calcium pathway may be identified. Such desensitizing compounds would be expected to inhibit cell migration. Further, compounds that affect CD38/SM38 gene activity (by affecting CD38/SM38 gene expression, including molecules, e.g., proteins or small organic molecules, that affect transcription or interfere with splicing events so that expression of the full length or the truncated form of the CD38/SM38 can be modulated) can be identified using the screens of the invention.

[0101] The compounds which may be screened in accordance with the invention include, but are not limited to, small organic or inorganic compounds, peptides, antibodies and fragments thereof, and other organic compounds (e.g., peptidomimetics) that bind to CD38/SM38 and either mimic the activity triggered by any of the known or unknown substrates of CD38/SM38 (i.e., agonists) or inhibit the activity triggered by any of the known or unknown substrates of CD38/SM38 (i.e., antagonists). Compounds that bind to CD38/SM38 and either enhance CD38/SM38 enzyme activities (i.e., ADP-ribosyl cyclase activity, NAD glycohydrolase activity, transglycosidation activity), i.e., agonists, or compounds that inhibit CD38/SM38 enzyme activities, i.e., antagonists, in the presence or absence of the chemoattractant or muscle stimulant will be identified. Compounds that bind to proteins that alter/modulate the enzyme activity of CD38/SM38 will be identified. Compounds that mimic natural substrates, i.e., NAD(P) and are converted by CD38/SM38 enzyme activities into products that act as agonists or antagonists of

WO 02/32288

PCT/US01/32383

the cADPR induced calcium release pathway can be identified. Compounds that directly activate or inhibit the cADPR Ca²⁺ signal transduction pathway in cells can be identified.

[0102] Compounds may include, but are not limited to, peptides such as, for example, soluble peptides, including but not limited to members of random peptide libraries (see, e.g., Lam, K.S. et al., 1991, Nature 354:82-84; Houghten, R. et al., 1991, Nature 354:84-86); and combinatorial chemistry-derived molecular library made of D- and/or L- configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to, members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide libraries; (see, e.g., Songyang, Z. et al., 1993, Cell 72:767-778), antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and FAb, F(ab')₂ and FAb expression library fragments, and epitope binding fragments thereof), and small organic or inorganic molecules.

[0103] Other compounds which may be screened in accordance with the invention include but are not limited to small organic molecules that affect the expression of the CD38/SM38 gene or some other gene involved in the CD38/SM38 signal transduction pathway (e.g., by interacting with the regulatory region or transcription factors involved in gene expression); or such compounds that affect the enzyme activities of the CD38/SM38 or the activity of some other factor involved in modulating CD38/SM38 enzyme activity, such as for example, a protein that ribosylates CD38/SM38 and thereby inactivates CD38/SM38 enzyme activities.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

5.3. COMPOSITIONS CONTAINING MODULATORS
OF CD38/SM38 AND THEIR USES

[0104] The present invention provides for methods of modulating cell migration comprising contacting a cell expressing CD38 with an effective amount of a CD38 modulating compound, such as a CD38 agonist or antagonist identified using the assays as set forth in Section 5.1 *supra*. Additionally, the present invention provides for methods of modulating calcium responses and/or muscle contractility comprising contacting a cell expressing SM38 with an effective amount of a SM38 modulating compound, such as a SM38 agonist or antagonist identified using the assays as set forth in Section 5.1 *supra*. An "effective amount" of the CD38/SM38 inhibitor, *i.e.*, antagonist, is an amount that decreases chemoattractant induced cell migration decreases intracellular calcium levels, decreases muscle contraction and/or that is associated with a detectable decrease in CD38/SM38 enzyme activity as measured by one of the above assays. An "effective amount" of the CD38/SM38 activator, *i.e.*, agonist, is an amount that subjectively increases chemoattractant induced cell migration, increases intracellular calcium levels, increases muscle contraction and/or that is associated with a detectable increase in CD38/SM38 enzyme activity as measured by one of the above assays. Compositions of the invention also include modified CD38/SM38 substrates, modulators of CD38/SM38 expression and agonists/antagonists of cADPR.

[0105] The present invention further provides methods of modulating cell migration in a subject, comprising administering to the subject, a composition comprising a compound that modulates CD38 enzyme activity identified as set forth in Section 5.1 *supra*. The composition may

WO 02/32288

PCT/US01/32383

comprise an amount of CD38 enzyme activator or inhibitor, modulators of CD38 expression, modified CD38 substrates, or direct agonists/antagonists of cADPR controlled Ca²⁺ responses. Accordingly, the present invention provides for compositions comprising CD38 activators and inhibitors.

[0106] The present invention provides for compositions comprising an effective amount of a compound capable of modulating the activity of CD38, the expression of CD38 and/or the activity of cADPR thereby regulating the migratory activity of cells, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical sciences" by E.W. Martin.

[0107] The invention provides for treatment or prevention of various diseases and disorders associated with cell migration by administration of a compound that regulates the expression or activity of CD38. Such compounds include but are not limited to CD38 antibodies; CD38 antisense nucleic acids, CD38 agonists and antagonists (see, Figures 2-3), modified CD38 substrates (see, Figure 5) and cADPR agonists and antagonists (see, Figure 6). In a non-limiting embodiment of the invention, disorders associated with hematopoietic derived cell migration are treated or prevented by administration of a compound that regulates CD38 activity. Such

WO 02/32288

PCT/US01/32383

disorders include but are not limited to inflammation, ischemia, asthma, auto-immune disease, diabetes, allergies, infections, arthritis and organ transplant rejections.

[0108] The compounds of the invention are preferably tested *in vitro*, and then *in vivo* for a desired therapeutic or prophylactic activity, prior to use in humans. For example, *in vitro* assays which can be used to determine whether administration of a specific therapeutic is indicated, include *in vitro* cell culture assays in which cells expressing CD38 are exposed to or otherwise administered a therapeutic compound and the effect of such a therapeutic upon CD38 activity is observed. In a specific embodiment of the invention the ability of a compound to regulate, *i.e.*, activate or inhibit cell migration may be assayed.

[0109] The present invention further provides methods of modulating the muscle contraction or other physiologic parameters in helminths such as *S. mansoni* by administering to helminth infected subject, a composition comprising a compound that modulates SM38 enzyme activity identified as set forth in Section 5.1 *supra*. The composition may comprise an amount of SM38 enzyme activator or inhibitor, modulators of SM38 expression, modified SM38 substrates, or direct agonists/antagonists of cADPR controlled Ca²⁺ responses. Accordingly, the present invention provides for compositions comprising SM38 activators and inhibitors.

[0110] The present invention provides for compositions comprising an effective amount of a compound capable of modulating the activity of SM38, the expression of SM38 and/or the

WO 02/32288

PCT/US01/32383

activity of cADPR thereby regulating the activity and viability of the parasite, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical sciences" by E.W. Martin.

[0111] The invention provides for treatment or prevention of various diseases and disorders associated with helminth infections. Such compounds include but are not limited to SM38 antibodies; SM38 antisense nucleic acids, SM38 agonists and antagonists (see, Figures 2-3), modified SM38 substrates (see, Figure 5) and cADPR agonists and antagonists (see, Figure 6). In a non-limiting embodiment of the invention, disorders associated with helminth infection are treated or prevented by administration of a compound that regulates SM38 activity. Such disorders include but are not limited to granuloma formation and fibrosis in the liver and lung.

[0112] The compounds of the invention are preferably tested *in vitro*, and then *in vivo* for a desired therapeutic or prophylactic activity, prior to use in humans. For example, *in vitro* assays which can be used to determine whether administration of a specific therapeutic is indicated, include *in vitro* cell culture assays in which cells expressing SM38 are exposed to or otherwise administered a therapeutic compound and the effect of such a therapeutic upon SM38 activity is observed. In a specific embodiment of the invention the ability of a compound to regulate, *i.e.*,

WO 02/32288

PCT/US01/32383

activate or inhibit muscle contractility or intracellular calcium accumulation. Additionally, the compounds of the invention may be assayed for their effect on *S. mansoni* pathogenesis, growth, differentiation, and reproduction in a mouse model for *S. mansoni* infection. Such assays would include the testing for effects on proliferation of parasites, maturation of female worms, quantity of granulomas in liver and lung, quantity of eggs in liver, lung bladder and intestines, quantity of worms in lung and liver and quantity of miracidia detected in urine and feces.

[0113] Additionally, the compounds of the invention may be assayed for their effect on *S. mansoni* pathogenesis, growth, differentiation, and reproduction. Such compounds could be tested in a mouse model for *S. mansoni* infection. Such assays would include the testing for effects on proliferation of parasites, quantity of granulomas in liver and lung, quantity of eggs in liver, lung bladder and intestines and quantity of miracidia detected in urine and feces.

[0114] The invention provides methods of treatment and/or prophylaxis by administration to a subject of an effective amount of a compound of the invention. In a preferred aspect, the compound is substantially purified. The subject is preferably an animal, and is preferably a mammal, and most preferably human.

[0115] Various delivery systems are known and can be used to administer a compound capable of regulating CD38 activity, cADPR, or CD38 expression, e.g., encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the compound, receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Methods of

WO 02/32288

PCT/US01/32383

introduction include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The compounds may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (e.g., oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. Pulmonary administration can also be employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

[0116] In a specific embodiment, it may be desirable to administer the compositions of the invention locally to a specific area of the body; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, e.g., in conjunction with a wound dressing after surgery, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers.

[0117] The present invention also provides pharmaceutical compositions. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of a compound capable of regulating CD38 activity, cADPR activity or CD38 expression and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other Generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is

WO 02/32288

PCT/US01/32383

administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical sciences" by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the therapeutic compound, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the patient. The formulation should suit the mode of administration.

[0118] The amount of the compound of the invention which will be effective in the treatment of a particular disorder or condition will depend on the nature of the disorder or condition, and can be determined by standard clinical techniques. In addition, *in vitro* assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the seriousness of the disease or disorder, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances. Effective doses may be extrapolated from dose response curves derived from

WO 02/32288

PCT/US01/32383

in vitro or animal model test systems. Additionally, the administration of the compound could be combined with other known efficacious drugs if the *in vitro* and *in vivo* studies indicate a synergistic or additive therapeutic effect when administered in combination.

[0119] The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention, optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

6. EXAMPLE: NEUTROPHILS REQUIRE CD38 FOR CHEMOTAXIS, CAPACITATIVE Ca²⁺ ENTRY AND BACTERIAL CLEARANCE

[0120] The subsection below describes data demonstrating that calcium entry in chemoattractant activated neutrophils is controlled by cADPR, a product of the CD38 enzyme reaction. The capacitative calcium influx, controlled by the cADPR produced by CD38, is required for neutrophils to migrate efficiently to chemoattractants.

6.1. MATERIALS AND METHODS

6.1.1. MICE

[0121] C57BL/6J x 129 CD38KO F2 animals(Cockayne et al., 1998 *Blood* 92:1324-1333) were backcrossed 6 generations (N6) to C57BL/6J and then inbred to produce homozygous congenic

WO 02/32288

PCT/US01/32383

C57BL/6J.129 CD38KO mice. CD38-Rag-2 double KO (dKO) mice were produced by crossing C57BL/6J.129 (N6) CD38KO mice with C57BL/6J.129 (N8) Rag-2 KO mice (Shin Kai et al., 1992 *Cell* 68:855-867) and then mating the offspring to obtain homozygous double KO animals. Bone marrow chimeric mice were produced by transplanting 1×10^7 whole bone marrow cells isolated from WT or CD38KO mice into lethally irradiated (950 rad) WT hosts. All mice were bred and maintained in the Trudeau Institute Animal Breeding Facility.

6.1.2. cADPR CONTENT MEASUREMENTS.

[0122] Mouse tissues were isolated from whole-body perfused WT or CD38KO mice and were flash frozen in liquid nitrogen. Bone marrow myeloid cells were flushed from the tibias and femurs of Rag-2KO or Rag-2-CD38 dKO mice. cADPR content in mouse tissues and bone marrow myeloid cells was then measured as previously described (Vu et al., 1997 *Biochem Biophys Res Commun* 236:723-726).

[0123] *S. pneumoniae* infection. Mice were infected intra-tracheally with 100 or 1000 CFU *S. pneumoniae* type 4 (Klein Strain) from American Type Tissue Culture (Rockville, Maryland). Blood, bronchial-aveolar lavage fluid (BAL) and lung tissue were collected from infected mice (Garvy et al., 1996 *Inflammation* 20:499-512). Bacterial titers in lung homogenate and blood were calculated on a per lung basis or per ml of blood. BAL cells were enumerated from cyto-centrifuge preparations.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

6.1.3. IN VITRO CHEMOTAXIS ASSAYS

[0124] Bone marrow neutrophils were purified (95% purity) by positive selection using biotinylated GR-1 (PharMingen) and MACS Streptavidin Microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn CA). Chemotaxis assays (Falk et al., 1980 *J. Immuno. Methods* 33:239-247) were performed using 24-well transwell plates with a 3 μ m pore size polycarbonate filter (Costar, Cambridge, MA). Medium (HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺), fMLP (1 μ M, Sigma, St. Louis, MO), or IL-8 (100 nM, Sigma) was placed in the lower and/or upper chamber in a checkerboard format. 1×10^5 neutrophils were loaded in the upper chamber and the plates were incubated at 37° C for 45 min. The transmigrated cells were collected from the lower chamber, fixed and counted on the flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose CA). To determine the absolute number of cells in each sample, a standard number of 20 μ M size fluorescent microspheres (Polysciences, Inc. Warrington, PA) was added to each tube and counted along with the cells. The total number of transmigrated cells = the number of counted neutrophils X total number of beads/beads counted. In some experiments, neutrophils were incubated in EGTA (2mM) or pre-treated for 20 min with 8-Br-cADPR (25-100 μ M, Sigma) or N(8-Br-A)D+ (1.0 mM).

6.1.4. CD38 EXPRESSION

[0125] Bone marrow, blood or peritoneal cavity cells were isolated from WT or CD38KO mice and stained with anti-mouse GR-1 FITC, anti-mouse MAC-1 PE and anti-mouse CD38 APC (PharMingen, San Diego CA). Human peripheral blood neutrophils were isolated on a ficoll gradient and then stained with anti-hCD15-FITC (Becton Dickinson, San Jose CA) and anti-

WO 02/32288

PCT/US01/32383

hCD38-Biotin (Caltag Laboratories, Burlingame CA). Mouse and human neutrophils were analyzed by flow cytometry, gating on the MAC-1⁺GR-1⁺ for mouse neutrophils and CD15⁺ for human neutrophils. To induce an inflammatory response, mice were injected with 1 ml 3% thioglycollate medium intra-peritoneally (Becton Dickinson, Cockeysville MD). The animals were sacrificed 12 hrs post-injection, and the cells infiltrating the peritoneal cavity were collected.

6.1.4. MEASUREMENT OF CD38 CYCLASE ACTIVITY

[0126] Measurement of CD38 cyclase activity. 1×10^6 purified bone marrow neutrophils were incubated for 20 min at 37° C in 100 μ l HBSS in a 96 well microplate. NGD (40 μ M) (Sigma) was added and the enzymatic conversion of NGD⁺ to cGDPR was measured fluorometrically (Graeff et al., 1994 *J. Biol. Chem.* 269:30260-30267) over the next 10 minutes (415 nm emission and 300 nm excitation).

6.1.5. RYR-3 MRNA EXPRESSION IN NEUTROPHILS

[0127] cDNA was prepared from RNA isolated from purified bone marrow neutrophils or brain tissue. 30 cycles (annealing temperature 61°C) RT-PCR was performed with 0.03-2 μ g input cDNA and RyR-3 specific primers (Guse et al., 1999 *Nature* 398:70-73).

[0128] Synthesis of N(8-Br-A)D⁺. N(8-Br-A)D⁺ was synthesized as previously described (Abdallah et al. 1975 *Eur. J Biochem* 50:475-481).

WO 02/32288

PCT/US01/32383

6.1.6. INTRACELLULAR CALCIUM MEASUREMENTS

[0129] Purified bone marrow neutrophils were resuspended in cell loading media (HBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} + 1% FBS + 4 mM probenecid) at 1×10^7 cells/ml. The cells were incubated at 37° C for 30 min with the fluorescent dyes Fluo-3 AM (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Fura Red AM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Molecular Probes, Eugene OR) and then washed twice and resuspended in cell loading medium or calcium-free medium at 1×10^6 cells/ml. In some experiments, cells were permeabilized in 5 μM digitonin in calcium-free media. In other experiments, cells were preincubated with EGTA (2mM), 8-Br-cADPR (10-100 μM), ruthenium red (Sigma) or N(8-Br-A)D⁺ (1mM) and then stimulated with the carrier control (DMSO 0.01%), fMLP (1 μM), IL-8 (100 nM), ryanodine (1 μM), cADPR (100 μM) or thapsigargin (1 μM). The accumulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in individual cells was assessed by flow cytometry measuring the fluorescence emission of Fluo-3 in the FL-1 channel and Fura-Red in the FL-3 channel. Data was analyzed using FlowJo 3.2 (Tree Star, Inc. San Carlos, CA). The relative $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was expressed as the ratio between Fluo-3 and Fura Red mean fluorescence intensity over time.

6.2. RESULTS

[0130] CD38 is the primary ADP-ribosyl cyclase expressed in lymphoid tissues. To directly test the requirement for CD38 and cADPR in calcium-sensitive immunologic responses *in vivo*, CD38 knockout (CD38KO) mice were generated (Cockayne et al. 1998 *Blood* 92:1324-1333). To determine whether CD38 is the primary cyclase expressed in mice, the cADPR content in tissues and cells isolated from CD38KO and C57BL/6J wild-type (WT) mice were

WO 02/32288

PCT/US01/32383

compared(Table 1).

Table 1. Comparison of cADPR content in tissues isolated from CD38KO and WT animals.

Tissue	cADPR content WT tissue (pmol/mg protein)	cADPR content CD38KO tissue (pmol/mg protein)
Spleen	2.108 ± 0.334	0.298 ± 0.091*
Thymus	0.769 ± 0.182	0.335 ± 0.088**
BM myeloid	0.633 ± 0.111	0.257 ± 0.032*
Lung	0.847 ± 0.213	0.480 ± 0.069
Kidney	0.488 ± 0.119	0.418 ± 0.070
Heart	1.249 ± 0.324	1.014 ± 0.237
Brain	3.865 ± 0.866	3.127 ± 0.316

Extracts were prepared from tissues isolated from 8-12 wk old CD38KO or WT mice or from bone marrow (BM) myeloid cells isolated from Rag-2KO or Rag-2-CD38 double KO mice and were analyzed for cADPR content. Three separate purifications and analyses were performed on tissues isolated from 3 mice/analysis. *P=0.01, **P=0.07; Anova analysis. Limit of detection, 0.2 pmol/mg protein.

[0131] WT tissues containing primarily lymphoid or myeloid cells, such as spleen, thymus and lymphoid deficient bone marrow (myeloid cells), had easily detectable levels of cADPR. In contrast, cADPR was not detected in lymphoid or myeloid tissues isolated from CD38KO mice. However, the cADPR content of CD38KO tissues such as brain, kidney and heart was nearly equivalent to the cADPR content of the same WT tissues. Thus, other unknown cyclases must be responsible for cADPR production in organs such as brain and heart, however, CD38 is the predominant ADP-ribosyl-cyclase expressed by myeloid and lymphoid cells.

[0132] CD38 deficient mice are more susceptible to bacterial infection. To test the requirement for CD38 and cADPR in innate inflammatory immune responses, CD38KO and WT mice were infected with *Streptococcus pneumoniae* and assessed survival (Figure 7A). It was observed that

WO 02/32288

PCT/US01/32383

the LD50 for CD38 KO animals is at least 10-fold lower than for WT mice, as 100 colony forming units (CFU) killed 50% of the CD38KO mice within 2.5 days of infection, while 1000 CFU were required to kill 50% of the WT animals in the same time period.

[0133] Since CD38 is expressed by the responding immunocytes and the bronchial epithelium (Fernandez JE et al., J. Biol. Reg. Homeost. Agents 12:81-91), WT or CD38KO bone marrow was transplanted into irradiated WT hosts to test whether CD38 expression in the lung and/or immune system was necessary for protection. The reconstituted chimeric animals possessed either CD38+ or CD38-deficient bone-marrow derived cells, while all other cell types, including the bronchial epithelium, were of WT origin in both groups of animals. The reconstituted mice were then infected with *S. pneumoniae* and survival was monitored (Figure 7B). Reconstituted animals receiving CD38KO bone marrow were much more susceptible to infection compared to mice receiving WT bone marrow, indicating that the increased susceptibility of CD38KO mice to *S. pneumoniae* infection is due to the loss of CD38 on bone marrow-derived lymphoid and/or myeloid cells.

[0134] To determine whether the increased susceptibility of CD38KO animals to *S. pneumoniae* was due to an inability to restrain bacterial growth and spreading to systemic sites, CD38KO and WT mice were infected with 1000 CFU of *S. pneumoniae* and bacterial titers were assessed in lung and blood 12 hours post-infection (Figure 7C). The bacterial titer in the lungs of CD38KO mice was increased five-fold compared to WT controls. However, the bacterial burden in the blood of the CD38KO mice was 200-500 times greater than in WT mice, indicating that the

WO 02/32288

PCT/US01/32383

bacteria rapidly disseminate in CD38KO mice.

[0135] To determine whether myeloid or lymphoid cells were responsible for the increased bacterial spreading, Rag-2 KO mice (Shin Kai, et al., 1992 *Cell* 68:855-867) (which lack lymphocytes but can express CD38 on all myeloid cells) and CD38-Rag-2 double knockout mice (which lack lymphocytes and cannot express CD38 on their myeloid cells) were infected with 1000 CFU *S. pneumoniae* and then bacterial titers were determined in lung and blood 12 hours later (Figure 7C). The bacterial titers in the lungs and blood of the lymphoid-deficient CD38-Rag-2 double KO mice were as high as those seen in the CD38KO mice and were significantly increased when compared to Rag-2 KO or WT mice. Thus, CD38 deficient myeloid cells are responsible for the increased susceptibility of CD38KO mice to *S. pneumoniae*.

[0136] CD38 deficient neutrophils do not accumulate at sites of infection and inflammation. To test whether myeloid cells were appropriately recruited to the lungs of *S. pneumoniae*-infected CD38KO animals, CD38KO and WT mice were infected and then the cells that were recruited to the lung airways after infection were enumerated. The total number of cells in the airways of CD38KO and WT animals increased equivalently from 6 to 18 hours post-infection (Figure 8A). However, neutrophils were the predominant cell type found in the lungs of WT animals 12-18 hours post-infection, while the cellular infiltrate in the lungs of the CD38KO animals was composed primarily of macrophages (Figure 8B-C). Thus, CD38 appears to be required for sustained recruitment of neutrophils to the site of infection and inflammation.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

[0137] CD38 deficient neutrophils make a defective chemotactic response to the chemoattractant fMLP. Neutrophils migrate to sites of infection in response to gradients of chemokines and chemoattractants that are produced by the local cells and by the invading pathogen (Hub et al. 1996 *Chemoattractant Ligands and Their Receptors* (ed. Horuk) 301-325 (CRC Press, Boca Raton, FL); Servant G. et al., 2000 *Science* 287:1037-1040; Gao, J.L., 1999 *J. Exp. Med* 189:657-662). Chemoattractants rapidly activate neutrophils and induce random migration (chemokinesis). If a chemotactic gradient exists, the activated neutrophils polarize their leading edge toward the highest concentration of the gradient and migrate directionally¹⁶ (chemotaxis). It has been previously demonstrated that neutrophils home to sites of infection upon stimulation of their N-formylpeptide receptor (FPR) by bacterially-derived formylated peptides such as formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). To test whether CD38KO neutrophils were defective in their ability to chemotax to fMLP, the ability of CD38KO and WT neutrophils to migrate by chemokinesis and chemotaxis in a transwell checkerboard assay was determined (Falk et al., 1980 *J. Immunol. Methods* 33:239-247) (Figure 8D). When fMLP was absent from the top and bottom chamber, or when fMLP was placed only in the top chamber, few (<2300 cells), but equivalent numbers, of the CD38KO and WT neutrophils migrated to the bottom chamber. When an equal concentration of fMLP was present in the top and bottom chamber (chemokinesis conditions), increased, but similar, numbers of WT and CD38KO neutrophils migrated to the bottom chamber, indicating that activation-induced chemokinesis to fMLP was equivalent between CD38KO and WT neutrophils. When fMLP was present in the bottom chamber only

WO 02/32288

PCT/US01/32383

(chemotaxis conditions), the migration of WT neutrophils to the bottom chamber was further increased. However, CD38KO neutrophils migrated only marginally better in the presence of a chemotactic gradient than in the absence of a fMLP gradient, indicating that CD38KO neutrophils can be activated to migrate by bacterial chemoattractants but are unable to follow the chemotactic gradient. To determine if this was a general property of CD38KO neutrophils, the same experiments were performed using the chemokine IL-8, which is a potent activator of neutrophils (Baggiolini et al., 1989 *J. Clin. Invest* 84:1045-1049). In contrast to what was observed with fMLP, the IL-8-induced chemotaxis of CD38KO and WT neutrophils was equivalent (Figure 8D). Thus, these data indicate that CD38KO neutrophils make defective chemotactic responses to some, but not all, chemoattractants.

[0138] CD38 is expressed and enzymatically active on neutrophils. Since CD38KO neutrophils appear to have an intrinsic defect in chemotaxis, CD38 expression and enzyme activity on mouse and human neutrophils was determined. Neutrophils isolated from the bone marrow and blood of WT mice clearly expressed CD38 (Figure 9A), and likewise, human peripheral blood neutrophils also expressed CD38 (Figure 9B). Interestingly, when WT mice were injected intraperitoneally with the inflammatory agent, thioglycollate, CD38 expression increased significantly on the neutrophils isolated from the blood and peritoneal cavity (Figure 9D). Next, to test whether CD38-expressing neutrophils can catalyze the cyclase reaction, WT and CD38KO neutrophils were incubated with the NAD⁺ analogue, nicotinamide guanine dinucleotide (NGD), and then measured the cyclization of NGD into the fluorescent compound cyclic GDP-ribose

WO 02/32288

PCT/US01/32383

(Graeff et al., 1994 *J. Biol. Chem.* 269:30260-30267) (cGDPR). As shown in Figure 9C, WT neutrophils, but not CD38KO neutrophils, produced cGDPR rapidly upon incubation with NGD, indicating that CD38-expressing neutrophils are competent to produce cyclic nucleotides.

[0139] cADPR and ryanodine induce intracellular calcium release in neutrophils. Since cADPR induces intracellular calcium release through ryanodine receptor (RyR) gated stores (Galione et al. 1991 *Science* 253:1143-1146), it was tested whether the RyR/cADPR calcium signaling pathway was functional in neutrophils. RT-PCR analysis showed that neutrophils express mRNA for RyR3 (Sorrentino, V. et al., 1993 *TIPS* 14:98-103; Hakamata Y. et al., 1992 *FEBS Lett* 312:229-235), although at levels much lower than seen in the brain (Figure 9D). To test whether the RyRs expressed by neutrophils were functional, intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) were measured in neutrophils that were permeabilized in calcium-free buffer and then stimulated with ryanodine (Figure 9E). A small, but reproducible, increase in $[Ca^{2+}]_i$ in ryanodine-stimulated neutrophils that could be blocked by the RyR inhibitor, ruthenium red was observed (Galione et al. 1991 *Science* 253:1143-1146). Next, to test whether cADPR could induce intracellular calcium release in neutrophils, neutrophils were permeabilized in calcium-free buffer and then stimulated the cells with purified cADPR (Figure 9F). A small, but easily detectable, rise in intracellular free calcium was observed. No calcium release was observed when the cADPR was first hydrolyzed by heat inactivation (Lee et al., 1989 *J. Biol. Chem.* 264:1608-1615) or when the cells were pre-treated with 8-Br-cADPR, an inactive analogue of cADPR that competitively antagonizes cADPR binding to RyRs (Guse et al., 1994 *Annu. Rev. Immunol* 12:593-633). The

WO 02/32288

PCT/US01/32383

specificity of the antagonist, 8-Br-cADPR, for cADPR mediated calcium release was further demonstrated by showing that 8-Br-cADPR was unable to block the accumulation of intracellular free calcium mediated by thapsigargin (Figure 9G). Together, the data demonstrate that intracellular calcium can be released through RyR and cADPR-mediated mechanism in neutrophils.

[0140] CD38 catalyzed cADPR is required for extracellular calcium influx in fMLP-activated neutrophils. Signaling through chemokine/chemoattractant G-protein coupled receptors such as FPR and the IL-8 receptors results in increased $[Ca^{2+}]_i$ due to a combination of intracellular calcium release and extracellular calcium influx (Murphy, P.M., 1994 *Annu. Rev. Immunol* 12:593-633; Demaurex N. et al., 1994 *Biochem J.* 297:595-601; Schorr W. et al., 1999 *Eur. J. Immunol* 29:897-904; Lew et al., 1989 *Eur. J. Clin. Invest.* 19:338-346). Since CD38KO neutrophils were defective in chemotaxis assays to fMLP and lacked the ability to produce the calcium mobilizing metabolite, cADPR, it was hypothesized that calcium mobilization in response to fMLP would be deficient in CD38KO neutrophils. To test this, CD38KO or WT neutrophils were stimulated with fMLP or IL-8 in calcium-free media and intracellular calcium release was measured (Figure 10A). An immediate sharp rise in intracellular calcium was observed that gradually declined over next 5 minutes in fMLP-stimulated WT neutrophils. In contrast, in fMLP-stimulated CD38KO cells, the magnitude of $[Ca^{2+}]_i$ after fMLP stimulation was reduced by approximately 20% and the $[Ca^{2+}]_i$ declined to baseline at least 2 minutes earlier. Unlike the reduced $[Ca^{2+}]_i$ found in fMLP-stimulated CD38KO neutrophils, the $[Ca^{2+}]_i$

WO 02/32288

PCT/US01/32383

of IL-8 stimulated CD38KO and WT neutrophils was identical. Thus, these data suggested that CD38 may be necessary for optimal intracellular calcium release after fMLP, but not IL-8, stimulation.

[0141] Next, to assess whether CD38 was required for extracellular calcium influx, stimulated CD38KO or WT neutrophils were stimulated with fMLP or IL-8 in calcium-containing media (Figure 10B). When we added fMLP to WT neutrophils, a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$, due to intracellular calcium release was observed, as well as a second extended, increase in $[Ca^{2+}]_i$, due to extracellular calcium influx. In striking contrast, the calcium influx phase of the response was essentially ablated in the fMLP-stimulated CD38KO neutrophils. Interestingly, when WT and CD38KO neutrophils were stimulated with IL-8 in calcium containing media, it was found that IL-8 induced a equivalent immediate increase in $[Ca^{2+}]_i$ that rapidly declined to baseline levels in both WT and CD38KO neutrophils, indicating that IL-8 did not induce extracellular calcium influx in either WT or CD38KO neutrophils.

[0142] To determine whether cADPR regulates calcium mobilization in fMLP stimulated neutrophils, CD38KO and WT neutrophils were preincubated with increasing concentrations of the cADPR antagonist, 8-Br-cADPR, and then stimulated with fMLP or IL-8 (Figure 10C). When 8-Br-cADPR-treated WT cells were stimulated with fMLP, the release of intracellular calcium as well as the influx of extracellular calcium was reduced in a dose-dependent fashion to the levels seen in CD38KO cells. In contrast, addition of 8-Br-cADPR to IL-8 stimulated neutrophils had absolutely no effect on the $[Ca^{2+}]_i$ of either WT or CD38KO neutrophils.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Together, these data indicate that CD38-produced cADPR regulates intracellular calcium release and extracellular calcium influx in response to fMLP, and that neither CD38 nor cADPR are necessary for calcium mobilization in IL-8 stimulated neutrophils.

[0143] CD38 catalyzed cADPR is required for neutrophil chemotaxis to fMLP but not IL-8. To test whether cADPR-mediated calcium mobilization is required for chemotaxis to fMLP, WT neutrophils were preincubated with either EGTA or 8-Br-cADPR and then chemotaxis to fMLP or IL-8 in a checkerboard chemotaxis assay was measured (Figure 10D). When WT neutrophils (no pre-treatment) were incubated with media in the top chamber and fMLP or IL-8 in the bottom chamber, the cells efficiently migrated to the bottom chamber. However, if the extracellular calcium was chelated with EGTA or if the cells were pre-treated with the cADPR antagonist, 8-Br-cADPR, chemotaxis of the WT neutrophils to fMLP was reduced by more than 80%. Importantly, EGTA or 8-Br-cADPR treatment had absolutely no effect on the ability of neutrophils to chemotax to IL-8. Thus, extracellular calcium influx, regulated by cADPR-mediated intracellular calcium release, is necessary for fMLP-induced chemotaxis of neutrophils.

[0144] An analogue of NAD⁺ inhibits neutrophil chemotaxis to fMLP, but not IL-8, in a CD38-dependent fashion. Since CD38 catalyzed cADPR appeared necessary for neutrophil chemotaxis to fMLP, it was predicted that chemotaxis could be inhibited by treating neutrophils with NAD⁺ analogues that could be converted by CD38 into antagonists of the cADPR signaling pathway. To test this prediction, neutrophils were pretreated with nicotinamide 8-bromoadenine dinucleotide (N(8-Br-A)D⁺), a substrate that can be converted by CD38 into 8-Br-cADPR, the

WO 02/32288

PCT/US01/32383

cADPR antagonist that was used in our earlier experiments. To first test whether $N(8\text{-Br-A})D^+$ altered extracellular calcium influx in fMLP-activated neutrophils, WT neutrophils were pretreated with $N(8\text{-Br-A})D^+$, the cells were stimulated with fMLP and then $[Ca^{2+}]_i$ was measured (Figure 11A). $N(8\text{-Br-A})D^+$ pre-treatment inhibited the entry of extracellular calcium in fMLP-treated neutrophils. Next, WT and CD38KO neutrophils were pretreated with $N(8\text{-Br-A})D^+$ or left in media alone, followed by testing for their ability to chemotax to fMLP (Figure 11B) or IL-8 (Figure 11C). Untreated WT neutrophils chemotaxed to both fMLP and IL-8, while untreated CD38KO neutrophils could not chemotax to fMLP, but could chemotax to IL-8. Interestingly, pre-treatment of WT neutrophils with $N(8\text{-Br-A})D^+$ severely reduced neutrophil chemotaxis to fMLP but had no effect on their ability to chemotax to IL-8. Pre-treatment of the CD38KO neutrophils with $N(8\text{-Br-A})D^+$ had no effect on the chemotaxis of the CD38KO neutrophils to either fMLP or IL-8, indicating that the $N(8\text{-Br-A})D^+$ induced inhibition of fMLP-mediated chemotaxis was CD38 dependent. Together, the data demonstrate that NAD^+ analogues can regulate calcium responses and chemotaxis of neutrophils in a CD38-dependent fashion.

7. EXAMPLE: MOUSE MODEL OF ALLERGIC LUNG DISEASE AND ROLE OF CD38

[0145] The subsection below describes data demonstrating that CD38-deficient eosinophils are unable to be recruited to the site of airway inflammation induced by allergens.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

7.1. MATERIALS AND METHODS

[0146] OVA priming and sensitization. C57BL/6 WT mice were immunized intraperitoneally with 20 µg chicken ovalbumin (OVA) adsorbed to alum. Immunized mice were sacrificed 30 days post-immunization and the OVA-primed CD4 T cells were purified from the spleen using MACS magnetic beads that were directly conjugated with anti-CD4. Naive CD4 T cells were purified using anti-CD4 conjugated MACS beads from unimmunized C57BL/6 WT mice. Naive or OVA-primed T cells were injected intravenously into either C57BL/6 WT or CD38KO recipients at 1×10^7 CD4 T cells per mouse to generate 4 groups of 10 mice each indicated in Figure 11 A and B. Recipient mice were then sensitized intratracheally with 10 µg OVA in PBS on each of 7 consecutive days immediately following T cell transfer. Mice were sacrificed on the eighth day after T cell transfer, and infiltrating cells were removed from the airways and alveoli of the lungs by bronchoalveolar lavage as described in Section 6.2.2, *supra*. Total cells were then enumerated by counting on a hemocytometer and differential cell counts were performed by centrifuging cells on to a glass slide, staining with Diff-Quick and identifying at least 200 cells per slide at 400X.

7.2. RESULTS

[0147] To determine if CD38 controls the recruitment of cells other than neutrophils to the lung, a mouse model of allergic lung disease that mimics many of the properties of human asthma was used (Lloyd CM et al., 2001, *Adv. Immunol.* 77:263-295). An important component of asthma is

WO 02/32288

PCT/US01/32383

airway inflammation, which is thought to be induced or exacerbated by the activities of eosinophils that have been recruited to the lung. Although eosinophils are primarily responsible for the pathology of asthma (Broide, DH et al., 1991, *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:637-648), their recruitment and function appears to be controlled by T cells that have been primed to allergenic antigens (Gavett et al., 1994, *Respir. Cell Mol. Biol.* 10:587-593). Such T cells often produce type 2 cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-13, as well as chemokines like eotaxin (Cohn, L. et al., 1988, *J. Immunol.* 161:3813-3816; Drazen JM et al., 1996, *J. Exper Med.* 183:1-5). To examine the ability of CD38 to regulate eosinophil recruitment independently of any effects of CD38 on T cell activation, WT mice were immunized with the antigen OVA. After 30 days, CD4 T cells from these OVA-primed mice were transferred to either WT or CD38KO recipients. As a control, naive CD4 T cells were transferred from unimmunized WT mice to either WT or CD38KO recipients. Recipient mice were then sensitized intratracheally with 10 µg of OVA in PBS on each of eight consecutive days immediately following T cell transfer. Mice were sacrificed on the ninth day after T cell transfer and the cells in the airways of the lungs were enumerated.

[0148] As seen in Figure 12A, substantial numbers of neutrophils were recruited to the airways of WT mice regardless of whether they received naive or primed CD4 T cells. In contrast, although CD38KO mice that received primed T cells did have significantly more neutrophils in the airways than CD38KO mice that received naive T cells, relatively few neutrophils were recruited to the airways of CD38KO mice compared to the airways of WT mice. Thus,

WO 02/32288

PCT/US01/32383

neutrophil recruitment to the lung in a model of allergic airway disease is also dependent on the expression of CD38.

[0149] Strikingly, the recruitment of eosinophils to the airways of OVA-sensitized mice was dependent on the presence of both primed CD4 T cells and the expression of CD38. As seen in Figure 12B there was a 30-fold reduction in the numbers of eosinophils recruited to the lungs of CD38K0 mice that had received primed CD4 T cells relative to that in WT mice that had received primed CD4 T cells and a 10-fold reduction in the numbers of eosinophils recruited to the airways of CD38KO mice that received naive CD4 T cells relative to that in WT mice that had received naive CD4 T cells. Therefore, the recruitment of eosinophils to the lung in a model of allergic airway disease is also dependent on CD38.

8. EXAMPLE: CLONING OF *SCHISTOSOMA MANSONI*
CD38 HOMOLOGUE

[0150] The subsection below describes the cloning and sequencing of a *S. mansoni* CD38 homologue referred to as SM38. Helminths, such as *S. mansoni*, are broadly defined as worm parasites that infect and can cause pathogenesis in most invertebrates, vertebrates and plant species. The genus *Schistosoma* consists of parasitic flatworms whose definitive habitat is the bloodstream of warm-blooded vertebrates. Four species of *Schistosoma*, including *S. mansoni* cause disease in 200-400 million humans per year and kill up to 1 million people each year (WHO, 1996). Additionally, at least two *Schistosoma* species infect domesticated cattle and sheep causing serious economic losses. Thus, it would be beneficial to develop effective

WO 02/32288

PCT/US01/32383

antibiotic drugs that could be used to treat infected humans and/or animals. The pathogenesis of Schistosoma infection is caused mainly by the deposition of eggs by the mature worm into various tissues and organs of humans and animals where granulomas then form leading to fibrosis and tissue damage. However, the cercariae (immature worm) and fully mature worm also release a number of proteins and lipid mediators that can also induce an immune inflammatory response (Fusco, AC et al., 1991, J. Parasitol. 77:649-657). The treatment of choice in schistosomiasis is the drug praziquantel which appears to induce calcium influx across the tegument of the worm causing immediate muscle contraction and paralysis (Kohn, AB et al., 2001, J. Biol. Chem 276:36873-36876). Thus, drugs that modulate schistosome calcium responses, particularly within the muscle, might be effective in the treatment of this disease.

8.1. MATERIALS AND METHODS

8.1.1. CLONING OF SHISTOSOMA MANSONI CD38 HOMOLOGUE

[0151] Primers were made corresponding to the EST sequence found in Genbank accession #AW017229. (5' primer: acatcttgggtactgaatggctcgg and 3' primer: tgagtaatgtctcgacgttgacctcg). *S. mansoni* cDNA libraries were obtained from Dr. Phillip LoVerde (SUNY, Buffalo), and were subjected to PCR using the primers indicated above. The library (1-20 μ l) and dH₂O were heated to 70°C for 10 minutes and were then combined with the remainder of the PCR reagents and cycled. The cycles were: 95°C 5 minutes, 1 cycle, followed by 95°C 1 minute, 65°C 1 minute and 72°C 2 minutes for 35 cycles followed by 1 cycle at 72°C for 5 minutes. The expected 330 bp band corresponding to EST AW017229 was isolated, TOPO

WO 02/32288

PCT/US01/32383

cloned, and then used as a probe to screen 250,000 plaques from the *S. mansoni* cDNA library. Five positives were isolated and then subjected to 3 more rounds of screening in order to produce plaque pure clones. All five clones were fully sequenced on both strands. The nucleotide sequence and amino acid translation of four of the clones were identical (referred to as SM38). The stop codon and polyadenylation sites were identified in all of the SM38 clones, but the initiation methionine was not present in any of the clones. To obtain the 5' end of the SM38 gene, a single primer extension approach (NAR, 1994, vol 22, No. 16, p3427-3428) was utilized. A first round of PCR was performed using an external SM38 primer (5' catgaataacctgattcataaac) and the universal reverse primer for Bluescript. Two μ l of this reaction was then subjected to PCR using an internal nested SM38 primer (5' gataaagtaagaactgtgcc) and the universal reverse primer. A 200 and a 300 bp band were identified from this reaction and were directly sequenced. The sequence obtained overlapped 124 bp with the 5' end of the SM38 clones and included an additional 153 bp of sequence, however the no stop codon was detected, indicating that we still did not have the 5' end of the gene. Therefore, classic 5'RACE (PNAS vol 85 pp 8998-9002, Dec. 1998) was performed using cDNA prepared from RNA isolated from adult *S. mansoni* worms (RNA provided by Dr. P. LoVerde, SUNY Buffalo). 10X Taq buffer, dNTP's, cDNA and Expand High Fidelity Taq were combined with the dT-AP primer (see ref. For details) and cycled for 5 minutes at 95°C followed by 2 minutes at 50°C and 40 minutes at 72°C. After this 40 minute incubation the 5' external SM38 primer (see above) and AP primers were added and cycled for 35 cycles under the

WO 02/32288

PCT/US01/32383

conditions: 95°C for 15 sec, 47°C for 30 sec, 72°C for 2 minutes followed by a 5 minute extension at 72°C. The reactions were run on a 1.5% agarose gel and a 300 bp band was isolated using Qiagen Gel Kit. The 5' RACE product was directly sequenced with the AP and 5' external SM38 primer. Two potential initiation methionines were identified in the sequence and two stop codons were found 13-19 amino acids upstream of the methionine residues. The RACE product was subsequently cloned. All three clones containing SM38 sequence (Two PCR generated clones and one clone from the *S.mansoni* cDNA library) were contiguous and overlapping. When assembled, the SM38 sequence included 1049 bp of sequence including 5' untranslated sequence, two potential initiation methionines, an open reading frame encoding a 303 amino acid protein, a stop codon, 3' untranslated sequence and a poly-adenylation site.

8.2. RESULTS

[0152] Since drugs that modulate calcium responses in the muscle fibers of Schistosomes appear to be effective anti-helminth reagents (Kohn et al, 2001, J. Biol. Chem. 276:36873-36876), we set out to identify specific calcium modulating targets of Schistosomes. It has been recently shown that Schistosomes express Ryanodine Receptors (RyR) within their muscle fibers (Day et al., 2000, Parasitol. 120:417-420; Silva et al., 1998, Biochem. Pharmacol. 56:997-1003). Agonists of RyRs expressed in vertebrate smooth and skeletal muscle are known to regulate intracellular calcium release, voltage gated calcium influx and muscle contractility. Interestingly, *S. mansoni* muscle fibers treated with RyR agonists such as caffeine induced the release of

WO 02/32288

PCT/US01/32383

intracellular calcium and induced contraction of the muscle fiber. Although drugs such as caffeine can modulate RyR-dependent calcium responses, the physiological modulator of RyRs, at least in vertebrate muscle fibers is cyclic ADP-ribose (cADPR). cADPR is a known calcium mobilizing metabolite that is produced by ADP-ribosyl cyclase enzymes such as the mammalian CD38 protein and the invertebrate Aplysia cyclase enzyme. To determine whether Schistosomes express an enzyme capable of producing the calcium mobilizing second messenger, cADPR, a search was performed of the publicly available EST sequences looking for Schistosome sequences that when translated would have homology to the mammalian CD38 and Aplysia enzymes. Three EST sequences (EST AI067047, EST AW017229 and EST N20756) were identified that could be assembled into a contiguous and overlapping sequence (Fig1.3). This assembled sequence shared limited but significant homology with both CD38 and the Aplysia cyclase enzymes.

[0153] To determine whether the assembled ESTs actually represented an authentic cDNA, primers were prepared from the sequence of EST AW017229 and performed PCR on a *S. mansoni* cDNA library. A 330 base pair fragment was isolated from the PCR reaction and was sequenced. As expected the sequence of the fragment matched that of the EST. The fragment was then used as a probe to screen 250,000 plaques from the *S. mansoni* cDNA library. Five independent plaques which hybridized to the EST probe were isolated, plaque purified and sequenced on both DNA strands. The sequence information was then used to design additional primers to isolate the 5' end of the cDNA (see methods). The complete cDNA sequence isolated

WO 02/32288

PCT/US01/32383

from the *S. mansoni* library was then assembled and compared to the ESTs. The alignment, shown in Figure 13, indicates that the contiguous assembly of the EST sequences was correct and that the cloned cDNA (referred to as SM38) included at least an additional 421 base pairs of sequence not found in any EST. Translation of the DNA sequence gave rise to a 299 amino acid sequence (Figure 14) containing structural motifs typical of cyclase enzymes (Prasad, GS, 1996 Nature Struct. Biol. 3:957-964). In particular, the SM38 protein contains conserved amino acid residues that align with critical catalytic and active site residues found in the *Aplysia* cyclase enzyme (Munshi C, et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:30770-30777) and in mammalian CD38 (Munshi C, et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:21566-21571; Graeff R., 2001, J. Biol. Chem. 276:12169-12173)(Figure 15A-B). Additionally, cysteine residues that are critical for the assembly of the tertiary structure of the cyclase enzymes (Prasad GS, et al., 1996, Nature Struct. Biol. 3:957-964) are also conserved in SM38; (Figure 15A-B). Importantly, the SM38 cDNA sequence encodes for a complete cyclase enzyme domain (Figure 16).

[0154] Based on these results, we have shown that Schistosomes such as *S. mansoni* encode a protein (SM38) that is highly homologous at the structural level to enzymes that are capable of catalyzing the production of the calcium mobilizing second messenger, cADPR. Since Schistosomes also express RyRs which release intracellular calcium in response to cADPR, it is predicted that SM38 will be able to regulate calcium response in Schistosomes. Furthermore, since regulation of calcium influx, particularly in Schistosome muscle fibers can result in paralysis and clearance of the worm, we predict that agonists/antagonists of the SM38 and RyR

WO 02/32288

PCT/US01/32383

pathways in Schistosomes may be effective as anti-helminth drugs.

[0155] The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention, and functionally equivalent methods and components are within the scope of the invention. Indeed, various modifications of the invention, in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications are intended to fall within the scope of the claims. Various publications are cited herein, the contents of which are hereby incorporated, by reference, in their entireties.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

We Claim:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 14.
2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1 comprising the DNA sequence of Figure 14.
3. An isolated nucleic acid molecule comprising the DNA sequence of Figure 14.
4. The isolated nucleic acid molecule of claim 3 comprising a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence shown in Figure 14.
5. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the nucleotide sequence of Claim 1 or 3 under stringent conditions and encodes a functionally equivalent gene product.
6. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the nucleic acid of claim 1 or 3 under moderately stringent conditions and encodes a functionally equivalent SM38 gene product.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

7. An isolated nucleic acid molecule that is a *SM38* antisense molecule.
8. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of Figure 14.
9. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of Figure 14.
10. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence that hybridizes to the nucleotide sequence of Claim 1 or 3 under stringent conditions and encodes a functionally equivalent gene product.
11. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence that hybridizes to the nucleotide sequence of Claim 1 or 3 under moderately stringent conditions and encodes a functionally equivalent gene product.
12. A purified fragment of a *SM38* protein comprising the cyclase domain of the *SM38* protein.
13. A chimeric protein comprising a fragment of a *SM38* protein consisting of at least 6 amino acids fused via a covalent bond to an amino acid sequence of a second protein, in which the second protein is not a *SM38* protein.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

14. An antibody which is capable of binding a SM38 protein.
15. A recombinant cell containing the nucleic acid of claim 5 or 6.
16. A method of producing a CD38 protein comprising growing a recombinant cell containing the nucleic acid of claim 5 or 6 such that the encoded CD38 protein is expressed by the cell, and recovering the expressed CD38 protein.
17. A method for identifying a compound that activates CD38 enzyme activity comprising (i) contacting a cell expressing CD38 with a test compound in the presence of substrate and measuring the level of CD38 activity; (ii) in a separate experiment, contacting a cell expressing CD38 protein with a vehicle control in the presence of substrate and measuring the level of CD38 activity where the conditions are essentially the same as in part (i), and then (iii) comparing the level of CD38 activity measured in part (i) with the level of CD38 activity in part (ii), wherein an increased level of CD38 activity in the presence of the test compound indicates that the test compound is a CD38 activator.
18. A method for identifying a compound that inhibits CD38 enzyme activity comprising (i) contacting a cell expressing CD38 with a test compound in the presence of a

WO 02/32288

PCT/US01/32383

chemoattractant and substrate and measuring the level of CD38 activity; (ii) in a separate experiment, contacting a cell expressing CD38 and substrate and measuring the level of CD38 activity, where the conditions are essentially the same as in part (i) and then (iii) comparing the level of CD38 activity measured in part (i) with the level of CD38 activity in part (ii), wherein a decrease level of CD38 activity in the presence of the test compound indicates that the test compound is a CD38 inhibitor.

19. The method of claim 17 or 18 further comprising the presence of a chemoattractant in step (i) and (ii) and wherein the cell expressing CD38 expresses a chemoattractant receptor.
20. The method of claim 17 or 18 wherein CD38 ADP-ribosyl cyclase activity is measured.
21. The method of claim 17 or 18 wherein levels of cADPR are measured.
22. The method of claim 17 or 18 wherein the level of NAADP is measured.
23. The method of claim 17 or 18 wherein intracellular calcium levels are measured.

WO 02/32288

PCT/US01/32383

24. The method of claim 17 or 18 wherein CD38 mediated cell migration is measured.
25. A method for identifying a compound that modulates the activity of CD38 comprising the steps of:
- (i) contacting a test compound with a CD38 protein;
 - (ii) determining whether said compound binds to the CD38 protein;
 - (iii) and selecting a test compound that binds to said CD38 protein as being a compound that can be used to modulate the activity of the CD38 protein.
26. A method for identifying a compound that activates SM38 enzyme activity comprising (i) contacting a cell expressing SM38 with a test compound in the presence of substrate and measuring the level of SM38 activity; (ii) in a separate experiment, contacting a cell expressing SM38 protein with a vehicle control in the presence of substrate and measuring the level of SM38 activity where the conditions are essentially the same as in part (i), and then (iii) comparing the level of SM38 activity measured in part (i) with the level of SM38 activity in part (ii), wherein an increased level of SM38 activity in the presence of the test compound indicates that the test compound is a SM38 activator.
27. A method for identifying a compound that inhibits SM38 enzyme activity

WO 02/32288

PCT/US01/32383

comprising (i) contacting a cell expressing SM38 with a test compound in the presence of a chemoattractant and substrate and measuring the level of SM38 activity; (ii) in a separate experiment, contacting a cell expressing SM38 and substrate and measuring the level of SM38 activity, where the conditions are essentially the same as in part (i) and then (iii) comparing the level of SM38 activity measured in part (i) with the level of SM38 activity in part (ii), wherein a decrease level of SM38 activity in the presence of the test compound indicates that the test compound is a SM38 inhibitor.

28. The method of claim 26 or 27 wherein levels of cADPR are measured.
29. The method of claim 26 or 27 wherein the level of NAADP is measured.
30. The method of claim 26 or 27 wherein intracellular calcium levels are measured.
31. The method of claim 26 or 27 wherein CD38 mediated cell migration is measured.
32. A method for identifying a compound that modulates the activity of SM38 comprising the steps of:
 - (i) contacting a test compound with a SM38 protein;

WO 02/32288

PCT/US01/32383

(ii) determining whether said compound binds to the SM38 protein;

(iii) and selecting a test compound that binds to said SM38 protein as being a compound that can be used to modulate the activity of the SM38 protein.

33. A method of modulating the migratory activity of cells expressing CD38 comprising contacting said cells with a CD38 inhibitor.

34. A method of modulating the migratory activity of cells expressing CD38 comprising contacting said cells with a CD38 activator.

Normal cellular response to chemoattractant signaling.

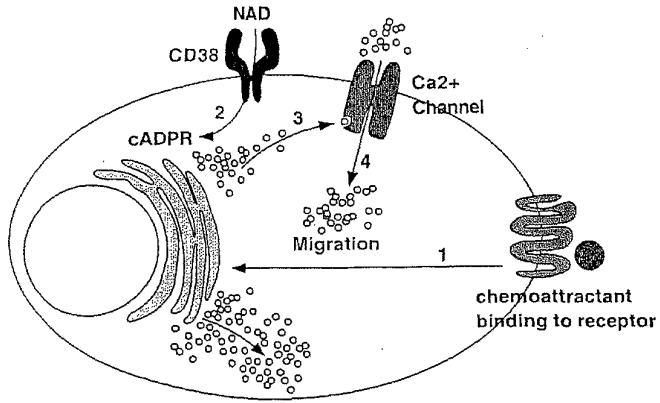


Figure 1

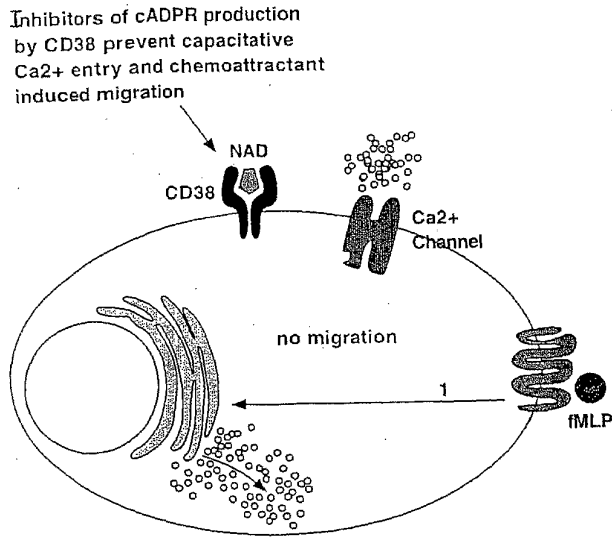


Figure 2

Proteins that regulate CD38 enzyme activity (screens will identify compounds that activate or inactivate these proteins)

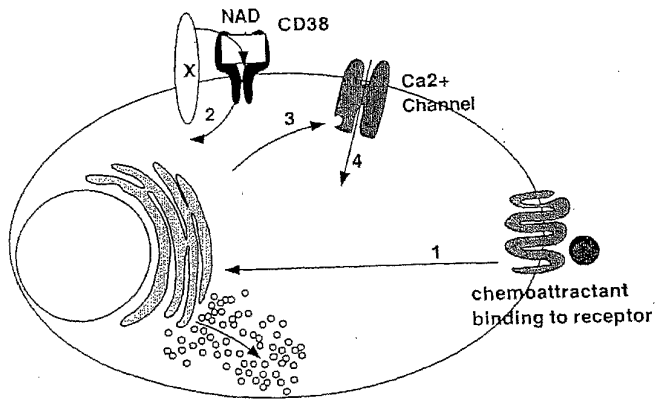


Figure 3

Proteins that regulate CD38 expression (screens will identify compounds that activate or inactivate these proteins)

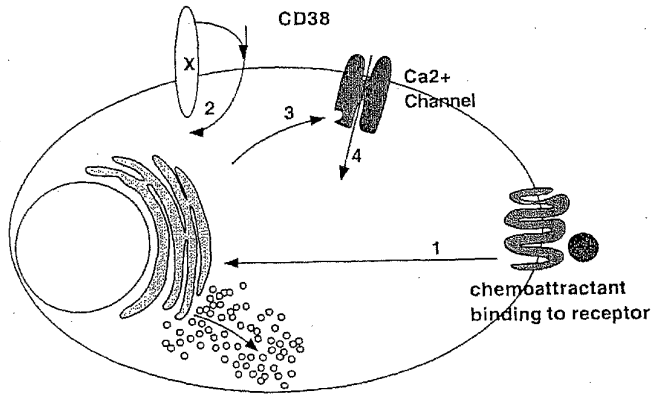


Figure 4

Alternative substrates for CD38 may generate inhibitors of cADPR and prevent capacitative Ca²⁺ release

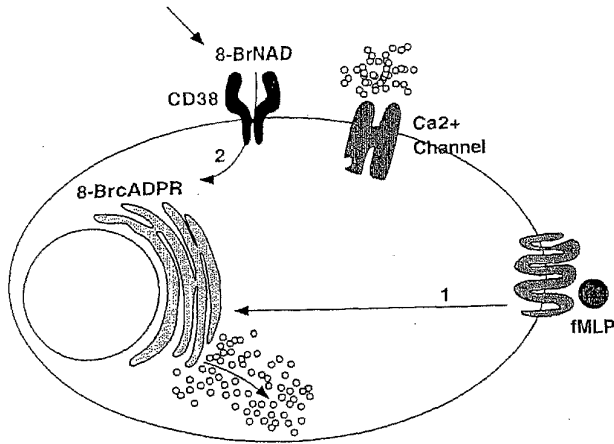


Figure 5

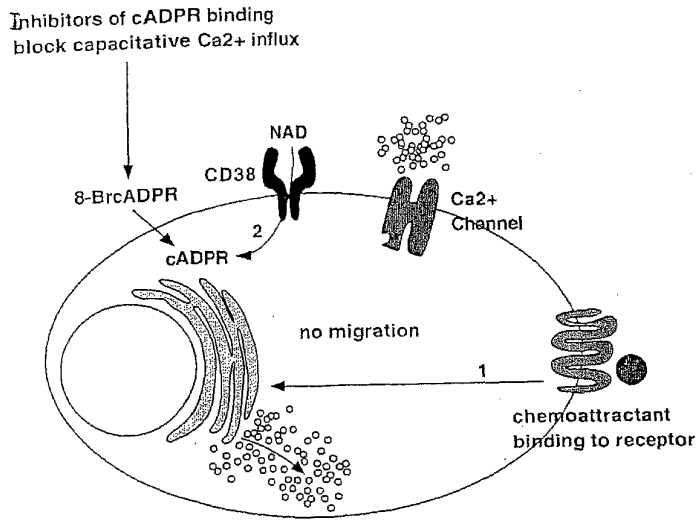
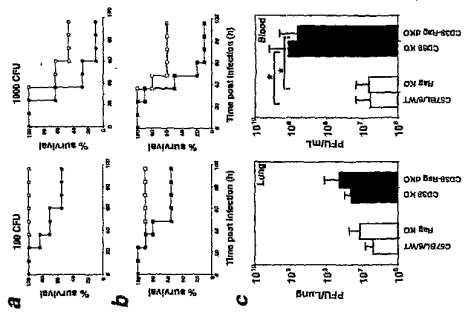


Figure 6

Figure 7A-C



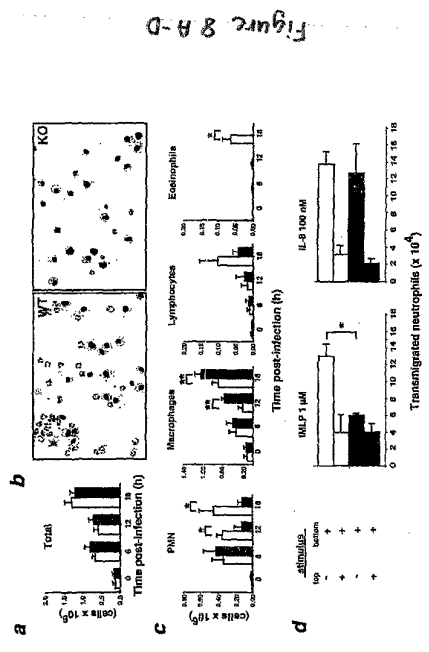
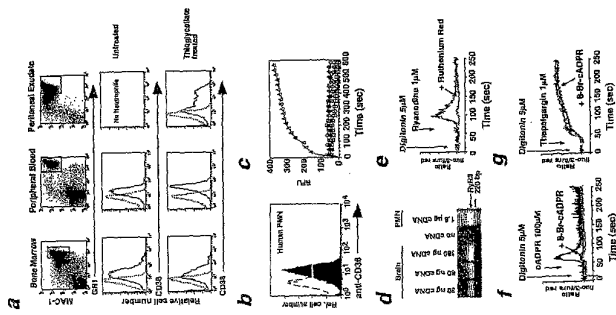
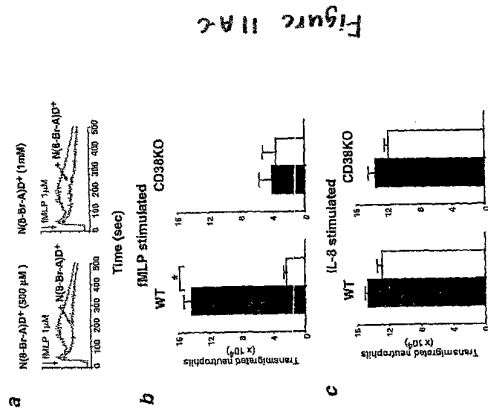


Figure 9A-G





WO 02/32288

PCT/US01/32383

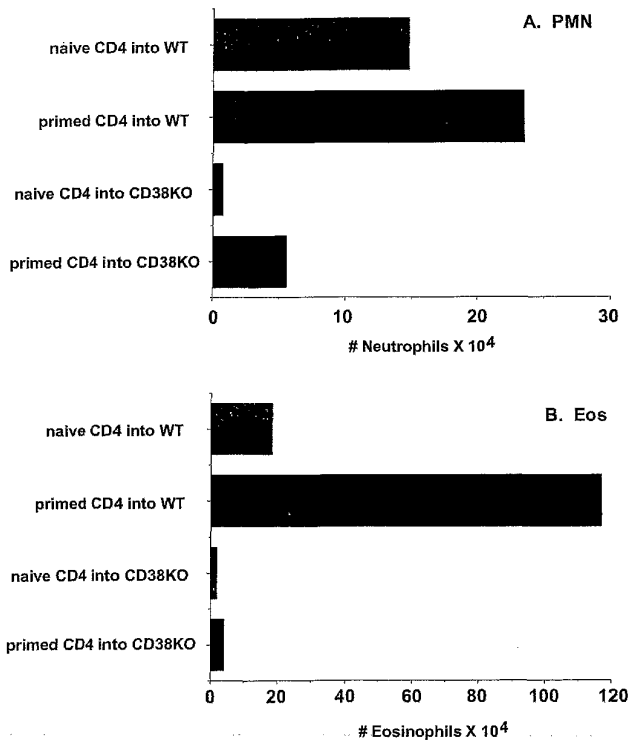


Figure 12

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Figure 38

Consensus	GGAAAGAAG TAGACATATA TTGTTATATA GATTTGTTCA GTTATTTTC	50
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	GGAAAGAAG TAGACATATA TTGTTATATA GATTTGTTCA GTTATTTTC	50
Consensus	ACAATCTTTT AATTGAAATA ATGATGAACG TAATATTGTT TCTTACTTTA	100
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	ACAATCTTTT AATTGAAATA ATGATGAACG TAATATTGTT TCTTACTTTA	100
Consensus	TCAAATATT TTGCTTTAA CTCTGCACAA CATCAATAA ACTTACTTAG	150
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	TCAAATATT TTGCTTTAA CTCTGCACAA CATCAATAA ACTTACTTAG	150
Consensus	TGAAATAGTA CAATCAGCAT GTACTCAGTG GAAGGTGAA CATGGAGCTA	200
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	TGAAATAGTA CAATCAGCAT GTACTCAGTG GAAGGTGAA CATGGAGCTA	200
Consensus	CTAATATAAG TTGTAGTGAG ATCTGGAATT CATTGAAAG CATTTACTT	250
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	CTAATATAAG TTGTAGTGAG ATCTGGAATT CATTGAAAG CATTTACTT	250
Consensus	TCAACTCATA CTAATCAGC ATGTGTTATG AAATCAGGGT TATTGATGA	300
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	TCAACTCATA CTAATCAGC ATGTGTTATG AAATCAGGGT TATTGATGA	300
Consensus	TTTTGTTTAT CAATTGTTG AATTGGAACA ACAACAACAA CAGCGACACC	350
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	TTTTGTTTAT CAATTGTTG AATTGGAACA ACAACAACAA CAGCGACACC	350
Consensus	ACACRATTCA AACGGAACAA TACTTCCATT CTCAGTGAT GAACATCATT	400
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	ACACRATTCA AACGGAACAA TACTTCCATT CTCAGTGAT GAACATCATT	400
Consensus	CGTGGAAATG GTAACGCTCT TGGAGTATGT CGTTCTCTAG AAATCAGATT	450
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	-----	
SM38	CGTGGAAATG GTAACGCTCT TGGAGTATGT CGTTCTCTAG AAATCAGATT	450
	-----	29
	CGTGGAAATG GTAACGCTCT TGGAGTATGT CGTTCTCTAG AAATCAGATT	450

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Figure 13B

Consensus	TCCAGGATAT CTGTTTGATG AATTGAATTG GTGTAATGGC AGTTTAACAG	500
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	TCCAGGATAT CTGTTTGATG AATTGAATTG GTGCAATGGC AGTTTAACAG	79
EST N20756	-----	
SM3B	TCCAGGATAT CTGTTTGATG AATTGAATTG GTGTAATGGC AGTTTAACAG	500
Consensus	GCAACACAAA ATACGGGACT GTATGTGGAT GCGATTATAA AAGTAATGTT	550
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	GCAACACAAA ATACGGGACT GTATGTGGAT GCGATTATAA AAGTAATGTT	129
EST N20756	-----	
SM3B	GCAACACAAA ATACGGGACT GTATGTGGAT GCGATTATAA AAGTAATGTT	550
Consensus	GTTCATGCGT TCTGGCAAAG TGCTTCGGCT GAGTATGCCA GGAGAGCATC	600
EST AW017229 comp	-----GGCT GAGTATGCCA GGAGAGCATC	24
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	GTTCATGCGT TCTGGCAAAG TGCTTCGGCT GAGTATGCCA GGAGAGCATC	179
SM3B	GTTCATGCGT TCTGGCAAAG TGCTTCGGCT GAGTATGCCA GGAGAGCATC	600
Consensus	TGTTAACATC TTTGTGGTAC TGAATGGCTC GGTCAAAGCT CCATTTAATG	650
EST AW017229 comp	TGTTAACATC TTTGTGGTAC TGAATGGCTC GGTCAAAGCT CCATTTAATG	74
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	TGTTAACATC TTTGTGGTAC TGAATGGCTC GGTCAAAGCT CCATTTAATG	229
SM3B	TGTTAACATC TTTGTGGTAC TGAATGGCTC GGTCAAAGCT CCATTTAATG	650
Consensus	AAAATAAAAC TTTTGGAAAA ATAGAACTAC CATTGGTTAA AACATCCTCG	700
EST AW017229 comp	AAAATAAAAC TTTTGGAAAA ATAGAACTAC CATT-GTTAA AACATCCTCG	123
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	AAAATAAAAC TTTTGGAAAA ATAGAACTAC CATTGGTTAA AACATCCTCG	279
SM3B	AAAATAAAAC TTTTGGAAAA ATAGAACTAC CATTG-TTAA AACATCCTCG	699
Consensus	AGTACAACAA TTAACAGTGA AATTAGTTCA TAGTTTGGAA GATGTAATA	750
EST AW017229 comp	AGTACAACAA TTAACAGTGA AATTAGTTCA TAGTTTGGAA GATGTAATA	173
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	AGTACAACAA TTAACAGTGA AATTAGTTCA TAGTTTGGAA GATGTAATA	280
SM3B	AGTACAACAA TTAACAGTGA AATTAGTTCA TAGTTTGGAA GATGTAATA	749
Consensus	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTGC AAGAACTTGC AAACAAGCTG	800
EST AW017229 comp	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTGC AAGAACTTGC AAACAAGCTG	223
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTGC AAGAACTTGC AAACAAGCTG	280
SM3B	ACCGACAAC ATGTGAATCG TGGAGTCTGC AAGAACTTGC AAACAAGCTG	799
Consensus	AACCTGTGAC ATATTCCCTT TCGTTGCATT GACGATCCTT TAGAGTTGAG	850
EST AW017229 comp	AACCTGTGAC ATATTCCCTT TCGTTGCATT GACGATCCTT TAGAGTTGAG	273
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756	AACCTGTGAC ATATTCCCTT TCGTTGCATT GACGATCCTT TAGAGTTGAG	280
SM3B	AACCTGTGAC ATATTCCCTT TCGTTGCATT GACGATCCTT TAGAGTTGAG	849
Consensus	ACATTATCAA TGCATTGAAA ATCCTGGCAA ACAACTATGT CAGTTTTGAG	900
EST AW017229 comp	ACATTATCAA TGCATTGAAA ATCCTGGCAA ACAACTATGT CAGTTTTGAG	323
EST A1067047 comp	-----ATTGAAA ATCATGGCAA ACAACTATGT CAGTTTTGAG	37
EST N20756	-----	
SM3B	ACATTATCAA TGCATTGAAA ATCCTGGCAA ACAACTATGT CAGTTTTGAG	280
		899

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Figure 13C

Consensus	CTTCGACGAG GTCAAACGTC GAGACATTAC TCATACTTTT TCCGCTAGTC	950
EST AW017229 comp	CTTCGACGAG GTCAAACGTC GAGACATTAC TCATACTTTT TCCGCTAGTC	373
EST A1067047 comp	CTTCGACGAG GTCAAACGTC GAGACATTAC TCATACTTTT TCCGCTAGTC	87
EST N20756	-----	280
SM38	CTTCGACGAG GTCAAACGTC GAGACATTAC TCATACTTTT TCCGCTAGTC	949
Consensus	ATTTGTTTAA CTTTTTATAC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTGAGAACT	1000
EST AW017229 comp	ATTTGTTTAA CTTTTTATAC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTGAGAACT	423
EST A1067047 comp	ATTTGTTTAA CTTTTTATAC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTGAGAACT	137
EST N20756	-----	280
SM38	ATTTGTTTAA CTTTTTATAC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTGAGAACT	999
Consensus	AAACTTTGAA CAGAGAAAGA GAACAATGAT AATAAAGGAA TAGGCATTA	1050
EST AW017229 comp	AAACTTTGAA CAGAGAAAGA GAACAATGAT AATAAAGGAA TAGGCATTA	473
EST A1067047 comp	AAACTTTG-----	145
EST N20756	-----	280
SM38	AAACTTTGAA CAGAGAAAGA GAACAATGAT AATAAAGGAA TAGGCATTA	1049

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Figure 14

GGAAAGAACCTGACATATATTGTTATATAGATTGTTCAAGTTATTTTCACAATCTTTTAAITCAAATA 70
 E R T . T Y I V I . I C S V I F H N L L I Q I

ATGATGAACGTAATATTGTTTCTTACTTTATCAAATATTTTGTCTTAACTCTGCACAACATCAAATAA 140
 M M N V I L F L T L S N I F V F N S A Q H Q I

ACTTACTTAGTGAATAGTACAATCACCATGTACTCAGTGGAGGTTGAACATGGAGCTACTAATAAAG 210
 N L L S E I V Q S R C T Q W K V E H G A T N I S

TGTAGTGAATCTGGAAATTCATTGAAAGCATTTCCTTCAACTCATACTAAATCAGCATGTGTATG 280
 C S E I W N S F E S I L L S T H T K S A C V M

AAATCAGGGTTATTCGATGATTTGTTTATCAATGTTTGAATTGGAAACAACAACAACAGCBACCC 350
 K S G L F D D F V Y Q L F E L E Q Q Q Q D R H

ACACAATTCAAACGGAACTACTTCCATTCTCAAGTGATGAACATCTCGTGAATGTAAACGTC 420
 H T I D T E Q Y F H S Q V N N I I R S M C K R L

TGGAGTATGCGTCTCTAGAACTACATTTCCAGGATATCTGTGTGATGAATGAATTGGTGAATGGC 490
 G V C R S L E T T F P Q Y L F D E L N W C N G

AGTTTAAACAGCAACAATAACGGGACTGTATGTGATGCGATTATAAAAGTAATGTTTTCATGCGT 560
 S L T G N T K Y G T V C G C D Y K S N Y Y H A

TCTGGCAAGTCTTCGGCTGAGTATGCCAGSAGACATCTGETAACATCTTGTGTACTGAATGCTC 630
 F W O S A S A E Y A R R A S G N I F V V L N G S

GGTCAAAGCTCCATTTAATGAAAATAAACTTTTGGAAAATAGAATACCATTTGTTAAACATCCTCGA 700
 Y K A P F N E N K T F E K I E L P L L K H P R

GTACAACAATTAACAGTGAATTAAGTTTCATAGTTTGGAAAGATGTAATAACCGACAACATGTGAATCGT 770
 V Q Q L T V K L V H S L E D V N N R Q T C E S

GGAGTCTGCAAGAACTTGCACAAGCTGAACCTGTACATATTCCTTTTTCGTTGCATGACGATCCTTT 840
 W S L Q E L A N K L N S V H I P F R C I D D P L

AGAGTTCAGACATTATCAATGCATTGAAAATCCTGGCAACAACATATGTCAGTTTCAGCTTCAGAGG 910
 E F R H Y Q C I E N P G K Q L C Q F S A S T R

TCAAACGTGAGACATTACTCATACTTTTCCGCTAGTCATTTGTTAACITTTTATACTTCCATGAATT 980
 S N V E T L L I L F P L V I C L T F Y T S H N

GAAATAACTTTTTCAGAACTAACTTTGAACAGAGAAAGAGAACAATGATAATAAGGAATAGGACATTAA 1050
 . N N F S E L N F E Q R K R T M I I K E . D I N

TGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1073
 E K K K K K K

WO 02/32288

PCT/US01/32383

Figure 15A-B

A.		Consensus	M.....L.....S.....I.....L.....RC.....	50				
	Aplysia cd38p	MSPVAIVACV	CLAVTLTRIS	PSEAIPTPE	LQNVLFQK	DYEITRYLT1	50	
	SM38p	M--MNVILFL	TLSMIFVNS	AQRII---	NL	LSEIVQSGCT	GNKVEH----	41
		ConsensusC.....#.....F.....K.....C.....G.....DF.....	100				
	Aplysia cd38p	LPRKSDCRRA	LWTKFKAFS	F--RPFNL	DLSGYDFFQ	DAQQTLPKMK	97	
	SM38p	-GATNISESE	NINSESTLL	STHTSADVM	KSGLFDCPVY	QLFELEQQDQ	90	
		ConsensusLE.T.PCY.....L.WC.....	150				
	Aplysia cd38p	VMFVSGVYDE	--AIDF---	ADDGRKYI---	TLEITLPE*	NLNSLWVQDQ	138	
	SM38p	QRHFTIQTEQ	VFHSQMMNI	RMCKRLGVC	RSLEITLPE*	LFDELWQDQ	140	
		ConsensusVC.....D.....FW..A.S..YA..A.G.....GS.....	200				
	Aplysia cd38p	RDKPGFNOK-	VDPFKDCPV	GARESPGTA	SSSVHSGEG	DVTYVWDESN	187	
	SM38p	SLTGNTKYGT	VG--GCDYKS	NVVHAEQSA	SAEYVRRSG	NIFVVLNES	186	
		Consensus*.....FGR.ELP.L.....V.....H.L.....C.....SL.....	250				
	Aplysia cd38p	PKVPAVAPDS	FFKRLPLN*	TNK-RTKVKV	IVLHQLGKI	I-ERCSAGSL	235	
	SM38p	-VKAPENRK	TKKRLPL*	KHPKQQLTV	KLVSLEDVW	NROTQESWSL	238	
		ConsensusL.....F.C...P.....C...NP.....CQ.....	300				
	Aplysia cd38p	LQLEMVVKAK	KGFQDVENP	KSVLFLQAD	RRAREQLA	KRYRIA---	282	
	SM38p	QELANKLSV	HIFERIDDP	LEFRHYQTE	NKQKLEQFS	ASTRSMVETL	286	
		Consensus	317				
	Aplysia cd38p	282	
	SM38p	LILFLVIGL	TFYTSMN	303	
B.		Consensus	M.....L.....L.....L.....L.....Q.....	50				
	Human CD38	MANCEFSPVS	GDKPCRLSR	RAQLCLGVS1	LVLILVVLA	VVPRWRQW	50	
	SM38p	M-----	-----	-----	MNVILFLTLS	NIFVNSAQ-	20	
		ConsensusE.V...RC.....C...W..F.....S.H.K.....	100				
	Human CD38	SGPGTIKRF	ETVLARLVKY	TEIHPENRHV	DQDSVWDAEK	GAFIS--RH	97	
	SM38p	---HQINILS	EIVQSGDFW	-RVEHGATNI	SGSEIWNQDE	SILLSTHTHS	66	
		ConsensusC.....S.....YQ.....S.....	150				
	Human CD38	FNHTEED--	---YQPLMKL	GTQTVQNKI	L---LWRI	KDLAQFTQV	138	
	SM38p	ACVAKSGLFD	DFVYQLFELE	GDQQRHHTI	QTEQYFHSQV	MNIIRGMCKR	118	
		Consensus*.....LE.T..GYL.D.L..WC...T...Y...C.....N.V.....	200				
	Human CD38	QRDMYELTI	LLQVLADDT	WGEFNTSKI	KVQSDPWR	KDQ--SNMPV	185	
	SM38p	LGVGRSLETTI	FPGLVDELN	WNGSLTGNT	KYGTVDS---	---DVKSNVV	181	
		Consensus*.....FK...S...A.A.....V.LIGS...F..N.TFG...E...L...V.....	250				
	Human CD38	SVFNTVSR	FREAQDVN	VMLNGSRSKI	FDKNSYFSV	EVNLOPEW	235	
	SM38p	HAFNCSAAE	YARRSGNIF	VVLNGSVKAP	FNEKTEFSKI	ELPLLKHPRV	211	
		ConsensusQ.L.....H.....R..C.....EL.....I.F.C.....	300				
	Human CD38	QILEANVIR	GRE-DSRDL	QDPTIKLES	II SKRNIOFS	FNKIYRPDKF	284	
	SM38p	QQLTVKLVHS	LEDVWVWQTE	ESWSLQHLAN	KLNSVHPER	QIDQPLEFRH	281	
		ConsensusDC..NP...C.....TS..	342				
	Human CD38	LQVWPFDS	SG-----	-----	-----	-----	300	
	SM38p	YQLENGQRK	LQFSASTRS	NVETLLIFP	LVICLTFYTS	MN	303	

WO 02/32288

PCT/US01/32383

MMNVILFLTL	SNIFVFNSAQ	HQINLLSEIV	QSRCTQWKVE	HGATNI	SCSE	50
IWNSFESILL	STHTKSACVM	KSGLFDDFVY	QLFELEQQQQ	QRHHTI	QTEQ	100
YFHSQVMNII	RGMCKRLGVC	RSLETTFPGY	LFDELNWCNG	SLTGNTKYGT		150
VCGCDYKSNV	VHAFWQSASA	EYARRASGNI	FVVLNGSVKA	PFNENKTFGK		200
IELPLLKHPR	VQQLTVKLVH	SLEDVNNRQT	GESWSLQELA	NKLNsvHIPF		250
RCIDDPLEFR	HYQCIENPGK	QLCQESASTR	SNVETLLILF	PLVICLTFYT		300
SMN						303

Figure 16

WO 02/32288

PCT/US01/32383

ATGATGAAYG	TNATHYTNTT	YYTNACNYTN	WSNAAYATHT	TYGTNTTYAA	50
YWSNGCNAR	CAYCARATHA	AYYTNYTNWS	NGARATHGTN	CARWSNMGNT	100
GYACNCARTG	GAARGTNGAR	CAYGGNGCNA	CNAAYATHWS	NTGYWSNGAR	150
ATHTGGAAYW	SNTTYGARWS	NATHYTNYTN	WSNACNCAYA	CNAARWSNGC	200
NTGYGTNATG	AARWSNGGNY	TNTTYGAYGA	YTTYGTNTAY	CARYTNTTYG	250
ARYTNGARCA	RCARCRCAR	CARMGNCAYC	AYACNATHCA	RACNGARCAR	300
TAYTTYCAYW	SNCARGTNAT	GAAYATHATH	MGNNGNATGT	GAAARMGNYT	350
NGGNGTNTGY	MGNWSNYTNG	ARACNACNTT	YCCNGGNTAY	YTNTTYGAYG	400
ARYTNAAYTG	GTGYAAYGGN	WSNYTNACNG	GNAAYACNAA	RTAYGGNACN	450
GTNTGYGGNT	GYGAYTAYAA	RWSNAAYGTN	GTNCAYGCNT	TYTGGCARWS	500
NGCNWSNGCN	GARTAYGCNM	GNMNGCNWS	NGGNAAYATH	TTYGTNGTNY	550
TNAAYGGNWS	NGTNAARGCN	CCNTTYAAYG	ARAAYAARAC	NTTYGGNAAR	600
ATHGARYTNC	CNYTNYTNA	RCAYCCNMGN	GTNCARCARY	TNACNGTNA	650
RYTNGTNCAY	WSNYTNGARG	AYGTNAAYAA	YMGNCARACN	TGYGARWSNT	700
GGWSNYTNCA	RGARYTNGCN	AAYAARYTNA	AYWSNGTCA	YATHCCNTTY	750
MGNTGYATHG	AYGAYCCNYT	NGARTTYMGN	CAYTAYCART	GYATHGARAA	800
YCCNGGNAAR	CARYTNTGYC	ARTTYWSNGC	NWSNACNMGN	WSNAAYGTNG	850
ARACNYTNYT	NATHYTNTTY	CCNYTNGTNA	THTGYYTAC	NTTYTAYACN	900
WSNATGAAY					909

Figure 17

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/032288 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/34, C12P 21/06, C12N 9/24, C07H 21/04, G01N 33/48
- (21) International Application Number: PCT/US01/32383
- (22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
63/241,065 17 October 2000 (17.10.2000) US
- (71) Applicant: TRUDEAU INSTITUTE, INC. [US/US];
100 Algonquin Avenue, P.O. Box 59, Saranac Lake, NY 12938 (US).
- (72) Inventors: LUND, Frances, E.; P.O. Box 59, 100 Algonquin Avenue, Saranac Lake, NY 12938 (US). RAN-DALL, Troy, D.; P.O. Box 59, 100 Algonquin Avenue, Saranac Lake, NY 12938 (US). PARTIDA-SANCHEZ, Santiago; P.O. Box 59, 100 Algonquin Avenue, Saranac Lake, NY 12938 (US).
- (74) Agent: STEPHENS, Carmella, L.; Baker Botts, LLP, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112-0228 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
11 July 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/032288 A3

(54) Title: CD38 MODULATED CHEMOTAXIS

(57) Abstract: The present invention relates to methods for modulating the migratory activity of cells expressing CD38 for the treatment of disorders including, but not limited to, inflammation, ischemia, asthma, autoimmune disease, diabetes, arthritis, allergies, infection with pathogenic organisms and transplant rejection. Such cells include, for example, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, macrophages and dendritic cells. The invention further relates to drug screening assays designed to identify compounds that modulate the ADP-ribosyl cyclase activity of CD38 and the use of such compounds in the treatment of disorders involving CD38 modulated cell migration. The invention is based on the discovery that CD38 ADP-ribosyl cyclase activity is required for chemotaxis. Furthermore, the invention relates to methods for identifying compounds that modulate the enzyme activity of the *S. mansoni* CD38 homologue and using those compounds in the treatment of pathologic disorders caused by helminth infection. This is based on the discovery that helminths such as *S. mansoni* express CD38 homologues.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/32383		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C12Q 1/34, C12P 21/06, C12N 9/24, C07H 21/04, G01N 33/48 US CL : 435/18, 200, 69, 1, 436/63, 536/23.2				
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) U.S. : 435/18, 69, 1, 200, 436/63				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	BERTHELIER et al. Human CD38 is an authentic NAD(P)+ glycohydrolase. Biochem. J. 1998, Vol. 330, pages 1383-1390, entire document.	17-34		
X	AUGUSTIN et al. Molecular cloning and functional expression of bovine spleen ecto-NAD+ glycohydrolase: structural identity with human CD38. Biochem. J. 2000, Vol. 345, pages 43-52, entire document.	17-34		
Y	US 5,958,723 A (ABRAMOVITZ et al.) 28 September 1999, column 9, lines 13-55.	17-18, 25-27, 32		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%;"> *-* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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 *-S* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent 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	*-* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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 *-S* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent 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	*-* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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 *-S* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 02 April 2002 (02.04.2002)		Date of mailing of the international search report 07 MAY 2002		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Teresa M. Ramirez Telephone No. (703) 308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/32383
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 1-16 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: Please See Continuation Sheet
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/32383

Continuation of Box I Reason 2:

Claims 1-16 are directed to nucleic acids encoding a SM32 polypeptide, a SM32 polypeptide, host cells comprising the nucleic acid encoding the SM32 polypeptide and a method for producing the SM32 polypeptide. No CFR was filed with the application. Since the claims either recite SEQ ID Nos or depend from such claims, they cannot be searched other than by a sequence search.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claim(s) 17-32, drawn to methods of identifying compounds that inhibit or activate CD38 or SM38 enzyme activity.

Group II, claim(s) 33-34, drawn to methods of modulating migratory activity with CD38 modulators.

The special technical feature linking Groups I-II appears to be that all these inventions are related to a CD38 homolog protein named SM38.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: CD38 proteins are known in the prior art. Bertelzier et al. (Human CD38 is an authentic NAD(P)⁺ glycohydrolase, Biochem J. 330:1383-1390, 1998) teaches a human CD38 protein and discloses an enzymatic activity for such protein. Augustin et al. (Molecular cloning and functional expression of bovine spleen ecto-NAD⁺ glycohydrolase: structural identity with human CD38, Biochem. J. 345:43-52, 2000) teaches a bovine CD38 protein. Therefore, Groups I-II do not share a special technical feature as defined in PCT Rule 13.2.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, SCISEARCH, EMBASE, USPATFULL, BIOTECHNO, WPI/DS

search terms: ADP-ribosyl cyclase, CD38, recombinant, human, activator, inhibitor, cell migration, chemoattract, etc.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/25	
C 1 2 Q 1/25	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/573	A
	C 1 2 N 5/00	A

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

(72)発明者 ランド, フランス, イー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 3 8 ニューヨーク州, サラナク レイク, アルゴンキン アヴェニュー
 1 0 0, ピー.オー.ボックス 5 9

(72)発明者 ランドール, トロイ, ディー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 3 8 ニューヨーク州, サラナク レイク, アルゴンキン アヴェニュー
 1 0 0, ピー.オー.ボックス 5 9

(72)発明者 パーティダ - サンシェズ, サンティアゴ
 アメリカ合衆国 1 2 9 3 8 ニューヨーク州, サラナク レイク, アルゴンキン アヴェニュー
 1 0 0, ピー.オー.ボックス 5 9

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA20 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA07 CA02
 4B050 CC03 CC05 DD11 LL01 LL03
 4B063 QA18 QQ21 QQ63 QQ89 QQ95 QR77
 4B065 AB01 BA01 CA27 CA44 CA46
 4H045 AA11 DA75 EA50

专利名称(译)	CD38调节的趋化性		
公开(公告)号	JP2004518414A	公开(公告)日	2004-06-24
申请号	JP2002535531	申请日	2001-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	Toryu杜墨研究所		
申请(专利权)人(译)	Toryudeyu研究所墨水.		
[标]发明人	ランドフランセスイー ランドールトロイディー パーティダサンシエズサンティアゴ		
发明人	ランド, フランセス, イー. ランドール, トロイ, ディー. パーティダ-サンシエズ, サンティアゴ		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/435 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/24 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	A61P3/10 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P33/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/4354 C12N9/2497 C12Y302/02005		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/573.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA20 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA02 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ21 4B063/QQ63 4B063 /QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR77 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/EA50		
优先权	60/241065 2000-10-17 US		
其他公开文献	JP4139214B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及调节表达CD38的细胞的迁移活性以治疗疾病的方法，所述疾病包括但不限于炎症，局部缺血，哮喘，自身免疫疾病，糖尿病，关节炎，过敏，病原生物感染和移植排斥。这些细胞包括例如嗜中性粒细胞，淋巴细胞，嗜酸性粒细胞，巨噬细胞和树突细胞。本发明还涉及设计用于鉴定调节CD38的ADP-核糖基环化酶活性的化合物的药物筛选试验，以及这些化合物在治疗涉及CD38调节的细胞迁移的疾病中的用途。本发明基于以下发现：趋化性需要CD38 ADP-核糖基环化酶活性。此外，本发明涉及鉴定调节曼氏血吸虫CD38同源物的酶活性的化合物的方法，并使用这些化合物治疗由蠕虫感染引起的病理性疾病。这是基于发现蠕虫如曼氏血吸虫表达CD38同源物。

		特許庁 (P2004-518414) (43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)	
(51) Int. Cl. 7	FI		テーマコード(参考)
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNA	2G045
C07K 16/40	C07K 16/40		4B024
C12N 1/15	C12N 1/15		4B050
C12N 1/19	C12N 1/19		4B063
C12N 1/21	C12N 1/21		4B065
	審査請求	未請求	予備審査請求
		有	(全155頁) 最終頁
(21) 出願番号	特願2002-535531 (P2002-535531)	(71) 出願人	503139315
(86) (2) 出願日	平成13年10月17日(2001.10.17)		トリュデュ インスティテュート, イ
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月14日(2003.4.14)		.
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/032383		アメリカ合衆国 12938 ニュー
(87) 国際公開番号	W02002/032288		ク州, サラナク レイク, アルゴンキ
(87) 国際公開日	平成14年4月25日(2002.4.25)		アヴェニュー 100, ビー.オー.
(31) 優先権主張番号	60/241,065		クス 59
(32) 優先日	平成12年10月17日(2000.10.17)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次