

(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2006-516387

(P2006-516387A)

(43) 公表日 平成18年7月6日(2006.7.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B063
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4B065
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4H045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-547554 (P2004-547554)	(71) 出願人 390033008 ジヤンセン・ファーマシューチカ・ナーム ローゼ・フェンノートシャツプ JANSSEN PHARMACEUTI CA NAAMLOZE VENNOOT SCHAP
(86) (22) 出願日 平成15年10月23日 (2003.10.23)	
(85) 翻訳文提出日 平成17年4月22日 (2005.4.22)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2003/011793	
(87) 国際公開番号 W02004/039835	
(87) 国際公開日 平成16年5月13日 (2004.5.13)	
(31) 優先権主張番号 PCT/EP02/12273	(74) 代理人 100060782 弁理士 小田島 平吉
(32) 優先日 平成14年10月31日 (2002.10.31)	(72) 発明者 ベーターズ, ピーター・ヨハン ベルギー・ビー-2340ビールセ・トウ ルンホウトセベーク30・ジヤンセン・フ ァーマシューチカ・ナームローゼ・フェン ノートシャツプ
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンによる刺激にตอบสนองしてその発現が増加される遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、一般に、鬱病の治療および診断に関する。特に、本発明はポリペプチドならびにこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、該ポリペプチドは、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンへの内分泌応答を媒介することにおいて中心的役割を果たすことが示されている。これらのポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、鬱病の診断、処置および/もしくは予防において有用である。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節するタンパク質であって、配列番号：46および配列番号：48よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードす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 mRNA、DNA もしくは cDNA である請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節するタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号：45、配列番号：47および配列番号：49よりなる群から選択される核酸配列を含んでなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節するタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号：45、配列番号：47および配列番号：49よりなる群から選択される核酸配列からなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節するタンパク質であって、配列番号：46および配列番号：48よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

請求項 1～4 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

## 【請求項 7】

ポリヌクレオチドが発現制御配列に操作可能に連結されている請求項 6 に記載のベクター。

## 【請求項 8】

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節するタンパク質であって、配列番号：46および配列番号：48よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質を発現することができる宿主細胞。

## 【請求項 9】

調節配列を含んでなるベクターでトランスフェクションした請求項 8 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 10】

請求項 6 もしくは 7 に記載のベクターでトランスフェクションした請求項 8 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 11】

a) 細胞を化合物の有無で CRH と接触させること；  
b) 該細胞における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節する少なくとも 1 つのタンパク質の量を決定すること；および  
c) 該化合物の有無で該タンパク質の量を比較すること；  
を含んでなり、

ここで該副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）シグナリングを調節するタンパク質が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46 および配列番号 48 よりなる群から選択される、  
細胞における CRH シグナリング応答を改変することができる化合物を同定する方法。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

細胞がマウス下垂体コルチコトロフ由来腺腫細胞系 A t T - 2 0 のような真核細胞である請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

C R H シグナリングを調節するタンパク質の量が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに結合する抗体を用いて決定されている請求項 1 1 もしくは 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

C R H シグナリングを調節するタンパク質の量が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の遺伝子転写のレベルを評価することにより決定されている請求項 1 1 もしくは 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

遺伝子転写のレベルが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに結合するプローブを用いて評価されている請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

遺伝子発現のレベルがマイクロアレイ技術を用いて分析される請求項 1 4 もしくは 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

遺伝子発現のレベルが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの群をコードするポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて評価される請求項 1 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

a) 細胞を試験化合物の有無で接触させること；ならびに  
b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定すること  
を含んでなる細胞における C R H シグナリング応答を改変することができる化合物を同定する方法。

40

【請求項 1 9】

遺伝子の発現レベルが、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7、配列番号 1 9、配列番

50

号 2 1、配列番号 2 3、配列番号 2 5、配列番号 2 7、配列番号 2 9、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 9、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7 および配列番号 4 9 の核酸配列を有するポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて決定される請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる少なくとも 1 つのタンパク質を発現する細胞を試験化合物と接触させること；ならびに

10

b) 該細胞の C R H 応答活性を該化合物の有無で比較すること

を含んでなる細胞における C R H シグナリング応答活性を改変することができる化合物を同定する方法。

【請求項 2 1】

細胞が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 のアミノ酸配列を有するタンパク質の群を発現する請求項 2 0 に記載の方法。

20

【請求項 2 2】

C R H 応答活性が、遺伝子レベルで転写の変化として評価されている請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

C R H 応答活性が、マイクロアレイ技術を用いて評価されている請求項 2 1 もしくは 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのタンパク質を発現することができる宿主細胞である請求項 2 0 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 2 5】

宿主細胞が、調節配列を含んでなる少なくとも 1 つのベクターでトランスフェクションされている請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

宿主細胞が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6 および配列番号 4 8 よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる少なくとも 1 つのベクターでトランスフェクションされている請求項 2 4 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

a) 個体の生物学的サンプルを得ること；および

b) 該生物学的サンプルにおける副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン ( C R H ) シグナリ

50

ングを調節する少なくとも1つのタンパク質の量を決定すること；

(ここで、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節するタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されている。)

を含んでなる個体におけるCRH誘発性鬱病を診断する方法。

【請求項28】

生物学的サンプルが体液もしくは組織サンプルである請求項27に記載の方法。

10

【請求項29】

CRHシグナリングを調節するタンパク質の量が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに結合する抗体を用いて決定されている請求項27もしくは28に記載の方法。

【請求項30】

CRHシグナリングを調節するタンパク質の量が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の遺伝子転写のレベルを評価することにより決定されている請求項27もしくは28に記載の方法。

20

【請求項31】

遺伝子転写のレベルが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに結合するプローブを用いて評価されている請求項30に記載の方法。

30

【請求項32】

遺伝子転写のレベルがマイクロアレイ技術を用いて分析される請求項30もしくは31に記載の方法。

【請求項33】

遺伝子転写のレベルが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48のアミノ酸配列を有するポリペプチドの群をコードするポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて分析される請求項32に記載の方法。

40

【請求項34】

遺伝子転写のレベルが、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43

50

、配列番号45、配列番号47および配列番号49の核酸配列を有するポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて分析される請求項32に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、鬱病の治療および診断に関する。特に、本発明はポリペプチドならびにこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、該ポリペプチドは、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンへの細胞性応答を媒介することにおいて中心的役割を果たすことが示されている。これらのポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、鬱病の診断、処置および/もしくは予防において有用である。

10

【背景技術】

【0002】

最近の社会経済分析により、鬱病は身体障害の主要原因且つ他の疾患の発症の主要危険因子であることが見出された。さらに、世界的規模で鬱病は過少診断され、そして過少治療されている。現在の抗鬱剤は有効であることが判明しているが、作用の遅い発現および副作用を抱える。この上に、どの薬理学的作用機序によりそれらがその臨床効果を及ぼすかはまだ明らかではない。鬱病のコルチコステロイド受容体仮説に基づく仮説駆動研究は、薬剤標的として脳神経ペプチド受容体、特に副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)受容体に焦点を当てる新しい概念をもたらしている。

20

【0003】

41アミノ酸ポリペプチドの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)は、視床下部-下垂体-副腎系の調節において中心的役割を果たし、様々なストレス因子への内分泌応答を媒介する。視床下部ニューロンはストレスに応答してCRHを下垂体門脈系に放出し、下垂体アドレノコルチコトロピン(ACTH)の分泌および生合成を刺激し、増加した副腎グルココルチコイド生産をもたらす(非特許文献1)。いくつかの臨床および前臨床研究は、鬱病の発症におけるCRH系の改変の因果的役割の方に向かせる(非特許文献2)。ヒトにおけるCRHでの最初の研究は、CRHへのACTH応答が鬱病患者において鈍化しており、常に増加した視床下部CRH分泌に伴うCRH受容体脱感作を反映することを示した(非特許文献3;非特許文献4)。増加したCRH放出の結果としての鈍化したACTH応答の裏づけとして、鬱病にかかっている患者の脳脊髄液における上昇したCRHレベルの結果がある。鬱状態におけるCRH分泌過多のこの概念を強化する他の結果は、鬱病を患った自殺犠牲者における増加したCRH分泌ニューロン数および減少したCRH受容体数である(非特許文献5;非特許文献6)。

30

【0004】

CRHには2つの高親和性受容体が記述されており(CRH-R1およびCRH-R2)、これらの両方ともいくつかのサブタイプ形態で存在する。CRHによるこれらの受容体の活性化は、アデニルシクラーゼのGs媒介性刺激をもたらし、増加した細胞内cAMPレベルを引き起こす。これはそれ自体がcAMP依存性プロテインキナーゼA(PKA)を活性化し、そして最終的にcAMPおよびCa<sup>2+</sup>の増加したサイトゾルレベルをもたらす。増加したcAMPおよびCa<sup>2+</sup>レベルは、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性キナーゼII(CAMKII)およびp42/p44マイトジェン活性化キナーゼ(MAPK)のようないくつかの他の追加のキナーゼの活性化をもたらす。結果としてCa<sup>2+</sup>/cAMP応答配列結合タンパク質(CREB)がリン酸化され、そしてこれは、今度は、プロモーター領域にcAMP応答配列(CRE)を含有する遺伝子の転写を調節する。CRHシグナリングの調節に関与することが示されているそのような遺伝子の例には、c-fos、マクロファージ遊走阻止因子遺伝子Mif、オーファン核受容体Nurr77およびNurr1が包含される。

40

【0005】

CRH活性化受容体の下流経路は、コルチコトロフの細胞モデルのAtT-20細胞に

50

において詳細に研究されそしてシグナリングカスケードに關与する多数の遺伝子の同定をもたらしたことににもかかわらず、主要な領域は探究されていない。従って、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体活性化遺伝子ネットワークに關与するさらなる遺伝子を同定するために全ゲノムレベルでCRH刺激への転写応答を探究することは、本発明の目的であった。このようにして同定されるポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、スクリーニング技術による薬剤標的として薬剤開発の新しい機会を提供し、または鬱病の診断、予防および/もしくは処置において有用である。

【非特許文献1】De Souza EB 1995 Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:789-819 10

【非特許文献2】Holsboer F 2001 Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62:77-91

【非特許文献3】Holsboer, F, Gerken A, Stalla GK, Muller OA 1987 Blunted aldosterone and ACTH release after human CRH administration in depressed patients. *Am J Psychiatry* 144:229-231 20

【非特許文献4】Holsboer F, Gerken A, von Bardeleben U, Grimm W, Beyer H, Muller OA, Stalla GK 1986 Human corticotropin-releasing hormone in depression - correlation with thyrotropin secretion following thyrotropin-releasing hormone. *Biol Psychiatry* 21:601-611

【非特許文献5】Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M 1988 Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 45:577-579 30

【非特許文献6】Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF 1994 Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60:436-444

【発明の開示】 40

【0006】

[発明の要約]

本発明は、全ゲノムレベルでのCRH刺激への転写応答に關与する多数の遺伝子の同定に關する。特に、配列番号45、配列番号47、配列番号49およびその機能的アナログよりなる群から選択される配列を有する、CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする多数のこれまで未知の遺伝子の同定に關する。

【0007】

さらなる態様として、本発明はこれらの配列を含んでなるベクター、上記の配列の1つをコードするベクターを含有する宿主細胞ならびに本発明のポリヌクレオチドもしくはベクターを含んでなるトランスジェニック非ヒト動物を包含する、上記のヌクレオチド配列 50

の組み換え使用に関する。

【0008】

C R Hシグナリングとこれまで関連付けられていなかった、従って、細胞におけるC R Hシグナリング応答を調節する化合物を同定する方法においてもしくは個体におけるC R H誘発性鬱病を同定するための診断方法において有用である多数の遺伝子を提供することもまた本発明の目的である。1つの態様として、細胞におけるC R Hシグナリング応答を改変することができる化合物を同定する方法は、該細胞を該化合物の有無でC R Hと接触させることおよび配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47もしくは配列番号49よりなる群から選択される核酸配列を含んでなるポリヌクレオチドの発現レベルを決定することを含んでなる。このスクリーニング方法において、発現レベルは、典型的には上記のポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いて、好ましくはアレイ技術方法を用いて評価される。従って、特定の態様として、本発明は細胞におけるC R Hシグナリング応答を調節する化合物を同定する方法を提供し、該方法は、該細胞を該化合物の有無でC R Hと接触させること；ならびに配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47および配列番号49の核酸配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルを決定することを含んでなり、ここで、これらの配列の発現プロファイルの変化は、該細胞におけるC R Hシグナリング応答を改変することができる化合物の指標となる。

[発明の詳細な記述]

本明細書において用いる場合、「化合物」もしくは「因子」という用語は、単純なもしくは複雑な有機分子、ペプチド、タンパク質もしくはオリゴヌクレオチドのような生物学的もしくは化学的化合物を意味する。「試験化合物」は、本明細書において用いる場合、該化合物がC R Hシグナリング活性を調節するかどうかを評価するために本発明の方法において使用する「化合物」もしくは「因子」をさす。

【0009】

「C R Hシグナリング」は、本明細書において用いる場合、該細胞におけるC R Hによる副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体の活性化の後の遺伝子転写の細胞性変化をさす。それは、C R H特異的遺伝子発現プロファイルを誘導する。転写レベルでの変化は、タンパク質レベルでもしくは遺伝子、RNAレベルで評価することができる。

【0010】

「C R H応答活性」は、本明細書において用いる場合、一般に、C R Hに該細胞をさらすことの結果としての検出可能な細胞パラメーターの変化をさす。検出可能な細胞パラメーターには、とりわけ、膜電位の変化、該細胞におけるC R Hシグナリングを調節する酵素の酵素活性の変化、本発明のタンパク質の発現レベルの変化またはc G M P、c A M P、 $Ca^{2+}$ もしくは $IP_3$ のような二次メッセンジャーの量の変化が包含される。

【0011】

「アナログ」もしくは「機能的アナログ」という用語は、該アナログがインビボおよび/もしくはインビトロで未改変のタンパク質と実質的に同じ生物学的活性を保持するように少なくとも1個のアミノ酸置換が行われている本発明のタンパク質の改変形態をさす。

【0012】

「機能的アナログ」という用語には、本発明のポリペプチドの「フラグメント」、「バリエーション」、「縮重バリエーション」、「アナログ」および「ホモログ」もしくは「化学的誘導體」が包含されるものとする。ポリペプチドの有用な化学的誘導體は当該技術分野において周知であり、そして例えば、二次的化学要素 (secondary chemical

l moiety) によるポリペプチド内に含まれる反応性有機部位の共有結合修飾が包含される。周知の架橋試薬は、例えば、ビオチン、蛍光色素のようなアフィニティタグを導入するために、もしくはポリペプチドを固相表面に結合するために(例えばアフィニティ樹脂を作製するために)アミノ、カルボキシルもしくはアルデヒド残基に反応させるのに有用である。

#### 【0013】

ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドのバリエーション(1つもしくは複数)は、該用語を本明細書において用いる場合、それぞれ、基準ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドと異なるポリヌクレオチドもしくはポリペプチドである。ポリヌクレオチドのバリエーションは、天然に存在する対立遺伝子バリエーションのような天然に存在するバリエーションであることができ、もしくはそれは天然に存在することが知られていないバリエーションであることができる。(1)ヌクレオチド配列が別の基準ポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチド。一般に、差異は、基準およびバリエーションのヌクレオチド配列が全体的に極めて類似しそして多くの領域において同一であるように限定される。下記のように、バリエーションのヌクレオチド配列の変化は、サイレントであることができる。すなわち、それらはポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を改変しないことができる。改変がこのタイプのサイレント変化に限定される場合、バリエーションは基準と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。また下記のように、バリエーションのヌクレオチド配列の変化は、基準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することもできる。そのようなヌクレオチド変化は、上記に説明するように、基準配列によりコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸置換、付加、欠失、融合およびトランケーションをもたらすことができる。(2)アミノ酸配列が別の基準ポリペプチドと異なるポリペプチド。一般に、差異は、基準およびバリエーションの配列が全体的に極めて類似しそして多くの領域において同一であるように限定される。バリエーションおよび基準ポリペプチドは、任意の組み合わせで存在することができる、1つもしくはそれ以上の置換、付加、欠失、融合およびトランケーションによりアミノ酸配列が異なることができる。

#### 【0014】

「相補的な」もしくは「相補性」という用語は、本明細書において用いる場合、二本鎖核酸分子を形成するように水素結合によって結合するプリンおよびピリミジンヌクレオチドの能力をさす。以下の塩基対は、相補性の関係にある：グアニンとシトシン；アデニンとチミン；およびアデニンとウラシル。本明細書において用いる場合、「相補的な」は、上記の関係が該分子の全長にわたって2つの1本鎖核酸分子を含んでなる実質的に全ての塩基対に当てはまることを意味する。「部分的に相補的な」は、分子の一方の一部が一本鎖のままであるように2つの1本鎖核酸分子の一方がもう一方より長さが短い場合の上記の関係をさす。

#### 【0015】

「保存的置換」もしくは「保存的アミノ酸置換」という用語は、ある種のアミノ酸の当該技術分野で認められている置換可能性に基づく親分子の生物学的活性に影響を与えない親タンパク質における1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基の置換をさす(例えば、M. Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Supp. 3, pg 345-352, 1978を参照)。

#### 【0016】

「そのフラグメント」は、該フラグメントが親タンパク質もしくは核酸分子における連続する5個もしくはそれ以上のアミノ酸、または10個もしくはそれ以上のヌクレオチドを含んでなるような、その配列が本明細書に開示されている核酸もしくはタンパク質分子のフラグメント、断片もしくはサブ領域をさす。

#### 【0017】

「機能性フラグメント」は、本明細書において用いる場合、本明細書に開示するタンパク質もしくは例えば受容体の活性部位のような機能的に異なった領域を含んでなるアミノ

10

20

30

40

50

酸の配列の単離されたサブ領域もしくはフラグメントをさす。機能性フラグメントは、クローニング技術により、もしくは選択的スプライシングメカニズムの天然産物として製造することができる。

【0018】

「ホモログ」もしくは「相同な」という用語は、異なる核酸分子もしくはアミノ酸配列間の関係を表し、ここで、該配列もしくは分子は、該分子もしくは配列内の1つもしくはそれ以上のブロックもしくは領域での部分的同一性もしくは類似性により関連している。「単離された核酸化合物」は、その天然の位置と位置的に異なる、いかに構築されもしくは合成されようとも (however construed or synthesized)、任意のRNAもしくはDNA配列をさす。

10

【0019】

「核酸プローブ」もしくは「プローブ」は、本明細書において用いる場合、別の核酸化合物とハイブリダイズする標識核酸化合物である。「核酸プローブ」は、一本鎖標的核酸配列とハイブリダイズする一本鎖核酸配列を意味する。核酸プローブは、オリゴヌクレオチドもしくはヌクレオチドポリマーであることができる。「プローブ」は、通常、プローブの末端(1つもしくは複数)に結合しているかもしくはプローブの配列の内部にあることができる検出可能な部分を含有する。

【0020】

「プライマー」という用語は、例えば核酸分子の酵素もしくは合成による伸長の開始基質として機能する核酸フラグメントである。

20

【0021】

「ハイブリダイゼーション」という用語は、本明細書において用いる場合、一本鎖核酸分子がヌクレオチド塩基対合によって相補鎖と結合するプロセスをさす。

【0022】

「ストリンジェンシー」という用語は、ハイブリダイゼーション条件をさす。高いストリンジェンシー条件は、非相同的塩基対合を退ける。低いストリンジェンシー条件は、逆の効果をもつ。ストリンジェンシーは、例えば、温度および塩濃度により改変することができる。「ストリンジェントな条件」は、50%ホルムアミド、5xSSC(750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストランおよび20µg/mlの変性した剪断サケ精子DNAを含んでなる溶液における42°Cで一晩のインキュベーション、続いて約65°Cで0.1xSSCにおいてフィルターを洗浄することをさす。さらなる適当なハイブリダイゼーション条件は、実施例に記載されている。

30

【0023】

「低いストリンジェンシー条件」には、6xSSPE(20xSSPE=3M NaCl; 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.02M EDTA、pH7.4)、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100µg/mlのサケ精子ブロッキングDNAを含んでなる溶液における37°Cで一晩のインキュベーション; 続いて50°Cで1xSSPE、0.1% SDSでの洗浄が包含される。さらに、いっそう低いストリンジェンシーを得るために、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの後に行う洗浄をさらに高い塩濃度(例えば5xSSC)で行うことができる。ここで留意すべきは、上記の条件のバリエーションが、ハイブリダイゼーション実験におけるバックグラウンドを抑えるために用いられる代替のブロッキング試薬の包含および/もしくは代用によって実施できることである。典型的なブロッキング試薬には、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性したサケ精子DNAおよび市販されている専売配合物が包含される。特定のブロッキング試薬の包含は、適合性の問題のために、上記のハイブリダイゼーション条件の改変を必要とし得る。

40

【0024】

「融合タンパク質」という用語は、本明細書において用いる場合、ドメインもしくはリンカー領域の組み合わされた機能を得る目的のために複数のタンパク質ドメインもしくは

50

リンカー領域を組み合わせることの結果であるタンパク質構築物をさす。これは、所望の融合タンパク質をコードする新しいポリヌクレオチド配列をもたらすためにそのようなドメインをコードするヌクレオチド配列の分子クローニングにより実施することができる。あるいはまた、融合タンパク質の作製は、2つのタンパク質を化学的に連結することにより実施することができる。

【0025】

「リンカー領域」もしくは「リンカードメイン」という用語または同様のそのような記述用語は、本明細書において用いる場合、クローニングベクターもしくは融合タンパク質の構築において使用するポリヌクレオチドもしくはポリペプチド配列をさす。リンカー領域の機能には、ヌクレオチド配列へのクローニング部位の導入、2つのタンパク質ドメイン間のフレキシブル成分もしくはスペース作製領域の導入、または特異的分子相互作用のためのアフィニティタグの作製を包含することができる。リンカー領域は、ポリペプチドもしくはヌクレオチド配列構築中に行われる選択によりもたらされる融合タンパク質に導入することができる。

スクリーニング方法

本発明は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)誘発性鬱病およびストレスを調節する化合物を同定するためのスクリーニング方法に関する。それは、CRH活性化CRH受容体の下流モジュレーターとしての多数の遺伝子の同定に基づく。特に、本発明は、細胞におけるCRHシグナリング応答を改変することができる化合物を同定する方法を提供し、該方法は；

- a) 該細胞を該化合物の有無でCRHと接触させること；
- b) 該細胞における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節する少なくとも1つのタンパク質の転写レベルでの変化を決定すること；および
- c) 該タンパク質の転写レベルを該化合物の有無で比較すること；

(ここで、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節するタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択される。)

を含んでなる。

【0026】

転写の変化をタンパク質レベルで決定するために、当該技術分野で既知の技術を用いて該タンパク質の量を決定することができる。例えば、クーマシーもしくは銀染色のようなタンパク質染色技術と組み合わせて等電点電気泳動法もしくはSDS-pageのような分離技術を用いる。あるいはまた、酵素であるタンパク質では、既定溶液もしくは組織抽出物における量は、反応生成物へのその基質の転化である、酵素がもたらす触媒効果に関して測定するもしくはアッセイすることができる。例えば、キナーゼでは、キナーゼ特異的リン酸化部位を含んでなる基質を用いてそして該基質への放射性ホスフェートの導入により基質のリン酸化を測定することによってキナーゼ活性を評価することができる。このアッセイは、試験する化合物の有無の両方で行うことができる。酵素ではないタンパク質では、他の定量方法が必要とされる。例えば、輸送タンパク質は、それらが輸送する分子へのそれらの結合により、そしてホルモンおよび毒素は、それらがもたらす生物学的効果により評価することができる。

【0027】

転写の変化を遺伝子レベルで評価するために、RNAもしくはcDNAを検出に直接用いることができ、または分析の前にPCRもしくは他の増幅技術を用いることにより酵素的に増幅することができる。好ましくは、該分析方法は、遺伝子の適当な領域を標的とする標識オリゴヌクレオチドプローブの使用を含んでなる。

【0028】

10

20

30

40

50

従って、好ましい態様として、遺伝子転写のレベルは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46 および配列番号 48 よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに結合するプローブを用いて評価される。

#### 【0029】

別の態様として、遺伝子発現の効率のよいスクリーニングを行うために CRH シグナリングを調節するタンパク質もしくはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技術方法は周知であり、一般的適用性を有し、そして遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変異性を包含する分子遺伝学における様々な問題に取り組むために用いることができる（例えば：M. Chee et al., Science, Vol. 274, pp 610 - 613 (1996) を参照）。従って、細胞における CRH シグナリング応答を改変することができる化合物を同定する方法を提供することは本発明の目的であり、該方法は；該細胞を試験する化合物の有無で CRH と接触させること；ならびに配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46 および配列番号 48 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの群をコードするポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いて遺伝子転写のレベルを決定することを含んでなる。

10

20

#### 【0030】

代わりの態様として、細胞における CRH シグナリング応答を改変することができる化合物を同定する方法は；

a) 該細胞を該化合物の有無で CRH と接触させること；および

b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47 もしくは配列番号 49 よりなる群から選択される核酸配列を含んでなるポリヌクレオチドの発現レベルを決定することを含んでなる。

30

#### 【0031】

発現レベルの変化を評価するために、RNA もしくは cDNA を検出に直接用いることができ、または分析の前に PCR もしくは他の増幅技術を用いることにより酵素的に増幅することができる。好ましくは、該分析方法は、ポリヌクレオチドの適当な領域を標的とする標識オリゴヌクレオチドプローブの使用を含んでなる。従って、好ましい態様として、遺伝子転写のレベルは、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47 もしくは配列番号 49 よりなる群から選択される核酸配列を含んでなるポリヌクレオチドに結合するプローブを用いて評価される。

40

#### 【0032】

別の態様として、遺伝子発現の効率のよいスクリーニングを行うために CRH シグナリングを調節するタンパク質をコードするヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。この態様として、本発明は、細胞における CRH シグナリング応答を改変することができる化合物を同定

50

する方法を提供し、該方法は、該細胞を該化合物の有無でCRHと接触させること；ならびに配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47および配列番号49の核酸配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルを決定することを含んでなる。特に、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47および配列番号49の核酸配列を有するポリヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドプローブのアレイを用いる。

10

#### 【0033】

別の態様として、遺伝子発現の効率のよいスクリーニングを行うためにCRHシグナリングを調節するタンパク質もしくはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技術法は周知であり、一般的適用性を有し、そして遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変異性を包含する分子遺伝学における様々な問題に取り組むために用いることができる（例えば：M. Chee et al., Science, Vol. 274, pp. 610-613 (1996)を参照）。

20

#### 【0034】

ゲノムDNAを直接使用しない場合には、mRNAを単離し、そして第一鎖cDNA合成を実施することができる。2回目のDNA合成を第二鎖の生成のために実施することができる。次に、特異的PCR増幅によって、単離されたcDNAを得ることができる。必要に応じて、二本鎖cDNAを任意の適当なベクター、例えばプラスミドにクローン化し、それによりcDNAライブラリーを生成せしめることができる。上記と同様にして、CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする遺伝子の任意の適当な領域を標的とする標識オリゴヌクレオチドプローブでバクテリオファージもしくはプラスミドシャトルベクターにおいて構築したcDNAライブラリーをスクリーニングすることが可能である。例えば、PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis et al., Academic Press (1990)を参照。

30

#### 【0035】

原核もしくは真核細胞における増殖のためにプラスミドもしくはファージのような適当なベクターにおいてcDNAライブラリーを構築する方法は、当業者に周知である[例えば、Maniatis et al. 上記を参照]。適当なクローニングベクターは周知であり、そして広く利用可能である。

#### 【0036】

さらなる態様として、遺伝子転写の変化はmRNAレベルで決定される。減少したもしくは増加した発現は、例えば；核酸増幅（例えば、PCR、RT-PCRによる）；RNAアーゼ保護；ノーザンブロットングおよび他のハイブリダイゼーション方法のような、ポリヌクレオチドの定量のための当該技術分野において周知である方法のいずれかを用いてRNAレベルで測定することができる。ホストから得られるサンプルにおける、本発明のポリペプチドのようなタンパク質のレベルを決定するために用いることができるアッセイ技術は、当業者に周知である。そのようなアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが包含される。タンパク質誘導体もしくはパリアントの存在を決定するために用いることができるアッセイ技術は、とりわけ、質量分析法を含んでなる。

40

#### 【0037】

従って、細胞におけるCRHシグナリング応答を改変することができる化合物を同定す

50

る方法を提供することは本発明の目的であり、該方法は；

a) 該細胞を該化合物の有無でCRHと接触させること；

b) 該細胞における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節する少なくとも1つのタンパク質の量を決定すること；および

c) 該タンパク質の量を該化合物の有無で比較すること；

(ここで、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節するタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46  
10 および配列番号48よりなる群から選択される。)

を含んでなる。

#### 【0038】

好ましくは、CRHシグナリングを調節するタンパク質の量をアッセイする方法は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに結合する抗体を用いている。  
20

#### 【0039】

従って、別の態様として、本発明は、CRHシグナリングを調節するタンパク質と免疫学的に反応する単一特異性抗体を提供し、該タンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択される。本発明のポリペプチドに対して作製される抗体は、日常的プロトコルを用いて、該ポリペプチドもしくはエピトープ保有フラグメント、アナログまたはこれらを発現する細胞を動物、好ましくは非ヒト動物に投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の製造には、連続細胞系培養により生産される抗体を提供する任意の技術を用いることができる。例には、ハイブリドーマ技術(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ(trioma)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)が包含される。  
30

#### 【0040】

米国特許第4,946,778号に記載されているもののような、一本鎖抗体の製造のための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造するために適応させることができる。また、ヒト化抗体を発現するためにトランスジェニックマウス、もしくは他の哺乳類を包含する他の生物を用いることもできる。  
40

#### 【0041】

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離するためもしくは同定するために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用いることができる。

#### 【0042】

本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、とりわけ、CRH誘発性ストレスもしくはは鬱病のようなCRH代謝関連疾患を処置するために用いることもできる。  
50

## 【 0 0 4 3 】

C R Hシグナリングを調節するタンパク質の量を決定するために、本発明の抗体は、通常の免疫学的技術において用いられる。適当な免疫学的技術は当業者に周知であり、そして例えば、E L I S A、ウェスタンブロット分析、競合的もしくはサンドイッチイムノアッセイなどが包含され、別に周知であるようにそれらは全て抗原 - 抗体免疫複合体の形成に依存し、ここで、アッセイの目的のために、抗体を例えば放射性、酵素もしくは蛍光標識で検出可能に標識することができ、または不溶性担体上に固定することができる。

## 【 0 0 4 4 】

例えば、E L I S Aスクリーニングフォーマットでは、担体（B S Aのような）に結合しているタンパク質もしくはそのペプチドフラグメントのいずれかでコーティングされている固相（例えばマイクロプレートの底）に該抗体を加え、そして次に、酵素、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ、もしくは<sup>1 2 5</sup> Iのような放射性同位体のような検出可能な標識と結合した抗免疫グロブリン抗体（例えば、免疫付与をマウスにおいて行う場合、抗マウス免疫グロブリン抗体を用いる、例えばヒツジ抗マウス免疫グロブリン（I g））を加える。

## 【 0 0 4 5 】

従って、サンプルにおけるC R Hシグナリングを調節するタンパク質の決定もしくは検出のためのイムノアッセイを提供することは本発明の目的であり、該方法は、サンプルを本発明のタンパク質に対する抗体と接触させることおよび抗体と該タンパク質との間で免疫複合体が形成されるかどうかを決定することを含んでなる。これらの方法は、組織サンプルもしくは体液サンプルで行うことができ、そして一般に、被験体の体からサンプルを得ること；検出可能に標識した本発明の抗体のイメージング有効量と該サンプルとを接触させること；およびサンプルにおけるC R Hシグナリングを調節するタンパク質の存在を明らかにするために標識を検出することを含んでなる。

## 【 0 0 4 6 】

本発明の抗体を用いる測定方法は、特に限定されない。測定する抗原の量に対応する抗体、抗原もしくは抗原 - 抗体複合体の量が、化学的もしくは物理的手段により検出され、そして既知の量の抗原を含有する標準溶液の使用により作製される標準曲線から計算される限り、任意の測定方法を用いることができる。例えば、比濁法、競合法、免疫測定法およびサンドイッチ法を適切に用いる。感度および特異性に関して、下記のサンドイッチ法を用いることが特に好ましい。

## 【 0 0 4 7 】

ラベリング物質を用いる測定方法では、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質などをラベリング因子として用いる。放射性同位体の例には、<sup>1 2 5</sup> I、<sup>1 3 1</sup> I、<sup>3</sup> Hおよび<sup>1 4</sup> Cが包含される。酵素は、通常、次に検出可能な反応を触媒する適切な基質の結合により検出可能にする。その例には、例えば、ベータ - ガラクトシダーゼ、ベータ - グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼおよびリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼが包含される。発光物質には、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、エクオリンおよびルシフェラーゼが包含される。さらに、アビジン - ビオチン系もまた、本発明の抗体および免疫原を標識するために用いることができる。

## 【 0 0 4 8 】

従って、さらなる態様として、本発明は：

- a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46および配列番号 48 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる少なくとも1つのタンパク質を発現する細胞を試験化合物と接触させること；および
- b) 該細胞のC R H応答活性を該化合物の有無で比較すること

10

20

30

40

50

を含んでなる細胞におけるCRHシグナリング応答活性を改変する化合物を同定しそして得る方法を提供する。

【0049】

膜電位の変化は、通常の電気生理学的技術を用いて、そして利用可能になる場合には、現在開発中の新規な高速大量処理方法を用いて測定することができる。膜電位の変化は、通常、イオン流動の結果であるので、代わりの方法として、膜電位の変化は、Molecular Probesを包含する供給業者からのfluo-3、fluo-4、fluo-5N、fura red、Sodium Green、SBFIおよび他の同様のプローブを包含するイオン感受性蛍光色素を用いて細胞内イオン濃度の変化によって間接的に測定することができる。DIBAC<sub>4(3)</sub>もしくはDi-4-Anepps他のような、Molecular Probesを包含する供給業者からの他の蛍光色素は、膜電位変化を検出することができる。例えば、カルシウムおよびナトリウムイオン流動は、画像解析アルゴリズムと組み合わせたレーザー共焦点法の有無で、蛍光顕微鏡検査を包含する、蛍光光度法および蛍光イメージング技術を用いて、このようにしてリアルタイムで特性化することができる。

10

【0050】

好ましい態様として、このアッセイは、蛍光イメージングプレートリーダー(FLUORESCENCE IMAGING PLATE READER (FLIPR), Molecular Devices Corporation)と呼ばれる装置に基づく。その最も一般的な形態において、それはフルオレセインに基づく色素により出される蛍光を励起しそして測定する。それは、フルオロフォアの488nmでの高出力励起をもたらすためのアルゴンイオンレーザー、96~384ウェルプレートの底一面を迅速に走査するための光学系および出された蛍光を捕獲するための高感度の冷却したCCDカメラを使用する。それはまた、装置が96/384ウェルプレートのウェルに試験因子の溶液を送達することを可能にする96/384ウェルピペティングヘッドも含有する。FLIPRアッセイは、全ての96/384ウェルから同時に、リアルタイムで、化合物の添加の前に、間にそして後に細胞の集団からの蛍光シグナルを測定するように設計される。

20

【0051】

従って、細胞におけるCRH応答を調節することにおいて機能的に活性がある化合物をスクリーニングしそして特性化するために用いるFLIPRアッセイを提供することは本発明の目的であり、該細胞は、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34よりなる群から選択されるタンパク質を発現する。

30

【0052】

代わりの態様として、細胞の活性は、電気生理学的方法を用いて評価することができる。従って、細胞におけるCRHシグナリングを調節するタンパク質は、全細胞および単一チャンネル電気生理学を用いて特性化することができる。

【0053】

従って、細胞におけるCRHシグナリング応答活性を調節する化合物を同定するためのスクリーニング方法を提供することは本発明のさらなる目的であり、該方法は；

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるタンパク質を発現する宿主細胞を試験する化合物と接触させること；

40

(b) 電気生理学的技術を用いて該細胞の膜電位への試験化合物の影響を測定すること；および

(c) 該細胞のCRH応答活性を該化合物の有無で比較すること

を含んでなる。あるいはまた、上記のスクリーニング方法における宿主細胞は、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34よりなる群から選

50

扱われるタンパク質を発現する。

【0054】

好ましい態様として、宿主細胞はゼノパス卵母細胞であり、そして電気生理学的測定は、別個の膜電位で電圧固定技術を用いて膜電流を測定することからなる。

【0055】

該細胞におけるCRHシグナリングを調節する酵素の酵素活性の変化は、一般に、反応生成物へのその基質の転化である、酵素がもたらす触媒効果に関して測定するかもしくはアッセイすることができる。例えば、キナーゼでは、キナーゼ特異的リン酸化部位を含んでなる基質を用いてそして該基質のリン酸化を測定することによりキナーゼ活性を評価することができる。同様にホスファターゼでは、リン酸化基質を用いてそして該基質の脱リン酸化を測定することによりホスファターゼ活性を評価することができる。これらのアッセイは、試験する化合物の有無の両方で行うことができる。

10

【0056】

従って、細胞におけるCRHシグナリング応答活性を改変することができる化合物を同定する方法を提供することは本発明の目的であり、該方法は；

a) 配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16および配列番号18よりなる群から選択されるキナーゼを含んでなる混合物をホスフェート源および適当なキナーゼ基質と接触させること；

b) 該混合物を該化合物の有無でインキュベーションすることおよび；該試験化合物のない場合の該基質のリン酸化のレベルと比較して該化合物の存在下での該基質のリン酸化の

20

レベルを測定すること

を含んでなる。

【0057】

本発明のアッセイにおいて、キナーゼはタンパク質として提供することができ、もしくは該キナーゼをコードするmRNAとしてアッセイ混合物において提供することができる。アッセイが無細胞成分を含んでなる場合、キナーゼはタンパク質として提供される。アッセイが細胞の環境において行われる場合、キナーゼはタンパク質としてもしくは該キナーゼをコードするmRNAとして提供することができ、ここで、キナーゼがアッセイにおいて利用可能であるように、該mRNAは翻訳され、そしてそれによりキナーゼタンパク質が生産される。キナーゼを特定するmRNAを得、そして該mRNAをキナーゼタンパク質の生産のために細胞に注入するのが簡単な事であるのは、本明細書に提供する実施例から明らかである。キナーゼはまた、キナーゼタンパク質をコードするプラスミドの発現により提供することもできる。キナーゼタンパク質をコードする操作可能なプラスミドを構築するためにそして該プラスミドを細胞において発現するために標準的な分子生物学技術を用いることができる(Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。

30

【0058】

本明細書に説明するように、キナーゼモジュレーターを同定する方法は、アッセイ混合物が無細胞である場合のインピトロで、生細胞をアッセイに含む場合のインピトロで、もしくは動物においてインピボで行うことができる。従って、本発明の1つの態様として、混合物は真核細胞内に含まれ、そして本発明の方法を行うことができ、ここで、アッセイ混合物の成分のいくつかは、その中に成分の微量注入によって細胞に外因的に提供することができる、そして成分のいくつかは細胞において内在性であることができる。

40

【0059】

「細胞において内在性である」という用語は、本明細書において用いる場合、該成分が対象細胞において生来生産されることを意味する。

【0060】

「細胞に外因性である」という用語は、本明細書において用いる場合、該成分が対象細胞に生来存在しないか、もしくは低レベルでその中に存在し、そしてそこに加えられるこ

50

とを意味する。

【0061】

本発明の方法が真核細胞を用いて行われる場合、1つもしくはそれ以上のキナーゼタンパク質、キナーゼ基質および試験化合物をインキュベーションの前に真核細胞に注入することができる。次に、そのように注入した細胞をプロテインキナーゼ活性を促進する条件下でインキュベーションし、そして次に、本明細書に記述するアッセイを用いてインキュベーション期間の後にプロテインキナーゼ活性のレベルを測定する。

【0062】

本発明の方法において有用な真核細胞は、ゼノパス・レーピス (*Xenopus laevis*) 卵母細胞、ゼノパス・レーピス胚細胞、哺乳類細胞 (IOTI/2細胞のような)、ドロソフィラ・メラノガスタ (*Drosophila melanogaster*) S2細胞、ディクチオステリウム・ディスコイデウム (*Dictyostelium discoideum*) 細胞および酵母細胞のいずれか1つであることができる。さらにより好ましくは、真核細胞はマウス下垂体コルチコトロフ由来腺腫細胞系細胞 AtT-20である。

【0063】

本発明の方法に使用するホスフェート源は、ATPもしくはGTPのようなしかしこれらに限定されるものではないヌクレオチド3リン酸が包含されるがこれらに限定されるものではない任意の一般的なホスフェート源であることができる。好ましい態様として、ホスフェート源は、その上に検出可能な標識を結合しており、この標識は、反応中にキナーゼ基質にリン酸基とともに導入される。このように、リン酸化基質は検出可能な標識を含有し、一方、非リン酸化基質は標識を含有しない点においてリン酸化キナーゼ基質を非リン酸化キナーゼ基質と区別することができる。別の態様として、ホスフェート源は、その上に検出可能な標識を結合しておらず；その代わりに、リン酸化キナーゼ基質は、例えば、抗体により、基質の一方の形態を認識するが、もう一方を認識しないことにより、非リン酸化キナーゼ基質と区別することができる。

【0064】

本発明の方法において有用な検出可能な標識には、プロテインキナーゼ活性の結果としてキナーゼ基質にそれへのリン酸基の導入の際に導入される任意の既知のもしくはこれまで知られていない検出可能な標識を包含することができる。

【0065】

有用な標識には、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{31}\text{S}$ のような放射性標識、およびビオチンなどのような非放射性標識が包含されるが、これらに限定されるものではない。

【0066】

別の態様として、本発明は、細胞におけるCRHシグナリング応答活性を改変することができる化合物を同定する方法を提供し、該方法は；

a) 配列番号36および配列番号38よりなる群から選択されるホスファターゼおよび適当なリン酸化基質を含んでなる混合物を接触させること；

b) 該混合物を該化合物の有無でインキュベーションすることおよび；該試験化合物のない場合の該基質のリン酸化のレベルと比較して該化合物の存在下での該基質のリン酸化のレベルを測定すること

を含んでなる。

【0067】

キナーゼアッセイでのように、本発明のアッセイにおけるホスファターゼはタンパク質として提供することができる、もしくは該ホスファターゼをコードするmRNAとしてアッセイ混合物において提供することができる。リン酸化基質は、典型的に、検出可能なリン酸残基で標識される。有用な標識には、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{31}\text{S}$ のような放射性標識、およびビオチンなどのような非放射性標識が包含されるがこれらに限定されるものではない。ホスファターゼ活性アッセイにおける使用には、基質は、好ましくは、典型的には $^{32}\text{P}$ で標識される、チロシンもしくはセリン残基でリン酸化される、ペプチド基質からなる。一

10

20

30

40

50

般に、リン酸化は様々な方法で実施することができる。典型的には、プロテインチロシンキナーゼを用いる。例えば、 $^{32}\text{P}$ で標識したATPと組み合わせた可溶性EGF受容体キナーゼを本発明のペプチド上のチロシン残基をリン酸化するために用いることができる。そのようなリン酸化反応は、典型的に、30分で約2時間もしくは室温で一晩にわたって進行させる。次に、以下に「ホスホペプチド」と称するリン酸化ペプチドをリン酸化反応混合物から精製する。例えば、ペプチドは、トリクロロ酢酸の添加および遠心分離により反応混合物から分離することができ、ここで、ペプチドは上清に残る。ペプチドは、一般に、カラムクロマトグラフィーにより、例えばC18上でさらに精製される。精製されたリン酸化ペプチドを凍結乾燥し、そして使用前に $-20^\circ\text{C}$ で保存することができる。

#### 【0068】

インキュベーション後に、脱リン酸化されないホスホペプチド（「非脱リン酸化ホスホペプチド」）をホスホペプチドの脱リン酸化により遊離される放射活性から（すなわち、脱リン酸化により遊離される遊離の放射性リンから）分離する。本明細書において用いる場合、「放射性リン」という用語には、放射性リン原子がチロシン残基上に存在しそして脱リン酸化により取り除かれることができる（例えばリン酸基として）全ての形態が包含される。典型的に、ホスホペプチドの脱リン酸化により遊離される遊離の放射性リンからの非脱リン酸化ホスホペプチドの分離は、非放射性ホスフェートおよび木炭を含む物質の添加による脱リン酸化反応の停止後に、遠心分離によりもたらされる。上清における放射活性は、当業者に周知である手段により決定される。ホスホペプチドによって最初にアッセイ混合物に加えられた放射活性の量および脱リン酸化により遊離される放射活性としてアッセイの最後に検出される放射活性の量に基づいて、アッセイするサンプルのホスファターゼ酵素活性を計算することができる。

#### 【0069】

また、細胞におけるCRHシグナリング応答活性を改変することができる化合物を同定する方法を提供することも本発明の態様であり、該方法は；

- a) 配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32および配列番号34よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる少なくとも1つのタンパク質を発現する細胞を該試験化合物と接触させること；および
  - b) 該化合物の有無で、該細胞におけるcAMP、cGMP、 $\text{Ca}^{2+}$ もしくは $\text{IP}_3$ のような二次メッセンジャーのレベルを比較すること
- をふくんでなる。

#### 【0070】

二次メッセンジャーのレベルは、上記のタンパク質の1つを含んでなる全細胞もしくは細胞抽出物のいずれかにおいて当該技術分野で既知の技術を用いて決定することができる。

#### 【0071】

細胞におけるCRHシグナリングを改変することができる化合物を同定するさらなる方法は、遺伝子プロモーターもしくは調節配列要素が転写因子結合部位を含んでなることを特徴とする遺伝子プロモーターもしくはその調節配列要素に操作可能に連結された、レポーター遺伝子のような、遺伝子の使用に基づき、ここで、該転写因子は細胞におけるCRHシグナリングを調節することができる。好ましい態様として、細胞におけるCRHシグナリングを調節することができる転写因子は、配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8から選択されている。従って、本発明は、上記に定義するような遺伝子プロモーター領域を含んでなる組み換えDNA分子を提供する。該組み換えDNA分子において、プロモーター領域は、レポーター遺伝子のような、検出可能な生成物をコードする核酸分子に操作可能に連結することができる。「操作可能に連結される」という用語は、本明細書において用いる場合、プロモーターの制御下で遺伝子を発現するために適切なフレームで遺伝子とプロモーターとを機能的に融合させることを意味する。本明細書において用いる場合、「レポーター遺伝子」という用語は、簡単な安価な方法もしくは試薬を用いて同定することができそしてプロモーター領域もしくはその活性フラグメントに操作可能

10

20

30

40

50

に連結することができる遺伝子産物をコードする遺伝子を意味する。例えば、ホタルルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、細菌クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼもしくは緑色蛍光タンパク質レポーター遺伝子のようなレポーター遺伝子を本発明のスクリーニングアッセイにおいて転写活性を決定するために用いることができる（例えば、Goeddel(ed.), *Methods Enzymol.*, Vol. 185, San Diego: Academic Press, Inc. (1990)を参照；また、Sambrook, 上記も参照）。好ましい態様として、レポーター遺伝子はホタルルシフェラーゼ遺伝子である。本発明はまた、上記に定義するような組み換えDNA分子を含んでなるベクター、ならびにそのようなベクターでもしくは一般に本発明の組み換えDNA分子で安定に形質転換した宿主細胞も提供する。「ベクター」という用語は、宿主細胞による外因性DNAの複製および/もしくは適切な発現のために宿主細胞にDNAを導入するのに有用な外因性DNAの任意のキャリアをさす。従って、特定の態様として、該ベクターは、pGL3Luc、pBLCAT5(LMBP2451)、pGMCsFlacZ(LMBP2979)、pEGFPもしくはpSEAPbasic(DMB3115)のような発現ベクターであり、ここで、LMBPおよびDMB番号は、Belgian Co-ordinated Collections of Microorganismsでのこれらの発現ベクターの受託番号をさす。

#### 【0072】

別の態様として、本発明は、CRHシグナリング活性を調節する化合物の同定の方法を提供し、該方法は：(i)上記に定義するような遺伝子プロモーター領域と候補因子とを接触させる段階；および(ii)該候補因子が、検出可能な生成物の発現を調節するかどうかを決定する段階（そのような調節は、CRHシグナリング活性を調節することができる因子の指標である）を含んでなる。検出可能な生成物は、遺伝子によりコードされるタンパク質またはルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼもしくは緑色蛍光タンパク質のようなレポーター遺伝子の生成物のいずれかをさす。検出可能な生成物を定量する方法は、当該技術分野において一般に既知であり、そしてとりわけ、発現生成物が酵素である場合には比色定量基質の使用、RIAもしくはELISAアッセイにおける特異的抗体の使用またはプロモーターに操作可能に連結された遺伝子から転写されるmRNAのレベルの測定（ここで、該mRNAは標準的な方法を用いて直接的にもしくは間接的に測定することができる）が包含される。好ましくは、遺伝子プロモーターは、配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8よりなる群から選択される転写因子の転写因子結合部位を含んでなる。

CRHシグナリングを調節することができるタンパク質をコードする核酸配列の同定

別の態様として、本発明は、CRHシグナリングを調節することができるタンパク質をコードする単離されそして精製された核酸分子に関し、ここで、該核酸分子はRNA、DNA、cDNAもしくはゲノムDNAのいずれかである。

#### 【0073】

特に、本発明には：

- (a) 配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに少なくとも70%の同一性を有するCRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする核酸分子；
  - (b) (a)のポリヌクレオチドに相補的な核酸分子；
  - (c) (a)もしくは(b)のポリヌクレオチドの少なくとも15個の連続塩基を含んでなる核酸分子；
  - (d) (a)もしくは(b)のポリヌクレオチド分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子；および
  - (e) (a)~(d)のいずれかのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に対して遺伝暗号の結果として縮重しているヌクレオチド配列を含んでなるCRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする核酸分子
- よりなる群から選択されるメンバーを含んでなる単離されそして精製された核酸分子が包

含まれる。

【0074】

遺伝暗号の縮重のために、コードされるアミノ酸（1つもしくは複数）もしくはタンパク質生成物の同一性を改変せずに配列番号：45、配列番号：47もしくは配列番号：49として同定される配列にヌクレオチド塩基対の多数の「サイレント」置換を導入できることを当業者は認識する。全てのそのような置換は、本発明の範囲内であるものとする。

【0075】

さらなる態様として、本発明は、ヒトプリンパーミアゼポリヌクレオチドに関する。そのようなポリヌクレオチドには、配列番号：46および配列番号：48よりなる群から選択されるアミノ酸配列に対して、該アミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより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をコードする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が包含される。この関連において、少なくとも97%の同一性を有するポリペプチドは非常に好ましく、一方、少なくとも98~99%の同一性を有するものはさらに非常に好ましく、そして少なくとも99%の同一性を有するものは最も非常に好ましい。そのようなポリヌクレオチドには、配列番号45、配列番号47もしくは配列番号49から選択されるポリヌクレオチド配列から本質的になるポリヌクレオチドが包含される。

【0076】

従って、さらなる態様として、本発明は：

a) 配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、なおさらに好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

b) 配列番号45、配列番号47および配列番号49よりなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、該ポリヌクレオチドの全長にわたって、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、なおさらに好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するヌクレオチド配列；

c) 配列番号45、配列番号47および配列番号49よりなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、該ポリヌクレオチドの全コーディング領域にわたって、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、なおさらに好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するヌクレオチド配列；および

d) 配列番号45、配列番号47および配列番号49よりなる群から選択されるポリヌクレオチドからなる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提供する。

【0077】

上記に概説するようなポリヌクレオチドは、特に、本発明のスクリーニング方法もしくは診断方法における使用のために提供される（特に、細胞におけるCRHシグナリングを調節することができる（化合物を）同定するためにもしくは個体における改変されたCRH代謝を診断するために）。

【0078】

同一性もしくは類似性は、当該技術分野において既知であるように、配列を比較することにより決定されるような、2つもしくはそれ以上のポリペプチド配列または2つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当該技術分野において、同一性はまた、場合によっては、そのような配列のストリング間のマッチにより決定されるような、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度も意味する。同一性および類似性は両方とも容易に計算することができる（Computational Mo

10

20

30

40

50

l e c u l a r B i o l o g y , L e s k , A . M . , e d . , O x f o r d U n i  
v e r s i t y P r e s s , N e w Y o r k , 1 9 8 8 ; B i o c o m p u t i n g  
: I n f o r m a t i c s a n d G e n o m e P r o j e c t s , S m i t h , D  
. W . , e d . , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k , 1 9 9 3 ; C o m  
p u t e r A n a l y s i s o f S e q u e n c e D a t a , P a r t I , G  
r i f f i n , A . M . , a n d G r i f f i n , H . G . , e d s . , H u m a n a  
P r e s s , N e w J e r s e y , 1 9 9 4 ; S e q u e n c e A n a l y s i s  
i n M o l e c u l a r B i o l o g y , v o n H e i n j e , G . , A c a d e m i c  
P r e s s , 1 9 8 7 ; および S e q u e n c e A n a l y s i s P r i  
m e r , G r i b s k o v , M . a n d D e v e r e u x , J . , e d s . , M S t  
o c k t o n P r e s s , N e w Y o r k , 1 9 9 1 ) 。 2 つのポリヌクレオチドも  
しくは2つのポリペプチド配列間の同一性および類似性を測定する多数の方法があるが、  
両方の用語は当業者に周知である ( S e q u e n c e A n a l y s i s i n M o l  
e c u l a r B i o l o g y , v o n H e i n j e , G . , A c a d e m i c P r  
e s s , 1 9 8 7 ; S e q u e n c e A n a l y s i s P r i m e r , G r i b s k  
o v , M . a n d D e v e r e u x , J . , e d s . , M S t o c k t o n P r e s  
s , N e w Y o r k , 1 9 9 1 ; および C a r i l l o , H . , a n d L i p m a  
n , D . , ( 1 9 8 8 ) S I A M J . A p p l i e d M a t h . , 4 8 , 1 0 7 3 )  
。 配列間の同一性もしくは類似性を決定するために一般に用いられる方法には、 C a r i  
l l o , H . , a n d L i p m a n , D . , ( 1 9 8 8 ) S I A M J . A p p l i e  
d M a t h . , 4 8 , 1 0 7 3 に開示されているものが包含されるが、これらに限定され  
るものではない。 同一性を決定するための好ましい方法は、試験する配列間の最大のマ  
ッチを与えるように設計される。 同一性および類似性を決定する方法は、コンピューター  
プログラムにおいて体系化される。 2 つの配列間の同一性および類似性を決定するための  
好ましいコンピュータープログラム方法には、 G C G プログラムパッケージ ( D e v e r  
e u x , J . , e t a l . , ( 1 9 8 4 ) N u c l e i c A c i d s R e s e a r c  
h 1 2 ( 1 ) , 3 8 7 ) 、 B L A S T P 、 B L A S T N および F A S T A ( A t s c  
h u l , S . F . e t a l . , ( 1 9 9 0 ) J . M o l e c . B i o l . 2 1 5 , 4 0  
3 ) が包含されるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0079】

C R H 活性を調節することができるタンパク質もしくはそのフラグメントをコードする  
核酸配列は、脳、心臓、腎臓、膵臓、肝臓および皮膚のようなしかしこれらに限定される  
ものではない、該遺伝子が発現される組織から単離することができる。 該配列はまた、ヒ  
トおよびマウス以外の哺乳類から単離することもできる。 他の細胞および細胞系もまた、  
哺乳類プリンパーミアーズ c D N A を単離するために使用するのに適当であることができる。  
適当な細胞の選択は、本明細書に記述するように、細胞抽出物においてもしくは全細胞  
アッセイにおいて C R H 調節活性をスクリーニングすることにより行うことができる。  
これらのアッセイのいずれか1つにおいて C R H 調節活性を保有する細胞は、プリンパー  
ミアーズ D N A もしくは m R N A の単離に適当であることができる。

#### 【0080】

本発明のタンパク質をコードする D N A を分子クローニングするために当該技術分野に  
おいて既知である様々な方法のいずれかを用いることができる。 1 つの方法として、 m R  
N A を単離し、そして第一鎖 c D N A 合成を実施する。 2 回目の D N A 合成を第二鎖の生  
成のために実施することができる。 次に、 C R H シグナリングを調節する精製されたタン  
パク質のアミノ酸配列からの縮重オリゴヌクレオチドプライマーの設計による D N A フラ  
グメントの特異的 P C R 増幅によって、単離された c D N A を得ることができる。 必要に  
応じて、二本鎖 c D N A を任意の適当なベクター、例えばプラスミドにクローン化し、そ  
れにより c D N A ライブラリーを生成せしめることができる。 別の方法は、配列番号 1、  
配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列  
番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、

10

20

30

40

50

配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47 もしくは配列番号 49 の任意の適当な領域を標的とする標識オリゴヌクレオチドプローブでバクテリオファージもしくはプラスミドシャトルベクターにおいて構築した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることである。例えば、PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis et al., Academic Press (1990) を参照。

【0081】

原核もしくは真核細胞における増殖のためにプラスミドもしくはファージのような適当なベクターにおいて cDNA ライブラリーを構築する方法は、当業者に周知である [例えば、Maniatis et al. 上記を参照]。適当なクローニングベクターは周知であり、そして広く利用可能である。

10

【0082】

他のタイプのライブラリー、ならびに他の細胞もしくは細胞タイプから構築されるライブラリーが、本発明の核酸配列を単離するために有用であり得ることは当業者に容易に明らかである。他のタイプのライブラリーには、他の細胞由来の、ヒトおよびマウス以外の生物由来の cDNA ライブラリー、ならびに YAC (酵母人工染色体) およびコスミドライブラリーを含むゲノム DNA ライブラリーが包含されるが、これらに限定されるものではない。ゲノム DNA ライブラリーの構築は、当該技術分野において周知である標準的な技術により行うことができる。周知のゲノム DNA ライブラリー構築技術は、T. Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed. Chap. 14 (1989) に見出すことができる。

20

【0083】

多くの場合において、単離された cDNA 配列は、ポリペプチドをコードする領域が cDNA の 5' 末端で足りない点において、不完全であることを当業者は認識する。これは、第一鎖 cDNA 合成中に mRNA 鋳型の DNA コピーを完成することができない、本質的に低い「伸長性 (processivity)」(重合反応中に鋳型に結合したままである酵素の能力の尺度) を有する酵素である逆転写酵素の結果である。

【0084】

全長の cDNA を得るか、もしくは短い cDNA を伸長するための利用可能なそして当業者に周知であるいくつかの方法、例えば、cDNA 末端の急速増幅法 (RACE) (Frohman et al., 1988, PNAS USA 85, 8998-9002)、もしくは Marathon<sup>TM</sup> 技術 (Clontech Laboratories Inc.) により例示される、この技術の最近の改変に基づくものがある。

30

【0085】

上記の方法により本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドをクローン化するためには、該核酸配列によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列が必要であり得る。これを実施するために、本発明のタンパク質を精製し、そして部分アミノ酸配列を自動シークエネーターにより決定することができる。全アミノ酸配列を決定する必要はないが、タンパク質からの 6~8 アミノ酸の 2 つの領域の直鎖状配列を部分 DNA フラグメントの PCR 増幅用のプライマーの製造のために決定する。

40

【0086】

いったん適当なアミノ酸配列が同定されると、それらをコードすることができる DNA 配列を合成する。遺伝暗号は縮重しているため、特定のアミノ酸をコードするために 1 個より多くのコドンを用いることができ、従って、アミノ酸配列は 1 組の同様の DNA オリゴヌクレオチドのいずれかによりコードすることができる。該組の 1 つのメンバーのみが本発明のポリヌクレオチド配列と同一であり、そして mismatches を有する DNA オリゴヌクレオチドの存在下でさえ、所望のタンパク質をコードする DNA にハイブリダイズすることができる。これらの方法により単離される DNA は、様々な細胞タイプからの、無脊椎動物および脊椎動物起源からの DNA ライブラリーをスクリーニングするために、そし

50

て相同遺伝子を単離するために用いることができる。

#### ポリペプチド

さらなる態様として、本発明は、CRHシグナリングを調節する実質的に純粋な形態のポリペプチドに関し、ここで、該ポリペプチドは、本発明の単離されそして精製された核酸分子によりコードされる。好ましい態様として、ポリペプチドは、配列番号46、配列番号48およびその機能的アナログよりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

#### 【0087】

本発明のタンパク質は、本発明の核酸によりコードされる、該分子によりコードされるポリペプチドを包含しそして保存的アミノ酸変化を有する、全ての可能なアミノ酸バリエーションを含む。

#### 【0088】

CRHシグナリングを調節するタンパク質は、例えば、ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅もしくはデノボDNA合成を包含する複数の組み換えDNA技術により得ることができることを当業者は認識する(例えば、T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Chap. 14 (1989)を参照)。

#### 【0089】

CRHシグナリングを調節する精製された生物学的活性タンパク質は、いくつかの異なる物理的形態を有することができる。本発明のポリペプチドは、全長の新生のもしくはプロセッシングされていないポリペプチドとして、または部分的にプロセッシングされたポリペプチドもしくはプロセッシングされたポリペプチドの組み合わせとして存在することができる。全長の新生ポリペプチドは、とりわけ、全長の新生ポリペプチドのフラグメントの形成をもたらす特異的タンパク質分解切断事象により、翻訳後に修飾されることができる。フラグメント、もしくは複数のフラグメントの物理的会合は、本発明のタンパク質と関連する完全な生物学的活性を有することができ；しかしながら、CRH調節活性の程度は、個々のフラグメント間で異なり得る。

#### 【0090】

また、本発明のこの態様において好ましいのは、ポリペプチドの構造もしくは機能特性を特徴とするフラグメントである。この点において本発明の好ましい態様には、本発明のポリペプチドのヘリックスおよびヘリックス形成領域、シートおよびシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、フレキシブル領域、表面形成領域、基質結合領域、高抗原性指数(high antigenic index)領域を含んでなるフラグメントおよびそのようなフラグメントの組み合わせが包含される。好ましい領域は、本発明のポリペプチドの活性を媒介するものである。この点において最も非常に好ましいのは、同様の活性もしくは向上した活性を有するか、または減少した望ましくない活性を有するものを包含する、本発明の応答調節因子ポリペプチドの化学的、生物学的もしくは他の活性を有するフラグメントである。

CRH活性を調節するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの組み換え発現

別の態様として、本発明のポリヌクレオチドは、適当なプロモーターおよび他の適切な転写調節要素を含有する発現ベクターへの分子クローニングにより組み換え的に発現し、そしてCRHシグナリングを調節するタンパク質を製造するために原核もしくは真核宿主細胞に導入することができる。そのような操作の技術は、Maniatis, T. et al., 上記に十分に記述されており、そして当該技術分野において周知である。

#### 【0091】

従って、さらなる態様として、本発明は、組み換え宿主におけるCRHシグナリングを調節するタンパク質の発現のための発現ベクターを提供し、ここで、該ベクターは、CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする核酸配列およびその機能的アナログを含有する。本発明のさらに好ましい態様として、この発現ベクターは、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49およびその機能的アナログよりなる群から選択される又

10

20

30

40

50

クレオチド配列を有する、CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする核酸分子を含有するか、もしくはCRHシグナリングを調節するタンパク質をコードするゲノムDNAを含有する。

【0092】

発現ベクターは、適切な宿主における遺伝子のクローン化コピーの転写およびそれらのmRNAの翻訳に必要とされるDNA配列と本明細書において定義する。そのようなベクターは、エシェリキア・コリ (*E. coli*) を包含する細菌、シアノバクテリア、植物細胞、昆虫細胞、両生類細胞、酵母細胞を包含する真菌細胞、および動物細胞のような様々な宿主において真核生物遺伝子を発現するために用いることができる。

【0093】

特に設計されたベクターは、細菌 - 酵母もしくは細菌 - 動物細胞もしくは細菌 - 真菌細胞もしくは細菌 - 無脊椎動物細胞のような宿主間のDNAの往復を可能にする。適切に構築された発現ベクターは：宿主細胞における自律複製のための複製起点、選択可能なマーカー、限られた数の有用な制限酵素部位、高コピー数の潜在能力、および活性プロモーターを含有することができる。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合しそしてRNA合成を開始するように導くDNA配列と定義する。強力なプロモーターは、mRNAを高頻度で開始させるものである。発現ベクターには、クローニングベクター、改変されたクローニングベクター、特に設計されたプラスミドもしくはウイルスを包含することができるが、これらに限定されるものではない。

【0094】

CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする、本発明の単離されそして精製された核酸分子は、組み換え宿主細胞における発現のために発現ベクターにクローン化することができる。組み換え宿主細胞は、エシェリキア・コリのような細菌、酵母のような真菌細胞、ゼノバス卵母細胞のような両生類細胞、ヒト、ウシ、ブタ、サルおよびげっ歯類由来の細胞系が包含されるがこれらに限定されるものではない哺乳類細胞、ならびにドロソフィラおよびカイコ由来の細胞系が包含されるがこれらに限定されるものではない昆虫細胞が包含されるがこれらに限定されるものではない、原核生物もしくは真核生物のものであることができる。適当であることができそして市販されている哺乳類種由来の細胞系には、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127I (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26)、MRC-5 (ATCC CCL 171)、L細胞、神経芽細胞腫、グリア細胞およびHEK-293 (ATCC CRL 1573) が包含されるが、これらに限定されるものではない。

【0095】

従って、さらなる態様として、本発明はCRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする組み換え的にクローン化された核酸分子もしくはその機能的アナログを含有する組み換え宿主細胞に関する。さらなる態様として、本発明の組み換え宿主細胞は、ゲノムDNAであるかもしくは(配列番号：45)；(配列番号：47)；(配列番号：49)；およびその機能的アナログよりなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸分子を含有する。

【0096】

発現ベクターは、形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポフェクションおよび電気穿孔が包含されるがこれらに限定されるものではない多数の技術のいずれか1つによって宿主細胞に導入することができる。発現ベクターを含有する細胞をクローニング的に増やし、そしてそれらがCRHシグナリングを調節するタンパク質を生産するかどうかを決定するために分析する。パーミアーゼを発現する宿主細胞クローンの同定は、本発明のポリペプチドに対する抗体との免疫学的反応性および宿主細胞に関連する哺乳類プリンパーミアーゼ活性の存在が包含されるがこれらに限定されるものではない、いくつ

10

20

30

40

50

か的手段により行うことができる。

【0097】

従って、本発明はまた、本明細書に概説するような発現ベクターからのCRHシグナリングを調節するタンパク質の発現を可能にする条件下で本発明の宿主細胞を培養することを含んでなる、組み換え宿主細胞におけるCRHシグナリングを調節するタンパク質の発現の方法にも関する。本発明のタンパク質は、直接発現により、または自己、酵素的もしくは化学的切断により取り除くことができる別のタンパク質もしくはペプチドとの翻訳融合物として興味のあるタンパク質を含んでなる融合タンパク質として合成することができる。従って、特定の態様として、本発明は、該ポリペプチドが融合タンパク質の一部である本発明のタンパク質を提供する。

10

【0098】

融合タンパク質としての発現は、寿命を延長し、所望のペプチドの収量を増加し、もしくは該タンパク質を精製する都合のよい手段を提供することが、組み換え系におけるある種のペプチドの製造においてしばしば認められる。これは、原核生物宿主において哺乳類タンパク質を発現する場合に特に該当する。特定の部位でポリペプチドを切断するか（例えば、エンテロキナーゼおよびトロンピン）、またはペプチドをペプチド鎖のアミノもしくはカルボキシ末端から消化する（例えば、ジアミノペプチダーゼ）様々なペプチダーゼが既知である。さらに、特定の化学物質（例えば、臭化シアン）は、ポリペプチド鎖を特定の部位で切断する。部位特異的内部切断部位を導入するためにアミノ酸配列（および組み換え手段を用いる場合には合成もしくは半合成のコーディング配列）に必要な改変を当業者は認識する。例えば、P. Carter, "Site Specific Proteolysis of Fusion Proteins", Chapter 13, Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes, American Chemical Society, Washington, D.C. (1990)を参照。

20

【0099】

さらに、例えば、上記のようなCRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする核酸分子をそのゲノムにすでに含んでなるが、それを発現しないかもしくは例えば弱いプロモーターのために適切に発現しない哺乳類細胞を用い、そしてその発現を誘導するために該哺乳類細胞に該プリンターミナーゼポリペプチドをコードする内在性核酸分子のすぐ近くに強力なプロモーターのような調節配列を導入することができる。

30

【0100】

異種の転写および/もしくは調節配列もしくはタンパク質の制御下のCRHシグナリングを調節するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する組み換え宿主細胞はそのようなものとして、本発明の別の態様である。

【0101】

これに関連して、「調節配列」という用語は、CRH調節タンパク質をコードする遺伝子のすぐ近くでの細胞のゲノムへのその組込みのために、プリンターミナーゼポリペプチドの発現を増加するために用いることができる核酸分子を意味する。そのような調節配列は、プロモーター、エンハンサー、不活性化サイレンサーイントロン配列、3'UTRおよび/もしくは5'UTRコーディング領域、タンパク質および/もしくはRNA安定化要素、CRH調節タンパク質をコードする遺伝子の発現を誘導するかもしくは引き起こすことができる調節タンパク質、例えば転写因子をコードする核酸分子または遺伝子発現を活性化しそして/もしくは遺伝子産物の量を増加することが既知である他の遺伝子発現制御要素を含んでなる。該調節配列の導入は、CRHシグナリングを調節するポリペプチドの発現の増加および/もしくは誘導を引き起こし、細胞における該ポリペプチドの増加した量の結果をもたらす。従って、本発明は、CRHシグナリングを調節するポリペプチドのデノボおよび/もしくは増加した発現を提供することを目的とする。

40

【0102】

50

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストランにより媒介されるトランスフェクション、カチオン性脂質により媒介されるトランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染もしくは他の方法によりもたすことができる。そのような方法は、Davis, Basic Methods In Molecular Biology (1986) のような多数の標準的な実験室マニュアルに記載されている。特に、CRHシグナリングを調節するポリペプチドは、実際には、組み換えベクターを欠く宿主細胞により発現することができると考えられる。

#### 【0103】

さらに、本発明のポリヌクレオチドの発現はまた、インビトロで製造された合成mRNAを用いて行うこともできる。合成mRNAもしくはCRHシグナリングを調節することができる細胞から単離されたmRNAは、小麦胚芽抽出物および網状赤血球抽出物が含まれるがこれらに限定されるものではない様々な無細胞系において効率よく翻訳することができ、同様にカエル卵母細胞への微量注入が含まれるがこれに限定されるものではない細胞に基づく系において効率よく翻訳することができ、カエル卵母細胞への微量注入が一般に好ましい。

10

#### トランスジェニック非ヒト動物

本発明はまた、生殖細胞、胚細胞、幹細胞もしくは卵またはそれら由来の細胞への本発明のポリヌクレオチドもしくはベクターの導入を含んでなる、トランスジェニック非ヒト動物、好ましくはトランスジェニックマウスの製造の方法にも関する。非ヒト動物は、本明細書に記載する本発明のスクリーニング方法に従って用いることができ、そして非トランスジェニックの健康な動物であることができ、またはリン酸摂取もしくは再吸収障害、好ましくはCRHシグナリングを調節するタンパク質における少なくとも1つの突然変異に起因する障害を有することができる。そのようなトランスジェニック動物は、例えば、上記のポリペプチドの突然変異体型と関連して薬剤の薬理学的研究によく適している。トランスジェニック胚の製造およびそれらのスクリーニングは、例えば、A. L. Joyner Ed., Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Pressにより記述されているように行うことができる。胚の胚膜のDNAは、例えば、適切なプローブでのサザンブロットを用いて分析することができる；上記参照。

20

#### 【0104】

好ましくは、本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、対応する哺乳類CRH調節タンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つの不活性化された野生型対立遺伝子をさらに含んでなる；上記参照。この態様は、例えば、CRH代謝の障害と関連する疾患の臨床症状の発現に関する本発明のポリペプチドの様々な突然変異体型の相互作用の研究を可能にする。トランスジェニック動物に関して以上に説明されている全ての適用は、2つ、3つもしくはそれ以上の導入遺伝子（例えば中性エンドペプチダーゼ（NEP）をコードする）を保有する動物にも当てはまる。トランスジェニック動物の発生および/もしくは生涯のある段階でCRHシグナリング発現もしくは機能を調節するタンパク質を不活性化することもまた望ましい可能性がある。これは、例えばCRHシグナリングを調節することができるタンパク質をコードするRNA転写産物に対するアンチセンスもしくはリボザイムの発現を導く例えば組織特異的、発生および/もしくは細胞調節性および/もしくは誘導性プロモーターを用いることにより行うことができる；同様に上記参照。適当な誘導系は、例えば、Gossen and Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992), 5547-5551) および Gossen et al. (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62) により記述されているような例えばテトラサイクリン調節性遺伝子発現である。同様に、CRHシグナリングを調節する突然変異体タンパク質の発現をそのような調節要素により制御することができる。

30

40

#### 【0105】

さらに、本発明はまた、本発明の核酸分子もしくはその一部を含有する（好ましくはそ

50

のゲノムに安定に組み込んだ)トランスジェニック哺乳類細胞にも関し、ここで、該核酸分子もしくはその一部の転写および/もしくは発現は、CRHシグナリングを調節するタンパク質の合成の減少をもたらす。

【0106】

好ましい態様として、該減少は、アンチセンス、センス、リボザイム、共抑制および/もしくは優性突然変異体効果により行われる。「アンチセンス」および「アンチセンスヌクレオチド」は、天然に存在する遺伝子産物の発現を阻止するDNAもしくはRNA構築物を意味する。

【0107】

本発明のポリヌクレオチドの提供は、上記のようなタンパク質の減少したレベルを有する、従って、リン酸代謝の欠損を有するトランスジェニック非ヒト動物を製造する可能性を広げる。これをいかにして成し遂げるかの技術は、当業者に周知である。これらには、例えば、アンチセンスRNA、リボザイムの、アンチセンスおよびリボザイム機能を組み合わせる分子の、そして/もしくは共抑制効果を与える分子の発現が包含される；同様に上記参照。細胞におけるCRHシグナリングを調節するタンパク質の量の減少にアンチセンス方法を用いる場合、アンチセンスRNAをコードする核酸分子は、好ましくは、形質転換に使用する動物種に関して相同な起源のものである。しかしながら、CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする内生的に存在する核酸分子に高度の相同性を示す核酸分子を用いることもまた可能である。この場合、相同性は好ましくは80%より高く、特に90%より高く、そしてさらにより好ましくは95%より高い。トランスジェニック哺乳類細胞における本発明のタンパク質の合成の減少は、例えばアデニン再吸収の改変をもたらすことができる。そのような細胞を含んでなるトランスジェニック動物において、これは様々な生理学的、発生的および/もしくは形態学的変化をもたらすことができる。

【0108】

従って、本発明はまた、上記のトランスジェニック細胞を含んでなるトランスジェニック非ヒト動物にも関する。これらは、例えば、以下の特徴：

- (a) CRHシグナリングを調節することができるタンパク質をコードする内在性遺伝子(1つもしくは複数)の破壊；
  - (b) 本発明のポリヌクレオチドを含んでなる転写産物に対する少なくとも(1つの)アンチセンスRNAおよび/もしくはリボザイムの発現；
  - (c) 本発明のポリヌクレオチドのセンスおよび/もしくは非翻訳mRNAの発現；
  - (d) 本発明の抗体の発現；
  - (e) 本発明の調節配列の機能性もしくは非機能性コピーの導入；または
  - (f) 本発明の組み換えDNA分子もしくはベクターの導入
- の少なくとも1つをもたらす外来DNAの安定なもしくは一時的な存在のために野生型動物と比較してCRH代謝の欠損を示すことができる。

【0109】

本発明のポリペプチド、それらのコードポリヌクレオチドおよびベクターを用いて、今度は、患者および罹患表現型のCRHシグナリングを調節するタンパク質における特定の突然変異に関して薬剤の効能をインビボおよびインビトロで研究することが可能である。さらに、本発明のポリペプチドの突然変異体は、CRH代謝に関連する障害の処置に、特にCRH誘発性ストレスもしくは鬱病の改善に有効であることができる薬剤の薬理学的プロファイルを決定するためにそしてさらなる薬剤の同定および製造に用いることができる。

【0110】

従って、本発明はまた、本発明のCRHシグナリングを調節することができるタンパク質をコードするポリペプチド、ポリヌクレオチドもしくはベクターの治療的に有効な量を哺乳類被験体に投与することを含んでなるCRH受容体関連障害を包含するCRH代謝の障害に関連する病状を予防する、処置するもしくは改善する方法にも関すると理解される

。 診断アッセイ

本発明はさらに、診断試薬としての本発明のポリヌクレオチドの使用に関する。機能障害と関連する配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47 もしくは配列番号 49 のポリヌクレオチドを特徴とする遺伝子の突然変異型の検出は、該遺伝子の不十分な発現、過剰発現または改変された空間的もしくは時間的発現に起因する疾患もしくは疾患へのかかりやすさの診断を加えるかもしくは特定することができるとして提供される。該遺伝子に突然変異を保有する個体は、様々な技術により DNA レベルで検出することができる。

10

## 【0111】

従って、本発明は：

- (a) 本発明のポリヌクレオチドにおける突然変異の有無を決定すること；および
- (b) 該突然変異の有無に基づいて病的症状もしくは病的症状へのかかりやすさを診断すること

を含んでなる CRH 活性の障害に関連する被験体における病的症状もしくは病的症状へのかかりやすさを診断する方法を提供することが理解される。診断のための核酸は、血液、尿、唾液、組織生検もしくは検視解剖材料のような、被験体の細胞から得ることができる。ゲノム DNA を検出に直接用いることができ、または分析の前に PCR もしくは他の増幅技術を用いることにより酵素的に増幅することができる。RNA もしくは cDNA もまた、同様に用いることができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較した増幅産物のサイズの変化により検出することができる。点突然変異は、標識した哺乳類プリンターミラーゼヌクレオチド配列に増幅 DNA をハイブリダイズすることにより同定することができる。好ましくは、マッチする配列を mismatch 二本鎖から RNアーゼ消化によりもしくは融点の違いにより区別することができる。DNA 配列の違いはまた、変性剤の有無で、キャピラリー電気泳動カラムもしくはゲルにおける DNA フラグメントの電気泳動移動度の改変により、またはダイレクト DNA シーケンスにより検出することもできる（例えば、Myers et al., Science (1985) 230: 1242）。特定の位置での配列変化はまた、特定の制限エンドヌクレアーゼ、RNアーゼおよび S1 保護のようなヌクレアーゼ保護アッセイもしくは化学切断方法により示すこともできる（Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401 を参照）。別の態様として、例えば遺伝子突然変異の効率のよいスクリーニングを行うために CRH 活性を調節することができるタンパク質をコードするヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技術方法は周知であり、一般的適用性を有し、そして遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変異性を包含する分子遺伝学における様々な問題に取り組むために用いることができる（例えば：M. Chee et al., Science, Vol 274, pp 610-613 (1996)）を参照）。

20

30

40

## 【0112】

診断アッセイは、記述する方法による CRH 調節タンパク質をコードする遺伝子における突然変異の検出によって疾患へのかかりやすさを診断するもしくは決定する方法を提供する。さらに、そのような疾患は、被験体から得られるサンプルからポリペプチドもしくは mRNA の異常に減少したもしく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、ならびに該サンプルから正常構造と比較してタンパク質誘導体の存在を決定することにより診断することができる。減少したもしくは増加した発現は、例えば；核酸増幅（例えば、PCR、RT-PCR による）；RNアーゼ保護；ノーザンブロッティングおよび他のハイブリダイゼーション方法のような、ポリヌクレオチドの定量のための当該技術分野において周知である方法のいずれかを用いて RNA レベルで測定することができる。

50

ホストから得られるサンプルにおける、本発明のポリペプチドのような、タンパク質のレベルを決定するために用いることができるアッセイ技術は、当業者に周知である。そのようなアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが包含される。タンパク質誘導體もしくはバリエーションの存在を決定するために用いることができるアッセイ技術は、とりわけ、質量分析法を含んでなる。

【0113】

従って、別の態様として、本発明は：

(a) 生物学的サンプルにおける本発明のポリペプチドもしくはその誘導體の存在もしくはその発現の量を決定すること；および  
 (b) ポリペプチドもしくはその誘導體の存在もしくはその発現の量に基づいて病的症状もしくは病的症状へのかかりやすさを診断すること  
 を含んでなる長期CRH暴露の障害に関連する被験体における病的症状もしくは病的症状へのかかりやすさを診断する方法を提供する。

10

【0114】

特に、本発明は、個体におけるCRH誘発性遺伝子発現プロファイルを診断する方法を提供し、該方法は：

a) 該個体の生物学的サンプルを得ること；および  
 b) 該生物学的サンプルにおける副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節する少なくとも1つのタンパク質の量を決定すること；  
 (ここで、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)シグナリングを調節するタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択される。)

20

を含んでなる。代替の態様として、CRH誘発性発現プロファイルを診断する方法は、本発明の少なくとも1つのタンパク質に限定されないが、CRHシグナリングに関与していると同定されるタンパク質、すなわち、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48のアミノ酸配列を有するタンパク質の群の発現レベルの同時評価を必要とする。

30

【0115】

好ましくは、該タンパク質の量は、好ましくはそれに結合する抗体を用いて、タンパク質レベルで、もしくは好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46および配列番号48よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに結合するプローブを用いて、遺伝子転写レベルで決定される。CRHシグナリングに関与するタンパク質の群の同時評価において、遺伝子発現のレベルはマイクロアレイ技術を用いて分析される。

40

【0116】

あるいはまた、CRH誘発性遺伝子発現プロファイルは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47もしくは配列番号49よ

50

りなる群から選択される核酸配列を含んでなる遺伝子の遺伝子転写のレベルを評価することにより決定される。遺伝子転写のレベルを決定する方法は上文に記述されており、そして好ましい態様として配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47もしくは配列番号49またはその相補物よりなる群から選択されるポリヌクレオチドに結合する、好ましくは選択的に結合するプローブの使用を含んでなる。別の態様として、個体のサンプルにおける遺伝子転写のレベルの効率のよいスクリーニングを行うために本発明のヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。

#### 【0117】

さらなる態様として、本発明は：

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49もしくはそのフラグメントのヌクレオチド配列；

(b) (a)のものに相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号：46、配列暗号：48もしくはそのフラグメントのポリペプチド；または

(d) 本発明のポリペプチドに対する、好ましくは、配列番号：46もしくは配列番号：48のポリペプチドに対する抗体および場合により検出のための適当な手段を含んでなる診断キットに関する。

#### 【0118】

任意のそのようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)もしくは(d)は、実質的な成分を含んでなることができることが理解される。そのようなキットは、疾患もしくは疾患へのかかりやすさ、特にCRH誘発性ストレスもしくは鬱病のようなCRH代謝関連障害を診断することにおいて有用である。

#### 【0119】

本発明のヌクレオチド配列はまた、染色体位置確認にも有用である。これらの配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的に標的とし、そしてそれとハイブリダイズすることができる。本発明による染色体への関連配列のマッピングは、それらの配列を遺伝子関連疾患と相関させることにおける重要な第一段階である。いったん配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の該配列の物理的位置を遺伝子地図データと相関させることができる。そのようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで利用可能)に見出される。次に、同じ染色体領域にマッピングされている遺伝子と疾患との関係を連鎖解析(物理的に隣接する遺伝子の共遺伝)によって同定する。本発明の遺伝子は、ヒト第15染色体にマッピングする。

#### 【0120】

罹患個体と非罹患個体とのcDNAもしくはゲノム配列の違いもまた決定することができる。突然変異が罹患個体のいくらかもしくは全てにおいて認められるが、正常個体では認められない場合、該突然変異は該疾患の原因因子であると思われる。

#### 【0121】

本発明のヌクレオチド配列はまた、組織位置確認にも有用である。そのような技術は、組織における本発明のポリペプチドの発現パターンの決定を、それらをコードするmRNAの検出により可能にする。これらの技術には、in situハイブリダイゼーション技術およびヌクレオチド増幅技術、例えばPCRが包含される。そのような技術は、当該技術分野において周知である。これらの研究からの結果は、生物におけるポリペプチドの正常機能の指標を提供する。

#### 【0122】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドもしくはそれらのフラグメントまたはそのアナログ、あるいはそれらを発現する細胞はまた、本発明のポリペプチドに免疫特異的な抗体を製造するために免疫原として用いることもできる。「免疫特異的な」という用語は、抗体が、先行技術における他の関連ポリペプチドに対するそれらの親和性より本発明のポリペプチドに対して実質的に大きな親和性を有することを意味する。

【0123】

従って、別の態様として、本発明は、哺乳類プリンパーミアーズと免疫学的に反応する単一特異性抗体を提供する。好ましい態様として、該抗体は、(配列番号: 46); (配列番号: 48); およびその機能的アナログよりなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと免疫学的に反応するか、もしくは該抗体は、CRHシグナリングを調節するタンパク質の活性を阻害する。

10

【0124】

本発明のポリペプチドに対して作製される抗体は、日常的プロトコルを用いて、該ポリペプチドもしくはエピトープ保有フラグメント、アナログまたはこれらを発現する細胞を動物、好ましくは非ヒト動物に投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の製造には、連続細胞系培養により生産される抗体を提供する任意の技術を用いることができる。例には、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)が包含される。

20

【0125】

米国特許第4,946,778号に記述されているもののような、一本鎖抗体の製造のための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造するために適応させることができる。また、ヒト化抗体を発現するためにトランスジェニックマウス、もしくは他の哺乳類を包含する他の生物を用いることもできる。

【0126】

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離するためもしくは同定するために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用いることができる。

30

【0127】

本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、CRH代謝関連障害を処置するために用いることもできる。

【0128】

さらなる態様として、本発明は、本発明のポリペプチドもしくはそのフラグメント、および様々なサブクラス(IgG、IgM、IgD、IgE)の免疫グロブリンの重鎖もしくは軽鎖の定常領域の様々な部分を含んでなる遺伝子工学によって作られた可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとして好ましいのは、ヒトIgG、特にIgG Iの重鎖の定常部分であり、この場合、融合はヒンジ領域で行われる。特定の態様として、Fc部分は、例えば血液凝固因子Xaで切断することができる切断配列の導入により簡単に取り除くことができる。さらに、本発明は、遺伝子工学によるこれらの融合タンパク質の製造方法に、そして薬剤スクリーニング、診断および治療のためのその使用に関する。本発明のさらなる態様はまた、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにも関する。融合タンパク質技術の例は、国際特許出願第WO94/29458号およびWO94/22914号に見出すことができる。

40

治療有用性

本発明のさらなる態様は、哺乳類ホストに導入した場合に、本発明のポリペプチドに対して該哺乳類において免疫学的応答を誘導する免疫学的/ワクチン製剤(組成物)に関し

50

、ここで、該組成物は本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含んでなる。ワクチン製剤はさらに、適当な担体を含んでなることができる。ポリペプチドは胃において分解され得るので、それは好ましくは非経口的に投与される（例えば、皮下、筋肉内、静脈内もしくは皮内注射）。非経口投与に適当な製剤には、酸化防止剤、バッファ、静菌剤および製剤をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有することができる水性もしくは非水性の滅菌した注射溶液；ならびに沈殿防止剤もしくは増粘剤を含むことができる水性および非水性の滅菌した懸濁剤が包含される。製剤は、単位用量もしくは複数用量容器、例えば、密閉アンプルおよびバイアルにおいて与えることができ、そして使用直前に滅菌した液状担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。ワクチン製剤はまた、水中油滴系および当該技術分野において既知である他の系のような、製剤の免疫原性を高めるためのアジュバント系を含むこともできる。投与量はワクチンの比活性により決まり、そして日常的な実験により容易に決定することができる。

10

#### 【0129】

さらに別の態様として、CRHシグナリングを調節するタンパク質をコードする遺伝子の発現は、発現ブロック技術を用いて阻害することができる。既知のそのような技術は、内部で作製されるかもしくは外部から投与されるいずれかの、アンチセンス配列の使用を伴う（例えば、O'Connor, J. Neurochem (1991) 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)を参照）。あるいはまた、遺伝子と三重らせん（「トリプレックス」）を形成するオリゴヌクレオチドを提供することができる（例えば、Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6:3703; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Dervan et al., Science (1991) 251:1360を参照）。これらのオリゴマーは、それ自体投与することができ、もしくは関連オリゴマーをインビボで発現することができる。合成アンチセンスもしくはトリプレックスオリゴヌクレオチドは、修飾塩基もしくは修飾バックボーンを含んでなることができる。後者の例には、メチルホスホネート、ホスホチオエートもしくはペプチド核酸バックボーンが包含される。そのようなバックボーンは、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もしくはトリプレックスオリゴヌクレオチドに導入され、そして当該技術分野において周知である。これらのおよび/もしくは他の修飾バックボーンで合成されるアンチセンスおよびトリプレックス分子もまた、本発明の一部をなす。

20

30

#### 【0130】

細胞における標的遺伝子の発現を阻害する別の方法として、部分的なもしくは完全に二本鎖の特徴を有するRNAを細胞にもしくは細胞外環境に導入する。阻害RNAを製造するために標的遺伝子の一部からのヌクレオチド配列を選択する点において阻害は特異的である。該RNAは、重合したリボヌクレオチドの1本もしくはそれ以上の鎖を含んでなることができ；それはホスフェート-糖バックボーンもしくはヌクレオシドのいずれかへの修飾を含むことができる。二本鎖構造は、単一の自己相補的RNA鎖もしくは2本の相補鎖により形成することができる。阻害は、RNAの二本鎖領域に対応するヌクレオチド配列が遺伝子阻害の標的となる点において配列特異的である。標的配列の一部と同一であるヌクレオチド配列を含有するRNAが好ましい。RNA阻害技術の例は、国際特許出願WO99/32619に見出すことができる。

40

#### 【0131】

さらに、CRHシグナリングを調節するタンパク質の発現は、該タンパク質をコードするmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることにより阻害することができる。リボザイムは、天然もしくは合成のものである触媒活性RNAである（例えば、Usman, N, et al., Curr. Opin. Struct. Biol (1996) 6(4), 527-33を参照）。合成リボザイムは、選択した位置で上記のmRNAを特異的に切断するように設計され、それにより機能性ポリペプチドへの該mRNAの翻訳を妨げるこ

50

とができる。リボザイムは、RNA分子に通常存在するように、天然のリボースホスフェートバックボーンおよび天然の塩基で合成することができる。あるいはまた、リボザイムは、リボヌクレアーゼ分解からの保護を与えるために非天然のバックボーンで合成することができ(例えば2'-O-メチルRNA)、そして修飾塩基を含有することができる。

#### 【0132】

CRHシグナリングを調節するタンパク質の不十分な発現と関連する異常な症状を処置するために、いくつかの方法もまた利用可能である。1つの方法は、製薬学的に許容しうる担体と組み合わせて、本発明のポリペプチド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被験体に投与してそれにより異常な症状を軽減することを含んでなる。あるいはまた、被験体における関連細胞による哺乳類プリンパーミアーゼの内因的生産をもたらすために遺伝子治療を用いることができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上記に説明するように、複製欠損性レトロウイルスベクターにおける発現用に設計することができる。次に、レトロウイルス発現構築物を単離し、そしてパッケージング細胞が今度は興味のある遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を生産するように本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージング細胞に導入することができる。これらの生産細胞は、インビボで細胞を設計することおよびインビボでのポリペプチドの発現のために被験体に投与することができる。遺伝子治療の概略は、Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (およびその中に引用される参考文献), Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996)を参照。別の方法は、適当な製薬学的担体と組み合わせて本発明のポリペプチドの治療量を投与することである。

#### 【0133】

さらなる態様として、本発明は、製薬学的に許容しうる担体もしくは賦形剤と組み合わせて、本発明のポリペプチドの可溶性形態のようなポリペプチド、アゴニスト/アンタゴニストペプチドもしくは小分子化合物の治療的に有効な量を含んでなる製薬学的組成物を提供する。そのような担体には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびその組み合わせが包含されるが、これらに限定されるものではない。本発明はさらに、本発明の上記の組成物の成分の1つもしくはそれ以上を詰めた1つもしくはそれ以上の容器を含んでなる製薬学的パックおよびキットに関する。本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独でもしくは治療化合物のような他の化合物とともに用いることができる。

#### 【0134】

組成物は、例えば全身もしくは経口経路による、投与の経路に適合させる。全身投与の好ましい形態には、典型的には静脈内注射による、注射が包含される。皮下、筋肉内もしくは腹腔内のような他の注射経路を用いることができる。全身投与の代わりに手段には、胆汁塩もしくはフシジン酸もしくは他の溶剤のような浸透剤を用いる経粘膜および経皮投与が包含される。さらに、本発明のポリペプチドもしくは他の化合物を腸溶性もしくはカプセル化製剤に調合することができる場合、経口投与もまた可能であることができる。これらの化合物の投与はまた、パッチ、軟膏、泥膏、ゲルなどの形態で、局所的および/もしくは局部的であることもできる。

#### 【0135】

必要な投薬量範囲は、本発明のペプチドもしくは他の化合物の選択、投与の経路、製剤の性質、被験体の症状の性質、および主治医の判断により決まる。しかしながら、適当な投薬量は、被験体のkg当たり0.1~100μgの範囲である。しかしながら、利用可能な化合物の多様性および様々な投与経路の異なる効率を考慮すると必要な投薬量の幅広いバリエーションが予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与より高い投薬量を必要とすると予想される。これらの投薬量レベルのバリエーションは、当該技術分

10

20

30

40

50

野において十分に理解されているように、最適化のための標準的な実験ルーチンを用いて調整することができる。

【0136】

処置に用いるポリペプチドはまた、上記のような「遺伝子治療」と呼ばれることが多い治療法において、被験体中で内生的に作製することもできる。従って、例えば、被験体からの細胞をエクスピボでポリペプチドをコードするようにDNAもしくはRNAのようなポリヌクレオチドで、そして例えばレトロウイルスプラスミドベクターの使用により操作することができる。次に、これらの細胞を被験体に導入する。

【実施例1】

【0137】

本発明は、以下の実験の詳細を参照することによりさらによく理解されるが、これらはその後続く請求項にさらに十分に記述されているような本発明を説明するにすぎないことを当業者は容易に理解する。さらに、本願の全体にわたって、様々な公開が引用される。これらの公開の開示は、本発明が関連する最新技術をさらに十分に記述するために本願に引用することにより本明細書に組み込まれる。

実験方法

細胞培養およびサンプル調製 - AtT-20細胞はATCCから購入し、そして10%のウシ胎仔血清、5%のウマ血清および4.5g/LのD-グルコースを含有するダルベッコ改変イーグル培地(Invitrogen Life Technologies)において加湿空気中5%のCO<sub>2</sub>において37℃で維持した。実験には、細胞を25cm<sup>2</sup> 20  
 フラスコに接種した。培地を48時間後に交換し、そして細胞を新しい培地において0.1%のDMSO、DMSO中1μMのCRH(Sigma)、DMSO中1μMのR121919もしくはDMSO中1μMのCRH+1μMのR121919のいずれかで0、0.5、1、2、4、8および24時間処理した。インキュベーション培地を吸引し、そして細胞の溶解のために3mlのトリゾール(Trizol)(Invitrogen Life Technologies)を加えることによりインキュベーションを止めた。全RNAを製造業者の説明書に従ってトリゾールを用いて抽出した。100μgの全RNAをカラム上でDNアーゼI処理とともにRneasyキット(Qiagen)を用いてさらに精製した。

マイクロアレイハイブリダイゼーション - cRNAを下記のように調製した。逆転写は、 30  
 T7-オリゴ(dT)<sub>24</sub>プライマーおよびSuperscript II RT(Invitrogen Life Technologies)を用いて10μgの全RNAで42℃で1時間行った。第二鎖cDNA合成は、エシエリキア・コリDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼおよびRNアーゼH(Invitrogen Life Technologies)を用いて16℃で2時間行った。フェーズロックゲル(Eppendorf)を用いたフェノール-クロロホルム抽出の後に、インビトロ転写をビオチン標識リボヌクレオチドでのBioarray高収量RNA転写産物ラベリングキット(Enzo Diagnostics)を用いて37℃で6時間行った。cRNAサンプルをQiagen Rneasyカラム上で精製し、続いて95℃で35分間断片化した。cRNA 40  
 収量は、50~100μgの間であった。サンプルをGeneChips(Affymetrix, Santa Clara, CA)上で処理した。各サンプルの品質を調べるために、5μgの標識cRNAをTest2アレイ上で行った。実際の実験は、UniGeneデータベース(Build 74)からの約12,000個の全長マウス遺伝子およびESTクラスターを調べるプローブ組を含有するマウスゲノムU74Av2アレイ上で行った。ハイブリダイゼーションは、15μgのcRNAを用いて連続回転下で45℃で16時間行った。アレイは、アフメトリックスフルイディクスステーションにおいてストレプトアビジン/フィコエリトリン(SAPE)を用いて染色し、続いて抗ストレプトアビジン抗体および二次SAPE染色で染色した。次に、アレイをHP-レーザーキャナ 50  
 ナーで走査し、そしてデータをMicroarray Suiteソフトウェア(Affymetrix)で解析した。この段階でスケールリングも正規化も行わなかった。実験の

10

20

30

40

50

質は、全てのサンプルにわたる提示コール ( p r e s e n t c a l l ) 率に基づいて評価し、それは平均して  $47.06 \pm 2.45\%$  であった。細胞質 - アクチンおよび G A P D H 5 ' / 3 ' 比は、それぞれ、 $1.10 \pm 0.08$  および  $0.93 \pm 0.05$  であった。

データ解析および遺伝子の選択

各アレイ上の生強度は、以下のグローバル平均アルゴリズムを用いてアライメントした：

【 0 1 3 8 】

【 数 1 】

$$\log I_{アライメント} = \log I_{生} + \left( \log \frac{\sum_{\text{全てのサンプル}} I_{生}}{\# \text{遺伝子} \times \# \text{サンプル}} - \log \frac{\sum_{\text{サンプル}} I_{生}}{\# \text{遺伝子}} \right)$$

10

【 0 1 3 9 】

基本的に、このアライメントは、全てのアレイにわたって測定される平均に対する1つのアレイの平均強度を定め、ハイブリダイゼーション、洗浄および染色におけるアレイごとのバリエーションを補正し、最終的にアレイ間の妥当な比較を可能にする。アライメント後に磨かれたデータを加重スペクトルマッピングを用いて解析した。加重スペクトルマッピングは、2つの最も高い主成分を表す特殊化した視覚化と組み合わせたデータのダブルセンタリング ( d o u b l e - c e n t e r i n g ) を含む非監視 ( u n s u p e r v i s e d ) 多変量解析法である。ダブルセンタリングは、アレイデータの「サイズ」成分を除くが、この情報は、それぞれのサンプルおよび遺伝子のサイズを表す記号の面積によって視覚化において再導入される。この方法は、大きいマイクロアレイデータセットの減少を可能にし、そしてデータにおける遺伝子および/もしくは対象のクラスターを視覚的に調べそしてそれにより同定する手段を提供する(7)。さらに詳細な解析は、OmniVizプログラムを用いて実施した。全ての実験において存在しなかった全ての記録を除き、そして20未満の全てのシグナルを20に設定した。CRH、R121919およびCRH+R121919処理の遺伝子発現倍数差を各時間点で計算した。これらの計算では比率を計算するためにDMSO処理サンプルにおける対応する時間点でのシグナルを用いた。

20

30

定量的RT-PCR-マイクロアレイデータを、リアルタイムPCR解析を用いて確かめた。第一鎖cDNA合成は、ランダムヘキサマープライマーおよびSuperscript II RT (Invitrogen Life Technologies)を用いて0.5 μgの全RNAで行った。定量的PCRは、Taqman PCRキットを用いてABI Prism 7700サイクラー (Applied Biosystems)で行った。cDNAの連続希釈物を用いて - アクチン、c-fos、Crh-R1、Crh-R2、Rgs2および興味のある遺伝子(配列は表2を参照)の濃度の対数に対する閾値サイクルの標準曲線を作製した。標準曲線から計算される線形回帰直線は、異なる時間点からのRNAサンプルにおける転写産物レベルの決定を可能にした。

結果

40

CRHへの転写応答をCRH-R1を発現するマウスAtT-20下垂体コルチコトコト由来腺腫細胞系において研究した。CRH-R1は、リアルタイム定量的RT-PCR (RTq) およびウェスタンブロットの両方により容易に検出可能であったが、CRH-R2発現はAtT-20細胞において認めることができなかった。CRH-R1特異的応答を同定するために細胞を1 μMのCRH、1 μMのCRH-R1特異的アンタゴニストR121919の存在下で1 μMのCRHに、そしてR121919のみにさらした。転写応答を第1の投与後24時間まで経時的に追跡した。処理効果を評価するために、アレイ実験を実施する前に異なる処理および時間点からのRNAでRTqによりc-fos mRNAレベルを決定した。以前の報告と一致して、CRHにさらすことは、0.5~1時間後にレベルがすでに下降する、c-fos転写の一時的な急増を引き起こした(図1

50

参照) (8; 9)。この応答は、R 1 2 1 9 1 9の存在下でほとんど完全に抑制された。興味深いことに、0.1%のDMSOにより誘導されるc-fos発現レベルは、しかしながら、CRHにより誘導される発現と比較して5~10倍の間低かった。

#### 【0140】

全ての時間点を、約12000個のマウス遺伝子およびESTを含有するマイクロアレイ上で解析した。スペクトルマッピング(いわゆる非監視法)を用いる発現プロファイルの全体的解析は、遺伝子発現の認められる変化の大部分を説明する進行時間を示唆した(図2参照)。代謝産物の蓄積および進行する細胞培養は追加の要因であるが、新しい培地および血清の添加により誘導されるこれらの培養物における細胞周期の同期化は、この現象を説明することができると思われる。スペクトルマップ解析はまた、CRH処理サンプルが主に初期の時間点において(0.5時間~2時間まで)他のサンプルと異なり、発現の全体的な違いは、8時間後に非常に小さくなることも示した。時間のこの明白な影響のために、発現測定は、DMSO処理コントロールサンプルの対応する時間点において認められるものに対して解析した。調節される遺伝子は、任意の1つの時間点で転写産物レベルの2倍より大きい変化を示すものと定義した。OmniViz Treescapビューを用いて、アンタゴニストでの処理と比較してCRHでの処理の後に発現の差異を示す、この基準を満たした111個の遺伝子を選択した。111個の遺伝子のうち26個は、CRHでの30分の処理後にすでに2倍の変化を示す、「初期レスポナー」であった。32個の遺伝子は、処理の1~2時間後に応答する「中間レスポナー」であり、そして53個の遺伝子は、処置後2時間もしくはそれ以上後に応答を示す「後期レスポナー」であった(図3参照)。これらの応答は、CRH-R1アンタゴニストR121919により抑制された。初期レスポナーの中には、転写因子Nurr1、Nurr77、Jun-BのようなCRH-R1の下流の経路における既知のプレーヤー(player)があり、アッセイを実証した。

10

20

#### 【0141】

同定される興味深い新規のプレーヤーには、転写因子(例えば、hairy/enhancer-of-split関連1(Hey1)、インターロイキン3により調節される核因子(NFIL3)、cAMP応答配列モジュレーター(CREM)および前立腺特異的ets転写因子(Pse)、受容体およびチャンネル調節因子(例えば、Ras関連GTP結合タンパク質(GEM)および受容体(カルシトニン)活性修飾タンパク質3(RAMP3)、分泌ペプチド(例えば、アドレノメジュリン、カルシトニン、コレシストキニン)ならびに細胞内シグナリングに關与するタンパク質(例えば、Gタンパク質シグナリングの調節因子2(Rgs2)、cAMP特異的ホスホジエステラーゼ4B(Pde4b)、イノシトール1,4,5-3リン酸受容体(IP<sub>3</sub>R1)および調節サブユニットホスファチジルイノシトール3-キナーゼ、p85)が包含される。他の興味深い調節される遺伝子は、ペリオドホモログPer1、繊維芽細胞増殖因子受容体2(Fgfr2)、血清/グルココルチコイド調節キナーゼおよび血清誘導性キナーゼを含んでなる(図4)。興味深いことに、上記の基準に従って同定される全てのレスポナーは、CRHにさらした後にアップレギュレーションされた。この誘導は一時的であり、そして誘導された遺伝子のほとんど全ては4~8時間後にベースラインに戻る。誘導された転写産物の多くは、CRH-R1シグナリングに負のフィードバックを及ぼすタンパク質をコードし(例えば、Pde4、Rgs2、CREMなど)、誘導の一時的な性質に寄与すると思われる。この負のフィードバックに加えて、リン酸化および内在化によるCRF<sub>1</sub>の脱感作のような他のメカニズムが転写誘導の一時的な性質に寄与する。この点において、CRFでのチャレンジがラット下垂体細胞においてCRF<sub>1</sub> mRNAを素早くダウンレギュレーションすることに留意することは興味深い。しかしながら、1μMのCRFにさらした下垂体由来AtT-20細胞におけるCRF<sub>1</sub> mRNAのいかなる改変も検出することはできなかった。マイクロアレイデータの確認は、ハイブリダイゼーション実験に用いるものと同じサンプルでそして反復実験で定量的リアルタイムPCR分析を用いて実施した。マイクロアレイにより同定される調節のレベルおよび時間経過は、図5においてRgs

30

40

50

2 について示すように定量的 PCR により認められるものと一致した。試験したこれらの遺伝子は、未処理のサンプルと比較した誘導のレベルを図 4 に示す。

#### 説明

CRH-R1 特異的アンタゴニストを用いて AtT-20 細胞において CRH-R1 の下流の転写経路を同定した。我々の結果は、CRH での刺激の際の cAMP および  $Ca^{2+}$  のようないくつかの二次メッセンジャーの活性化と一致する。転写応答のいくつかは、CREB のリン酸化およびその後の cAMP 応答配列の下流の遺伝子の転写により説明することができる。これらの配列は、例えば、Per1、Nurr1、CREM-ICER、c-Fos のプロモーターにおいて見出されている。さらに、これらの遺伝子の誘導の反応速度プロファイルは、cAMP 形成の 0.5 時間後の CREB による認められる最大転写速度と一致する。CREM-ICER の誘導は、cAMP への転写応答を弱めることにおける負のフィードバックメカニズムを構成する。興味深いのは、下垂体の中葉における急性ストレスに応答した CREM-ICER の報告される誘導である。CREM-ICER を欠損するマウスは、 $\beta$ -エンドルフィンレベルの慢性増加を示し、CREM-ICER 誘導がストレスに応答した遺伝子発現の調節に関与し得ることを示唆する (10)。

我々の結果は、CREM-ICER が CRH シグナリングの調節に直接関与し、そして結果として、CREM-ICER の除去がストレスシグナルへの改変された応答をもたらし得ることを示唆する。CRH シグナリングの別の新規な推定上の負のフィードバック調節因子は、Rgs2 である。我々は、CRH での刺激の際のこの遺伝子の初期応答挙動の可能な説明を与える、ヒト RGS2 遺伝子のプロモーターにおける 2 つの単一の CRE モチーフを同定した。我々の結果の裏づけとして、ホスホイノシチドシグナリングおよび cAMP の両方が、ヒト星状細胞腫および神経芽細胞腫細胞において Rgs2 mRNA の迅速で且つ一時的な増加を誘導することを示す最近の報告がある。Rgs2 タンパク質は、 $G_q$  機能の選択的インヒビターである。最近、Rgs2 は、 $G_q$  に作用することによってではなく、アデニルシクラーゼ III 型の活性を直接阻害することにより、臭気物質により誘発される cAMP 生産を減少することが示されている。Rgs2 は、最初は活性化 T リンパ球における前初期応答遺伝子として同定されたが、Rgs2 欠損マウスにおける研究は、これらのマウスが増加した不安および攻撃性を示すようにそれがストレス関連挙動の調節においても役割を果たすことを示唆する (11)。

cAMP 特異的ホスホジエステラーゼ 4B (Pde4b) の誘導もまた、cAMP シグナルを直接弱める、負のフィードバック下に分類することができる。CRH での刺激の際に生成される別の重要な二次メッセンジャーは、 $Ca^{2+}$  である。CRH は、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルを介した定常状態脱分極により刺激される細胞外  $Ca^{2+}$  流入を引き起こし、そしてイノシトール 1, 4, 5-3リン酸 (InsP3) 感受性  $Ca^{2+}$  プールからの放出によって細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇することが示されている (12)。

InsP3 受容体およびホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの p85 調節サブユニットは両方ともアップレギュレーションされ、長期の  $Ca^{2+}$  シグナリングの相殺メカニズムを説明すると思われる。低分子量 G タンパク質 kir/Gem のアップレギュレーションもまた、長期の  $Ca^{2+}$  シグナリングの減衰の方に向かせる。最近の研究により、Gem が補助サブユニットによって細胞膜で  $Ca^{2+}$  チャンネル発現を調節することが示されている。Gem の増加したレベルは、 $Ca^{2+}$  誘発性エキソサイトーシスを阻害することが示されており、そして Gem は  $Ca^{2+}$  過負荷に対する防御効果を有し得ることが提示されている。細胞内  $Ca^{2+}$  はまた、二次メッセンジャーとしてのその役割に加えて、遺伝子発現を調節することにおいて重要な役割を果たすことも示されている。興味深いのは、カルシニューリン/NFAT および Cam キナーゼシグナリングによる NFIL3/E4BP4 の調節であり、CRH 処理の際の NFIL3 mRNA レベルの増加を説明する。B リンパ球において、NFIL3 の発現は、Raf マイトジェン活性化プロテインキナーゼおよびホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ経路の両方を通してインターロイキン 3 により誘導される。この細胞タイプにおいて、NFIL3 は、Bcl-xL 依存性経路との相乗作用においてアポトーシスを抑制する。我々のデータは、AtT-20 細胞のアポトーシスの防止における N

10

20

30

40

50

F I L 3 の役割を示唆する。

【 0 1 4 2 】

C R H は、最も有効な A C T H 分泌促進薬である。残念なことに、使用したマイクロアレイは、P O M C レベルに関して調べなかった。しかしながら、コレシストキニン ( C C K ) ならびに 2 つのカルシトニンペプチドファミリーメンバー、アドレノメジュリン ( A D M ) およびカルシトニン ( C T ) のようないくつかの他のプレプロペプチド m R N A は、C R H 投与後にアップレギュレーションされることが見出された。また、この点において興味深いのは、R A M P 3 のアップレギュレーションである。R A M P は、カルシトニン受容体様受容体 ( C R L R ) の輸送およびグリコシル化を制御する。R A M P 3 の場合、C R L R と一緒にそれは A D M 受容体を生成することが示されている。この遺伝子のアップレギュレーションは、R A M P 3 が他の G 共役受容体を調節する可能性があるかどうか不明であるように C R H にさらした後の A D M へのもしくは他の細胞外刺激への A t T - 2 0 細胞の応答性を調節することにおいて役割を果たす可能性がある。C C K は A t T - 2 0 細胞により分泌されるが、C R H によるその発現の誘導はこれまで報告されていない ( 1 3 ) 。しかしながら、C C K と C R H との間の相互作用は詳細に研究されており、そしてパニック発作、鬱病、不安および胃内容排出において示されている ( 1 4 ~ 1 9 ) 。これらの実験の大部分は、C C K の中枢効果を媒介することにおける C R H の役割の方向に向かせる。我々のデータは、C R H がさらに C C K 分泌促進薬として機能する可能性があることを示唆する。C C K のものと非常に同じような状況は、アドレノメジュリンでも同様にそうであるように思われる。A D M は下垂体において発現され、そして動物における基礎および C R H により刺激される A C T H 放出に影響を及ぼすことが示されており、従って、視床下部 - 下垂体 - 副腎系を調節することにおけるその潜在的役割を示唆する ( 2 0 ~ 2 3 ) 。現在の発現データは、C R H が A D M および C T を誘導することを示す。さらに、最近の結果は、循環するアドレノメジュリンがクッシング病において増加され、そして下垂体が A D M の高められた生産の部位に相当し得ることを示し ( 2 4 ) 、C R H が A D M を誘導している可能性があることを示唆する。

10

20

【 0 1 4 3 】

要するに、我々は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 1 活性化遺伝子ネットワークの一部を解明し、そしてこのシグナリングカスケードのいくつかの新規な標的を同定した。我々の結果は、細胞および丸ごとの生物レベルの両方で C R H 刺激へのこれらの転写応答の機能を解明するためのさらなる実験の必要性を誘発する。

30

【 0 1 4 4 】

## 【表 1】

## 参考文献

1. De Souza EB 1995 Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:789-819
2. Holsboer F 2001 Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62:77-91 10
3. Holsboer F, Gerken A, Stalla GK, Muller OA 1987 Blunted aldosterone and ACTH release after human CRH administration in depressed patients. *Am J Psychiatry* 144:229-231
4. Holsboer F, Gerken A, von Bardeleben U, Grimm W, Beyer H, Muller OA, Stalla GK 1986 Human corticotropin-releasing hormone in depression--correlation with thyrotropin secretion following thyrotropin-releasing hormone. *Biol Psychiatry* 21:601-611
5. Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M 1988 Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 45:577-579 20
6. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF 1994 Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60:436-444
7. Wouters L, Göhlmann HW, Bijmens L, Kass SU, Molenberghs G, Lewi PJ 2002 Graphical exploration of gene expression data: a comparative study of three multivariate methods. *Biometrics* 30

【 0 1 4 5 】

## 【表 2】

8. Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL, Loeffler JP 1995 Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol Endocrinol* 9:745-755
9. Boutillier AL, Sassone-Corsi P, Loeffler JP 1991 The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 5:1301-1310 10
10. Mazzucchelli C, Sassone-Corsi P 1999 The inducible cyclic adenosine monophosphate early repressor (ICER) in the pituitary intermediate lobe: role in the stress response. *Mol Cell Endocrinol* 155:101-113
11. Oliveira-Dos-Santos AJ, Matsumoto G, Snow BE, Bai D, Houston FP, Whishaw IQ, Mariathasan S, Sasaki T, Wakeham A, Ohashi PS, Roder JC, Barnes CA, Siderovski DP, Penninger JM 2000 Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12272-12277 20
12. Tse A, Lee AK 2000 Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and intracellular Ca<sup>2+</sup> release regulate exocytosis in identified rat corticotrophs. *J Physiol* 528 Pt 1:79-90.:79-90
13. Beinfeld MC 1992 CCK mRNA expression, pro-CCK processing, and regulated secretion of immunoreactive CCK peptides by rat insulinoma (RIN 5F) and mouse pituitary tumor (AtT-20) cells in culture. *Neuropeptides* 22:213-217
14. Coskun T, Bozkurt A, Alican I, Ozkutlu U, Kurtel H, Yegen BC 1997 Pathways mediating CRF-induced inhibition of gastric emptying in rats. *Regul Pept* 69:113-120 30
15. Kellner M, Wiedemann K, Yassouridis A, Levengood R, Guo LS, Holsboer F, Yehuda R 2000 Behavioral and endocrine response to cholecystokinin tetrapeptide in patients with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 47:107-111
16. Geraciotti TD, Jr., Ekhaton NN, Nicholson WE, Arndt S, Loosen PT, Orth DN 1999 Intra- and inter-individual correlations between cholecystokinin and corticotropin-releasing hormone concentrations in human cerebrospinal fluid. *Depress Anxiety* 10:77-80
17. Calogero AE, Nicolosi AM, Moncada ML, Coniglione F, Vicari E, Polosa P, D'Agata R 1993 Effects of cholecystokinin octapeptide on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and on vasopressin, prolactin and growth hormone release in humans. *Neuroendocrinology* 58:71-76 40

【 0 1 4 6 】

## 【表 3】

18. Biro E, Sarnyai Z, Penke B, Szabo G, Telegdy G 1993 Role of endogenous corticotropin-releasing factor in mediation of neuroendocrine and behavioral responses to cholecystokinin octapeptide sulfate ester in rats. *Neuroendocrinology* 57:340-345
19. Kamilaris TC, Johnson EO, Calogero AE, Kalogeras KT, Bernardini R, Chrousos GP, Gold PW 1992 Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130:1764-1774 10
20. Shan J, Krukoff TL 2001 Intracerebroventricular adrenomedullin stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the sympathetic nervous system and production of hypothalamic nitric oxide. *J Neuroendocrinol* 13:975-984
21. Martinez V, Cuttitta F, Tache Y 1997 Central action of adrenomedullin to inhibit gastric emptying in rats. *Endocrinology* 138:3749-3755
22. Parkes DG, May CN 1995 ACTH-suppressive and vasodilator actions of adrenomedullin in conscious sheep. *J Neuroendocrinol* 7:923-929 20
23. Samson WK, Murphy T, Schell DA 1995 A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology* 136:2349-2352
24. Letizia C, Di Iorio R, De Toma G, Marinoni E, Cerci S, Celi M, Subioli S, D'Erasmus E 2000 Circulating adrenomedullin is increased in patients with corticotropin-dependent Cushing's syndrome due to pituitary adenoma. *Metabolism* 49:760-763

【 0 1 4 7 】

[ 表 1 ] C R H シグナリングを調節するタンパク質の一覧表。

30

【 0 1 4 8 】

【表4】

表1

CRHカチンクを調節することができるカチンクの一覧表		配列番号	NA	AA	タイトル	AC NT
転写因子	遺伝子記号	1	2	核因子、インターロイキン3により調節される	UB3148	
102955_at	NFL3	3	4	前立腺特異的 e. t. s 転写因子	AB019436	
104008_at	Pse	5	6	ヒリオトホモログ (トロソフィラ)	AF022892	
93619_at	Per	7	8	活性化転写因子3	U19118	
104155_1_at	Atf3					
キナーゼ		9	10	繊維芽細胞増殖因子受容体2	NM23362	
93090_at	Fgr2	11	12	血清ノグアルコルチコイド調節キナーゼ	NM_011361	
97890_at	Syk	13	14	セリン/トレオニンキナーゼ pim3	BC017621	
96841_at	Pim3	15	16	Fyn 癌原遺伝子	M27266	
100153_at	Fyn	17	18	血漿誘導性キナーゼ	NM_152804	
92310_at	Shk					
分泌因子		19	20	コレシストキニン	NM_031161	
96055_at	Cck	21	22	アドレノメジュリン	U77630	
102798_at	Adm	23	24	カルシトニン	X97991	
92533_at	Cl					
cAMPシグナリング		25	26	ホスホジエステラーゼ4B、cAMP特異的	NM_019840	
103610_at	Pde4b	27	28	Gタンパク質シグナリングの調節因子2	U67187	
97844_at	Rgs2	29	30	cAMP応答配列モジュレーター	M60265	
100533_s_at	Crem					
イノシトールシグナリング		31	32	イノシトール1,4,5-3リン酸受容体	X15373	
94977_at	IP3R1	33	34	細胞外Ca <sup>2+</sup> 濃度を調節する、ホリウム1(0857M77)		
96592_at	PKG1					
ホスファターゼ		35	36	プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、N	U11812	
104422_at	Ptpn	37	38	プロテインチロシンホスファターゼ、非受容体型16	X61940	
104598_at	Ptpn16					
受容体および細胞内調節因子		39	40	Ras関連GIP結合タンパク質	U10551	
92534_at	GemA1r	41	42	受容体 (カルシトニン) 活性化調節タンパク質3	A250481	
92368_at	Ramp3					
プロテアーゼ		43	44	ユビキチン特異的プロテアーゼ2	NM_016808	
92820_at	Usp2					
未知のもの		45	46	RIKEN cDNA 1300002F13遺伝子	NM_133753	
93914_at		47	48	IL-6/MMP-1、細胞外マトリックスに類似、carne.mGC:37790 IMAGE:5097591	A1255353	
96326_at		49		腫瘍壊死因子、α誘発性タンパク質3	NM_009397	
99392_at						

【0149】

10

20

30

40

【表 5】

表 2

β-アクチンフォワード	5'-CATCTTGGCCTCACTGTCCAC-3'
β-アクチンプローブ	5'-TGCTTGCTGATCCACATCTGCTGGA-3'
β-アクチンリバース	5'-GGGCCGGACTCATCGTACT-3'
c-fos フォワード	5'-GGGAGGACCTTACCTGTTCTGT-3'
c-fos プローブ	5'-CACCAGGCTGTGGGCTCAAGG-3'
c-fos リバース	5'-CCAGATGTGGATGCTTGCAA-3'
CRF <sub>2</sub> フォワード	5'-GGGAGAACAGAAAGCGCCTG-3'
CRF <sub>2</sub> プローブ	5'-AGAAGGGTGAGGATCCCCAAATCAGAGT-3'
CRF <sub>2</sub> リバース	5'-CCCTTGTTTCAATCACTCCCA-3'
CRF <sub>1</sub> フォワード	5'-TTTCTGAACAGTGAGGTCCGC-3'
CRF <sub>1</sub> プローブ	5'-CCGGAAGAGGTGGCGCGCA-3'
CRF <sub>1</sub> リバース	5'-GGGCTCTGATGGAGTGCTTG-3'
Rgs2 フォワード	5'-TTGGAAGACCCGTTTGAGCTA-3'
Rgs2 プローブ	5'-TCTTGCAAAATTCCTCTGCTCCTGGG-3'
Rgs2 リバース	5'-TTTCTTGCCAGTTTGGGCT-3'
Fgfr2 フォワード	5'-AGACTTCCATGGGAATGATAGCA-3'
Fgfr2 プローブ	5'-CCTCTCGTCCGGCAGCTGGC-3'
Fgfr2 リバース	5'-AATGTGTAAGCCGGCAGAA-3'
Mig-6 フォワード	5'-AATCCTTTGTCCAATACTGTACACACA-3'
Mig-6 プローブ	5'-GAAAAATGCACTGATCTCCGCA-3'
Mig-6 リバース	5'-GTATGAATAAATGAAGTTAAAACATGCT-3'
Pi3k フォワード	5'-CCATGGTGCTTGTTAACGCTTT-3'
Pi3k プローブ	5'-CCCAACTTGTAGCTGGTAAAGCTTCA-3'
Pi3k リバース	5'-CCTGTCTACCTTCTGGTCTCCAA-3'
Crem フォワード	5'-CTTGCTGATCGTCTGGAGAGTTT-3'
Crem プローブ	5'-TGCTGATGACCCTCCATTGTGA-3'
Crem リバース	5'-TTAACATTCTGAGGTTGCAAGAA-3'
Pde4b フォワード	5'-GCCGTGTGTATGGCTGCAT-3'
Pde4b プローブ	5'-CAGCCCCCAGGCCACTGTGG-3'
Pde4b リバース	5'-AGGAGGGATAACAGGTGCTGTGT-3'
CCK フォワード	5'-CCTGGACCCAGCCATAGA-3'
CCK プローブ	5'-AGCCCATGTAGTCCCGGTCACTTA-3'
CCK リバース	5'-TGCGCCGGCCAAA-3'
CT フォワード	5'-GCTTGGACAGCCCCAGATC-3'
CT プローブ	5'-GGTACTCAGATTCACACCCGCTT-3'
CT リバース	5'-TGTGTGTACGTGCCAGCAT-3'
Nfil-3 フォワード	5'-GCGAGTTTGAAGGCATGCA-3'
Nfil-3 プローブ	5'-CTCTCTTCACCCGCCGATGCGAT-3'
Nfil-3 リバース	5'-CCATGTTTCTCCAGGTCAAATG-3'
Ramp-3 フォワード	5'-TGGCAGACTCGGCTTCTGT-3'
Ramp-3 プローブ	5'-TTTGCTTTGGCCACACCTACCTGG-3'
Ramp-3 リバース	5'-CTGGTCGGGAGGACTTTGG-3'
SGK フォワード	5'-TGGACCAATGCCCCAGTT-3'
SGK プローブ	5'-TCAGTCAAAGCCGTTGGTGTTCATTG-3'
SGK リバース	5'-GCCCGTTTTATAGGTGACATTTAA-3'

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

【0150】

【図 1】異なる時間点（時間）の DMSO、CRH、CRH + R121919 もしくは R121919 で処理した AtT-20 細胞における β-アクチン mRNA レベル（100% と見なす）に対して正規化した定量的 RT-PCR により評価した場合の c-fos mRNA レベル。

【図 2】全ての時間点および処理の正規化したマイクロアレイデータに適用する対応分析。四角は異なるサンプルを示し、一方、丸は遺伝子を示す。四角の間の距離は、サンプル間の類似性の尺度である。既定サンプルと遺伝子との正の関連（すなわち、その特定のサンプルにおけるその遺伝子のアップレギュレーション）は、図心（十字で示す）を通した

共通線上の該遺伝子およびサンプルのポジショニングをもたらす。対応分析は、サンプル間の主要な識別子として明らかに時間を同定する。さらに、CRHでの処理の効果は、初期の時間点において最も顕著であると同定することができる。

【図3】CRH処理の際に変化している遺伝子を示すヒートマップ。値は、対応する時間点でのDMSOサンプルの強度で各サンプルの強度を割ることにより計算した。これらの計算された比率を $\log_2$ スケール単位を用いて(us<sub>i</sub>ng on a  $\log_2$  scale)カラーランプに転化する。このようにして発現の誘導の異なるタイミングが明白になる。CRHでの処理の30分後に2倍の変化を示す遺伝子は「初期レスポonder」と呼ばれ、「中間レスポonder」は処理の1~2時間後に変化を示し、そして「後期レスポonder」は2時間もしくはそれ以上後に応答を示す。

10

【図4】本文に説明するような経路もしくは機能により分類されるCRHにより誘導される遺伝子のセレクションの概略。値は、対応する時間点でのDMSOサンプルの強度で各サンプルの強度を割ることにより計算した。これらの計算された比率を $\log_2$ スケール単位を用いてカラーランプに転化し、そしてヒートマップに示す。

【図5】AtT-20細胞におけるCRHによるRgs2の誘導。誘導は、任意の処理の前のAtT-20細胞において認められるレベルと比較して計算する。上には、Rgs2で得られるアレイデータを示す。下には、アレイ実験に使用したのと同じサンプルで定量的RT-PCRにより測定した場合のそして反復実験で測定した場合のRgs2 mRNAのレベルを示す。

【配列表】

20

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO.1

5 atgcagctgagaaaaatgcagaccatcaaaaaaggagcccgcaccctagatcctaccagcagctcagacaagatgctgctgtaactctgacctagct  
 gaggtggccaggacactagcctcaggtgaaalltgcctgaacgaaggagcagtgaggaaaacaatcctggcgtgctggagaaaacgggaat  
 tcaatccggacgagaaagacccatgattggagaaacggcggaaaacaacgaagctgcaaaaagatctcgggagaaagcggcctcaatg  
 acctgtttggagaacaagctgaitccctgggagaaagaaatgccacttfaaaagctgagctgctcctcctgaaattaaagtgttggttaattagctccac  
 ggctgattgcccagaatccagaaaactcagtaaitccacagctgtctacttccaggaactaccagacatccaaggctgctgtagctctttgtggagcagc  
 10 atgagcctgcgatgtagccggaggtgcatctcagtcacatcaagcactctccccagagctcctcctccgatgtgtcagaggtgtcctcggtagcacac  
 tcaggaagccccgcacagggaggtgctccggagccctgagaacaagttccctgtgatcaagcaggaagccctggagttggagagcttggccggga  
 ggccaaggagagcggggcacgtatccacctccatctaccagagctacatgggaagctcttctccacttaccacccccaccctcttgcaggctc  
 catgggtccactagcaactccccagaacctcagagggccgatgagggtgtagtggcagaagctctctgtaggggaaagcgaacaacaggctcccaagg  
 gccccatccattctccagtgagctgcaacggggtccagccacgggtgggaaggttccgggaagtgaacctctgacctaccgacaagctcggatfaa  
 15 agccaagccatcagctcaaatggtaggcttggacagcggattggaagcagtcagaaactctctcaccgccgatgcgcaaaaagacattt  
 tgacctggagaacatggaaacctcgggtatggccatctcctccctctctcagtgacaggtgacgaacatcaagattggctcccaaatcgggaac  
 actggcatcacaagaactgagcaaaaactcagagtagcttcaaaaacaggtgtgtggaaagcaagcaggtggtctataagttccgaagctgag  
 aattttagttgagcaggggaatagcaaacctatctgcagaggtggtctcctcaagaattatagccacacaaccgactcggctcggactccaggtaa

10

SEQ ID No.2

MQLRKMQTIKKEPAPLDPTSSSDKMLLLNSALAEVAEDLASGEDLLNNEGSMGKNKSSACRRK  
 REFIPDEKDDAMYWEKRRKNNEAAKRREKRRLNDLVLENKLIALGEENATLKAELLSLKLFPG  
 LISSTAYAQEIQLSNSTAVYFQDYQTSKAAVSSFVDEHEPAMVAGSCISVIKHSPQSSLDVSEV  
 25 SSV EHTQESPAQGGCRSPENKFPVIKQEPVELESFAREAREERGTYSTSIYQSYMSSPSTYSHSPF  
 LLQVHGSTNSPRTSEADEGVVGGKSDGEDEQVVKGPPIHSPVELQRVHATVVKVPEVNPSALP  
 HKLRIKAKAMQVKVBALDSEFEGMQKLSPPADAJAKRHFDLEKHGTSGMMAHSSLPPFSVQVTNI  
 QDWLSKSEHWHKELSSKTQSSFKTGVVVEVKDGGYKVBSEABNLYLKQGIANLSAEVVS LKRFI  
 30 ATQPISASDSR

20

SEQ ID No. 3

tgtccgctctgctccacacactagcaccagcccgcctgctgccccggtagaaccgccagctggcctgtgatggccagcaggtggcctgag  
 cttctgacaggggcctgcctatagactgagcggcctgagggcctcagactcacactcaaggggcaagggcctgtgtggccacctaaagccacctct  
 35 gtcccagccctgctgcccactgatgtctgactgagaccagcagtgaccctgagctgctcccactgctcctctcctgaggttggctctgc  
 ctaggacggacgactcttctgaagcagggcctcaggaagcaagcccaagcctccaccgagcagatggcagtgccagccagcctgagcaacg  
 tgtccccgggtgctgctactgctccagatgtgcaaccagcaagggcagggagaaaggcagcagcagcagcaatggcctgagaaagcaggaatg  
 gagfctagtcaccaccgccaccctgagcagggcctgctgcttctcactcttacttfaacatgtatcccagcagatagcagctgggtcggcaagctcc  
 cgaggcccgtccggggagggaccaccggaggagcccagcagtgctccgctcattgacagccagcctctgggagcaggttgatgagcactcgtc  
 40 agagcaggtgcaatcagtggtgtggcggcaggtcctgaaagatattgagacggcctgcaagctctgaacatcagcagaccctgggactggagcc  
 ctggtaactgagaaagtgcttattgagacaagaaccagtagccgtgctccagcagcagcagcctccagcagcctggcgggtaagggagctgtgc  
 gccatgtccgaggaacagttccgtcagcgtgcaccctgggtgggatgtactgcaigcccactggacatcggaaagtcagcggcctggatgaaagga  
 gaggaacctgctgggaccttcaactgctgctccaccagcagggagggctgacgatgggtgaggtgagctgtcgtctccggcagcccaatt  
 cacctgtggcagttcctgaaagactgctgctcaagccccacagctatggccgcttcatccgctgctcaacaagagaaagcagcttcaaaattgag  
 45 actcagcagaggtggccgactgtgggtgtgctcgaagaccggccagcctgaactatgataaactaagccgctccatccgccaattacaagaag  
 ggcatctctgtaaacccgacatctcagcgcctgtctaccaatttgcacatcagctcgaagccacaagaccagagcctacaacctgccccagg  
 cagccactctctgtggcctgtcctcctgctcactctgaattcagggcctgctggtatccagaacccaaggctccagatagacagccactgatctag  
 ggatacacatgagctctctgggtacacagggcccaaggaatcagggagctagctcagcacacagggactggaccaagtcagctcaccggaca  
 50 gtgatgtcactgtctcctgctcccaatcctgtaccatctctgcatggtgctaaagatgtctgtacctgctgggaaagccagggtggcctggg  
 gatggataataagacgtaagataactg

30

SEQ ID No.4

MGSASPLSNVSPGCLLLFPDVA PRITGTEKAASGAMGPEKQEWSPSPATPEQGLSAFYLSYFN  
 55 MYPDDSSWVAKVPEARAGEDHPPEEPEQCPVIDSQASGSTLDEHSLEQVQSMVVGEVLKDIETAC  
 KLLNITADPGDWSPGNVQKWLLWTEHQYRLPPAGKAFQELGGKELCAMSEEQFRQRAPLGGD

VLHAHLDIWKSAAWMKERTSPGTLHYCASTSEEGWTDGEVDSSCSGQPIHLWQFLKELLKPH  
SYGRFIRWLNKEKGIFKIEDSAQVARLWGVKRNRPAMNYDKLSRSIRQYYKKGIRKPDISRVLV  
YQFVHPV

5 SEQ ID No.5

cgggtcgaccacgcgtcccccacgcgtccggcggagctctctgggtgocggggccgaaacggcaagcggaaggggcctcgaacggccagggtg  
 tctgtattaaattatgcacccctcagagacagcgcgtcctactccttattcagacctcaaaagccccgttgcaccctgggtggtcttccacctccctg  
 10 ttctgctccactgatatggccagacatgagtggtccctgaaggggccgatgggggagagacccccaggcccggagaacctttttctctggaggga  
 gtccatccccctggggcccgacaccggccttctcaggccccagcctggctgatgacctgatgcaaacagcaatggctcaagtggtcaatgagtc  
 caacggaccggagtcacaggggcgcatctcagcggagttctcagatgctcctctcggcaatggcaaggactcagctctgctggagaccctgagagcag  
 caagatgacaactcagagcccatccccaccagcagctcattgctcagcctcctgagtcgagctcagagcaggacaacctatccacagtg  
 gctgcagcagtgaaacagctcagcctcagcagcagcaccagaagaacatcactgactgactctgggagctcaactcagctcaccagagcgtcgggg  
 caaggccctcctgggacctgcccacactgagctcagctcgtccctgctcaagcagggtcagcctaaccaggaatfaccagcagtgagctcggg  
 15 ggagggtgagccttggccatggacatgctcacttacacctggagggaattggagcafatcacatccgaalacacactcgaaccaggaacctctctg  
 tggctgtgctcctcctgacagggccggattgtctatattcggagcaggcaggtgtcctgctgctgcaaacggagtggtttcgggggcccctctcag  
 agctcctgctcccaggatggtgggtgtctctatgctctactacaccatctgactgccacctggggcactggcaccctctcaggtcaggtcgaag  
 gacttccccaggaaggtgtctctctcggcaatcagagggggtcctgaccggggtccaggccctgggtaccagccatccgccaaccocatatgta  
 ccaagatccgggtctcagatgagccccctgcacagccgtgctgctcactcaltgcccagcgcacccactctggtatgaaagctcccggatccccctga  
 20 caaggagatcttccaccggcagacacaccaagctgcccctcctccaggtatgagatgaaaggctccccactgctgggttacctccccaggtactcctg  
 gggctcccagctctctctctctcactcctgagcaccctcctgctggcctcaltcataagaaactgctgagctggcagccagccctttgaccatcc  
 cctattcctctgctcctggaaacggggaatgacacatggacaccagctggggcctgttggcaccctgggagccgaagggtgcttctgtgtggg  
 tcccatlaaaagtgccagcggcaccctgaaatgaggacgtctcactccccagccccagccagctcctcctggactctgatatccagagctctc  
 agagcagatccatcagatgctgctgagcctgctcagacgtccagccccacggggctctgtggagttggccctctgatgtcccctggtcctctacacagc  
 25 cctgctcctcagtgatagaatggggggagcgtgaggggcctgggctcctcctcagtgactttccagcagatctgtaaggatgctcacttggttaa  
 agcaccagggaacaagctctcattgaatctcggccaaagccccccccggccccgctccttctacaggtacattcaagccaaagictctccct  
 gccagtcccccaaacccgaactggaggtggccccagttctgaccaaagcctcgttagccttggccccctgaggagccagagaggaaagaaacctctgg  
 ctgtctccaccagcagatcaactgctgacagcactcctcaggtattggagagctgcaacatcccaagtaaaccaagcgttaaatgctcctcctcctc  
 30 ctactgctctcagccctgatgatgacaagcagagggcaggtccagttcctgtggggccaaagaaagatccgtctgcaaatgctgtctgggga  
 gggggcaactcctcggagggagccagtggtgggagggcaccctgagccctgcccctggccaataaggcagagagcgtgtgtctcctcaccagfca  
 gtgtagctcagctccaccatgctcctggtgggagacaagaaagccccggagtcggacatcaicatgatggaagacctgctgcccctggccccctgccc  
 cagccccagctcggccccagccccacagtagccctgacccaacccccagatgctctatcggccagtggtctgaccaagccctgctgtccctgac  
 acacagaaggaaggaagcctctcccaacccctcagagatctggcagcctcgtggactgacacctctctgtggccccctcagccccctggtgccc  
 35 acctggccccctctcccctgctcggcacaccactgcccgatcaaaagcaagcgttcccggcaccaccaccaccagccccccggccccgaacctcc  
 ctgctatgctcctcctcctcctgctcctctcttggaccctggccccccccaccagccacgaacccctcccaagcaatggtccaacctaccactcc  
 cagttctcctcctcagggagggccccagccccctcctcctcctcctacatctgtgtcctcctcctcctcctctcctctctcctctcctctcctcctc  
 40 tccatccctgccccaccactctcagccccccccaccggccagactccccactgttcaactcagagatgacgtcctcccaccagctcaatctgctgag  
 cttgaggagctcccggcagcggaggggggcgtgctgcaaggagcccaaggacgtgctggccccctgctccagtgaggagactgctgagcc  
 agagcccagatgggtggagtactgagctcgaatcagatgactttcaggtcctcagcaccctgctggagctactgctccaagaagactcctgctc  
 ggacacaggctccgacgctcagcctcctgggctctggcctgggctctgggtctggttcaagatcccagaaaggggggaagcactcagccagatca  
 45 cccgacagctcagagcagccalacaagcaagtacttggcagcatgactctccagagctgaaagctgggctcctcggccagactgagcctgg  
 ggaccaggctcaatagtggtgctcagaccctcctgctgctcaggtgctcctgctcagaccagcgtgctatgatgacataccaggtgctccagggga  
 tgcagcctctgctgaaagcaagaccgggagggctccggccalgcagaacaagcagccacggttctcagaggaccagggcgggaactgggtg  
 ctgtgactcctgggtccggaaaggccagctgctcctgggcccccttggatgagtgccgtgtgtgactgtggcagcagcgttaagactcctggccactgga  
 50 tgaccgctctctcagaactggatggattggggctggagccatggaaagggtggagccgaggggtgggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtg  
 atgggtgagggagggccagccccaaatggggctaaagggtcaagctcagactctgctccatggaggaagagaaaggggtggggtcctaccag  
 cccagcttaccctgcaagaagaaaccagccagctagatccatttggggccgcttacagcagctolatagagagccttcccttaccatggtgggtctt  
 ataactcaagatcagctggaccacaaccataggaaactccccagctctcctcccaacafaggggctggaccocccattaccagccagcagaggact  
 55 goctctagctcttagcagatgggaagtctcagccccatttggaggattgtccacggcgtcccactgaggagaccggggctctcgttaagggtgct  
 gacaagctgctgaggtgctgtccaaatccagctgagcctgagctccagctcaggggtggctgacttatttattggagagagcagctcactctc  
 ccacctccccagatggaggagggaacctgggatctgtgtagatccagctccgtgaacccctagctgctccaggggtggggaggtgtgtgga  
 ccatgagctccctgctgctccccctcaggtgggaccaccaggtgtctcagctctaccctcaccatgacatttgtgtttgataattgtctgttattttttta  
 atacaaaatgacaaaatgaaaaaccaaaaa

55 SEQ ID No.6

10  
10  
20  
30  
40  
50



5 cttttgataggttacactcatcagagcagatgictgtctctcgggggtgtaatgtgggagatctttactttagggggtcaccctaccagggtaccctgt  
 ggaaggactttttaagctgtcctcaaaaggaggacacagatggacaagccaccaactgcaccaatgaactgtacatgatgatgagggtatgctggcatgc  
 tgtacctcacaagagaccactcaagcagttggcgaagactggatcgaaitctgactctcacaaccaatgaggaaactctggatcaccaggcctc  
 cgaacagtattctcctagttaccccacacaagtagctcttcttcaggggacgattctgtgtttctccagaccctatgacctatgaaccctgtctgcctca  
 gtatccacacataaacggcagtgtaaaacatga

SEQ ID No.10

10 PRDKLTLGKPLGEGCFGQVVMABEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMFM  
 MKMIGKHKNIINLLGACTQDGLYVIVVEYASKGNLREYLARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFK  
 DLVSCITYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLTENNVMKIADFGLARDINNIDYKKTNNGR  
 LPVKWMAPEALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKBGHRMDKPTN  
 CTNELYMMMRDCWHA VPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTINEEYLDLTQPLEQYSPSYPDTSSSCS  
 SGDDSVFSPDFMPYEPCLPQYPHINGSVKT

10

15

SEQ ID No.11

20 aocccagcgtccggcggtttcaactgtcctccctcagctctctttgggctcttccgggcatcgggacgatgaccgtcaaaagccgaggtgctggaagc  
 ccttacctactocagaatgagggaatgtagcgaattcctcctgctttatgaaacagagaaggatgggctggaacgatttattcagaagatgccagca  
 caocctatgcagcaaacacgctgaagttcagctcatttgaatgctccatcctcaggagccggagcttataacgtaaccctctcctccgcaagtc  
 cctctcaacaaatcaacctgggtccgtctcccaacctcagcacaacctcggacttactcttgaagtgatcggaaaggcagtttggaaagggttc  
 tctggctaggcacaaggcagaagatattctatgcaagcaagtttacagaagaagccatcctgaaagaaagaggagaagcataltatgtcaga  
 ggggaatgtctgtgaaatgtgaagcaccctctcgtgggcttactctcattccagaccgctgacaacctctactttgctctggactactaataag  
 gtggagagctgttctaccatctccagaggagcgtcttctcctggaaccagggctcgaattctacgcagctgaaatagccagtgcctgggctatctgca  
 25 ctcctcaaacatcgtttatagagacttaaacctgagaatattctcctagactcccaggccacatcgtctcactgactttgggctcgaagaagaat  
 ggcataaacgggacaacatctactctgtggcagcctcagatctgctcctcagagctccataagcagccgatgaccggacgggtgactgggtgt  
 gctctggggctgtcctcgtatgagatgctctacggcctgccccgtttatagccggaacacggctgagatgtagacaataatctgacaagcctctccagt  
 tgaaccaaataaftacaacctggcaagcaccctcctggaaggcctcctcgaagaccggaccaagagctgggtgccaaggatgactttatggag  
 30 ataaagatcatalttcttcttaataaactgggatgctcatcaataagaattacacccccatitaacccaatgtgagtgggccagtgacctcgg  
 cactttagtcccaggtttaccgagagccggtcccagcctcactcagcaggtcccctgacagcatcctgtcagccaggtgaaaggaagcagcagaa  
 gccttctcggctctcctcactgcaacctctgtgattcctcctctgagctcctgggatggtctgaaagactctcagcgtttctcaaaagtgtttcttact  
 cctttggggaggtggcagctgacagaacattttaaaagaattgcacacctggaagctggcagctcgcctgccccggcgtggcgcgacgcagcgcg  
 cgctcgtgagggagcttccgaagagcacacctctctcaatgagcttgtagggctcttctctctctcctccaacgtgggtgctagctccagcagc  
 35 cgagcgtgagagtgccgctgagacagacacctggctcagttagaaggaaatgacaggtctaaaggaaatccccagctcgtctgagctgctgatca  
 agaatattctcaatgctccttctgagatcgtgtagctccaaagctttctctatcagagctgctcagttgtgtttgtttgtttgttttttttttttt  
 gcgatttcccgtgtgcaagtgagctgagtgctatgctcagacagcaggtttgtgtgagcaatgtgacactgacagactacaatgtggg  
 acattgttttctccacatttgaagataaattatgtgtagctgtttgttagaiaatagtaataactaaacctattgaaacggcttgcactgcaatgacgacat  
 40 tcagatcctaagaaagcattgctctcaaaatattctattttaaaagggttttatggaccaatgccccagttgacgcaaaagccgtgtgtttcattg  
 ttaaaatgtcacctataaaacggcatttatttatttttccctttgtcattcttftgcaatcttctgattatgtatgacgtgtaaaagagctgtgacattgg  
 gttataacactagataatcaactlacaggctatttgaaccatcatttgaatgtagctgtaataaacatgggtataaataatgtaaatcctcctctaccacaca  
 actttttgtgtgcgataaaccaatttgggtttgcaataaaacttgaaacct

20

SEQ ID No.12

45 MTVKABEARSTLTYSRMRGMVAAILAFMKQRRMGLNDFIQKIASNTYACKHAEVQSILKMSHP  
 QEPPELMNANPSPPPSPSQINLGPSSNPHAKPSDFHFLKVIKGSFGKVLARHKAEVVFYAVKV  
 LQKKAILKKEEKHIMSERNVLLKNVHKHPFLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRER  
 CFLEPRARFYAAEIASALGYLHSLNIVYRDLKPENILLDSQGHIVLDFGLCKENIBHNGTSTFCC  
 TPEYLAPEVLHKQPYDRYVDDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNITN  
 50 SARHLEGLLQKDRTKRLGAKDDFMEIKSHIFFSLINWDDLINKKITPPFNPNVSGPSDLRHFDP  
 FTEEPVPSISGRSPDSILVTASVKBAEAFLGFSYAPPVDSFL

30

SEQ ID No.13

55 gcaggcgggtgagagcggcgtgaaagccgcggaacggcctgacacctccgactctactacggcaagctagtcggacgggtgctgtccccgc  
 gcgccaccagccctgggtaaacgacagggagcgtccggctccccaagcaccgcccctcggagactcaaaaacagccaccggcaaaagcagacctc  
 ggcggaaggagggcggagctcaggcggccccctcccggcgaagatacacatctcgtgggtcaaaaacccccggggcagcggccggggcgtg

40









ttggtagtgaatcaggaagcagcaaccaggaagagcctctgtgtgagaacggctccctcactgtgtgaagaacagaggagggaacaggcctctg  
aatgttcttccctctgtcgggaaagcagagttlgagatgaaagatccgatgcaatgtgtggagcaittaaaatcaagaggctgggattatgtggcctt  
agctagtggctgtacacctccctaaactagcctatgttacacatagtggtgttattctgtttatatttagtactaagtaacattacaattgtttactgtgtg  
caagggtgtgacgttcttaggactacagatcattagctactgtgtgtcagctatcagaactgagaagatgtgtgattgttaaatgggtgtgtgtaggga  
5 ccgaatgctgtgccgtgctgtagaa

SEQ ID No.28

MQSAMFLAVQHDCVPMDKSAGNGPKVEEKREKMKRLLNHWKTRLSYFLQNSSAPGKPKTKGK  
10 KSKQQTFFIKSPFEEAHVWAEAFDELLASKYGLAAFRAFLKSEFCEBENIEFWLACEDFKKTKSPQK  
LSSKARKIYTDFFIEKAPKEINIDFQTKSLIAQNIQEATSGCFTTAQKR VYSLMENNNSYPRFLESEF  
YQDLCKKPQITTEPHAT

SEQ ID No.29

aaaaagialataggacaanaftaaggcaaatgacatgaaacagttgaaticacagcaggatcgaagttaacacgttctgtggcagagcagatagcct  
gtctahatgcagacigtcaaatitctgtctactlactgtcagtagcaacaatgacagacagatgattctgcagactcagaagaatgaitcgcata  
aacgtagagaatctttcacgaa gacccctcatatagaanaaactgaatgaactttcctctgtatgtcctgtattcccaagattgaaaga gaaaaacaga  
ggaaagaggacaccacctgctaccatggcagtagcaactagcatatatacagactagcacggggcaatacagaaggagactgacctgccc  
20 caagtcacatggctgtgccacaggtgacatgccaactaccagatccgagctcctactactgtctttgocacaagggtgtgtgatggctgacctaccagg  
aagcctgcacatgcccagcaactagcagaagaagcaactcgaagcgggagctgaggctgatgaaaaacagggaagctcccgggagtgctgca  
ggaaaga gaaagaatgtcaaatgtctgaaatcgtgtggctgtgtgaaaatcaaaacagacctcattgaggaaactcaaggccctcaaaagacct  
tattgccataaagcagagtaactgtgtgattggacctgtgtgactgtgaactcctaatcggggcaggc gatgcagcatcctcataatggccatgtggact  
25 glagtagggctcttaacctgttaagaatcagctgtgtaggtgtgaaatgggaactgttccatgggtggatgagctcccctcattaccaa  
gctgtcctattgccaatagatgcaacatattgtttgtccctctgtcttctactttttcagggaagctgctaaagaatgtc gacgtcgaagaaagagat  
gtgaagtgtctgagatgctgacgtgctggaagttcagaacaagaagcttatagaggagctfgaaactlfgaaa gacattgtctcccacaaacaga  
ttagtgaanaatftaacatgactgattacagcaltgtacagttgctttgaaatgcaatacaaatatagccggcaagaattatggcttttctttgtatcatt  
atcaacttctaaaciaaactcctaaagatgcttgtgtatttaattgtccttaccctcctaaagttcaattittagaagagacaactcaaaaalgtatgaac  
aaacttcaaaatgaagfattgtgaactgttccagtcacaatattacagttcccagtcctcgtcatgaatagtgctcctatgcaataaaaatttgcagggtt  
30 taagaatcatttaggaaagggtgaaticaaagcagtgcatctctccagtagtaagataaaaatcaaccatagagataccctcaggaaagaatgaaaggaa  
gtgatcctgatgacatgacgtgagaatagcctacaatgaattatgcatttatagattttataatcgtcactttgaaagaa gattgtattgtctccttgg  
gtgccacagttgaagcagtttfaatagaacatgtgtgtcttctgtactatttggatatttfaagatctgagcatttactacagctcctactatgtatgt  
agtaftgaatttctcaaaaagttgtgtcttctgtgttatttaagaaagagacaacatatttcaatctggaalaggttccacaaagtatgaatttattgctaca  
ctgfatcagcagccttgcaatactgggaccttctatagagacaacagcagggtctctaggagcagatgctggtggagcacttgcctggcatgctac  
35 atgtcagttgaaaggaaagacctcaagctctgcaaatggaatggggtccagggaagagggttagagggttagcctttgtgctgtactagccttctgtgat  
cgtctgagagatttctgtgatgacctccattgtgaattctgcaacctcaggaaatgtaaacgttfaaaaactcccaagatgtcattttgtatttacaacttg  
gatcaatttgtttgtcttggaaatagctgttacattgtcacgttaggtttaggccttaacctcagattctctgctcagcctctgagtgcttggga  
ttacggatgtggccagaataccagttgatcaattctttataaaaattacttcttctt

SEQ ID No.30

MTMETVESQQDRSVTRSVAEHSSAHMQTGQISVPTLAQVATIAETDSDADSEVIDSHKRREILSR  
RPSYRKILNELSSDVP GHPKIEEEKSEEEGTPPNIA TMA VPTSIYQTSTGQYNEBTDLAPSHMAAAT  
45 GDMPTYQIRAPTTALPQGVVMAASPGSLHSPQQLAEBATRKRRLMKNREBAARECRKKKEY  
VKCLENRVA VLENQNKTLIEELKALKDLYCHKAE

SEQ ID No.31

gctgaagcgtttcctcaagcctgccgggggggagagagaggagggtgtgtgtgtgagagggtggaggcagagggtgga gaga gagaagc  
50 gcacgccagaggaggtgtgggtgtccgctccatcctaacggaacgagctccctctcgcggacatgggattgcccagcggctgtaacccctctcc  
tggctctgatcccccaaccggcgtgctccccgtcaccaggaagcgtgattacaaggaccagatgtgcatcctggctggcgtcctattggtacta  
gagtgctgacctgggctaggcttccaacacgacatgtctgacaaaatgtcagtttccatattggagacattgttctctgtatgctggaggatcta  
cgaatgalltatcagcacccttagcctgtgtgtgtagaccgtgtgtgtacagcca gaa gccggggaccttaacaatccaccagaatcagagactgc  
ctctttagctatgtctatgaatcgaatcctcgcacagaaacagttctgaaagctgctaaagccggggccaacagcactacagatgactgctgctcaa  
55 caaattgcatctgtcgaacttggaaaagaaagcagaatgagacagaaaacaggaaatgttggggacctatccaatagtcacagctgatccagct  
cctgcatttgaaaagcaataaaccttgaactgtgaaatagagcctccagccttgcagagaagaatgocattgagggtgacgttgacgaggctggaat  
gaagggtcctgttttaccatcaaccatttacaagcttgcctcatcggagacagtggtgcataggcgacaaggtatgtttgaaatcctgtcaatgctggcc

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

10

20

30

40









MRRPRRPGSGSGSGGLRLLVCLLLLGRFPGCSAISAHGCLFDRRLCSHLEVCIQDGLFGQC  
 QAGVQGARPLQVTSVPLQRLQVLRQLMSQGLSWHDDLQHVISQEMERIPRLRPPPEHPDR  
 SGLVPRKPGPAGELLTQGNPTGSSPAAQGFPRPAGGRSWGGSPLSSLQAELLPPLLEHLLMPPQP  
 5 PHPALTYEPALLQPYLFHQFGSRDGRSGSESSGVVGVGFLSKAEGPALFSRSASKAILGTHSGHS  
 FGDLTGSPSAQLFQDSGLLYMAQELPVPGRARAPRLPENGONRAEDSSEGHEEEVLGGRGEKSP  
 PQAAQFELSLQRLTAVLAGYGVVELRQLTPEQFSTLLTLMQLLPEKGTGRNLEGA VNVGGADVKK  
 TIQMQRQDPAEALPPTPSLPGYLTA SPASSEVQVLSPGFPEPPHTPSPLGSSSVLLEKKSPLGQS  
 QPTVVGRPSARPSAEEYGYIVTDQKPLSLVAGVRLLEILAEHVHMSGSEFINISVVGPAVTRIRH  
 10 NEQNLSLADVTTQAGLVKSELEAQTGLQILQTGVGQREAAEVLPRQAHGISPMRSVLLTLVAL  
 AGVAGLLVALAVALCMRHHSRQRDKERLAALGPEGAHGDTTFEYQDLCRQHMAKSLFNRAE  
 GQPEPSRVS SVSSQPSDAAQASPSHSSSPSWCEEPAQANMDISTGHMILAYMEDHLRNRDLAK  
 EWQALCAYQAEPNCAAAQDESNIKKNRHPDFLPYDHARIKLVESPSRSDYINASPIEHDP  
 MPAIYATQGPLSHTIADFQMVWESGCTVIVMLTPLVEDGVKQCDRYWPDEGSSLYHVYEVN  
 15 LVSEHIWCEDFLVRSFYLNLTQETRTLQFHFLSWPAEGTPASTRPLDFRRKVNKCYRGRSCP  
 IIVHCSGDGARTGTYLIDMVLNRMAGVKEIDIAATLEHVRDQRPGLVRSKQFEFALTA VAE  
 VNAILKALPQ

10

SEQ ID No.37

20 cggcgaggagaaagcgcggtgaagccagattagagcagcagcactgggacttagggccacaggacaccgcacaagatcaccgacttttct  
 ggagaaccgcagaacggcgacgctgggctgctgggctggccatggtgatggaggtgggcatcctggacgccgggggctgcgcgctgctgc  
 gagaggcgccgcgagcagctgctggtgattgctgctctctctccttcaacgccggccacatcgcgggctcagtgaaactgctgctcagcaccat  
 cgtgcggcgccgcacaaggcgccatggcctggagcatatcgtgcccaacgctgaactgctggccgctgctgcccggagcctaccacgcccgt  
 25 ggtgctgctgagcagcagcgcctcctggacggcgccaagcgcgacggcaccctggccctggcgcggcgcgctcctgcccagagagcgcgc  
 tccactcaagctctcttctccaaggagataatgaagcgtttcggcttctcctcctgactgacccaacagctccacccccacgggctcagcctccc  
 cctgactactgctgctgacagatgcagaatccggatgcagctcctgtagtaccctctctacgafcagggggcccagtgagatcctgctcctgct  
 acctggcagctcctaccgctctcggaaagatgcttgcacgctggcgcacaccgcttgcacagctcagccaatgtcctaccactttaggg  
 gtcactaccagataagagcattcctgtaggagacaaccacaaggcagacatcagctcctggctcaacgagcctattgactcatagactccacaagg  
 30 atgctggaggagagtgcttctcattgcccaggccgcatctcccgtcagccaccatcctgcttactcctcatgaggactaaccgggtaagctggac  
 gagcctttaggttgaaagcagagggcggagatcaictcccgaactcagcttcatgggccaagctgctgcagtttagtcccaagtgctagcccctca  
 ctgctctgctgaaagcgggagccctgcatgctgctgaccgggacacctctactaccaagcttcaactcctgcttccateccctccacccccac  
 gaacagtgccctgaactacctaataagcccaccacacctcccaagctgctgaaaggcaaggagggtgtaggttctactgccaocgggctgccca  
 ctctctctgtaggaggaataaactctggagagcctatggagctgctgcttatttatttaacacccccctcacccccactcctcctgagtt  
 35 ccactgagttcctaagcagtcacaacaatgactgaccgcaagacatgctgaactggcacaatcgggaccaatattgtaggtatcatcaagctcct  
 gacaanaacaggcagaaagagaagagactctgttggaggcagttctgctgctgtttttttctagaactcagctgacacaccaccagattaa  
 ccatcccgatgacatcgcgctgtagagtttacccttattttttgttaggtgggttctccttcaaaaatgctattgctactcatagaagaaccaa  
 atacctcaatttggttgctgactgactatctgtaataagaccagagcaggttcttccggcactgacagacaaggcagtaggtttagcttca  
 gttatcgacagttgtagttttattatgatctgaagtaataatitctctctgtagagacattttagtactggatgactttttatacaagaataatgat  
 40 acgttctattga

20

SEQ ID No.38

45 MVMEVGILDAGGLRALLREGAAQCILLDCRSFFAFNAGHIAGSVNVRFSITVRRRAKGMGLEH  
 IVPNAELRGRLLAGAYHAVVLLDERSASLDGAKRDGTLALAAGALCREARSTQVFFLQGGYEAF  
 SASCPBELCSKQSTPTGLSLPLSTSVPDSAESGCSSCSTPLYDQGGPVEILSFLYLGSAYHASRKDM  
 LDALGITALINVSANCPNHFEHGYQYKSIPVEDNHKADISSWFNEAIDFIDSIKDAGGRVVFHCQA  
 GISRSATICLALYLMRTNVRKLEAFEFVKQRSSII SPNFSFMGQLLQFESQVLAPHCSAEAGSPAM  
 50 AVLDRGTSTTVFNFPVSIPVHPTNSALNLYLKSPIITSPSC

30

SEQ ID No.39

55 ataccatcaaatgaagcaccaaaacaactggtgagcggccctggcctggctcattcttaatacatattgccatcttactgctctgattccttagatccc  
 cgcaatgactctgaataatgtaccatgcgccaaggcactgtggcctgagcagccacagcagcctgagtagtgcctgctgtagccagcactgtaggt  
 ccagaagatccccaccctcgcaacctccgaaaccgccactctactgctccggaagagcactgcccggcagctggtgctccgaactccacagactg  
 gtcactctctgactgctgaaacacctactaccagtagtctataggggagcaaggagtggaagtcaccctggccaacatcttgcaggtgtgca  
 tgacagcatggacagcagctgtgaggtctgggagaagatacatatgagcgtaccctgctgctgacggagagtgcaaccattatcctcctgacatg

40

tgggaaaataagggggagaacgaatggctccatgaccactgcatgcaaggcgggatgcctatctgacgtctactctatcacagaccgtgcaagcttc  
 gagaaggcatctgagctgaggtattcagctccgacggcccggcagacagaaagacatcctataatttgggtgcaacaaaagcgacttagtgcggtgt  
 cgaagaagtgtctgtcagaaggagagctgtgtgctgtggtgctgactgcaaatcatcgagacctctggcgtgtgacagacaacgtgaaggaaactgtt  
 5 tggggcattgagcagcaggtgcccctggcggacagcaaggagaagaatgagaggagcctggcctaccagaaggcgggagagcattccc  
 aggaaagccagcgtctgtgggcaaaattgtgcccacaaacaagaacatggcttcaagctccaagtcaaatcctgccaatgacctgtctgtctct  
 aggcaccagctgtcaccagatgtccctgtgacatcgttgaaggctattgggaccagtgtatctatattagattggatacataagcattgtagacgcaa  
 ctcccctatgcaagatgaaaccaacaggttagccctgtggcaaccaagtgacgggcaatgaatgagctctgcaagagtcagattatcatalgga  
 aaagctgagctgtactggaatgctcagactatitaagacacgcttcgggticacatgagttctctcctttggcagcagaatatttttctcagttgt  
 10 gttccatgtgattcgaagctctggctcatatagaatgtagggaaatggcggtagttatggaggagaaaggcctcactgcatactatataccctgaaac  
 gacatcttagagcggcctcatcagattgtgactatttctcctcagtgagagaattgtagattgctggaactgagcctactaactgttttggtaaa  
 gaccacagagattgtagacttaggagctafatgtagtactctafatggttcaaaaaattgttactatgtgctgtagaaggtttatitgagaaactatttttt  
 ttgccaaattctacttagcaaatcctctatgtctgtttttaaactaagctatcaaaaaatttttaaaaaaatctcaactatattgataactgcag  
 tgcataatttaatafatgctgtttttcccccaaaacataaacatccccatccttgggtgctctgtatgccacagctgaattatattatatttgaataa  
 15 ccatttataattgataagafattatgagcatatttctactgagaaatgctgttttattaccctttatatttttcaaaagtattcaagttttacctaattgtctataat  
 aaataataaaatcttgaaaaagg

10

SEQ ID No.40

MTLNNTMRQGTVMQPPQRWSMPADARHLMVQKDPHPCNLRNRHSTAPEEHCRRTWSSDS  
 20 TDSVISSESGNTYRYRVLIGEQQVVKSTLANIFAGVHDSMDSDCVLEDTYERLTVVDGESATI  
 ILLDMWENKGENE'WLHDHCMQVGDAYLIVYSITDRASFKAASELRIQLRRARQTEDIPILVGNK  
 SDLVRCREVS'VSEGRACA'V'F'DCKFIETSA'V'QHNVKELFEGIERQVRLPRDSKEKNERRLA'YQ  
 KRRESIPRKARRFWGKIVAKNNKNMASSSKSKSCHDLSVL

SEQ ID No. 41

tatcccgtgtgctgcaagccggctgcatcttattggtccatgaagaccccagcacagcggctgacacctctccactgttgtgctcttgtggtgagtg  
 tgcccaggtatgctgcaacgagacagggatgctggagagcctgctctgctgggaaagcctcgtgacatgatgcagaaggtgctgtgtgga  
 agtggtgcaacctgtcggatgctgtattatgaaagcttcaactgaccgagatggagaccaacatcatggcctgctactggcccaaccgctg  
 30 gcccagagctcatcactggaatccacaaggcaattctttcactgacgggtgacagggaccactgggaaagacccccggatgaaagtactcatcca  
 ctgacgcgggtctctgtgctgactgtgctatgctgctgctgctgctggcgaagaacacactgacggctgctgtaggagatgctggtgga  
 gggccatgctgagcagcgtgggaatgtgctcagagctctgagagctggcagactggcttctgtctggtttgcttggccacacctactgccc  
 ccaagctctcccgaccagcgtgctgctggccctgctgctagccctgctggggtcagatgctcatalcttcttcttggcctagtggaaga  
 aagtgacaatacccgaattgtggaccaaggcatggaaataactgttctgtagcccgctcccaggctcgttccctgattctagccgttctggcaga  
 35 gcttctgctagcctgaacccccgcccaagctcctgaccattctagctcctgaccctgacccctgctacactggccagagagggcaggaaggtcactg  
 gaagatgtgagcggccccctctatcaagagactgagcacatctattatcagacatgaaaggatagcctgggtcattagagaccacgtgtgacct  
 ctgaccacctgctctctctgtatctgtcacattctgttccagtgtggcctggagcgtggtgctgttttagccctcaaaagacacctaccctcgagg  
 agagcgtgaaacctctctgagggglatcctgggagtggggagcactgaggtgtgctcaagggtctgctgctgtagctcattttgaaatagtgct  
 ccttcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

20

SEQ ID No.42

MKTPAQRHLHLLFLLLLCECAQVCGCNETGMLERLPRCGKAFADMMQKVA'V'VWKWCNLSEFI  
 45 V'Y'Y'ESFTNCTEMBTNIMGCY'W'PNPLAQSFITGIHRQFFSNCTVDRTHWBEDPPDEVLIPLI'AV'PVV  
 LTVAMAGLVVWRSKHTDRLL

30

SEQ ID No. 43

atgctcaacaagaagcaaatcaagaagtgcccagggtctggctgtctcgaacctgggaacacgtgctcatgaaactcaattctcagtcctgag  
 caacaccgagagctgagagattactgctccagaggctgtacatcgggaccctggccacaccagcagcctcacacggccctcatggaagattt  
 gcaaaactaatccagacatattgagctgtccccaatgatgtggtgagccactgagttcaagaccaatgacagagatacgccacagcttcatg  
 gctataatcagcaggatgctcaggaaattccttctgttctctggatggtctccacaatgaggtgaaccgggtggcagcaaggcctaaggccagccctga  
 gacccttgatcatctccctgatgaaagaaaggcgcagacatgtgaggaatctggaaagggaagacagtcggaltggggtatctctctgtggca  
 55 gctgaagagctcccatgacacagctgctactcttacaatctctgatccctctgggactctctgttccctcgcgaagagaggttaccctga  
 ggtgacgttaatgagattgatgagccttcaccaagaggacataattggatggtgatgagaagccaactgctgcccctgcccagccagaaacgatgc  
 ataaaaagttctctgccaagggttccaaagatcttggctccacctgaaagcattctcaagaatccagatcgaaccagcaagctcaacaattgtg  
 aattcccactaagagacctgacttgagagaattgcttcagaaaacccaaccatgctgttcaaacctgtatgctgtgtccaatcactccggaaacc

40



SEQ ID No.47

atggctgaacaactctctcaggccttgatttgcaaatatcggaagctgtgaagatagagaagaacccagaagacatttcaaacctaccaat  
 5 gggatcatctatcaatfataaacatgaccgatacacgctggagatgttcagaacatgccaatttggcccacagttccgagagatcatccaaagcactt  
 attgacagaaggtgicaggcttccctggaaagccagaagaagctcaactgggtgtcgtgaagtcaggagcctcgtgctctgaaaaccaatggtgatgga  
 aactgcctcatgcatgagcttgcagctacatgtgggtgtcaggtatgacctggctcctgaggaaaggccctctgacagcccttaaggagacagaca  
 ctgggaactfataatocgctggcagctggaaatctgaaatcaggaatttgggaaacagggacttctacgacactcgaactggaatgacgaatgg  
 gacaacttggcaaaatggcatcagcagacacacctgcagcccgaagtggacttcaatcctctggaagaatccacatattgtcctcagcaaacat  
 10 cctcagaagaccatcatgtcatttcagacaaaatgctaaagaatttggaaatctggtccaatttgcctcttggaaagtgggtggatttctgctctctc  
 tggcctgccaggagtgtacagatatccatgctcagctatgacagccagcacttctacccctggtgacctgaagacagtggacctgaacttcg  
 cgtgttccactgttaacagagaccgggttaggttgaagactaaaagttaacttctgacagatcctgagaatgagatgaaaggaaaagcttctaaagg  
 gtactgtatgtagtggagatccctgtcgaagctgggaccacgacgactcacctgatcaacgctgcaaaatggatgaagcgaactaccaaaagaa  
 ataaatttggtagacgattactttagctgttcagcagcaatacaagaatggcagagaaacagcagatcaggccaggagagcggccacatgcccagaa  
 15 ccccttggagcctccacaccagctatcactatgataataatgtagacacccaactgctcttctctatgcttgaaactcagccttctatgccac  
 gaatgctcagagaggcgaacaaatcagagcaagctccaaagctgaactcgaagctagccctgaagactcccaggcgtggacttgcctcct  
 caaactggagcccggagaaaccgctggagaccctcctcagcccccacagcaccagccttctctcagtgagaccactgcaatgaagtga  
 ggagctcctgggtcccttcttgaatgtcagcagataatggattctgtgagcttgcacgcccgcagattaatgcccacaccgacacctgga  
 aagtgcaagcctcctcagatgtcactcctgacctttaaaggctatcagactgttcaaaaggactacagcagagcccagctccagcctcactc  
 20 cagtatccctgctcctgctcaaccaactcctcaagctgacccctcacaactatccaaagtctcactccacactctggcccaggactggaatgtctctc  
 tctgctgctcctcccagctgacggactccagagacagagcagcaggcaagctgagaaagctgctgcatgatttgggactccagaa  
 acaagggttctgactctatgttctcagatacagagaaataagcagctgttactgctctgcgaaagctgttcccccggcccaggttccagaa  
 atgtccctgctcctggcagggagtgccgacactcggaaaccatgttgaagggtactgtcagaaagtgttctcgaagctcagaacagatcc  
 atgaagcaagaagaacggaagaaacagctgagatcaagccagcagacatgctcgaactacacaggtagcctcaagctgaaatgtcccggg  
 25 cctcctgcaagaacatttgcctgtcagctgaggaactcctgtaggtgagcaccctaaagcagtaggttctgtggcccaccgggtgagc  
 ccacgctgaaagagcccctaaacagcgcgtgcccggcccctgctgtgatcacttggcaatgccaagttaatggttactgcaatgagtctaccagttc  
 aagcagatgtagtctaa

10

SEQ ID No.48

30 MAEQLLPQALYLSNMKRAVKIRERTPEDIFKPTNGIYHFKTMHRYTLEMFRTCQFCQPFREIHK  
 ALIDRSVQASLESQKKNLWCREVRKLVALKTNGDGNCLMHAACQYMWGVQDIDLVLRLKALC  
 STLKETDTRNFKFRWQLESLSQEFVETGLCYDTRNWNDEWDNLVKMASADTPAARSGLOYN  
 SLEEIHFVLSNILRRPIIVISDKMLRSLESGSNFAPLKVGGIYPLHWPQAQECYRYPVPLGYDSQHF  
 35 VPLVTLKDSQPELRAVPLVNRDRGRFEDLKVHFLTDFENEMKEKLLKEYLJVMELPVQGDWHDGT  
 THLINAAKLDEANLPKEINLVDDYFELVQHEYKKWQENSQAARRAAHAQNPLEPSTPQLSLMDI  
 KCETPNCPFFMSVNTQPLCHECSERRQKNQSKLPKLNKSLGPEGLPGVGLGSSNWSPEETAGGP  
 HSAPPTAPSLFLFSETTAMKCRSPGCPFTLNQVHNGFCERCHARQINASHTADPGKQACLQDVT  
 RTFNGICSTCFKRRTAEPSSSLTSSIPASCHQRSKSDPSQLIQSLIPHSCHRTGNVSPSGCLSQAART  
 40 PGDRAGTSKCRKAGCMYFGTPENKGFCTLCFIBYRENKQSVTASAKAGSPAPRFQNNVPCLGRE  
 CGTLGSTMFEYGCQKCFIEAQNQRPFHEARRTEEBQLRSSQHRDMPRTTQVASRLKCARASCKNIL  
 ACRSEELCMECQHLSQLRVGSVAHRGEPTPEPPKQRCRAPACDHFNGAKCNGYCNCEYQFKQM  
 YG

20

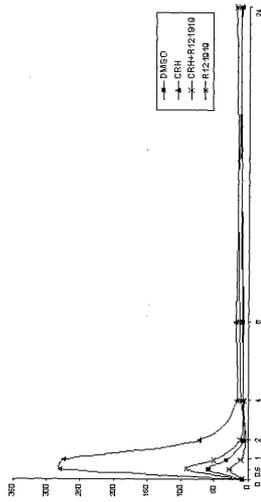
SEQ ID No. 49

45 ttttttcatactgataaaatttattfaaaaaaagagaataaataattatacccttgacaaaaataaagacttataataaaagtcttagaaaatatga  
 aaagataatattcaaatattataaatcaafattcacatgacagcaaaagtggaatgattctacaagaaggtgaggaggaagatcttccggctccga  
 gcaatgtctctgagagagccctcctgctccttctctccttcaatgaggtgtgctcctattitaaagaaacctgatacaagcagatcaatcagtttagaagct  
 50 ggtatttattgaccgcaaaataatttttacaataaaatctatcaagatcctttaaatafcaggttccaatgcaacttagaatacagttaaaccaaatftac  
 aagtctcgaacttctctgtgtagctctaccgancggcgtgaggtattgctgaagtgagtgctgctcctggtg

30

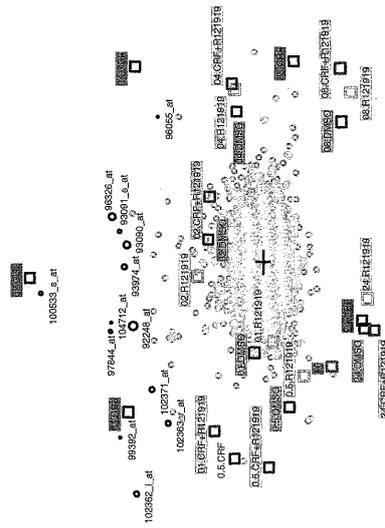
【 図 1 】

Fig. 1



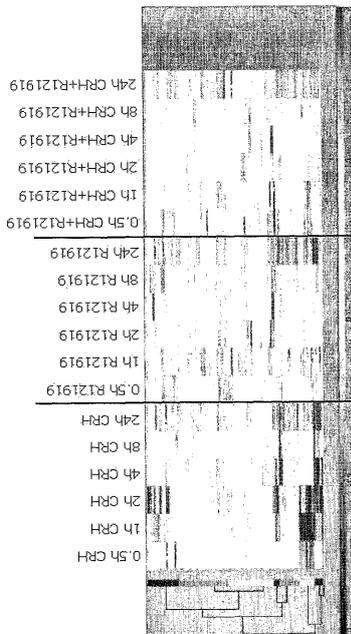
【 図 2 】

Fig. 2



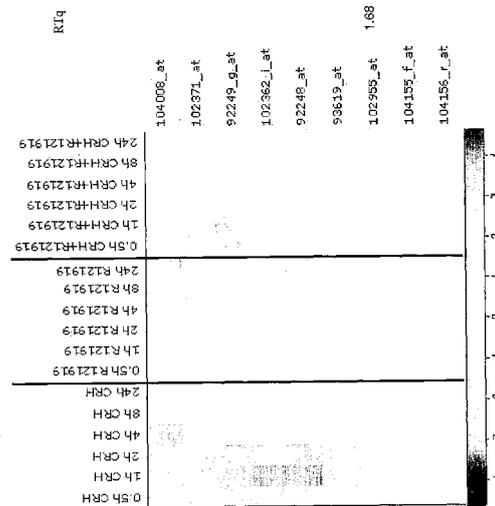
【 図 3 】

Fig.3



【 図 4 - 1 】

図4



転写因子

即立検待異的 ets 転写因子

核転写因子サブファミリー-4、グループA、メンバー1

核転写因子サブファミリー-4、グループA、メンバー2

Jun-B 転写因子

核転写因子サブファミリー-4、グループA、メンバー2

ピリオドホモログ

転写因子、インターロイキン3により調節される

活性化転写因子3

活性化転写因子3



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/11793
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/10 G01N33/53 C12Q1/68 A61P25/24		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N C12Q A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, GENSEQ, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENEMBL [Online] 5 April 2001 (2001-04-05), STRAUSBERG, R. ET AL.: "Mus musculus RIKEN cDNA 1300002F13 gene, mRNA (cDNA clone MGC:6714 IMAGE:3585640), complete cds." XP002270084 Database accession no. BC005546	1-10
X	CHRAPKIEWICZ N B ET AL.: "RAT GENE 33 ANALYSIS OF ITS STRUCTURE MESSENGER RNA AND BASAL PROMOTER ACTIVITY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 16, 1989, pages 6651-6668, XP001161090 ISSN: 0305-1048 figure 2 page 6664, last paragraph	1-10
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "B" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  17 February 2004		Date of mailing of the international search report  19. 05. 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  ALCONADA RODRIG..., A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/11793

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PARKES D ET AL: "Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression with the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 7, no. 10, 1993, pages 1357-1367, XP002241803 ISSN: 0888-8809 the whole document</p> <p>-----</p>	11-34

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/11793**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 27-34 are directed to a diagnostic method practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

see additional sheet

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

1-34 in part

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP 03/11793

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 27-34 are directed to a diagnostic method practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: 1-34 (in part)

The isolated polynucleotide of SEQ ID NO:45, encoding for the polypeptide of SEQ ID NO:46 which modulates corticotropin releasing hormone (CRH) signaling, a vector comprising said polynucleotide and a host cell capable of expressing the polypeptide of SEQ ID NO:46; a method of identifying a compound capable of alter CRH signaling comprising contacting a cell with CRH in the presence of a test compound, determining the amount of the polypeptide of SEQ ID NO:46 or of the gene of SEQ ID NO:45 and compare the amount of said protein or polynucleotide in the presence or absence of said compound; a method for diagnosing CRH induced depression by obtaining a sample from an individual, determining in said sample the amount of the polypeptide of SEQ ID NO:46 or of the polynucleotide of SEQ ID NO:45.

---

## 2. claims: 1-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID NO:48 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:47.

---

## 3. claims: 3,4,6-10, 19 and 34 (in part)

As invention 1 but related to the polynucleotide of SEQ ID NO:49.

---

## 4. claims: 11-34 (in part)

A method of identifying a compound capable of alter CRH signaling comprising contacting a cell with CRH in the presence of a test compound, determining the amount of the polypeptide of SEQ ID NO:2 or of the gene of SEQ ID NO:1 and compare the amount of said protein or polynucleotide in the presence or absence of said compound; a method for diagnosing CRH induced depression by obtaining a sample from an individual, determining in said sample the amount of the polypeptide of SEQ ID NO:2 or of the polynucleotide of SEQ ID NO:1.

---

## 5. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID NO:4 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:3.

---

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 6. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID NO:6  
which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:5.

---

## 7. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID NO:8  
which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:7.

---

## 8. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:10 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:9.

---

## 9. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:12 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:11.

---

## 10. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:14 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:13.

---

## 11. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:16 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:15.

---

## 12. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:18 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:17.

---

## 13. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:20 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:19.

---

## 14. claims: 11-34 (in part)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM. PCT/ISA/ 210

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:22 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:21.

---

15. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:24 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:23.

---

16. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:26 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:25.

---

17. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:28 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:27.

---

18. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:30 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:29.

---

19. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:32 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:31.

---

20. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:34 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:33.

---

21. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:36 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:35.

---

22. claims: 11-34 (in part)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:38 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:37.

---

23. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:40 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:39.

---

24. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:42 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:41.

---

25. claims: 11-34 (in part)

As invention 1 but related to the polypeptide of SEQ ID  
NO:44 which is encoded by the polynucleotide of SEQ ID  
NO:43.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/02	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	A
<b>C 1 2 Q 1/48 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/48	Z
<b>C 1 2 Q 1/37 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/48	
<b>C 1 2 Q 1/42 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/37	
<b>C 1 2 Q 1/44 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/42	
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/44	
	C 0 7 K	14/47	

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

(72) 発明者 ゲールマン, ヒンリヒ・ビルヘルム・ヘルムート  
ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセバーク 3 0・ジヤンセン・ファーマシユー  
チカ・ナムローゼ・フエンノートシャツプ

(72) 発明者 スワゲマカース, ジークリート・マリア・アリス  
ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセバーク 3 0・ジヤンセン・ファーマシユー  
チカ・ナムローゼ・フエンノートシャツプ

(72) 発明者 フィーレンス, フレデリク・ルシエン・ピーター  
ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセバーク 3 0・ジヤンセン・ファーマシユー  
チカ・ナムローゼ・フエンノートシャツプ

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 CA12 DA02  
DA06 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 GA19 HA08 HA09  
HA12 HA14  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ20 QQ27 QQ33 QQ36 QQ42  
QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR33 QR36 QR42 QR48 QR55 QR57  
QR59 QR69 QR77 QR82 QS05 QS10 QS12 QS16 QS24 QS25  
QS28 QS34 QS36 QX02  
4B065 AA26X AA90X AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44  
CA46  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA30 DA36 DA50 DA89 EA20 EA50  
FA72 FA74