

(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2004-500039

(P2004-500039A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-523754 (P2001-523754)	(71) 出願人	501439149
(86) (22) 出願日	平成12年9月15日 (2000. 9. 15)		ソルベイ・フアーマシユーチカルズ・ペー
(85) 翻訳文提出日	平成14年3月14日 (2002. 3. 14)		・ブイ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/009116		オランダ・エヌエルー1381シーピー
(87) 国際公開番号	W02001/019983		ウエースプ・シージェイバンハウテンラー
(87) 国際公開日	平成13年3月22日 (2001. 3. 22)		ン36
(31) 優先権主張番号	99203014.8	(74) 代理人	100060782
(32) 優先日	平成11年9月16日 (1999. 9. 16)		弁理士 小田島 平吉
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	デレールスニエダー, ウイリ
(31) 優先権主張番号	1013062		オランダ・エヌエルー1381シーピー
(32) 優先日	平成11年9月16日 (1999. 9. 16)		ウエースプ・シージェイバンハウテンラー
(33) 優先権主張国	オランダ (NL)		ン36

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトG-タンパク質共役型受容体

## (57) 【要約】

本発明は、IGS3Gタンパク質共役型受容体ファミリー、および該IGS3タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明は、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用を阻害または活性化すること、該ポリヌクレオチドを含むベクター、このベクターを含む宿主細胞およびIGS3遺伝子が過剰発現、非圧減圧下で、過少発現または抑制のいずれかであるヒト以外のトランスジェニック動物（ノックアウト動物）にも関する。本発明は、さらに、該Gタンパク質共役型受容体ファミリーIGS3のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる化合物をスクリーニングするための方法および広範囲の疾患およびこのような状態のための診断アッセイの処置におけるIGS3受容体ファミリーに対するIGS3ポリペプチドおよびポリペプチドヌクレオチドおよびアゴニストまたはアンタゴニストの使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a) 配列番号 2 記載の I G S 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- b) Centraal bureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号 CBS 102196 号内に含まれる DNA 挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特には配列番号 1 に相当するヌクレオチド配列；
- c) (a) または (b) のヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも 80% (好ましくは少なくとも 90%) の配列の同一性を有するヌクレオチド配列；
- d) (a) または (b) または (c) のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列からなる群より選ばれたヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

該ポリヌクレオチドが、配列番号 2 の I G S 3 ポリペプチドをコードする配列番号 1 内に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

該ポリヌクレオチドが、配列番号 1 のものに対してその全長にわたって少なくとも 80% 同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

配列番号 1 のポリヌクレオチドである、請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

DNA また RNA である、請求項 1 から 4 までに記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

少なくとも 5 個のヌクレオチドおよび好ましくは 30 個と 50 個との間のヌクレオチドの請求項 1 のポリヌクレオチドまたはその断片を含んでなるハイブリダイゼーションプローブ。

## 【請求項 7】

発現系が適合する宿主細胞内に存在する場合に、該発現系が、配列番号 2 のポリペプチドと少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる I G S 3 ポリペプチドを産生可能である、発現系を含んでなる DNA または RNA 分子。

## 【請求項 8】

請求項 7 の発現系を含んでなる宿主細胞。

## 【請求項 9】

酵母細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

## 【請求項 10】

動物細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

## 【請求項 11】

請求項 8 から 10 までに記載の細胞から誘導された I G S 3 受容体膜調製物。

## 【請求項 12】

該ポリペプチドの産生のために十分な条件下で請求項 8 の宿主を培養しそして培養物からポリペプチドを回収することを含んでなる、I G S 3 ポリペプチドを産生するための方法。

## 【請求項 13】

適当な培養条件下で、細胞が I G S 3 ポリペプチドを産生可能なように、請求項 7 の発現系を用いて細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、細胞の I G S 3 ポリペプチドを産生する細胞を産生するための方法。

## 【請求項 14】

配列番号 2 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含んでなる、I G S 3 ポリペプチド。

## 【請求項 15】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 4 のポリペプチド。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 の I G S 3 ポリペプチドに対して免疫特異性の抗体。

【請求項 1 7】

( a ) 該受容体に対するアゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または、  
( b ) 配列番号 2 の I G S 3 ポリペプチドコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列、または生体内で該受容体活性の産生を行うような形で該ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドを患者に提供する

ことを含んでなる、請求項 1 4 の I G S 3 ポリペプチド受容体の増強された活性または発現を必要とする患者の治療のための方法。 10

【請求項 1 8】

( a ) 該受容体に対するアンタゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または

( b ) 該受容体をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチドを患者に投与し、および/または

( c ) そのリガンドに関して該受容体と競合するポリペプチドの治療的な有効量を患者に投与する

ことを含んでなる、請求項 1 4 の I G S 3 ポリペプチド受容体の活性または発現を阻害する必要性を有する患者の治療のための方法。 20

【請求項 1 9】

( a ) 該患者のゲノム内の該 I G S 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内の突然変異の存在または不在を決定し、および/または

( b ) 該患者から誘導された試料内の I G S 3 ポリペプチド発現の存在または量を分析する

ことを含んでなる、該患者内の請求項 1 4 の I G S 3 ポリペプチドの発現または活性に関連する患者内の疾患または疾患に対する罹患性の診断のための方法。

【請求項 2 0】

( a ) I G S 3 ポリペプチドを産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

( b ) 試験化合物が I G S 3 ポリペプチドの活性化により発生されるシグナルをもたらすかどうかを決定する 30

ことを含んでなる、請求項 1 4 の I G S 3 ポリペプチドに対するアゴニストを同定するための方法。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項 2 2】

( a ) I G S 3 ポリペプチドを産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

( b ) 該アゴニストにより発生されるシグナルが候補化合物の存在下において減少されるかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項 1 4 の I G S 3 ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための方法。 40

【請求項 2 3】

請求項 2 2 の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項 2 4】

請求項 1 3 記載の方法により産生される組換え宿主細胞または I G S 3 ポリペプチドを発現するその膜。

【請求項 2 5】

a ) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列またはその生物学的に活性な部分から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を、高レベル遺伝子発現または遺伝子が該動物内で通常は発現されない細胞タイプ内での発現を駆動する 50

ことができる調節配列と連結させ、または

b) 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列またはその生物学的に活性な部分から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を操作し、そして、配列番号2のアミノ酸配列または生物学的に活性な部分を有するタンパク質をコードする内在性遺伝子対立遺伝子が完全にまたは部分的に不活性化されるような方法で該動物のゲノム内に該配列を再導入する

工程を含んでなる、遺伝子的に操作したヒト以外の動物を創成する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド、これらによりコードされるポリペプチドおよびこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、およびこれらの製造に関する。さらに具体的には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に関し、これを以後IGS3と呼ぶ。本発明は、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用の阻害または活性化、該ポリヌクレオチドを含むベクター、これらのベクターを含む宿主細胞およびIGS3遺伝子が過剰発現、非発現、過少発現および/または抑制のいずれかであるトランスジェニック動物(ノックアウト動物)にも関する。本発明は、さらに、該Gタンパク質共役型受容体IGS3のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用できる化合物をスクリーニングするための方法に関する。

10

20

【0002】

【発明の背景】

多数の医療的に重要な生物学的過程が、Gタンパク質および/または第二メッセンジャー、例えばcAMPを含むシグナル伝達経路に関与するタンパク質により媒介されることは良く証明されている(Lefkowitz, Nature 1991, 351:353-354)。本明細書中でこれらのタンパク質は、Gタンパク質と一緒に経路に関与するタンパク質と呼ばれる。これらのタンパク質の一部の例は、GPCR受容体、例えばアドレナリン作動剤およびドーパミンのためのもの(Kobilka, B.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K. et al., Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R., et al., Nature, 1988, 336:783-787)、Gタンパク質自体、エフェクタータンパク質、例えばホスホリパーゼC、アデニル酸シクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ、およびアクチュエータータンパク質、例えばタンパク質キナーゼAおよびタンパク質キナーゼC(Simon, M.I., et al., Science, 1991, 252:802-8)を含む。

30

40

【0003】

例えば、シグナル伝達の一つの形においてGPCRへのホルモン結合の際に、受容体は、ヘテロ三量体状Gタンパク質と相互作用してそしてグアニンヌクレオチド-結合部位からGDPの分離を誘導する。グアニンヌクレオチドの正常の細胞濃度において、GTPは部位を直ちに満たす。Gタンパク質のサブユニットへのGTPの結合は、受容体からGタンパク質の分離およびGタンパク質のサブユニットへの分離を起こす。次いで、GTPを有する形は、アデニル酸シクラーゼに結合して活性化する。Gタンパク質自体により触媒されるGTPのGDPへの加水分解(サブユニットは固有のGTPアーゼ活性を有する)は、Gタンパク質をその基底の不活性形に返還させる。サブユニットのGTPアーゼ活性は、本質的には、オン/オフスイッチを制御する内部時計である。

サブユニットのGDP結合形は、に対する高いアフィニティを有しそしてGDPのとの引き続く再結合は、系を基底状態に返還させる。このように、Gタンパク質は二重の役割、すなわち受容体からエフェクター(この例ではアデニル酸シクラーゼ)へのシグナルを中継する中間体としておよびシグナルの存続期間を制御する時計としての役割を

50

有する。

【0004】

Gタンパク質共役型受容体の膜結合スーパーファミリーは、7個の推定膜貫通ドメインを有するとして特性化されている。ドメインは、細胞外または細胞質ループにより連結された膜貫通らせんを表すと考えられている。Gタンパク質共役型受容体は、広範囲の生物学的活性受容体、例えばホルモン、ウイルス、成長因子および神経受容体を含む。

【0005】

Gタンパク質共役型受容体ファミリーは、CNS障害の治療に使用される神経弛緩性薬剤に結合するドーパミン受容体を含む。このファミリーの成員の別の例は、カルシトニン、アドレナリン作動薬、神経ペプチドY、ソマスタチン、ニューロテンシン、ニューロキニン、カプサイシン、VIP、CGRP、CRF、CCK、プラジキニン、ガラニン、モチリン、ノシセプチン、エンドテリン、cAMP、アデノシン、ムスカリニン作用薬、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンピン、キニン、濾胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子-1、ロドプシン、オドラント、およびサイトメガロウイルス受容体を含み、これらに限定はされない。

10

【0006】

大部分のGタンパク質共役型受容体は、機能的タンパク質構造を安定化すると考えられているジスルフィド結合を形成する最初の2個の細胞外ループのそれぞれの中に単独保存システイン残基を有する。7個の膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と呼ばれる。TM5とTM6とを結合する細胞質ループが、Gタンパク質結合ドメインの主要な成分であろう。

20

【0007】

大部分のGタンパク質共役型受容体は、第三細胞質ループおよび/またはカルボキシ末端内に潜在的リン酸化部位を含む。数種のGタンパク質共役型受容体、例えば - アドレナリン受容体において、タンパク質キナーゼAおよび/または特定の受容体キナーゼによるリン酸化は、受容体脱感作を媒介する。

【0008】

最近、ある種のGPCRが、カルシトニン受容体様受容体と同様に、受容体活性調節タンパク質(RAMP)と呼ばれる小さい一回貫通膜タンパク質と相互作用するであろうことが発見された。GPCRとある種のRAMPとのこの相互作用は、天然のリガンドがGPCR-RAMPの組み合わせに対する関連アフィニティを有しそして複合体の機能的シグナル伝達活性を調節することに決定的である(McLathie, L.M. et al., Nature (1998) 393: 333-339)。

30

【0009】

ある種の受容体に対して、Gタンパク質共役型受容体のリガンド結合部位は、数個のGタンパク質共役型受容体膜貫通ドメインにより形成された親水性ソケットを含んでなり、そのソケットはGタンパク質共役型受容体の疎水性残基により囲まれていると考えられる。それぞれのGタンパク質共役型受容体膜貫通らせんの親水性側は内側に向き、そして極性リガンド-結合部位を形成すると考えられる。TM3は、数種のGタンパク質共役型受容体においてリガンド-結合部位、例えばTM3アスパラギン酸残基を有すると考えられている。TM5セリン、TM6アスパラギンおよびTM6およびTM7フェニルアラニンまたはチロシンもリガンド結合に関係する。

40

【0010】

Gタンパク質共役型受容体は、ヘテロ三量体Gタンパク質により種々の細胞内酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターに細胞内結合できる(Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10: 317-331 参照)。種々のGタンパク質サブユニットは、特定のエフェクターを優先的に刺激して種々の生物学的機能を細胞内で調節する。Gタンパク質共役型受容体の細胞質内残基のリン酸化は、ある種のGタンパク質共役型受容体のGタンパク質結合の調節のための重要な機構として同定された。Gタンパク質共役型受容体は哺乳類宿主内の多数の部位に見いだされている。

50

## 【0011】

主としてGPCRクラスである受容体は、現在既知の薬剤の半分以上を誘導した(Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14:1516)。これは、これらの受容体が、治療標的として確立され、証明された経歴を有することを示す。本発明中に記載する新規のIGS3 GPCRは、機能不全、障害または疾患(以後全体的に「疾患」と呼ぶ)の診断、防止、改善または矯正において役立つことができる別の受容体の同定および特性決定のための当該技術分野での要求を明らかに満足する。「疾患」は、精神分裂症、間欠性発作不安(EPA)障害、例えば強迫症( OCD)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含む精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害(ADHD)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群( IBS)、炎症性腸疾患( IBD)、胃食道反射疾患( GERD)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害を含み、これらに限定はされない。

10

20

## 【0012】

## 【発明の要約】

一つの態様では、本発明は、IGS3ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび組換え物質およびこれらの製造のための方法に関する。本発明の別の態様は、このようなIGS3ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび組換え物質の使用のための方法に関する。このような使用は、上記の「疾患」の一つの治療標的としておよび治療のための使用を含み、これに限定はされない。

30

## 【0013】

さらに別の態様において、本発明は、本発明により提供される物質を用いるアゴニストおよびアンタゴニストの同定のため、および同定された化合物を用いるIGS3平衡失調に関連する状態を治療する方法に関する。本発明のさらに別の態様は、不適当なIGS3活性またはレベルに関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。本発明のさらに別の態様は、IGS3の異常な発現または活性から起きる障害のためのモデルとして挙動する動物に基づく系に関する。

## 【0014】

## 【表1】

表1: 配列番号1のIGS3-DNA

```

5'-
TTAATCTCTTCAAGCCTCTGATTTCCCTCTCCTGTA AAAACAGGGGCGGTAATTACCACATA
ACAGGCTGGTCATGAAAATCAGTGAACATGCAGCAGGTGCTCAAGTCTTGTTTTTGTTC
CAGGGGCACCAGTGGAGGTTTTCTGAGCATGGATCCAACCACCCCGGCCTGGGGAACAGA
AAGTACAACAGTGAATGGAAATGACCAAGCCCTTCTTCTGCTTTGTGGCAAGGAGACCCT
GATCCCGGTCTTCCTGATCCTTTTCATTGCCCCTGGTCGGGTGGTAGGAAACGGGTTTGT
GCTCTGGCTCCTGGGCTTCCGCATGCGCAGGAACGCCTTCTCTGTCTACGTCTCAGCCT
GGCCGGGGCCGACTTCTCTTCCCTCTGCTTCCAGATTATAAATTGCCTGGTGTACCTCAG
TAACTTCTTCTGTTCCATCTCCATCAATTTCCCTAGCTTCTTCACCACTGTGATGACCTG
TGCCTACCTTGCAGGCCTGAGCATGCTGAGCACCGTCAGCACCGAGCGCTGCCTGTCCGT
CCTGTGGCCCATCTGGTATCGCTGCCGCCGCCAGACACCTGTGAGCGGTCTGTGTGTGT
CCTGCTCTGGCCCTGTCCCTACTGCTGAGCATCTTGAAGGGAAGTTCTGTGGCTTCTT
ATTTAGTGATGGTACTCTGGTTGGTGTGACACATTTGATTTCACTGCAGCGTGGCT
GATTTTTTTTATTCATGGTTCTCTGTGGGTCCAGTCTGGCCCTGCTGGTCAGGATCCTCTG
TGGCTCCAGGGGTCTGCCACTGACCAGGCTGTACCTGACCATCCTGCTCACAGTGTGGT
GTTCCCTCTCTGCCGCCTGCCCTTTGGCATTGAGTGGTTCCTAATATTATGGATCTGGAA
EGATTCTGATGCTTATTTTGTATATTCAATCCAGTTTCAGTTGTCCTGTATCTCTTAA
CAGCAGTGCCAACCCCATATTTACTTCTTCGTGGGCTCTTTAGGAAGCAGTGGCCGCT
GCAGCAGCCGATCCTCAAGCTGGCTCTCCAGAGGGCTCTGCAGGACATTGCTGAGGTGGA
TCACAGTGAAGGATGCTTCCGTGAGGGCACCCCGGAGATGTCGAGAAGCAGTCTGGTGTA
GAGATGGACAGCCTCTACTTCCATCAGATATATGTG-3'

```

10

20

【0015】

30

【表2】

表2: 配列番号2のIGS3-タンパク質

```

MDPTTPAWGTESTTVNGNDQALLLLCGKETLIPVFLILFIALVGLVGNFVLWLLGFRMR
RNAFSVYVLSLAGADFLFCFQIINCLVYLSNFFCSISINFPSFFTVMTCAYLAGLSML
STVSTERCLSVLWPIWYRCRRPRHLSAVVCVLLWALSLLLSILEGKFCGFLFSDGDSGWC
QTFDFITAAWLIFLFMVLGSSLLALLVRI LCGSRGLPLTRLYLTILLTVLVFLLCGLPFG
IQWFLILWIWKSDVLFCHIHPVSVVLSLSSANPIIYFFVGSFRKQWRLQQPILKLAL
QRALQDIAEVDHSEGCFRQGTPEMSRSSLV

```

40

【0016】

発明の詳細な説明

構造および化学的類似性は、配列およびモチーフの範囲内で、本発明のIGS3 GPCRとその他のヒトGPCRとの間に存在する。従って、IGS3はなかでも上記の「疾患」に関与すると考えられる。

【0017】

別途に断らない限り、本明細書中に使用される技術的および科学的用語は、本発明が属する当該技術分野の通常の熟練者により共通して理解されると同様の意味を有する。本明細

50

書中に記載のものに類似または等価なあらゆる方法および物質が本発明の実施または試験に使用できるけれども、好ましい方法、装置および物質をここに記載する。本明細書中に引用したすべての公開文献は、すべての公開文献を特定して個別に完全に記載すると同様に本明細書中に引用して組み込むと同様に、引用することにより本明細書中に編入される。

【0018】

定義

以下の定義は、本明細書中にしばしば使用される一部の用語の理解を助けるために記載される。

【0019】

「IGS3」は、なかでも、配列番号2中に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドまたはその変種を呼ぶ。

10

【0020】

「受容体活性」または「受容体の生物学的活性」は、該IGS3の代謝または生理的機能と呼び、同様の活性または改善された活性または低下した望ましくない副作用を有するこれらの活性を含む。該IGS3の抗原性および免疫原性活性も含まれる。

【0021】

「IGS3遺伝子」は、配列番号1中に記載のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドまたはこれらの変種および/またはこれらの補体を呼ぶ。

【0022】

本明細書中に使用される「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、および人体適応化された抗体、ならびにFab断片を含み、これにはFabまたはその他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産生物も含まれる。

20

【0023】

「単離された」は、「人手により」本来(天然)の状態から改変および/または本来の環境から分離されたことを意味する。従って、本来的に存在する「単離された」組成物または物質が「単離」されると、その当初の環境から変化または移動または両方を受ける。例えば、本来的に生きた動物内に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、しかしその本来の状態と一緒に存在する物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離され」ており、このように本明細書中で用語が使用される。

30

【0024】

「ポリヌクレオチド」は、一般に、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであってもよいあらゆるポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを呼ぶ。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖状DNA、一本鎖および二本鎖の領域の混合であるDNA、一本鎖および二本鎖状RNA、および一本鎖および二本鎖の領域の混合であるRNA、一本鎖またはさらに典型的には二本鎖または一本鎖および二本鎖の領域の混合であってもよいDNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子を含むが、これに限定はされない。さらに「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含んでなる三本鎖領域も含んでもよい。用語ポリヌクレオチドは、1個またはそれ以上の修飾塩基を含むDNAまたはRNAおよび安定性またはその他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。「修飾された」塩基は、例えばトリチル化された塩基および通常ではない塩基、例えばイノシンを含む。種々の修飾がDNAおよびRNAに対して行われ、従って、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的または代謝的に修飾された、典型的に天然に見いだされるポリヌクレオチドの形、ならびにウイルスおよび細胞のDNAおよびRNA特性の化学的の形を包含する。「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

40

【0025】

「ポリペプチド」は、たがいにペプチド結合または変形ペプチド結合、すなわちペプチド

50

アイソスターで結合された2個またはそれ以上のアミノ酸を含んでなるあらゆるペプチドまたはタンパク質を呼ぶ。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般にタンパク質と呼ばれるさらに長い鎖、および/またはこれらの組み合わせを呼ぶ。ポリペプチドは、20個の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、天然の過程、例えば翻訳後プロセッシングにより、または当該技術分野では周知の化学的修飾技術のいずれかにより修飾されたアミノ酸配列を含む。このような修飾は基本的教科書中およびさらに長大な論文中ならびに大量の研究文献中に十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチドのあらゆる場所で起きることができる。同じ形式の修飾が、与えられたポリペプチド中の種々の部位において同一または異なる程度で存在してもよいことが認められる。また、与えられたポリペプチドは多数の形式の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝してもよく、そしてこれらは分枝を有するかまたは有していない環状であってもよい。環状、分枝状および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセッシングからもたらされてもよくまたは合成法により作製されてもよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質または脂質誘導体の共有結合付加、ホスホチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加例えばアルギニル化、およびユビキチン化を含む。例えば、「タンパク質 - 構造および分子的性質」(PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993)および「翻訳後タンパク質修飾 - 前途および予想」(Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed. Academic Press, New York, 1983)、「タンパク質修飾および非タンパク質補因子の分析」(Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646)および「タンパク質合成: 翻訳後修飾および熟成」(Ratten et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663: 48-62)を参照。

10

20

30

#### 【0026】

本明細書中に使用される用語としての「変種」は、比較するポリヌクレオチドまたはポリペプチドとはそれぞれ異なるが、本質的な性質、例えば本質的な生物学的、構造的、調節的または生化学的性質は保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変種は、他の比較ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列中の変化は、比較ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変してもしなくてもよい。ヌクレオチド変化は、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断を比較配列によりコードされるポリペプチド中にもたらしてもよく、これは以下に考察する。ポリペプチドの典型的な変種は、アミノ酸配列が他の比較ポリペプチドと異なる。一般に、相違は、比較ポリペプチドおよび変種の配列が全体的には密接に類似しそして多くの領域で一致している程度に限定される。変種および比較ポリペプチドは、アミノ酸配列内であらゆる組み合わせにより1個またはそれ以上の置換、

40

50

付加、および欠失で異なってもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子暗号によりコードされるものであってもなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、天然に存在する例えば対立遺伝子変種であってもよく、またはこれは天然に存在するとは知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非-天然存在変種は、突然変異誘発技術または直接合成により作製されてもよい。

【0027】

「同一性」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、配列は最高度の一致が得られるように整列される。「同一性」それ自体は、当該技術分野で認められた意味を有しそして公開された技術を用いて算出できる。例えば下記参照：「コンピューターによる分子生物学」(COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988); 「バイオコンピューティング：情報学およびゲノムプロジェクト」(BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993); 「配列データのコンピューター分析、第一部」(COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994); 「分子生物学における配列解析」(SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G. Academic Press, 1987); および「配列解析プライマー」(SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991)。2個のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の間の一致を測定する多数の方法が存在するけれども、用語「同一性」は、当該技術分野の熟練者には周知である(Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math., (1988) 48:1073)。2個の配列の間の同一性または類似を決定するために一般的に使用される方法は、「大型コンピューターへのガイド(Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994) およびCarillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math., (1988) 48:1073 中に開示されたものを含むが、これに限定はされない。同一性および類似を決定するための方法は、コンピュータープログラム中にコード化されている。2個の配列間の同一性および類似を決定するための好ましいコンピュータープログラム法は、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403)を含むが、これに限定はされない。用語「相同」は、「同一性」に互換可能である。

【0028】

説明として、配列番号1の比較ヌクレオチド配列に対して少なくとも例えば95%「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列が配列番号1の比較ヌクレオチド配列のヌクレオチド100個それぞれに対して5個以下のヌクレオチド相違を含んでもよいことを除いて、比較配列と一致することを意味する。換言すると、比較ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一するヌクレオチド配列を有すポリヌクレオチドを得るためには、比較配列中のヌクレオチドの5%以下が欠失または他のヌクレオチドにより置換されてもよいが、または比較配列中の全ヌクレオチドの5%以下の数のヌクレオチドが比較配列内に挿入されてもよいが、または比較配列内の全ヌクレオチドのいずれかの5%以下のヌクレオチドの数において欠失、挿入および置換の組み合わせがあってもよい。比較配列のこれらの

10

20

30

40

50

変異は、比較ヌクレオチド配列の5または3末端位置においてまたはこれらの末端位置の間のいかなる位置でも、比較配列中のヌクレオチドの間で個別に、または比較配列内の1個またはそれ以上の連続基内のヌクレオチドのいずれかに散布して起きてもよい。

#### 【0029】

同様に、例えば、配列番号2の比較アミノ酸配列に対して少なくとも95%「同一性」を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、ポリペプチド配列が配列番号2の比較配列のアミノ酸100個のそれぞれに対して5個以下のアミノ酸変化を含んでもよいことを除いてポリペプチドのアミノ酸配列が比較配列と一致すること意味する。換言すると、比較アミノ酸配列に少なくとも95%一致するアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、比較配列内のアミノ酸残基の5%以下が欠失または他のアミノ酸で置換されていてもよい、または比較配列内の全アミノ酸残基の5%以下の数のアミノ酸が比較配列中に挿入されてもよい。比較配列のこれらの変更は、比較アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置においてまたはこれらの末端位置の間のあらゆる位置で、比較配列内の残基間に個別にまたは比較配列内の1個またはそれ以上の隣接基内のいずれかに散在して存在してもよい。

#### 本発明のポリペプチド

一つの態様では、本発明は、IGS3ポリペプチド(IGS3タンパク質も含む)に関する。IGS3ポリペプチドは配列番号2のポリペプチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)に1999年9月15日付けで寄託された寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド;ならびに配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号2のものとおよび/またはCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドとその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、そしてさらに好ましくは、少なくとも90%の同一性、そしてその上にさらに好ましくは少なくとも95%の同一性を該アミノ酸配列に対して有するポリペプチドを含む。さらに、少なくとも97%、特に少なくとも99%のものが高度に好ましい。IGS3ポリペプチド内には、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドとその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを有し、そしてさらに好ましくは、配列番号2に少なくとも90%の同一性、そしてその上にさらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドも含む。さらに、少なくとも97%、特に少なくとも99%のものが高度に好ましい。好ましくは、IGS3ポリペプチドは受容体の少なくとも一つの生物学的活性を示す。

#### 【0030】

本発明の別の態様では、IGS3ポリペプチドは、さらに大きいタンパク質、例えば融合タンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製において支援する配列、例えば重複ヒスチジン残基を含む追加のアミノ酸配列、検出を支援する配列、例えば抗原性ペプチドタグ(例えばヘマグルチニン(HA)タグ)または組換え物産生の間の安定性のための追加の配列を含むとしばしば有利である。

#### 【0031】

IGS3ポリペプチドの断片も本発明中に含まれる。断片とは、上記のIGS3ポリペプチドのアミノ酸配列の一部ではあるが全体ではないものと同様のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。IGS3ポリペプチドと同様に、断片は「自立」、すなわちこれら

が部分または領域を形成するさらに大きいポリペプチド内で、最も好ましくは単独の連続領域を含んでなってもよい。本発明のポリペプチド断片の代表的な例は、例えば、IGS3ポリペプチドのアミノ酸番号約1-20、21-40、41-60、61-80、81-100、および101から末端までよりの断片を含む。この範囲内で、「約」は一方の端または両端のいずれかにおける数個、5、4、3、2または1個のアミノ酸ほど大きいかまたは小さい特定の列挙の範囲を含む。

#### 【0032】

好ましい断片は、例えば、アミノ末端を含む残基の一連の連続物もしくはカルボキシ末端を含む残基の一連の連続物の欠失、またはアミノ末端を含むものおよびカルボキシ末端を含むものの残基の2個の連続物の欠失を除き、IGS3ポリペプチドのアミノ酸配列を有する末端切断ポリペプチドを含む。構造的または機能的属性、例えばアルファらせんおよびアルファらせん形成性領域、ベータシートおよびベータシート形成性領域、ターンおよびターン形成性領域、コイルおよびコイル形成性領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両性領域、ベータ両性領域、フレキシブル領域、表面形成性領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含んでなる断片により特徴付けられる断片も好ましい。その他の好ましい断片は、生物学的活性の断片である。生物学的活性の断片は、受容体活性を媒介するものであり、類似した活性もしくは改善された活性を有するか、または低下した望ましくない活性を有するものを含む。動物中特にヒト中で抗原性または免疫原性であるものも含まれる。

10

#### 【0033】

従って、本発明のポリペプチドは、配列番号2のものおよび/またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドのいずれかと少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または相当する断片に少なくとも80%同一であるこれらの断片を含む。好ましくは、これらのポリペプチド断片のすべては、抗原活性を含む受容体の生物学的活性を保持する。定義された配列および断片の変種も本発明の一部を形成する。好ましい変種は、保存的アミノ酸置換により比較物とは異なるもの、すなわち別または類似した特性の残基を置換するものである。典型的なこのような置換は、Ala、Val、LeuおよびIleの間、SerとThrとの間、酸残基AspとGluとの間、AsnとGlnとの間、および塩基性残基LysとArgとの間、または芳香族残基PheとTyrとの間である。特に好ましくは、数個、5~10個、1~5個または1~2個のアミノ酸が、いずれかの組み合わせで置換、欠失、または追加されている変種である。

20

30

#### 【0034】

本発明のIGS3ポリペプチドは、あらゆる適当な方法で作製できる。このようなポリペプチドは、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え作製されたポリペプチド、合成して作製されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせで作製されたポリペプチドを含む。このようなポリペプチドの作製方法は、当該技術分野では周知である。

#### 本発明のポリヌクレオチド

本発明の別の態様はIGS3ポリヌクレオチドに関する。IGS3ポリヌクレオチドは、IGS3ポリペプチドおよび断片をコードする単離されたポリヌクレオチド、およびこれに密接に関連するポリヌクレオチドを含む。さらに具体的には、本発明のIGS3ポリヌクレオチドは、配列番号1中に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、例えば配列番号2のIGS3ポリペプチドをコードできるもの、配列番号1の特定の配列を有するポリヌクレオチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物に本質的に相当するポリヌクレオチドを含む。

40

#### 【0035】

IGS3ポリヌクレオチドは、配列番号2のIGS3ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配

50

列を含んでなるポリヌクレオチド、配列番号1のものにその全長にわたって少なくとも80%同一性であるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドおよびCentraal bureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物に本質的に相当するポリヌクレオチドをさらに含む。

#### 【0036】

これに関して、少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドが特に好ましく、そして少なくとも95%同一であるものがさらに好ましい。さらに、少なくとも97%のものが高度に好ましく、少なくとも98-99%のものが最も高度に好ましく、少なくとも99%のものが最も好ましい。IGS3ポリヌクレオチドとして、配列番号1内に含まれるヌクレオチド配列に対しましてはCentraal bureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物に対して十分な一致性を有するヌクレオチド配列も、増幅のためまたはプローブまたはマーカーとしての使用のために使用可能な条件下でハイブリダイズするために含まれる。本発明は、これらのIGS3ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも提供する。

10

#### 【0037】

本発明のIGS3は、Gタンパク質共役型受容体ファミリーの他のタンパク質に構造的に関連し、これは公開データベース中のBLASTサーチの結果により示される。表2のアミノ酸配列(配列番号2)は、約35%一致(BLAST使用、Altschul S. F. et al., Nucleic Acids Res. (1997), 25:3389-3402)をその長さの大部分(2-306アミノ酸残基)において、ヒトmas腫瘍遺伝子によりコードされるタンパク質(特許出願WO8707472号中の配列1)と有する。この配列は、37%の同一性(アミノ酸残基35-315)を特許出願WO9616087号中に公開されたG-タンパク質共役型受容体(GENESEQ96P-R97222)に対して有する。表1のヌクレオチド配列(配列番号1)は、52%および54%の同一性を2個の上記の受容体(それぞれGENESEQ87N-70685および96N-T28807)の長さの大部分で有する。さらに、残基104-1144内でヒトソマトスタチン-3-受容体(WO9313130号;93N-Q45657)に48%同一である。IGS3タンパク質配列のヒドロパシー分析(Kyte J. et al., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132; Klein P. et al., Biochem. Biophys. Acta (1985) 815:468-476)は、予想通りに7個の膜貫通ドメインの存在を示した。従って、本発明のIGS3ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、なかでもこれらの相同ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに類似した生物学的機能/性質を有すると予想され、そしてこれらの有用性は当該技術分野のすべての熟練者には明白である。

20

30

#### 【0038】

本発明のポリヌクレオチドは、天然資源、例えばゲノムDNAから得ることができる。特に、縮重(degenerated)PCRプライマーは、特定のGPCR遺伝子サブファミリー内で保存された領域をコードするように設計できる。縮重プライマーを用いるゲノムDNAまたはcDNA上のPCR増幅反応は、考慮している遺伝子ファミリーの数のメンバー(公知および新規の両方)の増幅をもたらす(ゲノム鋳型を用いる場合には、縮重プライマーは同じエキソン内に位置しなければならない)(Libert et al., Science, 1989, 244:569-572)。本発明のポリヌクレオチドは、周知で商業的に利用できる技術を用いて合成もできる。

40

#### 【0039】

配列番号2のIGS3ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1(ヌクレオチド番号149~1138)中に含まれる配列をコードするポリペプチドと一致してもよいか、またはこれは、遺伝子コードの重複(縮重)の結果として、配列番号1内に含まれるポリペプチドをコードする配列と比較して変化を示す異なるヌクレオチド配列であ

50

ってもよいが、しかし配列番号2のポリペプチドをコードしてもよい。

【0040】

本発明のポリヌクレオチドがIGS3ポリペプチドの組換え産生に使用される場合には、ポリペプチドは成熟ポリペプチドのためのコーディング配列またはその断片それ自体、成熟ポリペプチドのためのコーディング配列または他のコーディング配列を有する読み取り枠内の断片、例えばリーダーまたは分泌配列、プレ-、またはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列またはその他の融合ペプチド部分をコードするものを含んでもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易とするマーカー配列がコードされることができ、本発明のこの実施におけるある好ましい態様では、マーカー配列はヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、これはpQEベクター(Qiagen, Inc.)内に提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されており、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、非-コーディング5'および3'配列、例えば転写された非-翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定化する配列を含んでもよい。

10

【0041】

さらに好ましい態様は、その中で数個、5-10、1-5、1-3、1-2または1個のアミノ酸残基があらゆる組み合わせで置換、欠失または付加された、配列番号2のIGS3ポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるIGS3変種をコードするポリヌクレオチドである。

20

【0042】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現の変化を含むが、これに限定はされない種々の目的のためにIGS3コード化配列を改変するために、当該技術分野では一般に公知の方法を用いて操作することができる。ランダムフラグメンテーションによるDNAシャフリングおよび遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再構築を、ヌクレオチド配列を操作するために使用してもよい。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位指定突然変異誘発は、アミノ酸置換の創成、新規の制限部位の創成、修飾(例えばグリコシル化またはリン酸化)パターンの改変、コドン優先の変化、スプライス変種の産生などの変異を導入するために使用してもよい。

30

【0043】

本発明は、さらに、本明細書中に以上に記載した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は、ストリンジェントな条件下で本明細書中に以上に記載したポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに特に関する。本明細書中に使用される用語「ストリンジェント条件」は、少なくとも80%、そして好ましくは少なくとも90%、そしてさらに好ましくは少なくとも95%、それ以上に好ましくは少なくとも97%、特に少なくとも99%の同一性が配列間で存在する場合にのみハイブリダイゼーションが起きることを意味する。

【0044】

配列番号1またはその断片中に含まれるヌクレオチド配列に一致または十分に一致する本発明のポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして、全長cDNAおよびIGS3をコードするゲノムクローンを単離するためおよびIGS3遺伝子に高度の配列類似性を有する他の遺伝子(ヒト以外の種からの相同体またはオルソログ体をコードする遺伝子を含む)のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために使用してもよい。当該技術分野の熟練者は、このようなハイブリダイゼーション技術を熟知している。典型的にはこれらのヌクレオチド配列は、比較物のものと80%同一、好ましくは90%同一、さらに好ましくは95%同一である。プローブは、一般に、少なくとも5個のヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも8個のヌクレオチド、そしてさらに好ましくは少なくとも10個のヌクレオチド、もっと好ましくは少なくとも12個のヌクレオチド、特に少なくとも15個のヌクレオチドを含んでなる。最も好ましくは、このようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチドを有しそして少なく

40

50

とも50個のヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは、30から50個の範囲内のヌクレオチドである。

【0045】

一つの態様は、ヒト以外の種からの相同体またはオルソログ体を含むIGS3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得るために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1またはその断片を有する標識プローブを用いる適当なライブラリーのスクリーニング、および全長DNAならびに該ポリヌクレオチド配列を含むゲノムクローンを単離する段階を含んでなる。このようなハイブリダイゼーション技術は当該技術分野の熟練者には周知である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、上記に定義されたもの、または42で、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート溶液、10%硫酸デキストラン(w/v)、および20µg/ml変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中で一晩インキュベーションし、次いで0.1xSSC中、約65でフィルターを洗浄する条件と定義される。

10

【0046】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、動物およびヒト疾患に対する治療法および診断法の発見のための研究用試薬および材料として使用してもよい。

ベクター、宿主細胞、発現

本発明は、ポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含んでなるベクター、および本発明のベクターを用いて遺伝子的に操作された宿主細胞および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生にも関する。細胞を含まない翻訳系も、本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いるこのようなタンパク質の産生に使用できる。

20

【0047】

組換え産生のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドのための発現系またはこれらの部分を組み込むために遺伝子的に操作できる。宿主細胞内へのポリヌクレオチドの導入は、多数の標準的実験マニュアル、例えば「分子生物学における基本的方法」(Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986))および「分子クローニング: 実験マニュアル」(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))に記載された方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスヴェクション(transvection)、ミクロ注入、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、スクレープ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(Ballistic introduction)または感染により行うことができる。

30

【0048】

適当な宿主の代表的な例は、細菌細胞、例えば連鎖球菌属、ブドウ状球菌、大腸菌、ストレプトミセス属および枯草菌細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属細胞、昆虫細胞、例えばショウジョウバエS2およびスポドプテラ(Spodoptera Sf9)細胞、動物細胞、例えばCHO、COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293およびボウス・メラノーマ(Bowes melanoma)細胞、および植物細胞を含む。

40

【0049】

広範な各種の発現系が使用できる。このような系は、なかでも、染色体、エピソームおよびウイルス誘導系、例えば細菌プラスミドから、バクテリオファージから、トランスポソンから、酵母エピソームから、挿入因子から、酵母染色体因子から、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスから誘導されたベクター、およびこれらの組み合わせから誘導されたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリ

50

オフージ遺伝因子、例えばコスミドおよびファジェミドから誘導されたものを含む。発現系は、発現を調節ならびに発生する制御領域を含んでもよい。一般に、宿主中にポリペプチドを産生するためのポリヌクレオチドを維持、増殖または発現するために適するあらゆる系またはベクターを使用してもよい。適当なヌクレオチド配列は、各種の周知で慣用の技術、例えば「分子クローニング：実験マニュアル」(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、上記)に記載のもののいずれを用いても発現系内に挿入してもよい。

#### 【0050】

小胞体の内腔内へ、細胞周辺腔内へまたは細胞外環境内への翻訳されたタンパク質の分泌のために、適当な分泌シグナルを所望のポリペプチド内に組み込んでもよい。これらのシグナルは、ポリペプチドに内在性であってもよくまたは非相同性シグナル、例えば異なる種から誘導されたものであってもよい。

10

#### 【0051】

スクリーニングアッセイで使用するためにIGS3ポリペプチドを発現すべき場合に、一般にポリペプチドが細胞の表面で産生されることが好ましい。このイベントにおいて、細胞をスクリーニングアッセイに使用する前に採取してもよい。IGS3ポリペプチドのアフィニティーまたは機能的活性が受容体活性調節タンパク質(RAMP)により変性される場合に、細胞表面における関係するRAMPの同時発現が好ましいと考えられ、しばしば要求される。このイベントの場合にも、IGS3ポリペプチドおよび関係するRAMPを発現する細胞の採取がスクリーニングアッセイ使用の前に要求される。IGS3ポリペ

20

#### 【0052】

IGS3ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により組換え細胞培養物から回収および精製できる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが精製に用いられる。タンパク質をリフォールディングするための周知の技術は、ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性される場合に活性コンホメーションを再生するために使用してもよい。

30

#### 診断アッセイ

本発明は、診断試薬としての使用のためのIGS3ポリヌクレオチドの使用にも関する。機能不全と関連するIGS3遺伝子の変異形の検出は、IGS3の過少発現、過剰発現または改変された発現からもたらされる疾患または疾患への罹病性の診断に追加またはこれを決定することができる診断手段を提供する。このイベントにおいても、関連する受容体活性調節タンパク質の同時発現は、所望の品質の診断アッセイを得るために要求できる。IGS3遺伝子内に変異を有する個体を、種々の技術によりDNAレベルで検出してもよい。

40

#### 【0053】

診断のための核酸は、患者の細胞から、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検物質から得てもよい。ゲノムDNAは検出のために直接使用してもよくまたは分析の前にPCRまたはその他の増幅技術を使用して酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様の方法で使用してもよい。欠失および挿入は、正常の遺伝子型と比較して増幅産物の大きさの変化により検出できる。点変異は、増幅したDNAを標識IGS3ヌクレオチド

50

配列にハイブリダイズして同定できる。完全にマッチした配列は、RNアーゼ消化によりまたは融解温度の相違により mismatch二本鎖から区別できる。DNA配列の相違は、変性剤を加えまたは加えないゲル内のDNA断片の電気泳動の移動性の改変により、または直接のDNA配列決定により検出してもよい。例えば Myers et al., Science (1985) 230: 1242 参照。特定の位置における配列変化は、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNアーゼおよびS1保護または化学切断法により解明してもよい。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401 参照。別の態様では、IGS3ヌクレオチド配列またはその断片を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを例えば遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。アレイ技術の方法は周知であり、そして一般的な用途を有しそして遺伝子発現、遺伝子連結、および遺伝子変化を含む分子遺伝学における各種の問題を解明するために使用できる(例えばM. Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996) 参照)。

10

#### 【0054】

診断アッセイは、記載の方法によるIGS3遺伝子内の変異の検出を通じて、なかでも上記の「疾患」の診断または罹患性決定のための方法を提供する。

#### 【0055】

さらに、なかでも上記の「疾患」は、患者より誘導された試料からIGS3ポリペプチドまたはIGS3 mRNAの異常な低下または増加したレベルを決定することを含んでなる方法により診断できる。

20

#### 【0056】

低下または上昇した発現は、ポリヌクレオチドの定量のために当該技術分野で周知の方法、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロッティングおよびその他のハイブリダイゼーション方法のいずれかを用いてRNAレベルで測定できる。宿主から誘導された試料中のタンパク質、例えばIGS3のレベルを決定するために使用できるアッセイ技術は、当該技術分野の熟練者には周知である。このようなアッセイ方法は、ラジオイムノアッセイ、競合-結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイを含む。

#### 【0057】

別の態様では、本発明はなかでも上記の「疾患」または「疾患」の一つへの罹病性のための診断キットに関する。

30

キットは、

(a) IGS3ポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列、またはその断片、および/または

(b) (a)のものに対して相補的なヌクレオチド配列、および/または

(c) IGS3ポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチド、またはその断片、および/または

(d) IGS3ポリペプチド、好ましくは配列番号2のポリペプチドに対する抗体、および/または

40

(e) IGS3ポリペプチドの関連する生物学的または抗原的性質のために必要なRAM Pポリペプチド

を含んでなってもよい。

#### 【0058】

このようないずれもキットでも、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は本質的な成分を含んでなってもよいことが認められる。

#### 染色体アッセイ

本発明のヌクレオチド配列は、染色体同定のためにも価値がある。配列は、個別のヒト染色体上の特定の位置に特異的に標的設定されそしてこれとハイブリダイズできる。本発明による染色体の関連配列の地図作製は、これらの配列を遺伝子関連疾患と関連させるため

50

に重要な第一段階である。配列が正確に染色体位置に場所決定された場合に、染色体上の配列の物理的位置は、遺伝子地図データと相関できる。このようなデータは、例えば V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library からオンラインで入手可能) 内に見いだされる。次いで、同じ染色体領域に場所決定された遺伝子と疾患との関係は、連鎖分析により同定される(物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝)。

#### 【0059】

影響および非影響個体間の cDNA またはゲノム配列の相違も決定できる。変異が影響を受けた個体の一部またはすべてに観察されるがしかしいずれの正常個体内にも観察されない場合には、変異は疾患の原因因子であろう。

10

#### 抗体

本発明のポリペプチドもしくはこれらの断片もしくはこれらの類似体、または関連 RAMP と一緒に要求される場合にこれらを発現する細胞は、IGS3 ポリペプチドに対して免疫特異性に抗体を産生する免疫原として使用してもよい。用語「免疫特異性」は、抗体が、従来技術の他の関連ポリペプチドへのこれらのアフィニティーよりも本質的に大きい本発明のポリペプチドへのアフィニティーを有することを意味する。

#### 【0060】

IGS3 ポリペプチドに対して生成した抗体は、ポリペプチドまたはエピトープ-保持断片、類似体または細胞を動物、好ましくはヒト以外に慣用のプロトコルを用いて投与して得てもよい。モノクローナル抗体の作製のために、連続細胞株培養により産生される抗体を供給するあらゆる技術を使用してもよい。その例は、ハイブリドーマ技術(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ技術、ヒト B-細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72) および EBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985)を含む。

20

#### 【0061】

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定するためまたはアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するために使用してもよい。

30

#### 【0062】

IGS3 ポリペプチド自体に対する抗体、または IGS3 ポリペプチド-RAMP 複合体に対する抗体は、なかでも上記の「疾患」を治療するために使用してもよい。

#### 動物

本発明の別の態様は、IGS3 の異常な発現または活性から起きる障害のためのモデルとして挙動するヒト以外の動物に基づく系に関する。ヒト以外の動物に基づくモデル系は、IGS3 遺伝子の活性をさらに特徴付けるために使用してもよい。このような系は、IGS3 に基づく疾患、例えばなかでも上記の「疾患」を治療できる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として使用してもよい。

40

#### 【0063】

この方法で、動物に基づくモデルは、IGS3 の異常な発現または活性の障害の治療において有効であるような薬剤化合物、治療および介入を同定するために使用してもよい。さらにこのような動物モデルは、動物患者内の LD<sub>50</sub> および ED<sub>50</sub> を決定するために使用してもよい。これらのデータは、潜在的 IGS3 障害治療の生体内効力を決定するために使用してもよい。

#### 【0064】

異常な IGS3 発現または活性に基づく IGS3 に基づく障害の動物に基づくモデル系は、非-組換え動物ならびに組換え操作トランスジェニック動物の両方を含んでもよい。

#### 【0065】

50

I G S 3 障害のための動物モデルは、例えば遺伝子モデルを含んでもよい。I G S 3 に基づく障害類似症候群を示す動物モデルは、例えばI G S 3 配列、例えば上記のもののような配列を、当該技術分野の熟練者に周知のトランスジェニック動物作製のための技術と組み合わせて使用して操作してもよい。例えば、I G S 3 配列は、関係する動物のゲノム内に導入、そして過剰発現および/または非発現であってもよく、または内在性I G S 3 配列が存在する場合には、これらを過剰発現、非発現のいずれでもよく、または、その代わりに、I G S 3 遺伝子発現を過少発現または不活性化するために破壊してもよい。

**【0066】**

I G S 3 遺伝子配列を過剰発現または非発現とするために、I G S 3 遺伝子配列のコーディング部分は、高レベル遺伝子発現または関係する動物種内で遺伝子が正常では発現されない細胞種内での発現を駆動することが可能な調節配列に連結されてもよい。このような調節領域は、当該技術分野の熟練者には周知であり、そして不当に多くの実験を行わないで使用してもよい。

10

**【0067】**

内在性I G S 3 遺伝子配列の過少発現のために、このような配列を単離および操作して、関係する動物のゲノム内に再導入された場合に、内在性I G S 3 遺伝子対立遺伝子が不活性化、すなわち「ロックアウト」されてもよい。好ましくは、操作されたI G S 3 遺伝子配列は、遺伝子標的法を介して、例えば動物ゲノム内へ操作されたI G S 3 遺伝子配列の組み込みの際に内在性I G S 3 配列が破壊されるように導入される。

**【0068】**

マウス、ラット、ラビット、リス、モルモット、ブタ、小型ブタ、ヤギ、およびヒト以外の霊長類、例えばヒヒ、サル、および類人猿を含むが、これに限定はされないあらゆる種の動物を、I G S 3 関連障害の動物モデルを作製するために使用してもよい。

20

**【0069】**

当該技術分野で公知のあらゆる技術は、I G S 3 導入遺伝子を動物内に導入してトランスジェニック動物の創始株を作製するために使用してもよい。このような技術は、前核ミクロ注入 (Hoppe, P. C. and Wagner, T. E. 1989, 米国特許 (US) 第4, 873, 191号); レトロウイルス媒介の生殖細胞系内への遺伝子導入 (van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152, 1985); 胚幹細胞内での遺伝子標的法 (Thompson et al., Cell 56: 313-321, 1989); 胚の電気穿孔 (Lo, Mol. Cell. Biol. 3: 1803-1814, 1983); および精子媒介遺伝子導入 (Lavitrano et al., Cell 57: 717-723, 1989) 等を含み、これらに限定はされない。このような技術の概説は、Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229, 1989 に記載されている。

30

**【0070】**

本発明は、すべてのこれらの細胞内にI G S 3 導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、ならびに一部であるがすべてではない細胞内に導入遺伝子を有する動物、すなわちモザイク動物を提供する (例えばJakobovitz, Curr. Biol. 4: 761-763, 1994 に記載の技術参照)。導入遺伝子は、単独の導入遺伝子として、またはコンカテマー、例えば頭-頭タンデムまたは頭-尾タンデム内に組み込まれてもよい。導入遺伝子は、例えばラスコラの教示 (Lasko, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236, 1992) に従って、特定の細胞種内に選択的に導入、そして活性化されてもよい。

40

**【0071】**

このような細胞タイプ特異性活性化のために必要な調節配列は、関係する特定の細胞種に依存し、そして当該技術分野の熟練者には明らかである。

**【0072】**

I G S 3 導入遺伝子を内在性I G S 3 遺伝子の染色体部位内に組み込むことを望む場合に

50

は、遺伝子標的法が好ましい。要約すると、この技術を用いる場合には、関係する内在性 I G S 3 遺伝子に相同なあるヌクレオチド配列（例えばマウス I G S 3 遺伝子のヌクレオチド配列）を含むベクターを、染色体配列との相同組換えを介して、内在性 I G S 3 遺伝子または遺伝子対立遺伝子のヌクレオチド配列内に組み込み、そしてその機能を破壊する目的で設計する。導入遺伝子は、特定の細胞タイプ内に選択的に導入されてもよく、これによりその細胞タイプ内でのみ関係する内在性遺伝子を不活性化し、これは例えばグラの教示に従う（Gu, H. et al., Science 265: 103 - 106, 1996）。このような細胞タイプ特異性不活性化のために必要な調節配列は、関係する特定の細胞種に依存し、そして当該技術分野の熟練者には明らかであろう。

#### 【0073】

トランスジェニック動物が作製されると、組換え I G S 3 遺伝子およびタンパク質の発現を標準技術を用いてアッセイしてもよい。最初のスクリーニングは、導入遺伝子の組み込みが起きたかどうかをアッセイするために動物組織を分析するために、サザンブロット分析または P C R 技術により行ってもよい。トランスジェニック動物の組織内の I G S 3 導入遺伝子の m R N A 発現のレベルは、動物から得た組織試料のノーザンブロット分析、in situ ハイブリダイゼーション技術、および R T - P C R を含むがこれに限定はされない技術を用いて評価してもよい。標的遺伝子 - 発現組織の試料を、関係する標的遺伝子導入遺伝子産物に対して特異性の抗体特異性を用いて免疫細胞化学的に評価してもよい。容易に検出できるレベルで I G S 3 遺伝子 m R N A または I G S 3 導入遺伝子ペプチドを発現する I G S 3 トランスジェニック動物（標的遺伝子産物エピトープに対する抗体を用いて免疫細胞化学的に検出）を、次いでさらに、特徴的な I G S 3 に基づく障害症候群を示すこれらの動物を同定するために続いて評価してもよい。

#### 【0074】

I G S 3 トランスジェニック創始動物（すなわち、関係する細胞または組織内に I G S 3 タンパク質を発現し、そしてこれは好ましくは、I G S 3 に基づく障害の症候群を示す動物）が作製されると、特定の動物のコロニーを作製するためにこれらを育種、同系交配、異系交配、または交雑交配してもよい。このような育種戦略の例は、分離した株を確立するために 1 種を越える組み込み部位を有する創始動物の異系交配、それぞれの I G S 3 導入遺伝子の付加発現の効果のために高いレベルで関係する I G S 3 導入遺伝子が発現する複合 I G S 3 トランスジェニックを産生するための分離した株の同系交配、増加した発現および D N A 分析による動物のスクリーニングの考えられる必要性を除くために、与えられた組み込み部位に対して同型接合の動物を作製するための異型接合トランスジェニック動物の交雑、複合異型接合または同型接合株を作製するための別々の同型接合株の交雑、I G S 3 導入遺伝子の発現および I G S 3 様症候群の発生に対する対立遺伝子変性の効果を検討するための種々の同系交配遺伝子背景への動物の育種を含むがこれらの限定はされない。このような方法の一つは、I G S 3 関連障害様症候群、例えば上記のものを示す F 1 世代を作製するために、I G S 3 トランスジェニック創始動物と野生型株との交雑である。次いで、異型接合標的遺伝子トランスジェニック動物が生育可能である場合に、異型接合株を発生させるために F 1 世代を同型交配してもよい。

#### ワクチン

本発明の別の態様は、哺乳類内に免疫学的反応を誘導するための方法に関し、これは、哺乳類に I G S 3 ポリペプチドまたはその断片を、所要の場合には抗体および/または T 細胞免疫反応を発生するために適する R A M P ポリペプチドと一緒に投与（例えば接種）して、なかでも上記の「疾患」から該動物を保護することを含んでなる。

#### 【0075】

本発明のさらに別の態様は、哺乳類内に免疫学的反応を誘導するための方法に関し、これは該動物を疾患から保護するための抗体を産生する免疫学的反応を誘導するために、I G S 3 ポリペプチドを生体内での I G S 3 ポリヌクレオチドの発現を指令するベクターを介して供給することを含んでなる。

#### 【0076】

本発明の別の態様は、哺乳類宿主内に導入された場合に、IGS3ポリペプチドに対する哺乳類内の免疫学的反応を誘導する免疫学的ノワクチン調剤（組成物）に関し、ここでその組成物はIGS3ポリペプチドまたはIGS3遺伝子を含んでなる。このような免疫学的ノワクチン調剤（組成物）は、治療用の免疫学的ノワクチン調剤または予防用の免疫学的ノワクチン調剤のいずれかであってもよい。ワクチン調剤は、さらに適当なキャリアーを含んでなってもよい。IGS3ポリペプチドは胃内で分解されることがあるので、これは好ましくは非経口的に投与される（皮下、筋肉内、静脈内、皮内などの注射を含む）。非経口投与のために適する調剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および調剤をレシピエントの血液と等張性とするための溶質を含んでもよい水性および非水性滅菌注射液剤、および懸濁剤または増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液を含む。調剤は、単位投与または複数投与容器、例えば封をしたアンプルおよびバイアル内に存在してもよく、そして使用の直前に滅菌液体キャリアーを加えるだけでよい凍結乾燥状態で貯蔵してもよい。ワクチン調剤は、調剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系、例えば水中油系およびその他の当該技術分野では公知の系を含んでもよい。用量はワクチンの活性に依存しそして日常的な試験により容易に決定できる。

10

20

30

40

50

#### スクリーニングアッセイ

本発明のIGS3ポリペプチドは、受容体を結合しそして本発明の受容体ポリペプチドを活性化（アゴニスト）または活性化を阻害（アンタゴニスト）する化合物のためのスクリーニングプロセス中に使用してもよい。従って、本発明のポリペプチドは、小分子基質および例えば細胞、細胞を含まない調製物、化学ライブラリー、および天然産物混合物内のリガンドの結合を評価するために使用してもよい。これらの基質およびリガンドは、天然の基質およびリガンドであってもまたは構造的または機能的疑似体であってもよい。

#### 【0077】

IGS3ポリペプチドは、病理学を含む生物学的機能の原因となる。従って、一方ではIGS3を刺激し、そして他方ではIGS3の機能を阻害できる化合物および薬剤を発見することが望ましい。一般に、アゴニストは、なかでも上記の「疾患」のような病状のための治療および予防の目的に使用される。

#### 【0078】

アンタゴニストは、なかでも上記の「疾患」のような病状のための種々の治療および予防の目的に使用してもよい。

#### 【0079】

一般に、このようなスクリーニング手順は、本発明の受容体ポリペプチドをその表面に発現しそして、必須の場合にはその表面にRAM Pの同時発現をするために適する細胞の産生を含む。このような細胞は、哺乳類、酵母、ショウジョウバエまたは大腸菌からの細胞を含む。次いで、受容体を発現する細胞（または発現された受容体を含む細胞膜）を試験化合物と接触させ、結合、または機能性反応の刺激もしくは阻害を観察する。

#### 【0080】

一つのスクリーニング技術は、受容体活性化により起きる細胞外pH、細胞内pH、または細胞内カルシウム変化を測定する系内での本発明の受容体を発現する細胞（例えばトランスフェクションされたCHO細胞）の使用を含む。この技術において、化合物を本発明の受容体ポリペプチドを発現する細胞と接触させてもよい。第二メッセンジャー反応、例えばシグナル伝達、pH変化、またはカルシウムレベルの変化を次いで測定して、潜在的化合物が受容体を活性化または阻害するかどうかを決定する。

#### 【0081】

別の方法は、受容体-媒介シグナル、例えばcAMP蓄積および/またはアデニル酸シクラーゼ活性の調節を決定することによる受容体阻害剤に関するスクリーニングを含む。このような方法は、真核細胞を本発明の受容体を用いてトランスフェクションして細胞表面上に受容体を発現させることを含む。次いで、細胞を潜在的アンタゴニストの存在下で本発明の受容体に対するアゴニストに暴露する。潜在的アンタゴニストが受容体を結合しこれにより受容体結合を阻害する場合には、アゴニスト媒介シグナルが調節されるであろう

。

【0082】

本発明の受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを検出する別の方法は、米国特許（US）第5,482,835号に記載の酵母に基づく技術である。

【0083】

アッセイは、単なる候補化合物の試験結合でもよく、ここで受容体を有する細胞への接着は、候補化合物と直接または間接に結合した標識によるか、または標識競合物との競合を含むアッセイにより検出される。さらに、これらのアッセイは、候補化合物が受容体の活性化により発生するシグナルをもたらすかどうかを試験してもよく、これにはその表面に受容体を有する細胞に適する検出系を用いる。活性化の阻害剤は、一般に、既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物の存在によるアゴニストによる活性化に対する効果を観察される。

10

【0084】

さらに、アッセイは、混合物を形成するためにIGS3ポリペプチドを含む溶液と候補化合物とを混合し、混合物中のIGS3活性を測定し、そして混合物のIGS3活性を標準と比較する段階を単に含んでなってもよい。

【0085】

IGS3 cDNA、タンパク質およびタンパク質に対する抗体は、細胞内のIGS3 mRNAおよびタンパク質の産生に対する添加した化合物の効果を検出するためのアッセイを構成するために使用してもよい。例えば、ELISAは、当該技術分野に公知の標準方法によりモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてIGS3タンパク質の分泌または細胞関連レベルを測定するために構築されてもよく、そしてこれは適当に操作された細胞または組織からのIGS3の産生を阻害または促進するであろう薬剤（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる）を発見するために使用できる。スクリーニングアッセイを行うための標準方法は、当該技術分野では周知である。

20

【0086】

潜在的IGS3アンタゴニストの例は、抗体または、ある場合にはIGS3のリガンド、例えばリガンドの断片に密接に関係したオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、または受容体に結合するが反応は行わないで、受容体の活性を阻止する小分子を含む。

【0087】

従って、別の態様では、本発明は、

(a) IGS3ポリペプチド、好ましくは配列番号2のもの、

(b) IGS3ポリペプチド、好ましくは配列番号2のものを発現する組換え細胞、

(c) IGS3ポリペプチド、好ましくは配列番号2のものを発現する細胞膜、または

(d) IGS3ポリペプチド、好ましくは配列番号2のものに対する抗体

を含んでなる、IGS3ポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、またはIGS3ポリペプチドの産生を低下、増加および/または促進する化合物を同定するためのスクリーニングキットに関する。

30

【0088】

あらゆるこのようなキット内に、(a)、(b)、(c)または(d)は本質的な成分を含んでなってもよいことが認められる。

40

予防および治療方法

本発明は、IGS3活性の過剰および/または不十分な量の両方に関連する異常な状態を治療するための方法を提供する。

【0089】

IGS3の活性が過剰な場合には、数種の方法が利用できる。一つの方法は、以上に記載した阻害化合物（アンタゴニスト）を、薬剤的に許容できるキャリアーと一緒に、IGS3へのリガンドの結合を遮断することにより、またはRAMPポリペプチドまたは第二シグナルとの相互作用を阻害することにより活性化を阻害し、これにより異状状態を緩和するために有効な量を患者の投与することを含んでなる。

50

## 【0090】

他の方法では、内在性IGS3と競合してリガンドをまだ結合できるIGS3ポリペプチドの可溶性の形を投与してもよい。このような競合物の典型的な態様は、IGS3ポリペプチドの断片を含んでなる。

## 【0091】

さらに別の方法では、内在性IGS3をコードする遺伝子の発現は、発現遮断技術を用いて阻害できる。既知のこのような技術は、内部産生または別途に投与されるアンチセンス配列の使用を含む。例えばO'Conner, J. Neurochem. (1991) 56:560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Florida USA (1988) 参照。あるいは、遺伝子と三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給できる。例えばLee et al., Nucleic Acids Res. (1979) 6:3073; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Dervan et al., Science (1991) 251:1360 参照。これらのオリゴマーは、それ自体を投与できるかまたは関連するオリゴマーを生体内で発現できる。合成したアンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチドは、修飾された塩基または修飾された骨格を含んでなってもよい。後者の例は、メチルホスホナート、ホスホロチオアートまたはペプチド核酸骨格を含む。このような骨格は、ヌクレアーゼによる分解からの保護を与えるためにアンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチド内に組み込まれ、これは当該技術分野には周知である。これらまたはその他の修飾された骨格を用いる合成されたアンチセンスおよび三重らせん分子は、本発明の一部を形成する。

## 【0092】

さらに、IGS3ポリペプチドの発現は、IGS3 mRNA配列に特異性のリボザイムを用いて回避してもよい。リボザイムは、天然または合成であることができる触媒活性RNAである(例えばUsman et al., Curr. Opin. Struct. Biol. (1996) 6(4), 527-33 参照)。合成リボザイムは、選択された位置で特異的にIGS3 mRNAを開裂し、これによりIGS3 mRNAの機能性ポリペプチド内への翻訳を避けるように設計できる。リボザイムは天然リン酸リボース骨格および天然塩基、例えばRNA分子中に通常見いだされるものを用いて合成してもよい。あるいは、リボヌクレアーゼ分解からの保護を与えるように、リボザイムは非天然骨格、例えば2'-O-メチルRNAを用いて合成してもよくそして修飾塩基を含んでもよい。

## 【0093】

IGS3およびその活性の低い発現に関連する異常な状態を治療するために、種々の方法も利用できる。一つの方法は、IGS3を活性化する化合物、すなわち上記のようなアゴニストの治療的に有効な量を薬剤的に許容できるキャリアと一緒に患者に投与して、これにより異常な状態を緩和することを含んでなる。あるいは、患者内の関連細胞によるIGS3の内在的産生を行うために遺伝子治療を利用してよい。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上記に考察した複製欠失レトロウイルスベクター内の発現に関して操作してもよい。次いでレトロウイルス発現構築物を単離して、そして本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターを用いて形質導入したパッケージング細胞内に導入してもよく、これによりパッケージング細胞は関係する遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する。これらの産生体細胞は、生体内における細胞の操作および生体内におけるポリペプチドの発現のために患者に投与してもよい。遺伝子治療の概説については、Human Molecular Genetics, Strachan T. and Read A.P., BIOS Scientific Publishers, Ltd (1986) 中の第20章「遺伝子治療およびその他の分子遺伝子に基づく治療方法」(Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approac

hes) およびその中の引用文献を参照のこと。

【0094】

上記のあらゆる治療方法は、例えば哺乳類、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラビット、サル、および最も好ましくはヒトを含む、このような治療が必要なあらゆる患者に適用してもよい。

調剤および投与

ペプチド、例えばIGS3ポリペプチドの可溶性形、およびアゴニストおよびアンタゴニストペプチドまたは小分子は、適当な薬剤キャリアーと組み合わせて調剤してもよい。このような調剤は、治療的に有効な量のポリペプチドまたは化合物、および薬剤的に許容できるキャリアーまたは賦形剤を含んでなる。調剤は投与の形態に適合しなければならず、そして当該技術分野の熟練者の範囲内に十分に入る。本発明は、さらに、本発明の上記の組成物の1種またはそれ以上の成分を充填した1個またはそれ以上の容器を含んでなる薬剤包装物およびキットにも関する。

10

【0095】

本発明のポリペプチドおよびその他の化合物は、単独または他の化合物、例えば治療用化合物と一緒に使用してもよい。

【0096】

薬剤組成物の全身投与の好ましい形は、注射、典型的には静脈内注射を含む。他の注射経路、例えば皮下、筋肉内、または腹腔内が使用できる。全身投与の別の手段は、浸透剤、例えば胆汁酸塩またはフシジン酸またはその他の界面活性剤を用いる粘膜経路または経皮投与を含む。さらに、経口およびカプセル化調剤に適当に調剤された場合には、経口投与も可能であろう。

20

【0097】

所要の投与範囲は、ペプチドまたは化合物の選択、投与の経路、調剤の性質、患者の病状の性質、および担当医師の判断に依存する。適当な用量は、 $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$  (患者体重)の範囲内である。しかし、種々の使用化合物および投与の種々の経路の異なる効率を考慮して、所要用量の広範な変化も予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与よりも高い用量を必要とすると予想される。これらの用量レベルの変化は、最適化のための標準的な経験慣行を用いて調整でき、これは当該技術分野では良く理解されている。

30

【0098】

治療に使用されるペプチドは、上記のようにしばしば「遺伝子治療」と呼ばれる治療モダリティにおいて、患者内に内在的に生成させることもできる。従って、例えば、患者からの細胞は、ポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAを用いて生体外で、そして例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いてポリペプチドをコードするように操作してもよい。次いで細胞を患者内に導入する。

【0099】

以下の実施例は、本発明をさらに詳細に説明することのみを意図するものであり、従ってこれらの実施例は本発明をいかなる意味でも制限するとはみなされない。

【0100】

40

【実施例】

実施例1. 新規のG-タンパク質共役型受容体をコードするゲノムDNAのクローニング  
 実施例1a. 新規のG-タンパク質共役型受容体(GPCR)をコードするゲノム断片の  
 相同性PCRクローニング

PCRに基づく相同性クローニング戦略を、新規のG-タンパク質共役型受容体(GPCR)をコードする部分ゲノムDNA配列を単離するために使用した。前進(F20)および後退(R42、R43)縮重PCRプライマーを、ニューロテンシン受容体遺伝子ファミリー(Vita N. et al. [1993] Febs Lett. 317, 139-142; Vita N. et al. [1998] Eur. J. Pharmacol. 360, 265-272)の保存領域内で、細胞内ループ1(I1)と膜貫通

50

ドメイン2 (TM2) との境界および膜貫通ドメイン3 と細胞内ループ2 の間の境界 (TM3 / I2) においてそれぞれ設計した。

F20 (I1 / TM2) :

5' - CTGCACTACCACTGCTC (AまたはT) (GまたはC) (A, C, GまたはT) (CまたはT) T (A, C, GまたはT) GC - 3'

(配列番号3)

R42 (TM3 / I2) :

5' - GGGTGGCAGATGGCCA (AまたはG) (AまたはG) (CまたはT) A (A, C, GまたはT) C (GまたはT) (CまたはT) TC (Cまたはイノシン) (C, GまたはT) (配列番号4)

R43 (TM3 / I2) :

5' - GTGGCAGATGGCCAGGCAGCG (AまたはG) TC (A, C, GまたはT) (AまたはG) C (AまたはG) CT (A, GまたはT) - 3'

(配列番号5)

ニューロテンシン受容体ファミリーの既知のメンバーの増幅を抑制するために、プライマーR42およびR43の3'最終ヌクレオチド位置を、ヒトNTR1 cDNAの相当する位置(R42)またはNTR1およびNTR2 cDNAの両方の相当する位置(R43)にいずれかに相補的とならないように選択した。

【0101】

一次PCR反応は、体積60  $\mu$ l 中で行いそして100 ng ヒトゲノムDNA (Clontech)、6  $\mu$ l ジーンアンプ<sup>TM</sup> (GeneAmp) 10x PCR緩衝液II (100 mM Tris-HCl pH8.3; 500 mM KCl、Perkin Elmer)、3.6  $\mu$ l 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.36  $\mu$ l dNTP類(それぞれのdNTPの25 mM)、1.5単位 AmpliTaq-Gold<sup>TM</sup> ポリメラーゼ (Perkin Elmer) および縮重前進 (F20) および後退プライマー (R42) それぞれ30ピコモルを含んでいた。反応管を95 °Cで10分間加熱し、次いで変性(95 °C、1分間)、アニーリング(55 °C、2分間) および伸展(72 °C、3分間)の35サイクルを行った。最後に反応管を10分間、72 °Cで加熱した。

【0102】

半-ネスト(semi-nested) PCR反応のために、一次PCR反応物の1/50希釈物の1  $\mu$ lを、それぞれ縮重前進および後退プライマーF20およびR43を用いる鑄型として用いた。半-ネストPCR反応は、一次PCR反応と同じ条件下で行った。

【0103】

半-ネストPCR反応産物をアガロースゲル上でサイズ分別し、そして臭化エチジウムを用いて染色した。±220 bpの断片が同定され、これをQiaex-II<sup>TM</sup> 精製キット(Qiagen)を用いてゲルから精製しそして供給者(pGEM-Tキット、Promega)の推奨する方法に従ってpGEM-Tプラスミド中に連結した。このようにして作製した組換えプラスミドを適合する大腸菌(E. coli) SURE<sup>TM</sup> 2細菌(Stratagene)を形質転換するために使用した。形質転換した細胞を、アンピシリン(100  $\mu$ g/ml)を含むLBアガープレート上にプレATINGした。プラスミドDNAを、Qiagen-tip 20 miniprepキット(Qiagen)を用いて個別コロニーのミニ培養物から精製した。DNA配列決定反応は、ABI Prism<sup>TM</sup> BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット(PE-ABI)を用い、挿入-近接を用いて精製したプラスミドDNA上で行った。配列決定反応産物をEtOH/NaOAc沈降を用いて精製し、そしてABI377自動化配列決定装置で分析した。

【0104】

公開ドメイン配列データバンク(Blastn; Altschul S.F. et al. [1997], Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)

に対するクローン HNT 1370 の挿入配列のコンピューター支援相同性サーチは、これが GPCR ファミリーの新規のメンバー（の一部）をコードすることの強い徴候を明らかにした。HNT 1370 は ±220 bp 断片からクローニングされたけれども、クローン人工操作の結果挿入サイズは ±130 bp に過ぎなかった。我々はこの新規の GPCR を IGS3 と呼ぶ。

【0105】

【表3】

表3：使用したオリゴプライマーの概要

配列番号: 3	F20: 5'-CTGCACTACCACGTGCTC(AまたはT)(GまたはC)(A,C,GまたはT)(CまたはT)T(A,C,GまたはT)GC -3'
配列番号: 4	R42: 5'-GGGTGGCAGATGGCCA(AまたはG)(AまたはG)(CまたはT)A(A,C,GまたはT)C(GまたはT)(CまたはT)TC(CまたはI/S)(C,GまたはT)
配列番号: 5	R43: 5'-GTGGCAGATGGCCAGGCAGCG(AまたはG)TC(A,C,GまたはT)(AまたはG)C(AまたはG)CT(A,GまたはT) -3'
配列番号: 6	IP11969: 5'GGGGCCGACTTCCTCTCCTCTGCTTCC-3'
配列番号: 7	IP12008: 5'-GCAAGGTAGGCACAGGTCATCACAGTGG-3'
配列番号: 8	IP12936: 5'-ATAAGCTTCTCCCTGGCCCTTAATAAATGAC-3'
配列番号: 9	IP12937: 5'-AGGAATTCAGACAGACAGGGGCAAAGTTG-3'

10

20

【0106】

実施例 1b . 完全 IGS3 コーディング配列を含むゲノム DNA 断片のクローニング IGS3 の完全コーディング配列は、ヒトゲノムライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを介して得た。ラムダ EMBL3 SP6/T7 フェージベクター中で構築されたヒトゲノム DNA ライブラリー (Clontech #HL1067) を、IGS3 特異性プローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。このプローブは、HNT 1355 プラスミド (これは HNT 1370 と同じ挿入物を含んでいた) から IGS3 特異性プライマー IP11969 (配列番号 6) および IP12008 (配列番号 7) を用いて増幅した 130 bp PCR 断片から誘導した (図 1)。130 bp 断片をゲルから Qiaex IIT<sup>M</sup> 精製キット (Qiagen) を用いて精製し、そして [-<sup>32</sup>P] dCTP のランダムプライム組込み (Random primed incorporation) を介して、比放射能 > 10<sup>9</sup> cpm/μg まで、プライムイット (Prime-It) II キット (Stratagene) を用い、供給者から提供された指針に従って放射能標識した。Clontech のラムダライブラリー・ユーザーマニュアル (PT1010-1) に従って、130 bp プローブを用いて約 550,000 個のプラークがスクリーニングされた。3 個の陽性クローン (-IGS3.1、-IGS3.3 および -IGS3.5) がプラーク精製されそしてマニアティスら (Maniatis et al., (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition [1989], CSH Laboratory Press)) による記載のようにして小規模液体培養物から組換えフェージ DNA が作製された。

30

40

【0107】

IGS3 特異性プライマーを用いる組換えフェージ DNA の配列分析は、3 個すべてのラムダクローンの挿入物が、330 アミノ酸の新規の推定 (イントロンを含まない) GPCR をコードする長いオープンリーディングフレームを含んでいた (翻訳の前提とする開始にはインフレーム終止コドンが前置された)。IGS3 コーディング配列を PCR 増幅の後にプラスミドベクター内にサブクローンした。PCR 反応は、エクスパンド<sup>T<sup>M</sup></sup> (Ex

50

pand) ハイフィデリティーPCRシステム (Boehringer) を用いて IP 12936 (配列番号8) および IP 12937 (配列番号9) オリゴヌクレオチドプライマーを用い、単離された -IGS3.1、-IGS3.3 および -IGS3.5 ファージDNA (500 ng) 上で行った。PCR反応管を95 に2分間加熱し、次いで変性(95、30秒間)、アニーリング(58、30秒間) および伸展(72、1分間) の35サイクルを行った。最後に最終伸展工程を10分間、72で行った。±1, 200BP PCR産物をゲルから精製しそしてpGEM-Tベクター内に連結した。次いで組換えDNAを大腸菌株DH5 F'を形質転換するために使用した。これから細菌クローンHB4971、HB4972(両方共に-IGS3.1からサブクローンされたもの)、HB4973 およびHB4974(両方共に-IGS3.3からサブクローンされたもの) およびHB4975 およびHB4976(両方共に-IGS3.5からサブクローンされたもの) が得られた。すべてのプラスミドクローンの挿入物を完全に配列決定した。すべての配列データを混成(meld)させると、共通配列が生まれ、これは推定新規GPCR受容体(IGS3)をコードする330アミノ酸の長いオープンリーディングフレームの存在を確認した(図1)。IGS3の共通cDNAおよびタンパク質配列をそれぞれIGS3DNA(配列番号1) およびIGS3PROT(配列番号2) として本明細書に記載する。IGS3DNA配列を用いるDNAデータバンクの相同性サーチは、1個のEST配列(受入(accession) 番号AF003828号)を示し、これは3'末端でIGS3DNAと部分的に重複する(図1)。

10

**【0108】**

プラスミドHNT4971(IGS3DNA配列を含む)を内包する細菌株を、100µgアンピシリン/mlを含むLBアガープレート上に再プレーティングした後に再クローニングしそしてインノゲネティクス(Innogenetics) N.V.株表(ICCG4319) および"Centraalbureau voor Schimmelculturen (CBS)" (Baarn、オランダ国、受入番号第102196号)の両方に寄託した。プラスミドDNAは、再クローニングした単離物から調製しそして挿入物を配列決定しそしてIGS3DNA配列と同一であることを見いだした。

20

**【0109】****【表4】**

PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 15.09.2000 04:00:52 PM

0-1	Form - PCT/RO/134 (EASY) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	SPW99.07
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	33
1-2	line	3>
1-3	Identification of Deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	Centraalbureau voor Schimmelcultures
1-3-2	Address of depositary institution	Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherlands
1-3-3	Date of deposit	15 September 1999 (15.09.1999)
1-3-4	Accession Number	CBS 102196
1-4	Additional Indications	NONE
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designated States
1-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	NONE
FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY		
0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	
FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY		
0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

10

20

30

【 0 1 1 0 】

【 表 5 】

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

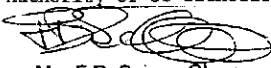
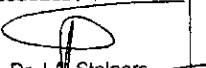
INTERNATIONAL FORM

Duphar International Research B.V.  
Postbus 900  
1380 DA WEESP  
The Netherlands

*name and address of depositor*

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

10

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: E. coli DH5 alpha F' pGEM-TnIGS3 ICCG 4319	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 102196
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation <i>(mark with a cross where applicable)</i>	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 15-09-99 (date dd-mm-yy of the original deposit) 1	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on not applicable (date dd-mm-yy of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on not applicable (date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures  Address: Oosterstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):   Mrs F.B. Snippe-Claus      Dr J.A. Stalpers Date (dd-mm-yy): 17-09-99 <i>p.o. R.A. Form</i>

20

30

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

【 0 1 1 1 】

【 表 6 】

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

INTERNATIONAL FORM

Duphar International Research B.V.  
 Postbus 900  
 1380 DA WEESP  
 The Netherlands

*name and address of the party to whom the  
 viability statement is issued*

VIABILITY STATEMENT  
 issued pursuant to Rule 10.2 by the  
 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
 identified on the following page

10

<b>I. DEPOSITOR</b>	<b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>
Name: Duphar International Research B.V.  Address: Postbus 900 1380 DA WEESP The Netherlands	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  CBS 102196  Date (dd-mm-yy) of the deposit or of the transfer: 1 15-09-99
<b>III. VIABILITY STATEMENT</b>	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 17-09-99 <sup>2</sup> . On that date (dd-mm-yy), the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable	

20

<sup>1</sup> Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

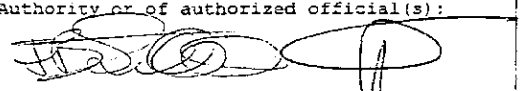
<sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

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

30

【 0 1 1 2 】

【 表 7 】

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED <span style="float: right;">4</span>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures  Address: Costersstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Snippe-Claus      Dr. A. Stappers Date (dd-mm-yy): 17-09-99      P.O. P. Asamson

10

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

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

共通 I G S 3 c D N A 配列を生成するために単離された種々の D N A クローンの相対位置の図示。H N T 1 3 7 0 は、「創始 ( f o u n d i n g ) 」ゲノムクローンを表す。  
 - I G S 3 . 1 A、Bなどは、ラムダクローン I G S 3 . 1 からの D N A の配列分析から得られた別々の (ほとんど) 重複した配列コンティグを示す。本文書中に記載した P C R プライマーは、( I P # ) で示す。C O N S E N S U S は、すべての得られた配列を混成 ( m e r g e ) した後に得られたコンティグを示す。少なくとも3個の独立したクローンの配列分析により完全に確認された C O N S E N S U S コンティグの部分は、I G S 3 D N A により表される (配列番号 1)。I G S 3 D N A 中に存在する 3 3 0 アミノ酸長さのオープンリーディングフレームは、「\* \*」で示す。E S T A F 0 0 3 8 2 8 の位置は「= =」で示す。

30

## 【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  
22 March 2004 (22.03.2004)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/19983 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/72, 16/28, C12Q 1/68, C12N 15/11, 5/10, 1/19, G01N 33/50, 33/566, A61K 48/00, 31/70, 31/60, A01K 67/027
- (52) International Application Number: PCT/EP00069116
- (22) International Filing Date: 15 September 2000 (15.09.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
95203014 8 16 September 1999 (16.09.1999) EP  
1013062 16 September 1999 (16.09.1999) NL
- (71) Applicant (for all designated States except US): SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V. [NL/NL]; C.J. Van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): DELEERSNIJDER, Willy [BE/BE]; C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL); NYS, Guy [BE/BE]; C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL); D'HEUVAERT, Nicole
- (74) Agent: VERHAGT, Marinus; Octrooibureau Zaan B.V., P.O. Box 140, NL-1381 CP Weesp (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— With international search 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 01/19983 A1

(54) Title: HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR

(57) Abstract: The present invention relates to the IG53 G-protein coupled receptor family, and to polynucleotides encoding said IG53 proteins. The invention also relates to inhibiting or activating the action of such polynucleotides and polypeptides, to a vector containing said polynucleotides, a host cell containing such vector and non-human transgenic animals where the IG53-gene is either overexpressed, misexpressed, underexpressed or suppressed (knock-out animals). The invention further relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor family IG53 and the use of IG53 polypeptides and polynucleotides and agonists or antagonists to the IG53 receptor family in the treatment of a broad range of disorders and diagnostic assays for such conditions.

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

## human G-protein coupled receptor

## Description

5 The present invention relates to novel identified polynucleotides, polypeptides encoded by them and to the use of such polynucleotides and polypeptides, and to their production. More particularly, the polynucleotides and polypeptides of the present invention relate to a G-protein coupled receptor (GPCR), hereinafter referred to as IGS3. The invention also relates to inhibiting or activating the action of such polynucleotides and polypeptides, to a vector containing said  
10 polynucleotides, a host cell containing such vector and transgenic animals where the IGS3-gene is either overexpressed, misexpressed, underexpressed and/or suppressed (knock-out animals). The invention further relates to a method for screening compounds capable to act as an agonist or an antagonist of said G-protein coupled receptor IGS3.

## 15 BACKGROUND OF THE INVENTION

It is well established that many medically significant biological processes are mediated by proteins participating in signal transduction pathways that involve G-proteins and/or second messengers; e.g., cAMP (Lefkowitz, *Nature*, 1991, 351:353-354). Herein these proteins are  
20 referred to as proteins participating in pathways with G-proteins. Some examples of these proteins include the GPC receptors, such as those for adrenergic agents and dopamine (Kobilka, B.K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K., et al., *Science*, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R., et al., *Nature*, 1988, 336:783-787), G-proteins themselves, effector proteins, e.g., phospholipase C, adenylyate cyclase, and phosphodiesterase, and  
25 actuator proteins, e.g., protein kinase A and protein kinase C (Simon, M.I., et al., *Science*, 1991, 252:802-8).

For example, in one form of signal transduction, upon hormone binding to a GPCR the receptor interacts with the heterotrimeric G-protein and induces the dissociation of GDP from the  
30 guanine nucleotide-binding site. At normal cellular concentrations of guanine nucleotides, GTP fills the site immediately. Binding of GTP to the  $\alpha$  subunit of the G-protein causes the dissociation of the G-protein from the receptor and the dissociation of the G-protein into  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits. The GTP-carrying form then binds to activated adenylyate cyclase. Hydrolysis of GTP to GDP, catalyzed by the G-protein itself ( $\alpha$  subunit possesses an intrinsic GTPase activity),  
35 returns the G-protein to its basal, inactive form. The GTPase activity of the  $\alpha$  subunit is, in essence, an internal clock that controls an on/off switch. The GDP bound form of the  $\alpha$  subunit has high affinity for  $\beta\gamma$  and subsequent reassociation of  $\alpha$ GDP with  $\beta\gamma$  returns the system to the

CONFIRMATION COPY

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

2

basal state. Thus the G-protein serves a dual role, as an intermediate that relays the signal from receptor to effector (in this example adenylyl cyclase), and as a clock that controls the duration of the signal.

5 The membrane bound superfamily of G-protein coupled receptors has been characterized as having seven putative transmembrane domains. The domains are believed to represent transmembrane  $\alpha$ -helices connected by extracellular or cytoplasmic loops. G-protein coupled receptors include a wide range of biologically active receptors, such as hormone, viral, growth factor and neuroreceptors.

10

The G-protein coupled receptor family includes dopamine receptors which bind to neuroleptic drugs used for treating CNS disorders. Other examples of members of this family include, but are not limited to calcitonin, adrenergic, neuropeptide Y, somatostatin, neurotensin, neurokinin, capsaicin, VIP, CGRP, CRF, CCK, bradykinin, galanin, motilin, nociceptin, endothelin, cAMP, adenosine, muscarinic, acetylcholine, serotonin, histamine, thrombin, kinin, follicle stimulating hormone, opsin, endothelial differentiation gene-1, rhodopsin, odorant, and cytomegalovirus receptors.

15 Most G-protein coupled receptors have single conserved cysteine residues in each of the first two extracellular loops which form disulfide bonds that are believed to stabilize functional protein structures. The 7 transmembrane regions are designated as TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 and TM7. The cytoplasmic loop which connects TM5 and TM6 may be a major component of the G-protein binding domain.

20 Most G-protein coupled receptors contain potential phosphorylation sites within the third cytoplasmic loop and/or the carboxy terminus. For several G-protein coupled receptors, such as the  $\beta$ -adrenoreceptor, phosphorylation by protein kinase A and/or specific receptor kinases mediates receptor desensitization.

25 Recently, it was discovered that certain GPCRs, like the calcitonin-receptor like receptor, might interact with small single pass membrane proteins called receptor activity modifying proteins (RAMPs). This interaction of the GPCR with a certain RAMP is determining which natural ligands have relevant affinity for the GPCR-RAMP combination and regulate the functional signaling activity of the complex (McLethie, L.M. et al., *Nature* (1998) 393:333-339).

30  
35

WO 01/19983

3

PCT/EP00/09116

For some receptors, the ligand binding sites of G-protein coupled receptors are believed to comprise hydrophilic sockets formed by several G-protein coupled receptor transmembrane domains, said sockets being surrounded by hydrophobic residues of the G-protein coupled receptors. The hydrophilic side of each G-protein coupled receptor transmembrane helix is postulated to face inward and form a polar ligand-binding site. TM3 has been implicated in several G-protein coupled receptors as having a ligand-binding site, such as the TM3 aspartate residue. TM5 serines, a TM6 asparagine and TM6 or TM7 phenylalanines or tyrosines are also implicated in ligand binding.

G-protein coupled receptors can be intracellularly coupled by heterotrimeric G-proteins to various intracellular enzymes, ion channels and transporters (see, Johnson et al., *Endoc. Rev.*, 1989, 10:317-331). Different G-protein  $\alpha$ -subunits preferentially stimulate particular effectors to modulate various biological functions in a cell. Phosphorylation of cytoplasmic residues of G-protein coupled receptors has been identified as an important mechanism for the regulation of G-protein coupling of some G-protein coupled receptors. G-protein coupled receptors are found in numerous sites within a mammalian host.

Receptors - primarily the GPCR class - have led to more than half of the currently known drugs (Drews, *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1516). This indicates that these receptors have an established, proven history as therapeutic targets. The new IGS3 GPCR described in this invention clearly satisfies a need in the art for identification and characterization of further receptors that can play a role in diagnosing, preventing, ameliorating or correcting dysfunctions, disorders, or diseases, hereafter generally referred to as "the Diseases". The Diseases include, but are not limited to, psychiatric and CNS disorders, including schizophrenia, episodic paroxysmal anxiety (EPA) disorders such as obsessive compulsive disorder (OCD), post traumatic stress disorder (PTSD), phobia and panic, major depressive disorder, bipolar disorder, Parkinson's disease, general anxiety disorder, autism, delirium, multiple sclerosis, Alzheimer disease/dementia and other neurodegenerative diseases, severe mental retardation, dyskinesias, Huntington's disease, Tourette's syndrome, tics, tremor, dystonia, spasms, anorexia, bulimia, stroke, addiction/dependency/craving, sleep disorder, epilepsy, migraine, attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD); cardiovascular diseases, including heart failure, angina pectoris, arrhythmias, myocardial infarction, cardiac hypertrophy, hypotension, hypertension - e.g. essential hypertension, renal hypertension, or pulmonary hypertension, thrombosis, arteriosclerosis, cerebral vasospasm, subarachnoid hemorrhage, cerebral ischemia, cerebral infarction, peripheral vascular disease, Raynaud's disease, kidney disease - e.g. renal failure; dyslipidemias; obesity; emesis; gastrointestinal disorders, including irritable bowel syndrome (IBS), inflammatory bowel disease (IBD), gastroesophageal reflux disease (GERD), motility

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

4

disorders and conditions of delayed gastric emptying, such as post operative or diabetic gastroparesis, and diabetes, ulcers – e.g. gastric ulcer; diarrhoea; other diseases including osteoporosis; inflammations; infections such as bacterial, fungal, protozoan and viral infections, particularly infections caused by HIV-1 or HIV-2; pain; cancers; chemotherapy induced injury;

5 tumor invasion; immune disorders; urinary retention; asthma; allergies; arthritis; benign prostatic hypertrophy; endotoxin shock; sepsis; complication of diabetes mellitus; and gynaecological disorders.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

10

In one aspect, the invention relates to IGS3 polypeptides, polynucleotides and recombinant materials and methods for their production. Another aspect of the invention relates to methods for using such IGS3 polypeptides, polynucleotides and recombinant materials. Such uses include, but are not limited to, use as a therapeutic target and for treatment of one of the

15 Diseases as mentioned above.

In still another aspect, the invention relates to methods to identify agonists and antagonists using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with IGS3 imbalance with the identified compounds. Yet another aspect of the invention relates to

20 diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate IGS3 activity or levels. A further aspect of the invention relates to animal-based systems which act as models for disorders arising from aberrant expression or activity of IGS3.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

25

Figure 1. Schematic representation of the relative positions of the different DNA clones that were isolated to generate the consensus IGS3 cDNA sequence. HNT1370 represents the "founding" genomic clone.  $\lambda$ -IGS3.1A,B etc. indicate separate (nearly) overlapping sequence contigs obtained from sequence analysis of DNA from lambda clone IGS3.1. PCR primers that

30 have been described in this document are indicated (IP#). CONSENSUS denotes the contig that was obtained after merging all obtained sequences. The part of the CONSENSUS contig that was fully validated by sequence analysis of at least three independent clones is represented by IGS3DNA (SEQ ID NO: 1). The 330 amino acids long open reading frame present in IGS3DNA is indicated with "=". The position of EST AF003828 is indicated with "==".

35

Table 1: IGS3-DNA of SEQ ID NO: 1

```
5' -  
TTAATCTCTTCAAGCCCTCGATTTCCCTCCCTGTA AAAACAGGGGCGGTAATTACCCATA  
5 ACATGCTGCTCATCAAAAATCAGTGAACATGCCAGCAGGTCTCAAGTCTTGTTTTGTTC  
CAGGGGCACCACTGGAGGTTTCTGAGCATGGATCCAAACCCCGGCTGGGAACAGA  
AAGTACAAACAGTGAATGGAAATGACCAAGCCCTTCTTCTGCTTGTGGCAAGSAGACCCCT  
GATCCCGGTCTTCCCTGATCCCTTTCATTGCCCTGGTCGGGCTGGTAGGAACGGGTTTGT  
10 GCTCTGGCTCCCTGGSCCTTCCGCATGCCAGGACGGCTTCTCTGTCTACGCTCTCAGCCCT  
GGCCGGGCCGACTTCCCTCTTCTCTGCTTCCAGATATAAATTGCCCTGGTATAGCTCAG  
TAACCTCTTCTGTTCCATCTCCATCAACTTCCCTAGCTTCTTCCACCACTGTGATGACCTG  
TCCCTACCTTCCAGGCCCTGAGCATGCTGAGCACCCCTCAGCACCGAGCGCTGCCCTGTCCGT  
CCTGTGGCCACTCTGGTACGCTGCCGCCGCCCCAGACACTGTACGGCTGCTGTGTGT  
CCTGCTCTGGGCCCTGTCCCTACTGCTGAGCATCTTGGAAAGGAAGTCTGTGGCTTCTT  
15 ATTTAGTGATGGTGACTCTGCTTGGTGTGACAGACATTTGATTTCACTCAACCCCTGGCT  
GACTTTTATTATGATGTTCTCTGTGGTCCAGTCTGGCCCTGCTGGTCAGGATCCCTCTG  
TGGCTCCAGGGGTCTGCCACTGACCAAGCTGTACCTGACCATCCTGCTCACAGTGTGGT  
GTCCCTCCTCTGGGGCCCTGCCCTTGGCATTCAGTGGTCCCTAATATTATGGATCTGGAA  
GGATTCTGATGCTTATTTTGTATATTCACTCAGTTTCAGTTGCTCTGTATCTCTTAA  
20 CAGCAGTCCCAAGCCCATCATTAATTTCTTGGTGGCTCTTTAGGAAGCAGTGGCCGCT  
GCAGCAGCCGATCTCTCAAGCTGGCTTCCAGAGGGCTCTGCAGGACATTGCTGAGGTGGA  
TCACACTCAAGCATGCTTCCCTCAGGGCACCCCGGAGATGTCGAGAGCAGTCTGGTGA  
GAGATGGACACCCTCTACTCCATCAGATATATGTG 3'
```

WO 01/19983

6

PCT/EP00/09116

Table 2: IGS3-protein of SEQ ID NO: 2

5 MDPTTPAWGTESTTVNGNDQALLLGGKETLIPVFLILFIALVGLVSNQFVLRLLGFRMR  
RNAFSVYVLSACADEFLFCFLINCLVYLSNPFCSISINFPSPFPTVMTCAYLAQLSML  
STVSTERCLSVLSPYVRCRRFRHLSAIVCVLLWALSLLSLLGKFCGFLFSDGQSGWC  
QTFDFITAAMLIYFLFWLCCSSLALLVRIICSSRGLPRLYLITLLTVLWFLCGLFPG  
IQWFLILWINKSDVLFCHINPVSVLSLNSANPIIYFVGSFRKQRLDQPLKLA;  
QRALQDIAEVDHSEGCFRQCTPEMERSSLV

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

7

**DESCRIPTION OF THE INVENTION**

Structural and chemical similarity, in the context of sequences and motifs, exists among the IGS3 GPCR of the invention and other human GPCR's. Therefore, IGS3 is implied to play a  
5 role among other things in the Diseases mentioned above.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein  
10 can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All publications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

**15 Definitions**

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

20 "IGS3" refers, among others, to a polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, or a Variant thereof.

"Receptor Activity" or "Biological Activity of the Receptor" refers to the metabolic or physiologic function of said IGS3 including similar activities or improved activities or these  
25 activities with decreased undesirable side effects. Also included are antigenic and immunogenic activities of said IGS3.

"IGS3-gene" refers to a polynucleotide comprising the nucleotide sequence set forth in  
30 SEQ ID NO:1 or Variants thereof and/or their complements.

"Antibodies" as used herein includes polyclonal and monoclonal antibodies, chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, including the products of a Fab or other immunoglobulin expression library.

35 "Isolated" means altered "by the hand of man" from the natural state and/or separated from the natural environment. Thus, if an "isolated" composition or substance that occurs in nature has been "isolated", it has been changed or removed from its original environment, or

WO 01/19983

8

PCT/EP00/09116

both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living animal is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein.

5 "Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. "Polynucleotides" include, without limitation single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-  
10 stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" may also include triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term polynucleotide also includes DNAs or RNAs containing one or more modified bases and DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as  
15 inosine. A variety of modifications has been made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often referred to as oligonucleotides.

20 "Polypeptide" refers to any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. "Polypeptide" refers to short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins, and/or to combinations thereof. Polypeptides  
25 may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. "Polypeptides" include amino acid sequences modified either by natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well-described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in voluminous research literature. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the  
30 peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result  
35 from posttranslation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

9

derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phospholipid, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. See, for instance, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182:626-646 and Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663:48-62.

15 "Variant" as the term is used herein, is a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide respectively, but retains essential properties such as essential biological, structural, regulatory or biochemical properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, and deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

"Identity" is a measure of the identity of nucleotide sequences or amino acid sequences. In general, the sequences are aligned so that the highest order match is obtained. "Identity" per se has an art-recognized meaning and can be calculated using published techniques. See, e.g.: (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D.W., ed.; Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART 1,

Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). While there exist a number of methods to measure identity between two polynucleotide or polypeptide sequences, the term "identity" is well known to skilled artisans (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073). Methods commonly employed to determine identity or similarity between two sequences include, but are not limited to, those disclosed in Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073. Methods to determine identity and similarity are codified in computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, GCG program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F. et al. J. Molec. Biol. (1990) 215:403). The word "homology" may substitute for the words "identity".

As an illustration, by a polynucleotide having a nucleotide sequence having at least, for example, 95% "identity" to a reference nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 is intended that the nucleotide sequence of the polynucleotide is identical to the reference sequence except that the polynucleotide sequence may include up to five nucleotide differences per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1. In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to any 5% of the nucleotides in the reference sequence may be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to any 5% of the total nucleotides in the reference sequence may be inserted into the reference sequence, or in a number of nucleotides of up to any 5% of the total nucleotides in the reference sequence there may be a combination of deletion, insertion and substitution. These mutations of the reference sequence may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

Similarly, by a polypeptide having an amino acid sequence having at least, for example, 95% "identity" to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is intended that the amino acid sequence of the polypeptide is identical to the reference sequence except that the polypeptide sequence may include up to five amino acid alterations per each 100 amino acids of the reference amino acid of SEQ ID NO: 2. In other words, to obtain a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a reference amino acid sequence, up to any 5% of the amino acid residues in the reference sequence may be deleted or substituted with another

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

11

amino acid, or a number of amino acids up to any 5% of the total amino acid residues in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either  
5 individually among residues in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

#### Polypeptides of the Invention

10 In one aspect, the present invention relates to IGS3 polypeptides (including IGS3 proteins). The IGS3 polypeptides include the polypeptide of SEQ ID NO:2 and the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS  
15 102196, deposited on September 15, 1999 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands); as well as polypeptides comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn  
20 (The Netherlands), and polypeptides comprising an amino acid sequence having at least 80% identity to that of SEQ ID NO:2 and/or to the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands) over its entire length, and still more preferably at  
25 least 90% identity, and even still more preferably at least 95% identity to said amino acid sequence. Furthermore, those with at least 97%, in particular at least 99%, are highly preferred. Also included within IGS3 polypeptides are polypeptides having the amino acid sequence which has at least 80% identity to the polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or  
30 the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands) over its entire length, and still more preferably at least 90% identity, and even still more preferably at least 95% identity to SEQ ID NO: 2. Furthermore, those with at least 97%, in particular at least 99% are highly preferred. Preferably IGS3 polypeptides exhibit at least one biological activity of the receptor.

In an additional embodiment of the invention, the IGS3 polypeptides may be a part of a larger protein such as a fusion protein. It is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences which  
35 aid in purification such as multiple histidine residues, sequences which aid in detection such as antigenic peptide tags (such as the haemagglutinin (HA) tag), or an additional sequence for stability during recombinant production.

Fragments of the IGS3 polypeptides are also included in the invention. A fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that is the same as part of, but not all of, the amino acid sequence of the aforementioned IGS3 polypeptides. As with IGS3 polypeptides, fragments may be "free-standing," or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single continuous region. Representative examples of polypeptide fragments of the invention, include, for example, fragments from about amino acid number 1-20; 21-40, 41-60, 61-80, 81-100; and 101 to the end of IGS3 polypeptide. In this context "about" includes the particularly recited ranges larger or smaller by several, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid at either extreme or at both extremes.

Preferred fragments include, for example, truncation polypeptides having the amino acid sequence of IGS3 polypeptides, except for deletion of a continuous series of residues that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Also preferred are fragments characterized by structural or functional attributes such as fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions, beta-sheet and beta-sheet-forming regions, turn and turn-forming regions, coil and coil-forming regions, hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions, substrate binding region, and high antigenic index regions. Other preferred fragments are biologically active fragments. Biologically active fragments are those that mediate receptor activity, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also included are those that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human.

Thus, the polypeptides of the invention include polypeptides having an amino acid sequence that is at least 80% identical to either that of SEQ ID NO:2 and/or the polypeptide having the amino acid sequence encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands), or fragments thereof with at least 80% identity to the corresponding fragment. Preferably, all of these polypeptide fragments retain the biological activity of the receptor, including antigenic activity. Variants of the defined sequence and fragments also form part of the present invention. Preferred variants are those that vary from the referents by conservative amino acid substitutions -- i.e., those that substitute a residue with another of like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

13

aromatic residues Phe and Tyr. Particularly preferred are variants in which several, 5-10, 1-5, or 1-2 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination.

5 The IGS3 polypeptides of the invention can be prepared in any suitable manner. Such polypeptides include isolated naturally occurring polypeptides, recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods. Methods for preparing such polypeptides are well known in the art.

#### Polynucleotides of the Invention

10

A further aspect of the invention relates to IGS3 polynucleotides. IGS3 polynucleotides include isolated polynucleotides which encode the IGS3 polypeptides and fragments, and polynucleotides closely related thereto. More specifically, the IGS3 polynucleotide of the invention includes a polynucleotide comprising the nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1, such as the one capable of encoding a IGS3 polypeptide of SEQ ID NO: 2, polynucleotides having the particular sequence of SEQ ID NO: 1 and polynucleotides which essentially correspond to the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands).

20

IGS3 polynucleotides further include polynucleotides comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity over its entire length to a nucleotide sequence encoding the IGS3 polypeptide of SEQ ID NO:2, polynucleotides comprising a nucleotide sequence that is at least 80% identical to that of SEQ ID NO:1 over its entire length and a polynucleotide which essentially corresponds to the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands).

25

In this regard, polynucleotides with at least 90% identity are particularly preferred, and those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred and those with at least 98-99% are most highly preferred, with at least 99% being the most preferred. Also included under IGS3 polynucleotides are a nucleotide sequence which has sufficient identity to a nucleotide sequence contained in SEQ ID NO: 1 or to the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands) to hybridize under conditions useable for amplification or for use as a probe or marker. The invention also provides polynucleotides which are complementary to such IGS3 polynucleotides.

30

35

IGS3 of the invention is structurally related to other proteins of the G-protein coupled receptor family, as shown by the results of BLAST searches in the public databases. The amino

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

14

acid sequence of Table 2 (SEQ ID NO:2) has about 35 % identity (using BLAST, Altschul S.F. et al. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3389-3402) over most of its length (amino acid residues 2-306 ) with the protein encoded by the human mas oncogene (Sequence 1 in patent application WO 8707472). The sequence is 37% identical (amino acid residues 35-315) with the G-protein coupled receptor published in patent application WO 9616087 (GENESEQ 96P-R97222 ). The nucleotide sequence of Table 1 (SEQ ID NO: 1) has 52 % and 54 % identity over most of its length to the two receptors above (GENESEQ 87N-70695 and 96N-T29807 respectively). Also there is 48% identity to the human Somatostatin-3 receptor in residues 104-1144 (WO 9313130; 93N-Q45657). Hydropathy analysis (Kyte J. et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157: 105-132; Klein P. et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 815: 468-476) of the IGS3 protein sequence expectedly showed the presence of 7 transmembrane domains. Thus, IGS3 polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, inter alia, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides, and their utility is obvious to anyone skilled in the art.

15

Polynucleotides of the invention can be obtained from natural sources such as genomic DNA. In particular, degenerated PCR primers can be designed that encode conserved regions within a particular GPCR gene subfamily. PCR amplification reactions on genomic DNA or cDNA using the degenerate primers will result in the amplification of several members (both known and novel) of the gene family under consideration (the degenerated primers must be located within the same exon, when a genomic template is used). (Libert et al., *Science*, 1989, 244: 569-572). Polynucleotides of the invention can also be synthesized using well-known and commercially available techniques.

20

The nucleotide sequence encoding the IGS3 polypeptide of SEQ ID NO:2 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in SEQ ID NO:1 (nucleotide number 149 to 1138), or it may be a different nucleotide sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code might also show alterations compared to the polypeptide encoding sequence contained in SEQ ID NO:1, but also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2.

30

When the polynucleotides of the invention are used for the recombinant production of the IGS3 polypeptide, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide or a fragment thereof, by itself; the coding sequence for the mature polypeptide or fragment in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro- protein sequence, or other fusion peptide portions.

35

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

15

For example, a marker sequence which facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1989) 86:821-824, or is an HA tag. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals, ribosome binding sites and sequences that stabilize mRNA.

Further preferred embodiments are polynucleotides encoding IGS3 variants comprising the amino acid sequence of the IGS3 polypeptide of SEQ ID NO:2 in which several, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 or 1 amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

The polynucleotides of the invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter IGS3-encoding sequences for a variety of purposes including, but not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. For example, oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis may be used to introduce mutations that create amino acid substitutions, create new restriction sites, alter modification (e.g. glycosylation or phosphorylation) patterns, change codon preference, produce splice variants, and so forth.

The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the herein above-described sequences. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides which hybridize under stringent conditions to the polynucleotides described above. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 80%, and preferably at least 90%, and more preferably at least 95%, yet even more preferably at least 97%, in particular at least 99% identity between the sequences.

Polynucleotides of the invention, which are identical or sufficiently identical to a nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1 or a fragment thereof, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA, to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding IGS3 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding homologs and orthologs from species other than human) that have a high sequence similarity to the IGS3 gene. People skilled in the art are well aware of such hybridization techniques. Typically these nucleotide sequences are 80% identical, preferably 90% identical, more preferably 95% identical to that of the referent. The probes generally will comprise at least 5 nucleotides, and preferably at least 8 nucleotides, and more preferably at least 10 nucleotides, yet even more preferably at least 12 nucleotides, in particular at least 15 nucleotides. Most preferred, such probes will have

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

16

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

5 One embodiment, to obtain a polynucleotide encoding the IGS3 polypeptide, including homologs and orthologs from species other than human, comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof, and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to those of skill in the art. Stringent hybridization conditions are as defined above or alternatively conditions under 10 overnight incubation at 42 °C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1xSSC at about 65°C.

15 The polynucleotides and polypeptides of the present invention may be used as research reagents and materials for discovery of treatments and diagnostics to animal and human disease.

#### 20 Vectors, Host Cells, Expression

The present invention also relates to vectors which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, and host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be used to produce such proteins using RNAs 25 derived from the DNA constructs of the present invention.

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof for polynucleotides of the present invention. Introduction of polynucleotides into host cells can be effected by methods described in many standard 30 laboratory manuals, such as Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) and Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) such as calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transvection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or 35 infection.

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

17

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as streptococci, staphylococci, E. coli, Streptomyces and Bacillus subtilis cells; fungal cells, such as yeast cells and Aspergillus cells; insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

A great variety of expression systems can be used. Such systems include, among others, chromosomal, episomal and virus-derived systems, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate nucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra).

For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the desired polypeptide. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals, i.e. derived from a different species.

If the IGS3 polypeptide is to be expressed for use in screening assays, generally, it is preferred that the polypeptide be produced at the surface of the cell. In this event, the cells may be harvested prior to use in the screening assay. In case the affinity or functional activity of the IGS3 polypeptide is modified by receptor activity modifying proteins (RAMP), coexpression of the relevant RAMP most likely at the surface of the cell is preferred and often required. Also in this event harvesting of cells expressing the IGS3 polypeptide and the relevant RAMP prior to use in screening assays is required. If the IGS3 polypeptide is secreted into the medium, the medium can be recovered in order to recover and purify the polypeptide: if produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered. Membranes expressing the IGS3 polypeptide can be recovered by methods that are well known to a person skilled in the art. In general, such methods include harvesting of the cells expressing the IGS3

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

18

polypeptide and homogenization of the cells by a method such as, but not limited to, pottering. The membranes may be recovered by washing the suspension one or several times.

IGS3 polypeptides can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well-known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during isolation and/or purification.

#### Diagnostic Assays

This invention also relates to the use of IGS3 polynucleotides for use as diagnostic reagents. Detection of a mutated form of the IGS3 gene associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to or define a diagnosis of a disease or susceptibility to a disease which results from under-expression, over-expression or altered expression of IGS3. Also in this event co-expression of relevant receptor activity modifying proteins can be required to obtain diagnostic assays of desired quality. Individuals carrying mutations in the IGS3 gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques.

Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a subject's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy or autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR or other amplification techniques prior to analysis. RNA or cDNA may also be used in similar fashion. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled IGS3 nucleotide sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase digestion or by differences in melting temperatures. DNA sequence differences may also be detected by alterations in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents, or by direct DNA sequencing. See, e.g., Myers et al., Science (1985) 230:1242. Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method. See Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401. In another embodiment, an array of oligonucleotide probes comprising the IGS3 nucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of e.g., genetic mutations. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

19

in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability. (See for example: M.Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)).

5 The diagnostic assays offer a process for diagnosing or determining a susceptibility to among other things the Diseases as mentioned above, through detection of mutation in the IGS3 gene by the methods described.

10 In addition, among other things, the Diseases as mentioned above can be diagnosed by methods comprising determining from a sample derived from a subject an abnormally decreased or increased level of the IGS3 polypeptide or IGS3 mRNA.

15 Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as an IGS3, in a sample derived from a host are well known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

20 In another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit for among other things the Diseases or susceptibility to one of the Diseases as mentioned above.

The kit may comprise:

- (a) an IGS3 polynucleotide, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof; and/or
- (b) a nucleotide sequence complementary to that of (a); and/or
- 25 (c) an IGS3 polypeptide, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof; and/or
- (d) an antibody to an IGS3 polypeptide, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO: 2; and/or
- 30 (e) a RAMP polypeptide required for the relevant biological or antigenic properties of an IGS3 polypeptide.

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

35

#### Chromosome Assays

The nucleotide sequences of the present invention are also valuable for chromosome identification. The sequence is specifically targeted to and can hybridize with a particular location  
5 on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating those sequences with gene associated disease. Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data are found, for example, in V. McKusick, Mendelian Inheritance in  
10 Man (available on line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between genes and diseases that have been mapped to the same chromosomal region are then identified through linkage analysis (coinheritance of physically adjacent genes).

The differences in the cDNA or genomic sequence between affected and unaffected individuals can also be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected  
15 individuals but not in any normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

#### Antibodies

20 The polypeptides of the invention or their fragments or analogs thereof, or cells expressing them if required together with relevant RAMP's, may also be used as immunogens to produce antibodies immunospecific for the IGS3 polypeptides. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantial greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

25 Antibodies generated against the IGS3 polypeptides may be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, analogs or cells to an animal, preferably a nonhuman, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique, which provides antibodies produced by continuous cell line cultures, may be used. Examples  
30 include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

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

Antibodies against IGS3 polypeptides as such, or against IGS3 polypeptide-RAMP complexes, may also be employed to treat among other things the Diseases as mentioned above.

## 5 Animals

Another aspect of the invention relates to non-human animal-based systems which act as models for disorders arising from aberrant expression or activity of IGS3. Non-human animal-based model systems may also be used to further characterize the activity of the IGS3 gene.

10 Such systems may be utilized as part of screening strategies designed to identify compounds which are capable to treat IGS3 based disorders such as among other things the Diseases as mentioned above.

In this way the animal-based models may be used to identify pharmaceutical compounds, therapies and interventions which may be effective in treating disorders of aberrant expression or activity of IGS3. In addition such animal models may be used to determine the LD<sub>50</sub> and the ED<sub>50</sub> in animal subjects. These data may be used to determine the *in vivo* efficacy of potential IGS3 disorder treatments.

15 Animal-based model systems of IGS3 based disorders, based on aberrant IGS3 expression or activity, may include both non-recombinant animals as well as recombinantly engineered transgenic animals.

Animal models for IGS3 disorders may include, for example, genetic models. Animal models exhibiting IGS3 based disorder-like symptoms may be engineered by utilizing, for example, IGS3 sequences such as those described, above, in conjunction with techniques for producing transgenic animals that are well known to persons skilled in the art. For example, IGS3 sequences may be introduced into, and overexpressed and/or misexpressed in, the genome of the animal of interest, or, if endogenous IGS3 sequences are present, they may either be overexpressed, misexpressed, or, alternatively, may be disrupted in order to underexpress or inactivate IGS3 gene expression.

25 In order to overexpress or misexpress a IGS3 gene sequence, the coding portion of the IGS3 gene sequence may be ligated to a regulatory sequence which is capable of driving high level gene expression or expression in a cell type in which the gene is not normally expressed in the animal type of interest. Such regulatory regions will be well known to those skilled in the art, and may be utilized in the absence of undue experimentation.

30

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

22

For underexpression of an endogenous IGS3 gene sequence, such a sequence may be isolated and engineered such that when reintroduced into the genome of the animal of interest, the endogenous IGS3 gene alleles will be inactivated, or "knocked-out". Preferably, the engineered IGS3 gene sequence is introduced via gene targeting such that the endogenous IGS3 sequence is disrupted upon integration of the engineered IGS3 gene sequence into the animal's genome.

Animals of any species, including, but not limited to, mice, rats, rabbits, squirrels, guinea-pigs, pigs, micro-pigs, goats, and non-human primates, *q.q.*, baboons, monkeys, and chimpanzees may be used to generate animal models of IGS3 related disorders.

Any technique known in the art may be used to introduce a IGS3 transgene into animals to produce the founder lines of transgenic animals. Such techniques include, but are not limited to pronuclear microinjection (Hoppe, P.C. and Wagner, T.E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); retrovirus mediated gene transfer into germ lines (van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152, 1985); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson *et al.*, Cell 56:313-321, 1989); electroporation of embryos (Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814, 1983); and sperm-mediated gene transfer (Lavitrano et al., Cell 57:717-723, 1989); etc. For a review of such techniques, see Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.115:171-229, 1989.

The present invention provides for transgenic animals that carry the IGS3 transgene in all their cells, as well as animals which carry the transgene in some, but not all their cells, i.e., mosaic animals. (See, for example, techniques described by Jakobovits, Curr. Biol. 4:761-763, 1994) The transgene may be integrated as a single transgene or in concatamers, e.g., head-to-head tandems or head-to-tail tandems. The transgene may also be selectively introduced into and activated in a particular cell type by following, for example, the teaching of Lasko et al. (Lasko, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236, 1992).

The regulatory sequences required for such a cell-type specific activation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

When it is desired that the IGS3 transgene be integrated into the chromosomal site of the endogenous IGS3 gene, gene targeting is preferred. Briefly, when such a technique is to be utilized, vectors containing some nucleotide sequences homologous to the endogenous IGS3 gene of interest (e.g., nucleotide sequences of the mouse IGS3 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 IGS3 gene or gene allele.

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

23

The transgene may also be selectively introduced into a particular cell type, thus inactivating the endogenous gene of interest in only that cell type, by following, for example, the teaching of Gu et al. (Gu, H. et al., Science 265:103-106, 1994). The regulatory sequences required for such a cell-type specific inactivation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

Once transgenic animals have been generated, the expression of the recombinant IGS3 gene and protein may be assayed utilizing standard techniques. Initial screening may be accomplished by Southern blot analysis or PCR techniques to analyze animal tissues to assay whether integration of the transgene has taken place. The level of mRNA expression of the IGS3 transgene in the tissues of the transgenic animals may also be assessed using techniques which include but are not limited to Northern blot analysis of tissue samples obtained from the animal, *in situ* hybridization analysis, and RT-PCR. Samples of target gene-expressing tissue, may also be evaluated immunocytochemically using antibodies specific for the target gene transgene product of interest. The IGS3 transgenic animals that express IGS3 gene mRNA or IGS3 transgene peptide (detected immunocytochemically, using antibodies directed against target gene product epitopes) at easily detectable levels may then be further evaluated to identify those animals which display characteristic IGS3 based disorder symptoms.

Once IGS3 transgenic founder animals are produced i.e., those animals which express IGS3 proteins in cells or tissues of interest, and which, preferably, exhibit symptoms of IGS3 based disorders), they may be bred, inbred, outbred, or crossbred to produce colonies of the particular animal. Examples of such breeding strategies include but are not limited to: outbreeding of founder animals with more than one integration site in order to establish separate lines; inbreeding of separate lines in order to produce compound IGS3 transgenics that express the IGS3 transgene of interest at higher levels because of the effects of additive expression of each IGS3 transgene; crossing of heterozygous transgenic animals to produce animals homozygous for a given integration site in order to both augment expression and eliminate the possible need for screening of animals by DNA analysis; crossing of separate homozygous lines to produce compound heterozygous or homozygous lines; breeding animals to different inbred genetic backgrounds so as to examine effects of modifying alleles on expression of the IGS3 transgene and the development of IGS3-like symptoms. One such approach is to cross the IGS3 transgenic founder animals with a wild type strain to produce an F1 generation that exhibits IGS3 related disorder-like symptoms, such as those described above. The F1 generation may then be inbred in order to develop a homozygous line, if it is found that homozygous target gene transgenic animals are viable.

#### Vaccines

Another aspect of the invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal which comprises administering to (for example by inoculation) the mammal the IGS3 polypeptide, or a fragment thereof, if required together with a RAMP polypeptide, adequate to produce antibody and/or T cell immune response to protect said animal from among other things one of the Diseases as mentioned above.

Yet another aspect of the invention relates to a method of inducing immunological response in a mammal which comprises delivering the IGS3 polypeptide via a vector directing expression of the IGS3 polynucleotide in vivo in order to induce such an immunological response to produce antibody to protect said animal from diseases.

A further aspect of the invention relates to an immunological/vaccine formulation (composition) which, when introduced into a mammalian host, induces an immunological response in that mammal to an IGS3 polypeptide wherein the composition comprises an IGS3 polypeptide or IGS3 gene. Such immunological/vaccine formulations (compositions) may be either therapeutic immunological/vaccine formulations or prophylactic immunological/vaccine formulations. The vaccine formulation may further comprise a suitable carrier. Since the IGS3 polypeptide may be broken down in the stomach, it is preferably administered parenterally (including subcutaneous, intramuscular, intravenous, intradermal etc. injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

#### Screening Assays

The IGS3 polypeptide of the present invention may be employed in a screening process for compounds which bind the receptor and which activate (agonists) or inhibit activation of (antagonists) the receptor polypeptide of the present invention. Thus, polypeptides of the

WO 03/19983

25

PCT/EP00/09116

invention may also be used to assess the binding of small molecule substrates and ligands in, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures. These substrates and ligands may be natural substrates and ligands or may be structural or functional mimetics.

5

IGS3 polypeptides are responsible for biological functions, including pathologies. Accordingly, it is desirable to find compounds and drugs which stimulate IGS3 on the one hand and which can inhibit the function of IGS3 on the other hand. In general, agonists are employed for therapeutic and prophylactic purposes for such conditions as among other things the

10

Diseases as mentioned above.

Antagonists may be employed for a variety of therapeutic and prophylactic purposes for such conditions as among other things the Diseases as mentioned above.

15

In general, such screening procedures involve producing appropriate cells, which express the receptor polypeptide of the present invention on the surface thereof and, if essential co-expression of RAMP's at the surface thereof. Such cells include cells from mammals, yeast, *Drosophila* or *E. coli*. Cells expressing the receptor (or cell membrane containing the expressed receptor) are then contacted with a test compound to observe binding, or stimulation or inhibition

20

of a functional response.

One screening technique includes the use of cells which express the receptor of this invention (for example, transfected CHO cells) in a system which measures extracellular pH, intracellular pH, or intracellular calcium changes caused by receptor activation. In this technique,

25

compounds may be contacted with cells expressing the receptor polypeptide of the present invention. A second messenger response, e.g., signal transduction, pH changes, or changes in calcium level, is then measured to determine whether the potential compound activates or inhibits the receptor.

30

Another method involves screening for receptor inhibitors by determining modulation of a receptor-mediated signal, such as cAMP accumulation and/or adenylate cyclase activity. Such a method involves transfecting an eukaryotic cell with the receptor of this invention to express the receptor on the cell surface. The cell is then exposed to an agonist to the receptor of this invention in the presence of a potential antagonist. If the potential antagonist binds the receptor,

35

and thus inhibits receptor binding, the agonist-mediated signal will be modulated.

WO 01/19983

PCT/EP08/09116

26

Another method for detecting agonists or antagonists for the receptor of the present invention is the yeast-based technology as described in U.S. Patent 5,482,835.

5 The assays may simply test binding of a candidate compound wherein adherence to the cells bearing the receptor is detected by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound or in an assay involving competition with a labeled competitor. Further, these assays may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation of the receptor, using detection systems appropriate to the cells bearing the receptor at their surfaces. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known  
10 agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed.

Further, the assays may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing an IGS3 polypeptide to form a mixture, measuring the IGS3 activity in the  
15 mixture, and comparing the IGS3 activity of the mixture to a standard.

The IGS3 cDNA, protein and antibodies to the protein may also be used to configure assays for detecting the effect of added compounds on the production of IGS3 mRNA and protein in cells. For example, an ELISA may be constructed for measuring secreted or cell  
20 associated levels of IGS3 protein using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art, and this can be used to discover agents which may inhibit or enhance the production of IGS3 (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues. Standard methods for conducting screening assays are well known in the art.

25 Examples of potential IGS3 antagonists include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligand of the IGS3, e.g., a fragment of the ligand, or small molecules which bind to the receptor but do not elicit a response, so that the activity of the receptor is prevented.

30 Thus in another aspect, the present invention relates to a screening kit for identifying agonists, antagonists, ligands, receptors, substrates, enzymes, etc. for IGS3 polypeptides, or compounds which decrease, increase and/or otherwise enhance the production of IGS3 polypeptides, which comprises:

- 35 (a) an IGS3 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;  
(b) a recombinant cell expressing an IGS3 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2;  
(c) a cell membrane expressing an IGS3 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO:2; or  
(d) antibody to an IGS3 polypeptide, preferably that of SEQ ID NO: 2.

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

27

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

#### 5 Prophylactic and Therapeutic Methods

This invention provides methods of treating abnormal conditions related to both an excess of and insufficient amounts of IGS3 activity.

10 If the activity of IGS3 is in excess, several approaches are available. One approach comprises administering to a subject an inhibitor compound (antagonist) as hereinabove described along with a pharmaceutically acceptable carrier in an amount effective to inhibit activation by blocking binding of ligands to the IGS3, or by inhibiting interaction with a RAMP polypeptide or a second signal, and thereby alleviating the abnormal condition.

15 In another approach, soluble forms of IGS3 polypeptides still capable of binding the ligand in competition with endogenous IGS3 may be administered. Typical embodiments of such competitors comprise fragments of the IGS3 polypeptide.

20 In still another approach, expression of the gene encoding endogenous IGS3 can be inhibited using expression-blocking techniques. Known such techniques involve the use of antisense sequences, either internally generated or separately administered. See, for example, O'Connor, *J Neurochem* (1991) 56:560 in *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Florida USA (1988). Alternatively, oligonucleotides, which form triple helices with the gene, can be supplied. See, for example, Lee et al., *Nucleic Acids Res* (1979) 6:3073; Cooney et al., *Science* (1988) 241:456; Dervan et al., *Science* (1991) 251:1360. These oligomers can be administered *per se* or the relevant oligomers can be expressed *in vivo*. Synthetic antisense or triplex oligonucleotides may comprise modified bases or modified backbones. Examples of the latter include methylphosphonate, phosphorothioate or peptide nucleic acid backbones. Such backbones are incorporated in the antisense or triplex oligonucleotide in order to provide protection from degradation by nucleases and are well known in the art. Antisense and triplex molecules synthesized with these or other modified backbones also form part of the present invention.

35 In addition, expression of the IGS3 polypeptide may be prevented by using ribozymes specific to the IGS3 mRNA sequence. Ribozymes are catalytically active RNAs that can be

natural or synthetic (see for example Usman, N, et al., *Curr. Opin. Struct. Biol* (1996) 6(4), 527-33.) Synthetic ribozymes can be designed to specifically cleave IGS3 mRNAs at selected positions thereby preventing translation of the IGS3 mRNAs into functional polypeptide. Ribozymes may be synthesized with a natural ribose phosphate backbone and natural bases, as normally found in RNA molecules. Alternatively the ribozymes may be synthesized with non-natural backbones to provide protection from ribonuclease degradation, for example, 2'-O-methyl RNA, and may contain modified bases.

For treating abnormal conditions related to an under-expression of IGS3 and its activity, several approaches are also available. One approach comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound which activates IGS3, i.e., an agonist as described above, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, to thereby alleviate the abnormal condition. Alternatively, gene therapy may be employed to effect the endogenous production of IGS3 by the relevant cells in the subject. For example, a polynucleotide of the invention may be engineered for expression in a replication defective retroviral vector, as discussed above. The retroviral expression construct may then be isolated and introduced into a packaging cell transduced with a retroviral plasmid vector containing RNA encoding a polypeptide of the present invention such that the packaging cell now produces infectious viral particles containing the gene of interest. These producer cells may be administered to a subject for engineering cells in vivo and expression of the polypeptide in vivo. For overview of gene therapy, see Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (and references cited therein) in *Human Molecular Genetics*, Strachan T. and Read A.P., BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

#### Formulation and Administration

Peptides, such as the soluble form of IGS3 polypeptides, and agonists and antagonist peptides or small molecules, may be formulated in combination with a suitable pharmaceutical carrier. Such formulations comprise a therapeutically effective amount of the polypeptide or compound, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Formulation should suit the mode of administration, and is well within the skill of the art. The invention further relates to

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

29

pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention.

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

10 Preferred forms of systemic administration of the pharmaceutical compositions include injection, typically by intravenous injection. Other injection routes, such as subcutaneous, intramuscular, or intraperitoneal, can be used. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants such as bile salts or fusidic acids or other detergents. In addition, if properly formulated in enteric or encapsulated formulations, oral administration may also be possible.

15 The dosage range required depends on the choice of peptide or compound, the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's condition, and the judgment of the attending practitioner. Suitable dosages are in the range of 0.1-100 µg/kg of subject. Wide variations in the needed dosage, however, are to be expected in view of the variety of compounds available and the differing efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration would be expected to require higher dosages than 20 administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, as is well understood in the art.

25 Polypeptides used in treatment can also be generated endogenously in the subject, in treatment modalities often referred to as "gene therapy" as described above. Thus, for example, cells from a subject may be engineered with a polynucleotide, such as a DNA or RNA, to encode a polypeptide ex vivo, and for example, by the use of a retroviral plasmid vector. The cells are then introduced into the subject.

30 The following examples are only intended to further illustrate the invention in more detail, and therefore these examples are not deemed to restrict the scope of the invention in any way.

WO 01/19983

PCT/JP00/09116

30

**EXAMPLE 1. THE CLONING OF GENOMIC DNA ENCODING A NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR.**

**5 Example 1a. Homology PCR cloning of a genomic fragment encoding a novel G-protein coupled receptor (GPCR).**

A PCR based homology cloning strategy was used to isolate partial genomic DNA sequences encoding novel G-protein coupled receptors (GPCR). The following forward (F20) and reverse (R42, R43) degenerate PCR primers were designed in conserved areas of the neurotensin receptor gene family (Vita N. et al. [1993] *FEBS Lett.* 317: 139-142; Vita N. et al. [1998] *Eur. J. Pharmacol.* 360: 265-272) at the boundary of intracellular loop n°1 (I1) with transmembrane domain 2 (TM2) and at the boundary of transmembrane domain 3 with intracellular loop n°2 (TM3/I2) respectively.

15

F20 (I1/TM2):

5'-CTGCACTACCACGTGCTC(A or T)(G or C)(A,C,G or T)(C or T)(A,C,G or T)GC-3'  
(SEQ ID NO: 3)

20

R42 (TM3/I2):

5'-GGGTGGCAGATGGCCA(A or G)(A or G)(C or T)(A,C,G or T)(C or T)(C or T)TC(C or Inosine)(C,G or T)  
(SEQ ID NO: 4)

25

R43 (TM3/I2):

5'-GTGGCAGATGGCCAGGCAGCG(A or G)TC(A,C,G or T)(A or G)C(A or G)CT(A,G or T)-3'  
(SEQ ID NO: 5)

In order to suppress amplification of known members of the neurotensin receptor family, the 3' ultimate nucleotide position of primers R42 and R43 was chosen in such a way that it was either not complementary to the corresponding position of the human NTR1 cDNA (R42) or to the corresponding position of both NTR1 and NTR2 cDNA (R43).

The primary PCR reaction was carried out in a 60 µl volume and contained 100 ng human genomic DNA (Clontech), 6 µl GeneAmp™ 10 x PCR buffer II (100mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl, Perkin Elmer), 3.6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.36 µl dNTPs (25mM of each dNTP), 1.5 units AmpliTaq Gok4™ polymerase (Perkin Elmer) and 30 pmoles of each of the degenerated forward (F20) and reverse primer (R42). Reaction tubes were heated at 95°C for 10 min and then

35

WO 01/19983

31

PCT/EP00/09116

subjected to 35 cycles of denaturation (95°C, 1 min), annealing (55°C, 2 min) and extension (72°C, 3min). Finally reaction tubes were heated for 10 min at 72°C.

For the semi-nested PCR reaction 1 µl of a 1/50 dilution of the primary PCR reaction was used as a template using the degenerate forward and reverse primers F20 and R43 respectively. The semi-nested PCR reaction was carried out under the same conditions as the primary PCR reaction.

Semi-nested PCR reaction products were size fractionated on an agarose gel and stained with ethidium bromide. A fragment of ± 220 bp was identified, purified from gel using the Qiaex-II™ purification kit (Qiagen) and ligated into the pGEM-T plasmid according to the procedure recommended by the supplier (pGEM-T kit, Promega). The recombinant plasmids thus produced were used to transform competent *E. coli* SURE™ 2 bacteria (Stratagene). Transformed cells were plated on LB agar plates containing ampicillin (100 µg/ml). Plasmid DNA was purified from mini-cultures of individual colonies using a Qiaex-tip 20 miniprep kit (Qiagen). DNA sequencing reactions were carried out on the purified plasmid DNA with the ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE-ABI), using insert-flanking. Sequencing reaction products were purified via EtOH/NaOAc precipitation and analysed on an ABI 377 automated sequencer.

A computer-assisted homology search of the insert sequence of clone HNT1370 against public domain sequence databanks (Blastn; Altschul S.F. et al. [1997], *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402) revealed strong indications that it encoded (part of) a novel member of the GPCR family. Although HNT1370 had been cloned from a ± 220 bp fragment the insert size was only ± 130 bp as a result of a cloning artefact. We refer to this novel GPCR sequence as IGS3.

Table 3: Overview of oligo primers used.

25

SEQ ID NO: 3	F20: 5'-CTGCACTACCAGTGCTC(A or T)(G or C)(A,C,G or T)(C or T)T(A,C,G or T)GC-3'
SEQ ID NO: 4	R42: 5'-GGGTGGCAGATGGCCA(A or G)(A or G)(C or T)(A,C,G or T)(C)(G or T)(C or T)TC(C or Inosine)(C,G or T)
SEQ ID NO: 5	R43: 5'-GTGGCAGATGGCCAGCAGCG(A or G)TC(A,C,G or T)(A or G)(A or G)CT(A,G or T)-3'
SEQ ID NO: 6	IP11969: 5'GGGGCCGACTTCCCTCTTCCCTGCTTCC-3'
SEQ ID NO: 7	IP12008: 5'-GCAAGGTAGGCACAGGTCATCACAGTGG-3'
SEQ ID NO: 8	IP12936: 5'-ATAAGCTTCTCCCTGGCCCTTAATAAATGAC-3'
SEQ ID NO: 9	IP12937: 5'-AGGAAATTCAGACAGACAGGGCCAAAGTTG-3'

**Example 1b. Cloning of genomic DNA fragments containing the complete IGS3 coding sequence.**

5 The complete coding sequence of IGS3 was obtained via hybridization screening of a human genomic library. A human genomic DNA library (Clontech #HL1067), constructed in the lambda EMBL3 SP6/T7 phage vector was screened by hybridization using an IGS3 specific probe. This probe was derived from a 130 bp PCR fragment amplified from the HNT1355 plasmid (which contained an identical insert as HNT1370) using IGS3 specific primers IP11969  
10 (SEQ ID NO: 6) and IP12008 (SEQ ID NO: 7) (Fig. 1). The 130 bp fragment was purified from gel using the Qiaex-II™ purification kit (Qiagen) and radiolabelled via random primed incorporation of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP to a specific activity of > 10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g using the Prime-it II kit™ (Stratagene) according to the instructions provided by the supplier. Approximately 550,000 plaques were screened with the 130 bp probe according to the Lambda Library User Manual of Clontech  
15 (PT1010-1). Three positive clones ( $\lambda$ -IGS3.1,  $\lambda$ -IGS3.3 and  $\lambda$ -IGS3.5) were plaque-purified and recombinant phage DNA was prepared from small-scale liquid cultures as described by Maniatis et al. (Sambrook, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition [1989]. CSH Laboratory Press).

Sequence analysis of the recombinant phage DNA using IGS3 specific primers showed  
20 that the inserts of all 3 lambda clones contained a long open reading frame encoding a novel putative (intron-less) GPCR of 330 amino acids (the postulated start of translation was preceded by an in-frame stop codon). The IGS3 coding sequence was subcloned into a plasmid vector after PCR amplification. PCR reactions were carried out on the isolated  $\lambda$ -IGS3.1,  $\lambda$ -IGS3.3 and  $\lambda$ -IGS3.5 phage DNA (500 ng) with the IP12936 (SEQ ID NO: 8) and IP12937 (SEQ ID NO: 9)  
25 oligonucleotide primers using the Expand™ High Fidelity PCR system (Boehringer). PCR reaction tubes were heated at 95°C for 2 min and then subjected to 35 cycles of denaturation (95°C, 30 sec), annealing (58°C, 30 sec) and extension (72°C, 1 min). There was a final elongation step at 72°C (10 min). A + 1,200 bp PCR product was purified from gel and ligated into the pGEM-T vector. The recombinant DNA was then used to transform E coli bacterial strain  
30 DH5 $\alpha$ F'. This yielded bacterial clones HB4971, HB4972 (both subcloned from  $\lambda$ -IGS3.1), HB4973 and HB4974 (both subcloned from  $\lambda$ -IGS3.3) and HB4975 and HB4976 (both subcloned from  $\lambda$ -IGS3.5). The inserts of all plasmid clones were completely sequenced. A meld of all sequence data yielded a consensus sequence, which confirmed the existence of a long open reading frame of 330 amino acids that encoded a putative novel GPCR receptor (IGS3)  
35 (Fig. 1). The consensus cDNA and protein sequence of IGS3 are presented here as IGS3cDNA (SEQ ID NO: 1) and IGS3PROT (SEQ ID NO: 2) respectively. Homology searches of DNA

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

33

databanks with the IGS3DNA sequence showed one EST sequence (accession n° AF003828) which partially overlapped with IGS3DNA at the 3' end (Fig.1).

The bacterial strain harboring plasmid HNT4971 (containing the IGS3DNA sequence) was recloned after replating on LB agar plates containing 100 µg ampicillin/ml and deposited  
5 both in the Innogenetics N.V. strain list (ICCG4319) and at the "Centraalbureau voor Schimmelculturen (CBS)" in Baarn, The Netherlands (accession n° 102196). Plasmid DNA was prepared from the recloned isolate and the insert was resequenced and found to be identical to the IGS3DNA sequence.

WG 01/19983

PCT/EP00/09116

34

PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 15.09.2000 04:00:52 PM

0-1	Form - PCT/RO/134 (EASY) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	SPW99, 07
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	33
1-2	line	3>
1-3	Identification of Deposit	
1-3-1	Name of depository institution	Centraalbureau voor Schimmelcultures
1-3-2	Address of depository institution	Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherlands
1-3-3	Date of deposit	15 September 1999 (15.09.1999)
1-3-4	Accession Number	CBS 102196
1-4	Additional Indications	NONE
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designated States
1-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	NONE

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

WO 01/19983

35

PCT/EP00/09116


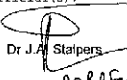
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Duphar International Research B.V.  
Postbus 900  
1380 DA WEESEP  
The Netherlands

*name and address of depositor*

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
around pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: E. coli DH5 alpha F pGEM-TriGS3 ICCG 4319	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CBS 102195
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation <i>(mark with a cross where applicable)</i>	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository accepts the microorganism identified under I above, which received by it on 15-09-99 <i>(date dd-mm-yy of the original deposit)</i> 1	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on not applicable <i>(date dd-mm-yy of the original deposit)</i> and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on not applicable <i>(date dd-mm-yy of receipt of request for conversion)</i>	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures Address: Oosterstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Mrs F.B. Shippe-Claus  Dr J.A. Stalpers Date (dd-mm-yy): 17-09-99 <i>P. R. A. G. M. v. d. ...</i>

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

WO 01/19983

36

PCT/EP00/09116

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

INTERNATIONAL FORM

Duphar International Research B.V.  
Postbus 900  
1380 DA WEESP  
The Netherlands

*name and address of the party to whom the  
viability statement is issued*

VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

<p><b>I. DEPOSITOR</b></p> <p>Name: Duphar International Research B.V.</p> <p>Address: Postbus 900 1380 DA WEESP The Netherlands</p>	<p><b>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b></p> <p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:</p> <p style="text-align: center;">CBS 102196</p> <p>Date (dd-mm-yy) of the deposit or of the transfer: 1            15-09-99</p>
<p><b>III. VIABILITY STATEMENT</b></p> <p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 17-09-99<sup>2</sup>. On that date (dd-mm-yy), the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/><sup>3</sup> viable</p> <p><input type="checkbox"/><sup>3</sup> no longer viable</p>	

<sup>1</sup> Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

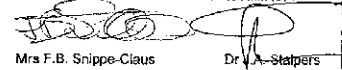
<sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

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

WO 01/19983

37

PCT/EP00/09116

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY HAS BEEN PERFORMED <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Centraalbureau voor Schimmelcultures	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):
Address: Oosterstraat 1 P.O. Box 273 3740 AG BAARN The Netherlands	 Mrs F.B. Snippe-Claus      Dr. A. Stappers Date (dd-mm-yy): 17-09-89      P.O. P. A. Jansen

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

## Claims

1. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
  - 5 a) a nucleotide sequence encoding the IGS3 polypeptide according to SEQ ID NO: 2;
  - b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the DNA insert contained in the deposit no. CBS 102196 at the Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn (The Netherlands), in particular a nucleotide  
10 sequence corresponding to the SEQ ID NO: 1;
  - c) a nucleotide sequence having at least 80 % (preferably at least 90%) sequence identity over its entire length to the nucleotide sequence of (a) or (b);
  - d) a nucleotide sequence which is complementary to the nucleotide sequence of (a) or (b) or (c).
- 15 2. The polynucleotide of claim 1 wherein said polynucleotide comprises the nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1 encoding the IGS3 polypeptide of SEQ ID NO:2.
3. The polynucleotide of claim 1 wherein said polynucleotide comprises a nucleotide  
20 sequence that is at least 80% identical to that of SEQ ID NO:1 over its entire length.
4. The polynucleotide of claim 3 which is the polynucleotide of SEQ ID NO:1.
5. The polynucleotide of claim 1-4 which is DNA or RNA.
- 25 6. A hybridization probe comprising the polynucleotide of claim 1 or a fragment thereof of at least 5 nucleotides and preferably between 30 and 50 nucleotides.
7. A DNA or RNA molecule comprising an expression system, wherein said expression  
30 system is capable of producing an IGS3 polypeptide comprising an amino acid sequence, which has at least 80% identity with the polypeptide of SEQ ID NO:2 when said expression system is present in a compatible host cell.
8. A host cell comprising the expression system of claim 7.
- 35 9. A host cell according to claim 8 which is a yeast cell

10. A host cell according to claim 8 which is an animal cell
11. IGS3 receptor membrane preparation derived from a cell according to claim 8-10.
- 5 12. A process for producing an IGS3 polypeptide comprising culturing a host of claim 8 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture.
- 10 13. A process for producing a cell which produces an IGS3 polypeptide thereof comprising transforming or transfecting a cell with the expression system of claim 7 such that the cell, under appropriate culture conditions, is capable of producing an IGS3 polypeptide.
14. An IGS3 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 80% identical
- 15 to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 over its entire length.
15. The polypeptide of claim 14 which comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
16. An antibody immunospecific for the IGS3 polypeptide of claim 14.
- 20 17. A method for the treatment of a subject in need of enhanced activity or expression of IGS3 polypeptide receptor of claim 14 comprising:
- (a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an agonist to said receptor; and/or
- 25 (b) providing to the subject an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity to a nucleotide sequence encoding the IGS3 polypeptide of SEQ ID NO:2 over its entire length; or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence in a form so as to effect production of said receptor activity in vivo.
- 30 18. A method for the treatment of a subject having need to inhibit activity or expression of IGS3 polypeptide receptor of claim 14 comprising:
- (a) administering to the subject a therapeutically effective amount of an antagonist to said receptor; and/or
- 35 (b) administering to the subject a polynucleotide that inhibits the expression of the nucleotide sequence encoding said receptor; and/or

- (c) administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide that competes with said receptor for its ligand.
19. A process for diagnosing a disease or a susceptibility to a disease in a subject related to expression or activity of the IGS3 polypeptide of claim 14 in a subject comprising:
- 5 (a) determining the presence or absence of a mutation in the nucleotide sequence encoding said IGS3 polypeptide in the genome of said subject; and/or
- (b) analyzing for the presence or amount of the IGS3 polypeptide expression in a sample derived from said subject.
- 10 20. A method for identifying agonists to the IGS3 polypeptide of claim 14 comprising:
- (a) contacting a cell which produces a IGS3 polypeptide with a test compound; and
- (b) determining whether the test compound effects a signal generated by activation of the IGS3 polypeptide.
- 15 21. An agonist identified by the method of claim 20.
22. A method for identifying antagonists to the IGS3 polypeptide of claim 14 comprising:
- 20 (a) contacting a cell which produces a IGS3 polypeptide with an agonist; and
- (b) determining whether the signal generated by said agonist is diminished in the presence of a candidate compound.
23. An antagonist identified by the method of claim 22.
- 25 24. A recombinant host cell produced by a method of claim 13 or a membrane thereof expressing an IGS3 polypeptide.
25. A method of creating a genetically modified non-human animal comprising the steps of
- 30 e) ligating the coding portion of a polynucleotide consisting essentially of a nucleic acid sequence encoding a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 or a biologically active fragment thereof to a regulatory sequence which is capable of driving high level gene expression or expression in a cell type in which the gene is not normally expressed in said animal; or
- 35 b) engineering the coding portion of a polynucleotide consisting essentially of a nucleic acid sequence encoding a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 or a biologically active fragment thereof and reintroducing said sequence in the genome of said animal in such a way that the endogenous

WO 01/19983

41

PCT/EP00/09116

gene alleles encoding a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2  
or a biologically active fragment are fully or partially inactivated.

WO 01/19983

PCT/EP00/09116

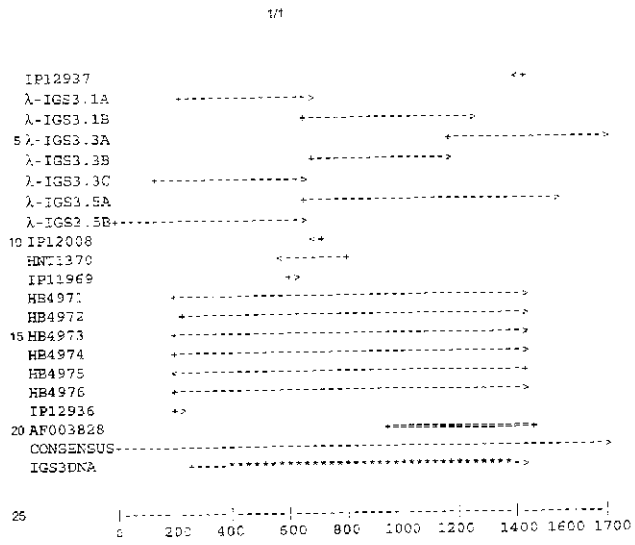


Fig.1  
30

WO 01/09883

1/6

PCT/EP00/09116

SEQUENCE LISTING

<110> SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V.

5 <120> Novel Human G-Protein coupled Receptor

<130> SPN 99.07

<140>

10 <141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1176

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> [149]..[1138]

25 <400> 1

ttaatctctt caagcctctg atttctctc ctgtaaaca gggcggtaa ttaccacata 60

acagctcgt catgaaatc agtgaacatg cagcaggtgc tcaagtcttg tttttgttc 120

30 gggggcacc agtggaggtt ttctgagc atg gat cca acc acc ccg gcc tgg 172

Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp

1 5

35 gga aca gaa agt aca aca gtg aat gga aak gac caa gcc ctt ctt ctg 220

Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn Gly Asn Asp Glu Ala Leu Leu Ile

10 15 20

40 ctt tgt ggc aag gag acc ctg atc ccg gtc ttc ctg atc ctt ttc att 268

Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile

25 30 35 40

45 gcc ctg gtc ggg ctg gla gga aac ggg ttt gtc ctg tgg ctc ctg ggc 316

Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly

45 50 55

50 ttc cgc atg cgc agg aac ggc ttc tat gtc aac gtc ctg agc ctg gcc 354

Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala

60 65 70

55 ggg gcc gac ttc ctg ttc ctg tgc ttc cag att ata aat tgg ctg gtc 412

Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val

75 80 85

55

WO 01/19983

2/6

PCT/EP00/09116

1ae ctc agt aac ttc ttc tgt tcc atc tcc atc aat ttc cct agc ttc 460  
 Tyr Leu Ser Arg Phe Phe Cys Ser Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe  
 90 95 100

5 ttc acc act gtc atg acc tgt gcc tac ctt gca ggc ctg agc atg ctg 508  
 Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu  
 105 110 115

10 agc acc acc agc acc gag cgc tgc ctg tcc gtc ctg tgg ccc atc tgg 556  
 Ser Thr Val Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp  
 120 125 130 135

15 tat cgc tgc cgc cgc ccc aga cac ctg tca gcc gtc gtc tgt gtc ctg 604  
 Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu  
 140 145 150

20 ctc tgg gcc ctg tcc cta ctg ctg agc atc tgg gaa ggg aag ttc tgt 652  
 Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Ser Ile Leu Gln Gly Lys Phe Cys  
 155 160 165

25 ggc ttc tta ttt agt gat ggt gac tct ggt tgg tgt cag acc ttt gat 700  
 Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp  
 170 175 180

30 ttc atc act gca gcc tgg ctg att ttt tta ttc atg gtt ctc tgt ggg 748  
 Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile Phe Leu Phe Met Val Leu Cys Gly  
 185 190 195 200

35 tcc agt ctg gcc ctg ctg gtc agg atc ctc tgt ggc tcc agg ggt ctg 796  
 Ser Ser Leu Ala Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Gly Leu  
 205 210 215

40 cca ctg atc agg ctg tac ctg acc atc ctg ctc acc gtc ctg gtc ttc 844  
 Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Leu Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val Phe  
 220 225 230

45 ctc ctc tgc gcc ctg ccc ttt gcc att cag tgg ttc cta atc tta tgg 892  
 Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Gln Trp Phe Leu Ile Leu Trp  
 235 240 245

50 atc tgg aag gat tct gat gtc tta ttt tgt cat att cat cca gtt tca 940  
 Ile Trp Lys Asp Ser Asp Val Leu Phe Cys His Ile His Pro Val Ser  
 250 255 260

55 gtt gtc ctg tca tct att aac agc agt gcc aac ccc atc att tac ttc 988  
 Val Val Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe  
 265 270 275 280

1036 ttc gtc gcc tct ttt aag aag cag tgg cgg ctg cag cag ccc atc ctc  
 Phe Val Gly Ser Phe Arg Lys Gln Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu  
 285 290 295

1084 aag ctg gct ctc cae agg gct ctg cag gac att gct gag gtc gat cac  
 Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Ile Ala Gln Val Asp His  
 300 305 310

WO 01/19983

3/6

PCT/EP00/09116

```

agl gaa gga tgc ttc cgt cag ggc acc cca gag atg tgg aga agc agt 1132
Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser
315 320 325
5
ctg gtg tagagatgga cagcctctac tcccatcaga tctatgtg 1176
Leu Val
330
10
15
<210> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20
<400> 2
Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn
1 5 10 15
25
Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile
20 25 30
Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn
35 40 45
30
Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe
50 55 60
35
Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys
65 70 75 80
Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val Tyr Leu Ser Asn Phe Phe Cys Ser
85 90 95
40
Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala
100 105 110
Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu Ser Thr Val Ser Thr Glu Arg Cys
115 120 125
45
Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His
130 135 140
50
Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu
145 150 155 160
Ser Ile Leu Glu Gly Lys Phe Cys Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp
165 170 175
55

```

WO 01/19983

4/6

PCT/EP00/09116

Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile  
 180 185 190

5 Phe Leu Phe Met Val Leu Cys Gly Ser Ser Leu Ala Leu Leu Val Arg  
 195 200 205

Ile Leu Cys Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Leu Thr  
 210 215 220

10 Ile Leu Leu Thr Val Leu Val Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly  
 225 230 235 240

Ile Gln Trp Phe Leu Ile Leu Trp Ile Trp Lys Asp Ser Asp Val Leu  
 245 250 255

15 Phe Cys His Ile His Pro Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Asn Ser  
 260 265 270

20 Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gln  
 275 280 285

Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu  
 290 295 300

25 Gln Asp Ile Ala Glu Val Asp His Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly  
 305 310 315 320

Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser Leu Val  
 325 330

35 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

40 <220>  
 <221> Description of Artificial Sequence: Degenerated  
 primers

45 <220>  
 <221> variation  
 <222> (21)  
 <223> A,C,G or T

50 <220>  
 <221> variation  
 <222> (24)  
 <223> A,C,G or T

55 <400> 3  
 ctgcactacc acgtgctctcws nvtngc 26

WO 01/19983 5/6 PCT/EP00/09116

<210> 4  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

5 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Degenerated primers

10 <220>  
 <221> variation  
 <222> (21)  
 <223> A,C,G or T

15 <220>  
 <221> variation  
 <222> (27)  
 <223> C or Inosine

20 <400> 4  
 gggtagcaga tggccarrra tckytcnb 28

25

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

30 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Degenerated primers

35 <220>  
 <221> variation  
 <222> (25)  
 <223> A,C,G or T

40 <400> 5  
 gtggcagatg gcaagccagr gatenrctt d 31

45 <210> 6  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

50 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

55 <400> 6  
 gggccgact tcatctctt atgcttc 28

WO 01/19983

5/6

PCT/EP00/09116

5 <210> 7  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
10 <400> 7  
gcaaggtagg cacaggccac caagaggg 28

15 <210> 8  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
20 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
<400> 8  
ataagcttct cctggccct tastaatga c 31  
25

30 <210> 9  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer  
35 <400> 9  
aggattcag acagacaggg gcaagctg 29

## 【手続補正書】

【提出日】平成13年10月30日(2001.10.30)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

a) 配列番号2記載のIGS3ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；  
b) Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102196号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号1に相当するヌクレオチド配列；  
c) (a)または(b)のヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80% (好ましくは少なくとも90%)の配列の同一性を有するヌクレオチド配列；  
d) (a)または(b)または(c)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列

からなる群より選ばれたヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項2】

該ポリヌクレオチドが、配列番号2のIGS3ポリペプチドをコードする配列番号1内に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項3】

該ポリヌクレオチドが、配列番号1のものに対してその全長にわたって少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項4】

配列番号1のポリヌクレオチドである、請求項3記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項5】

DNAまたはRNAである、請求項1から4までに記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項6】

発現ベクターが適合する宿主細胞内に存在する場合に、該発現ベクターが配列番号2のポリペプチドと少なくとも80%一致を有するアミノ酸配列を含んでなるIGS3ポリペプチドを産生可能である、発現ベクターを含んでなるDNAまたはRNA分子。

## 【請求項7】

請求項6の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

## 【請求項8】

酵母細胞である、請求項7記載の宿主細胞。

## 【請求項9】

動物細胞である、請求項7記載の宿主細胞。

## 【請求項10】

請求項7から9までに記載の細胞から誘導されたIGS3受容体膜調製物。

## 【請求項11】

該ポリペプチドの産生のために十分な条件下で請求項7の宿主を培養しそして培養物からポリペプチドを回収することを含んでなる、IGS3ポリペプチドを産生するための方法。

## 【請求項12】

適当な培養条件下で、細胞がIGS3ポリペプチドを産生可能なように、請求項6の発現ベクターを用いて細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、細胞のIGS3ポリペプチドを産生する細胞を産生するための方法。

## 【請求項13】

配列番号 2 のアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含んでなる、IGS3 ポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 13 のポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 2 またはその変種の IGS3 ポリペプチドに対して免疫特異性の抗体。

【請求項 16】

(a) 該受容体に対するアゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または、  
(b) 配列番号 2 の IGS3 ポリペプチドコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも 80% の同一性を有するヌクレオチド配列、または生体内で該受容体活性の産生を行うような形で該ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドを患者に提供する

ことを含んでなる、請求項 13 の IGS3 ポリペプチド受容体の増強された活性または発現を必要とする、請求項 13 の IGS3 ポリペプチド受容体の発現または活性に関する疾患を患っている患者の治療のための方法。

【請求項 17】

(a) 該受容体に対するアンタゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または

(b) 該受容体をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害するポリヌクレオチドを患者に投与し、および/または

(c) そのリガンドに関して該受容体と競合するポリペプチドの治療的な有効量を患者に投与する

ことを含んでなる、請求項 13 の IGS3 ポリペプチド受容体の増強された活性または発現を必要とする、請求項 13 の IGS3 ポリペプチド受容体の発現または活性に関する疾患を患っている患者の治療のための方法。

【請求項 18】

(a) 該患者のゲノム内の該 IGS3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内の突然変異の存在または不在を決定し、および/または

(b) 該患者から誘導された試料内の IGS3 ポリペプチド発現の存在または量を分析する

ことを含んでなる、該患者内の請求項 13 の IGS3 ポリペプチドの発現または活性に関連する患者内の疾患または疾患に対する罹患性の診断のための方法。

【請求項 19】

(a) IGS3 ポリペプチドを産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物が IGS3 ポリペプチドの活性化により発生されるシグナルをもたらすかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項 13 の IGS3 ポリペプチドに対するアゴニストを同定するための方法。

【請求項 20】

請求項 19 の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項 21】

(a) IGS3 ポリペプチドを産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生されるシグナルが候補化合物の存在下において減少されるかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項 13 の IGS3 ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための方法。

【請求項 22】

請求項 21 の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項 23】

請求項 12 記載の方法により産生される組換え宿主細胞または IGS3 ポリペプチドを発

現するその膜。

【請求項 2 4】

a) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を、高レベル遺伝子発現または遺伝子が該動物内で通常は発現されない細胞タイプ内での発現を駆動することができる調節配列と連結させ、または

b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列から本質的になるポリヌクレオチドのコーディング部分を操作し、そして、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする内在性遺伝子対立遺伝子が完全にまたは部分的に不活性化されるような方法で該動物のゲノム内に該配列を再導入する

工程を含んでなる、遺伝子的に操作したヒト以外の動物を創成する方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					Inter.	not Application No
					PCT/EP	00/09116
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>						
IPC 7	C12N15/12	C07K14/72	C07K16/28	C12Q1/68	C12N15/11	
	C12N5/10	C12N1/19	G01N33/56	G01N33/566	A61K48/00	
	A61K31/70	A61K31/00	A01K67/027			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)						
IPC 7	C12N	C07K	C12Q	G01N	A61K	A01K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data						
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
A	TRENKLE T.C.M. ET AL.: "Human RAP-PCR products."					1-17, 19, 20, 22, 24, 25
	EMBL DATABASE ACCESSION NUMBER AF003828, 28 July 1997 (1997-07-28), XP002130202 abstract					
X	WO 94 10323 A (IMP CANCER RES TECH -SPDOWER ROBERT ANTHONY (GB); EPENETOS AGAMEMIN) 11 May 1994 (1994-05-11) SEQ.ID.53					6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* documents when more than one priority claim is or which is filed to establish the publication date of another claim or other special issue (see Appendix) *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 defined ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document(s) taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family						
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
5 December 2000				12/12/2000		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1, 5100 Patentstr. NL - 2200 HP The Hague Tel: +31 (0) 70 340 2040 fax: +31 (0) 70 340 2016 Fax: +31 (0) 70 340 3016				Authorized officer  Mandl, B		

1

International Application No. PCT/JP 00 09116

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claim 17 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition, as far as it refers to a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity to SEQ.ID.1.

## Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 17 (partially); 18,21,23 (completely)

Claims 18, 21 and 23 and, partially, claim 17, as far as it refers to an agonist or a complementary nucleotide sequence in a form so as to effect production of I6S3 receptor activity, relate to agonists or antagonists of I6S3 receptor activity without giving a true technical characterization of the claimed matter. Consequently, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

Furthermore, claim 17 defines a polynucleotide as comprising a nucleotide sequence that has at least 80% identity to a nucleotide sequence encoding the I6S3 polypeptide of SEQ.ID.2 over its entire length. Back-translation of the polypeptide into DNA generates a very great number of nucleic acid sequences. It is not possible to search an entire database with this enormous set of sequences. The search thus has been limited to polynucleotide sequences having at least 80% identity with SEQ.ID.1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 56.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Inventor:   
 Application No:   
 PCT/EP 00/09116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9410323 A	11-05-1994	EP 1038967 A	27-09-2000
		EP 0672158 A	20-09-1995
		GB 2286593 A, B	23-08-1995
		JP 8506239 T	09-07-1996
		US 5885808 A	23-03-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	

(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ニス, ガイ

オランダ・エヌエル - 1 3 8 1 シーピー ウエースプ・シーゼイバンハウテンラン 3 6

(72) 発明者 ドヒューベルト, ニコレ

オランダ・エヌエル - 1 3 8 1 シーピー ウエースプ・シーゼイバンハウテンラン 3 6

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02  
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA09 CA11 DA02 DA12 GA11 HA01  
 HA12 HA14 HA17  
 4B063 QA19 QQ02 QQ43 QR55 QR62 QS25 QS34  
 4B064 AG20 CA06 CA10 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA72 AA90 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA44 CA18 NA14 ZA012 ZA362  
 ZA512 ZA662 ZA812 ZB112 ZB312 ZC022 ZC352 ZC422  
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 NA14 ZA01 ZA36 ZA51 ZA66  
 ZA81 ZA96 ZB11 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02 ZC42  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 DA50 DA75 EA21 EA23 EA25 EA27  
 EA28 FA74

专利名称(译)	人G蛋白偶联受体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004500039A</a>	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001523754	申请日	2000-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏威杉机俞蒂卡尔的裴浮标		
[标]发明人	デレールスニーダーウイリ ニスガイ ドヒューベルトニコレ		
发明人	デレールスニーダー,ウイリ ニス,ガイ ドヒューベルト,ニコレ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/00 A61K31/70 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P13/12 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/19 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P1/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P13/12 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/723		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P13/12 A61P19/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/19 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZB112 4C084/ZB312 4C084/ZC022 4C084/ZC352 4C084/ZC422 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA66 4C086/ZA81 4C086/ZA96 4C086/ZB11 4C086/ZB32 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC02 4C086/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA23 4H045/EA25 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	1999203014 1999-09-16 EP 1013062 1999-09-16 NL		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及IGS3G蛋白偶联受体家族和编码IGS3蛋白的多核苷酸。本发明包括抑制或激活这些多核苷酸和多肽的作用，所述载体包含多核苷酸，宿主细胞和包含所述载体的基因IGS3过度表达，在非真空压力或低表达（敲除动物），它是非人类动物或被抑制的。本发明进一步，IGS3在用于该方法的诊断测定方法以及用于筛选能够作为G蛋白偶联受体家族IGS3的激动剂或拮抗剂的化合物的宽范围的疾病和这样的条件下的治疗使用IGS3多肽和多肽核苷酸和激动剂或拮抗剂用于受体家族。

