

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516038

(P2004-516038A)

(43) 公表日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 Q 1/34
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 29/00
 C 1 2 Q 1/02

F I

C 1 2 Q 1/34 Z N A
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 29/00
 C 1 2 Q 1/02

テーマコード (参考)

2 G O 4 5
 4 B O 6 3
 4 C O 8 4
 4 H O 4 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-553118 (P2002-553118)
 (86) (22) 出願日 平成13年12月15日 (2001.12.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年6月23日 (2003.6.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/014838
 (87) 国際公開番号 W02002/052270
 (87) 国際公開日 平成14年7月4日 (2002.7.4)
 (31) 優先権主張番号 60/257,878
 (32) 優先日 平成12年12月22日 (2000.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503137975
 ベーリンガー インゲルハイム ファルマ
 ゲゼルシャフト ミット ベシュレンク
 テル ハフツング ウント コンパニー
 コマンディトゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル
 ハイム アム ライン (番地なし)
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性炎症性気道疾患の炎症性状態に陽性の影響を与える物質を同定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、炎症プロセスに関与するタンパク質及び炎症性疾患に陽性の影響を与えるための該タンパク質の機能の調節に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

物質が、タンパク質の機能の活性剤であるか又は阻害剤であるか測定するための方法であって、

該タンパク質が、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアリル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるか、又は該タンパク質の機能的同等体、誘導体、変異体、突然変異体またはフラグメントであることを特徴とし、及び

該方法が、該タンパク質又はその機能的同等体、誘導体、変異体、突然変異体またはフラグメントと、該タンパク質の所望の機能の活性剤であるか又は阻害剤であるかを試験するための物質とを接触させ、及びその所望の機能が活性化されているか阻害されているかを測定することを特徴とする前記方法。 10

【請求項 2】

所望の機能が阻害されているかまたは活性化されているかを直接測定する請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

所望の機能が阻害されているかまたは活性化されているかを間接的に測定する請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

該タンパク質が哺乳類タンパク質である請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 5】

該タンパク質がヒトタンパク質である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

分析を、細胞系を使用して行う請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

分析を、無細胞系を使用して行う請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

マクロファージ中で発現するタンパク質のレベルを測定することを含む、タンパク質の発現レベルを測定するための方法であって、

該タンパク質が、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアリル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれる、前記方法。 30

【請求項 9】

該マクロファージが哺乳類マクロファージである請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

該マクロファージがヒトマクロファージである請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

慢性炎症性気道疾患を診断又は監視するための請求項 8 記載の方法。

【請求項 12】

慢性炎症性気道疾患が慢性気管支炎及び C O P D からなる群から選ばれる請求項 11 記載の方法。 40

【請求項 13】

物質が、あるタンパク質の機能の活性剤であるかまたは阻害剤であるか測定するための試験系であって、該タンパク質が、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアリル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるか、又は該タンパク質の機能的同等体、変異体、突然変異体またはフラグメントである前記試験系。

【請求項 14】

M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアリル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからな 50

る群から選ばれるタンパク質、又はその機能的同等体、変異体、突然変異体またはフラグメントの細胞発現を含む請求項 1 3 記載の試験系。

【請求項 1 5】

M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤または阻害剤であると測定された物質。

【請求項 1 6】

M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤または阻害剤である、ある疾患を治療するための物質。

10

【請求項 1 7】

前記疾患が慢性炎症性気道疾患である請求項 1 6 記載の物質。

【請求項 1 8】

前記慢性炎症性気道疾患が慢性気管支炎及び C O P D からなる群から選ばれる請求項 1 7 記載の物質。

【請求項 1 9】

M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤または阻害剤であると測定された少なくとも 1 種の物質を含む医薬組成物。

20

【請求項 2 0】

慢性炎症性気道疾患を治療するための医薬組成物を製造するための、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤または阻害剤であると測定された物質の使用。

【請求項 2 1】

慢性炎症性気道疾患が慢性気管支炎及び C O P D からなる群から選ばれる請求項 2 0 記載の物質の使用。

【請求項 2 2】

M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤または阻害剤であると測定された少なくとも 1 種の物質を含む医薬組成物を、慢性炎症性気道疾患の治療に必要な生物に適当量投与することを含む慢性炎症性気道疾患を治療するための方法。

30

【請求項 2 3】

哺乳類を治療するための請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

ヒトを治療するための請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 5】

慢性気管支炎及び C O P D からなる群から選ばれる慢性炎症性気道疾患を治療するための請求項 2 2 記載の方法。

40

【請求項 2 6】

M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤または阻害剤であると測定された物質を投与することを含む、マクロファージ中で M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質を選択的に調整するための方法。

50

【請求項 27】

マクロファージが、慢性炎症性気道疾患に含まれる請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

慢性炎症性気道疾患が、慢性気管支炎及び C O P D からなる群から選ばれる請求項 27 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

序論

本発明は、炎症過程、特に、マクロファージが重要な役割を果たす慢性炎症性気道疾患の調節の分野に関する。炎症過程は、本発明により炎症過程に関与することが確認されているタンパク質の生物活性に影響を及ぼすことにより調節することができる。

マクロファージが重要な役割を果たす慢性炎症性気道疾患の例は、慢性気管支炎 (C B) である。C B は、気流が制限されているか否かに関わらずに起こり得、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) を含む。C B は、以下のいくつかの疾患の症状を含む複雑な疾患である：咳及び粘質過分泌を特徴とする慢性気管支炎、炎症及び気管支周囲線維症を含む末梢気道病変、気腫及び気流制限。C B は、肺機能が加速度的かつ不可逆的に減退することを特徴とする。C B 発症の主要危険因子は、連続的にタバコを喫煙することである。全ての喫煙者の約 20 % だけが C B に苦しめられるので、遺伝的素因もまた疾患の一因となっていると思われる。

【0002】

C B の初期段階において最初に起こるのは炎症であり、小気道及び大気道に影響を与える。タバコを喫煙することに引き起こされる刺激が、マクロファージ及び好中球を誘引する。喫煙者の痰ではこれらの数が増加している。絶え間なく喫煙すると、傷害部位に炎症細胞を補充するマクロファージ、好中球及び上皮細胞から媒介物が放出されることにより、肺における進行性炎症性反応となる。これまで、C B の経過を戻すのに利用できる治療がなかった。禁煙により、肺機能の減退を減らすことができる。

現在までに、患者の症状を幾分軽減する薬剤がわずかに知られている。持続性 2 - アゴニスト及び抗コリン作用剤を適用すると、一時的に気管支が拡張する。L T B ₄ - 阻害剤のような炎症性現象に用いるための様々なアンタゴニストが研究されている。

慢性炎症性気道疾患を治療するための薬剤を提供することが常に必要とされている。慢性炎症性気道疾患の原因は、活性化された炎症性免疫細胞、例えばマクロファージにあると考えることができる。それ故、炎症過程の原因を除くよう、マクロファージの機能を調節する薬剤が必要である。

【0003】

発明の説明

本発明において、炎症過程に関与するマクロファージ、特に慢性炎症性気道疾患に関与するマクロファージ、更に特に慢性気管支炎または C O P D に関与するマクロファージが、差別的に発現した核酸配列及びタンパク質発現のパターンを示すことが分かり、これは、健康なドナーまたは炎症を起こしたドナー由来のマクロファージの遺伝子発現のパターンとは異なるものであり、ここで、後者は、活性化状態のマクロファージを含有する。それ故、マクロファージは種々の炎症状態において種々の活性レベルを示す。例えば、本発明において、C O P D 喫煙者の炎症過程に含まれるマクロファージは、健康な喫煙者由来のマクロファージとは異なる遺伝子発現パターンを示すことが、つまり、C O P D 喫煙者におけるマクロファージが、以下に「活性化過剰」状態と称した、異なる状態を示すことが分かった。本発明は、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアリル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質を調節する物質を同定することにより、マクロファージの活性化過剰を阻害するか又はマクロファージの活性化過剰状態を軽減する可能性を提供する。これらのタンパク質は全て以下の配列表に示されており、マクロファージの活性化過剰状態を維持するか又は活性化過剰に関与する。

【 0 0 0 4 】

本明細書において、用語「慢性炎症性気道疾患」は、例えば、慢性気管支炎（ＣＢ）及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）を含む。用語「慢性炎症性気道疾患」がＣＢ及びＣＯＰＤを意味するのが好ましく、ＣＢまたはＣＯＰＤを意味するのがより好ましい。

【 0 0 0 5 】

本発明は、活性化過剰でないマクロファージと比べて活性化過剰マクロファージにおいて差別的に発現する核酸配列の同定に基づく。そのような核酸配列は、ＭＩＦ、ＤＡＤ１、ＡＲＬ４、ＧＮＳ２、トランスグルタミナーゼ２、ステアリル－ＣｏＡ－不飽和化酵素及びＵＤＰ－グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質であって、炎症過程、好ましくは慢性炎症性気道疾患に關与するマクロファージの活性化過剰状態を維持するか又はマクロファージの活性化過剰に關与するタンパク質をコードする。そのような差別的に発現する核酸配列又は該核酸配列にコードされるタンパク質はまた、以下に、それぞれ本発明の差別的に発現する核酸配列又はタンパク質と命名した。特に、本発明は、差別的に発現する核酸配列及びタンパク質発現パターンに起因する、マクロファージにおける表現型の変化と、炎症過程にマクロファージが關与することとの関連を教示するものであり、従って、種々の用途の根拠（basis）を提供する。例えば、本発明は、本発明のマクロファージタンパク質又は本発明の差別的に発現する核酸配列の発現レベルを測定するための方法及び試験系を提供し、それにより、例えば、哺乳類、好ましくはヒト、特に好ましくは炎症過程に罹っているヒト、特に慢性炎症性気道疾患に罹っているヒトにおいて活性化過剰マクロファージに關連することによる炎症過程の診断又は監視方法を提供する。本発明はまた、本発明の差別的に発現する核酸配列又はタンパク質により物質を同定する方法であって、該物質が調節をする前記方法に關する。ここで、該物質が調節をするとは、該物質が、本発明の差別的に発現する核酸配列又はタンパク質に阻害剤又は活性剤として作用し、それによりマクロファージの活性化過剰を阻害するかマクロファージの活性化過剰状態を軽減して慢性炎症過程に陽性の影響を与えることを言う。それにより哺乳類、好ましくは前記疾患に罹っているヒトの治療をすることができる。本発明はまた、マクロファージにおいて本発明の差別的に発現する核酸配列又はタンパク質を選択的に調節する方法であって、該タンパク質又は差別的に発現する核酸配列のモジュレータであると測定された物質を投与することを含む前記方法に關する。本発明は、炎症過程、好ましくは慢性炎症性気道疾患の治療が必要な患者を治療するために前記物質を使用することを含む。

【 0 0 0 6 】

本発明の第一段階において、本発明の差別的に発現する核酸配列は、活性化過剰でないマクロファージと比べて活性化過剰マクロファージにおいて異なる発現パターンを有するものと確認された。簡単のため、特にＣＯＰＤに關与するマクロファージの調査について説明するが、他の慢性炎症性気道疾患、例えば、他の慢性気管支炎症状に罹っている被験者由来のサンプルから同等の結果を得ることができる。異なる発現パターンを調査することにより、以下の実施例で例証するように、炎症過程に關与するマクロファージの活性化状態に応じて発現する、一連の差別的に発現する核酸配列を同定することになる。

【 0 0 0 7 】

簡単に言えば、そのような本発明の差別的に発現する核酸配列は、活性化過剰マクロファージ由来の細胞抽出物又は細胞を使用する、比較発現プロファイリング実験により同定する。すなわち、例えば、ＣＯＰＤにおける炎症部位由来のものと、該疾患に罹っていないが、タバコの煙にさらされているような同様の炎症を起こしている状態にあるコントロールの対応する部位とを比較する。

【 0 0 0 8 】

第二段階において、本発明のタンパク質は、差別的に発現する核酸配列によりコードされるものと確認される。すなわち、活性化過剰を媒介する役割を果たすか又は活性化過剰状態を維持する役割を果たすタンパク質である。本発明の差別的に発現する核酸配列群は、ＭＩＦ、ＤＡＤ１、ＡＲＬ４、ＧＮＳ２、トランスグルタミナーゼ２、ステアリル－Ｃ

10

20

30

40

50

A - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質をコードするものと同定することができる。該タンパク質は、活性化過剰でないマクロファージのコントロールレベルよりも低いか又は高いレベルで、本発明により活性化過剰にされているマクロファージにおいて発現することを特徴とする、活性化過剰状態を維持するか又は活性化過剰に関与する。

従って、本発明は、MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアリル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドグリコシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質に関する。前記群から選ばれるタンパク質を、以下、本発明のタンパク質と称する。本発明のタンパク質を以下の配列表に示す。本発明のMIF（配列番号1, 2）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を、例えばマクロファージの遊走を阻害することにより媒介するかは、例えば糖質コルチコイドの反作用する抑制効果及び/又は細菌の湿潤に対する炎症応答を誘発するといった別のMIFの機能又は本発明のMIFの生物学的活性に関連する他のMIFの機能に依存する。

10

【0009】

本発明はまた、MIFの機能的同等物、誘導体、変異体（variant）、突然変異体（mutant）及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的（functional）」とは、本発明のMIFの生物学的活性に関与する機能を有することを意味する。

【0010】

本発明のDAD1（配列番号3, 4）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を媒介するかは、例えば、オリゴサッカリールトランスフェラーゼ複合体への結合及び/又は本発明のDAD1の生物学的活性に関連する他のDAD1の機能に依存する。

20

本発明はまた、DAD1の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的」とは、本発明のDAD1の生物学的活性に関与するDAD1の機能を有することを意味する。

【0011】

本発明のARL4（配列番号5, 6）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を媒介するかは、例えば、小胞及び膜輸送に関連するタンパク質との相互作用及び/又は本発明のARL4の生物学的活性に関連する他のARL4の機能に依存する。

30

本発明はまた、ARL4の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的」とは、本発明のARL4の生物学的活性に関与するARL4の機能を有することを意味する。

本発明のGNS（配列番号7, 8）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を媒介するかは、例えば、ヘパラン等の基質の結合及び/又は認識、及び/又は本発明のGNSの生物学的活性に関連する他のGNSの機能に依存する。

【0012】

本発明はまた、GNSの機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的」とは、本発明のGNSの生物学的活性に関与するGNSの機能を有することを意味する。

40

本発明のトランスグルタミナーゼ2（配列番号9, 10）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を媒介するかは、例えば、（ - グルタミル）リシンイソペプチド結合の形成及び/又は本発明のトランスグルタミナーゼ2の生物学的活性に関連する基質認識等の他のトランスグルタミナーゼ2の機能に依存する。

本発明はまた、トランスグルタミナーゼ2の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的」とは、本発明のトランスグルタミナーゼ2の生物学的活性に関与するトランスグルタミナーゼ2の機能を有することを意味する。

50

【 0 0 1 3 】

本発明のステアシル - C o A - 不飽和化酵素（配列番号 1 1 , 1 2 ）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を媒介するかは、例えば、パルミトイル - C o A 及び / 又はステアシル - C o A 等の基質への結合及び / 又はその酸化活性及び / 又は本発明のステアシル - C o A - 不飽和化酵素の生物学的活性に関連する基質認識等の他のステアシル - C o A - 不飽和化酵素の機能に依存する。

本発明はまた、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的」とは、本発明のステアシル - C o A - 不飽和化酵素の生物学的活性に関与するステアシル - C o A - 不飽和化酵素の機能を有することを意味する。

10

【 0 0 1 4 】

本発明のUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼ（配列番号 1 3 , 1 4 ）の生物学的活性、すなわち本発明の炎症過程におけるマクロファージの関与を媒介するかは、例えば、UDP - グルコース及び / 又はセラミド等の基質への結合及び / 又は移行活性及び / 又は本発明のUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼの生物学的活性に関連する基質認識等の他のUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼの機能に依存する。

本発明はまた、UDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼの機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体及びフラグメントに関する。本明細書において、「機能的」とは、本発明のUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼの生物学的活性に関与するUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼの機能を有することを意味する。

20

【 0 0 1 5 】

本発明により、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の生物学的活性は、コントロールレベルよりも低いレベルで発現する場合、マクロファージの活性化過剰状態を軽減するか又はマクロファージの活性化過剰を阻害するよう活性化するのが好ましく、コントロールレベルよりも高いレベルで発現する場合、マクロファージの活性化過剰状態を軽減するか又はマクロファージの活性化過剰を阻害するよう阻害するのが好ましい。

【 0 0 1 6 】

本発明の一態様において、本発明は、物質が、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤であるか又は阻害剤であるかを測定する試験方法に関する。該タンパク質は慢性炎症性気道疾患に関与しており、炎症を媒介する役割を果たすので、該タンパク質の生物学的活性を調節する物質は、慢性炎症性気道疾患を治療するのに使用することもできるし、物質の機能を最適化し、最適化された物質が慢性炎症性気道疾患を治療するのに適当であるようにするためのリード化合物として使用することもできる。本発明の方法を行うために、本発明の試験系を使用することができる。

30

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、物質が、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤であるか又は阻害剤であるかを測定するための試験系に関する。本発明の方法を行うのに有用な試験系は、細胞系又は無細胞系を含む。例えば、本発明の一態様は、例えば、測定可能な読み出し（read out）として、レポーター遺伝子、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子等の発現を使用する、差別的に発現する核酸配列の発現レベルに作用する物質を試験できるように設計された試験系に関する。本発明の別の態様は、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれる各タンパク質の、天然の活性剤又は人工的なものであるが適当な活性剤により、例えば適当なキナーゼ等により、本発明のタンパク質の機能の

40

50

各活性化を干渉する物質、又は、本発明のタンパク質の各機能と直接相互作用する物質を試験できるように設計された試験系に関する。

【0018】

本発明の試験系は、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質、又は本発明のタンパク質の機能的同等体、誘導体、変異体、突然変異体またはフラグメント、本発明のタンパク質をコードする核酸又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメントをコードする核酸及び / 又は制御要素を含み、ここで本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメント、又は本発明のタンパク質をコードする核酸若しくは本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメントをコードする核酸は、試験する物質と相互作用することができ、直接相互作用することにより、測定可能な読み出しが本発明のタンパク質のそれぞれの生物学的活性の変化を示すか、及び / 又は本発明のタンパク質の発現の変化を示す。

10

【0019】

本発明の試験系は、例えば、当業界で周知の要素を含む。例えば、無細胞系は、例えば、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメント、本発明のタンパク質をコードする核酸又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメントをコードする核酸を、溶解形態又は結合形態で、又は細胞区画又は小胞内に含むことができる。適当な細胞系としては、例えば、適当な原核細胞又は真核細胞、例えば、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメント、本発明のタンパク質をコードする核酸又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメントをコードする核酸を含む原核細胞又は真核細胞があげられる。本発明の前記試験系に使用するのに適当な細胞は、組換え技術により、例えば、所望の本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメントを発現するのに適当な組換えベクターで形質転換するか又は形質移入した後で得ることができる。或いは、そのような適当な細胞は、所望の本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質の機能的同等物、誘導体、変異体、突然変異体又はフラグメントを発現する天然原料から単離される細胞又は細胞系であり得る。本発明の試験系は、対象の物質が本発明のタンパク質の活性剤であるか又は阻害剤であるかを試験するのが望まれているか又は必要であるとき、本発明のタンパク質の天然又は人工のリガンドを含むことができる。

20

30

【0020】

本発明の試験方法は、例えば、細胞系を細胞系の表現型を監視するのに使用するとき、読み出しを測定すること、例えば試験系における表現型の変化を測定することを含む。そのような変化は、例えば以下の実施例に詳細に説明したように、天然に起こるか又は人工的な応答における変化、例えば、M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の細胞のレポーター遺伝子発現であり得る。

40

本発明の試験方法は、一方では物質が本発明の活性剤であるか又は阻害剤であるかを測定するのに適当な高速処理 (h i g h t h r o u g h p u t) 試験に有用であり得る。また、例えば、高速処理試験において確認されたヒット化合物又はリード化合物の二次試験又は確認にも有用であり得る。

【0021】

本発明はまた、本発明の方法において、本発明の M I F、D A D 1、A R L 4、G N S 2、トランスグルタミナーゼ 2、ステアシル - C o A - 不飽和化酵素及び U D P - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の活性剤又は阻害剤であると確認された物質に関する。本発明の物質は、本発明の M I F、D A D 1、A R L 4

50

、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の機能を活性化又は阻害することができる、好ましくは阻害することができる、あらゆる化合物である。MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の機能を活性化又は阻害する方法の例としては、MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の発現レベルに影響を与えることである。MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の機能を活性化又は阻害する方法の別の例としては、適用した物質の性質に応じて可逆的又は不可逆的に行うことができる物質を、MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質に直接結合させ、それによって本発明のタンパク質の機能的ドメインを活性化するか又は阻止することである。

10

【0022】

従って、MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質の生物学的活性を活性化するか又は阻害するのに有用な物質としては、差別的に発現する核酸配列の発現に作用する物質、例えば、対応する遺伝子又は調節配列とハイブリダイズし、それにより遺伝子発現に影響する核酸フラグメント、又はMIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質自体又は他の天然に発生する細胞成分により活性化又は阻害するのに作用する物質、例えば、本発明のタンパク質に酵素学的に作用する他のタンパク質、例えば、タンパク質キナーゼがあげられる。

20

【0023】

それ故、本発明は、例えば、本発明のタンパク質の遺伝子をコードする核酸配列、又は該核酸配列のフラグメント、誘導体、突然変異体又は変異体である物質であって、該核酸配列又はそのフラグメント、誘導体、突然変異体又は変異体が、遺伝子発現レベルに影響を与えることができる前記物質、例えば、アンチセンス核酸、リボザイムとして適当な核酸分子、又は三重らせん形成に適当な核酸分子に関する。

30

本発明はまた、例えば、MIF、DAD1、ARL4、GNS2、トランスグルタミナーゼ2、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素及びUDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼからなる群から選ばれるタンパク質に直接結合しているか又はその活性化と相互作用し、それによりその生物学的活性に影響を与える有機若しくは無機化合物又は抗体である物質に関する。

【0024】

更なる観点において、本発明は、本発明のタンパク質をコードする核酸、好ましくはメッセンジャーRNA、又は細胞、好ましくはマクロファージ、より好ましくは炎症部位から単離したマクロファージ、さらにより好ましくは慢性炎症性気道疾患に罹っている被験者の炎症部位から単離したマクロファージにおける本発明のタンパク質自身の発現レベルを測定するための方法に関する。そのような方法は、例えば、物質が本発明の活性剤であるか又は阻害剤であるか測定するための上に概要を示した方法において、差別的に発現する核酸配列発現レベルに物質が影響を与えることができるかどうか試験するのに使用することができる。しかしながら、本発明の発現レベルを測定するための方法はまた、マクロファージの活性化状態を試験するのに、例えば、活性化過剰マクロファージにより引き起こされる疾患の治療の結果を調査するか又は診断するために使用することができる。前記マクロファージは、哺乳類であるのが好ましく、ヒト細胞であるのがより好ましい。従って

40

50

、本発明のマクロファージは、哺乳類の炎症部位、より好ましくはヒトの炎症部位から得るのが好ましい。従って、本発明はまた、慢性炎症性疾患の診断方法、又は該疾患の監視方法、例えば、マクロファージにおいて本発明のタンパク質をコードする核酸、好ましくはメッセンジャーRNA、又は本発明のタンパク質自身の発現レベルを測定することを含む、慢性炎症性疾患の治療が必要な患者の治療結果を監視する方法に関する。

【0025】

本発明のタンパク質をコードする核酸、好ましくはメッセンジャーRNA、又は本発明のタンパク質自身の発現レベルを測定する方法は、発現レベルの測定目的に応じ、ルシフェラーゼアッセイ等のレポーター遺伝子駆動アッセイを介するか又はハイブリダイゼーション技術を介する各RNA転写物の濃度を測定するといった公知の方法により、又はそれぞれの抗体を使用する本発明のタンパク質のタンパク質濃度を測定することにより行うことができる。

10

本発明はまた、慢性炎症性気道疾患を治療するための本発明の物質の使用に関する。本発明の別の態様は、活性剤又は阻害剤であると測定された本発明の物質の少なくとも1種を含有する医薬組成物に関する。本発明の組成物は、それ自体公知の方法により、例えば、慣用の混合、溶解、粉碎、ドラジェ製造、微粒子化(levigating)、粉末化、乳化、カプセル化、包括化(entrapping)又は凍結乾燥方法により製造することができる。

【0026】

本発明の活性化するか又は阻害する物質を慢性炎症性気道疾患を治療するための薬剤として使用するために、該物質を動物モデルで、例えば、炎症性気道疾患に罹っている動物又は本発明のタンパク質を発現するトランスジェニック動物で試験することができる。

20

本発明の物質の毒性及び治療効果は、細胞培養及び動物実験をしてIC₅₀、LD₅₀及びED₅₀を測定することを含む、標準的な医薬的方法により測定することができる。得られたデータは、動物、より好ましくはヒトの投与量範囲を見積もるのに使用する。投与量範囲はまた投与形態(錠剤、カプセル、エアゾールスプレー、アンプル等)及び投与ルート(例えば、経皮、経口、口内(buccal)、点鼻、非経口、吸入、気管内又は直腸)にもまた依存する。

【0027】

有効成分として本発明の物質の少なくとも1種を含有する医薬組成物は、慣用の方法により処方することができる。そのような組成物の製造方法は、例えば、“Remington's Pharmaceutical Science”に記載されている。本発明の物質の少なくとも1種を処方するのに有用な成分の例は、国際公開公報第99/18193号パンフレットに記載されている。この文献は本明細書に含まれるものとする。

30

更なる観点において、本発明は、慢性炎症性気道疾患を治療する方法に関する。該方法は、慢性炎症性気道疾患の治療に必要な生物、好ましくはヒトに、物質が本発明のタンパク質の活性剤であるか又は阻害剤であるかを測定するための本発明の方法により活性剤であるか又は阻害剤であると測定された少なくとも1種の物質を含有する医薬組成物の適当な量を投与することを含む。

【0028】

他の態様において、本発明は、本発明のタンパク質の活性剤であるか又は阻害剤であると測定された物質を投与することを含む、マクロファージにおける本発明のタンパク質の濃度を選択的に調節する方法に関する。

40

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、限定的に解釈すべきではない。しかしながら、以下の実施例は本発明の最も好ましい態様を示すものである。

【0029】

実施例

実施例1：比較発現プロファイリング

以下は、本発明のタンパク質を同定するために、どのようにしたら比較発現プロファイリングを行うことが出来るかを具体的に示すものである。

50

1. 1. 被験者の選択

3群の被験者について研究した：健康な非喫煙者、健康な喫煙者及びCOPD患者。肺機能を評価するために、被験者は肺活量を測定しなければならない。年齢及び身長に基づく簡単な計算を使用して結果を特徴付けた。COPD患者については、その予測FEV₁%が<70%の者について研究した。健康な喫煙者は、COPD患者と年齢及び喫煙暦を合わせたが正常な肺機能を有する者である。健康な非喫煙者は、正常な肺機能を有し、これまで喫煙したことがない。健康な非喫煙者の群は、喘息を除外するためメタコリン挑戦(challenge)を有する。この方法は、各投与間で肺活量を測定することによる、被験者に投与するメタコリン量を増やすことを必要とする。FEV₁が20%低下したとき、試験を中止し、PC20を計算する。これがFEV₁を20%低下させるメタコリンの投与量に相当する。喘息が存在しない証拠として、32より大きい値を必要とする。全被験者は通常のアレルゲンに対する皮膚プリックテストをし、陰性の結果を有することを必要とする。これによりアトピー性の個体を除く。被験者の病歴を監視し、付随する(concomitant)疾患を除外した。

【0030】

1. 2. BAL (気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage)) 方法

BAL前にミダゾラムを投与して被験者を落ち着かせた。局所麻酔スプレーを使用して咽頭の裏に麻酔をした。7mm オリンパス気管支鏡を使用した。洗浄領域は右側中央部の突出部(lobe)である。250mlの滅菌生理食塩水を点滴(instill)し、直ぐに吸引した。得られた吸引液はマクロファージを含有した。

1. 3. BAL 処理

滅菌ガーゼを通してBALを濾過し、細片を除去した。該細胞をHBSS中で2回洗浄し、1ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)に再懸濁し、計測した。マクロファージを引き出して、15 ml Falcon blue-cap ポリプロピレンを使用してベレットにし、10,000,000細胞当たり1ml Trizol 試薬濃度においてTrizol 試薬(Gibco BRL Life Technologies)に再懸濁し、次いで、-70において凍結した。

【0031】

1. 4. 差別的 (Differential) 遺伝子発現分析

全RNAを、実施例1.3により得たマクロファージサンプルから抽出した。ピペットを通してTrizol中細胞懸濁液をホモジナイズし、室温で5分間インキュベートした。Trizol 1mL当たり200µLのクロロホルムを添加し、該混合物を注意深く15秒間混合し、室温で3分以上インキュベートした。サンプルを4において、15分間10000gでスピンのした。上相を新しい反応チューブに移し、室温で10分間、Trizol 1mL当たり0.5 mlのイソプロパノールを添加することによりRNAを沈殿させた。次いで、4において10000gで10分間ミクロ遠心分離器を使用することにより該沈殿物をベレット状にし、該ベレットを75%エタノールで2回洗浄し、風乾し、及びDEPC-H₂Oに再懸濁した。

Qiagen RNeasy Total RNA単離キット(Qiagen)によりRNAの洗浄を行い、RNAの純度を上げた。RNAの純度は、アガロースゲル電気泳動により測定し、濃度は260nmにおけるUV吸収により測定した。

【0032】

5µgの各RNAをcDNA合成に使用した。第一及び第二ストランド合成は、SuperScript Choice system (Gibco BRL Life Technologies)により行った。総体積11µLのRNA及び1µLの100µM T7-(dt)₂₄プライマー中で、配列番号1に記載の配列を70まで10分間加熱し、氷上で2分間冷却した。最終濃度の1倍(1x)にするための第一ストランド溶液、濃度10 mMにするためのDTT及び最終濃度0.5 mMにするためのdNTP混合物を、総体積18µLに添加した。該反応混合物を42において2分間インキュベートし、2

μL のSuperscript II 逆転写酵素 ($200\text{ U}/\mu\text{L}$) を添加した。第二ストランドを合成するため、 $1.15\times$ 第二ストランド溶液、 $230\mu\text{M}$ dNTPs、 10 U E. coli DNA リガーゼ ($10\text{ U}/\mu\text{L}$)、E. coli DNA ポリメラーゼ ($10\text{ U}/\mu\text{L}$)、RNase H ($2\text{ U}/\mu\text{L}$) を含有する $130\mu\text{L}$ の混合物を、第一ストランド合成の反応に加え、ピペットで注意深く混合した。16 において2時間第二ストランド合成を行い、次いで $2\mu\text{L}$ の T4 DNA ポリメラーゼ ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) を添加し、16 で5分間インキュベートし、 $10\mu\text{L}$ の 0.5 M EDTA を添加することにより、反応を停止した。

【0033】

cRNA 合成の前に、二本鎖 cDNA を精製した。該 cDNA を等量のフェノール：クロロホルム：イソamilアルコール ($25:24:1$) と混合し、未結合のヌクレオチドから cDNA を分離するために、ミクロ遠心分離中で相ロック (lock) ゲル (Eppendorf) のゲルマトリックスによりスピンした。水相を酢酸アンモニウム及びエタノールで沈殿させた。続いて、cDNA を *in vitro* 転写に使用した。製造業者 (ENZODiagnostics) の手順に従い ENZO BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit を使用して cRNA 合成を行った。簡単に説明すると、cDNA を、総体積 $40\mu\text{L}$ の $1\times$ HY 反応溶液、 $1\times$ ビオチンラベルしたリボヌクレオチド、 $1\times$ DTT、 $1\times$ RNase 阻害剤混合物及び $1\times$ T7 RNA ポリメラーゼと共に 37 で5時間インキュベートした。次いで、該反応混合物を Rneasy カラム (Qiagen) を通して精製し、酢酸アンモニウム及びエタノールで cRNA を沈殿させ、最後に DEPC 処理水に再懸濁した。260nm において UV 分光器により濃度を測定した。残りの cDNA を $1\times$ 断片化緩衝液 ($5\times$ 断片化緩衝液： 200 mM 酢酸トリス、 $\text{pH } 8.1$ 、 500 mM KOAc、 150 mM MgOAc) と共に 94 において35分間インキュベートした。

【0034】

DNA チップをハイブリダイズするために、 $15\mu\text{g}$ の cRNA を使用し、総体積 $300\mu\text{L}$ の 50 pM ビオチンラベルしたコントロール B2 オリゴヌクレオチド、配列番号 16 に示した配列、 $1\times$ cRNA カクテル、 0.1 mg/ml herring 精子 DNA、 0.5 mg/ml アセチル化 BSA、 $1\times$ MES ($2\text{ - [N - モルホリノ] - エタン$ スルホン酸) ハイブリダイゼーション溶液と混合した。該ハイブリダイゼーション混合物を 99 まで5分間加熱し、45 に10分間で冷却し、 $200\mu\text{L}$ の混合物を使用してプローブ配列に満たした。45 において60rpmで16時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、チップ上のハイブリダイゼーション混合物を、 $300\mu\text{L}$ の非ストリンジェント洗浄液 (100 mM MES、 100 mM NaCl、 0.01% Tween 20) と置換した。このチップを Affymetrix Fluidics ステーションに挿入し、EukGE-WS2 手順により洗浄及び染色した。チップ当たりの染色溶液は、 $600\mu\text{L}$ の $1\times$ 染色液 (100 mM MES、 1 M NaCl、 0.05% Tween 20)、 2 mg/ml BSA、 $10\mu\text{g/ml}$ SAPE (ストレプトアビジンフィコエリトリン) (Dianova) を含有し、抗体溶液は、 $1\times$ 染色液、 2 mg/ml BSA、 0.1 mg/ml ヤギ IgG、 $3\mu\text{g/ml}$ ビオチニル化抗体を含有した。洗浄及び染色処理後、チップを HP Gene Array Scanner (Hewlett Packard) でスキャンした。

【0035】

データ分析は、COPD 喫煙者から単離した RNA でハイブリダイズしたチップと健康な喫煙者から単離した RNA でハイブリダイズしたチップとの比較により行った。

以下に、差別的に発現した遺伝子及び本発明の方法により確認したその機能を具体的に示す。

【0036】

実施例 2：MIF

10

20

30

40

50

COPD患者において一貫して上方制御していると確認された遺伝子は、MIF（配列番号3，4）をコードする。MIFは、下垂体細胞、マクロファージ及びT細胞により分泌され、その合成は、LPS、TNF、IFN-等の炎症誘発性刺激により誘発される。MIF自身は、糖質コルチコイドの反作用する抑制効果による炎症誘発性活性及び細菌の湿潤に対する炎症を誘発することによる炎症誘発性活性を有する。MIFを中和することにより、ある種のマウスモデルにおいて敗血症ショックを予防することができる（Calandra et al. 1994, Bernhagen et al. 1998, Calandra et al. 2000）。

MIFは、健康な喫煙者と比較してCOPD喫煙者では、一貫して上方制御されていることが分かった（42%）。これを、“倍（fold）変化”値（表1）に示した。COPD喫煙者と健康な喫煙者とを比較するためのp値は0.03であった。

10

【0037】

【表1】

表1：MIFの脱制御(Deregulation)：閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.3	5 vs 43	3.9	39 vs 57	-2.0	68 vs 66	2.8
1 vs 37	8.0	5 vs 56	1.9	39 vs 58	1.0	68 vs 69	2.3
1 vs 43	1.8	5 vs 57	1.5	39 vs 62	1.0	68 vs 76	5.0
1 vs 56	-1.3	5 vs 58	2.9	44 vs 2	1.4	68 vs 78	3.2
1 vs 57	-1.6	5 vs 62	2.0	44 vs 37	14.4	70 vs 65	1.1
1 vs 58	1.2	6 vs 2	-1.6	44 vs 43	3.0	70 vs 66	1.4
1 vs 62	-1.2	6 vs 37	6.5	44 vs 56	1.4	70 vs 69	1.1
3 vs 2	-1.6	6 vs 43	1.5	44 vs 57	1.1	70 vs 76	2.6
3 vs 37	6.3	6 vs 56	-1.6	44 vs 58	2.1	70 vs 78	1.6
3 vs 43	1.4	6 vs 57	-2.0	44 vs 62	1.5	71 vs 65	2.1
3 vs 56	-1.6	6 vs 58	1.0	64 vs 65	2.0	71 vs 66	2.7
3 vs 57	-2.1	6 vs 62	-1.5	64 vs 66	2.6	71 vs 69	2.2
3 vs 58	-1.1	39 vs 2	-1.6	64 vs 69	2.1	71 vs 76	4.9
3 vs 62	-1.5	39 vs 37	1.0	64 vs 76	4.7	71 vs 78	3.1
5 vs 2	1.9	39 vs 43	1.0	64 vs 78	3.0		
5 vs 37	18.5	39 vs 56	-1.5	68 vs 65	2.1		

20

30

40

【0038】

2.1. MIFのクローニング

ヒトTHP-1細胞から抽出した全RNAから、MIFをクローン化した。5 µg RNAを、オリゴ(d t)₁₈プライマー、1x第一ストランド緩衝液、10 mM DTT、0.5 mM dNTPs及び2 U Superscript II（Gibco BRL）により42℃において50分間cDNAに逆転写した。次いで、70℃、15分間で該反応を終了し、cDNA濃度をUV分光光度計で測定した。MIFを増幅させるために、MIF用の配列特異性プライマー（配列番号17の前（forward）プライマー及び配列番号18の逆（reverse）プライマー）10 pmol及びcDNA 100 ngをPCRに使用した。反応条件は以下の通りである：94℃で2分間、94℃で30秒

50

間を35サイクル、53 で30秒、72 で90秒、次いでTaq DNA - ポリメラーゼにより72 で7分間。反応混合物を2%アガロースゲルで分離し、約360bpのバンドを切断し、QIAEX II 抽出キット (Qiagen) を使用して精製した。精製したバンドの濃度を測定し、約120ngを、300ngのpDONR201、Gateway system (Life Technologies) のドナーベクター、1x BPクローナーゼ (clonase) 反応緩衝液、BPクローナーゼ酵素混合物 (総体積20μL) と共に、25 で60分間インキュベートした。次いで、反応物を2μLのプロテイナーゼKと共にインキュベートし、37 で10分間インキュベートした。次いで、該反応混合物をコンピテントDB3.1細胞に電気穿孔し、カナマイシン含有プレートで培養した。配列決定によりクローンを確認した。データベースに入れた配列と同じ配列 (acc. L19686) を有する、pDONR-MIFと命名したクローンを次の実験に使用した。 10

【0039】

2.2 MIF用形質移入ベクターの生成

1.1に記載したMIF含有ベクターを使用して、MIFがCMVプロモータの制御下で発現するGateway cloning system (Life Technologies) の“attR1”及び“attR2”組換え部位を含有する発現ベクターpcDNA3.1(+)/attRにMIF用cDNAを移行させた。150ngの“エントリー (entry) ベクター” pDONR-MIFを、TE (Tris/EDTA) で20μLにした、150ngの“目的 (destination) ベクター” pcDNA3.1(+)/attR、4μLのLRクローナーゼ酵素混合物、4μL LRクローナーゼ反応緩衝液と混合し、25 で60分間インキュベートした。次いで、2μLのプロテイナーゼK溶液を添加し、37 で10分間インキュベートした。氷上で30分間DNAと共に細胞をインキュベートした後、42 で30秒間熱ショックを与えることにより、1μLの反応混合物を50μL DH5 に形質転換した。細胞に熱ショックを与えた後、450μLのS.O.C.を添加し、細胞を37 で60分間インキュベートした。100μg/mLアンピシリンを含有するLBプレートに細胞 (100μL) を塗抹し、一晚インキュベートした。挿入物としてMIFと共にpcDNA3.1(+)/attRを含有するコロニーをpcDNA/MIFとし、形質移入研究に使用した。 30

【0040】

2.3 組換えMIFの発現

1.1に記載したMIF含有ベクターを使用して、Gateway cloning system (Life Technologies) の“attR1”及び“attR2”組換え部位を有する発現ベクターgpET28abc/attRにMIF用cDNAを移行させた。これらのベクターにより、T7プロモータの制御下、細菌中で、higで標識した組換えMIFを発現させた。150ngの“エントリーベクター” pDONR-MIFを、TE (Tris/EDTA) で20μLにした、150ngの“目的ベクター” gpET28abc/attR、4μLのLRクローナーゼ酵素混合物、4μL LRクローナーゼ反応緩衝液と混合し、25 で60分間インキュベートした。次いで、2μLのプロテイナーゼK溶液を添加し、37 で10分間インキュベートした。氷上で30分間DNAと共に細胞をインキュベートした後、42 で30秒間熱ショックを与えることにより、1μLの反応混合物を50μL DH5 に形質転換した。細胞に熱ショックを与えた後、450μLのS.O.C.を添加し、細胞を37 で60分間インキュベートした。100μg/mLアンピシリンを含有するLBプレートに細胞 (100μL) を塗抹し、一晚インキュベートした。正確な読み枠内にhig標識に融合したMIFと共にgpET28abc/attRを含有するコロニーをpgPET/MIFとし、細菌内でMIFを発現させるのに用いた。 40

【0041】

2.4 組換えMIFの精製

100 μ g/ml アンピシリンを含む1 LのブロスにpQE/MIFを含有するE. coli M15 (pREP4)の0.5 mLを一晩培養したものを接種した。培養物を、OD₆₀₀が0.6になるまで激しく攪拌しながら37 °Cにおいてインキュベートした。1 mM IPTGを添加することにより発現を誘発し、培養物をさらに4時間成長させた。4 °Cで20分間4000 \times gで遠心分離することにより細胞を捕集した。ペレットを-20 °Cで凍らせた。

氷上で細胞を解凍し、溶解緩衝液(50 mM NaH₂PO₄、pH 8.0、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール)の2 mL/g細胞ペレット中に再懸濁した。次いで、リゾチームを添加して1 mg/mlにし、氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を超音波処理した(300 Wにおいて10秒間6回破碎)。10 μ g/ml RNase A及び5 μ g/ml DNase Iを添加し、氷上で10分間インキュベートした。次いで、4 °Cで20分間10000 \times gにおいて細片を引き出すことにより溶菌液を透明にした。次いで、プロテアーゼ阻害剤(40 μ g/ml バシトラシン、4 μ g/ml ロイペプチン、4 μ g/ml キモトリプシン、10 μ g/ml pepstatin、100 μ M PMSF)を添加した。3 mLのNi-NTAレジン(Qiagen)を溶菌液に添加し、カラムに充填した。穏やかに攪拌しながら4 °Cで60分間レジンの結合させた。次いで、カラム出口を開け、レジンを12 mLの洗浄液(50 mM NaH₂PO₄、pH 8.0、300 mM NaCl、20 mM イミダゾール)で2回洗浄し、3 mLの溶離液(50 mM NaH₂PO₄、pH 8.0、300 mM NaCl、250 mM イミダゾール)で4回溶出した。組換えタンパク質を含有する溶出画分を、SDS-PAGEで測定し、精製したタンパク質をBradford法により測定した。

10

20

【0042】

2.5. 末梢血由来の単核細胞及びCD4⁺ T細胞の精製

健康なボランティアの血液10 mLを25 mL PBSで希釈し、50 mLファルコンチューブ中15 mLフィコールの上で注意深く重ねた。該チューブを室温で40分間400 \times gでスピンした。パスツールピペットで細胞を除き、室温で10分間500 \times gにおいて50 mL PBS中で洗浄した。

磁気ビーズを使用してCD4⁺ リンパ球を単離した。細胞画分(前段落に記載のもの)を1 \times 10⁷ 細胞当たり、80 μ L MACS液(PBS、2 mM EDTA、0.5% BSA)に再懸濁した。20 μ LのCD4⁺ 分離ビーズ(Miltenyi Biotec)を1 \times 10⁷ 細胞に添加し、4 °Cで15分間インキュベートした。次いで、20体積のMACS緩衝液を添加し、1000 rpmで10分間スピンした。ペレットを、1 \times 10⁸ 細胞当たり500 μ L MACS液に再懸濁し、3 mLのMACS緩衝液で平衡にしたMiltenyi Separation Column LS⁺に加えた。磁気ビーズを30秒間磁場にさらし、ラベルしたCD4⁺ 細胞を保持した。その後、カラムを磁場から離し、CD4⁺ 細胞を5 mLのMACS液で流した。細胞をスピンドウンし、RPMI 1640、10% FCSに再懸濁した。

30

同様に、フィコール密度遠心分離により全血からヒト単核細胞を単離した。接種後、非粘着細胞を除くために、細胞を24時間に2回RPMI 1640、10% FCSで洗浄した。

40

【0043】

2.6. MIFによる表現型効果/細胞効果

以下のアッセイは、MIFで過渡的に又は安定的に形質移入されている細胞系THP-1 (Tsuchiya et al., 1980)又はMonoMac 6 (Ziegler-Heitbrock et al., 1988)で行い、読出した情報を、形質移入したようにみせかけた細胞と比較した。また、MIFの活性を刺激する本発明の物質を添加した。

【0044】

サイトカインの製造及び放出

単球/マクロファージ細胞系を、2.5 ~ 5 \times 10⁵ 細胞/mLの細胞密度で、MIF (

50

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で刺激した。0、1、3、6、12、24、48 及び 72 時間後に細胞を捕集し、更に研究するために上澄みを凍結し、細胞を PBS で洗浄し、143 mM -メルカプトエタノールを含む 400 μL の RLT 緩衝液 (Qiagen RNeasy Total RNA Isolation Kit) 中に再懸濁し、DNA を 20 g の針で少なくとも 5 回切断し、-70 で保存した。

【0045】

煙リッチ培地により、タバコの煙による細胞刺激を行った。サプリメント無含有 100 mL RPMI 培地を、2 本のタバコの煙で灌流した。タバコの煙を 50 mL シリンジ中に引き (タバコ 1 本当たり 50 mL 体積の約 20 体積)、次いで培地中に灌流した。その後、培地の pH を 7.4 に調整し、0.2 μm フィルタを通して培地を濾過滅菌 (filter sterilize) した。細胞を煙リッチ培地に再懸濁し、 1×10^6 細胞/mL の細胞密度で、37 で 10 分間インキュベートした。次いで細胞を RPMI 1640 で 2 回洗浄し、上述した時間でフラスコ又は 24 ウェルプレート (Monomac 6) に播種した。

全 RNA を、Qiagen RNeasy Total RNA Isolation Kit (Qiagen) により、製造業者の手順に従い単離した。精製した RNA を TaqMan 分析に使用した。サイトカイン TNF、IL-1、IL-8 及び IL-6 の発現レベルを測定した。

【0046】

分泌したサイトカインの検出

培養及び刺激した細胞の上澄み中のタンパク質を、最終濃度が 10% になるまで三塩素酸 (TCA) を添加することにより沈殿させた。沈殿物を 80% エタノールで 2 回洗浄し、ペレットを 50 mM Tris/HCl、pH 7.4、10 mM MgCl_2 、1 mM EDTA 中に再懸濁した。ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を測定し、各サンプル 50 μg を 12% SDS ポリアクリルアミドゲルにかけた。ゲルを PVDF 膜上にブロットし、TBS-T 中 5% BSA 中で 1 時間ブロックし、商業的に入手可能な、ヒト TNF、IL-1、IL-8 及び IL-6 に対する抗体と共に 1 時間インキュベートした。TBS-T で洗浄後、セイヨウワサビパーオキシダーゼに結合している抗ヒト IgG と共にブロットをインキュベートし、再度洗浄し、ECL 化学ルミネッセンスキット (Amersham) で展開した。バンドの強度を BioMax X 線フィルム (コダック) で可視化し、濃度計で定量した。

【0047】

CD4⁺ 細胞 (2.0 に記載したものを)、RPMI 1640、10% FCS 中 96 ウェルプレート (5×10^4 細胞/200 μL) に接種し、10 ng/mL MIF の存在下又は不存在下、デキサメタゾン (10 nM) と共にインキュベートした。5% CO₂ で加湿した雰囲気中、37 において 24 時間インキュベートした後、サイトカイン放出 (例えば IL-2 又は IFN- (インターフェロン-ガンマ)) を ELISA により測定した。MIF はデキサメタゾンの阻害活性を超え、サイトカインの放出を引き起こした。デキサメタゾンに与える MIF の反作用する効果を、本発明の物質 (0.1 - 100 ng/mL) を反応混合物に添加することにより調節し、MIF-媒介効果の阻害%として計算した。

単核におけるサイトカイン放出 (IL-1、IL-6、IL-8、TNF-) を測定するために、デキサメタゾン及び MIF (前段落に記載したものと) と共に 1 時間予備インキュベートした後、細胞を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS で処理することが必要である。

【0048】

分泌したマトリックス金属プロテアーゼ及び他のプロテアーゼの検出

サイトカインについて使用した方法と同じ方法を使用した。ウエスタンブロットに使用した抗体は、ヒト MMP-1、MMP-7、MMP-9 及び MMP-12 にあわない。

分泌したマトリックス金属プロテアーゼの活性

蛍光物質を使用してプロテアーゼ活性を測定した。刺激した細胞と未刺激の細胞とから単

10

20

30

40

50

離した上澄み（既述のもの）を、総体積 50 μ L で、1 μ M の基質（D a b c y l - G a b a - P r o - G l n - G l y - L e u - G l u （E D A N S）- A l a - L y s - N H₂ （N o v a b i o c h e m））と共に 5 分間室温でインキュベートした。反応当たり 125 ng の精製した MMP - 12 で陽性コントロールを行った。励起 320 nm 及び発光 405 nm において蛍光光度分析によりプロテアーゼ活性を測定した。

【0049】

タンパク質分解活性及び細胞遊走を測定するための別のアッセイにおいて、走化性（B o y d e n）チャンバを使用した。チャンバの上方部分のウェルにおいて、細胞（ウェル当たり 10^5 細胞）を、M a t r i g e l （B e c t o n D i c k i n s o n）の 8 μ m 層で被覆したフィルター上に置いた。区画の下方部分で、M I F（1 μ g / m L）、M C P - 1（10 ng / m l）、ロイコトリエン B₄（10 ng / m l）等の化学遊走物質を培地に添加した。5 日後フィルターを除き、M a t r i g e l を通り抜けてきた、下面の細胞を、メタノールで固定し、D i f f - Q u i k 染色キット（D a d e B e h r i n g）で染色し、光学顕微鏡により高性能視野（400x）で 3 回（i n t h r e e）カウントした。

10

【0050】

走化性アッセイ

走化性を測定するために、48 ウェルの走化性（B o y d e n）チャンバ（N e u r o p r o b e）を使用した。細胞を、24 時間、F C S 無含有 R P M I 培地中で飢えさせた。100 ng / m L L P S、10 ng / m L ロイコトリエン B₄ 又は M C P - 1 で刺激することにより走化性を刺激した。M I F（1 / m L）を添加して走化性を阻止した。M I F 活性を妨げるよう、本発明の物質を、F C S 無含有 R P M I 培地中で希釈し、30 μ L を下方区画のウェルと置換した。ポリカーボネートフィルター（孔径 8 μ m）で上方区画を下方区画から離れた。50 μ L の細胞懸濁液（ 5×10^4 ）を上方区画のウェルに置いた。該チャンバを、5% C O₂ で加湿した雰囲気中、37 °C で 5 時間インキュベートした。次いで、フィルターを除き、上面の細胞をこすり落とし、下面の細胞をメタノール中で 5 分間固定し、D i f f - Q u i k 染色セット（D a d e B e h r i n g）で染色した。遊走した細胞を光学顕微鏡により高性能視野（400x）で 3 回カウントした。

20

【0051】

粘着アッセイ

細胞を捕集し、P B S で洗浄し、P B S 及び 1 μ M B C E C F（（2' - 7' - ビス - （カルボキシエチル）- 5（6'）- カルボキシフルオレセインアセトキシメチル）エステル、C a l b i o c h e m）中に再懸濁し（ 4×10^6 / m l）、37 °C で 20 分間インキュベートした。P B S 中で細胞を洗浄し、0.1% B S A を含有する P B S 中に再懸濁した（ 3.3×10^6 / m l）。 3×10^5 細胞（90 μ L）を、ラミニン（B e c t o n D i c k i n s o n）で被覆した 96 ウェルの平底プレートの各ウェルに添加し、10 分間放置した。M I F（1 μ g / m L）の存在又は不存在下、本発明の物質を添加し、37 °C で 20 分間インキュベートした。0.1% B S A を含有する P B S で細胞を洗浄し、37 °C で 20 分間プレートをインキュベートした。0.1% B S A を含有する P B S で細胞を洗浄し、粘着細胞を 100 μ L の 0.025 M N a O H 及び 0.1% S D S で可溶化した。蛍光測定により定量した。

30

40

【0052】

食作用

細胞懸濁液（ 2.5×10^4 細胞 / m l）を、5 m l の U 9 3 7 又は T H P - 1 と共に 6 ウェルプレートに播種するか、又は 2 m l の M o n o M a c 6 と共に 24 ウェルプレートに播種し、本発明の物質の存在下、5% C O₂ で加湿した雰囲気中、37 °C で 1 時間インキュベートした。M I F の存在下、本発明の物質を添加し、M I F の活性を阻害した。熱により不活性化した S a c c h a r o m y c e s b o u l a r d i i（20 酵母 / 細胞）の分散懸濁溶液 40 μ L を各ウェルに添加した。細胞を 3 時間より長くインキュベートし、P B S で 2 回洗浄し、細胞遠心分離した（c y t o c e n t r i f u g e）。サイ

50

トスピン調製物を May - Grunwald - Giemsa で染色し、食菌した粒子を光学顕微鏡によりカウントした。

【 0 0 5 3 】

実施例 3 : D A D 1

健康な喫煙者と比較して C O P D 喫煙者において一貫して下方制御すると確認された遺伝子は、D A D 1 (アポトーシス細胞死に対するディフェンダー 1 (d e f e n d e r a g a i n s t a p o p t o t i c c e l l d e a t h 1)) である。元々、D A D 1 はアポトーシスの陰性レギュレータとして発見された (N a k a s h i m a e t a l . 1 9 9 3) 。 S c h i z o s a c c a r o m y c e s p o m b e における O s t 2 タンパク質に対する相同性により、発生期のポリペプチドにおいてアスパラギン残基上に高マンノースオリゴサッカライドを触媒する、オリゴサッカアリアルトランスフェラーゼ複合体の 1 6 k D a サブユニットであることが分かった。D A D 1 は、内在性膜タンパク質であり、いたるところに発現する (K e l l e h e r a n d G i l m o r e 1 9 9 7) 。 D A D 1 は、健康な喫煙者と比較して C O P D 喫煙者では、一貫して上方制御されていることが分かった (4 2 %) 。これを、“倍変化”値 (表 2) に示した。

10

【 0 0 5 4 】

【 表 2 】

表 2 : 閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。平均して、DAD1 は、1.6 倍で上方制御され、メジアンは 1.5 倍である。

20

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.1	5 vs 43	2.3	39 vs 57	4.8	68 vs 66	1.4
1 vs 37	2.5	5 vs 56	3.9	39 vs 58	2.5	68 vs 69	1.
1 vs 43	1.5	5 vs 57	4.0	39 vs 62	6.6	68 vs 76	2.2
1 vs 56	2.4	5 vs 58	2.0	44 vs 2	-2.9	68 vs 78	2.1
1 vs 57	2.5	5 vs 62	5.5	44 vs 37	1.1	70 vs 65	-1.3
1 vs 58	1.3	6 vs 2	1.0	44 vs 43	-1.7	70 vs 66	-1.4
1 vs 62	3.4	6 vs 37	2.7	44 vs 56	1.0	70 vs 69	-1.3
3 vs 2	-1.2	6 vs 43	1.6	44 vs 57	1.0	70 vs 76	1.1
3 vs 37	2.3	6 vs 56	2.7	44 vs 58	-1.9	70 vs 78	1.1
3 vs 43	1.4	6 vs 57	2.7	44 vs 62	1.4	71 vs 65	1.1
3 vs 56	2.3	6 vs 58	1.4	64 vs 65	-1.1	71 vs 66	1.0
3 vs 57	2.3	6 vs 62	3.7	64 vs 66	-1.1	71 vs 69	1.2
3 vs 58	1.2	39 vs 2	1.7	64 vs 69	-1.1	71 vs 76	1.6
3 vs 62	3.2	39 vs 37	4.8	64 vs 76	1.3	71 vs 78	1.6
5 vs 2	1.4	39 vs 43	2.8	64 vs 78	1.3		
5 vs 37	3.9	39 vs 56	4.7	68 vs 65	1.4		

30

40

【 0 0 5 5 】

該タンパク質をクローン化して、既述のクローニング及びアッセイ法と同様にして設計及びアッセイを行った。

実施例 4 : A R L 4

50

健康な喫煙者と比較してCOPDの喫煙者において一貫して上方制御すると確認された遺伝子は、ARL4 (ADP-リボシル化ファクター様タンパク質4 (ADP-ribosylation factor-like protein 4)) である。ARL4は、ADP-リボシル化ファクター (ARF) のファミリーに属する。ARFは、小胞及び膜輸送に関連する。ARL4は核の中でも外でも検出され、細胞分化に関連する (Jacobset al. 1999)。

ARL4は、健康な喫煙者と比較してCOPD喫煙者では、一貫して上方制御されていることが分かっている (45%)。これを、“倍変化” 値 (表3) に示した。COPD喫煙者と健康な喫煙者とを比較する2つの別々の群のp値は0.10及び0.06であった。

【0056】

10

【表3】

表3：閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。平均して、

ARL4は、1.6倍で上方制御され、メジアンは1.9倍である。

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.1	5 vs 43	1.9	39 vs 57	2.5	68 vs 66	2.4
1 vs 37	2.7	5 vs 56	2.2	39 vs 58	1.2	68 vs 69	4.5
1 vs 43	3.2	5 vs 57	1.6	39 vs 62	1.5	68 vs 76	7.8
1 vs 56	4.3	5 vs 58	-1.2	44 vs 2	-3.7	68 vs 78	3.3
1 vs 57	2.0	5 vs 62	1.0	44 vs 37	-1.3	70 vs 65	1.2
1 vs 58	-1.1	6 vs 2	1.2	44 vs 43	-1.1	70 vs 66	1.5
1 vs 62	1.2	6 vs 37	3.4	44 vs 56	1.5	70 vs 69	2.7
3 vs 2	-1.8	6 vs 43	3.6	44 vs 57	-1.7	70 vs 76	4.7
3 vs 37	2.0	6 vs 56	4.1	44 vs 58	-3.5	70 vs 78	1.9
3 vs 43	2.4	6 vs 57	2.7	44 vs 62	-2.7	71 vs 65	1.7
3 vs 56	3.2	6 vs 58	1.3	64 vs 65	-1.1	71 vs 66	2.0
3 vs 57	1.5	6 vs 62	1.6	64 vs 66	1.2	71 vs 69	3.9
3 vs 58	-1.4	39 vs 2	1.1	64 vs 69	2.2	71 vs 76	6.7
3 vs 62	1.0	39 vs 37	3.3	64 vs 76	3.8	71 vs 78	2.8
5 vs 2	-1.3	39 vs 43	4.0	64 vs 78	1.6		
5 vs 37	1.8	39 vs 56	4.7	68 vs 65	1.9		

20

30

【0057】

40

4.1. ARL4のクローニング

ヒト3T3-L1から抽出した全RNAから、ARL4をクローン化した。5 µg RNAを、オリゴ(dt)18プライマー、1x第一ストランド緩衝液、10 mM DTT、0.5 mM dNTPs及び2U Superscript II (Gibco BRL)により42 °Cにおいて50分間cDNAに逆転写した。次いで、70 °C、15分間で該反応を終了し、cDNA濃度をUV分光光度計で測定した。ARL4を増幅させるために、ARL4用の配列特異性プライマー10 pmol/L (配列番号19の前プライマー及び配列番号20の逆プライマー) 及びcDNA100 ngをPCRに使用した。反応条件は以下の通りである：94 °Cで2分間、94 °Cで30秒間を35サイクル、53 °Cで30秒、72 °Cで90秒、次いでTaq DNA-ポリメラーゼにより72 °Cで7分間。反応混合物を2%アガロースゲルで分離し、約600 bpのバンドを切断し、QIAEX II

50

抽出キット (Q i a g e n) を使用して精製した。この生成物を B a m H 1 及び H i n d I I I で消化し、B a m H 1 及び H i n d I I I で消化した q Q E - 3 0 (Q i a g e n) にクローン化した。データベースに入れた配列と同じ配列 (a c c . U 7 3 9 6 0) を有する p Q E / A R L 4 と命名したクローンを次の実験に使用した。

【0058】

4.2. A R L 4 の発現

100 μ g / ml アンピシリンを含む 1 L のブロスに p Q E / A R L 4 を含有する E . c o l i M 1 5 (p R E P 4) の 0.5 mL を一晩培養したものを接種した。培養物を、O D₆₀₀ が 0.6 になるまで激しく撹拌しながら 37 °C においてインキュベートした。1 mM I P T G を添加することにより発現を誘発し、培養物をさらに 4 時間成長させた。4 °C で 20 分間 4000 \times g で遠心分離することにより細胞を捕集した。ペレットを -20 °C で凍らせた。

【0059】

氷上で細胞を解凍し、溶解緩衝液 (50 mM N a H₂ P O₄、pH 8.0、300 mM N a C l、10 mM イミダゾール) の 2 mL / g 細胞ペレット中に再懸濁した。次いで、リゾチームを添加して 1 mg / ml にし、氷上で 30 分間インキュベートした。次いで、細胞を超音波処理した (300 W において 10 秒間 6 回破碎)。10 μ g / ml R N a s e A 及び 5 μ g / ml D N a s e I を添加し、氷上で 10 分間インキュベートした。次いで、4 °C で 20 分間 10000 \times g において細片を引き出すことにより溶菌液を透明にした。次いで、プロテアーゼ阻害剤 (40 μ g / ml バシトラシン、4 μ g / ml ロイペプチン、4 μ g / ml キモトリプシン、10 μ g / ml p e f a b l o c、100 μ M P M S F) を添加した。3 mL の N i - N T A レジン (Q i a g e n) を溶菌液に添加し、カラムに充填した。穏やかに撹拌しながら 4 °C で 60 分間レジンに結合させた。次いで、カラム出口を開け、レジンを 12 mL の洗浄液 (50 mM N a H₂ P O₄、pH 8.0、300 mM N a C l、20 mM イミダゾール) で 2 回洗浄し、3 mL の溶離液 (50 mM N a H₂ P O₄、pH 8.0、300 mM N a C l、250 mM イミダゾール) で 4 回溶出した。組換えタンパク質を含有する溶出画分を、S D S - P A G E で測定し、精製したタンパク質を B r a d f o r d 法により測定した。

【0060】

4.3 G T P S 結合アッセイ

組換え A R L 4 (1 μ M) を、37 °C で、50 mM H e p e s (pH 7.5)、1 mM ジチオスレイトール、1 mM M g C l₂ 存在下又は不存在下 (図の凡例に示した通り)、2 mM E D T A (M g²⁺ 無含有 1 mM 又は 1 μ M)、100 mM K C l 中、[³⁵S] G T P S 又は [³H] G D P (10 μ M, ~ 1000 c p m / p m o l) とともにインキュベートした。G T P S 結合反応を始める前に、本発明の物質を、A R L 4 と共に 5 分間 4 °C において 0.5 ~ 300 nM の濃度範囲で予備インキュベートした。様々な時間において (10 秒から 30 分)、25 μ L のサンプル (A R F 25 p m o l) を除去し、氷冷した 20 mM H e p e s (pH 7.5)、100 mM N a C l、10 mM M g C l₂ 中に希釈し、25 mm B a 85 ニトロセルロースフィルター (S c h l e i c h e r & S c h u l l) で濾過した。2 mL の同じ緩衝液でフィルターを 2 回洗浄し、乾燥し、シンチレーションカウンターで定量した。

【0061】

実施例 5 : G N S

健康な喫煙者と比較して C O P D の喫煙者において一貫して下方制御すると確認された遺伝子は、G N S (グルコサミン - 6 - サルファターゼ (G N S)) である。G N S は、ヘパランの N - アセチル - d - グルコサミン - 6 - サルフェートユニットの 6 - サルフェート基を加水分解する (K r e s s e e t a t . 1980)。G N S は、健康な喫煙者と比較して C O P D 喫煙者では、一貫して下方制御されていることが分かった (44%)。これを、“倍変化”値 (表 4) に示した。C O P D 喫煙者と健康な喫煙者とを比較する 2 つの別々の群の p 値は 0.05 及び 0.006 であった。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

【 表 4 】

表 4 : 閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。平均して、-2.0 倍で下方制御され、メジアンは-1.8 倍である。

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	1.0	5 vs 43	-4.6	39 vs 57	-2.4	68 vs 66	-3.6
1 vs 37	1.0	5 vs 56	-1.7	39 vs 58	-3.3	68 vs 69	-2.3
1 vs 43	-3.7	5 vs 57	-3.1	39 vs 62	-1.1	68 vs 76	-2.6
1 vs 56	-1.1	5 vs 58	-4.0	44 vs 2	-1.2	68 vs 78	-2.6
1 vs 57	-2.3	5 vs 62	1.0	44 vs 37	-1.2	70 vs 65	-1.4
1 vs 58	-3.0	6 vs 2	1.0	44 vs 43	-4.3	70 vs 66	-1.6
1 vs 62	1.0	6 vs 37	1.1	44 vs 56	-1.3	70 vs 69	1.0
3 vs 2	-1.5	6 vs 43	-3.5	44 vs 57	-2.6	70 vs 76	-1.1
3 vs 37	-1.4	6 vs 56	1.0	44 vs 58	-3.7	70 vs 78	-1.1
3 vs 43	-5.0	6 vs 57	-2.2	44 vs 62	-1.2	71 vs 65	-2.1
3 vs 56	-1.8	6 vs 58	-3.0	64 vs 65	-2.3	71 vs 66	-2.5
3 vs 57	-3.1	6 vs 62	1.1	64 vs 66	-2.6	71 vs 69	-1.7
3 vs 58	-3.9	39 vs 2	1.0	64 vs 69	-1.7	71 vs 76	-1.8
3 vs 62	-1.3	39 vs 37	-1.1	64 vs 76	-1.9	71 vs 78	-1.8
5 vs 2	-1.7	39 vs 43	-3.8	64 vs 78	-1.9		
5 vs 37	-1.7	39 vs 56	1.0	68 vs 65	-3.1		

10

20

30

【 0 0 6 3 】

該タンパク質をクローン化して、既述のクローニング及びアッセイ法と同様にして設計及びアッセイを行った。

実施例 6 : トランスグルタミナーゼ 2

健康な喫煙者と比較して C O P D の喫煙者において一貫して下方制御する確認された遺伝子は、トランスグルタミナーゼ 2 である。この酵素は、(- グルタミル) リシン結合の形成及びポリアミンのタンパク質への連結による特異的なタンパク質の共有結合架橋を触媒するカルシウム依存トランスグルタミナーゼのファミリーに属する (F o l k 1 9 8 0) 。トランスグルタミナーゼを分泌することもできる。生理学的機能はよく知られていないが、骨形成、傷の治療、及び他の再生過程において起こるマトリックスの専門的な過程に関連すると思われる (L u e t a l . 1 9 8 5) 。

40

トランスグルタミナーゼ 2 は、健康な喫煙者と比較して C O P D 喫煙者では、一貫して下方制御されていることが分かった (5 5 %) 。これを、“倍変化”値 (表 5) に示した。C O P D 喫煙者と健康な喫煙者とを比較する 2 つの別々の群の p 値は 0 . 0 4 及び 0 . 1 6 であった。

【 0 0 6 4 】

【 表 5 】

表5：閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。平均して、2.3倍で下方制御され、メジアンは-2.35倍である。

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	1.0	5 vs 43	-5.6	39 vs 57	-2.3	68 vs 66	-2.8
1 vs 37	-3.6	5 vs 56	-1.4	39 vs 58	-3.9	68 vs 69	-7.4
1 vs 43	-6.9	5 vs 57	-3.7	39 vs 62	1.0	68 vs 76	-4.4
1 vs 56	-1.5	5 vs 58	-7.5	44 vs 2	1.0	68 vs 78	-3.4
1 vs 57	-3.6	5 vs 62	1.0	44 vs 37	-3.2	70 vs 65	1.5
1 vs 58	-8.9	6 vs 2	2.2	44 vs 43	-7.7	70 vs 66	1.2
1 vs 62	1.0	6 vs 37	-2.2	44 vs 56	-1.9	70 vs 69	-2.5
3 vs 2	1.0	6 vs 43	-3.6	44 vs 57	-3.8	70 vs 76	-1.4
3 vs 37	-2.5	6 vs 56	1.0	44 vs 58	-11.3	70 vs 78	1.0
3 vs 43	-4.5	6 vs 57	-2.5	44 vs 62	1.0	71 vs 65	-1.8
3 vs 56	-1.2	6 vs 58	-4.7	64 vs 65	1.4	71 vs 66	-2.4
3 vs 57	-2.8	6 vs 62	-1.2	64 vs 66	1.1	71 vs 69	-6.9
3 vs 58	-5.9	39 vs 2	1.0	64 vs 69	-2.7	71 vs 76	-3.9
3 vs 62	1.0	39 vs 37	-1.8	64 vs 76	-1.5	71 vs 78	-2.8
5 vs 2	1.0	39 vs 43	-2.9	64 vs 78	-1.1		
5 vs 37	-3.3	39 vs 56	1.2	68 vs 65	-2.1		

10

20

30

40

【0065】

該タンパク質をクローン化して、既述のクローニング及びアッセイ法と同様にして設計及びアッセイを行った。

実施例7：ステアシル - CoA - 不飽和化酵素

健康な喫煙者と比較してCOPDの喫煙者において一貫して下方制御すると確認された遺伝子は、ステアシル - CoA - 不飽和化酵素である。ステアシル - CoA - 不飽和化酵素は、9においてパルミトイル - CoA及びステアロイル - CoAの酸化を触媒し、それぞれ、モノ不飽和脂肪アシル - CoAエステル、パルミトイル - CoA及びアオレオイル - CoA形成をする(Enoch et al., 1976)。

ステアシル - CoA - 不飽和化酵素は、健康な喫煙者と比較してCOPD喫煙者では、一貫して下方制御されていることが分かった(48%)。これを、“倍変化”値(表6)に示した。COPD喫煙者と健康な喫煙者とを比較する2つの別々の群のp値は0.03及び0.15であった。

【0066】

【表6】

表6：閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。平均して、2.3倍で下方制御され、メジアンは-1.9倍である。

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.7	5 vs 43	-5.8	39 vs 57	-3.9	68 vs 66	-2.5
1 vs 37	1.0	5 vs 56	-2.1	39 vs 58	-7.3	68 vs 69	-1.2
1 vs 43	-4.0	5 vs 57	-3.7	39 vs 62	-1.8	68 vs 76	-1.2
1 vs 56	1.0	5 vs 58	-6.5	44 vs 2	-1.1	68 vs 78	-1.5
1 vs 57	-2.4	5 vs 62	-2.3	44 vs 37	1.3	70 vs 65	-1.5
1 vs 58	-4.6	6 vs 2	-3.0	44 vs 43	-2.4	70 vs 66	-1.2
1 vs 62	-1.1	6 vs 37	-1.8	44 vs 56	1.4	70 vs 69	1.5
3 vs 2	-1.8	6 vs 43	-7.1	44 vs 57	-1.5	70 vs 76	1.5
3 vs 37	-1.1	6 vs 56	-2.2	44 vs 58	-2.9	70 vs 78	1.3
3 vs 43	-4.4	6 vs 57	-4.3	44 vs 62	1.3	71 vs 65	-2.5
3 vs 56	-1.2	6 vs 58	-8.2	64 vs 65	-4.2	71 vs 66	-1.9
3 vs 57	-2.7	6 vs 62	-2.4	64 vs 66	-3.3	71 vs 69	1.0
3 vs 58	-5.0	39 vs 2	-2.7	64 vs 69	-1.7	71 vs 76	-1.1
3 vs 62	-1.2	39 vs 37	-1.6	64 vs 76	-1.7	71 vs 78	-1.3
5 vs 2	-2.9	39 vs 43	-6.4	64 vs 78	-2.2		
5 vs 37	-1.9	39 vs 56	-1.7	68 vs 65	-3.3		

10

20

30

40

【0067】

該タンパク質をクローン化して、既述のクローニング及びアッセイ法と同様にして設計及びアッセイを行った。

実施例8：UDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼ

健康な喫煙者と比較してCOPDの喫煙者において一貫して下方制御すると確認された遺伝子は、UDP - グルコースセラミドトランスフェラーゼである。この酵素は、UDP - グルコースからセラミドへのグルコースの移行を触媒する。生成物グルコシル - セラミドは、分化、粘着、増殖、及び細胞 - 細胞認識等の多くの細胞過程に関連する、300より多いグリコシングリピッドのコア構造として機能する (Basu et al. 1968, Ichikawa et al. 1996)。

セラミドトランスフェラーゼは、健康な喫煙者と比較してCOPD喫煙者では、一貫して下方制御されていることが分かった (48%)。これを、“倍変化”値 (表7) に示した。

【0068】

【表7】

表 7 : 閉塞性喫煙者と健康な喫煙者との比較のための倍変化値(FC)。平均して、1.2 倍で下方制御され、メジアンは-1.9 倍である。

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	1.3	5 vs 43	-2.4	39 vs 57	-1.6	68 vs 66	-4.0
1 vs 37	-2.4	5 vs 56	-2.0	39 vs 58	-2.6	68 vs 69	-1.1
1 vs 43	-1.9	5 vs 57	-1.6	39 vs 62	-2.3	68 vs 76	-2.9
1 vs 56	-1.5	5 vs 58	-2.6	44 vs 2	7.2	68 vs 78	-3.4
1 vs 57	-1.3	5 vs 62	-2.0	44 vs 37	1.9	70 vs 65	1.0
1 vs 58	-2.1	6 vs 2	1.0	44 vs 43	2.7	70 vs 66	-2.0
1 vs 62	-1.5	6 vs 37	-4.2	44 vs 56	3.5	70 vs 69	1.5
3 vs 2	1.3	6 vs 43	-2.8	44 vs 57	4.6	70 vs 76	-1.4
3 vs 37	-2.6	6 vs 56	-2.3	44 vs 58	2.7	70 vs 78	-1.8
3 vs 43	-1.9	6 vs 57	-1.8	44 vs 62	3.4	71 vs 65	-2.0
3 vs 56	-1.6	6 vs 58	-3.0	64 vs 65	-1.7	71 vs 66	-4.3
3 vs 57	-1.3	6 vs 62	-2.4	64 vs 66	-3.2	71 vs 69	1.0
3 vs 58	-2.1	39 vs 2	1.0	64 vs 69	-1.1	71 vs 76	-2.5
3 vs 62	-1.7	39 vs 37	-3.5	64 vs 76	-2.5	71 vs 78	-3.7
5 vs 2	1.0	39 vs 43	-2.4	64 vs 78	-2.9		
5 vs 37	-3.1	39 vs 56	-2.2	68 vs 65	-1.9		

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

該タンパク質をクローン化して、既述のクローニング及びアッセイ法と同様にして設計及びアッセイを行った。

L i t e r a t u r e :

M I F

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A., and Bucala, R. (1994). J. Exp. Med. 179, 1985 - 1902.

Bernhagen, J., Calandra, T., and Bucala, R. (1998). J. Mol. Med. 76, 151 - 161.

Calandra, T., Echtenacher, B., Le Roy, D. Pugin, J., Metz, C.N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R., and Glauser, M. P. (2000). Nat. Med. 6, 164 - 170.

D A D 1

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., Nishimoto, T. (1993). Mol. Cell. Biol. 13, 6367 - 6374.

Kelleher, D., and Gilmore, R. (1997). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 4994 - 4999.

A R L 4

Jacobs, S., Schilf, C., Fliegert, F., Kolin

g, S., Weber, Y., Schurmann, A., and Joost, H.-G. (1999). FEBS Lett. 456, 384-388.

GNS

Kresse, H., Paschke, E., von Figura, K., Gilberg, W., and Fuchs, W. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6822-6826.

Transglutaminase 2

Folk, J.E. (1980). Annu. Rev. Biochem. 49, 517-531

Lu, S., Saydak, M., Gentile, V., Stein, J.P., and Davies, P.J.A. (1995). J. Biol. Chem. 270, 9748-9756. 10

Stearoyl-CoA-Desaturase

Enoch, H.G., Catala, A., and Strittmater, P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 5095-5103.

UDP-glucose Ceramide Glucosyltransferase

Basu, S., Kaufmann, B., and Rosemann, S. (1968). J. Biol. Chem. 243, 5802-5807.

Ichikawa, S., Sakiyama, H., Suzuki, G., Jwa Hidari, K.I.-P., and Hirabayashi, Y. (1996) 20
) . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 4638-4643.

Cell lines

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Int. J. Cancer 26, 171-176.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmüller, G. (1988). Int. J. Cancer 41, 456-461.

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/052270 A2(51) International Patent Classification: **G01N 33/68**,
C12Q 1/48, G01N 33/50, A61P 11/00

(21) International Application Number: PCT/EP01/14838

(22) International Filing Date:
15 December 2001 (15.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/257,878 22 December 2000 (22.12.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG
[DE/DE]; 55216 Ingelheim/Rhein (DE).(81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MY, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).**Published:**
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **JUNG, Birgit**
[DE/DE]; Mühlstrasse 23, 55270 Schwabenheim (DE);
MÜLLER, Stefan [DE/DE]; Thalkirchner Str. 184, 81371
München (DE); **KRAUT, Norbert** [DE/AT]; Rosasgasse
13/11, A-1120 Wien (AT).

WO 02/052270 A2

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING SUBSTANCES WHICH POSITIVELY INFLUENCE INFLAMMATORY CONDITIONS OF CHRONIC INFLAMMATORY AIRWAY DISEASES

(57) Abstract: The present invention relates to proteins involved in inflammatory processes and the modulation of the function of such a protein in order to positively influence inflammatory diseases.

PCT/EP01/14838

Introduction

Examples for chronic inflammatory airway diseases, in which macrophages play an important role is chronic bronchitis (CB). CB may occur with or without airflow limitation and includes chronic obstructive pulmonary disease (COPD). CB is a complex disease encompassing symptoms of several disorders: chronic bronchitis which is characterized by cough and mucus hypersecretion, small airway disease, including inflammation and peribronchial fibrosis, emphysema, and airflow limitation. CB is characterized by an accelerated and irreversible decline of lung function. The major risk factor for developing CB is continuous cigarette smoking. Since only about 20% of all smokers are afflicted with CB, a genetic predisposition is also likely to contribute to the disease.

Only a few drugs are known to date to provide some relief for patients. Long-lasting β_2 -agonists and anticholinergics are applied to achieve a transient bronchodilation. A

WO 02/052270

2

PCT/EP01/14838

variety of antagonists for inflammatory events are under investigation like, LTB₄-inhibitors.

There is a continuous need to provide drugs for treating chronic inflammatory airway diseases. Chronic inflammatory airway diseases can be attributed to activated inflammatory immune cells, e.g. macrophages. There is therefore a need for drugs modulating the function of macrophages in order to eliminate a source of inflammatory processes.

10

Description Of The Invention

In the present invention it was found that macrophages involved in an inflammatory process, particularly in a chronic inflammatory airway disease, more particularly in chronic bronchitis or COPD, show a pattern of differentially expressed nucleic acid sequence and protein expression which differs from the pattern of gene expression of macrophages from healthy donors or donors in an irritated state, which latter do contain macrophages in an activated state. Therefore, macrophages show different activation levels under different inflammatory conditions. For example, it is shown in the present invention that macrophages involved in an inflammatory process in COPD smokers show different gene expression pattern than macrophages from healthy smokers, indicating that in COPD smokers macrophages are in a different, hereinafter named "hyperactivated" state. The present invention provides for the possibility to inhibit the hyperactivation or to reduce the hyperactive state of a macrophage by allowing the identification of substances which modulate a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase, all depicted in the Sequence Listing hereinafter, involved in the hyperactivation or maintaining the hyperactive state of a macrophage.

The term "chronic inflammatory airway disease" as used hereinafter includes, for example, Chronic Bronchitis (CB) and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). The preferred meaning of the term "chronic inflammatory airway disease" is CB and COPD, the more preferred meaning is CB or COPD.

WO 02/052270

3

PCT/EP01/14838

The invention is based on the identification of a nucleic acid sequence differentially expressed in a hyperactivated macrophage compared to a macrophage which is not hyperactivated. Such a nucleic acid sequence encodes a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase, which protein is involved in the hyperactivation or maintaining the hyperactive state of a macrophage involved in an inflammatory process, preferably in a chronic inflammatory airway disease. Such differentially expressed nucleic acid sequence or protein encoded by such nucleic acid sequence is in the following also named differentially expressed nucleic acid sequence or protein of the invention, respectively. In particular, the present invention teaches a link between phenotypic changes in macrophages due to differentially expressed nucleic acid sequence and protein expression pattern and involvement of macrophages in inflammatory processes and, thus, provides a basis for a variety of applications. For example, the present invention provides a method and a test system for determining the expression level of a macrophage protein of the invention or differentially expressed nucleic acid sequence of the invention and thereby provides e.g. for methods for diagnosis or monitoring of inflammatory processes with involvement of hyperactivated macrophages in mammalian, preferably human beings, especially such beings suffering from an inflammatory process, preferably in a chronic inflammatory airway disease. The invention also relates to a method for identifying a substance by means of a differentially expressed nucleic acid sequence or protein of the invention, which substance modulates, i.e. acts as an inhibitor or activator on the said differentially expressed nucleic acid sequence or protein of the invention and thereby positively influences chronic inflammatory processes by inhibition of the hyperactivation or reduction of the hyperactive state of macrophages, and thereby allows treatment of mammals, preferably human beings, suffering from a said disease. The invention also relates to a method for selectively modulating such a differentially expressed nucleic acid sequence or protein of the invention in a macrophage comprising administering a substance determined to be a modulator of said protein or differentially expressed nucleic acid sequence. The present invention includes the use of said substances for

WO 02/052270

4

PCT/EP01/14838

treating beings in need of a treatment for an inflammatory process, preferably a chronic inflammatory airway disease.

In the present invention in a first step a differentially expressed nucleic acid
5 sequence of the invention is identified which has a different expression pattern in a hyperactivated macrophage compared to a macrophage which is not hyperactivated. For the sake of conciseness this description deals particularly with investigation of macrophages involved in COPD, however, equivalent results may be obtained with samples from subjects suffering from other chronic inflammatory airway diseases,
10 e.g. other chronic bronchitis symptoms. The investigation of the different expression pattern leads to the identification of a series of differentially expressed nucleic acid sequences expressed in dependency on the activation state of a macrophage involved in an inflammatory process, as exemplified in the Examples hereinbelow.

15 Briefly, such a differentially expressed nucleic acid sequence of the invention is identified by comparative expression profiling experiments using a cell or cellular extract from a hyperactivated macrophage, i.e. for example from the site of inflammation in COPD and from the corresponding site of control being not suffering from said disease, however, suffering under the same irritating condition like
20 cigarette smoke exposure.

In a second step the proteins are identified which are encoded by the differentially expressed nucleic acid sequence, i.e. proteins playing a role in mediating the hyperactivation or in maintaining the hyperactivated state. A group of differentially
25 expressed nucleic acid sequences of the invention can be identified to encode a protein which is selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. A said protein is involved in the hyperactivation or maintaining the hyperactive state which is characterized in that it is expressed in a macrophage
30 that is hyperactivated according the invention at a lower or higher level than the control level in a macrophage which is not hyperactivated.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

5

Accordingly, the invention concerns a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. A protein selected from the said group is hereinafter also named protein of the invention. The said proteins of the invention
5 are depicted hereinafter in the Sequence Listing.

The biological activity of MIF (SEQ ID NO. 1, 2) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process according to the invention, e.g. by inhibition of macrophage migration, is dependent,
10 for example, on counteracting suppressive effects of glucocorticoids and/or on another MIF function like inducing inflammatory response to invasion of bacteria or any other function of MIF relevant for its biological activity according to the invention.

The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or
15 fragment of MIF. Functional in this context means having a function of the MIF that is involved in its biological activity according to the invention.

The biological activity of DAD1 (SEQ ID NO. 3, 4) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process
20 according to the invention, is dependent, for example, on binding to an oligosaccharyltransferase complex and/or on any other DAD1 function relevant for its biological activity according to the invention.

The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or
25 fragment of DAD1. Functional in this context means having a function of DAD1 that is involved in its biological activity according to the invention.

The biological activity of ARL4 (SEQ ID NO. 5, 6) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process
30 according to the invention, is dependent, for example, on interaction with proteins involved in vesicular and membrane trafficking and/or on any other ARL4 function relevant for its biological activity according to the invention.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

6

The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of ARL4. Functional in this context means having a function of ARL4 that is involved in its biological activity according to the invention.

- 5 The biological activity of GNS (SEQ ID NO. 7, 8) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process according to the invention, is dependent, for example, on binding and/or recognizing a substrate, e.g. heparan and/or on its hydrolytic activity and/or on any other GNS function relevant for its biological activity according to the invention.

10

The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of GNS. Functional in this context means having a function of GNS that is involved in its biological activity according to the invention.

- 15 The biological activity of Transglutaminase 2 (SEQ ID NO. 9, 10) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process according to the invention, is dependent, for example, on formation of (γ -glutamyl)lysine isopeptide bonds and/or on any other Transglutaminase 2 function, e.g. substrate recognition, relevant for its biological activity according to the
20 invention.

- The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of Transglutaminase 2. Functional in this context means having a function of Transglutaminase 2 that is involved in its biological activity according to the
25 invention.

- The biological activity of Stearyl-CoA-Desaturase (SEQ ID NO. 11, 12) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process according to the invention, is dependent, for example, on
30 binding to a substrate, e.g. palmitoyl-CoA and/or stearyl-CoA and/or on its oxidative activity and/or on any other Stearyl-CoA-Desaturase function, e.g. substrate recognition, relevant for its biological activity according to the invention.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

7

The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of Stearyl-CoA-Desaturase. Functional in this context means having a function of Stearyl-CoA-Desaturase that is involved in its biological activity according to the invention.

5 .

The biological activity of UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase (SEQ ID NO. 13, 14) according to the present invention, i.e. mediating the involvement of a macrophage in an inflammatory process according to the invention, is dependent, for
10 example, on binding to a substrate, e.g. UDP-glucose and/or ceramide and/ or on its transferring activity and/or on any other UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase function, e.g. substrate recognition, relevant for its biological activity according to the invention.

15 The invention also concerns a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. Functional in this context means having a function of UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase that is involved in its biological activity according to the invention.

20 According to the present invention, the biological activity of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase, if expressed at a lower level than the control level, is preferably activated in order to inhibit hyperactivation or reduce a hyperactivated state of a macrophage, and if expressed at a higher level
25 than the control level, is preferably inhibited in order to inhibit hyperactivation or reduce a hyperactivated state of a macrophage.

In one embodiment the present invention concerns a test method for determining a substance to be an activator or inhibitor of protein selected from the group consisting
30 of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. Since such a protein is involved in a chronic inflammatory airway disease and plays a role in mediating inflammation, a substance modulating the biological activity of such a protein can be used for treating a chronic

WO 02/052270

8

PCT/EP01/14838

inflammatory airway diseases or can be used as lead compound for optimization of the function of the substance in a way that the optimized substance is suitable for treating chronic inflammatory airway diseases. For performing a method of the invention, a test system according to the invention can be used.

5

The present invention also concerns a test system for determining whether a substance is an activator or an inhibitor of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. A test system useful for
10 performing a method of the invention comprises a cellular or a cell-free system. For example, one embodiment of the invention concerns a test system that is designed in a way to allow the testing of substances acting on the expression level of the differentially expressed nucleic acid sequence e.g. using expression of a reporter-gene, e.g. luciferase gene or the like, as a measurable readout. Another
15 embodiment of the invention concerns a test system that is designed in a way to allow the testing of substances directly interacting with a respective function of a protein of the invention or interfering with the respective activation of a function a protein of the invention by a natural or an artificial but appropriate activator of the respective protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS,
20 Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase, e.g. an appropriate kinase or the like.

A test system according to the invention comprises a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase
25 and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase, or a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention, a nucleic acid encoding a said protein or encoding a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention and/or regulatory elements, wherein a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said
30 protein of the invention or a nucleic acid encoding a said protein or a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention is capable to interact with a substance which should be tested in a way that direct interaction leads to a measurable read-out indicative for the change of a respective

WO 02/052270

9

PCT/EP01/14838

biological activity of a said protein according to the invention and /or for the change of expression of a said protein of the invention.

A test system of the invention comprises, for example, elements well known in the art. For example, cell-free systems may include, for example, a said protein or a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention, a nucleic acid encoding a said protein or encoding a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention in soluble or bound form or in cellular compartments or vesicles. Suitable cellular systems include, for example, a suitable prokaryotic cell or eukaryotic cell, e.g. such comprising a said protein of the invention or a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention, a nucleic acid encoding a said protein or encoding a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention. A cell suitable for use in a said test system of the invention may be obtained by recombinant techniques, e.g. after transformation or transfection with a recombinant vector suitable for expression of a desired protein of the invention or functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein of the invention, or may e.g. be a cell line or a cell isolated from a natural source expressing a desired protein of the invention or functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein. A test system of the invention may include a natural or artificial ligand of the protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase if desirable or necessary for testing whether a substance of interest is an inhibitor or activator of a said protein of the invention.

A test method according to the invention comprises measuring a read-out, e.g. a phenotypic change in the test system, for example, if a cellular system is used a phenotypic change of the cell. Such change may be a change in a naturally occurring or artificial response, e.g. a reporter gene expression of the cell to a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase activation or inhibition, e.g. as detailed in the Examples hereinbelow.

WO 02/052270

10

PCT/EP01/14838

A test method according to the invention can on the one hand be useful for high throughput testing suitable for determining whether a substance is an inhibitor or activator of the invention, but also e.g. for secondary testing or validation of a hit or lead substance identified in high throughput testing.

5

The present invention also concerns a substance identified in a method according to the invention to be an inhibitor or activator of a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. A substance of the present invention is any compound which is capable of activating or preferably inhibiting a function of a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. An example of a way to activate or inhibit a function of a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase is by influencing the expression level of a said protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase. Another example of a way to activate or inhibit a function of a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase is to apply a substance directly binding a protein selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase and thereby activating or blocking functional domains of a said protein of the invention, which can be done reversibly or irreversibly, depending on the nature of the substance applied.

Accordingly, a substance useful for activating or inhibiting biological activity of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase includes a substance acting on the expression of differentially expressed nucleic acid sequence, for example a nucleic acid fragment hybridizing with the corresponding gene or regulatory sequence and thereby influencing gene

WO 02/052270

11

PCT/EP01/14838

expression, or a substance acting on a protein selected from the group consisting of:
MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-
Glucose Ceramide Glycosyltransferase itself or on its activation or inhibition by other
naturally occurring cellular components, e.g. an other protein acting enzymatically on
5 a said protein of the invention, e.g. a protein kinase.

Therefore, the invention concerns, for example, a substance which is a nucleic acid
sequence coding for the gene of a protein of the invention, or a fragment, derivative,
mutant or variant of such a nucleic acid sequence, which nucleic acid sequence or a
10 fragment, derivative, mutant or variant thereof is capable of influencing the gene
expression level, e.g. a nucleic acid molecule suitable as antisense nucleic acid,
ribozyme, or for triple helix formation.

The invention also concerns a substance which is e.g. an antibody or an organic or
15 inorganic compound directly binding to or interfering with the activation of a protein
selected from the group consisting of: MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2,
Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase and
thereby affecting its biological activity.

20 In a further aspect, the present invention relates to a method for determining an
expression level of a nucleic acid coding for a protein of the invention, preferably
messenger RNA, or protein of the invention itself, in cell, preferably in a macrophage,
more preferably in a macrophage isolated from a site of inflammation, even more
preferably from a site of inflammation in a subject suffering from a chronic
25 inflammatory airway disease. Such a method can be used, for example, for testing
whether a substance is capable of influencing differentially expressed nucleic acid
sequence expression levels in a method outlined above for determining whether a
substance is an activator or inhibitor according to the present invention. A method for
determining an expression level according to the invention can, however, also be
30 used for testing the activation state of a macrophage, e.g. for diagnostic purposes or
for investigation of the success of treatment for a disease which is caused by the
hyperactivated macrophage. Said macrophage is preferably a mammalian, more
preferably a human cell. Accordingly, macrophages of the present invention are

WO 02/052270

12

PCT/EP01/14838

preferably obtainable from the site of inflammation in a mammal and more preferably from a site of inflammation in a human being. Accordingly, the invention also relates to a method for diagnosis of a chronic inflammatory disease, or monitoring of such disease, e.g. monitoring success in treating beings in need of treatment for such

5 disease, comprising determining an expression level of a nucleic acid coding for a protein of the invention, preferably messenger RNA, or protein of the invention itself in a macrophage.

A method for determining expression levels of a nucleic acid coding for a protein of

10 the invention, preferably messenger RNA, or protein of the invention itself can, depending on the purpose of determining the expression level, be performed by known procedures such as measuring the concentration of respective RNA transcripts via hybridization techniques or via reporter gene driven assays such as luciferase assays or by measuring the protein concentration of said protein of the

15 invention using respective antibodies.

The present invention also relates to the use of a substance according to the invention for the treatment for a chronic inflammatory airway disease. Another embodiment of the present invention relates to a pharmaceutical composition

20 comprising at least one of the substances according to the invention determined to be an activator or an inhibitor. The composition may be manufactured in a manner that is itself known, e.g. by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, powdering, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes.

25 In order to use substances activating or inhibiting according to the invention as drugs for treatment for chronic inflammatory airway diseases, the substances can be tested in animal models for example an animal suffering from an inflammatory airway disorder or a transgenic animal expressing protein of the invention.

30 Toxicity and therapeutic efficacy of a substance according to the invention can be determined by standard pharmaceutical procedures, which include conducting cell culture and animal experiments to determine the IC_{50} , LD_{50} and ED_{50} . The data

WO 02/052270

13

PCT/EP01/14838

obtained are used for estimating the animal or more preferred the human dose range, which will also depend on the dosage form (tablets, capsules, aerosol sprays ampules, etc.) and the administration route (for example transdermal, oral, buccal, nasal, enteral, parenteral, inhalative, intratracheal, or rectal).

5

A pharmaceutical composition containing at least one substance according to the invention as an active ingredient can be formulated in conventional manner. Methods for making such formulations can be found in manuals, e.g. "Remington Pharmaceutical Science". Examples for ingredients that are useful for formulating at least one substance according to the present invention are also found in WO 99/18193, which is hereby incorporated by reference.

In a further aspect the invention concerns a method for treating a chronic inflammatory airway disease. Such method comprises administering to a being, preferably to a human being, in need of such treatment a suitable amount of a pharmaceutical composition comprising at least one substance determined to be an activator or inhibitor by a method according to the invention.

In an other embodiment the invention relates to a method for selectively modulating the concentration of a protein of the invention in a macrophage, comprising administering a substance determined to be an activator or inhibitor of protein of the invention.

The following examples are meant to illustrate the present invention, however, shall not be construed as limitation. However, the Examples describe most preferred embodiments of the invention.

30

Examples

Example 1: Comparative Expression Profiling

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

14

The following is an illustration of how comparative expression profiling can be performed in order to identify protein of the invention.

1.1. Selection of Subjects

- 5 Three groups of subjects are studied: healthy non-smokers, healthy smokers and patients with COPD.

In order to assess lung function subjects have to perform spirometry. A simple calculation based on age and height is used to characterize the results. COPD
10 subjects are included if their FEV₁ % predicted is <70%. Healthy smokers are age and smoking history matched with the COPD subjects but have normal lung function. Healthy non-smokers have normal lung function and have never smoked. The latter group has a methacholine challenge to exclude asthma. This technique requires increasing doses of methacholine to be given to the subject, with spirometry between
15 each dose. When the FEV₁ falls 20% the test is stopped and the PC₂₀ is calculated. This is the dose of methacholine causing a 20% fall in FEV₁, and we will require a value of >32 as evidence of absence of asthma. All subjects have skin prick tests to common allergens and are required to have negative results. This excludes atopic individuals. The clinical history of the subjects is monitored and examined in order to
20 exclude concomitant disease.

1.2. BAL (bronchoalveolar lavage) Procedure

Subjects are sedated with midazolam prior to the BAL. Local anaesthetic spray is used to anaesthetize the back of the throat. A 7mm Olympus bronchoscope is used.
25 The lavaged area is the right middle lobe. 250 ml of sterile saline is instilled and immediately aspirated. The resulting aspirate contains macrophages.

1.3. BAL Processing

BAL is filtered through sterile gauze to remove debris. The cells are washed twice in
30 HBSS, resuspended in 1ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) and counted. The macrophages are spun to a pellet using 15 ml Falcon blue-cap polypropylen, resuspended in Trizol reagent (Gibco BRL Life Technologies) at a concentration of 1 ml Trizol reagent per 10 million cells and then frozen at -70°C.

WO 02/052270

15

PCT/EP01/14838

1.4. Differential Gene Expression Analysis

Total RNA is extracted from macrophage samples obtained according to Example 1.3. Cell suspensions in Trizol are homogenized through pipetting and incubated at room temperature for 5 minutes. 200 μ l chloroform per ml Trizol is added, the mixture
5 carefully mixed for 15 seconds and incubated for 3 more minutes at room temperature. The samples are spun at 10000g for 15 minutes at 4°C. The upper phase is transferred into a new reaction tube and the RNA is precipitated by adding 0.5 ml isopropanol per ml Trizol for 10 minutes at room temperature. Then, the
10 precipitate is pelleted by using a microcentrifuge for 10 minutes at 4°C with 10000g, the pellet is washed twice with 75% ethanol, air dried and resuspended in DEPC- H_2O .

An RNA cleanup with Qiagen RNeasy Total RNA isolation kit (Qiagen) is performed in order to improve the purity of the RNA. The purity of the RNA is determined by
15 agarose gelelectrophoresis and the concentration is measured by UV absorption at 260 nm.

5 μ g of each RNA is used for cDNA synthesis. First and second strand synthesis are performed with the SuperScript Choice system (Gibco BRL Life Technologies). In a
20 total volume of 11 μ l RNA and 1 μ l of 100 μ M T7-(dt)₂₄ primer, sequence shown in SEQ ID NO. 15, are heated up to 70°C for 10 minutes and then cooled down on ice for 2 minutes. First strand buffer to a final concentration of 1x, DTT to a concentration of 10 mM and a dNTP mix to a final concentration of 0.5 mM are added to a total volume of 18 μ l. The reaction mix is incubated at 42°C for 2 minutes
25 and 2 μ l of Superscript II reverse transcriptase (200 U/ μ l) are added. For second strand synthesis 130 μ l of a mix containing 1.15x second strand buffer, 230 μ M dNTPs, 10 U E.coli DNA ligase (10U/ μ l), E.coli DNA polymerase (10 U/ μ l), RNase H (2U/ μ l) is added to the reaction of the first strand synthesis and carefully mixed with a pipette. Second strand synthesis is performed at 16°C for 2 hours, then 2 μ l of T4
30 DNA polymerase (5 U/ μ l) are added, incubated for 5 minutes at 16°C and the reaction is stopped by adding 10 μ l 0.5 M EDTA.

WO 02/052270

16

PCT/EP01/14838

Prior to cRNA synthesis the double stranded cDNA is purified. The cDNA is mixed with an equal volume of phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) and spun through the gel matrix of phase lock gels (Eppendorf) in a microcentrifuge in order to separate the cDNA from unbound nucleotides. The aqueous phase is precipitated
5 with ammoniumacetate and ethanol. Subsequently, the cDNA is used for in vitro transcription. cRNA synthesis is performed with the ENZO BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit according to manufacturer's protocol (ENZO Diagnostics). Briefly, the cDNA is incubated with 1x HY reaction buffer, 1x biotin labeled ribonucleotides, 1x DTT, 1x RNase Inhibitor Mix and 1x T7 RNA Polymerase in a
10 total volume of 40 µl for 5 hours at 37°C. Then, the reaction mix is purified via RNeasy columns (Qiagen), the cRNA precipitated with ammonium acetate and ethanol and finally resuspended in DEPC-treated water. The concentration is determined via UV spectrometry at 260 nm. The remaining cRNA is incubated with
15 1x fragmentation buffer (5x fragmentation buffer: 200 mM Tris acetate, pH 8.1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) at 94°C for 35 minutes.

For hybridization of the DNA chip 15 µg of cRNA is used, mixed with 50 pM biotin-labeled control B2 oligonucleotide, sequence shown SEQ ID NO. 16, 1x cRNA cocktail, 0.1 mg/ml herring sperm DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA, 1x MES (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid) hybridization buffer in a total volume of 300 µl. The
20 hybridization mixture is heated up to 99°C for 5 minutes, cooled down to 45°C for 10 minutes and 200 µl of the mix are used to fill the probe array. The hybridization is performed at 45°C at 60 rpm for 16 hours.

After the hybridization the hybridization mix on the chip is replaced by 300 µl non-stringent wash buffer (100 mM MES, 100 mM NaCl, 0.01% Tween 20). The chip is
25 inserted into an Affymetrix Fluidics station and washing and staining is performed according to the EukGE-WS2 protocol. The staining solution per chip consists of 600 µl 1x stain buffer (100 mM MES, 1 M NaCl, 0.05% Tween 20), 2 mg/ml BSA, 10 µg/ml SAPE (streptavidin phycoerythrin) (Dianova), the antibody solution consists of
30 1x stain buffer, 2 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml goat IgG, 3 µg/ml biotinylated antibody. After the washing and staining procedure the chips are scanned on the HP Gene Array Scanner (Hewlett Packard).

WO 02/052270

17

PCT/EP01/14838

Data Analysis is performed by pairwise comparisons between chips hybridized with RNA isolated from COPD smokers and chips hybridized with RNA isolated from healthy smokers.

- 5 The following is an illustration of differentially expressed genes and their function as identified according to the approach of the present invention.

Example 2: MIF

- A gene identified as consistently upregulated in individuals with COPD codes for
 10 MIF. MIF is secreted by pituitary cells, macrophages, and T cells and its synthesis can be induced by proinflammatory stimuli such as LPS, $\text{TNF}\alpha$, and $\text{IFN-}\gamma$. MIF itself has proinflammatory activity by counteracting suppressive effects of glucocorticoids and by inducing inflammation in response to invasion of bacteria. Neutralizing MIF can prevent septic shock in certain mouse models (Calandra et al. 1994, Bernhagen
 15 et al. 1998, Calandra et al. 2000)

MIF is consistently found upregulated (42%) in COPD smokers compared to healthy smokers. This is shown by "fold change" values (Tab. 1). The p value for comparing COPD smokers and healthy smokers is 0.03.

20

Tab.1: Deregulation of MIF: "fold change" (FC) values for each patient are listed for the comparisons between obstructed and healthy smokers.

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.3	5 vs 43	3.9	39 vs 57	-2.0	68 vs 66	2.8
1 vs 37	8.0	5 vs 56	1.9	39 vs 58	1.0	68 vs 69	2.3
1 vs 43	1.8	5 vs 57	1.5	39 vs 62	1.0	68 vs 76	5.0
1 vs 56	-1.3	5 vs 58	2.9	44 vs 2	1.4	68 vs 78	3.2
1 vs 57	-1.6	5 vs 62	2.0	44 vs 37	14.4	70 vs 65	1.1
1 vs 58	1.2	6 vs 2	-1.6	44 vs 43	3.0	70 vs 66	1.4
1 vs 62	-1.2	6 vs 37	6.5	44 vs 56	1.4	70 vs 69	1.1
3 vs 2	-1.6	6 vs 43	1.5	44 vs 57	1.1	70 vs 76	2.6
3 vs 37	6.3	6 vs 56	-1.6	44 vs 58	2.1	70 vs 78	1.6

WO 02/052270

18

PCT/EP01/14838

3 vs 43	1.4	6 vs 57	-2.0	44 vs 62	1.5	71 vs 65	2.1
3 vs 56	-1.6	6 vs 58	1.0	64 vs 65	2.0	71 vs 66	2.7
3 vs 57	-2.1	6 vs 62	-1.5	64 vs 66	2.6	71 vs 69	2.2
3 vs 58	-1.1	39 vs 2	-1.6	64 vs 69	2.1	71 vs 76	4.9
3 vs 62	-1.5	39 vs 37	1.0	64 vs 76	4.7	71 vs 78	3.1
5 vs 2	1.9	39 vs 43	1.0	64 vs 78	3.0		
5 vs 37	18.5	39 vs 56	-1.5	68 vs 65	2.1		

2.1. Cloning of MIF

MIF is cloned from a total RNA extracted from human THP-1 cells. 5 µg RNA is reverse transcribed into cDNA with 5 ng oligo(dt)₁₈ primer, 1x first strand buffer, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs and 2 U Superscript II (Gibco BRL) at 42°C for 50 minutes. Then, the reaction is terminated at 70°C for 15 minutes and the cDNA concentration is determined by UV-spectrophotometry. For amplification of MIF 100 ng of the cDNA and 10 pmoles of sequence-specific primers for MIF (forward primer, SEQ ID NO. 17 and reverse primer, SEQ ID NO. 18) are used for PCR. Reaction conditions are: 2 minutes of 94°C, 35 cycles with 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 53°C, 90 seconds at 72°C, followed by 7 minutes at 72°C with Taq DNA-polymerase. The reaction mix is separated on a 2% agarose gel, a band of about 360bp is cut out and purified with the QIAEX II extraction kit (Qiagen). The concentration of the purified band is determined and about 120 ng are incubated with 300 ng of pDONR201, the donor vector of the Gateway system (Life Technologies), 1x BP clonase reaction buffer, BP clonase enzyme mix in a total volume of 20 µl for 60 minutes at 25°C. Then, reactions are incubated with 2 µl of proteinase K and incubated for 10 minutes at 37°C. The reaction mix is then electroporated into competent DB3.1 cells and plated on Kanamycin-containing plates. Clones are verified by sequencing. A clone, designated pDONR-MIF, with identical sequence to the database entry (acc. L19686) is used for further experiments.

2.2. Generation of a transfection vector for MIF

WO 02/052270

19

PCT/EP01/14838

The vector containing MIF described under 1.1. is used to transfer the cDNA for MIF to the expression vector pcDNA3.1(+)/attR that contains the "attR1" and "attR2" recombination sites of the Gateway cloning system (Life Technologies) where MIF is expressed under the control of the CMV promoter. 150 ng of the "entry vector"

- 5 pDONR-MIF is mixed with 150 ng of the "destination vector" pcDNA3.1(+)/attR, 4 μ l of the LR Clonase enzyme mix, 4 μ l LR Clonase reaction buffer, added up with TE (Tris/EDTA) to 20 μ l and incubated at 25°C for 60 minutes. Then, 2 μ l of proteinase K solution is added and incubated for 10 minutes at 37°C. 1 μ l of the reaction mix is transformed into 50 μ l DH5 α by a heat-shock of 30 seconds at 42°C after incubating
- 10 cells with DNA for 30 minutes on ice. After heat-shock of the cells 450 μ l of S.O.C. is added and cells are incubated at 37°C for 60 minutes. Cells (100 μ l) are plated on LB plates containing 100 μ g/ml ampicillin and incubated over night.
- A colony that contains pcDNA3.1(+)/attR with MIF as an insert is designated pcDNA/MIF and used for transfection studies.

15

2.3. Expression of recombinant MIF

The vector containing MIF described under 1.1. is used to transfer the cDNA for MIF to the expression vectors gpET28abc/attR that contains the "attR1" and "attR2" recombination sites of the Gateway cloning system (Life Technologies). These

- 20 vectors allow the expression of recombinant his-tagged MIF in bacteria under the control of the T7 promoter. 150 ng of the "entry vector" pDONR-MIF is mixed with 150 ng of the "destination vector" gpET28abc/attR, 4 μ l of the LR Clonase enzyme mix, 4 μ l LR Clonase reaction buffer, added up with TE (Tris/EDTA) to 20 μ l and incubated at 25°C for 60 minutes. Then, 2 μ l of proteinase K solution is added and
- 25 incubated for 10 minutes at 37°C. 1 μ l of the reaction mix is transformed into 50 μ l DH5 α by a heat-shock of 30 seconds at 42°C after incubating cells with DNA for 30 minutes on ice. After heat-shock of the cells 450 μ l of S.O.C. is added and cells are incubated at 37°C for 60 minutes. Cells (100 μ l) are plated on LB plates containing 100 μ g/ml ampicillin and incubated over night.
- 30 A colony that contains gpET28abc/attR with MIF fused to the his-tag in the correct reading frame is designated pgPET/MIF and used for expression of MIF in bacteria.

WO 02/052270

20

PCT/EP01/14838

2.4. Purification of recombinant MIF

1 l LB broth including 100 µg/ml ampicillin is inoculated with 0.5 ml of an overnight culture of *E. coli* M15(pREP4) that carries pQE/MIF. The culture is incubated at 37°C with vigorous shaking until OD₆₀₀ of 0.6. Expression is induced by adding 1 mM IPTG and the culture is grown further for 4 hours. Cells are harvested by centrifugation at 4000xg for 20 minutes at 4°C. Pellet is frozen at -20°C.

Cells are thawed on ice and resuspended in 2 ml/g cell pellet of lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Then, lysozyme is added to 1 mg/ml and incubated on ice for 30 minutes. Then, cells are sonicated (six bursts of 10 seconds at 300 W). 10 µg/ml RNase A and 5 µg/ml DNase I is added and incubated on ice for 10 minutes. Then, lysates are cleared by spinning debris at 10000xg for 20 minutes at 4°C. Then, protease inhibitors (40 µg/ml bacitracin, 4 µg/ml leupeptin, 4 µg/ml chymostatin, 10 µg/ml pepabloc, 100 µM PMSF) are added. 3 ml of Ni-NTA resin (Qiagen) are added to the lysate and filled into a column.

Binding to the resin is allowed for 60 minutes at 4°C during gentle shaking. Then, column outlet is opened, the resin washed twice with 12 ml wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) and eluted with four times 3 ml of elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). The elution fraction that contains the recombinant protein is determined by SDS-PAGE and protein concentration of the purified protein is determined by the method of Bradford.

2.5. Purification of CD4⁺ T cells and mononuclear cells from peripheral blood

10 ml blood of healthy volunteers is diluted with 25 ml PBS and layered carefully on top of 15 ml ficoll in a 50 ml Falcon tube. The tube is spun at 400x g for 40 minutes at room temperature. Cells are removed with a pasteur pipet and washed in 50 ml PBS at 500x g for 10 minutes at RT.

CD4⁺ lymphocytes are isolated with the help of magnetic beads. The cell fraction (as described in the previous paragraph) is resuspended 80 µl MACS buffer (PBS, 2 mM EDTA, 0.5% BSA) per 1x10⁷ cells. 20 µl of CD4⁺ separation beads (Miltenyi Biotech) are added to 1x10⁷ cells, mixed and incubated at 4°C for 15 minutes. Then, 20 volumes of MACS buffer are added and spun at 1000 rpm for 10 minutes. The pellet

WO 02/052270

21

PCT/EP01/14838

is resuspended in 500 µl MACS buffer per 1×10^6 cells and added to a Miltenyi Separation Column LS⁺ that is equilibrated with 3 ml of MACS buffer. Magnetic beads are exposed to a magnetic field for 30 seconds and labeled CD4⁺ cells are retained. Afterwards, the column is separated from the magnetic field and CD4⁺ cells are flushed out with 5 ml of MACS buffer. Cells are spun down and resuspended in RPMI 1640, 10% FCS).

Similarly, human mononuclear cells are isolated from whole blood by ficoll density centrifugation. After seeding the cells are washed twice in 24 hours with RPMI 1640, 10% FCS in order to remove non-adherent cells.

10

2.6. Phenotypic/cellular effects caused by MIF

The following assays are performed with cell lines THP-1 (Tsuchiya et al. 1980), and MonoMac 6 (Ziegler-Heitbrock et al. 1988) that are transiently or stably transfected with MIF and the read-outs are compared to mock-transfected cells. In addition substances according to the invention that stimulate the activity of MIF are added.

Production and Release of Cytokines

Monocytic/macrophage cell lines are stimulated with MIF (1 µg/ml) at cell densities between 2.5 and 5×10^5 cells/ml. Cells are harvested after 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours, the supernatant frozen for further investigation, cells are washed with PBS, and resuspended in 400 µl of RLT buffer (from Qiagen RNeasy Total RNA Isolation Kit) with 143 mM β-mercaptoethanol, the DNA sheared with a 20 g needle for at least 5 times and stored at -70°C .

Stimulation of cells by cigarette smoke is performed by a smoke-enriched media. 100 ml RPMI media without supplements is perfused with the cigarette smoke of 2 cigarettes. The smoke of the cigarettes is pulled into a 50 ml syringe (about 20 volumes of a 50-ml volumes per cigarette) and then perfused into the media. Afterwards, the pH of the media is adjusted to 7.4, and the media is filtersterilized through a 0.2 µm filter. Cells are resuspended in smoke-enriched media and incubated for 10 minutes at 37°C at a density of 1×10^6 cells/ml. Then, cells are washed twice with RPMI 1640 and seeded in flasks or 24-well plates (MonoMac6) for the times indicated above.

WO 02/052270

22

PCT/EP01/14838

Total RNAs are isolated with the Qiagen RNeasy Total RNA Isolation Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Purified RNA is used for TaqMan analysis. The expression levels of cytokines TNF α , IL-1 β , IL-8, and IL-6 are measured.

5

Detection of secreted cytokines

Proteins in the supernatants of the cultured and stimulated cells are precipitated by adding TCA to a final concentration of 10%. Precipitates are washed twice with 80% ethanol and pellets are resuspended in 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA. Protein concentration is determined via the Bradford method and 50 μ g of each sample are loaded on 12% SDS polyacrylamide gels. Gels are blotted onto PVDF-membranes, blocked for 1 hour in 5% BSA in TBST, and incubated for 1 hour with commercially available antibodies against human TNF α , IL-1 β , IL-8, and IL-6. After washing with TBST blots are incubated with anti-human IgG conjugated to horseradish-peroxidase, washed again and developed with ECL chemiluminescence kit (Amersham). Intensity of the bands are visualised with BioMax X-ray films (Kodak) and quantified by densitometry.

Purified CD4⁺ cells (as described under 2.0) are seeded in 96-well-plates (5x10⁴ cells/200 μ l) in RPMI 1640, 10% FCS and incubated with dexamethasone (10 nM) in the presence or absence of 10 ng/ml MIF. After 24 hours of incubation at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, cytokine release (e.g. IL-2 or IFN- γ (interferon-gamma)) is determined by ELISA. MIF overrides the inhibitory effect of dexamethasone and causes release of cytokines. The counteracting effect of MIF on dexamethasone is modulated by adding substances according to the invention (0.1 - 100 ng/ml) to the reaction mix and calculate the effect as percent inhibition of the MIF-mediated effect.

In order to determine cytokine release (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) in monocytes, the cells need to be treated with 1 μ g/ml LPS after 1 hour of preincubation with dexamethasone and MIF (according to previous paragraph).

30

Detection of secreted matrix metalloproteases and other proteases

WO 02/052270

23

PCT/EP01/14838

The procedure is identical to the one used for cytokines. Antibodies used for Western blotting are against human MMP-1, MMP-7, MMP-9, and MMP-12.

Activity of secreted matrix metalloproteases

- 5 Protease activity is determined with a fluorescent substrate. Supernatants isolated from stimulated and unstimulated cells (described above) are incubated in a total volume of 50 μ l with 1 μ M of the substrate (Dabcyl-Gaba-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu (EDANS)-Ala-Lys-NH₂ (Novabiochem)) for 5 minutes at room temperature. Positive controls are performed with 125 ng purified MMP-12 per reaction. Protease activity is
- 10 determined by fluorometry with an excitation at 320 nm and an emission at 405 nm.

In an alternative assay to determine proteolytic activity and cell migration a chemotaxis (Boyden) chamber is used. In the wells of the upper part of the chamber cells (10^5 cells per well) are plated on filters coated with an 8 μ m layer of Matrigel

15 (Becton Dickinson). In the lower compartment chemoattractants like MIF (1 μ g/ml), leukotriene B₄ (10 ng/ml), MCP-1 (10 ng/ml) are added to the media. After five days filters are removed, cells on the undersurface that have traversed the Matrigel are fixed with methanol, stained with the Diff-Quik staining kit (Dade Behring) and counted in three high power fields (400x) by light microscopy.

20

Chemotaxis Assay

- In order to determine chemotaxis, a 48 well chemotaxis (Boyden) chamber (Neuroprobe) is used. Cells are starved for 24 hours in RPMI media without FCS. Chemotaxis is stimulated by 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml leukotriene B₄ or MCP-1.
- 25 Addition of MIF (1 μ g/ml) is used to block chemotaxis. Substances according to the invention are diluted in RPMI media without FCS and 30 μ l is placed in the wells of the lower compartment in order to counteract MIF activity. The upper compartment is separated from the lower compartment by a polycarbonate filter (pore size 8 μ m). 50 μ l cell suspension (5×10^4) are placed in the well of the upper compartment. The
- 30 chamber is incubated for 5 hours at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Then the filter is removed, cells on the upper side are scraped off, cells on the downside are fixed for 5 minutes in methanol and stained with the Diff-Quik staining

WO 02/052270

24

PCT/EP01/14838

set (Dade Behring). Migrated cells are counted in three high-power fields (400x) by light microscopy.

Adherence Assay

- 5 Cells are harvested, washed in PBS and resuspended (4×10^6 /ml) in PBS and 1 μ M BCECF ((2'-7'-bis-(carboxyethyl)-5(6')-carboxyfluorescein acetoxymethyl) ester, Calbiochem) and incubated for 20 minutes at 37°C. Cells are washed in PBS and resuspended (3.3×10^6 /ml) in PBS containing 0.1% BSA. 3×10^5 cells (90 μ l) are added to each well of a 96-well flat bottom plate coated with laminin (Becton Dickinson) and allowed to settle for 10 minutes. Substances according to the invention are added in the presence and absence of MIF (1 μ g/ml), and plates are incubated for 20 minutes at 37°C. Cells are washed with PBS containing 0.1% BSA and adherent cells are solubilized with 100 μ l of 0.025 M NaOH and 0.1% SDS. Quantification is performed by fluorescence measurement.

15

Phagocytosis

- Cell suspensions (2.5×10^4 cells/ml) are seeded in 6-well plates with 5 ml of U937 or THP-1 or in 24-well plates with 2 ml of MonoMac6 and incubated for 1 hour at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. In the presence of MIF, substances according to the invention are added to counteract the activity of MIF. 40 μ l of a dispersed suspension of heat-inactivated *Saccharomyces boulardii* (20 yeast/cell) are added to each well. Cells are incubated for three more hours, washed twice with PBS and cytocentrifuged. The cytospin preparations are stained with May-Grünwald-Giemsa and phagocytosed particles are counted by light microscopy.

25

Example 3: DAD1

- A gene identified as being downregulated in COPD smokers compared to healthy smokers is DAD1 (defender against apoptotic cell death 1). Originally, DAD1 was discovered as being a negative regulator of apoptosis (Nakashima et al. 1993). By homology to the Ost2 protein in *Schizosaccharomyces pombe* it was identified as the 16 kDa subunit of the oligosaccharyltransferase complex which catalyzes the transfer

WO 02/052270

25

PCT/EP01/14838

of high mannose oligosaccharides onto asparagine residues in nascent polypeptides.
DAD1 is an integral membrane protein and is ubiquitously expressed (Kelleher and
Gillmore 1997).

DAD1 is consistently found upregulated (42%) in comparisons between COPD
5 smokers and healthy smokers. This is shown by „fold change“ values (Tab. 2).

Tab. 2: Fold change values (FC) for comparisons between obstructed smokers and
healthy smokers. On average DAD1 is upregulated by 1.6fold, the median is 1.5fold.

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.1	5 vs 43	2.3	39 vs 57	4.8	68 vs 66	1.4
1 vs 37	2.5	5 vs 56	3.9	39 vs 58	2.5	68 vs 69	1.
1 vs 43	1.5	5 vs 57	4.0	39 vs 62	6.6	68 vs 76	2.2
1 vs 56	2.4	5 vs 58	2.0	44 vs 2	-2.9	68 vs 78	2.1
1 vs 57	2.5	5 vs 62	5.5	44 vs 37	1.1	70 vs 65	-1.3
1 vs 58	1.3	6 vs 2	1.0	44 vs 43	-1.7	70 vs 66	-1.4
1 vs 62	3.4	6 vs 37	2.7	44 vs 56	1.0	70 vs 69	-1.3
3 vs 2	-1.2	6 vs 43	1.6	44 vs 57	1.0	70 vs 76	1.1
3 vs 37	2.3	6 vs 56	2.7	44 vs 58	-1.9	70 vs 78	1.1
3 vs 43	1.4	6 vs 57	2.7	44 vs 62	1.4	71 vs 65	1.1
3 vs 56	2.3	6 vs 58	1.4	64 vs 65	-1.1	71 vs 66	1.0
3 vs 57	2.3	6 vs 62	3.7	64 vs 66	-1.1	71 vs 69	1.2
3 vs 58	1.2	39 vs 2	1.7	64 vs 69	-1.1	71 vs 76	1.6
3 vs 62	3.2	39 vs 37	4.8	64 vs 76	1.3	71 vs 78	1.6
5 vs 2	1.4	39 vs 43	2.8	64 vs 78	1.3		
5 vs 37	3.9	39 vs 56	4.7	68 vs 65	1.4		

10 The protein is cloned and assays are designed and performed in an analogous
manner to the cloning and assays described hereinbefore.

15 Example 4: ARL4

WO 02/052270

26

PCT/EP01/14838

A gene identified as being upregulated in COPD smokers compared to healthy smokers is ARL4 (ADP-ribosylation factor-like protein 4). ARLs belong to the family of ADP-ribosylation factors (ARFs). ARFs are involved in vesicular and membrane trafficking. ARL4 is both detected inside and outside of the nucleus and it is

5 speculated that it is involved in cellular differentiation (Jacobs et al. 1999),

ARL4 is consistently found upregulated (45%) in comparisons between COPD smokers and healthy smokers. This is shown by „fold change“ values (Tab. 3: The p values for two separate groups comparing COPD smokers and healthy smokers are

10 0.10 and 0.06.

Tab. 3: Fold change values (FC) for comparisons between obstructed smoker and healthy smokers. On average ARL4 is upregulated by 1.6fold, the median is 1.9fold.

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.1	5 vs 43	1.9	39 vs 57	2.5	68 vs 66	2.4
1 vs 37	2.7	5 vs 56	2.2	39 vs 58	1.2	68 vs 69	4.5
1 vs 43	3.2	5 vs 57	1.6	39 vs 62	1.5	68 vs 76	7.8
1 vs 56	4.3	5 vs 58	-1.2	44 vs 2	-3.7	68 vs 78	3.3
1 vs 57	2.0	5 vs 62	1.0	44 vs 37	-1.3	70 vs 65	1.2
1 vs 58	-1.1	6 vs 2	1.2	44 vs 43	-1.1	70 vs 66	1.5
1 vs 62	1.2	6 vs 37	3.4	44 vs 56	1.5	70 vs 69	2.7
3 vs 2	-1.8	6 vs 43	3.6	44 vs 57	-1.7	70 vs 76	4.7
3 vs 37	2.0	6 vs 56	4.1	44 vs 58	-3.5	70 vs 78	1.9
3 vs 43	2.4	6 vs 57	2.7	44 vs 62	-2.7	71 vs 65	1.7
3 vs 56	3.2	6 vs 58	1.3	64 vs 65	-1.1	71 vs 66	2.0
3 vs 57	1.5	6 vs 62	1.6	64 vs 66	1.2	71 vs 69	3.9
3 vs 58	-1.4	39 vs 2	1.1	64 vs 69	2.2	71 vs 76	6.7
3 vs 62	1.0	39 vs 37	3.3	64 vs 76	3.8	71 vs 78	2.8
5 vs 2	-1.3	39 vs 43	4.0	64 vs 78	1.6		
5 vs 37	1.8	39 vs 56	4.7	68 vs 65	1.9		

15

WO 02/052270

27

PCT/EP01/14838

4.1. Cloning of ARL4

ARL4 is cloned from a total RNA extracted from human 3T3-L1. 5 µg RNA is reverse transcribed into cDNA with 5 ng oligo(dt)₁₈ primer, 1x first strand buffer, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs and 2 U Superscript II (Gibco BRL) at 42°C for 50 minutes. Then, the reaction is terminated at 70°C for 15 minutes and the cDNA concentration is determined by UV-spectrophotometry. For amplification of ARL4 100 ng of the cDNA and 10 pmoles of sequence-specific primers for ARL4 (forward primer, SEQ ID NO. 19 and reverse primer, SEQ ID NO. 20) are used for PCR. Reaction conditions are: 2 minutes of 94°C, 35 cycles with 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 53°C, 90 seconds at 72°C, followed by 7 minutes at 72°C with Taq DNA-polymerase. The PCR product is separated on a 2% agarose gel, a band of about 600bp is cut out and purified with the QIAEX II extraction kit (Qiagen). This product is digested with BamHI and HindIII and cloned into pQE-30 (Qiagen) that is digested with BamHI and HindIII. A clone, designated pQE/ARL4 with identical sequence to the database entry (acc.U73960) is used for further experiments.

4.2 Expression of ARL4

1 l LB broth including 100 µg/ml ampicillin is inoculated with 0.5 ml of an overnight culture of E. coli M15(pREP4) that carries pQE/ARL4. The culture is incubated at 37°C with vigorous shaking until OD₆₀₀ of 0.6. Expression is induced by adding 1 mM IPTG and the culture is grown further for 4 hours. Cells are harvested by centrifugation at 4000xg for 20 minutes at 4°C. Pellet is frozen at -20°C. Cells are thawed on ice and resuspended in 2 ml/g cell pellet of lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Then, lysozyme is added to 1 mg/ml and incubated on ice for 30 minutes. Then, cells are sonicated (six bursts of 10 seconds at 300 W). 10 µg/ml RNase A and 5 µg/ml DNase I is added and incubated on ice for 10 minutes. Then, lysates are cleared by spinning debris at 10000xg for 20 minutes at 4°C. Then, protease inhibitors (40 µg/ml bacitracin, 4 µg/ml leupeptin, 4 µg/ml chymostatin, 10 µg/ml pepabloc, 100 µM PMSF) are added. 3 ml of Ni-NTA resin (Qiagen) are added to the lysate and filled into a column. Binding to the resin is allowed for 60 minutes at 4°C during gentle shaking. Then,

WO 02/052270

28

PCT/EP01/14838

column outlet is opened, the resin washed twice with 12 ml wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) and eluted with four times 3 ml of elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). The elution fraction that contains the recombinant protein is determined by SDS-PAGE
5 and protein concentration of the purified protein is determined by the method of Bradford.

4.3 GTPγS binding assay

Recombinant ARL4 (1 μM) is incubated at 37 °C with [³⁵S]GTPS or [³H]GDP (10 μM, ~1000 cpm/pmol) in 50 mM Hepes (pH7.5), 1 mM dithiothreitol, 1 mM MgCl₂ with or without (as indicated in the figure legends) 2 mM EDTA (1 μM or 1 mM free Mg²⁺), 100 mM KCl. Substances according to the invention are preincubated with ARL4 for 5 minutes at 4°C in a concentration range from 0.5 to 300 nM before starting the GTPγS binding reaction. At various time points (10 seconds to 30 minutes) samples
10 of 25 μl (25 pmoles of ARF) are removed, diluted into 2 ml of ice-cold 20 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 10 mM MgCl₂, and filtered on 25-mm BA 85 nitrocellulose filters (Schleicher & Schüll). Filters are washed twice with 2 ml of the same buffer, dried, and quantified by scintillation counting.

20

Example 5: GNS

A gene identified as being downregulated in COPD smokers compared to healthy smokers is Glucosamine-6-sulphatase (GNS). GNS hydrolysis the 6-sulfate group of
25 the N-acetyl-d-glucosamine 6-sulfate units of heparan (Kresse et al. 1980). GNS is consistently found downregulated (44%) in comparisons between COPD smokers and healthy smokers. This is shown by „fold change“ values (Tab. 4). The p values for two separate groups comparing COPD smokers and healthy smokers are 0.05 and 0.006.

30

WO 02/052270

29

PCT/EP01/14838

Tab. 4: Fold change values (FC) for comparisons between obstructed smoker and healthy smokers. On average is downregulated by -2.0fold, the median is -1.8fold

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	1.0	5 vs 43	-4.6	39 vs 57	-2.4	68 vs 66	-3.6
1 vs 37	1.0	5 vs 56	-1.7	39 vs 58	-3.3	68 vs 69	-2.3
1 vs 43	-3.7	5 vs 57	-3.1	39 vs 62	-1.1	68 vs 76	-2.6
1 vs 56	-1.1	5 vs 58	-4.0	44 vs 2	-1.2	68 vs 78	-2.6
1 vs 57	-2.3	5 vs 62	1.0	44 vs 37	-1.2	70 vs 65	-1.4
1 vs 58	-3.0	6 vs 2	1.0	44 vs 43	-4.3	70 vs 66	-1.6
1 vs 62	1.0	6 vs 37	1.1	44 vs 56	-1.3	70 vs 69	1.0
3 vs 2	-1.5	6 vs 43	-3.5	44 vs 57	-2.6	70 vs 76	-1.1
3 vs 37	-1.4	6 vs 56	1.0	44 vs 58	-3.7	70 vs 78	-1.1
3 vs 43	-5.0	6 vs 57	-2.2	44 vs 62	-1.2	71 vs 65	-2.1
3 vs 56	-1.8	6 vs 58	-3.0	64 vs 65	-2.3	71 vs 66	-2.5
3 vs 57	-3.1	6 vs 62	1.1	64 vs 66	-2.6	71 vs 69	-1.7
3 vs 58	-3.9	39 vs 2	1.0	64 vs 69	-1.7	71 vs 76	-1.8
3 vs 62	-1.3	39 vs 37	-1.1	64 vs 76	-1.9	71 vs 78	-1.8
5 vs 2	-1.7	39 vs 43	-3.8	64 vs 78	-1.9		
5 vs 37	-1.7	39 vs 56	1.0	68 vs 65	-3.1		

The protein is cloned and assays are designed and performed in an analogous
 5 manner to the cloning and assays described hereinbefore.

Example 6: Transglutaminase 2

A gene identified as being downregulated in COPD smokers compared to healthy smokers is transglutaminase 2. This enzyme belongs to a family of calcium-
 10 dependent transglutaminases that catalyze the covalent cross-linking of specific proteins by the formulation of (γ -glutamyl)lysine bonds and the conjugation of polyamines to proteins (Folk 1980). Transglutaminases can also be secreted. The physiological functions are not well understood, it may be involved in the specialized processing of the matrix that occurs during bone formation, wound healing, and other
 15 remodeling processes (Lu et al. 1995).

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

30

Transglutaminase 2 is consistently found downregulated (55%) in comparisons between COPD smokers and healthy smokers. This is shown by „fold change“ values (Tab. 5). The p values for two separate groups comparing COPD smokers and healthy smokers are 0.04 and 0.16.

5

Tab.5: Fold change values (FC) for comparisons between obstructed smoker and healthy smokers. On average is downregulated by 2.3fold, the median is -2.35fold

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	1.0	5 vs 43	-5.6	39 vs 57	-2.3	68 vs 66	-2.8
1 vs 37	-3.6	5 vs 56	-1.4	39 vs 58	-3.9	68 vs 69	-7.4
1 vs 43	-6.9	5 vs 57	-3.7	39 vs 62	1.0	68 vs 76	-4.4
1 vs 56	-1.5	5 vs 58	-7.5	44 vs 2	1.0	68 vs 78	-3.4
1 vs 57	-3.6	5 vs 62	1.0	44 vs 37	-3.2	70 vs 65	1.5
1 vs 58	-8.9	6 vs 2	2.2	44 vs 43	-7.7	70 vs 66	1.2
1 vs 62	1.0	6 vs 37	-2.2	44 vs 56	-1.9	70 vs 69	-2.5
3 vs 2	1.0	6 vs 43	-3.6	44 vs 57	-3.8	70 vs 76	-1.4
3 vs 37	-2.5	6 vs 56	1.0	44 vs 58	-11.3	70 vs 78	1.0
3 vs 43	-4.5	6 vs 57	-2.5	44 vs 62	1.0	71 vs 65	-1.8
3 vs 56	-1.2	6 vs 58	-4.7	64 vs 65	1.4	71 vs 66	-2.4
3 vs 57	-2.8	6 vs 62	-1.2	64 vs 66	1.1	71 vs 69	-6.9
3 vs 58	-5.9	39 vs 2	1.0	64 vs 69	-2.7	71 vs 76	-3.9
3 vs 62	1.0	39 vs 37	-1.8	64 vs 76	-1.5	71 vs 78	-2.8
5 vs 2	1.0	39 vs 43	-2.9	64 vs 78	-1.1		
5 vs 37	-3.3	39 vs 56	1.2	68 vs 65	-2.1		

The protein is cloned and assays are designed and performed in an analogous
10 manner to the cloning and assays described hereinbefore.

Example 7: Stearyl-CoA-Desaturase

A gene identified as being downregulated in COPD smokers compared to healthy
15 smokers is Stearoyl-CoA-Desaturase. Stearoyl-CoA-Desaturase catalyzes the

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

31

oxidation of palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA at the Δ^9 position to form the mono-unsaturated fatty acyl-CoA esters, palmitoleoyl-CoA and aoleoyl-CoA, respectively (Enoch et al. 1976).

Stearoyl-CoA-desaturase is consistently found downregulated (48%) in comparisons between COPD smokers and healthy smokers. This is shown by „fold change“ values (Tab. 6). The p values for two separate groups comparing COPD smokers and healthy smokers are 0.03 and 0.15.

Tab. 6: Fold change values (FC) for comparisons between obstructed smoker and healthy smokers. On average is downregulated by 2.3fold, the median is -1.9fold

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	-1.7	5 vs 43	-5.8	39 vs 57	-3.9	68 vs 66	-2.5
1 vs 37	1.0	5 vs 56	-2.1	39 vs 58	-7.3	68 vs 69	-1.2
1 vs 43	-4.0	5 vs 57	-3.7	39 vs 62	-1.8	68 vs 76	-1.2
1 vs 56	1.0	5 vs 58	-6.5	44 vs 2	-1.1	68 vs 78	-1.5
1 vs 57	-2.4	5 vs 62	-2.3	44 vs 37	1.3	70 vs 65	-1.5
1 vs 58	-4.6	6 vs 2	-3.0	44 vs 43	-2.4	70 vs 66	-1.2
1 vs 62	-1.1	6 vs 37	-1.8	44 vs 56	1.4	70 vs 69	1.5
3 vs 2	-1.8	6 vs 43	-7.1	44 vs 57	-1.5	70 vs 76	1.5
3 vs 37	-1.1	6 vs 56	-2.2	44 vs 58	-2.9	70 vs 78	1.3
3 vs 43	-4.4	6 vs 57	-4.3	44 vs 62	1.3	71 vs 65	-2.5
3 vs 56	-1.2	6 vs 58	-8.2	64 vs 65	-4.2	71 vs 66	-1.9
3 vs 57	-2.7	6 vs 62	-2.4	64 vs 66	-3.3	71 vs 69	1.0
3 vs 58	-5.0	39 vs 2	-2.7	64 vs 69	-1.7	71 vs 76	-1.1
3 vs 62	-1.2	39 vs 37	-1.6	64 vs 76	-1.7	71 vs 78	-1.3
5 vs 2	-2.9	39 vs 43	-6.4	64 vs 78	-2.2		
5 vs 37	-1.9	39 vs 56	-1.7	68 vs 65	-3.3		

The protein is cloned and assays are designed and performed in an analogous manner to the cloning and assays described hereinbefore.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

32

Example 8: UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase

A gene identified as being downregulated in COPD smokers compared to healthy smokers is UDP-glucose Ceramide Glycosyltransferase. This enzyme catalyzes the transfer of glucose from UDP-glucose to ceramide. The product glucosyl-ceramide
 5 serves as the core structure of more than 300 glycosphingolipids that are involved in multiple cellular processes as differentiation, adhesion, proliferation, and cell-cell recognition (Basu et al. 1968, Ichikawa et al. 1996).

Ceramide Glycosyltransferase is consistently found downregulated (48%) in comparisons between COPD smokers and healthy smokers. This is shown by „fold
 10 change“ values (Tab. 7).

Tab. 7: Fold change values (FC) for comparisons between obstructed smoker and healthy smokers. On average is downregulated by 1.2fold, the median is -1.9fold

comp	FC	comp	FC	comp	FC	comp	FC
1 vs 2	1.3	5 vs 43	-2.4	39 vs 57	-1.6	68 vs 66	-4.0
1 vs 37	-2.4	5 vs 56	-2.0	39 vs 58	-2.6	68 vs 69	-1.1
1 vs 43	-1.9	5 vs 57	-1.6	39 vs 62	-2.3	68 vs 76	-2.9
1 vs 56	-1.5	5 vs 58	-2.6	44 vs 2	7.2	68 vs 78	-3.4
1 vs 57	-1.3	5 vs 62	-2.0	44 vs 37	1.9	70 vs 65	1.0
1 vs 58	-2.1	6 vs 2	1.0	44 vs 43	2.7	70 vs 66	-2.0
1 vs 62	-1.5	6 vs 37	-4.2	44 vs 56	3.5	70 vs 69	1.5
3 vs 2	1.3	6 vs 43	-2.8	44 vs 57	4.6	70 vs 76	-1.4
3 vs 37	-2.6	6 vs 56	-2.3	44 vs 58	2.7	70 vs 78	-1.8
3 vs 43	-1.9	6 vs 57	-1.8	44 vs 62	3.4	71 vs 65	-2.0
3 vs 56	-1.6	6 vs 58	-3.0	64 vs 65	-1.7	71 vs 66	-4.3
3 vs 57	-1.3	6 vs 62	-2.4	64 vs 66	-3.2	71 vs 69	1.0
3 vs 58	-2.1	39 vs 2	1.0	64 vs 69	-1.1	71 vs 76	-2.5
3 vs 62	-1.7	39 vs 37	-3.5	64 vs 76	-2.5	71 vs 78	-3.7
5 vs 2	1.0	39 vs 43	-2.4	64 vs 78	-2.9		
5 vs 37	-3.1	39 vs 56	-2.2	68 vs 65	-1.9		

The protein is cloned and assays are designed and performed in an analogous
 15 manner to the cloning and assays described hereinbefore.

WO 02/052270

33

PCT/EP01/14838

Literature:MIF

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (1994). J. Exp. Med. 179,
5 1985-1902.

Bernhagen, J., Calandra, T., and Bucala, R. (1998). J. Mol. Med. 76, 151-161.

Calandra, T., Echtenacher, B., Le Roy, D., Pugin, J., Metz, C.N., Hültner, L.,
Heumann, D., Männel, D., Bucala, R., and Glauser, M.P. (2000). Nat. Med. 6, 164-
170.

10

DAD1

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama,
S., Nishimoto, T. (1993). Mol. Cell. Biol. 13, 6367-6374.

Kelleher, D., and Gilmore, R. (1997). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 4994-4999.

15

ARL4

Jacobs, S., Schilf, C., Fliegert, F., Kölling, S., Weber, Y., Schürmann, A., and Joost,
H.-G. (1999). FEBS Lett. 456, 384-388.

20 GNS

Kresse, H., Paschke, E., von Figura, K., Gilberg, W., and Fuchs, W. (1980). Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6822-6826.

Transglutaminase 2

25 Folk, J.E. (1980). Annu. Rev. Biochem. 49, 517-531

Lu, S., Saydak, M., Gentile, V., Stein, J.P., and Davies, P.J.A. (1995). J. Biol. Chem.
270, 9748-9756.

Stearoyl-CoA-Desaturase

30 Enoch, H.G., Catala, A., and Strittmater, P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 5095-5103.

UDP-glucose Ceramide Glucosyltransferase

Basu, S., Kaufmann, B., and Rosemann, S. (1968). J. Biol. Chem. 243, 5802-5807.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

34

Ichikawa, S., Sakiyama, H., Suzuki, G., Jwa Hidari, K.I.-P., and Hirabayashi, Y.
(1996). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 4638-4643.

Cell lines

- 5 Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K.
(1980). Int. J. Cancer 26, 171-176.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmüller,
G. (1988). Int. J. Cancer 41, 456-461.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

35

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim Pharma KG

5 <120> Method for identifying substances which positively
influence inflammatory conditions of chronic
inflammatory airway diseases

<130> COPDrestlicheP

10

<140>

<141>

<150> US 60/257,878

15 <151> 2000-12-22

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 2167

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

ctgcagggaac caatacccat aggtatatttg tataaatggg ccattggggcc tccagctgg 60
aggctggctg gtgccacgag ggtccacacag goattgggtgt ccttctctata tcacatggcc 120
ttcaactgaga ctggtatatg gattgcacot atcagagacc aaggacagga cctccctgga 180
30 aatctctgag gacctggcct gtgatccagt tgetgccttg tctcttctct gctatgtcat 240
ggcttatctt cttaaccca ttcatcatt cattcatca ttcagcagta ttagtcaatg 300
totcttgata tgcctggcac ctgctagatg gtccccgagt ttaccattag tggaaaagac 360
atttaagaaa ttacccaagg gctctatgag aggcataca cgggtggacct gactagggtg 420
tggcttccct gaggagctga agttgccag aggccacag aaggggagct gaggacgttt 480
35 gaaccactga acctgctctg gacctcgctt ccttccttcg gtgcctccca gcatctatc 540
ctctttaaag agcaggggtt cagggaggtt cctggatgg tgattcgag gggcagctcc 600
cctctacct gcagcatgac taccocgcc catctcaaac acacaagctc acgcatgcgg 660
gactggagcc cttgaggaca tgtggoccaa agacaggagg tacaggggct cagtgctgc 720
agtgaatga actgggcttc atctctgaa gggtaagggt ccattctccg gggtcaccgc 780

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

36

cgcaccccca ccccgggcac agcgccctcct ggcgactaac atcgggtgact tagtgaagg 840
 actaagaaag acccgaggcg aggcgggaac aggcggattt ctagccgcca agtggagaac 900
 aggttgaggc ggtgcggcg gcttagcggc ggttgctgga ggaacgggcg gagtgcgcca 960
 gggctcctgcc ctgcgggggt cgagccgagg caggcggtga cttcccaact cggggcgagg 1020
 5 ccgcagcctc gcggggggcg ggcctgggc cggcggtggc gtcacaaaag gcgggaccac 1080
 agtgggtgctc gagaagtacg gcacgtagct cagcggcggc cgcggcggt gctctgtgc 1140
 ctctgcggcg gtctcctggt cctctgcgca tcatgcgat gttcatcgt aacaccaaag 1200
 tgccccgcgc ctccgtgccc gacgggttcc tctccgagct caccacgag ctggcgagc 1260
 ccacgggcaa gcccccacag gtttgccggg aggggacagg aagaggggg tgcccacgg 1320
 10 acgagggggtt ccgcgctggg agctggggag gcgactcctg aacggagctg gggggcgggg 1380
 cggggggagg acggtggctc gggcccgaa gggacgttcg gggcccgac aggtcgctgg 1440
 ggcgggctga ccgcgcctt tctcgcagt acatcgcggt gcacgtggt ccggaccagc 1500
 tcatggcctt cggcggtccc agcgagcgt gcgcgctct cagcctgac agcatcgga 1560
 agatcgggcg cgcgcagaac cgtcctaca gcaagctgct gtgcggcctg ctggccgagc 1620
 15 gcctgcgcat cagccgggac aggtacggcg agtcgggag gggcggggga gggcgggcg 1680
 cggcgggcca ggcgggggac tgagccacc cgtgagtcg gcctcctccc ccgcagggt 1740
 ctacatcaac tattacgaca tgaacgggc caatgtggc tggaacaact ccaccttcg 1800
 ctaagagccg cagggaacca cgtgtctgc gctggctcca ccggggaac ccgcgcagc 1860
 tgtgttctag gccgcggcac ccaaccttc tgggggggag aaataaacg tttagagact 1920
 20 aggagtgctt cggggttctt tggcttcgg gaggcaattg tgcagagccg ggacattgg 1980
 gagcgaggtc gggaaacgtt gttggggcg ggggtcagg ccgggttct cctctgaac 2040
 ctgctgttcg ggagcccttt tgtccagct gtccctcta cgtcctaac agaggagccc 2100
 cagtgctttt ccattctatg gcgtacgaag ggatgaggag aagttggac ctgcccctg 2160
 gctgcag 2167

25

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro

1 5 10 15

35

Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly

20 25 30

Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met

40 35 40 45

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

37

Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 5 65 70 75 80

Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 85 90 95

10 Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 100 105 110

Thr Phe Ala
 115

15

<210> 3

<211> 699

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<400> 3

catccgggtg ggtcgacggg tctccaaga gtttggggcg cggacgggag taccttggt 60
 gcagttatgt cggcgctcggg agtgtctgtc atttcgcggt tottagaaga gtaacttgagc 120
 25 tccactcgcg agcgtctgaa gttgctggac gcgtacctgc tgtatatact gctgacccggg 180
 ggcgtgcagt tcggttactg tctcctcgtg gggaccttcc ccttcaactc ttttctctcg 240
 ggcttcatct ctgtgtggg gagtttcatc ctacgcggttt gctgagaat acagatcaac 300
 ccacagaaca aagcggattt caaagcctc tcccagagc ggcctttgc tgattttctc 360
 tttgcaagca ccatcctgca ccttgttgc atgaactttg ttggtgaat cattctcatt 420
 30 tacttaattg aggagtagga gactaaaaga atgttcactc ttgaatttc ctggataaga 480
 gttctggaga tggcagctta ttggacacat ggattttctt cagatttgac acttactgct 540
 agctctgctt tttatgacag gagaaaagcc cagagttcac tgtgtgtcag aacaacttcc 600
 taacaaacat ttattaatcc agcctctgcc ttctattaaa tgtaaccttt tgcatttccaa 660
 attaaagaac tccatgccac tctcaaaaa aaaaaaaaa 699

35

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

38

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Ala Ser Val Leu Ser Val Ile Ser Arg Phe Leu Glu Glu Tyr
5 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Pro Gln Arg Leu Lys Leu Leu Asp Ala Tyr Leu Leu
20 25 30

10 Tyr Ile Leu Leu Thr Gly Ala Leu Gln Phe Gly Tyr Cys Leu Leu Val
35 40 45

Gly Thr Phe Pro Phe Asn Ser Phe Leu Ser Gly Phe Ile Ser Cys Val
50 55 60

15 Gly Ser Phe Ile Leu Ala Val Cys Leu Arg Ile Gln Ile Asn Pro Gln
65 70 75 80

Asn Lys Ala Asp Phe Gln Gly Ile Ser Pro Glu Arg Ala Phe Ala Asp
20 85 90 95

Phe Leu Phe Ala Ser Thr Ile Leu His Leu Val Val Met Asn Phe Val
100 105 110

25 Gly

<210> 5

30 <211> 1077

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

35 cttatccctg cgtagaaacg cctgccaatg ctttctcatt tggacccaga ctccagatcg 60
ggagcagtc ttagctgga tcagctacca agagaagttg taaaccaaga agagaaaagc 120
atttcaattt gggacattta ttgcacctg gaaatgggga atgggctgtc agaccagact 180

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

39

tetatcctgt ccaacotgcc ttcatctcag tctttccaca ttgtattctt gggtttggac 240
 tgtgtcggaa agacaacagt cttatcacgg ctgcagttca atgaatttgt aaataccgta 300
 cctaccaaag gatttaacac tgagaaaatt saggtaacct tgggaattc taaaacagtc 360
 acttttcaat tctgggatgt aggtgggtcag gagaaattaa ggccactgtg gaagtcatat 420
 5 accagatgca cagatggcat tgtatttgtt gtggaactct ttgatgtcga aaggatggaa 480
 gaagccaaaa ctgaacttca caaataaact aggatatcag aaaatcaggg agtccctgta 540
 cttatagttg ctaacaaaca agatttgagg aactcattgt cactttcaga aattgagaaa 600
 ttgttagcaa tgggtgaact gagctcatca actccttggc atttgcagcc tacotgtgca 660
 atcataggag atggcctaaa ggaaggactt gagaaactac atgatatgat cattaaaaga 720
 10 agaaaaatgt tgcggcaaca gaaaaagaaa agatgaatat caatacctat tatatctgtg 780
 tggagtaggt tttctctggt ctgattttga caaatagaag agtgtctaca ccgtcccttg 840
 cctgtctgcc ctctgggatg ctattaaago tttgttttgt tgaacaatca gatgcccaac 900
 tctgttgccct tgtggaagat gactaaatgc agtgccttct aaagtgtctc cttctcccta 960
 cccacacaaat cttttggtac taccattttg ggaagccaag caaggatagt aaattgacca 1020
 15 gaacacagtt gtgggaattt ggtctgaagt tagtgaaata aaactttasa gagtgtc 1077

<210> 6

20 <211> 200

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

25 Met Gly Asn Gly Leu Ser Asp Gln Thr Ser Ile Leu Ser Asn Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Phe Gln Ser Phe His Ile Val Ile Leu Gly Leu Asp Cys Ala Gly
 20 25 30

30

Lys Thr Thr Val Leu Tyr Arg Leu Gln Phe Asn Glu Phe Val Asn Thr
 35 40 45

Val Pro Thr Lys Gly Phe Asn Thr Glu Lys Ile Lys Val Thr Leu Gly
 35 50 55 60

Asn Ser Lys Thr Val Thr Phe His Phe Trp Asp Val Gly Gly Gln Glu
 65 70 75 80

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

40

Lys Leu Arg Pro Leu Trp Lys Ser Tyr Thr Arg Cys Thr Asp Gly Ile
 85 90 95

Val Phe Val Val Asp Ser Val Asp Val Glu Arg Met Glu Glu Ala Lys
 5 100 105 110

Thr Glu Leu His Lys Ile Thr Arg Ile Ser Glu Asn Gln Gly Val Pro
 115 120 125

10 Val Leu Ile Val Ala Asn Lys Gln Asp Leu Arg Asn Ser Leu Ser Leu
 130 135 140

Ser Glu Ile Glu Lys Leu Leu Ala Met Gly Glu Leu Ser Ser Ser Thr
 145 150 155 160

15 Pro Trp His Leu Gln Pro Thr Cys Ala Ile Ile Gly Asp Gly Leu Lys
 165 170 175

Glu Gly Leu Glu Lys Leu His Asp Met Ile Ile Lys Arg Arg Lys Met
 20 180 185 190

Leu Arg Gln Gln Lys Lys Lys Arg
 195 200

25

<210> 7

<211> 2379

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 7

ggaattccgg tcggcctctc gcccttcagc tacctgtgcg tccctccgtc ccgtcccgtc 60
 ccgggggtcac ccgggagcct gtcgctatg cggctcctgc ctctagcccc aggtcggctc 120
 cggcgggggca gcccccgcca cctgcctcc tcagccccag cgtcgtact gctgggtgtg 180
 35 ggcggctgcc tgggggtctt cggggtgct gcgggaacc ggaggcccaa cgtgggtgtg 240
 ctctccacgg acgaccagga cgaagtgtc ggcggcatga caccactaaa gaaaacccaa 300
 gctctcatcg gagagatggg gatgaattt tccagtgtt atgtgccaag tgcctctctg 360
 tgcccacga gagccagtat cctgacagga aagtaaccac ataactatca cgttgtgaac 420

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

41

```

aacactctgg aggggaactg cagtagtaag tctggcsga agatccaaga accaaatact 480
ttcccagcaa ttctcagatc aatgtgtggt tatcagacct tttttgcagg gaaatattta 540
aatgagtacg gagcccccaga tgcagggtga ctagaacacg ttctctctgg ttggagttac 600
tggatagcct tggaaaagaa ttctaagtat tataattaca cctgtcttat caatgggaag 660
5 gcacggaagc atggtgaaaa ctatagtgtg gactacctga cagatgtttt ggctaastgtc 720
tcttggact ttctggacta caagtccaac tttagacct tottcatgat gatggccact 780
ccagcgctct attgccttg gacagctgca cctcagtaac agaaggcttt ccagaatgtc 840
tttgaccaa gaacaagaa ctccaacatc catggaacga acaagcactg gttaattagg 900
caagccaaga ctcaatgao taattottca atacagtttt tagataatgc atttaggaaa 960
10 agtgggcaaa ctctctctc agttgatgac cttgtggaga aactgggtcaa gaggtggag 1020
ttcactgggg agtcaacaa cacttacatc ttctatacct cagacaatgg ctatcacaca 1080
ggacagtttt ccttgccaat agacaagaga cagctgtatg agtttgatat caaagtcca 1140
ctgttggttc gaggacctgg gatcaaacca aatcagacaa gcaagatgct ggttgccaac 1200
attgacttgg gtctactat tttagcatt gctggctacg acotaaataa gacacagatg 1260
15 gatgggagt ccttattgcc catthttgaga ggtgocagta actgacctg gogatoagat 1320
gtctgtgtgg aataccaagg agaagggcgt aacgtcactg acccaacatg ccttccctg 1380
agtccctggc tatctaatg ctccccagac tgtgtatgtg aagatgttta taacaatacc 1440
tatgcctgtg tgaggacaat gtcagcattg tggatttgc agtattgcga gtttgatgac 1500
caggagggtg ttgtagaagt ctataatctg actgcagacc cagaccagat cactaacatt 1560
20 gctaaaacca tagaccaga gcttttagga aagatgaact atcggttaat gatgttacag 1620
tctgttctg ggccaacctg tgcactoca ggggttttg accccggata caggtttgac 1680
cccgtctca tgttcagcaa tgcggcagt gtcaggactc gaagattttc caaacatctt 1740
ctgtagcgac ctccacacag ctctgcagat ggtacctgac acgctcttt ctgatgaagt 1800
gatttgatga ggtgtctgta gctagtcttc aagaccacac ctggaagagt ttctgggctg 1860
25 gctttaagtc ctgthttgaaa aagcaaccca gtcagctgac ttctctgtgc aatgtgttaa 1920
actgtgaact ctgccatgt gtcaggagtg gctgtctctg gtctcttctc ttagctgaca 1980
aggacactcc tgaggtcttt gttctcactg tatttttttt atcctggggc cacagttctt 2040
gatttattct cttgtgggta aagaactgaat ttgtaaaacc attcagataa atggcagtac 2100
tttaggcac acacaaacac acagatacac cttttgatat gtaagcttga cctaagttca 2160
30 aagacactgt gtacatttc agattgagca ctccactatc aaaaatacta acatcacatg 2220
gottgaagag taacctcag agctgaatca tccaagtaag aacaagtacc attgttgatt 2280
gataagtaga gatacatttt ttatgatgtt catcacagtg tggtaagggt gcaaatcca 2340
aacatgtcac coagctctg ttcatgtttt tgtgaattc 2379

```

35

<210> 8

<211> 552

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 8

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

42

Met Arg Leu Leu Pro Leu Ala Pro Gly Arg Leu Arg Arg Gly Ser Pro
 1 5 10 15

Arg His Leu Pro Ser Cys Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly
 5 20 25 30

Gly Cys Leu Gly Val Phe Gly Val Ala Ala Gly Thr Arg Arg Pro Asn
 35 40 45

10 Val Val Leu Leu Leu Thr Asp Asp Gln Asp Glu Val Leu Gly Gly Met
 50 55 60

Thr Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ala Leu Ile Gly Glu Met Gly Met Thr
 65 70 75 80

15 Phe Ser Ser Ala Tyr Val Pro Ser Ala Leu Cys Cys Pro Ser Arg Ala
 85 90 95

Ser Ile Leu Thr Gly Lys Tyr Pro His Asn His His Val Val Asn Asn
 20 100 105 110

Thr Leu Glu Gly Asn Cys Ser Ser Lys Ser Trp Gln Lys Ile Gln Glu
 115 120 125

25 Pro Asn Thr Phe Pro Ala Ile Leu Arg Ser Met Cys Gly Tyr Gln Thr
 130 135 140

Phe Phe Ala Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Tyr Gly Ala Pro Asp Ala Gly
 145 150 155 160

30 Gly Leu Glu His Val Pro Leu Gly Trp Ser Tyr Trp Tyr Ala Leu Glu
 165 170 175

Lys Asn Ser Lys Tyr Tyr Asn Tyr Thr Leu Ser Ile Asn Gly Lys Ala
 35 180 185 190

WO 02/052270 PCT/EP01/14838
 43
 Arg Lys His Gly Glu Asn Tyr Ser Val Asp Tyr Leu Thr Asp Val Leu
 195 200 205
 Ala Asn Val Ser Leu Asp Phe Leu Asp Tyr Lys Ser Asn Phe Glu Pro
 5 210 215 220
 Phe Phe Met Met Ile Ala Thr Pro Ala Pro His Ser Pro Trp Thr Ala
 225 230 235 240
 10 Ala Pro Gln Tyr Gln Lys Ala Phe Gln Asn Val Phe Ala Pro Arg Asn
 245 250 255
 Lys Asn Phe Asn Ile His Gly Thr Asn Lys His Trp Leu Ile Arg Gln
 260 265 270
 15 Ala Lys Thr Pro Met Thr Asn Ser Ser Ile Gln Phe Leu Asp Asn Ala
 275 280 285
 Phe Arg Lys Arg Trp Gln Thr Leu Leu Ser Val Asp Asp Leu Val Glu
 20 290 295 300
 Lys Leu Val Lys Arg Leu Glu Phe Thr Gly Glu Leu Asn Asn Thr Tyr
 305 310 315 320
 25 Ile Phe Tyr Thr Ser Asp Asn Gly Tyr His Thr Gly Gln Phe Ser Leu
 325 330 335
 Pro Ile Asp Lys Arg Gln Leu Tyr Glu Phe Asp Ile Lys Val Pro Leu
 340 345 350
 30 Leu Val Arg Gly Pro Gly Ile Lys Pro Asn Gln Thr Ser Lys Met Leu
 355 360 365
 Val Ala Asn Ile Asp Leu Gly Pro Thr Ile Leu Asp Ile Ala Gly Tyr
 35 370 375 380

PCT/EP01/14838

[illegible]

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

```
5 aacaggcgtg acgccagtte taaacttgaa acaaaacaaa acttcaaagt acacccaaat 60
agaacctcct taaagcataa atctcacgga gggtctcggc cggcagtgga aggagccacc 120
gcccccgccc cgacccatggc cgaggagctg gtcttagaga ggtgtgatct ggagctggag 180
accaatggcc gagaccacca caccggccgac ctgtgcgggg agaagctggt ggtgcgacgg 240
ggccagccct tctggctgac cctgcacttt gagggccgca actaccaggc cagtgtagac 300
10 agtctcactc tcaagtctgt gaccggccca gcccttagcc agggggccgg gaccaaggcc 360
cgttttccac taagagatgc tgtggaggag ggtgactgga cagccaccgt ggtggaccag 420
caagactgca cctctctgct gcagctcacc accccggcca acgccccat cggcctgtat 480
cgctcagccc tggaggccct cactggctac cagggatcca gotttctgct gggccacttc 540
atthttgctct tcaacgcctg gtgcccagcg gatgtgtgt acctggactc ggaagaggag 600
15 cggcaggagt atgtctcac ccagcagggc ttatctacc agggctcggc caagttccac 660
aagacatac cttggaattt tgggcagttt caagatggga tcttagacat ctgcctgac 720
ctctatgatg tcaaccccaa gttcctgaag aacgcggcc gtgactgttc ccggcgagc 780
agccccctct acgtgggccc ggtgggtagt ggcattgtca actgcaacga tgaccagggt 840
gtgctgctgg gacgtggga caacaactac ggggacggc tcagcccat gtcctggatc 900
20 ggcagcgtgg acatcctgag ggcctggaag aaccacggct gccagcgcgt caagtatggc 960
cagtctctgg tcttcgcgc cgtggcctgc acagtgtga ggtgcctagg catccctacc 1020
cgctcgtgta ccaactacaa ctccggccat gaccagaaca gcaaccttct catcgatgac 1080
ttccgcaatg agtttgggga gatccagggt gacaagagcg agatgatctg gaacttccac 1140
tgtctgggtg agtctggat gaccagcccg gacctgcagc cggggtaaga gggctggcag 1200
25 gccctggacc caacgcccc gaagaagagc gaaggaaagt actgctgtgg ccagttcca 1260
gttcgtgcca tcaaggaggc cgacctgagc accaagtacg atcgccctt tgtctttgag 1320
gaggtcaatg ccgacgtggt agactggatc cagcaggacg atgggtctgt gcacaaatcc 1380
atcaaccgtt cctgtatctg tgggctgaag atcagcata agagcgtggg ccgagacgag 1440
cgggaggata tcaccacac ctacaaatac ccagaggggt cctcagagga gagggaggcc 1500
30 ttcaacaagg cgaaccacct gaacaaactg gccgagaagg agggagacag gatggccatg 1560
cggatccgtg tgggcccagc catgaacatg ggcagtgact ttgactcttt tgcccacatc 1620
accaacaaca ccgtgagga gtactctctg ccctctctgc tctgtgcccg caccgtcagc 1680
tacaatggga tcttggggcc cgaagtgtgg accaagtacc tgcctcaact aacctggag 1740
cctttctctg agaagagcgt tctcttttc atctctatg agaaataccg tgactgcctt 1800
35 acggagtcca acctcatcaa ggtgcgggcc ctctctgtg agccagttat caacagctac 1860
ctgctggctg agagggaact ctacctggag aatccagaaa tcaagatccg gatccttggg 1920
gagcccaagc agaaacgcaa gctgggtgct gaggtgtccc tgcagaacc gctcctgtg 1980
gccctggaag gctgcacctt cactgtggag ggggccggcc tgaactgagga gcagaagacg 2040
gtggagatcc cagaccctgt ggaggcaggg gaggaagtta aggtgagaat ggacctogtg 2100
40 ccgtctacca tgggctcca cagctgggtg gtgaacttcg agagcgacaa gctgaaggct 2160
gtgaagggtc tccggaatgt catcattggt cccgcctaag ggaacctgc tccagcctg 2220
ctgagagccc ccaccttgat cccaatcctt atcccaagct agtgagcaaa atatgccct 2280
tattgggccc cagacccag ggcagggtgg gcagcctatg ggggctctcg gaaatggaat 2340
gtgcccctgg cccatctcag cctcctgagc ctgtgggtcc ccaactcacc cctttgctgt 2400
```

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

46

gaggaatgct ctgtgccaga aacagtggga gccctgaact gtgctgactg gggctggggt 2460
 gagagaggaa agacctaat tccctctcct gccagatgc ccttggaaa gccattgacc 2520
 acccaccata ttgtttgac tacttcatag ctcttggag caggcaaaaa agggacagca 2580
 tgccttggc tggatcagga atccagctcc ctgactgca tccgtacct cttcccatga 2640
 5 ctgcaccag ctccaggggc ccttgggaca cccagagctg ggtggggaca gtgataggcc 2700
 caaggtcccc tccacatccc agcagcccaa gcttaatagc cctccccctc aacctcacca 2760
 ttgtgaagca cctactatgt gctgggtgcc tcccacactt gctggggctc acggggcctc 2820
 caacccattt aatcaccatg ggaactgtt gtgggcgtg ctccaggat aaggagactg 2880
 aggccttagag agaggagga gccccctcca caccagtgc ctctgggta taagcaaggc 2940
 10 tgggtaatgt gaaggcccaa gacagagtc tggcctctg actctgagtc cactgtcca 3000
 ttataaacc cagctgacc tgagactgtc gcagaggtg tctggggcct ttatcaaaaa 3060
 aagaatcagc caagacaagg aggtagagag gggactggg gactgggagt cagagccctg 3120
 gctgggttca ggtcccaagt ctggccagcg actgccttct cctctctggg cctttgttcc 3180
 cttgttggtc agaggagtga ttgaacctgc tcatctccaa ggaacctctc cactccatgt 3240
 15 ttgcaataca caattcc 3257

<210> 10

20 <211> 687

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

25 Met Ala Glu Glu Leu Val Leu Glu Arg Cys Asp Leu Glu Leu Glu Thr
 1 5 10 15

Asn Gly Arg Asp His His Thr Ala Asp Leu Cys Arg Glu Lys Leu Val
 20 25 30

30

Val Arg Arg Gly Gln Pro Phe Trp Leu Thr Leu His Phe Glu Gly Arg
 35 40 45

Asn Tyr Gln Ala Ser Val Asp Ser Leu Thr Phe Ser Val Val Thr Gly
 35 50 55 60

Pro Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gly Thr Lys Ala Arg Phe Pro Leu Arg
 65 70 75 80

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

47

Asp Ala Val Glu Glu Gly Asp Trp Thr Ala Thr Val Val Asp Gln Gln
85 90 95

Asp Cys Thr Leu Ser Leu Gln Leu Thr Thr Pro Ala Asn Ala Pro Ile
5 100 105 110

Gly Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Ala Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ser
115 120 125

10 Ser Phe Val Leu Gly His Phe Ile Leu Leu Phe Asn Ala Trp Cys Pro
130 135 140

Ala Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Gln Glu Tyr Val
145 150 155 160

15 Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Ala Lys Phe Ile Lys
165 170 175

Asn Ile Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Gln Asp Gly Ile Leu Asp Ile
20 180 185 190

Cys Leu Ile Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn Ala Gly
195 200 205

25 Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Val Tyr Val Gly Arg Val Gly
210 215 220

Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
225 230 235 240

30 Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Val Ser Pro Met Ser Trp Ile Gly
245 250 255

Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Asn His Gly Cys Gln Arg Val
35 260 265 270

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

48

Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
 275 280 285

Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
 5 290 295 300

His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Phe
 305 310 315 320

10 Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
 325 330 335

Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
 340 345 350

15 Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr
 355 360 365

Tyr Cys Cys Gly Pro Val Pro Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
 20 370 375 380

Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp
 385 390 395 400

25 Val Val Asp Trp Ile Gln Gln Asp Asp Gly Ser Val His Lys Ser Ile
 405 410 415

Asn Arg Ser Leu Ile Val Gly Leu Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
 420 425 430

30 Arg Asp Glu Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
 435 440 445

Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys
 35 450 455 460

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

49

Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
 465 470 475 480

Gln Ser Met Asn Met Gly Ser Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Thr
 5 485 490 495

Asn Asn Thr Ala Glu Glu Tyr Val Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
 500 505 510

10 Thr Val Ser Tyr Asn Gly Ile Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Lys Tyr
 515 520 525

Leu Leu Asn Leu Thr Leu Glu Pro Phe Ser Glu Lys Ser Val Pro Leu
 530 535 540

15 Cys Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Arg Asp Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu
 545 550 555 560

Ile Lys Val Arg Ala Leu Leu Val Glu Pro Val Ile Asn Ser Tyr Leu
 20 565 570 575

Leu Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg
 580 585 590

25 Ile Leu Gly Glu Pro Lys Gln Lys Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser
 595 600 605

Leu Gln Asn Pro Leu Pro Val Ala Leu Glu Gly Cys Thr Phe Thr Val
 610 615 620

30 Glu Gly Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Thr Val Glu Ile Pro Asp
 625 630 635 640

Pro Val Glu Ala Gly Glu Glu Val Lys Val Arg Met Asp Leu Val Pro
 35 645 650 655

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

50

Leu His Met Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Ser Asp Lys
660 665 670

Leu Lys Ala Val Lys Gly Phe Arg Asn Val Ile Ile Gly Pro Ala
5 675 680 685

<210> 11

<211> 1470

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gacggtcacc cgttgccagc tctagccttt aaattcccg ctcggggacc tccacgcacc 60
15 gcggttagcg ccgacaacca gctagcgtgc aaggcgccgc ggtcagcgcc gtaccggcgg 120
gtttcgaaac cgcagtcctc cggcgacccc gaactccgct cggagcctc agcccccctgg 180
aaagtgtacc cggcatcgga gagccaagat gccggccac ttgctgcagg acgatatctc 240
tagctctcat accaccacca ccaccattac agcgctcct ccaggggctc tgcagaatgg 300
aggagataag ttggagaaga tgccctctta cttggaagac gacattcgcc ctgatataaa 360
20 agatgatata tatgaccoca cctacaagga taaggaggc ccaagcccca aggttgaata 420
tgtctggaga aacatcatcc ttatgtctct gctacacttg ggaagcctgt atgggatcac 480
tttgattcct acctgcaagt tctacacctg gctttggggg gtattctact attttgtcag 540
tgccctgggc ataacagcag gagctcatcg tctgtggagc caccgctctt acaagctcg 600
gctgccccta cggctcttct tcatcattgc caacacaatg gcattccaga atgatgtcta 660
25 tgaatgggtc cgtgaccaco gtgcccacca caagttttca gaaacacatg ctgacccoca 720
taattccoga cgtggctttt tcttctctca cgtgggttgg ctgcttctgc gcaaacaccc 780
agctgtcaaa gagaaggga gtaagctaga cttgtctgac ctgaagctg agaaactggt 840
gatgttccag aggaggtact acaaacctgg cttgctgatg atgtgttcca tctgcccac 900
gcttgtgccc tggatattct ggggtgaaac ttttcaaac agtgtgttgc ttgccacttt 960
30 cttgcgatat gctgtgtgct ttaatgccac ctggtggtg aacagtgtg cccacctctt 1020
cggatattct ccttatgaca agaacattag ccccgggag aatatcctgg ttccacttgg 1080
agctgtgggt gagggttcc acaactacca ccactcctt cctatgact actctgocag 1140
tgagtaccgc tggcacatca acttcaacac attcttcatt gattggatgg ccgcccctcg 1200
tctgacctat gaccggaaga aagtctcaa gcccgccatc ttggccagga ttaaaagaac 1260
35 cggagatgga aactacaaga gtggtgagt ttgggtccc tcaggttcct ttttcaaaaa 1320
ccagccagcg agaggtttta atgtctgttt attaactact gaataatgct accaggatgc 1380
taaagatgat gatgttaacc cattccagta cagtattctt ttaaaattca aaagtattga 1440
aagccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1470

40

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

51

<210> 12

<211> 359

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 12

Met Pro Ala His Leu Leu Gln Asp Asp Ile Ser Ser Ser Tyr Thr Thr
 1 5 10 15

10 Thr Thr Thr Ile Thr Ala Pro Pro Pro Gly Val Leu Gln Asn Gly Gly
 20 25 30

Asp Lys Leu Glu Thr Met Pro Leu Tyr Leu Glu Asp Asp Ile Arg Pro
 35 40 45

15

Asp Ile Lys Asp Asp Ile Tyr Asp Pro Thr Tyr Lys Asp Lys Glu Gly
 50 55 60

Pro Ser Pro Lys Val Glu Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Met Ser
 20 65 70 75 80

Leu Leu His Leu Gly Ala Leu Tyr Gly Ile Thr Leu Ile Pro Thr Cys
 85 90 95

25 Lys Phe Tyr Thr Trp Leu Trp Gly Val Phe Tyr Tyr Phe Val Ser Ala
 100 105 110

Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser His Arg Ser Tyr
 115 120 125

30

Lys Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Ile Ile Ala Asn Thr Met
 130 135 140

Ala Phe Gln Asn Asp Val Tyr Glu Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His
 35 145 150 155 160

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

52

His Lys Phe Ser Glu Thr His Ala Asp Pro His Asn Ser Arg Arg Gly
 165 170 175
 Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Ala
 5 180 185 190
 Val Lys Glu Lys Gly Ser Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu Glu Ala Glu
 195 200 205
 10 Lys Leu Val Met Phe Gln Arg Arg Tyr Tyr Lys Pro Gly Leu Leu Met
 210 215 220
 Met Cys Phe Ile Leu Pro Thr Leu Val Pro Trp Tyr Phe Trp Gly Glu
 225 230 235 240
 15 Thr Phe Gln Asn Ser Val Phe Val Ala Thr Phe Leu Arg Tyr Ala Val
 245 250 255
 Val Leu Asn Ala Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Leu Phe Gly
 20 260 265 270
 Tyr Arg Pro Tyr Asp Lys Asn Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ile Leu Val
 275 280 285
 25 Ser Leu Gly Ala Val Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Ser Phe
 290 295 300
 Pro Tyr Asp Tyr Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Trp His Ile Asn Phe Asn
 305 310 315 320
 30 Thr Phe Phe Ile Asp Trp Met Ala Ala Leu Gly Leu Thr Tyr Asp Arg
 325 330 335
 Lys Lys Val Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Arg Ile Lys Arg Thr Gly
 35 340 345 350

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

53

Asp Gly Asn Tyr Lys Ser Gly
355

5 <210> 13

<211> 1637

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10 <400> 13

```
gaggcggaacc ggagcgcggg gccgcggtcg ccccgaccag agccgggaga ccgcagcacc 60
cgcagccgcc cgcgagcgcg ccgaagacag cgcgcaggcg agagcgcgcg gccggggcg 120
cgcaggccct gccgcgccct ccgtcccca ccccccctcg cctttctctc tcccacctt 180
cctctcgcc cccgcgcgcc cgcacgggc gccacccctg tctctctctt gccggagcgt 240
15 tgtccgtggt gccgcgcga gccgcgcgg cgggtccggc gccgcgggg atggcgcgtgc 300
tggacccggc cttggaggga atggccgtct togggttctg cctctctctt gtgctgtggc 360
tgcagcattt catggctato atctacccc gattacacct caacaagaag gcaactgaca 420
aacagccotta tagcaagcto ccagggtgtct ctctcttgaa accactgaaa ggggtagato 480
ctaacttaac caacaacctg gaaacattct ttgaattgga ttatccaaa tatgaagtgc 540
20 tcccttgtgt acaagatcat gatgaccag ccattgatgt atgtaagaag cttcttggaa 600
aatatccaaa tgttgatgct agattgttta tagtggttaa aaaagttggc attaatccta 660
aaattaataa tttaatgcca ggatatgaag ttgcaagta tgatcttata tggatttgtg 720
atagtggaaat aagagtaatt ccagatacgc ttaactgacat ggtgaatcaa atgacagaaa 780
aagtaggctt ggttccggg ctgccttacg tagcagacag acagggcttt gctgccacct 840
25 tagagcaggc atatttttga acttcacatc caagatacta tatctctgcc aatgtaactg 900
gtttcaaatg tgtgacagga atgtctgtt taatgagaaa agatgtgttg gatcaagcag 960
gaggacttat agcttttgcct cagtacattg ccgaagatta ctttatggcc aaagcgatag 1020
ctgacgcagg ttggagggtt gcaatgtcca ctcaagttgc aatgcaaac totggctcat 1080
attcaatttc tcagtttcaa tccagaatga tcagggtggc caaactacga attaatatgc 1140
30 ttcctgctac aataatttgt gagccaattt cagaatgctt tgttgccagt ttaattattg 1200
gatgggcagc ccaccatgtg ttcagatggg atattatggt attttcatg tgcattggc 1260
tggcatggtt tatatttgac tacattcaac tcaggggtgt ccaggggtgc acactgtgtt 1320
tttcaaaact tgattatgca gtcgcctggt tcatccgcga atccatgaca atatacattt 1380
ttttgtctgc attatgggac ccactataa gctggagaa tcgtcgctac agattacgot 1440
35 gtgggggtac agcagaggaa atoctagatg tataactaca gotttgtgac tgtatataaa 1500
ggaaaaaaga gaagtattat aaattatgtt tatataaatg cttttaaaaa totaccttot 1560
gtatgtttat cacatgtatg ttttggatgc tgttctttaa tttatttttg catggcaact 1620
gcacatgtga aaaaaaa 1637
```

40

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

54

<210> 14

<211> 394

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 14

Met Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Glu Gly Met Ala Val Phe Gly Phe

1 5 10 15

10 Val Leu Phe Leu Val Leu Trp Leu Met His Phe Met Ala Ile Ile Tyr

20 25 30

Thr Arg Leu His Leu Asn Lys Lys Ala Thr Asp Lys Gln Pro Tyr Ser

35 40 45

15

Lys Leu Pro Gly Val Ser Leu Leu Lys Pro Leu Lys Gly Val Asp Pro

50 55 60

Asn Leu Ile Asn Asn Leu Glu Thr Phe Phe Glu Leu Asp Tyr Pro Lys

20 65 70 75 80

Tyr Glu Val Leu Leu Cys Val Gln Asp His Asp Asp Pro Ala Ile Asp

85 90 95

25 Val Cys Lys Lys Leu Leu Gly Lys Tyr Pro Asn Val Asp Ala Arg Leu

100 105 110

Phe Ile Gly Gly Lys Lys Val Gly Ile Asn Pro Lys Ile Asn Asn Leu

115 120 125

30

Met Pro Gly Tyr Glu Val Ala Lys Tyr Asp Leu Ile Trp Ile Cys Asp

130 135 140

Ser Gly Ile Arg Val Ile Pro Asp Thr Leu Thr Asp Met Val Asn Gln

35 145 150 155 160

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

55
 Met Thr Glu Lys Val Gly Leu Val His Gly Leu Pro Tyr Val Ala Asp
 165 170 175
 Arg Gln Gly Phe Ala Ala Thr Leu Glu Gln Val Tyr Phe Gly Thr Ser
 5 180 185 190
 His Pro Arg Tyr Tyr Ile Ser Ala Asn Val Thr Gly Phe Lys Cys Val
 195 200 205
 10 Thr Gly Met Ser Cys Leu Met Arg Lys Asp Val Leu Asp Gln Ala Gly
 210 215 220
 Gly Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Ile Ala Glu Asp Tyr Phe Met Ala
 225 230 235 240
 15 Lys Ala Ile Ala Asp Arg Gly Trp Arg Phe Ala Met Ser Thr Gln Val
 245 250 255
 Ala Met Gln Asn Ser Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Gln Phe Gln Ser Arg
 20 260 265 270
 Met Ile Arg Trp Thr Lys Leu Arg Ile Asn Met Leu Pro Ala Thr Ile
 275 280 285
 25 Ile Cys Glu Pro Ile Ser Glu Cys Phe Val Ala Ser Leu Ile Ile Gly
 290 295 300
 Trp Ala Ala His His Val Phe Arg Trp Asp Ile Met Val Phe Phe Met
 305 310 315 320
 30 Cys His Cys Leu Ala Trp Phe Ile Phe Asp Tyr Ile Gln Leu Arg Gly
 325 330 335
 Val Gln Gly Gly Thr Leu Cys Phe Ser Lys Leu Asp Tyr Ala Val Ala
 35 340 345 350

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

56
Trp Phe Ile Arg Glu Ser Met Thr Ile Tyr Ile Phe Leu Ser Ala Leu
355 360 365
Trp Asp Pro Thr Ile Ser Trp Arg Thr Gly Arg Tyr Arg Leu Arg Cys
5 370 375 380
Gly Gly Thr Ala Glu Glu Ile Leu Asp Val
385 390

10

<210> 15
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15

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

<400> 15
20 ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gggaggcggg tttttttttt tttttttttt 60
ttt 63

<210> 16
25 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16
gtcgtcaaga tgctaccgtt cagga 25

35

<210> 17
<211> 51

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tgccgatgtt catcgtaaac a 51

10

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18

20 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt taggcgaagg tggagtgtt 50

<210> 19

<211> 32

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

30

<400> 19

aaggattcgg gaatgggctg toagaccaga ct 32

35 <210> 20

<211> 31

<212> DNA

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

58

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

5

<400> 20

ttaagcttgc atcttttctt tttctgttgc c

31

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

59
Claims

- 1) A method for determining whether a substance is an activator or an inhibitor of a function of a protein, characterized in that the protein is selected from the group
5 consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase, or a functional equivalent, derivative, variant, mutant or fragment of a said protein, and characterized in that the method comprises contacting a said protein or functional equivalent, variant, mutant or fragment thereof with a substance to be tested whether it is an inhibitor or
10 activator of a desired function of a said protein, and measuring whether the desired function is inhibited or activated.
- 2) A method according to claim 1 in which the inhibition or activation of the desired function is measured directly.
- 15 3) A method according to claim 1 in which the inhibition or activation of the desired function is measured indirectly.
- 4) A method according to claim 1 in which the said protein is a mammalian protein.
- 20 5) A method according to claim 4 in which the said protein is a human protein.
- 6) A method according to claim 1 in which the analysis is performed using a cellular system.
- 25 7) A method according to claim 1 in which the analysis is performed using a cell-free system.
- 8) A method for determining an expression level of a protein which is selected from
30 the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase comprising determining the level of a said protein expressed in a macrophage.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

60

- 9) A method according to claim 8 in which said macrophage is a mammalian macrophage.
- 10) A method according to claim 9 in which said macrophage is a human
5 macrophage.
- 11) A method according to claim 8 for diagnosis or monitoring of a chronic inflammatory airway disease.
- 10 12) A method according to claim 11 in which the chronic inflammatory airway disease is selected from the group consisting of chronic bronchitis and COPD.
- 13) A test system for determining whether a substance is an activator or an inhibitor of a function of a protein, characterized in that the protein is selected from the group
15 consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase or a functional equivalent, variant, mutant or fragment of a said protein.
- 14) A test system according to claim 13 comprising a cell expressing a protein
20 selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase or a functional equivalent, variant, mutant or fragment of a said protein.
- 15) A substance determined to be an activator or inhibitor of a protein selected from
25 the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase.
- 16) A substance which is an activator or inhibitor of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-
30 Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase for the treatment for a disease.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

61

17) A substance according to claim 16 in which said disease is a chronic inflammatory airway disease.

18) A substance according to claim 17 in which said chronic inflammatory airway disease is selected from the group consisting of chronic bronchitis and COPD.

19) A pharmaceutical composition comprising at least one substance determined to be an activator or inhibitor of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase.

20) Use of a substance determined to be an activator or inhibitor of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase for preparing a pharmaceutical composition for treating a chronic inflammatory airway disease.

21) Use of a substance according to claim 20 in which the chronic inflammatory airway disease is selected from the group consisting of chronic bronchitis and COPD.

22) A method for treating a chronic inflammatory airway disease which method comprises administering to a being in need of such treatment a suitable amount of a pharmaceutical composition comprising at least one substance determined to be an activator or inhibitor of a protein selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase.

23) A method according to claim 22 for treating a mammal.

30

24) A method according to claim 22 for treating a human being.

WO 02/052270

PCT/EP01/14838

62

25) A method according to claim 22 for treating a chronic inflammatory airway disease selected from the group consisting of chronic bronchitis and COPD.

26) A method for selectively modulating a protein selected from the group
5 consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2, Stearyl-CoA-Desaturase
and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase in a macrophage, comprising
administering a substance determined to be an activator or inhibitor of a protein
selected from the group consisting of MIF, DAD1, ARL4, GNS, Transglutaminase 2,
Stearyl-CoA-Desaturase and UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase.

10

27) A method according to claim 26 in which the macrophage is involved in a chronic inflammatory airway disease.

28) A method according to claim 27 in which the chronic inflammatory airway disease
15 is selected from the group consisting of chronic bronchitis and COPD.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/052270 A3(51) International Patent Classification: **G01N 33/68**,
C12Q 1/48, G01N 33/50, A61P 11/00

(21) International Application Number: PCT/EP01/14838

(22) International Filing Date:
15 December 2001 (15.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/257,878 22 December 2000 (22.12.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG
[DE/DE]; 55216 Ingelheim/Rhein (DE).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **JUNG, Birgit**
[DE/DE]; Mühlschtrasse 23, 55270 Schwabenheim (DE).
MÜLLER, Stefan [DE/DE]; Thalkirchner Str. 184, 81371
München (DE). **KRAUT, Norbert** [DE/AT]; Rosasgasse
13/11, A-1120 Wien (AT).(81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BI, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).**Published:**
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
13 March 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/052270 A3

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING SUBSTANCES WHICH POSITIVELY INFLUENCE INFLAMMATORY CONDI-
TIONS OF CHRONIC INFLAMMATORY AIRWAY DISEASIS(57) Abstract: The present invention relates to proteins involved in inflammatory processes and the modulation of the function of
such a protein in order to positively influence inflammatory diseases.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Appl. No. PCT/EP 01/14838
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12Q1/48 G01N33/50 A61P11/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAKITA HIRONI ET AL: "Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation." AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 158, no. 2, August 1998 (1998-08), pages 573-579, XP001120665 ISSN: 1073-449X the whole document --- -/--	1-14, 22-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* 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) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2002		Date of mailing of the international search report 27/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-8016		Authorized officer Moreno de Vega, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/EP 01/14838
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DONNELLY SEAMAS C ET AL: "Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome." NATURE MEDICINE, vol. 3, no. 3, 1997, pages 320-323, XP009002030 ISSN: 1078-8956 the whole document	1-14, 22-28
X	US 6 080 407 A (THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 27 June 2000 (2000-06-27) the whole document	1-14, 22-28
P, X	WO 01 32606 A (THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 10 May 2001 (2001-05-10) the whole document	22-28

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 01/14838
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. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 22-28 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 15-21 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> 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:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/EP 01 14838

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 15-21

Present claims 15-21 relate to an extremely large number of possible compounds and compositions defined by a functional feature determined by a vague and undefined method. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not to be found, however, for the compounds and compositions claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the claimed scope is impossible.

Furthermore, present claim 13 relate to a test system without specifying any of its components. A lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claim impossible. Consequently, the search has been carried out for claim 13 limited to dependent claim 14, which appears to specify at least one component of the test system.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International Application No. PCT/EP 01/14838	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6080407	A	27-06-2000	US 6030615 A		29-02-2000
			AU 692159 B2		04-06-1998
			AU 6834594 A		12-12-1994
			CA 2163211 A1		24-11-1994
			EP 0702566 A1		27-03-1996
			JP 9500363 T		14-01-1997
			WO 9426307 A1		24-11-1994
WO 0132606	A	10-05-2001	AU 1235601 A		14-05-2001
			EP 1228037 A1		07-08-2002
			WO 0132606 A1		10-05-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/48	A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
// C 0 7 K 14/47	G 0 1 N 33/50	Z
	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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ユング ビルギット

ドイツ連邦共和国 5 5 2 7 0 シュヴァベンハイム ミュールシュトラッセ 2 3

(72)発明者 ミューラー シュテファン

ドイツ連邦共和国 8 1 3 7 1 ミュンヘン タルキルヒナー シュトラッセ 1 8 4

(72)発明者 クラウト ノルベルト

オーストリア アー - 1 1 2 0 ヴィーン ロザスガッセ 1 3 / 1 1

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB07 BB10 BB14 BB21 BB24 BB50 BB51 CB01 FA16

FB02 FB03

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ20 QQ79 QR02 QR06 QR10 QR41 QR48

QR57 QR66 QR69 QR77 QS12 QS28 QS36 QX01 QX02

4C084 AA17 NA14 ZA59 ZB11

4H045 AA30 BA10 CA40 EA50 FA72 FA74 GA26