

(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2005-528083**(P2005-528083A)**

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-554728 (P2003-554728)	(71) 出願人	504238862
(86) (22) 出願日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		アレス トレイディング ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月20日 (2004.8.20)		スイス ツェーハー 1 1 7 0 オーボンヌ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005885		ゾーナ アンデュストリエル ド ルーリエッタ
(87) 国際公開番号	W02003/054012	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	0130720.6	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 レプチンタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、本明細書で 4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーとして同定した新規なタンパク質 INSP035、並びに前記タンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の疾患診断、疾患予防および疾患治療における使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の (i) から (iii) のいずれかのポリペプチド：

(i) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(ii) 分泌タンパク質機能、特に 4 - ヘリックスバンドルサイトカイン機能、より具体的には長鎖サイトカイン機能、さらに具体的にはレプチン機能を有する (i) のポリペプチドのフラグメント、または (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する (i) のポリペプチドのフラグメント；または

(iii) (i) もしくは (ii) の機能的等価物。

10

【請求項 2】

分泌タンパク質として機能するか、特に 4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーであるか、より具体的には長鎖サイトカインファミリーのメンバーであるか、さらに具体的にはレプチンである、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 (iii) に記載の機能的等価物であり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と相同であり、且つ 4 - 分泌タンパク質活性、具体的には 4 - ヘリックスバンドルサイトカイン活性、より具体的には長鎖サイトカイン活性、さらに具体的にはレプチン活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】

20

配列番号：2に記載のアミノ酸配列もしくはその活性なフラグメントと 80% を超える配列同一性、好ましくは 90%、95%、98% または 99% を越える配列同一性を有する請求項 1 - 3 のいずれか 1 項記載のフラグメントまたは機能的等価物。

【請求項 5】

配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと顕著な構造的相同性を示す、請求項 1 - 4 のいずれか 1 項記載の機能的等価物。

【請求項 6】

請求項 1 (i) 記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有し、配列番号：2の配列に由来する 7 つまたはそれより多い（例えば 8、10、12、14、16、18、20 またはそれより多い）アミノ酸残基から成る、請求項 1、2 または 4 のいずれか 1 項記載のフラグメント。

30

【請求項 7】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコードする精製核酸分子。

【請求項 8】

配列番号：1に記載の核酸配列を有するか、または前記核酸配列の余剰的等価物もしくはそのフラグメントである、請求項 7 に記載の精製核酸分子。

【請求項 9】

高いストリンジェンシーの条件下で請求項 7 または 8 記載の核酸分子とハイブリダイズする、精製核酸分子。

【請求項 10】

請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含むベクター。

40

【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターで形質転換されている宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと特異的に結合し、且つ好ましくは前記ペプチドの分泌タンパク質活性、具体的には 4 - ヘリックスバンドルサイトカイン活性、より具体的には長鎖サイトカイン活性、さらに具体的にはレプチン活性を阻害する、リガンド。

【請求項 13】

抗体である、請求項 12 記載のリガンド。

【請求項 14】

50

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの発現レベルもしくは活性を増加または低下させる化合物。

【請求項 15】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの生物学的作用のいずれをも誘発することなく、前記ポリペプチドと結合する、請求項 14 記載の化合物。

【請求項 16】

天然または改変されている、基質、リガンド、酵素、レセプターまたは構造的もしくは機能的模倣物である、請求項 14 または 15 記載の化合物。

【請求項 17】

疾患の治療または診断に使用するための、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、請求項 11 記載の宿主細胞、請求項 12 もしくは 13 記載のリガンド、または請求項 14 - 16 のいずれか 1 項記載の化合物。 10

【請求項 18】

患者由来の組織において、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコードする天然遺伝子の発現レベルを評価するか、または請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの活性を評価すること；および
前記発現レベルまたは活性をコントロールレベルと比較すること；
を含み、このとき前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆している、患者の疾患を診断する方法。 20

【請求項 19】

*in vitro*で実施される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

(a) 請求項 12 または 13 記載のリガンドを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適する条件下で生物学的サンプルと接触させる工程；および

(b) 前記複合体を検出する工程；
を含む請求項 18 または 19 記載の方法。

【請求項 21】

(a) 患者由来の組織サンプルを核酸プローブと、請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で接触させる工程； 30

(b) コントロールサンプルを、工程 (a) で用いられるのと同じ条件下で前記プローブと接触させる工程；および

(c) 前記サンプルにおけるハイブリッド複合体の存在を検出する工程；を含み、このときコントロールサンプルのハイブリッド複合体のレベルと異なる患者サンプルのハイブリッド複合体レベルの検出は疾患を示唆している、請求項 18 または 19 記載の方法。

【請求項 22】

(a) 患者の組織由来の核酸サンプルを核酸プライマーと、請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子と前記プライマーとの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で接触させる工程； 40

(b) コントロールサンプルを、工程 (a) で用いられるのと同じ条件下で前記プライマーと接触させる工程；

(c) 前記サンプルの核酸を増幅させる工程；および、

(d) 患者サンプルおよびコントロールサンプルの両サンプルから、増幅核酸レベルを検出する工程、
を含み、このときコントロールサンプルの増幅核酸レベルと顕著に異なる患者サンプルの増幅核酸レベルの検出は疾患を示唆している、請求項 18 または 19 記載の方法。

【請求項 23】

(a) 疾患について検査される患者から、組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから、請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子を単離する 50

工程；および、

(c) 疾患に附随する変異の存在を前記疾患の指標として前記核酸分子中で検出することによって、疾患について患者を診断する工程；

を含む請求 18 または 19 記載の方法。

【請求項 24】

核酸分子を増幅させて増幅産物を生成し、前記増幅産物で変異の有無を検出することをさらに含む、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

該核酸分子を、前記分子にハイブリダイズする核酸プローブとストリンジェントな条件下で接触させて、疾患に附随する変異に対応する任意の部分に前記核酸プローブの非ハイブリダイズ部分を有するハイブリッド二本鎖分子を形成させること；および

10

疾患に附随する変異の有無の指標として前記プローブ鎖の非ハイブリダイズ部分の有無を検出すること；

によって、前記患者における変異の有無を検出する請求項 23 または 24 記載の方法。

【請求項 26】

疾患が、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態、特に免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、より具体的には 5 型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）から選択される、請求項 18 - 25 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 27】

分泌タンパク質として、具体的には 4 - ヘリックスバンドルサイトカインスーパーファミリーのポリペプチドメンバーとして、より具体的には長鎖サイトカインファミリーのメンバーとして、さらに具体的にはレプチンとしての、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの使用。

30

【請求項 28】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、請求項 11 記載の宿主細胞、請求項 12 または 13 記載のリガンド、または請求項 14 - 16 のいずれか 1 項記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 29】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドまたは請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含む、ワクチン組成物。

40

【請求項 30】

以下の疾患の治療用医薬の製造で使用される、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 - 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、請求項 11 記載の宿主細胞、請求項 12 または 13 記載のリガンド、請求項 14 - 16 のいずれか 1 項記載の化合物、または請求項 28 に記載の医薬組成物：細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態、特に免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症

50

、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病；腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病；骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、より具体的には5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）。

【請求項31】

請求項1 - 6のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項7 - 9のいずれか1項記載の核酸分子、請求項10記載のベクター、請求項11記載の宿主細胞、請求項12もしくは13記載のリガンド、請求項14 - 16のいずれか1項記載の化合物または請求項28に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、患者の疾患を治療する方法。

10

【請求項32】

疾患にかかっている患者での天然遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較する場合に低い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物または組成物がアゴニストである、請求項31記載の方法。

【請求項33】

疾患にかかっている患者での天然遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較する場合に高い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物または組成物がアンタゴニストである、請求項31記載の方法。

20

【請求項34】

請求項1 - 6のいずれか1項記載のポリペプチドの発現もしくは活性レベルまたは請求項7 - 9のいずれか1項記載の核酸分子の発現レベルを、前記患者由来の組織においてある期間にわたってモニターすることを含む、患者において疾患の治療をモニターする方法であって、前記期間にわたる発現または活性のレベルがコントロールレベルに対して変化することは前記疾患の退行の指標である、前記方法。

30

【請求項35】

請求項1 - 6のいずれか1項記載のポリペプチドまたは請求項7 - 9のいずれか1項記載の核酸分子を、前記ポリペプチドまたは核酸分子に対し結合親和性を有すると疑われる1つまたは2つ以上の化合物と接触させること；および、前記核酸分子またはポリペプチドと特異的に結合する化合物を選択すること；を含む、疾患の治療および/または診断で有効な化合物を同定する方法。

【請求項36】

請求項7 - 9のいずれか1項記載の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；前記核酸分子の増幅に有用なプライマーを含む第二の容器；および疾患の診断を容易にするために前記プローブおよびプライマーを使用するための指示を含む、疾患の診断に有用なキット。

40

【請求項37】

ハイブリダイズしないRNAを消化するための薬剤を保有する第三の容器をさらに含む、請求項36のキット。

【請求項38】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも1つが請求項7 - 9のいずれか1項記載の核酸分子である前記キット。

【請求項39】

請求項1 - 6のいずれか1項記載のポリペプチドと結合する1つまたは2つ以上の抗体、および前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬を含む、キッ

50

ト。

【請求項 40】

形質転換されており、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをより高いレベルもしくはより低いレベルで発現する、または発現しない、非ヒトトランスジェニック動物または非ヒトノックアウト動物。

【請求項 41】

請求項 40 記載の非ヒトトランスジェニック動物を候補化合物と接触させること、および前記動物の疾患に対する前記化合物の作用を決定することによって、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、本明細書において分泌タンパク質として、特に 4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー、詳しくは長鎖サイトカインファミリーのメンバー、最も詳しくはレプチンとして同定された新規タンパク質 INSP035 に関し、さらに疾患の診断、予防および治療におけるこれらタンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許および特許出願は、参照により完全に本明細書に含まれるものとする。

【背景技術】

【0002】

薬剤の発見プロセスにおいて、機能ゲノム学の時代の到来にあわせて根幹的な革命が現在進行している。“機能ゲノム学”という用語は、対象のタンパク質配列に機能を帰属させるためにバイオインフォマティクスツールを利用するアプローチに用いられる。そのようなツールは、配列データの生成速度が、これらタンパク質配列に機能を割り当てる研究室の能力をはるかに越えるのでますます必要性を増している。

バイオインフォマティクスツールの潜在能力および精度が高まっているために、前記ツールは通常生化学的特徴付け技術と急速に置き換えられつつある。実際、本発明の同定に用いた高度なバイオインフォマティクスツールは、今や、高い信頼性をもつ結果を出力する能力を有する。

配列データが利用可能になるにつれ、種々の研究機関および企業組織がそれらを調査し、重要な発見が絶え間なく達成され続けている。しかしながら、研究および薬剤発見のための標的として、更なる遺伝子およびそれらがコードするポリペプチドを同定し特徴付ける必要性は引き続き存在している。

【0003】

[サイトカインに関する導入部]

サイトカインは、白血球から主に分泌される増殖因子ファミリーであり、ナノモル以下の濃度で細胞内の一連の反応を実行することができる強力な調節物質として作用するメッセンジャータンパク質である。インターロイキン、ニューロトロフィン、増殖因子、インターフェロンおよびケモカインは全て、細胞性レセプターと共に働いて細胞の増殖および分化を調節するサイトカインファミリーと定義される。それらのサイズは、サイトカインが迅速に体内のあちこちに輸送され、必要なときには分解されることを可能にする。広範囲の細胞機能、特に免疫応答および細胞増殖を制御することにおけるそれらの役割は、ここ 20 年にわたる多くの研究によって明らかにされている (S.B. Boppana (1996) Indian J. Pediatr. 63(4): 447-52)。サイトカインは、他の増殖因子のように、1 つの特異的な組織または腺ではなく多数の異なる種類の細胞によって生産されるという事実によって古典的ホルモンとは区別され、また、標的細胞上に位置する特異的な高親和性レセプターとの相互作用を介して広範囲の細胞に効果を及ぼす。

全サイトカインのコミュニケーション系は、多面作用性 (1 つのメッセンジャーが多種の作用を引き起こす) および重複性 (各作用が 2 つ以上のメッセンジャーに引き起こされ

10

20

30

40

50

る)の両方を示す(G. Tringali et al. (2000) Therapie. 55(1): 171-5; L. Tessarolo (1998) Cytokine Growth Factor Rev. 9(2): 125-137)。1個の細胞に対する個々のサイトカインの作用はまた、前記サイトカインの濃度、他のサイトカインの濃度、サイトカインの時間的順序、および細胞の内部状態(細胞周期、隣接する細胞の存在、癌性)にも左右されるであろう。

【0004】

サイトカインは典型的には小さな(200アミノ酸未満)タンパク質であるが、それらは、翻訳後にスプライシングされるさらに大きな前駆体からしばしば生成される。mRNAの選択的スプライシング経路に加えて、前記スプライシングによって、各サイトカインの広範な変種が提供され、その各々は生物学的作用において実質的に異なり得る。多くのサイトカインの膜および細胞外マトリックス結合型も、単離されている(M. Okada-Ban et al. (2000) Int. J. Biochem. Cell Biol. 32(3): 263-267; S.P. Atamas (1997) Life Sci. 61(12): 1105-1112)。

サイトカインは複数のファミリーに分類され得るが、大部分は無関係である。配列類似性はしばしば非常に低いので、分類は通常、二次構造組成を基にしている。前記ファミリーは、例えばIFN様、IL2様、IL1様およびTNF様といった原型メンバーに因んで命名されている(A. Zlotnik et al. (2000) Immunity 12(2): 121-127)。

サイトカインは、多細胞生物における多くの重要な反応、例えば免疫応答調節(J. Nishihira (1998) Int. J. Mol. Med. 2(1): 17-28)、炎症(P.K. Kim et al. (2000) Surg. Clin. North. Am. 80(3): 885-894)、創傷治癒(R.A. Clark (1991) J. Cell Biochem. 46(1): 1-2)、胚発生および発育、並びにアポトーシス(H.D. Flad et al. (1999) Pathobiology 67(5-6): 291-293)に関与することが、研究によって示されている。

HIVおよびカポジ肉腫附随ウイルスのような病原性生物(ウイルスおよび細菌)は、抗サイトカイン因子およびサイトカインファミリー類似体をコードしており、これによって前記因子および前記類似体がサイトカインレセプターと相互作用して体の免疫応答を制御することが可能となる(S. Sozzani et al. (2000) Pharm. Acta. Helv. 74(2-3): 305-312; Y. Aoki et al. (2000) J. Hematother. Stem. Cell Res. 9(2): 137-145)。ウイルスがコードするサイトカインであるウィロカイン(virokine)は、宿主の免疫系を模倣して破壊するという能力のために、ウイルスの病原性発揮に必要とされることが示されている。

【0005】

サイトカインは、以下を含む病状および疾患の治療、予防および/または診断に有用であり得る: 免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心臓血管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染(マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス(サイトメガロウイルス)感染を含む)。

ウイルスがコードするサイトカインであるマクロファージ抑制タンパク質IIは、Th2型細胞の選択的補充と細胞毒性免疫応答からの回避とを仲介することができる(K.S. Weber et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31(8): 2458-66)。これらのデータは、Th1型応答から離れてTh2型応答に向けて炎症性細胞の補充を指令することと、それによって細胞毒性反応からの回避を容易にすることにおけるvMIP-IIの免疫調節的役割を示す証拠を提供している。したがって、このタンパク質を用いて、Th1型免疫応答の過剰刺激が結び付く疾患(例えば炎症性腸症候群)を調節することができよう。別の研究では、Kawamotoら(

10

20

30

40

50

S. Kawamoto et al. (2001) Int. Immunol. 13(5): 685-94) は、vIL-10が自己免疫性糖尿病の治療において細胞性IL-10よりも優れている可能性があることを示唆する結果を提示した。これらの結果は、ウイルスがコードするサイトカインが単なるウイルス排除よりも治療において潜在的有用性を有することを示している。

【0006】

サイトカインの臨床的利用は、免疫系の調節物質としての役割に焦点が当てられており (F.H. Rodriguez et al. (2000) Curr. Pharm. Des. 6(6): 665-680)、例えば甲状腺癌に対する応答の促進においてである (C. Schmutzler et al. (2000) 143(1): 15-24)。サイトカインの細胞増殖および細胞分化の制御により、サイトカインはまた抗癌標的にもなっている (E. Lazar-Molnar et al. (2000) Cytokine. 12(6): 547-554; K. Gado (2000) 24(4): 195-209)。サイトカインおよびサイトカインレセプターにおける新規な変異は、いくつかの事例で疾患に対する抵抗性を付与することが示されている (S.J. van Deventer et al. (2000) Intensive Care Med. 26(Suppl1): S98-S102)。活性を調節して潜在的副作用を除去するために、合成サイトカイン (ミューテイン) を作製することも、また重要な研究方法であった (A.B. Shanafelt et al. (1998) 95(16): 9454-9458)。

サイトカインサブセットは4-ヘリックスバンドルサイトカインであって、それらのヘリックスがそれぞれ約15または25残基を含む場合に、短鎖および長鎖サイトカインへとさらに分類される。長鎖の4-ヘリックスバンドルサイトカインであるLIF、IL-6、CNTF、G-CSF、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) およびレプチンについては結晶構造が決定されている。これらのサイトカインは、その一次構造では低度の相同性しか示されていないが、その三次構造および機能的レセプターエピトープにおいては高い相同性を示している。

上記で述べたように、サイトカイン分子は、多数が疾患の進行に役割を果たし得る多様な生理学的機能において役割を果たすことが示されている。サイトカイン分子の活性を変更することは疾患の表現型を変えるための手段であり、新規なサイトカイン分子が上記で特定した疾患および他の症状の治療でも役割を果たし得る且つ前記治療の開発においても有用であり得ることから、新規なサイトカイン分子を同定すること自体、極めて適切である。

【発明の開示】

【0007】

(発明の詳細な説明)

本発明は、INSP035タンパク質が分泌タンパク質、具体的には4-ヘリックスバンドルサイトカインクラスのメンバー、より具体的には長鎖サイトカインファミリーのメンバー、さらに具体的にはレプチンであるという発見を基にしている。

本発明の第一の特徴の一態様ではポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号: 2、配列番号: 18、配列番号: 20、配列番号: 22および/または配列番号: 24に記載のアミノ酸配列を含む;

(ii) 分泌タンパク質機能、好ましくは4-ヘリックスバンドルサイトカイン機能、より好ましくは長鎖サイトカイン機能、さらに好ましくはレプチン機能を有する(i)のポリペプチドフラグメントであるか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドフラグメントである; または

(iii) (i) または(ii) の機能的等価物である。

好ましくは、この態様のポリペプチドが配列番号: 2に記載のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記ポリペプチドが配列番号: 2に記載のアミノ酸配列から成る。

配列番号: 18に記載の配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP035エクソン1ポリペプチド”と称される。配列番号: 20に記載の配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP035エクソン2ポリペプチド”と称される。配列番号: 18および配列番号: 20の組み合わせによって、配列番号: 22に記載の配列が生成される。配列番号: 22は、以下では“予測INSP035エクソン1ポリペプチド”と称される。配列番号: 2は、以下では“クローン化INSP035ポリペプチド”と称される。INSP035はまた、実施例の節においてIPAA26841とも称されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

予測 INSP035ヌクレオチドおよびポリペプチド配列（それぞれ配列番号：21および22）は、クローン化完全長 INSP035配列の一部と同一であることが示された（配列番号：1は、配列番号：2のポリペプチド配列を有する翻訳産物を示す）。クローン化配列（配列番号：1）は3つの潜在的開始コドンを示し、そのうち、前記クローン化配列（配列番号：1）は第一の潜在的開始コドンで始まる配列であり、配列番号：21は第二の潜在的開始コドンで始まる配列であり、配列番号：23は第三の潜在的開始コドンで始まる配列である。予測 INSP35ヌクレオチド配列は、第二の潜在的開始コドンで始まる配列と一致する（すなわち、両者は配列番号：21に記載の配列を有する）。

好ましくは、本発明の第一の特徴の INSP035ポリペプチドは、4 - ヘリックスバンドル サイトカインクラスのポリペプチドメンバーとして、具体的には長鎖サイトカインファミリーのメンバーとして、より具体的にはレプチンとして機能する。

“4 - ヘリックスバンドルサイトカインクラスのメンバー”という用語は本技術分野ではよく理解されており、当業者は、本技術分野で公知の多様なアッセイの1つを用いて、ポリペプチドがこのクラスのメンバーとして機能するか否かを容易に確認することができるであろう。例えば、アッセイには、*in vitro*で前脂肪細胞の脂肪生成に対する影響の測定が含まれ得る。別の例は、下記文献に開示されたアッセイである（J. Kratzsch (2002) Horm. Res. 57(3-4) : 127-32）。

SWISSPROTデータベースの配列アクセス番号Q9BTA0、BLASTデータベースのMGC10820、DerwentデータベースのABG12133によって定義されるポリペプチドは、本発明の範囲から特異的に排除される。

【 0 0 0 9 】

第二の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする精製核酸分子を提供する。好ましくは、前記精製核酸分子が、配列番号：1（クローン化 INSP035ポリペプチドをコードする）、配列番号：17（INSP035エクソン1ポリペプチドをコードする）、配列番号：19（INSP035エクソン2ポリペプチドをコードする）、配列番号：21（配列番号：17および配列番号：19の組み合わせ、したがって第二の潜在的開始コドンで開始する INSP035配列をコードする）、配列番号：23（第三の潜在的開始コドンで始まる INSP035配列をコードする）に記載の核酸配列を有するか、またはこれら配列のいずれかの余剰的（redundant）等価物もしくはフラグメントである。

第三の特徴では、高ストリンジェンシー条件下で本発明の第二の特徴の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸分子を提供する。

第四の特徴では、本発明は、本発明の第二または第三の特徴の核酸分子を含むベクター、例えば発現ベクターを提供する。好ましいベクターは、pEAK12d-IPAAA26841long-6HIS（図8参照）、pEAK12d-IPAAA26841-short-6HIS（図9参照）、pEAK23s-sigptd-IPAAA26841-short（図10参照）、pCR4 TOP0 IPAAA26841（図11参照）およびsigptdIPAAA26841s-6His（図14参照）のように、実施例に記述されているものである。

第五の特徴では、本発明は、本発明の第四の特徴のベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

第六の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、且つ好ましくは前記ポリペプチドの分泌タンパク質活性を抑制するリガンドを提供する。より好ましくは、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、且つ前記ポリペプチドのサイトカイン活性を抑制するリガンドを提供する。さらに好ましくは、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、且つ前記ポリペプチドの長鎖サイトカイン活性を抑制するリガンドを提供する。もっとも好ましくは、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、且つ前記ポリペプチドのレプチン活性を抑制するリガンドを提供する。

第七の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させるか、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節するのに有効な化合物を提供する。

10

20

30

40

50

本発明の第七の特徴の化合物は、前記ポリペプチドの遺伝子発現レベルまたは活性を増加させ得るか（アゴニスト作用）、または低下させ得るか（アンタゴニスト作用）。重要なことに、INSP035エクソンポリペプチドおよびINSP035ポリペプチドの機能を同定することによって、疾患の治療および/または診断に有効な化合物を同定し得るスクリーニング方法のデザインが可能になる。

【0010】

第八の特徴では、本発明は、診断または治療で使用するために、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第五の特徴の宿主細胞、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を提供する。これらの分子はまた、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心臓血管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態を治療する薬物の製造においても用いることができる。好ましくは前記疾患には次のものが挙げられるが、ただしこれらに限定されない：免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心臓血管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、より具体的には5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）。

10

20

【0011】

第九の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルまたは本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性レベルを前記患者由来の組織で評価する工程、および前記発現または活性レベルをコントロールレベルと比較する工程を含む患者の疾患を診断する方法を提供し、この場合前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示している。前記の方法は、好ましくはin vitroで実施されるであろう。同様な方法は、患者における疾患の治療的処置のモニタリングに使用され得る。この場合、時間の経過にしたがってポリペプチドまたは核酸分子の発現もしくは活性レベルがコントロールレベルに向かって変化することは、疾患の緩解を示している。

30

本発明の第一の特徴のポリペプチドを検出する好ましい方法は、以下の工程を含む：（a）本発明の第六の特徴のリガンド（例えば抗体）と生物学的サンプルとを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；および（b）前記複合体を検出する工程。

本発明の第九の特徴によると、例えば短いプローブによる核酸ハイブリダイゼーション法、点変異分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、および、抗体を用いて異常なタンパク質レベルを検出する方法といった種々の異なる方法が存在することは、当業者には明らかであろう。同様な方法を短期または長期ベースで用いて、モニターされる疾患の治療を可能にすることができる。本発明はまた、前記疾患診断方法に有用なキットも提供する。

40

【0012】

第十の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドの分泌タンパク質としての使用を提供する。好ましくは、本発明の第一の特徴のポリペプチドが、4-ヘリックスバンドルサイトカインクラスのメンバーとして、具体的には長鎖サイトカインファミリーのメンバーとして、より具体的にはレプチンとして用いられ得る。

第十一の特徴では、本発明は医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明

50

の第四の特徴のベクター、または本発明の第五の特徴の宿主細胞、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を医薬的に許容できる担体と組合わせて含有する。

第十二の特徴では、本発明は、疾患（例えば細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態）の診断または治療を目的とする医薬品の製造で使用するために、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二のもしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第五の特徴の宿主細胞、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を提供する。特に、前記疾患には以下が含まれるが、ただしこれらに限定されない：免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髓増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、より具体的には5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）。 10 20

【0013】

第十三の特徴では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を患者に投与することを含む。

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現または活性レベルと比較したとき罹患対象者で低下する疾患については、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物がアゴニストであるべきである。逆に、前記天然の遺伝子の発現、または前記ポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現または活性レベルと比較したとき罹患対象者で上昇する疾患については、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物がアンタゴニストであるべきである。前記アンタゴニストの例にはアンチセンス核酸分子、リボザイムおよびリガンド（例えば抗体）が含まれる。 30 40

第十四番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドを高レベルで、または低レベルで発現させるために、または全く発現させないように形質転換したトランスジェニックまたは遺伝子ノックアウト非ヒト動物を提供する。前記トランスジェニック動物は、疾患の研究用モデルとして非常に有用であり、さらに前記疾患の治療または診断に有効な化合物の同定を目的とするスクリーニング方法で用いることもできる。

【0014】

本発明を利用するために用いることができる標準的な技術および方法の要旨は、下記で提供される。本発明は、記載される特定の方法論、プロトコル、細胞株、ベクターおよび試薬に限定されないことは理解されよう。本明細書で用いられる専門用語は単に個々の態様を説明するためのものであり、前記用語によって本発明の範囲を限定しようとするものではないこともまた理解されよう。本発明の範囲は添付の請求の範囲の用語によってのみ限定される。 40

本明細書では、ヌクレオチドおよびアミノ酸についての標準的な略語が用いられる。

本発明の実施では別に指示がなければ、分子生物学、微生物学、リコンビナントDNA技術および免疫学の通常の技術が用いられるであろう。前記技術は当業者の技術範囲内である。 50

前記のような技術は、文献で完全に説明されている。特に適切な解説書の例には以下が含まれる：Sambrook Molecular Cloning； A Laboratory Manual, Second Edition (1989)； DNA Cloning, Vol. I and II (D.N. Glover ed. 1985)； Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984)； Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984)； Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984)； A nimal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986)； Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986)； B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)； the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.)特にVol. 154 & 155； Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)； Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds. 1987, Academic Press, London)； Scopes, (1987) Protein Purification： Principles and Practice, Second Edition (Springer Verlag, NY)； および Handbook of Experimental Immunology, Vols. I - IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds. 1986)。

10

【 0 0 1 5 】

本明細書において用いる“ポリペプチド”という用語は、ペプチド結合または改変ペプチド結合によって互いに結合した2つまたは3つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。前記改変ペプチド結合によるものは、すなわちペプチドイソスターである。この用語は、短鎖（ペプチドおよびオリゴペプチド）および長鎖（タンパク質）の両方を指す。

20

本発明のポリペプチドは成熟タンパク質の形態を有するものでもよく、またプレ-、プロ-またはプレプロ-タンパク質であってプレ-、プロ-またはプレプロ-部分の切断によって活性化されて活性な成熟ポリペプチドを生じるタンパク質でもよい。そのようなポリペプチドでは、プレ-、プロ-またはプレプロ-配列がリーダー配列もしくは分泌配列であっても、または成熟ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列であってもよい。

本発明の第一の特徴のポリペプチドは、融合タンパク質の一部を形成することができる。例えば、1つまたは2つ以上の付加アミノ酸配列を含むことがしばしば有利である。前記付加アミノ酸配列は、分泌もしくはリーダー配列、プロ-配列、精製に役立つ配列、または例えばリコンビナント形成の間により高いタンパク質安定性を付与する配列を含んでもよい。あるいは、または前記に加えて、前記成熟ポリペプチドを別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させるような化合物（例えばポリエチレングリコール）と融合させることができる。

30

【 0 0 1 6 】

ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、または本技術分野で周知の化学的改変技術によって改変された、20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。本発明のポリペプチドに一般的に存在する公知の改変には、グリコシル化、脂質付加、硫化、 α -カルボキシル化（例えばグルタミン酸残基の）、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化がある。他の可能な改変には、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、GPIアンカー形成、ヨード化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、タンパク質へのトランスファーRNA媒介性アミノ酸付加（例えばアルギニル化）およびユビキチン結合が含まれる。

40

改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシ末端を含むポリペプチド内のいずれの場所に存在してもよい。実際、共有結合改変によるポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両端の閉塞(blockage)は、天然に存在するポリペプチドおよび合成ポリペプチドで一般的であり、そのような改変は本発明のポリペプチドにも存在し得る。

50

【0017】

ポリペプチド内に生じる改変は、多くの場合ポリペプチドが生成される方法の関数であろう。組換えによって生成されるポリペプチドについて、改変の性質および程度は大部分が、特定の宿主細胞の翻訳後改変能力および問題のポリペプチドのアミノ酸配列に存在している改変シグナルによって決定されるであろう。例えば、グリコシル化パターンは、異なる種類の宿主細胞間で変動する。

本発明のポリペプチドは、任意の適切な様式で調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド（例えば、細胞培養物から精製される）、組換え的に生成されたポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成的に生成されたポリペプチド、または前記方法の組合せによって生成されたポリペプチドが含まれる

10

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP035エクソンポリペプチドおよび/またはINSP035ポリペプチドと相同なポリペプチドであり得る。本明細書で用いる用語として、2つのポリペプチドは、前記ポリペプチドの一方の配列が他方のポリペプチドの配列に対して十分に高い同一性または類似性を有する場合、“相同である”と称される。“同一性”とは、アラインメントを施した配列のどの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で同一であることを示す。“類似性”は、アラインメントを施した配列のいずれの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で類似の種類であることを示す。同一性および類似性の度合いは、容易に計算できる（Computational Molecular Biology, A.M. Lesk ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, D.W. Smith ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, G. von Heinje, Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, M. Gribskov and J. Devereux eds., M. Stockton Press, New York, 1991）。

20

【0018】

したがって、相同なポリペプチドには、INSP035エクソンポリペプチドおよびINSP035ポリペプチドの天然の生物学的変種（例えば前記ポリペプチドが由来した種における対立形質変種または地理的変種）および変異体（例えばアミノ酸置換、挿入または欠失を含む変異体）が含まれる。前記変異体は、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されているポリペプチドを含んでもよく、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝コードでコードされたものでもそうでなくてもよい。典型的な前記の置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間で；SerとThr間で；酸性残基AspとGlu間で；AsnとGln間で；塩基性残基LysとArg間で；または芳香族残基PheとTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつか（すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、または単に1つ）のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加された変種である。とりわけ好ましいものは、タンパク質の特性および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。また、その際とりわけ好ましいものは、保存的置換である。

30

前記変異体にはまた、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドも含まれる。

40

【0019】

典型的には、2つのポリペプチド間で80%を越える同一性が、機能的等価物の指標であると考えられる。好ましくは、本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP035エクソンポリペプチドもしくはINSP035ポリペプチドまたはそれらの活性なフラグメントと、80%を越える配列同一性の度合いを有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ90%、95%、98%または99%を越える同一性の度合いを有する。

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドはまた、構造についてのアラインメントの1つまたは2つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであってもよい。例えば、バイオペンジウム（Biopendium）検索データベースの作製に用いられる検索ツールの一

50

角を構成するインフォーマティカ=ゲノムスレッダー (Inpharmatica Genome Threader) 技術を用いて (同時係属PCT特許出願 (PCT/GB01/01105) を参照されたい)、INSP035エクソンポリペプチドまたはINSP035ポリペプチドと比較して低い配列同一性しかもたないが、INSP035エクソンポリペプチドまたはINSP035ポリペプチド配列との顕著な構造的相同性を共有するために、分泌タンパク質活性、好ましくは4-ヘリックスバンドルサイトカイン活性、より好ましくは長鎖サイトカイン活性、さらに好ましくはレプチン活性を有すると予測される、現在は機能が未知のポリペプチドを同定することができる。“顕著な構造的相同性”とは、インフォーマティカ=ゲノムスレッダーが、2つのタンパク質は10%以上の確実性を有して構造的相同性を共有すると予測することを意味する。

本発明の第一の特徴のポリペプチドはまた、INSP035エクソンポリペプチドおよびINSP035ポリペプチドのフラグメント並びにこれらポリペプチドの機能的等価物のフラグメントを含むが、ただしこれらフラグメントが4-ヘリックスバンドルサイトカイン活性、詳細には長鎖サイトカイン活性、より詳細にはレプチン活性を保持するか、またはこれらポリペプチドと共通の抗原決定基を有することを条件とする。

【0020】

本明細書において用いる、“フラグメント”という用語は、INSP035、ポリペプチドまたはその機能的等価物の1つのいずれかのアミノ酸配列の一部 (全体ではないが) と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記フラグメントは、前記配列に由来する少なくともn個の連続するアミノ酸を含むべきであり、さらに個々の配列に応じてnは好ましくは7またはそれより大きい (例えば8、10、12、14、16、18、20またはそれより大きい)。小さなフラグメントは、抗原決定基を構成することができる。

そのようなフラグメントは、“独立的存在 (free-standing)” (すなわち、他のアミノ酸もしくはポリペプチドの一部でもなく、他のアミノ酸もしくはポリペプチドの一部に融合されているのでもない) であってもよく、またはより大きなポリペプチドに含まれて、前記ポリペプチドの一部分または領域を形成してもよい。より大きなポリペプチドの内部に含まれている場合、本発明のフラグメントは、最も好ましくは連続するただ1つの領域を形成する。例えばある種の好ましい態様は、前記フラグメントのアミノ末端に融合したブレ-および/またはプロ-ポリペプチド領域を有するフラグメント、および/または前記フラグメントのカルボキシ末端に融合した付加的領域を有するフラグメントに関する。しかしながら、いくつかのフラグメントがただ1つのより大きなポリペプチドの内部に含まれていてもよい。

本発明のポリペプチドまたはその免疫原性フラグメント (少なくとも1つの抗原決定基を含む) を用いて、例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体といった、前記ポリペプチドに免疫特異的なリガンドを作製することができる。そのような抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現しているクローンを単離もしくは同定するか、またはアフィニティークロマトグラフィーで本発明のポリペプチドを精製することができる。前記抗体はまた、当業者には明らかなように、他の用途のうち診断的または治療的補助としても用いることができる。

【0021】

“免疫特異的”という用語は、前記抗体が、従来技術における他の近縁ポリペプチドに対する親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して実質的に強い親和性を有することを意味する。本明細書で用いる“抗体”という用語は、完全な分子だけでなく問題の抗原決定基と結合することができるそのフラグメント、例えばFab、F(ab')₂およびFvも指す。したがって、そのような抗体は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと結合する。

ポリクローナル抗体が所望される場合、選択される哺乳類 (例えばマウス、ウサギ、ヤギまたはウマ) が、本発明の第一の特徴のポリペプチドで免疫され得る。動物を免疫するために用いられるポリペプチドは、リコンビナントDNA技術によって誘導されてもよく、または化学的に合成されてもよい。所望する場合には、前記ポリペプチドを担体タンパク質と結合させることができる。前記ポリペプチドと化学的に結合させることができる一般的に用いられ得る担体には、ウシ血清アルブミン、チログロブリンおよびキーホールリン

ペットヘモシアニンが含まれる。次に、前記担体結合ポリペプチドが用いられて、動物が免疫される。免疫した動物から血清が採集され、既知の方法（例えばイムノアフィニティークロマトグラフィー）にしたがって処理される。

【0022】

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対するモノクローナル抗体もまた、当業者は容易に生成できる。ハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を作製する一般的な方法論は、周知である（例えば以下を参照されたい：G. Kohler & C. Milstein, Nature 256 : 495 - 497(1975) ; Kozbor et al., Immunology Today 4 : 72(1983) ; Cole et al., 77 - 96 “ Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy ”, Alan R. Liss, Inc. (1985)）。

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対して生成されたモノクローナル抗体のパネル(p anels)を種々の特性、すなわちアイソタイプ、エピトープ、親和性などについてスクリーニングすることができる。モノクローナル抗体は、それらを作らせた個々のポリペプチドの精製に特に有用である。あるいは、対象のモノクローナル抗体をコードする遺伝子を、例えば当技術分野で知られるPCR技術によってハイブリドーマから単離し、さらにクローニングし適切なベクターで発現させることができる。

また、非ヒト可変領域がヒト定常領域と結合または融合されているキメラ抗体（例えば以下を参照されたい：Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 3439(1987)）も有用であり得る。

【0023】

抗体は、例えばヒト化により、改変して個体での免疫原性を減少させることができる（例えば以下を参照されたい：Jones et al., Nature, 321 : 522(1986) ; Verhoeyen et al., Science, 239 : 1534(1988) ; Kabat et al., J. Immunol., 147 : 1709(1991) ; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 10029(1989) ; Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 34181(1991) ; Hodgson et al., Bio/Technology 9 : 421(1991)）。本明細書で用いられる“ヒト化抗体”という用語は、非ヒトドナー抗体の重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン中のCDRアミノ酸および選択した他のアミノ酸がヒト抗体の等価なアミノ酸に代えて置換されている抗体分子を指す。したがって、ヒト化抗体はヒトの抗体とよく似ているが、ドナー抗体の結合能力を有する。

また別の選択肢では、前記抗体が、2つの異なる抗原結合ドメインを有し、その各ドメインは異なるエピトープに向けられている“二重特異性”抗体であってもよい。

ファージディスプレイ技術を用いて、本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する抗体をコードしている遺伝子を、関連する抗体の保有についてスクリーニングされたヒト由来のリンパ球のPCR増幅V-遺伝子レパートリー、または未感作ライブラリーのいずれかから選択することができる（J. McCafferty et al., (1990) Nature 348 : 552 - 554 ; J. Marks et al., (1992) Biotechnology 10 : 779 - 783）。前記抗体の親和性は、鎖のシャッフリングによって改善することもできる（T. Clackson et al., (1991) Nature 352 : 624 - 628）。

上記の技術によって作製された抗体は、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）で試薬として用いることができるという点で、更なる有用性を有する。これらの用途では、これら抗体を、分析的に検出可能な試薬（例えば放射性同位元素、蛍光分子または酵素）で標識することができる。

【0024】

本発明の第二および第三の特徴の好ましい核酸分子は、配列番号：2、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22および配列番号：24に記載のポリペプチド配列ならびに機能的に等価なポリペプチドをコードするものである。これら核酸分子は、本明細書に記載した方法および用途で用いることができる。本発明の核酸分子は、好ましくは本明細書で開示される配列に由来する少なくともn個の連続するヌクレオチドを含み、この場合、前記個々の配列に応じてnは10またはそれより大きい（例えば12、14、15、18、20、25、30、35、40またはそれより大きい）。

本発明の核酸分子は、上記で述べた核酸分子に相補的な配列も含む（例えばアンチセンスまたはプローブとしての目的のために）。

本発明の核酸分子は、RNA（例えばmRNA）、またはDNA（例えばcDNA、合成DNAまたはゲノムDNAを含む）の形態であってもよい。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学合成によって、またはそれらの組合わせによって得ることができる。前記核酸分子は、固相ホスホルアミダイト化学合成のような技術を用いる化学合成によって、ゲノムまたはcDNAライブラリーから、または生物体からの分離によって調製することができる。RNA分子は、一般的にはDNA配列のin vitroまたはin vivo転写によって作製され得る。

核酸分子は、二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖DNAは、コード鎖（センス鎖としても知られる）でも、非コード鎖（アンチセンス鎖とも称される）でもよい。

“核酸分子”という用語には、DNAおよびRNAのアナログ（例えば改変骨格を含むもの）、並びにペプチド核酸（PNA）も含まれる。本明細書で用いられる“PNA”という用語は、アンチセンス分子または抗遺伝子(anti-gene)作用因子を指し、長さが少なくとも5ヌクレオチドであってアミノ酸残基のペプチド骨格に結合されたオリゴヌクレオチドを含む。前記ペプチド骨格は好ましくはリジンで終わり、前記末端リジンは当該組成物に可溶性を付与する。PNAは、PEG化（pegylated）されて細胞内での寿命が延長されてもよい（細胞内では、PNAは優先的に相補性一本鎖DNAおよびRNAと結合して転写物の伸長を停止させる（P.E. Nielsen et al. (1993) Anticancer Drug Des. 8: 53 - 63））。

【0025】

配列番号：2のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：1に示した核酸分子のコード配列と同一であり得る。配列番号：18のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：17に示した核酸分子のコード配列と同一であり得る。配列番号：20のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：19に示した核酸分子のコード配列と同一であり得る。配列番号：22のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：21に示した核酸分子のコード配列と同一であり得る。配列番号：24のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：23に示した核酸分子のコード配列と同一であり得る。

これらの分子はまた、遺伝コードの縮退の結果として、配列番号：2、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22および配列番号：24をコードする配列と異なる配列を有することもある。そのような核酸分子には、それ自体で成熟なポリペプチドのコード配列；成熟ポリペプチドのコード配列および付加コード配列（例えばリーダー配列または分泌配列をコードするもの）、例えばプロ-、プレ-またはプレプロ-ポリペプチド配列をコードするもの；前述の付加的コード配列を伴って、または伴わないで、さらに付加的な非コード配列（非コード5'および3'配列を含む）を伴う成熟ポリペプチドのコード配列が含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記の非コード5'および3'配列は、例えば転写される非翻訳配列で、転写（終止シグナルを含む）、リボソーム結合およびmRNA安定性において役割を果たすものである。前記核酸分子は、更なる機能性を提供するアミノ酸のような付加アミノ酸をコードする付加配列を含むこともできる。

【0026】

本発明の第二および第三の特徴の核酸分子は、本発明の第一の特徴のポリペプチドおよびフラグメントの機能的等価物およびそれらのフラグメントもコードし得る。そのような核酸分子は、天然に存在する変種（例えば天然に存在する対立形質変種）であっても、または前記分子は天然に存在することが知られていない変種であってもよい。前記のような天然に存在しない核酸分子の変種は、突然変異誘発技術（核酸分子、細胞または生物に対して適用される技術が含まれる）によって達成できる。

このような変種の中では、特にヌクレオチドの置換、欠失または挿入によって前述の核酸分子と異なる変種が挙げられる。置換、欠失または挿入には、1つまたは2つ以上のヌクレオチドが関与し得る。変種は、コード領域または非コード領域またはその両方において変化していてもよい。コード領域における変化は、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失または挿入を生成し得る。

本発明の核酸分子はまた、多様な理由で、当技術分野で一般的に知られている方法を用

10

20

30

40

50

いて操作されてもよく、前記方法としては、遺伝子産物（ポリペプチド）のクローニング、プロセッシングおよび／または発現の改変が挙げられる。ランダムフラグメント化によるDNAシャッフリングならびに遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドのPCRリアッセンブリーは、ヌクレオチド配列の操作に用いられ得る技術に含まれる。部位特異的突然変異誘発を用いて、新規な制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変化、スプライシング変種の生成、変異の導入などを行うことができる。

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする核酸分子は、結合核酸分子が融合タンパク質をコードするように、異種配列に連結されてもよい。前記のような結合核酸分子は本発明の第二または第三の特徴に包含される。例えば、本発明のポリペプチドの活性の阻害物質についてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、前記のような結合核酸分子を用いて、市販の抗体により認識され得る融合タンパク質を発現させることは、有用であり得る。融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチド配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作し、それによって前記ポリペプチドを異種タンパク質から切り離して精製することができるようにしてもよい。

本発明の核酸分子には、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と部分的に相補的であり、したがってそのコード核酸分子とハイブリダイズする（ハイブリダイゼーション）アンチセンス分子も含まれる。そのようなアンチセンス分子（例えばオリゴヌクレオチド）は、当業者にはよく知られるように、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、その標的核酸と特異的に結合してその転写を妨げるようにデザインすることができる（例えば以下の文献を参照されたい：J.S. Cohen, Trends in Pharm. Sci., 10: 435 (1989); J. Okano, Neurochem. 56: 560(1991); J. O' Connor, Neurochem. 56: 560(1991); Lee et al., Nucleic Acids Res. 6: 3073(1979); Cooney et al., Science 241: 456(1988); Dervan et al., Science 251: 1360(1991)）。

【0027】

本明細書で用いられる“ハイブリダイゼーション”という用語は、2つの核酸分子が水素結合によって互いに会合することを指す。典型的には、1つの分子が固相支持体に固定され、他方は溶液中で遊離しているであろう。次に、2つの分子は、水素結合に適した条件下で互いに接触させられ得る。前記結合に影響する因子には以下が含まれる：溶媒の種類および体積；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液相分子の固相支持体への非特異的結合を妨害する薬剤（デンハルト試薬、またはBL0TT0）；分子の濃度；分子の結合速度を増加させる化合物の使用（硫酸デキストランまたはポリエチレングリコール）；およびハイブリダイゼーションに続く洗滌条件のストリンジェンシー（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。

完全に相補的な分子と標的分子とのハイブリダイゼーションの阻害は、当業者に知られるハイブリダイゼーションアッセイを用いて調べることができる（例えばSambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。したがって、実質的に相同な分子は、文献（G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987, Methods Enzymol. 152: 399 - 407; A.R. Kimmel, 1987, Methods Enzymol. 152: 507 - 511）で教示されるように、完全に相同な分子と標的分子との結合を種々のストリンジェンシー条件下で競合させ阻害するであろう。

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の会合よりも非常に類似した分子の会合に適したハイブリダイゼーション反応の条件を指す。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、以下を含む溶液（50%のホルムアミド、5倍のSSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5倍のデンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/mLの変性せん断サケ精子DNA）中で42℃にて一晩インキュベーションし、続いてフィルターを約65℃にて0.1倍のSSC中で洗滌すると定義される。低ストリンジェンシー条件は、35℃にて実施されるハイブリダイゼーション反応を含む（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。好ましくは、ハイブリダイゼーションに用いられる条件が高ストリンジェンシー条件である。

【0028】

本発明のこの特徴の好ましい態様は、INSP035ポリペプチド（配列番号：22{配列番号

10

20

30

40

50

：18および配列番号：20の組み合わせと等価）、配列番号：2または配列番号：24）をコードする核酸分子の全長にわたって少なくとも70%同一である核酸分子、およびそのような核酸分子と実質的に相補的な核酸分子である。好ましくは、本発明のこの特徴の核酸分子は、配列番号：17および配列番号：19を組み合わせることによって生じる配列を有する核酸分子（配列番号：21と等価）、配列番号：1、配列番号：23の全長にわたって少なくとも80%同一の領域またはこれらと相補的な核酸分子を含む。これに関しては、そのような核酸分子の全長にわたって少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%または99%同一の核酸分子が特に好ましい。この特徴の好ましい態様は、INSP035ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を実質的に保持するポリペプチドをコードする核酸分子である。

10

【0029】

本発明はまた、以下の工程を含む、本発明の核酸分子を検出する方法を提供する：（a）二重鎖を形成するハイブリダイゼーション条件下で、本発明の核酸プローブを生物学的サンプルと接触させる工程；および（b）形成された前記の二重鎖を全て検出する工程。

本発明に従って利用し得るアッセイに関連して下記でさらに考察するように、上述の核酸分子をRNA、cDNAまたはゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして用いて、INSP035ポリペプチドをコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離し、さらにINSP035ポリペプチドをコードする遺伝子と高い配列類似性を有する相同遺伝子またはオーソログ遺伝子のcDNAまたはゲノムクローンを単離することができる。

これに関しては、当技術分野で既知の他の技術のうち、特に以下の技術を利用することができる。これらの技術は、例示として下記で考察される。DNAのシーケンシングおよび解析の方法は周知であって、当技術分野では一般的に利用可能であり、本明細書で考察される本発明の態様の多くを実施するために実際に用いることができる。そのような方法では、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、シークエナーゼ（US Biochemical Corp., Cleveland, OH）、Taqポリメラーゼ（Perkin Elmer）、耐熱性T7ポリメラーゼ（Amersham, Chicago, IL）、またはポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼの組合せ（例えば市販（Gibco/BRL, Gaithersburg, MD）のELONGASE増幅システムで見出されるようなもの）のような酵素を利用することができる。好ましくは、シーケンシング過程は、例えばハミルトンマイクロラボ（Hamilton Micro Lab）2200（Hamilton, Reno, NV）、ペルティエサーマルサイクラー（Peltier Thermal Cycler）PTC200（MJ Research, Watertown, MA）、ABIカタリスト並びに373および377DNAシークエンサー（Perkin Elmer）のような機器を用いて自動化することができる。

20

30

【0030】

INSP035ポリペプチドの機能と等価な機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法の1つは、当技術分野で知られている標準的な手法を用い、天然のプローブまたは人工的に設計したプローブによりゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを探索することである（例えば以下の文献を参照されたい：“Current Protocols in Molecular Biology”，Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992）。特に有用なプローブは、適切なコード遺伝子（配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21および配列番号：23）に由来する核酸配列に一致するか、または前記配列と相補的であって、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、さらに好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプローブである。前記のようなプローブは、分析的に検出可能な試薬で標識して、前記プローブの識別を容易にすることができる。有用な試薬には、放射性同位元素、蛍光色素、および検出可能な生成物の形成を触媒し得る酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプローブを用いて、当業者は、ヒト、哺乳類または他の動物供給源から対象のタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNAまたはRNAポリヌクレオチドの相補的なコピーを単離し、近縁配列、例えば前記のファミリー、タイプおよび/またはサブタイプに属するまた別のメンバーについて、前記の供給源をスクリーニングすることができるであろう。

40

【0031】

50

多くの場合、単離されるcDNA配列は不完全で、ポリペプチドをコードする領域は短く（通常は5'末端で）切断されているであろう。完全長cDNAを得るために、または短いcDNAを伸長させるために、いくつかの方法が利用可能である。そのような配列は、部分的なヌクレオチド配列を用い、上流の配列（例えばプロモーターおよび調節エレメント）を検出するための当技術分野で公知の種々の方法を用いて伸長させることができる。例えば、使用され得るある方法は、cDNA末端迅速増幅法（RACE；例えば以下を参照されたい：Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988) 85: 8998 - 9002)に基づく。前記技術の最近の改変（例えばマラソン（Marathon）（商標）技術（Clontech Laboratories Inc.）により例示される）は、より長いcDNAの検索を顕著に単純化している。“制限部位”PCRと称されるわずかに異なる技術では、普遍的プライマーを用いて、既知の遺伝子座に近接する未知の核酸配列が検索される（G. Sarkar (1993) PCR Methods Applic. 2: 318 - 322）。逆PCRも、既知の領域に基づく多様なプライマーを用いて、配列を増幅することまたは伸長することに用いられ得る（T. Triglia et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 8186）。使用され得る別の方法は捕捉PCRで、この方法は、ヒトおよび酵母の人工染色体DNAにおける既知配列に近接しているDNAフラグメントのPCR増幅を含む（M. Lagerstrom et al. (1991) PCR Methods Applic. 1: 111 - 119）。未知配列を検索するために用いられ得る別の方法は、パーカーの方法である（J.D. Parker et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055 - 3060）。さらに、ゲノムDNAを少しずつ移動して調べるためにPCR、入れ子（nested）プライマーおよびプロモーターファインダーTM（PromoterFinderTM）ライブラリー（Clontech, Palo Alto, CA）を用いてもよい。この方法ではライブラリーのスクリーニングが不要で、イントロン/エクソン結合部の発見に有用である。

10

20

【0032】

完全長cDNAをスクリーニングする場合、より大きなcDNAを包含するようにサイズ選択されたライブラリーを用いることが好ましい。さらにまた、遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含むという点で、ランダムプライミングした(random-primed)ライブラリーが好ましい。ランダムプライムライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを生成できない状況で特に好まれ得る。ゲノムライブラリーは、5'非転写調節領域に配列を伸長させるために有用であり得る。

本発明のある態様では、染色体上の位置特定のために、本発明の核酸分子を用いることができる。この技術では、核酸分子は個々のヒト染色体上の特定の位置に対して特異的に標的化され、個々のヒト染色体上の特定の位置とハイブリダイズさせることができる。本発明の関連配列の染色体上へのマッピングは、遺伝子関連疾患に関する配列の相関性確認において重要な工程である。いったん染色体の正確な位置に配列がマッピングされたら、前記配列の染色体上の物理的な位置を遺伝子地図データと相関させることができる。そのようなデータは、例えば以下で見出すことができる：V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man（ジョーンズホプキンス大学、ウェルチ医学図書館を通じてオンラインで利用可能である）。同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関係を、次に連鎖解析（物理的に近接する遺伝子の同時遺伝(coinheritance)）によって同定する。これにより、ポジショナルクローニングまたは他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を検索する研究者に貴重な情報が提供される。いったん疾患または症候群の位置が遺伝連鎖によって特定のゲノム領域で大まかに限局されたら、前記領域にマッピングされるいずれの配列も、更なる解析のための関連遺伝子または調節遺伝子となることができる。前記核酸分子はまた、正常な個体、キャリア個体または罹患個体間で転座、逆位などによる染色体位置上の相違を検出するために用いることができる。

30

40

【0033】

本発明の核酸分子はまた、組織分布同定(tissue localisation)のために貴重である。そのような技術は、ポリペプチドをコードするmRNAの検出によって、組織中の前記ポリペプチドの発現パターンの決定を可能にする。これらの技術には、in situハイブリダイゼーション技術およびヌクレオチド増幅技術（例えばPCR）が含まれる。これらの研究から得られる結果は、生物内での前記ポリペプチドの正常な機能を示唆する。さらに、変異遺

50

伝子によってコードされるmRNAの発現パターンと正常mRNA発現パターンとの比較研究によって、変異ポリペプチドの疾患における役割に対する貴重な洞察が提供される。そのような不適切な発現は時間的、位置的または量的性質を有する場合もある。

遺伝子サイレンシングアプローチを実施して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内在性発現をダウンレギュレートすることもできる。RNA干渉 (RNAi) (S.M. Elbashir et al. Nature 2001, 411, 494-498) は、使用可能な配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのための1つの方法である。短いdsRNAオリゴヌクレオチドをin vitroで合成して細胞内に導入する。これらdsRNAの配列特異的結合によって標的mRNAの分解が開始され、標的タンパク質の発現が減少または阻害される。

上記に述べた遺伝子サイレンシングの有効性は、ポリペプチド発現の測定 (例えばウェスタンブロッティングによる)、またはTaqManによる方法を用いるRNAレベルの測定によって評価することができる。

10

【0034】

本発明のベクターは本発明の核酸分子を含み、クローニングベクターでも発現ベクターでもよい。本発明のベクターで形質転換、トランスフェクトまたは形質導入され得る本発明の宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。

本発明のポリペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中の前記ポリペプチドをコードする核酸分子の発現によって、リコンビナント形態で調製することができる。前記のような発現方法は当業者によく知られており、多くは以下の文献でより詳細に記述されている: Sambrook et al. (上掲書) および Fernandez & Hoeffler (1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression", Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto)。

20

【0035】

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを生成させるために、核酸分子の維持、増殖または発現に適したいずれの系またはベクターも用いることができる。周知であり日常的である種々の技術のいずれによっても (例えば前掲書 (Sambrook et al.) に記載されたようなもの)、適切なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。一般的には、コード遺伝子は制御エレメント (例えばプロモーター、リボソーム結合部位 (細菌での発現の場合)、および場合によってオペレーター) の制御下に置かれ、それによって所望のポリペプチドをコードするDNA配列を形質転換宿主細胞でRNAに転写させることができる。

30

適切な発現系の例には、例えば染色体系、エピソーム系およびウイルス由来系、例えば以下に由来するベクターが含まれる: 細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス (例えばSV40)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス、または上記の組合せ、例えばプラスミドとバクテリオファージの遺伝子エレメントに由来するもの (例えばコスミドおよびファージミドを含む)。ヒト人工染色体 (HAC) もまた、プラスミドに包含させ発現させるよりも大きいDNAフラグメントを搬送するのに用いることができる。

【0036】

40

特に適切な発現系には、リコンビナントバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された微生物 (例えば細菌); 酵母発現ベクターで形質転換された酵母; ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) を感染させた昆虫細胞系; ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV) または細菌発現ベクター (例えばTiまたはpBR322プラスミド) で形質転換した植物細胞系; または動物細胞系が含まれる。無細胞翻訳系もまた、本発明のポリペプチドの生成に用いることができる。

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の宿主細胞への導入は、多くの標準的な実験室マニュアル (例えば、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および上掲書 (Sambrook et al.)) に記載された方法によって達成できる。特に適切な

50

方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン仲介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、陽イオン脂質仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、擦過ローディング(scraper loading)、弾道導入または感染が含まれる(以下を参照されたい: Sambrook et al. (1989) 上掲書; Ausubel et al. (1991) 上掲書; Spector, Goldman & Levinwald, (1998))。真核細胞では、発現系は、その系の要求に応じて一過性(例えば、エピソード性)または永続的(染色体組込み)であり得る。

【0037】

コード核酸分子は、所望であれば、例えば翻訳ポリペプチドの小胞体内腔、細胞膜周辺腔または細胞外環境への分泌のために、シグナルペプチドまたはリーダー配列のような制御配列をコードする配列を含んでいても、または含んでいなくてもよい。これらのシグナルは前記ポリペプチドにとって内因性であってもよく、または異種シグナルであってもよい。リーダー配列は、翻訳後プロセッシングで細菌宿主によって取り除くことができる。

コントロール配列の他に、宿主細胞の増殖に関連して前記ポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが望ましい場合がある。調節配列の例は、化学的または物理的刺激(調節化合物の存在を含む)または多様な温度もしくは代謝条件にตอบสนองして遺伝子の発現を増加させたり低下させたりする配列である。調節配列は、ベクターの非翻訳領域、例えばエンハンサー、プロモーター並びに5'および3'非翻訳領域である。これらは、宿主細胞タンパク質と相互作用して、転写および翻訳を実行する。そのような調節配列は、その強度および特異性を変化させることができる。利用されるベクター系および宿主に依存して、多くの適切な転写および翻訳エレメント(構成性および誘発性プロモーターを含む)を用いることができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、誘発性プロモーター、例えばBluescriptファージミド(Stratagene, La Jolla, CA)またはpSpor1(商標)プラスミド(Gibco BRL)などのハイブリッドlacZプロモーターを用いることができる。バキュロウイルスポリヘドリン(polyhedrin)プロモーターは、昆虫細胞で用いることができる。植物細胞ゲノムに由来するプロモーターまたはエンハンサー(例えば熱ショック、RUBISCOおよび貯蔵タンパク質遺伝子)または植物ウイルスに由来するプロモーターまたはエンハンサー(例えばウイルスプロモーターまたはリーダー配列)は、ベクターへクローニングすることができる。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子由来または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。配列の多数コピーを含む細胞株の作製が必要な場合、SV40またはEBVをベースとするベクターが、適切な選択マーカーとともに用いられ得る。

【0038】

発現ベクターは、特定の核酸コード配列を適切な調節配列とともにベクター内に配置させることができるように構築される。前記コード配列の調節配列に関する位置および向きは、前記コード配列が調節配列の“制御”下で転写されるような位置および向きである(すなわちコントロール配列にてDNA分子と結合するRNAポリメラーゼは、前記コード配列を転写する)。いくつかの事例では、前記配列を適切な向きで制御配列に付属させることができるように(すなわちリーディングフレームを維持するために)、前記配列を改変する必要があるであろう。

コントロール配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入の前に核酸コード配列に連結させることができる。あるいは、コントロール配列および適切な制限部位を既に含む発現ベクターへ、コード配列を直接クローニングすることができる。

リコンビナントポリペプチドの長期的かつ高収量の生成のためには、安定な発現が好ましい。例えば、対象のポリペプチドを安定に発現する細胞株は、ウイルスの複製起点および/または内因性発現エレメント並びに選択マーカー遺伝子を同じまたは別個のベクター上に含む発現ベクターを用いて形質転換させることができる。ベクターの導入に続き、選択培地に切り替える前に細胞を栄養(enriched)培地で1-2日間増殖させることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することで、選択マーカーの存在によって、導入された配列をうまく発現する細胞の増殖および回収が可能になる。安定に形質

10

20

30

40

50

転換された細胞の耐性クローンは、細胞の種類に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0039】

発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞株は当技術分野で公知であり、米国菌培養収集所 (American Type Culture Collection, ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。そのような細胞株には、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎 (COS) 細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞、ボウズ (Bowes) メラノーマ細胞およびヒト肝細胞癌 (例えばHepG2) 細胞および他の多数の細胞株が挙げられるが、これだけに限られない。

バキュロウイルス系では、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料は、特にインビトロジェン (Invitrogen, San Diego, CA) からキットの形態で ("MaxBac" キット) 商業的に入手可能である。そのような技術は一般的に当業者に知られており、文献には完全に記載されている (Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555(1987))。この系での使用に特に適切な宿主細胞には、昆虫細胞、例えばドロソフィラ (*Drosophila*) S2細胞およびスポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9細胞が含まれる。

当技術分野で公知である多くの植物細胞培養および植物体 (whole plant) 遺伝子発現系が存在する。適切な植物細胞遺伝子発現系の例には、米国特許第5,693,506号、5,659,122号および5,608,143号に記載されるものが含まれる。植物細胞培養における遺伝子発現の更なる例は、文献に記載されている (Zenk (1991) *Phytochemistry* 30: 3861 - 3863)。

特に、プロトプラストを単離し、これを培養して完全な再生植物を形成することが可能な植物は全て利用することができ、それによって移入遺伝子を含む完全な植物が回収できる。特に、サトウキビ、サトウダイコン、綿花、果実および他の樹木、マメ類および野菜の主要な種の全てを含む (ただしこれらに限定されない) 全ての植物は、培養細胞または培養組織から再生させることができる。

【0040】

特に好ましい細菌宿主細胞の例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌 (*E. coli*)、ストレプトマイセスおよびバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 細胞が含まれる。

真菌での発現に特に適切な宿主細胞の例には、酵母細胞 (例えば *S. セレビス* (*cerevisiae*)) およびアスペルギルス細胞が含まれる。

形質転換細胞株の回収に用いることができる多くの選択系は、当技術分野で公知である。そのような例としては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (*M. Wigler et al.* (1977) *Cell* 11: 223 - 32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*I. Lowy et al.* (1980) *Cell* 22: 817 - 23) の遺伝子が挙げられ、これらはそれぞれ tk - または apt[±] 細胞で用いることができる。

さらにまた、抗代謝物質耐性、抗生物質耐性または除草剤耐性を選択基準として用いてもよい。例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) はメトトレキセートに対する耐性を付与し (*M. Wigler et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 3567 - 70)、nptはアミノグリコシド系ネオマイシンおよびG - 418に対する耐性を付与し (*F. Colbere - Garapin et al.* (1981) *J. Mol. Biol.* 150: 1 - 14)、さらにalsまたはpatはそれぞれクロロスルフロン (chlorsulfuron) およびホスフィノトリシン (phosphinotricin) アセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する。さらに別の選択可能な遺伝子が報告されており、それらの例は当業者には明白であろう。

【0041】

マーカー遺伝子の発現の有無は対象の遺伝子も存在することを示唆するが、対象の遺伝子の存在および発現を確認する必要がある。例えば、関連配列がマーカー遺伝子配列内に挿入されている場合、マーカー遺伝子機能が存在しないことによって、適切な配列を含む形質転換細胞を識別することができる。あるいは、マーカー遺伝子は、ただ1つのプロモーターの制御下に、本発明のポリペプチドをコードする配列とともに直列に配置することができる。通常、誘発または選択に応答するマーカー遺伝子の発現は、直列遺伝子の発現も示している。

あるいは、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、前記ポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者に知られている多様な手法で同定することができる。前記手法には、DNA - DNAまたはDNA - RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイ、例えば蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) またはイムノアッセイ技術 (例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) および放射性イムノアッセイ (RIA)) が含まれ (ただしこれらに限定されない)、核酸またはタンパク質の検出および / または定量的のためにメンブレン、溶液またはチップをベースとする技術が含まれる (例えば以下を参照されたい: R. Hampton et al. (1990) *Serological Methods, A Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN; および D.E. Maddox et al. (1983) *J. Exp. Med.* 158: 1211 - 1216)。

【0042】

多様な標識および結合技術が当業者に知られており、種々の核酸およびアミノ酸アッセイで用いることができる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に近縁な配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブの作製手段には、標識したポリヌクレオチドを用いるオリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識またはPCR増幅が含まれる。あるいは、本発明のポリペプチドをコードする配列をベクターにクローニングしてmRNAプローブを作製することができる。そのようなベクターは当技術分野で公知であって、商業的に入手可能であり、適切なRNAポリメラーゼ (例えばT7、T3またはSP6) および標識ヌクレオチドを添加することにより *in vitro* でRNAプローブを合成することに用いられ得る。これらの手法は、商業的に入手可能な種々のキット (Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, MI); Promega (Madison, WI); U.S. Biochemical Corp., (Cleveland, OH)) を用いて実施することができる。

検出を容易にするために用いられ得る適切なレポーター分子または標識には、放射性核種、酵素および蛍光、化学発光または色素生産性物質、基質、コファクター、阻害剤、磁性粒子などが挙げられる。

【0043】

本発明の核酸分子は、トランスジェニック動物 (特にげっ歯類動物) の作製にも用いることができる。そのようなトランスジェニック動物は、本発明の別の特徴を構成する。そのような作製は、体細胞の改変によって局部的に、または遺伝性改変を導入する生殖細胞系列療法によって実施することができる。前記のようなトランスジェニック動物は、本発明のポリペプチドのモジュレーターとして有効な薬剤分子のための動物モデルを作製するために特に有用であり得る。

ポリペプチドは、周知の方法によってリコンビナント細胞培養物から回収し精製することができる。前記周知の方法には、硫酸またはエタノール沈澱、酸性抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸化セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーが含まれる。高性能液体クロマトグラフィーは、精製に特に有用である。単離および精製の間にポリペプチドが変性した場合には、タンパク質のリフォールディングのためによく知られている技術を用いて活性的な高次構造を再生することができる。

【0044】

所望の場合には、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に本発明のポリペプチドをコードする配列を連結させることにより特殊化したベクター構築物も、タンパク質の精製を容易にするために用いることができる。そのような精製促進ドメインの例には、金属キレートペプチド (例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン - トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAGS伸長 / アフィニティー精製システム (Immunex Corp., Seattle, WA) で用いられるドメイン) が含まれる。切断可能なリンカー配列 (例えばXA因子またはエンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego, CA) に特異的なもの) を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に包含させて、精製を容易にすることに用いてもよい。そのような発現ベクターの1つは、チオレドキシンまたはエン

10

20

30

40

50

テロキナーゼ切断部位に先行するいくつかのヒスチジン残基と融合させた本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。ヒスチジン残基は、IMAC (固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー; J. Porath et al. (1992) Prot. Exp. Purif. 3: 263 - 281) により精製を容易にし、一方、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位は、融合タンパク質からポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターについての考察は以下で提供される: D.J. Kroll et al. (1993) DNA Cell Biol. 12: 441 - 453)。

【0045】

スクリーニングアッセイで使用するためにポリペプチドを発現させる場合は、前記ポリペプチドを発現する宿主細胞の表面で前記ポリペプチドを生成させることが一般には好ましい。この場合、宿主細胞はスクリーニングアッセイで使用する前に、例えば蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) またはイムノアフィニティー技術のような技術を用いて収獲することができる。ポリペプチドが培養液中に分泌される場合は、前記培養液を回収して発現されたポリペプチドを回収および精製することができる。ポリペプチドが細胞内で生成される場合、ポリペプチドを回収する前に、先ず初めに細胞を溶解させねばならない。

本発明のポリペプチドを用いて、種々の薬剤スクリーニング技術のいずれかで化合物ライブラリーをスクリーニングすることができる。そのような化合物は、本発明のポリペプチドの遺伝子発現レベルまたは活性レベルを活性化させる (アゴニスト作用) か、または阻害する (アンタゴニスト作用) ことができ、本発明のさらなる特徴を形成し得る。好ましい化合物は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させることに有効であるか、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節することに有効である。

アゴニスト化合物またはアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーまたは天然物混合物から単離することができる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは、天然または改変された基質、リガンド、酵素、レセプター、もしくは構造的もしくは機能的模倣物質であってもよい。前記のようなスクリーニング技術の適切な概論については、以下を参照されたい: Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5。

【0046】

良好なアンタゴニストである可能性が高い化合物は、本発明のポリペプチドと結合し、結合しているときに前記ポリペプチドの生物学的作用を誘発しない分子である。強力なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドと結合し、それによって本発明のポリペプチドの活性を阻害または消滅させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。そのようなやり方で、前記ポリペプチドと正常な細胞の結合分子との結合が阻害され、その結果前記ポリペプチドの正常な生物学的活性が阻害され得る。

このようなスクリーニング技術で用いられる本発明のポリペプチドは、溶液中で遊離していても、固相支持体に固定されていても、細胞表面に保持されていても、または細胞内に位置していてもよい。一般に、このようなスクリーニングの方法は、前記のポリペプチドを発現している適切な細胞または細胞膜を用いることを含み、前記細胞または細胞膜をテスト化合物と接触させて、結合または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する。続いて前記テスト化合物と接触させた細胞の機能的応答を、前記テスト化合物と接触させなかったコントロール細胞と比較する。このようなアッセイによって、前記ポリペプチドの活性化によって生じるシグナルをテスト化合物がもたらすか否かを、適切な検出系を用いて評価することができる。活性化の阻害剤は、一般的には既知のアゴニストの存在下でアッセイを行われ、テスト化合物の存在下でのアゴニストによる活性化の影響が観察される。

【0047】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト化合物を同定する好ましい方法は、以下の工程を含む:

(a) 本発明の第一の特徴のポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に应答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されており；さらに

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用によって生じるシグナルのレベルを測定することにより、前記化合物が前記ポリペプチドと結合しこれを活性化するかまたは阻害するかを決定する工程。

【0048】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するさらに好ましい方法は、以下の工程を含む：

(a) 前記ポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に应答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されており；さらに

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用によって生じるシグナルレベルを前記化合物が存在しないときのシグナルレベルと比較することにより、前記化合物が前記ポリペプチドと結合しこれを活性化するかまたは抑制するかを決定する工程。

さらに好ましい態様では、上述の一般的な方法が、前記ポリペプチドに対する標識または非標識リガンドの存在下でアゴニストまたはアンタゴニストの同定を行う工程をさらに含み得る。

【0049】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法の別の態様は、以下の工程を含む：

本発明のポリペプチドをその表面に有する細胞とリガンドとの結合または前記のポリペプチドを含む細胞膜とリガンドとの結合の抑制を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で候補化合物を存在させて決定する工程、および前記ポリペプチドに結合したリガンドの量を決定する工程。リガンドの結合の減少をひき起こし得る化合物は、アゴニストまたはアンタゴニストであると考えられる。好ましくは、前記リガンドが標識されている。

より詳しくは、アンタゴニストまたはアゴニスト化合物をポリペプチドについてスクリーニングする方法は以下の工程を含む：

(a) 本発明のポリペプチドをその表面に発現している全細胞または本発明のポリペプチドを含む細胞膜と、標識リガンドとをインキュベートする工程；

(b) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 工程(a)の標識リガンドおよび前記全細胞または細胞膜の混合物に候補化合物を添加し、前記混合物を平衡化させる工程；

(d) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を工程(c)の後で測定する工程；さらに

(e) 工程(b)および工程(d)で結合した標識リガンドの相違を比較する工程であって、それにより工程(d)結合の減少をひき起こす化合物はアゴニストまたはアンタゴニストであると考え前記工程。

【0050】

前記ポリペプチドは、上記のアッセイにおいて用量依存的な様式で多様な生理学および病理学的プロセスを調節することが判明するであろう。したがって、本発明の“機能的等価物”には、上記アッセイにおいて用量依存的な様式で同じ調節的活性のいずれかを示すポリペプチドが含まれる。用量依存的活性の程度は本発明のポリペプチドのそれと同一である必要はないが、好ましくは前記“機能的等価物”は、所定の活性アッセイにおいて本発明のポリペプチドと比較して実質的に類似の用量依存性を示すであろう。

上述のある態様では、単純な結合アッセイを用いてもよい。この場合、テスト化合物のポリペプチド保持表面への付着が、直接的または間接的にテスト化合物と結合させた標識手段によって検出されるか、または標識競合物質との競合を含むアッセイで検出される。別の態様では、競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この場合、ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドと特異的に結合することができる中和抗体が、結合についてテスト化合物と競合する。このようにして、前記抗体を用いて、前記ポリペプチドに対し特異的な結合親和性を保有する一切のテスト化合物の存在を検出することができる。

【0051】

前記ポリペプチドをコードするmRNAの細胞内産生に対する添加テスト化合物の影響を検出するアッセイをデザインすることもできる。例えば、当技術分野で公知の標準的な方法によりモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定するELISAを構築することができ、前記ELISAを用いて、適切に操作された細胞または組織からのポリペプチド生成を阻害または増強し得る化合物について検索することができる。続いて、前記ポリペプチドと被検化合物との結合複合体の形成を測定することができる。

10

さらにまた本発明の範囲内に含まれるアッセイ方法は、過剰発現アッセイまたは除去 (ablation) アッセイで本発明の遺伝子およびポリペプチドの使用を必要とするものである。前記のアッセイは、これら遺伝子 / ポリペプチドの細胞内レベルの操作およびこの操作事象による前記被操作細胞の生理機能に対する影響の評価を含む。例えばそのような実験によって、特定の遺伝子 / ポリペプチドが関与するシグナル伝達経路および代謝経路の詳細が明らかにされ、本研究対象のポリペプチドが相互作用するポリペプチドのアイデンティティーに関する情報がもたらされ、さらに関連遺伝子およびタンパク質を調節する方法についての手がかりが提供される。

【0052】

20

使用され得る別の薬剤スクリーニング技術は、対象のポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物の高速大量処理スクリーニングを提供する (国際特許出願W084/03564を参照されたい)。前記方法では、多数の異なる小型のテスト化合物が固相支持体上で合成され、次に本発明のポリペプチドと反応させられ洗浄され得る。ポリペプチドを固定する方法の1つは、非中和抗体を使用することである。続いて、当技術分野で周知の方法を用いて、結合ポリペプチドを検出することができる。精製ポリペプチドはまた、前述の薬剤スクリーニング技術で使用するために、プレート上に直接被覆させることができる。

当技術分野で公知の標準的なレセプター結合技術により膜結合レセプターまたは可溶性レセプターを同定するのに、本発明のポリペプチドが用いられ得る。前記標準的な技術は、例えばリガンド結合アッセイおよび架橋アッセイであり、そのようなアッセイでは、ポリペプチドが放射性同位体で標識されているか、化学的に改変されているか、またはその検出もしくは精製を容易にするペプチド配列と融合されており、推定上のレセプター供給源 (例えば細胞の組成物、細胞膜、細胞上清、組織抽出物または体液) とインキュベートされる。結合の有効性は、生物物理的技術、例えば表面プラズモン共鳴および分光法を用いて測定することができる。結合アッセイは、レセプターの精製およびクローニングのために用いることができるが、ポリペプチドとそのレセプターとの結合に競合する前記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためにも用いることができる。スクリーニングアッセイを実施する標準的な方法は、当技術分野ではよく理解されている。

30

【0053】

本発明はまた、上記で述べるアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質、酵素を同定する方法に有用なスクリーニングキットを含む。

40

本発明は、上記アゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質および酵素、並びに上記で述べる方法によって発見され、本発明のポリペプチドの活性または抗原性を調節する他の化合物を含む。

本発明はまた、本発明のポリペプチド、核酸、リガンドまたは化合物を適切な医薬担体と組合せて含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、下記で詳細に説明するように、治療用もしくは診断用試薬として、ワクチンとして、または他の免疫原性組成物として適切であり得る。

本明細書で用いられる専門用語にしたがえば、ポリペプチド、核酸、リガンドまたは化合物 {X} を含む組成物は、組成物中のX + Yの合計の少なくとも85質量%がXである場合に

50

不純物（本明細書中ではY）を“実質的に含まない”。好ましくは、Xが組成物中のX+Yの合計の少なくとも約90質量%、より好ましくは少なくとも約95質量%、98質量%または99質量%を構成する。

【0054】

本医薬組成物は、好ましくは治療的に有効な量の本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物を含むべきである。本明細書で用いられる“治療的に有効な量”という用語は、標的疾患または症状を治療、緩和もしくは予防するために、または検出可能な治療効果もしくは予防効果を示すために必要な治療薬剤の量を指す。いずれの化合物についても、治療的に有効な投与量は、最初に細胞培養アッセイ（例えば新生物細胞培養アッセイ）または動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌまたはブタ）のいずれかで見積もることができる。動物モデルは、適切な濃度範囲および投与経路の決定にも用いることができる。次にそのような情報を用いて、ヒトで有用な投与用量および投与経路を決定することができる。

10

ヒト対象者に対する正確な有効量は、疾患状態の重篤度、対象者の全身の健康状態、対象者の年齢、体重および性別、食事、投与時間および投与回数、併用薬剤、反応感受性および治療に対する許容性/応答性に依存するであろう。この量は、日常的検査により決定することができ、それは臨床医の判断の範囲内である。一般には、有効用量は、0.01mg/kgから50mg/kg、好ましくは0.05mg/kgから10mg/kgであろう。本組成物は、患者に個別に投与されてもよく、または他の薬剤、医薬品またはホルモンと一緒に投与されてもよい。

【0055】

20

医薬組成物はまた、治療薬の投与のために医薬的に許容できる担体を含むことができる。そのような担体には、抗体および他のポリペプチド、遺伝子並びに他の治療薬剤（例えばリポソーム）が含まれるが、ただし担体がそれ自体で前記組成物を投与される個体に有害な抗体の産生を誘発せず、かつ不都合な毒性をもたらすことなく投与され得ることを条件とする。適切な担体は、大型でゆっくりと代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子であり得る。

医薬組成物に、医薬的に許容できる塩、例えば鉍酸塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような）；および有機酸の塩（酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などのような）を用いることができる。医薬的に許容できる担体についての綿密な考察は以下のテキストで入手可能である：Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)。

30

治療用組成物中の医薬的に許容できる担体は、さらに液体、例えば水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールを含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝物質などのような助剤が、前記組成物中に存在していてもよい。そのような担体は、患者が摂取できるように、前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などとして製剤化することを可能にする。

【0056】

いったん製剤化されたら、本発明の組成物を直接対象者に投与することができる。治療される対象者は動物で、特にヒト対象者が治療され得る。

40

本発明で用いられる医薬組成物は、多数の経路（経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髓内、硬膜下腔内、心室内、経皮的アプリケーション（例えばW098/20734を参照）、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内または直腸的手段が挙げられるが、ただしこれらに限定されない）によって投与できる。遺伝子銃またはハイポスプレーもまた、本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。典型的には、本治療用組成物は、注射用物質（液体溶液または懸濁剤のいずれか）として調製できる。注射に先立ち液体ビヒクルで溶液または懸濁液とするのに適する固体を調製することもできる。

本組成物の直接的デリバリーは一般に、皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内に注射することによって達成されるか、または組織の間隙腔に送達されるであろう。前記組成物はまた、病巣に投与してもよい。投薬治療は、単回投与スケジュールでも複数回投与スケジュー

50

ールでもよい。

本発明のポリペプチドの活性が特定の疾患状態において過剰である場合には、いくつかのアプローチが利用可能である。あるアプローチは、医薬的に許容できる担体とともに上記のような阻害化合物（アンタゴニスト）を、前記ポリペプチドの機能を阻害するのに有効な量で対象者に投与することを含む。前記ポリペプチドの機能の阻害は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を遮断することによって、または第二のシグナルを阻害することによって成され、それによって異常な症状が緩和される。好ましくは、前記アンタゴニストが抗体である。最も好ましくは、そのような抗体が、先に記載するような免疫原性を最少にするキメラ抗体および/またはヒト化抗体である。

【0057】

別のアプローチでは、リガンド、基質、酵素、レセプターに対する結合親和性を保持する該ポリペプチドの可溶形を投与することができる。典型的には、前記ポリペプチドは、関連部分を保持するフラグメントの形態で投与することができる。

また別のアプローチでは、前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、内部で生成されるまたは別々に投与されるアンチセンス核酸分子（上述のような）の使用といった発現遮断技術を用いて、阻害することができる。遺伝子発現の改変は、ポリペプチドをコードする遺伝子の制御領域、5'領域または調節領域（シグナル配列、プロモーター、エンハンサーおよびイントロン）に対して相補的な配列またはアンチセンス分子（DNA、RNAまたはPNA）をデザインすることによって達成できる。同様に、阻害は“三重らせん”塩基対方法論を用いて達成することができる。三重らせん対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために二重らせんが充分に開く能力を阻害することから有用である。三重らせんDNAを用いる近年の治療上の進歩は、文献に記載されている（J.E. Gee et al.(1994) In: B.E. Huber & B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY）。相補的配列またはアンチセンス分子をデザインし、リボソームに対する結合を妨げて転写を妨害することによってmRNAの翻訳を遮断することもできる。そのようなオリゴヌクレオチドは投与されてもよいし、またin vivoでの発現によりin situで生成させてもよい。

【0058】

さらに、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げることができる。リボザイムは、天然または合成であり得る触媒的活性型のRNAである（例えば以下を参照されたい：N. Usman et al., Curr. Opin. Struct. Biol.(1996) 6(4): 527 - 533）。合成リボザイムをデザインして、選択した位置でmRNAを特異的に切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を妨げることができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるような、天然のリボースリン酸骨格および天然の塩基を用いて合成され得る。或いは、リボザイムは、非天然の骨格（例えば2'-O-メチルRNA）を用いて合成されて、リボヌクレアーゼ分解から保護されてもよく、また改変塩基を含んでいてもよい。

RNA分子は、細胞内安定性および半減期を増加させるように改変されてもよい。可能な改変には、RNA分子の5'および/または3'末端へのフランキング配列の付加、または分子の骨格内でホスホジエステル結合に代わるホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限られない。この概念は、PNAの生成にも受け継がれ、内因性エンドヌクレアーゼによって同様に容易には認識されないイノシン、ケオシン(guosine)およびブトシン(butosine)のような非慣用塩基、ならびにアセチル-、メチル-、チオ-および同様な改変形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンの包含によってPNA分子の全てに広げられ得る。

【0059】

本発明のポリペプチドおよびその活性の過小発現に関連する異常な状態を治療するためには、いくつかのアプローチも利用可能である。あるアプローチは、前記ポリペプチドを活性化する化合物（すなわち上記で述べたアゴニスト）の治療的に有効な量を対象者に投与し、異常な状態を緩和することを含む。あるいは、本ポリペプチドの治療量を適切な医

10

20

30

40

50

薬担体と組合せて投与し、関連性のあるポリペプチド生理学的バランスを回復させることができる。

遺伝子治療を用い、対象者の関連細胞によって本ポリペプチドの内因性産生を行わせることができる。遺伝子治療は、欠陥のある遺伝子を修正した治療用遺伝子と置き換えることによって、前記ポリペプチドの不適切な生成を永久的に治療することに用いられる。

本発明の遺伝子治療は、*in vivo*または*ex vivo*で実施することができる。*ex vivo*遺伝子治療は、患者の細胞の単離および精製、治療用遺伝子の導入、および遺伝的に改変した細胞を患者に戻して導入することを必要とする。対照的に、*in vivo*遺伝子治療は、患者の細胞の単離および精製を必要としない。

治療用遺伝子は、患者に投与するために、典型的には“パッケージング”されている。遺伝子デリバリービヒクルは、リポソームのような非ウイルス性、または、例えばK.L. Berkner (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39 - 66に記載されているアデノウイルスのような複製欠損ウイルスもしくはN. Muzyczka (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 97 - 129および米国特許第5,252,479号に記載されているアデノ付随ウイルス(AAV)ベクターであり得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、複製欠損レトロウイルスベクターで発現させるために、操作され得る。次に、この発現構築物は単離されて、前記ポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージ細胞に導入され得る。その結果、前記パッケージ細胞は、対象の遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生することができるようになる。これらのプロデューサー細胞は、*in vivo*で細胞を操作するため及び*in vivo*でポリペプチドを発現させるために、対象者に投与することができる(以下を参照されたい: Gene Therapy and Other Molecular Genetic - based Therapeutic Approaches, Chapter 20 (およびその中に引用された文献), “Human Molecular Genetics” (1996) T. Strachan & A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.)。

10

20

【0060】

別のアプローチは“裸のDNA”の投与で、この場合、治療用遺伝子が血流または筋肉組織に直接注射される。

本発明のポリペプチドまたは核酸分子が疾患をひき起こす原因物質である場合には、本発明は、前記疾患をひき起こす原因物質に対する抗体を生成するワクチンとして用いることができる前記ポリペプチドまたは核酸分子を提供する。

30

本発明のワクチンは、予防的(すなわち、感染を防ぐ)であっても治療的(すなわち、感染後の疾患を治療する)であってもよい。そのようなワクチンは、免疫性を付与する抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質または核酸を、通常は上記で述べた医薬的に許容できる担体と組合せて含む。前記担体には、組成物を投与される個体に対して有害な抗体の産生をそれ自体で誘発しない担体のいずれもが含まれる。さらに、これらの担体は免疫刺激剤(“アジュバント”)として機能してもよい。さらにまた、前記抗原または免疫原は、細菌の類毒素(例えばジフテリア、破傷風、コレラ、H. ピロリ菌(*pyroli*)由来の類毒素)および他の病原体と結合されてもよい。

ポリペプチドは胃で分解されるので、ポリペプチドを含むワクチンは、好ましくは非経口的に(例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射)投与される。非経口投与に適した製剤には、水性および非水性の無菌注射溶液、並びに水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。前記無菌注射溶液は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤をレシピエントの血液に対して等張にする溶質を含んでいてもよく、前記無菌懸濁剤は、懸濁剤または増粘剤を含んでもよい。

40

【0061】

本発明のワクチン製剤は、単位用量または複数単位用量の容器で提供されてもよい。例えば、密封されたアンプルおよびバイアルでの提供は、使用直前に無菌液状担体を添加することのみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。投与量はワクチンの比活性に依存し、日常的な検査によって容易に決定することができる。

本発明はまた、診断薬としての本発明の核酸分子の使用に関する。本発明の核酸分子に

50

より特徴付けられ、機能不全に付随する遺伝子の変異型の検出は、前記遺伝子の過小発現、過剰発現または位置的もしくは時間的発現の変化から生じる疾患の診断、またはそのような疾患に対する感受性の診断を規定するかまたはそれら診断に付け加えることができる診断ツールを提供する。前記遺伝子に変異を保有する個体は、種々の技術によってDNAレベルで検出することができる。

診断のための核酸分子は、対象者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から入手できる。ゲノムDNAを直接検出に用いてもよいし、またはPCR、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(SDA)もしくは他の増幅技術进行分析に先立って用いることによって、ゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい(以下の文献を参照されたい: Saiki et al., Nature 324: 163 - 166(1986); Bej et al., Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol., 26: 301 - 334(1991); Birkenmeyer et al., J. Virol. Meth., 35: 117 - 126(1991); Van B runt, J., Bio/Technology, 8: 291 - 294(1990))。

10

【0062】

ある態様では、本発明のこの特徴は、本発明のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価すること、および前記発現レベルをコントロールのレベルと比較することを含む、患者における疾患を診断する方法を提供する。この場合、前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する。前記方法は、以下の工程を含み得る:

a) 本発明の核酸分子と核酸プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で、患者由来の組織サンプルを前記核酸プローブと接触させる工程;

20

b) 工程a) で用いた条件と同じ条件下で、コントロールサンプルを前記プローブと接触させる工程; および、

c) 前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程;

この場合、コントロールサンプル中のハイブリッド複合体レベルと異なるハイブリッド複合体レベルが患者サンプルで検出されることは、疾患を示唆する。

本発明のさらなる特徴は、以下の工程を含む診断方法を含む:

a) 疾患について検査される患者から、組織サンプルを入手する工程;

b) 前記組織サンプルから、本発明の核酸分子を単離する工程; および、

c) 疾患に付随する前記核酸分子における変異の存在を検出することによって、患者を疾患について診断する工程。

30

【0063】

上記に記載した方法における核酸分子の検出を補助するために、増幅工程、例えばPCRの使用が含まれ得る。

正常な遺伝子型と比較すると、増幅産物におけるサイズの変化によって、欠失および挿入が検出される。点変異は、増幅DNAを本発明の標識RNAとハイブリダイズさせるか、あるいは本発明の標識アンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることによって同定することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によって、または溶融温度における差異を評価することによって、ミスマッチを有する二重鎖と区別することができる。DNAをストリンジェントな条件下で前記DNAとハイブリダイズする核酸プローブと接触させてハイブリッド二本鎖分子を形成させること(前記ハイブリッド二本鎖は、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分で前記核酸プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分を有する)、および、前記プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分の有無を前記DNA鎖の対応部分における疾患付随変異の有無を示すものとして検出することによって、患者における変異の有無を検出することができる。

40

前記のような診断は特に出生前検査で有用であり、新生児検査でもなお有用である。

【0064】

参照遺伝子と“変異”遺伝子との間の点変異および他の配列的相違は、他の周知の技術、例えば直接DNAシーケンシングまたは一本鎖構造多型性(Orita et al., Genomics, 5: 874 - 879(1989))によって同定できる。例えば、シーケンシングプライマーは、二本鎖PCR産物または改変PCRによって作製された一本鎖テンプレート分子とともに用い

50

ることができる。配列決定は、放射能標識ヌクレオチドを用いる通常の方法によって、または蛍光タグを用いる自動シーケンシング法によって実施される。クローン化DNAセグメントを、特異的DNAセグメントを検出するためのプローブとして用いることもできる。この方法の感受性は、PCRと併用したとき極めて増強される。さらに、点変異および他の配列の変動（例えば多型性）は、例えば対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをただ1つのヌクレオチドが異なる配列のPCR増幅に用いることによって、上記のように検出することができる。

DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下でのゲル内のDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化によって、または直接DNAシーケンシング（例えば、Myers et al., Science (1985) 230:1242）によっても検出することができる。特定の位置における配列の変化はまた、RNaseおよびS1保護のようなヌクレアーゼ保護アッセイによって、または化学切断法（Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401を参照）によっても明らかにすることができる。

10

【0065】

ミクロ欠失、異数性、転座、逆位のような変異は、通常のゲル電気泳動およびDNAシーケンシングの他に、in situ分析によっても検出できる（例えば以下を参照されたい：Keller et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA(1993)）。すなわち、細胞内のDNAまたはRNA配列は、それらを単離および/またはメンブレン上に固定する必要なしに、変異について分析することができる。蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）は、現在のところ最も一般的に用いられている方法で、FISHに関する多数の概論が存在する（例えば以下を参照されたい：Trachuck et al., Science, 250, 559-562(1990)；およびTrask et al., Trends, Genet., 7, 149-154(1991)）。

20

本発明の別の態様では、本発明の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、遺伝的変種、変異および多型性の効率的スクリーニングを実施することができる。アレイ技術方法はよく知られていて一般的な適応性を有しており、遺伝子発現、遺伝連鎖および遺伝的可変性を含む分子遺伝学における種々の疑問に取り組むのに用いることができる（例えば以下を参照されたい：M. Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp610-613）。

【0066】

ある態様では、前記アレイが、以下の文献に記載されている方法にしたがって調製され使用される（PCT出願W095/11995（Chee et al.）；D.J. Lockhart et al.(1996) Nat. Biotech. 14:1675-1680；M. Schena et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619）。オリゴヌクレオチド対は、2つから100万個を越える範囲にわたり得る。前記オリゴマーは、光誘導化学法を用いて基板上の指定領域で合成される。基板は、紙、ナイロンまたは他の種類のメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライドもしくは他の適切な固相支持体のいずれであってもよい。別の特徴では、オリゴヌクレオチドは、PCT特許出願（W095/251116, Baldeschweiler et al.）に記載されているように、化学的結合方法およびインクジェット応用装置を用いることによって基板表面上で合成することができる。別の特徴では、ドット（またはスロット）プロットに類似する“格子化（gridded）”アレイが、真空系、熱結合方法、UV結合方法、機械的または化学的結合方法を用いて基質表面にcDNAフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを配置すること及び連結させることに用いられ得る。上述するようなアレイは、手動で、または利用可能な装置（スロットプロットまたはドットプロット装置）、材料（適切な固相支持体すべて）および機械（ロボット機器を含む）を用いて作製することができ、8、24、96、384、1536または6144個のオリゴヌクレオチド、または2つから100万個を越える範囲の他のいずれの数をも含むことができる（このことは、アレイ自体を商業的に入手可能な計測器の有効利用に向くものとしている）。

30

40

【0067】

上記で考察する方法の他に、対象者に由来するサンプルから、ポリペプチドまたはmRNAの異常な増加または低下のレベルを決定することを含む方法によって、疾患を診断するこ

50

とができる。発現低下または発現増加は、例えば、核酸増幅、一例を挙げるとPCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザンブロット法および他のハイブリダイゼーション方法のようなポリヌクレオチドの定量のために当技術分野で周知の方法のいずれかを用いて、RNAレベルで測定することができる。

宿主に由来するサンプルで本発明のポリペプチドレベルを決定することに用いることができるアッセイ技術は当業者によく知られており、また上記でいくらか詳細に考察されている（ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイを含む）。本発明のこの特徴では、以下の工程を含む診断方法が提供される：（a）上記のようなリガンドを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適する条件下で、生物学的サンプルと接触させる工程；および（b）前記複合体を検出する工程。

10

ELISA、RIAおよびFACSのようなポリペプチドレベルを測定するためのプロトコルは、ポリペプチド発現の変化レベルまたは異常レベルを診断するための基礎をさらに提供することができる。ポリペプチド発現の正常値または標準値は、正常な哺乳類対象体（好ましくはヒト）から得られた体液または細胞抽出物を、複合体形成に適した条件下で、前記ポリペプチドに対する抗体と混合することによって確立される。標準的な複合体形成量は、種々の方法、例えば分光測定方法によって定量することができる。

【0068】

本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体は、前記ポリペプチドの発現によって特徴付けられる症状または疾患の診断のために、または本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンドおよび他の化合物を用いて治療されている患者をモニターするアッセイにおいて、用いることができる。診断目的に有用な抗体は、治療薬として上記で述べたのと同じ様式で調製することができる。前記ポリペプチドについての診断アッセイは、前記抗体および標識を用いてヒトの体液または細胞もしくは組織の抽出物中のポリペプチドを検出する方法を含む。前記抗体は改変して、または改変せずに用いることができ、さらにそれらをレポーター分子と共有結合または非共有結合によって結合させることによって標識することができる。当技術分野で公知の多様なレポーター分子を用いることができ、それらのいくつかは上記に記載されている。

20

生検組織由来の、対象者、コントロールおよび疾患サンプルで発現されているポリペプチドの量は、標準値と比較される。標準値と対象者の値との間の偏差は疾患診断のためのパラメータを確立する。診断アッセイを用いて、ポリペプチド発現の有無および過剰を識別し、治療的処置の間のポリペプチドレベルの調節をモニターすることができる。そのようなアッセイはまた、動物実験、臨床試験または個々の患者の治療モニタリングにおける特定の治療的処置方法の有効性を評価することに用いることができる。

30

【0069】

本発明の診断キットは、以下を含み得る：

- （a）本発明の核酸分子；
- （b）本発明のポリペプチド；または
- （c）本発明のリガンド。

本発明のある特徴では、診断キットが、ストリンジェントな条件下で本発明の核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；前記核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを含む第二の容器；および、疾患の診断を容易にするために前記プローブおよびプライマーの使用についての指示書を含み得る。前記キットは、ハイブリダイズしていないRNAを消化するための薬剤を保持している第三の容器をさらに含んでもよい。

40

本発明の別の特徴では、診断キットが核酸分子のアレイを含んでもよく、前記核酸分子の少なくとも1つが本発明の核酸分子であってもよい。

本発明のポリペプチドを検出するために、診断キットは、本発明のポリペプチドと結合する1つまたは2つ以上の抗体；および、前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬；を含み得る。

【0070】

そのようなキットは、疾患または疾患に対する感受性、特に細胞増殖性疾患、自己免疫

50

／炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態に対する感受性を診断する場合に有用であろう。好ましくは、前記疾患には以下のものが含まれるが、ただしこれらに限定されない：免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、より好ましくは5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）。

10

本発明の種々の特徴および態様は、特に INSP035ポリペプチドに関連する実施例を介して、これからより詳細に説明されるであろう。

本発明の範囲を逸脱することなく細部の改変がなされ得ることは、理解されるであろう。

【0071】

（実施例）

20

（実施例1：INSP035）

配列番号：18および配列番号：20を組合せることにより得られるポリペプチド配列（配列番号：22の等価物）はINSP035の連続するエクソンの翻訳を表しており、PDBデータベースに存在するタンパク質構造に対するインフォーマティクス=ゲノムスレッダーツールで質問（query）として前記ポリペプチド配列を用いた。最もマッチングするものは、4-ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造である。前記の最もマッチングするものは、前記質問配列とのアラインメントで79%のゲノムスレッダー信頼性を示した（図1）。図2は、INSP035質問配列と、4-ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーであるヒト肥満タンパク質（レプチン）の配列（PDB-1ax8）（Zhang et al., Nature 1997(May 8), 387(6629): 206-9）とのアラインメントを示している。INSP035ポリペプチド配列が、図2では“ユーザー配列（User-Seq）”と称されていることを注記しておく。4-ヘリックスバンドルサイトカインファミリータンパク質のメンバーは、治療において極めて重要である。

30

1. IPAAA26841のクローニング

1.1 cDNAライブラリー

ヒトcDNAライブラリー（バクテリオファージラムダ（ ）ベクター中に含まれている）は、StratageneもしくはClontechから購入するか、またはSerono Pharmaceutical Research Instituteで製造元（Stratagene）のプロトコルにしたがって ZAPもしくは GT10ベクター中に調製した。バクテリオファージ DNAは、感染させた大腸菌宿主株の小規模培養物から製造元（Promega, Corporation, Madison WI.）の指示にしたがいWizard Lambda Preps DNA精製系を用いて調製した。用いたライブラリーおよび宿主株のリストは、表Iに示されている。5つの異なるライブラリーの8つのプール（100ng/ μ LファージDNA）または個々のライブラリーのファージDNAを、その後続くPCR反応に用いた。

40

【0072】

1.2 ファージライブラリーDNAに由来する仮想的cDNAのPCR

INSP035（IPAAA26841；図3）の完全なコード配列を含むcDNAは、遺伝子特異的クローニングプライマー（26841-CP1および26841-CP2、図3および表II）を用いて511bpのPCR増幅産物として得られた。PCRは、1XのAmpliTaq（登録商標）緩衝液、200 μ MのdNTP、各々50ピコモルのクローニングプライマー、2.5ユニットのAmpliTaq（登録商標）（Perkin Elmer）および各々100ngのファージライブラリープールDNAを含む最終容積50 μ Lで、次のよ

50

うにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて行った：94 にて1分；94 にて1分、x にてy分、および72 、を40サイクル（ここでxは最低 T_m -5 で、yは産物1kbにつき1分である）；続いて72 にて1分を1サイクル行ってから、4 にて保持サイクル。

増幅産物は、1xのTAE緩衝液（Invitrogen）中0.8%のアガロースゲルで可視化し、予測される分子量で移動したPCR産物をWizard PCR Preps DNA精製系（Promega）を用いてゲルから精製した。50 μ Lの滅菌水に溶出させたPCR産物を、直接サブクロニングするか、または-20 で保存した。

1.3 PCRのための遺伝子特異的クローニングプライマー

仮想的 c DNAの完全長および部分的配列を増幅するために、プライマーデザイナーソフトウェア（Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA）を用いて、18-25塩基の長さを有するPCRプライマー対をデザインした。PCRプライマーは、 55 ± 10 に近い T_m および40-60%のGC含量をもつように最適化した。標的配列INSP035（IPAAA26841）に対して高い選択性を有するプライマーを選択した（ほとんどまたは全く非特異的プライミングを示さない）。

【0073】

1.4 PCR産物のサブクロニング

PCR産物を、インビトロジェン社（Invitrogen Corporation）から購入したTAクローニングキットを用い製造元に指定されている条件を用いて、トポイソメラーゼI改変クローニングベクター（pCR4blunt TOP0）中にサブクロニングした。簡単に記すと、ヒトライブラリープール増幅に由来する4 μ Lのゲル精製PCR産物を、1 μ LのTOP0ベクターおよび1 μ Lの塩溶液とともに室温にて15分間インキュベートした。続いて前記反応混合物で大腸菌株TOP10（Invitrogen）を次のように形質転換した。ワンショットTOP10細胞の50 μ Lアリコート氷上で解凍してから、2 μ LのTOP0反応物を添加した。前記混合物を氷上で15分間インキュベートし、続いて42 にて正確に30秒間のインキュベーションによってヒートショック処理した。サンプルを氷上に戻し、250 μ Lの温SOC培地（室温）を添加した。サンプルを、振盪しながら（220rpm）37 にて1時間インキュベートした。続いて形質転換混合物をアンピシリン（100 μ g/mL）含有L-ブロス（LB）プレート上に蒔いて、37 で一晩インキュベートした。c DNA挿入物を含むアンピシリン耐性コロニーを、コロニーPCRによって同定した。

1.5 コロニーPCR

滅菌つま楊枝を用いて、コロニーを50 μ Lの滅菌水に接種した。続いて接種物の10 μ Lアリコートを、使用したプライマーがT3およびT7であったことを除き上述のように20 μ Lの全反応容積でPCRを行った。サイクリング条件は以下のとおりであった：94 にて2分；94 にて30秒、47 にて30秒および72 にて1分、を30サイクル；72 にて7分を1サイクル。続いて更なる分析の前にサンプルを4 で維持した（保持サイクル）。

PCR反応産物を、1xのTAE緩衝液中において1%アガロースゲル上で分析した。予測されるPCR産物サイズ（511bpのc DNA+106bp（マルチクローニングサイトまたはMCSのため））を示すコロニーを、アンピシリン（100 μ g/mL）含有L-ブロス（LB）5mL中で、220rpmにて振盪しながら37 にて一晩増殖させた。

1.6 プラスミドDNAの調製およびシーケンシング

MiniprepプラスミドDNAを、Qiaprep Turbo9600自動システム（Qiagen）またはWizard Plus SV Miniprepキット（Promega Cat.# 1460）を用い、製造元の指示にしたがって5mLの培養物から調製した。プラスミドDNAを100 μ Lの滅菌水に溶出させた。そのDNA濃度を、エッペンドルフB0分光計を用いて測定した。BigDye Terminatorシステム（Applied Biosystems Cat.# 4390246）を用い製造元の指示にしたがいながら、プラスミドDNA（200-500ng）をT7およびT3プライマーと共にDNAシーケンシングした。Dye-Exカラム（Qiagen）またはMontage SEQ 96クリーンアッププレート（Millipore cat.#LSKS09624）を用いてシーケンシング反応物を精製し、続いてApplied Biosystems 3700シーケンサーで分析した。クローン化c DNAフラグメントの配列は、図4に示されている。

【0074】

2. HEK293/EBNA細胞における INSP035 (IPAAA26841) 発現用プラスミドの構築

続いて、DNAシーケンシングによって同定した INSP035 (IPAAA26841) の完全なコード配列 (ORF) を含む pCRII-TOPOクローン (図5 ; プラスミド番号12130) を用いて、ゲートウェイ (Gateway) (登録商標) クローニング法 (Invitrogen) により、前記挿入物を哺乳類細胞発現ベクター pEAK12d (図6) 中にサブクローニングした。

2.1 インフレーム6HISタグ配列に融合させたゲートウェイ適合性 INSP035 (IPAAA26841) ORFの作製

コード配列 INSP035 (IPAAA26841) は、複数の潜在的な開始メチオニンを含んでいる。したがって、最長ORFにおいて第一および第二のメチオニンを用いる2つの発現クローンを作製することにし、これらをそれぞれ IPAAA26841-long型および IPAAA26841-short型と称した。

ゲートウェイクローニングプロセスは二工程PCR反応を必要とし、これによって5'末端に attB1組換え部位およびコザック配列がフランキングし、3'末端にインフレーム6ヒスチジン (6HIS) タグをコードする配列、終止コドンおよび attB2組換え部位がフランキングする INSP035 (IPAAA26841) の ORF (ゲートウェイ適合性 cDNA) が作製される。IPAAA26841-long型を作製するために、第一のPCR反応物 (最終容積50 μ L) は以下を含む：25ngの pCRII TOPO-IPAAA26841 (プラスミド12130、図5)、2 μ Lの dNTP (5mM)、5 μ Lの10xの Pfx ポリメラーゼ緩衝液、各々0.5 μ Lの遺伝子特異的プライマー (100 μ M) (26841 longEX1 (順方向) および26841EX2 (逆方向)) および0.5 μ LのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen)。PCR反応は、95 で2分の最初の变性工程に続いて、94 で15秒および68 で30秒を12サイクル、で実施した。Wizard PCR prepDNA精製システム (Promega) を用い製造元の指示にしたがって、反応混合物から直接、PCR産物を精製した。IPAAA26841-short型を作製するため、第一のPCR反応物は、使用したPCRプライマーが26841shortEX1および26841EX2であったことを除いてlong型の場合と同一であった。第二のPCR反応物 (最終容積50 μ L) は、以下を含んでいた：10 μ Lの精製PCR産物、2 μ Lの dNTP (5mM)、5 μ Lの10xの Pfx ポリメラーゼ緩衝液、各々0.5 μ Lのゲートウェイ変換プライマー (100 μ M) (GCPフォワードおよびGCPリバーズ)、および0.5 μ LのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ。第二のPCR反応の条件は、以下のとおりであった：95 にて1分；94 で15秒、45 で30秒および68 で3.5分を4サイクル；および、94 にて15秒、55 にて30秒および68 にて3.5分を25サイクル。PCR産物は、上述のように精製した。

【 0 0 7 5 】

2.2 ゲートウェイ適合性 INSP035 (IPAAA26841) ORFのゲートウェイエントリーベクター pDONR201および発現ベクター pEAK12d へのサブクローニング

ゲートウェイクローニング方法の第二段階は、ゲートウェイ改変PCR産物のゲートウェイエントリーベクター pDONR201 (Invitrogen, 図7) へのサブクローニングを含む。前記サブクローニングは、以下のものである：5 μ Lの精製PCR産物を、1.5 μ Lの pDONR201ベクター (0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのBP緩衝液および1.5 μ LのBPクローナーゼ (clonase) 酵素ミックス (Invitrogen) とともに、室温で1時間インキュベートした。この反応をプロテイナーゼK (2 μ g) の添加によって停止させ、さらに10分間37 でインキュベートした。バイオラド = ジーンパルサー (Biorad Gene Pulser) を用いるエレクトロポレーションによって、前記の反応物のアリコート (2 μ L) を大腸菌DH10B細胞へ形質転換した。形質転換体をLB-カナマイシンプレート上に蒔いた。Wizard Plus SV Miniprepsキット (Promega) を用いて、得られたコロニーの1 - 4からプラスミドミニ-プレップDNAを調製し、続いて1.5 μ Lの前記プラスミド溶出物を組換え反応物に用いた。前記組換え反応物は、最終容積10 μ L中に、1.5 μ LのpEAK12dベクター (図6) (0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのLR緩衝液および1.5 μ LのLRクローナーゼ (Invitrogen) を含んでいた。この混合物を室温で1時間インキュベートし、プロテイナーゼK (2 μ g) の添加によって反応を停止させ、さらに10分間37 でインキュベートした。この反応物のアリコート (1 μ L) を用いて、エレクトロポレーションにより、大腸菌DH10B細胞を形質転換した。

正しい挿入物を含むクローンを、pEAK12dプライマー (pEAK12d FおよびpEAK12d R) をP

10

20

30

40

50

CRに用いたことを除き、上に記載するようにコロニーPCRを行うことによって同定した。Qiaprep Turbo 9600自動化システム (Qiagen) を用いるか、またはWizard Plus SV miniprepキット (Promega) により手動で、正しい挿入物を含むクローンからプラスミドmini prep DNAを単離して、pEAK12d FおよびpEAK12d Rプライマーを用いて配列を確認した。

配列を確認した各クローンの500mL培養物から、プラスミドpEAK12d-IPAAA26841 long6His (プラスミド番号12148、図8) およびプラスミドpEAK12d-IPAAA26841short6His (プラスミド番号12686、図9) のCsCl勾配精製maxi-prepDNAを調製して (J. Sambrook, et al., in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、滅菌水に1μg/μLの濃度で再懸濁して-20℃で保存した。

【0076】

10

2.3 5'末端にIL-12p40由来のインフレームシグナル配列および3'末端にインフレーム6HISタグ配列を含むゲートウェイ適合性IPAAA26841shortORFの作製

INSP035 (IPAAA26841) の予測される配列は、明瞭なシグナルペプチドをそのコード配列の5'末端に含んでいない。したがって、HEK293/EBNA系で発現されるcDNAの分泌を容易にするために、IL-12p40 (Swissprot P29460) 由来のシグナル配列を含むINSP035 (IPAAA28841) コード配列の変形を作製した。IL-12p40シグナル配列は、配列MCHQQLVISW FSLV FLASPLVAを有する22アミノ酸シグナルペプチドをコードする。前記シグナルペプチドは、前駆体タンパク質のAla22とIle23との間で切断される。IL-12p40シグナル配列は、2つの連続するPCR反応で、IPAAA26841short型コード配列の5'末端に付加される。第一のPCRでは、IL-12p40のアミノ酸11-22のコード配列がIPAAA26841の5'末端に付加される。シグナルペプチド切断部位が維持されていることを保証するために、IPAAA26841のATG開始コドンをPCRプライマー中でATA (Met - Ile) に変異させる。第二のPCRでは、アミノ酸1-10のコード配列が付加される。続いて、前記PCR産物を、第三のPCR反応でその5'および3'末端にそれぞれattB1およびattB2組換え部位を付加することによって、ゲートウェイクロニング系適合性にする。

20

IL12p40 (1-22) -IPAAA26841-short融合物を作製するために、第一のPCR反応物 (最終容積50μL) は以下を含む: 25ngのpCRII TOP0-IPAAA26841 (プラスミド12686および図9)、2μLのdNTP (5mM)、5μLの10XのPfxポリメラーゼ緩衝液、各々0.5μLの遺伝子特異的プライマー (100μM) (26841-SP1および26841-EX2) 並びに0.5μLのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen)。PCR反応は、95℃にて2分間の最初の変性工程に続いて、94℃にて15秒および68℃にて30秒を10サイクル、で行った。PCR産物は、Wizard PCR prep DNA精製システム (Promega) を用い製造元の指示にしたがって、前記反応混合物から直接精製した。第二のPCR反応物 (最終容積50μL) は、以下を含んでいた: 10μLの精製PCR産物、2μLのdNTP (5mM)、5μLの10X Pfxポリメラーゼ緩衝液、0.5μLのプライマー (SP2およびGCPRリバー) (各々100μM) および0.5μLのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ。第二のPCR反応の条件は以下のとおりであった: 95℃にて2分間の最初の変性工程、続いて94℃にて15秒および68℃にて30秒を10サイクル。PCR産物は、Wizard PCR prep DNA精製システム (Promega) を用い製造元の指示にしたがって、前記反応混合物から直接精製した。第三のPCR反応のために、SP3プライマーおよびGCPRプライマー (各々100μM)、ならびに0.5μLのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼを用いた。反応条件は以下のとおりであった: 95℃にて1分間; 94℃にて15秒、45℃にて30秒および68℃にて3.5分を4サイクル; 94℃にて15秒、55℃にて30秒および68℃にて3.5分を25サイクル。PCR産物は上記の記載のように精製した。続いてPCR産物を、2.2の節に記載するようにサブクロニングして、発現ベクターpEAK12d-sigptd-IPAAA26841short (プラスミド番号12737、図10) を得た。

30

40

【0077】

2.4 発現ベクターpEAK12dの構築

ベクターpEAK12dは、哺乳類細胞発現ベクターpEAK12 (Edge Biosystemsから購入) のゲートウェイクロニング系適合型である。pEAK12では、対象cDNAがヒトEF1プロモーターの制御下で発現される。pEAK12dは、下記のように作製した。

pEAK12は、制限酵素HindIIIおよびNotIで消化し、クレノウ (Klenow) (New England Bio

50

labs) を用いて平滑末端にし、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ (Roche) を用いて脱リン酸化した。脱リン酸化後、平滑末端のゲートウェイリーディングフレームカセットC (ゲートウェイベクター変換系、Invitrogen cat#11828-019) に前記ベクターを連結して、大腸菌DB3.1細胞 (ccdB遺伝子を含むベクターの増殖を許容する) を形質転換した。前記カセットは、ccdB遺伝子にフランキングなAttR組換え部位を含み、クロラムフェニコール耐性を有する。前記ベクターを連結した前記カセットで、Wizard Plus SV Miniprepsキット (Promega) を用いていくつかの耐性コロニーからMini prep DNAを単離し、AseI/EcoRIで消化して、前記カセットが正しい方向性で挿入されたことを示している670bpのフラグメントが生じるコロニーを同定した。得られたプラスミドをpEAK12d (図6) と名付けた。

3. INSP035 (IPAAA26841) を含む cDNAライブラリー / 鋳型の同定

CFPoc-1細胞、SHSYSY細胞およびU373細胞、並びに網膜および膀胱のcDNAライブラリーにおいて、26841-CP1および26841-CP2を用いて得られ且つ正しいサイズ (511bp) で移動するPCR産物を、プールC (胎児肺、胎児腎、胎児肝、骨髄および胎盤) およびプールB (胎児脳、卵巣、下垂体および胎盤) において同定した。クローン化PCR産物のプラスミドマップ (pCR4 blunt-TOPO-IPAAA26841) (プラスミド番号12130) は、図5に示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

表 I : ヒト c DNAライブラリー

ライブラリー	組織／細胞供給源	ベクター	宿主株	供給元	カタログ番号
1	ヒト胎児脳	Zap II	XL1-BlueMRF'	St*	936206
2	ヒト卵巣	GT10	LE392	C1**	HL1098a
3	ヒト下垂体	GT10	LE392	C1	HL1097a
4	ヒト胎盤	GT11	LE392	C1	HL1075b
5	ヒト精巣	GT11	LE392	C1	HL1010b
6	ヒト黒質	GT10	LE392	本施設内	
7	ヒト胎児脳	GT10	LE392	本施設内	
8	ヒト脳皮質	GT10	LE392	本施設内	
9	ヒト結腸	GT10	LE392	C1	HL1034a
10	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	HL1065a
11	ヒト胎児肺	GT10	LE392	C1	HL1072a
12	ヒト胎児腎	GT10	LE392	C1	HL1071a
13	ヒト胎児肝	GT10	LE392	C1	HL1064a
14	ヒト骨髄	GT10	LE392	C1	HL1058a
15	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	C1	HL1050a
16	ヒト胎盤	GT10	LE392	本施設内	
17	ヒトSHSYSY	GT10	LE392	本施設内	
18	ヒトU373細胞株	GT10	LE392	本施設内	
19	ヒトCFPoc-1細胞株	Uni Zap	XL1-BlueMRF'	St	936206
20	ヒト網膜	GT10	LE392	C1	HL1132a
21	ヒト膀胱	GT10	LE392	本施設内	
22	ヒト血小板	Uni Zap	XL1-BlueMRF'	本施設内	
23	ヒト神経芽腫Kan+Ts	GT10	LE392	本施設内	
24	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
25	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
26	ヒト胸腺	GT10	LE392	C1	HL1127a
27	ヒト脾臓5' ストレッチ	GT11	LE392	C1	HL1134b
28	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	C1	HL1050a
29	ヒト精巣	GT10	LE392	C1	HL1065a
30	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	HL1065a
31	ヒト黒質	GT10	LE392	C1	HL1093a
32	ヒト胎盤#11	GT11	LE392	C1	HL1075b
33	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	カスタム
34	ヒト胎盤#59	GT10	LE392	C1	HL5014a
35	ヒト下垂体	GT10	LE392	C1	HL1097a
36	ヒト睪#63	UniZapXR	XL1-BlueMRF'	St	937208
37	ヒト胎盤#19	GT11	LE392	C1	HL1008
38	ヒト肝臓5' ストレッチ	GT11	LE392	C1	HL1115b
39	ヒト子宮	Zap-CMVX	XL1-BlueMRF'	St	980207
40	ヒト腎ラージインサート cDNAライブラリー	R TriplEx2	XL1-Blue	C1	HL5507u

10

20

30

40

* : ストラタジーン (Stratagene)

** : クローンテック (Clontech)

【 0 0 7 9 】

表II: IPAAA26841クローニングプライマー

プライマー	配列 (5' - 3')
26841-CP1	CAC CTC AAA CCT GCC ATG T
26841-CP2	TTC CTC AGC AGA GGG TGA A

【 0 0 8 0 】

表III：IPAAA26841サブクローニングおよびシーケンシングのためのプライマー

プライマー	配列 (5' - 3')
GCPフォワード	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u>
GCPリバーズ	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT “TCA” [ATG GTG ATG GTG ATG GTG]
26841-longEX1	GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG TCC CTG GGG CTA CTG AAA TTC C
26841-shortEX1	GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG GAC TCC GCC CTT GAG TGG CT
26841-EX2	[GTG ATG GTG ATG GTG] GCA GAG GGT GAA GCG CCG GGC GC TGA
26841-SP1	TTT TCC CTG GTT TTT CTG GCA TCT CCC CTC GTG GCC AT(A) GA C TCC GCC CTT GAG TGG CT
SP2	ATG TGT CAC CAG CAG TTG GTC ATC TCT TGG TTT TCC CTG GTT TTT CTG GCA TCT CCC CTC GTG GCC AT(A)
SP3	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG TG T CAC CAG CAG TTG
pEAK12-F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12-R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

10

20

30

下線付き配列 = コザック配列

“ ” 付き配列 = 終止コドン

[] 内配列 = Hisタグ

(A) = G - A (Met - Ile) に変異させた IPAAA26841中のヌクレオチド

【 0 0 8 1 】

4 . 哺乳類細胞での IPAAA26841-long6HIS-V1の発現 (プラスミド番号12148)

4 . 1 細胞培養

エプスタイン=バーウイルスの核抗原を発現しているヒト胚性腎293細胞 (HEK293-EBNA , Invitrogen) は、Ex 細胞VPRO無血清培地 (シードストック、維持培地、JRH) に懸濁状態で維持した。トランスフェクションの16-20時間前 (- 1日目) に、細胞を2つのT225フラスコに播種した (2% FBS播種培地 (JRH) を含むDMEM / F12 (1 : 1) 中に 2×10^5 細胞 / ml の密度でフラスコ当たり50mL) 。次の日 (トランスフェクション0日目) 、JetPEI (登録商標) 試薬を用いてトランスフェクションを行った (プラスミドDNA2 μ L / μ g、PolyPlus-トランスフェクション) 。各フラスコについて、113 μ g のプラスミド番号12148を2.3 μ g のGFP (蛍光レポーター遺伝子) とコ-トランスフェクトした。トランスフェクション混合物を2つの前記T225フラスコに加え、37 (5% CO₂) で6日間インキュベートした。陽性トランスフェクションの確認は、1日目および6日目に定量的蛍光試験によって実施した (Axiovert 10 Zeiss) 。

40

6日目に (採集日) 、2つのフラスコから上清 (100mL) をプールし、遠心分離して (4、400g) 、固有の識別標を付したポットに入れた。

50

6Hisタグ付加タンパク質のQCのために（内部バイオプロセッシングQC）、アリコート（500 μ L）を保持した。

【0082】

4.2 精製方法

C-末端6Hisタグを有するリコンビナントタンパク質を含む100mLの培養液サンプルを、冷緩衝液A（50mMの NaH_2PO_4 ；600mMのNaCl；8.7%（w/v）グリセロール；pH7.5）を用いて最終容積200mLに希釈した。0.22 μ mの滅菌フィルター（Millipore, 500mLフィルターユニット）で前記サンプルをろ過し、250mLの滅菌培養角ビン（Nalgene）で4 で維持した。

精製は、自動サンプル添加装置（Labomatic）に連結したVISIONワークステーション（Applied Biosystems）で4 で実施した。精製方法は、以下の2つの連続する工程を含んでいた：Niイオンで荷電されているPoros 20MC（Applied Biosystems）カラム（4.6 \times 50mm、0.83mL）での金属アフィニティークロマトグラフィー、続いてセファデックスG-25中型（Amersham Pharmacia）カラム（1.0 \times 10cm）でのゲルろ過。

最初のクロマトグラフィー工程のために、金属アフィニティークラムを30カラム容積のEDTA溶液（100mMのEDTA；1MのNaCl；pH8.0）で再生させ、15カラム容積の100mM NiSO_4 溶液で洗浄してNiイオンを再荷電し、10カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて7カラム容積の緩衝液B（50mMの NaH_2PO_4 ；600mMのNaCl；8.7%（w/v）グリセロール；400mMのイミダゾール；pH7.5）で洗浄し、最後に15カラム容積の緩衝液A（15mMのイミダゾールを含む）で平衡化した。Labomaticサンプル添加装置でサンプルを200mLのサンプルループに移し、続いてNi金属アフィニティークラムに流速10mL/分で装荷した。前記カラムを12カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて28カラム容積の緩衝液A（20mMイミダゾールを含む）で洗浄した。20mMイミダゾール洗浄の間に、ゆるく付着していた混入タンパク質はカラムから溶出した。リコンビナントHisタグ付加タンパク質を、流速2mL/分、10カラム容積の緩衝液Bで最後に溶出させ、この溶出タンパク質を1.6mL画分で採集した。

二番目のクロマトグラフィー工程のために、セファデックスG-25ゲルろ過カラムを2mLの緩衝液D（1.137MのNaCl；2.7mMのKCl；1.5mMの KH_2PO_4 ；8mMの Na_2HPO_4 ；pH7.2）で再生し、続いて4カラム容積の緩衝液C（137mMのNaCl；2.7mMのKCl；1.5mMの KH_2PO_4 ；8mMの Na_2HPO_4 ；20%（w/v）グリセロール；pH7.4）で平衡化した。Niカラムから溶出したピーク画分は、VISIONに統合されているサンプル添加装置を自動的に通過して、セファデックスG-25カラムに装荷され、2mL/分の流速の緩衝液Cでタンパク質を溶出した。脱塩サンプルを2.2mL画分で回収した。前記画分を、0.22 μ mの滅菌遠心分離フィルター（Millipore）でろ過し、凍結して-80 で保存した。サンプルのアリコートを、抗His抗体を用い、SDS-PAGE（4-12% NuPAGEゲル；Novex）ウェスタンブロットで分析した。

電気泳動に続いて、タンパク質を4 にて1時間、290mAでゲルからニトロセルロースメンブレンへ電氣的に移した。前記メンブレンを、5%粉乳を含む緩衝液E（137mMのNaCl；2.7mMのKCl；1.5mMの KH_2PO_4 ；8mMの Na_2HPO_4 ；0.1%トウイーン20（pH7.4））で室温にて1時間ブロッキングし、続いて2.5%粉乳を含む緩衝液E中で2つのウサギポリクローナル抗体混合物（G-18およびH-15、各々0.2 μ g/mL；Santa Cruz）とともに4 で一晩インキュベートした。室温でさらに1時間インキュベートした後、前記メンブレンを緩衝液Eで洗滌（10分、3回）、続いて2.5%粉乳を含む緩衝液Eで1/3000に希釈したHRP結合抗ウサギ二次抗体（DAKO、HRP0399）と室温で2時間インキュベートした。緩衝液Eで洗滌（10分、3回）した後、前記メンブレンをECLキット（Amersham Pharmacia）で1分処理した。続いて前記メンブレンをハイパーフィルム（Amersham Pharmacia）に露光し、前記フィルムを現像してウェスタンブロット画像を視覚的に分析した。

【0083】

配列表

配列番号：1（INSP035クローン化ヌクレオチド配列）

```

1  ATGTCCTGG GGCTACTGAA ATTCCAGGCA GTGGGTGAAG AGGACGAGGA
51  GGATGAGGAG GGGGAGAGCC TGGACTCTGT GAAGGCACTG ACAGCCAAGC
101 TGCAGCTGCA GACTCGGCGG CCCTCATATC TGGAGTGGAC AGCCCAGGTC

```

151 CAGAGCCAGG CCTGGCGCAG GGCCCAAGCC AAACCTGGAC CAGGGGGACC
 201 TGGGGACATC TGTGGTTTCG ACTCAATGGA CTCCGCCCTT GAGTGGCTCC
 251 GACGGGAGCT GCGGGAGATG CAGGCGCAGG ACAGGCAGCT GGCAGGGCAG
 301 CTGCTGCGGC TGGGGGCCA GCTGCACCGA CTGAAGATGG ACCAAGCCTG
 351 TCACCTGCAC CAGGAGCTGC TGGATGAGGC CGAGCTGGAG CTGGAGCTGG
 401 AGCCCGGGGC CGGCCTAGCC CTGGCCCCGC TGCTGCGGCA CCTGGGCCTC
 451 ACGCGCATGA ACATCAGCGC CCGGCGCTTC ACCCTCTGCT GA

【 0 0 8 4 】

配列番号：2 (INSP035クローン化タンパク質配列)

1 MSLGLLKFQA VGEEDDEEE GESLDSVKAL TAKLQLQTRR PSYLEWTAQV
 51 QSQAWRRAQA KPGPGGPGDI CGFDSMDSAL EWLRLRELM QAQDRQLAGQ
 101 LLRLRAQLHR LKMDQACHLH QELLDEAELE LELEPGAGLA LAPLLRHLGL
 151 TRMNISARRF TLC

10

【 0 0 8 5 】

配列番号：17 (INSP035の予測されるヌクレオチド配列エクソン1)

1 ATGGACTCCG CCCTTGAGTG GCTCCGACGG GAGCTG

配列番号：18 (INSP035の予測されるタンパク質配列エクソン1)

1 MDSALEWLRR EL

【 0 0 8 6 】

20

配列番号：19 (INSP035の予測されるヌクレオチド配列エクソン2)

1 CGGGAGATGC AGGCGCAGGA CAGGCAGCTG GCAGGGCAGC TGCTGCGGCT
 51 GCGGGGCCAG CTGCACCGAC TGAAGATGGA CCAAGCCTGT CACCTGCACC
 101 AGGAGCTGCT GGATGAGGCC GAGCTGGAGC TGGAGCTGGA GCCCGGGGCC
 151 GGCCTAGCCC TGGCCCCGCT GCTGCGGCAC CTGGGCCTCA CGCGCATGAA
 201 CATCAGCGCC CGGCGCTTCA CCCTCTGCTG A

【 0 0 8 7 】

配列番号：20 (INSP035の予測されるタンパク質配列エクソン2)

1 REMQAQDRQL AGQLRLRAQ LHLKMDQAC HLHQELLDEA ELELELEPGA
 51 GLALAPLLRH LGLTRMNISA RRFTLC

30

配列番号：21 (INSP035の予測されるヌクレオチド配列 / 二番目のメチオニン以降の INSP035ヌクレオチド配列)

1 ATGGACTCCG CCCTTGAGTG GCTCCGACGG GAGCTGCGGG AGATGCAGGC
 51 GCAGGACAGG CAGCTGGCAG GGCAGCTGCT GCGGCTGCGG GCCCAGCTGC
 101 ACCGACTGAA GATGGACCAA GCCTGTCACC TGCACCAGGA GCTGCTGGAT
 151 GAGGCCGAGC TGGAGCTGGA GCTGGAGCCC GGGGCCGGCC TAGCCCTGGC
 201 CCCGCTGCTG CGGCACCTGG GCCTCACGCG CATGAACATC AGCGCCCGGC
 251 GCTTCACCCT CTGCTGA

【 0 0 8 8 】

40

配列番号：22 (INSP035の予測されるタンパク質配列 / 二番目のメチオニン以降の INSP035タンパク質配列)

1 MDSALEWLRR ELREMQADR QLAGQLRLR AQLHLKMDQ ACHLHQELLD
 51 EAELELELEP GAGLALAPLL RHLGLTRMNI SARRFTLC

配列番号：23 (三番目のメチオニン以降の INSP035ヌクレオチド配列)

1 ATGCAGGCGC AGGACAGGCA GCTGGCAGGG CAGCTGCTGC GGCTGCGGGC
 51 CCAGCTGCAC CCACTGAAGA TGGACCAAGC CTGTACCTG CACCAGGAGC
 101 TGCTGGATGA GGCCGAGCTG GAGCTGGAGC TGGAGCCCGG GGCCGGCCTA
 151 GCCCTGGCCC CGCTGCTGCG GCACCTGGGC CTCACGCGCA TGAACATCAG

50

201 CGCCCGGCGC TTCACCCTCT GCTGA

配列番号：24（三番目のメチオニン以降のINSP035タンパク質配列）

1 MQAQDRQLAG QLLRLRAQLH RLKMDQACHL HQELLDEAEL ELELEPGAGL

51 ALAPLLRHLG LTRMNISARR FTLC

【0089】

さらに追加される疾患には以下が含まれる：神経性過食症（P. Monteleone et al., *Psychosom Med* 2002 Nov-Dec; 64(6): 874-9）、末期腎疾患（R. Pecoits-Filho et al., *Eur J Clin Invest* 2002 Nov; 32(11): 811-7）、乳癌、前立腺内膜癌、結腸癌および肥満に起因する胆嚢癌（*J Nutr* 2002 Nov; 132(11 Suppl): 2451S-2455S）、新脈管形成、創傷治癒、リポリーシス、血圧恒常性、および満腹制御に関連する疾患（G. Fruhbeck, *Nutr Rev* 2002 Oct; 60(10 Pt 2): S47-55; discussion S68-84, 85-87）並びに肥満に関連する心脈管系疾患（*Circulation* 2002 Oct 8; 106(15): 1919-24）。

10

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】配列番号：18および20を組合せたポリペプチド配列（配列番号：22と等価）を用いたインフォーマティカゲノムスレッダー検索の結果を示す。

【図2】配列番号：18および20を組合せたポリペプチド配列（配列番号：22と等価）と最近縁構造との間でインフォーマティカゲノムスレッダーにより得られたアラインメントを示す。

20

【図3】IPAAA26841（配列番号：21を含む）の予測されるヌクレオチド配列を、その翻訳とともに示す。

【図4】プライマー26841-CP1および26841-CP1を用いてクローニングしたPCR産物のヌクレオチド配列を、その翻訳とともに示す。

【図5】pCR4blunt-TOPO-IPAAA26841のマップを示す。

【図6】発現ベクターpEAK12dのマップを示す。

【図7】ゲートウェイベクターpDONR201のマップを示す。

【図8】pEAK12d-IPAAA26841 long-6HISのマップを示す。

【図9】プラスミドpEAK12d-IPAAA26841 short-6HISのマップを示す。

【図10】プラスミドpEAK23s-sigptd-IPAAA26841-shortのマップを示す。

30

【図11】PCR4 TOPO IPAAA26841のヌクレオチド配列を示す。

【図12】pEAK12D-IPAAA26841 long-6Hisのヌクレオチド配列を示す。

【図13】pEAK12D-IPAAA26841-6Hisのヌクレオチド配列を示す。

【図14】sigptdIPAAA26841s-6Hisのヌクレオチド配列を示す。

【図15】仮説的タンパク質（NP_116037）に対し配列の一部にわたって100%のマッチング、すなわち、注釈付けされる機能が存在しないことを示している、INSP035ポリペプチド（配列番号：2）のNCBI-NRの結果を示す。NP_116037とp17257とのアラインメントも示されている。

【図16】INSP035ポリペプチド（配列番号：2）についてのNCBI-month-aa/NCBI-month-ntの結果を示す。

40

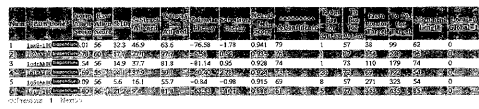
【図17】INSP035ポリペプチド（配列番号：2）についてのNCBI-ntの結果を示す。

【図18】INSP035ポリペプチド（配列番号：2）についてのNCBI-estの結果を示す。

【図 1】

Figure 1

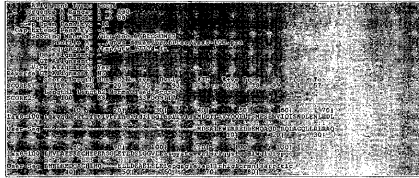
Genome Threader results – Energy Scores



【図 2】

Figure 2

Alignment



【図 3】

INSP035 (IPAA26841)の予想されるヌクレオチド配列 (翻訳付き)

```

1  CACACACCA  TCTGCTCACT  CACCCTGGCA  CATTGAGCCC  CCTTAACCCA  CTTTGAACAT
61  TGACCAACAC  ACACCTCCCTG  GCACGCTCTT  CTCACCTTCA  ACTTCTGCCA  CCTTCCCTTG
121  GGCAATACCTG  CCAGCCTTTC  CTAATCTCA  GAGTGCAGC  CCGCCTGTGT  CACTCACCTG
181  AAACCTGGCA  TCTCCCTGGG  GCTACTGAAA  TTCCAGGCAG  TGGGTGAAGA  GGACGAGGAG
241  GATGAGGAGG  GGSAGAGCCT  GACTCTGTG  AAGGCACTGA  CAGCCAGCT  GCAGCTGCAG
301  ACTCGGCGGC  CTTCAATATCT  GGAGTGGACA  GCCAGGTCC  AGAGCGCAGG  CTGGCGCAGG
361  GCCCAAGCCA  AACCTGGACC  AGGGGGACCT  GGGGACATCT  GTGTTTCGA  CTCATGGAC
421  TCCGCCCTTG  AGTGGCTCCG  ACGGGAGCTG  CGGGAGATGC  AGGCGCAGGA  CAGGCGAGTG
481  GCAGGCGCAG  TGTGCGGCT  GCGGGCCAG  CTGCACCGAC  TGAAGATGGA  CCAAGCCTGT
541  CACCTGCACC  AGGAGCTGCT  GGATGAGGCC  GAGCTGGAGC  TGGAGCTGGA  GCCCGGGGCC
601  GGCCTAGCCC  TGGCCCCGCT  GCTGCGGCAC  CTGGGCTCA  CGCGCATGAA  CATCAGCGCC
661  CGGCGCTTCA  CCCTCTGCTG  AGGAACACCT  GTGCCCCCG  ACTCCCGCC  CCTCTCCCA
721  ATGCGGCTTC  CCTGCTGCTG  CTGGGAGAG  GAGAGGAGG  GGTGCCCGAC  AGGCACGAG
781  TCCTGGCGGG  GGAGGAGGAA  CATTGAGCTT  TCTGAGAGCT  GAATCCCAAG  AOTGCAAAAC
841  CCGACATCC  TGTTCCTCT  GCTGACCCAG  CTGGGAGGAG  GAGGAGGAG  AGCTCACACC
901  CTCAACTCC  TCAATAAAC  CTTTCTCTG  TTCCC

```

PCR primers の位置および方向

【図 4】

プライマー 26841-CP1 および 26841-CP2 を用いてクローニングされた PCR 産物のヌクレオチド配列 (翻訳付き)

```

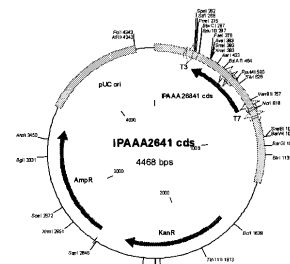
1  CACCTCAAAC  CTGCCATGTC  CCTGGGGCTA  CTGAATTC  AGGCACTGGG  TGAAGAGGAC
61  GAGGAGGATG  AGGAGGGGGA  GAGCCTGGAC  TCTGTGAAG  CACTGACAGC  CAAGCTGCAG
121  CTGCAGACTC  GGGCGCCCTC  ATATCTGGAG  TGGACAGCCC  AGGTCCAGAG  CCAGGCTGG
181  CGCAGGGCCC  AAGCCAAACC  TGGACAGGG  GAGCTGGGG  ACATCTGTGG  TTTGACTCA
241  ATGGAATCCG  CCCTTGAGTG  GCTCCGAGG  GAGCTGCGGG  AGATGACAGG  GCAGGACAGG
301  CAGCTGGCAC  GGCAGCTGCT  GCGGCTGCGG  GCCAGCTGC  ACCGACTGAA  GATGGACCAA
361  GCTGTGACC  TGCACAGGA  GCTGCTGGAT  GAGGCGGAGC  TGGAGCTGGA  GCTGGAGGCC
421  GGGGCGGGCC  TAGCCCTGGC  CCGCTGCTG  CGGACCTGG  GCCTCAGGCG  CATGAACATC
481  AGCGCCCGGC  GCTTCACCTT  CTGCTGAGGA  A

```

【図 5】

pCR4 blunt-TOPO-IPAA26841 のマップ

分子:	IPAA26841 eds,	4468 bps	DNA 環状
ファイル名:	12130[1].cm5		
分子の特徴:			
型	開始	終点	名称
領域	2	216	lac プロモーター部位
領域	206	221	M13 リバースプライミング部位
領域	217	294	LacZa-codB 遺伝子融合 ¹
マーカー	243		T3
領域	262	294	ポリリンカー ¹
領域	294	294	TOPO クローニング部位 ¹
マーカー	523		C 推定 ATG 開始コドン
マーカー	565		C 推定 ATG 開始コドン
マーカー	790		C 推定 ATG 開始コドン
遺伝子	790	294 C	IPAA26841 eds
領域	805	295 C	挿入 PCR 産物 26842_19_2
領域	806	1321	¹ LacZa-codB 遺伝子融合
領域	806	823	¹ ポリリンカー
領域	806	806	¹ TOPO クローニング部位
マーカー	858		C T7
領域	881	866 C	~20M13 フォワードプライミング部位
遺伝子	1670	2464	KanR
領域	2656	2660	リボソーム結合部位
遺伝子	2668	3528	AmpR
領域	3673	4346	pUC ori



【図 6】

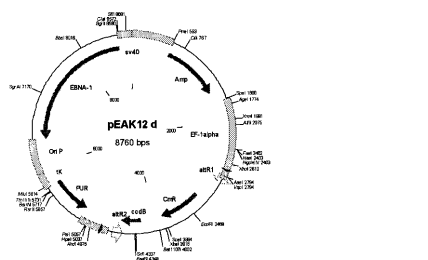
発現ベクター pEAK12d のマップ

分子: pEAK12 d, 8760 bps DNA 環状
ファイル名: pEAK12DEST.cm5

説明: 哺乳動物発現ベクタープラスミド(プラスミド ID 11345)

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	Amp	
領域	1690	2795	EF-1alpha	
領域	2703	2722		pEAK12F プライマーの位置
領域	2796	2845		MCS
マーカー	2855		attR1	
遺伝子	3256	3915	CmR	
遺伝子	4257	4562	ccdB	
マーカー	4603		C attR2	
領域	4733	4733		MCS
領域	4734	5162		ポリ A/スプライシング
領域	4819	4848	C	pEAK12R プライマーの位置
遺伝子	5781	5163	C PUR	ピュロマイシン
領域	6005	5782	C tK	tK プロモーター
領域	6500	6006	C Ori P	
遺伝子	8552	6500	C EBNA-1	
領域	8553	8752	sv40	



【図 7】

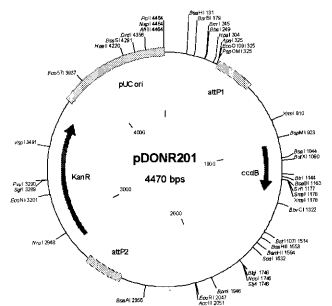
ゲートウェイ・ベクター pDONR201 のマップ

分子: pDONR201, 4470 bps DNA 環状
ファイル名: pDONR201.cm5

説明: ゲートウェイ エントリーベクター (Invitrogen)- プラスミド ID# 13309

分子の特徴:

型	開始	終了	名称
領域	332	563	attP1
遺伝子	959	1264	ccdB
領域	2513	2744	attP2
遺伝子	2868	3677	KanR
領域	3794	4467	pUC ori



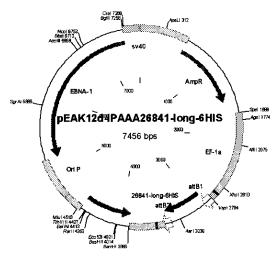
【図 8】

pEAK12d-IPAAA26841-long-6HIS のマップ

分子: pEAK12d-IPAAA26841-long-6HIS, 7456 bps DNA 環状
ファイル名: 12148[1].cm5

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	AmpR	
領域	1690	2795	EF-1a	
領域	2702	2722		pEAK12F
マーカー	2855		attB1	
遺伝子	2888	3394	26841-long-6HIS	
マーカー	3410		attB2	
領域	3430	3858		ポリ A/スプライシング
領域	3544	3825	C	pEAK12R
遺伝子	4477	3859	C	PurR
領域	4701	4478	C	tK プロモーター
領域	5196	4702	C Ori P	
遺伝子	7248	5196	C EBNA-1	
領域	7249	7448	sv40	



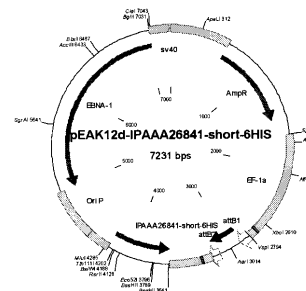
【図 9】

プラスミド pEAK12d-IPAAA26841-short-6HIS のマップ

分子: pEAK12d-IPAAA26841-short-6HIS, 7231 bps DNA 環状
ファイル名: 12686[1].cm5

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	AmpR	
領域	1690	2795	EF-1a	
領域	2703	2722		pEAK12F
マーカー	2855		attB1	
遺伝子	2888	3169	IPAAA26841-short-6HIS	
マーカー	3185		attB2	
領域	3205	3633		ポリ A/スプライシング
領域	3319	3300	C	pEAK12R
遺伝子	4252	3634	C	PurR
領域	4476	4253	C	tK プロモーター
領域	4971	4477	C Ori P	
遺伝子	7023	4971	C EBNA-1	
領域	7024	7223	sv40	



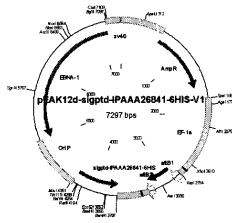
【図 10】

プラスミド pEAK12s-sigptd-IPAAA26841-short のマップ

分子: pEAK12d-sigptd-IPAAA26841-6HIS-V1, 7297 bps DNA 環状
ファイル名: 12737[1].cm5

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	AmpR	
領域	1690	2795	EF-1a	
領域	2703	2722		pEAK12F
マーカー	2855		attB1	
遺伝子	2888	3235	sigptd-IPAAA26841-6HIS	
マーカー	3251		attB2	
領域	3271	3699		ポリ A/スプライシング
領域	3385	3386	C	pEAK12R
遺伝子	4318	3700	C	PurR
領域	4542	4319	C	tK プロモーター
領域	5037	4543	C Ori P	
遺伝子	7089	5037	C EBNA-1	
領域	7090	7289	sv40	



【図 11】

Figure 11

PCR4 TOPO IPAAA26841

```
1 AGGCGCCCAAT ACGCAAAACG CCTCTCCCGC CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTGGC
61 ACGCAGCGTT TCCGCACTGG AAGCGCGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAT GTGAGTATGC
121 TCACCTCATTA GGCACCCGAG GCTTACACTT TTATGCTTCC GGCTCGTAIG TTGTGTGGAA
181 TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCAATGATTAC GCCAAGCTCA
241 GAATTAAACC TCACATAAGG GACTAGTCTT GCAGGTTTAA ADGAATTCGC CTTTTCCTCT
301 AGCAGAGGGT GAAGCGCGGG GCGCTGATGT TCATCGCGGT GAGGCCGAGG TGCCGAGACA
361 GCGGGGCGAG GGCATAGGCG GCGCGGGGCT CCAGCTCCAG CTCGAGCTCG GCTCATCCA
421 CGAGCTCCTG GTGACAGTGA CAGGCTTGGT CCATCTTTCG TCGTGTGAGC TGGGCCGCGA
481 GCGGCAAGCA CTGCGCTGCC AGCTGCCCTT CCGCGCGCTG CATCTCCCGC AGCTCCCGTC
541 GGAGCAACTC AAGGGCGGAG TCATTAGATG CGAAACACCA GATGTCCCCA GGTCCCGCTG
601 GTCCAGGTTT GCGTTGGGCC CTCGCGCAGG CCGCTGCTCG GACCTGGGCT GTCCACTCCA
661 GATATGAGGG CCGCGAGTGT TGCAGCTGCA GCTTGGCTGT CAGTGGCTTC ACAGAGTCCA
721 GGCCTCCTCC CCGCTCATCG TCCTGCTCCT CTTACCCGAC TGCTTGGAT TTGAGTAGGC
781 CGAGGACATG GCGAGGTTTG AGGTCAAGGG CGAATTCGCG GCGGCTAAAT TCAATTCGCG
841 CTATAGTGA TCGTATTACA ATTCACTGGC CGTCTTTTAA CAAGCTCGTG ACTGGGAAAA
901 CCGTGGCGTT ACCCAACTTA ATCGCTTTC AGCACATCCC CTTTGGCA CGTGGCGTAA
961 TAGCGAAGAG GCGCGACGCG ATCGCGCTTC CCAAGCTTTC GCGAGCTAT ACCTACGCGA
1021 GTTTAAGGTT TACACCTATA AAGAGAGAG CCGTTATCGT CTGTTTGGG ATGTACAGAG
1081 TGAATTATT GACACGCGCG GCGGACGGAT GGTGATCCC CTGGCCAGTG CAGCTCTGCT
1141 GTCAGATAA GTCTCCCGTG AACTTTACCC GGTGGTGAT ATCGGGGATG AAGGCTGGCG
1201 CATGATGACC ACCGATATGG CAGTGTGCC GGTCTCGGTT ATCGGGGAG AAGTGGCTGA
1261 TCTAGCGCAC CGCGAAATG ACATCAAAA CGCCATTAC CTGATGCTTC GGGGAATATA
1321 AATGTCAGCG ATGAGATTAT CAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTCA CGTAGAAGCG
1381 CAGTCCGCGA AAGCGGTGCT GACCCCGGAT GAATGTGAG TACTGGGCTA TCTGACAAAG
1441 GGAAAGCGCA AGCGCAAGAG GAAGCAGGT AGCTTCCAGT GCGCTTACAT GCGCAGTAGT
1501 AGACTGGGCG GTTTTATGGA CAGCAAGCGA ACGGATATG CCAGCTGGGG GCGGCTCTGG
1561 TAAGGTTGGG AAGCGCTGCA AAGTAACTG GATGGCTTTC TGCGCGCCAA GGTATCTGAT
1621 GCGCAGGGGA TCAGCTCTG ATCAGAGAG ACAGTAGAGA TCGTTTTCGA GTGATGAGCA
1681 AGATGAGATT CACCGAGGTT TCCCGCGCG TTGGGTGAG AGGCTATTTC GCTATGACTG
1741 GGCACACAG ACAATGGCT GCTCTGATCG CGCGGTGTT CCGGCTGTC GCGAGGGGCG
1801 CCGGTTCTT TTTGTCAAGA CGAGCTGTG CGGTGCGCTG AATGAACCT AGACGAGGCG
1861 AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG CCACAGCGGG CGTTCCTTGC CGAGCTGTGC TCGAGCTGT
1921 CACTGAAGCG GGAAGGGACT GCGTCTGATT GCGCGAAGTG CCGCGGCGAG ATCTCCTGTC
```

【図 12】

Figure 12

pEAK12D-IPAAA26841long-6HIS

```
1 GCGCTAATCT GCTGCTGCA AACAACAAA CACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCG
61 GATCAGAGAG TACCAACTCT TTTTCCGAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCGATACCCA
121 AATACTGTC TTCTAGTGA GCGTAGTGA GCGCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCAGCG
181 CCTACATACC TCGCTCTGCT GAAGCAGATT ACCAGTGGCT GTCGCAAGT GCGATAGGTC
241 GTGCTTACC GGGTTGAGCT CAGAGATAG ATACCGGATA AGGCGGAGCG GTGCGGCTGA
301 ACGGGGGGTT CGTGCACACA GCGCGCTGTC GAGCGAAGCA CTAACACCGA ACTGAGATAC
361 CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCGAGC CTTCGCGAG GGAGAAAGCG GGACAGGAT
421 CCGGTAAAGC GCAGGCTCGG ACAGGAAAG CCGCAGAGGG AGCTTCCAG GGGAAACGCC
481 TGGTATCTTT ATAGTCTGT GGGGTTTGG CAGCTCTGAG TTGAGCGCTG ATTTTGTGGA
541 TGCTGTGTCG GGGGCGGAGG CCGTAGGAAA ACGCCAGCA AGCAAGCTA GAGTTTAAAC
601 TTGACAGATG AGACAATAAC CCGTATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAAGATAT
661 GAGTATTCAA CATTTCCGTC TGCGGCTTAT TCCCTTTTT GCGGCAATTT GCGTTCCTGT
721 TTTTGTCTAC CCAGAAACGC TGGTGAAGT AAAAGATGCA GAAGATCACT TGGGTGCGGG
781 AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGTAAAGACT CTGAGAGTT TCGCGCCGCA
841 AGAAGCTTTC CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGGCGGG TATTATCCCG
901 TATTGATGCC GGGCAAGAGC AACTGCTGTC CCGCATACAC TATTTCTAGA ATGACTTGGT
961 TGAATACTCA CCAGTCAAGC AAGAGCATCT TAAGGATGCG ATGACAGTAA GAGAAATATG
1021 CAGTCTGCGC ATACCATGTA GTGATTAACG TCGGGCCAAC TTACTCTGTA CAACTATCGG
1081 AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTGA CAACATGGGG GATCATGTAA CCGGCTTGA
1141 TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAGCGCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC
1201 TGTAGCAATG GCAACAAGCT TGGGAAACT ATTAAGTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
1261 CCGGCACCAA CTAATAGACT GGAATGAGGC GGAATAAGTT GCGAGAACAC TTCTGCGCTC
1321 GGCATCTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCAGGA GCGGCTGAGC GTGGGCTCAG
1381 CGGTATCATT GAGCACTGG GCGCGGATGG TAAAGCCCTC CGTATCGTAG TTACTACAC
1441 TACGGGGAGT CAGGCACTGA TGAATGAGC AATATGACAG ATCGCTGAGA TAGTGGCTC
1501 ACTGATTAAG CATTTGTAAG GATAAATTC TGGTAAGGAG GACACGATG GAGTGGGCA
1561 AGTTGGGGAA CCGGTATCCG TTGCTGAATC TGGCATATGT GGAAGATATA GAGCGCGAGC
1621 GTGCGATCAG GCATTTTTTT TCGCGCAAT GTCAAAAGGC CATCCGCTAG GATGGCTTTT
1681 CCGCATAACT AGTAGAGCTC CGTGGCGGCT CAGTGGGAGC AGCGACATC GCCACAGCTC
1741 CCGGAGAGT TGGGGGAGG GGTGGCGAAT TGAACCGGTG CTAAGAGAG GTGGGGGCGG
1801 GTAAACTGGG AAGTGTATCT CGTGTACTGG CTCGCCCTTT TTCCGCGAGG TGGGGAGGAA
1861 CCGTATATAA GTGACAGACT CCGCTGAGAC GTTCTTTTTC GCAACGGGTT CCGCGCAGGA
1921 ACACAGAGTAA GTGCCGCTG TGTTTCCCG GCGCGTGGCG TGTTTGGGCT
```

```
4141 GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC AAGAGGGAGC TTCCAGGGGG AAACGCTGG
4201 TATCTTTATA GTGCTGTGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGGCTGATTT TTGTGATGCG
4261 TGTCGAGGGG GCGGAGCGCT ATGGAAGAAC GCGAGCAAGC CGGCTTTTT ACGGTTCTCG
4321 GCGCTTTGCT GCGCTTTTGC TCACATGTTC TTCTCTGCGT TATCCCGTGA TTCTGTGGAT
4381 AACCOTATTA CCGCTTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTGCGC GCAGCGGAAC GACCGAGGCG
4441 AGCCAGTCTAG TGAGCGAGGA AGCGGAGG
```

1981 TGCGTGCCCT GAATTAATCT CACCTGSGCT CAGTACGTGA TTTGTGATCC CGAGCTCGG
2041 GTTGGAAGTG GGTGGAGAGG TTGCGAGGCT TGCGCTTAAG GAGCCCTCTC GCGTCTGACT
2101 TGAGTTGAGG CCGTGCCCTG GCGCTGSGGC CGCGCGCTGC GAATCTGGTG GCACCTTCGG
2161 GCGCTGCTCG CTGCTTTGGA TAAGTCTCTA GCGATTTAAA ATTTTGTGATG ACCTGCTGCG
2221 ACCGCTTTTT TCGCGAAGA TAGTCTTTGA AATGCGGGCC AAGACGATCT GCACATCTGT
2281 ATTTGCGTTT TTGGGCGCG GGGCGGCGAC GGGCGCGGTG GCTCCAGCG CACATCGATG
2341 TTGCGGAGGG GGGGCGCTCG GAGCGCGGCC ACGAGAAATC GGACGGGGGT AGTCTCAAGC
2401 TGCGCGGCGT GCTCTGGTGC CTGCGCTCGC CGCGCGCTGT ATCGCGCGCG CTGCGCGCGC
2461 AAGGCTGGGA GCTCAAAATG GAGGAGCGCG CGCTGGGGAG AGCGGCGCGG TGAGTCAACC
2521 ACACAAAGGA AAGGGGCTT TCGCTCTCA GCGCGTGGTT CATGTGACTC CAGCGAGTAC
2581 CGGCGCGGCT CGAGGCACCT GATTTAGTTC TCGAGCTTTT GGAGTACGTC GTCTTTAGGT
2641 TGCGGGGAGG GGTTTTATGC TAGTGAGTTT CCCCACACTG AGTGGGTGGA GACTGAAGTT
2701 AGCGACGCTT GGCACCTTGT GTAAATCTCT TTGGAATTTG CCGTTTITGA GTTTGGATCT
2761 TGGTTCAATC TCAGCGCTCA GACAGTGGTT CAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACT
2821 TCTTTCTCCC ATTTGAGGTC TCGTAAGCTA TCAAACTAGT TTGTACAAA AAGCAGGCTT
2881 CGCCACCATG TCCCTGGGCG TACTGAATTT CCAGCGAGTG GGTGAAGAGG ACGAGAGGA
2941 TGAGGAGGGG GAGAGCGCTG ACTCTGTGAA GGCAGTGACA GCGAAGCTGC AGCTGCAGAC
3001 TCGCGCGGCG TCATATCTGC AGTGAGACAG CCAGGCTCCAG AGCCAGGCGT CGCGCAGGCG
3061 CCAAGCGAAA CCGTGACAG GGGGACCTGG GGACATCTGT GGTTTGACT CAATGGACTC
3121 CGCGCTTGGC TGCGTCCGAC GGGAGCTGCG GGAGATGCGAG GCGCAGGACA GGCAGCTGGC
3181 ACGGAGCGTG TCGCGCTCG GGGCGCTGCT GACCGAGCTG AAGATGGACC AAGCCTGTCA
3241 CTTGACCCAG GAGCTGTGCG ATGAGGCGGA GCTGGAGCTG GAGCTGAGCG CGGCGGCGCG
3301 CTTAGCCCTG GCGCGGCTCG TGCGGCACTT GGGCGCTCAG CGCATGAACA TCAGCGCCCG
3361 GCGCTTCAAC CTTGCGCAC ATCAGCATCA CCATTGAAC CCAGCTTTCT TGTACAAAGT
3421 GGTTCGATG CGCGAGGTA GCGAGCTGCG GCGTGGCGCT CCAGCTCAAG GCGGACAGG
3481 TGCGCTAAGT TAGCTGTGAT TCGAGGACAG GCGCGAGCG GGTGCTGACA CPTCCAGCTC
3541 CATCTCTTCC TCAGGTGCG CGGCGTGACA TCCCTGTGAC CCGTCCCGAG TGCGTCTCTC
3601 GGTCTGTGAA GGTGCTACTC CAGTGCCCAT CAGGCTTGTC CTAATAAAT TAAGTTGCTAT
3661 CATTTTGTTT GACTAGGTGT CCTGTATATA TATTATGGGG TGGAGCGGG TGTATGAGAG
3721 CACGCGGCGC AAGTTAATCT GTTATATTGA GCTTATATAG GTTACAAATA AAGCAATAGC
3781 ATCACAAAAT TCACAAATA AGCATTTTTT TCAGTGCATT CTAGTTGTGG TTGTGCAAAA
3841 CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC CGCTCAGGC ACCGGGCTTG CGGCTCATCG
3901 ACCAGGTGCG CGGTCTCTCG GGCAGCTCGA CGTGGCGGCT GAGCGTCAAG CCGAGCGCGT
3961 COTAGAACGG GAGTTGCGG GCGCGGAGG TCTCCAGAAA GCGCGGCAAC CGCGCGGCGT
4021 CGCGCGGCTC CATCTCGGGG AGCAGCAGGG CGCTGCCAG ACCCTTGCCC TGCTGTGCG
4081 GCGAGCGCG GAGGTGCGC AGCAACCGG CGGCGTCTCT GCGCGGTGCG GCGCGCAGGA

4141 GGCCTTCCAT CTGTTGCTGC GGGCGAGCC TGAACCGCT CAACCTGGCC ATGCGGGGCG
4201 CGATCTCGGC GAACACCGCC CCGCTTTCGA CCGCTTCGG CCGGCTCCAG ACCGCGACCG
4261 CGGGCGGCTC GTCCGCGACC CACACCTTGC CGATGTCGAG CCGCAGCGCG GTGAGGAAGA
4321 GTTCTTGCGC CTCGCTGACC CCGCTGATGT GCGCGTCCGG GTCGACGGTG TGCGCGGTGG
4381 CGGGGTAGTC GCGGAGCGCG GCGCGAGGGG TGCGTACGGC CCGGGGAGCG TGCTGCGGGG
4441 TGGCGAGGCG CACCGTGGGC TTGTACTCGG TCATGCTGGC CTGAGAGTCC GCTCTGTGTT
4501 CGAGGCCACA CGCGTCACTT TAATATGCGA AGTGAGCTCG GGACCGCGCC GCGCGAGCTG
4561 CATCTGCGTG TTTTGGCGAA TGACAGAGCG CTGGGCGGGG TTGTGTCTAT CTAAGAATA
4621 AAGACATGCA AATATATTTT TTCCGGGAGC ACGCGCAGCA ACGCGCAGCA ACGGCGCAGG
4681 GGGATGAGC AGCTGGGCCA CTCCCTGAAG ATCCGCTTGA TTAACCTTAA ACGGCTAGCA
4741 TATGCTTCCC GGGTAGTAGT ATATACTATC CAGACTAACC CTAATTCAT AGCATATGTT
4801 ACCAAGCGGG AAGCATATGC TATCGAATTA GGGTTAGTAA AAGGTCCTTA AGGAACAGCG
4861 ATCTGGATAG CATATGCTAT CTAATCTAT CTTGGGTAG CATATGCTAT CTAATCTAT
4921 ATCTGGTAG CATAGGCTAT CTAATCTAT ATCTGGTAG CATATGCTAT CTAATCTAT
4981 ATCTGGTAG TATATGCTAT CTAATTTTAT ATCTGGTAG CATAGGCTAT CTAATCTAT
5041 ATCTGGTAG CATATGCTAT CTAATCTAT ATCTGGTAG TATATGCTAT CTAATCTAT
5101 ATCCGGTAG CATATGCTAT CTAATGCTAT ATACAGCTAG CATATGCTAT CTAATCTAT
5161 AGTGCGAGTG CTATCCTTTG CATATGCGCG CACCTCCCAA GGAGATCCCG ATGCTGTGAT
5221 GCTCACCGAG TAAATGTGCG TATGTTTTTC CAACCGGAGA AGCTGTGAG CCGCGAGCTG
5281 AGTGAAGTGA CAACATGGGT ATGCCAATT GCGCCATGTT GGGAGGAGCA AAGTGTGAG
5341 AAGACAGATG GCGAGAAATA CACCAAGAGC ACGCATGATC TCTATGGGG ATTATTTCTT
5401 TAGTGCGGGG GAATACAGCG CTTTAAATAC GATTGAGGCG GTCTCTTAAC AAGTACATC
5461 ACTCCTGCCC TTCTCTACCC CATCTCCAT CACCTCCTTC ATCTCGTCA TCTCGGCTAT
5521 CACCTCCCGC GCGAGCGGCT TCCACATAG GTGGAACCA GGGAGGCAAA TCTACTCAT
5581 CGTCAAAAGT GCACAGCTG ACCCTGATAT TCGAGGTAG AGCGGCTTT GTCATAACA
5641 GGTCCCTAAT CGCATCCTTC AAACCTCCAG CAAATATAG ATTGTTAAA AAGACCATGA
5701 AATAACAGAC AATGAGATCC CTAGCGGGC CAGGTTGTGG GCGGGTCCA GGGGCAATC
5761 CAAAGGGGAG ACGACTCAAT GGTGAAGAG CACATTTGAG AATAGCAGG CAGGTTCTC
5821 GCGTTAGGTT TAAAGGGAG GTCTACTAC CTCATATAC GAACACAGCG GCGAGCCAGG
5881 TTCTCTGCT GGTAGCTCT TCTAGTGCAC TCTTAGCCAG GAGAGCTCTT AAACCTTCTG
5941 CAATGTTCTC AATTTTGGG TTGGAACCTC CTTGACACAG ATGTTTCCA AACCACTC
6001 CTTTTTGGC CCGCTCCCA TCACCTGAG CCGCGGCTCC AGTCTTGGG CTTCTCTCTG
6061 GGTACTCTCG GGGCGGCTCG TCTATGCTC CCGGGGCGAC CTCAGGCTCA CCACTCGGCG
6121 CACCTCTCTG GTGCTATTCA AATATGCGG CTTCGCTTAC AGGTTGGA AATGCGCTC
6181 TAAGTGGAG GCGGCTGCGC GGTGAGAGC CGGATGAGA TGAATGACTA CTGAGGCTC
6241 TGGGCTCTT TTCTCCAGT CCACGAGCT TCCCGCTGG TCTTCAAGA CTTCGCCCG

6301 TGCTCTTCT AGTCTCTTA CCGCGGCGC CTCACATACC TCGTGAGCC CGGCTCCAC
6361 TACCTCTCTG ACCCGGGCT CCACCTGCTC CTCGAGCCCG GCGTCCGCA CTCTCTCCAG
6421 CCGCAGGACC TCACCGAGCC CGAGCTCCCG CAGCTCCAGC CCGACAGCA CAGCGCCCTC
6481 CAGCGCCACC AGCGCCAGCC CCGCGGAGC CTCTCCAGC CCGAGGACT CCGACGCGC
6541 CAGCTCCCC AGCTCCAGCC CCGACAGCC CAGCGGCTCC AGCGCCACA GCGCGAGCC
6601 CTCTGTCTC ACCGTGGGTC CTTTTGAGC CAATGCAACT TGGAGCTTTT TGGGCTCTC
6661 GACACCATC TCTATGCTT GCGGCTGATC CTGAGCGGCG CGGGGCTCCT GGTCTCCCG
6721 CTCTGTCTC TGCTGCTCT CCGGCTCTC GTGAGGCTT ATCAGCGGCT CTCTTTGAG
6781 GTCACTGCG GCGGAGGCT TCTGCTCAG ATGCTCTC CTCTCTCTC AGCGCAATTC
6841 CAGGCTCTCT ACCTGGGCGC TCGTAGACA TGAATGACG TAAAGAGAT GAATAGACAT
6901 CTTTATFAGA CGAGCTCAG TGAATACAGG GAGTGAGAG TCGTGGGCG TCACAGAGC
6961 CCGCCACCT CATCGGCTC ATGCTGCTG TCAGACAGAT CCGAGCTCA AATTTCCCA
7021 TCGTGGAGC CATCTGCTC CTGATCACA ATTAATGCG GCGCGGAAA CTCCGCTGA
7081 ACATCTCAA GATTTGCTC CTGAGCTCA AGCAGGCT CAAATGCTC CTCCGCTTT
7141 TGCTGGAGG GTAGGATGG GATTTCTCG GAGCGGCTCT CTCTCTCTC AAGTCAACA
7201 GACAGAGATG CTACTGGGCG AAGCGAAGAA AAGCTGGGTG CGGCTGTGA AGCTAAGAT
7261 TGTGACATC GATGGGCGG GGTGTACAT CCGCGGCTC CCGGCTAAC TCGGCGAGT
7321 TCGGCGCAT CTGCGCTCA TGGTACTA ATTTTITTA TTATGCGAG GCGCGAGGCG
7381 GCGTGGGCT CTGAGCTAT CCGAGATAG TAGGAGGCT TTTTGGAGG CTAAGGCTTT
7441 TGCAAAAGC TAATTC

【 1 3 】

Figure 13

pEAK12D IPAAA26841s-6His

1 GCGTAATCT GCTGCTGCA AACAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGT TTGTTGCGG
61 GATCAGAGC TACCACTCT TTTTCGAGG GTAACTGGT TCAGCAGAG CAGAGATCCA
121 AATACTGTCC TTCTAGTGA CCGTAGTGA GCGCAGCAT TCAGAGATC TGTAGACCG
181 CCGACATACC TGCTGTGCT GAAGCGAGT ACAGATGGCT GTCGCGAGT GCGATAGTC
241 GTGCTTACC GGGTGAAGT CAAGAGATAG TTACCGGATA AGCGCAGCG GTGCGGCTGA
301 ACGGGGGGTT CCGTGACACA GCGCAGCTG GAGCGAAGA CCGACACCA ACTGAGATC
361 CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGGAGC CTTCCGAGG GGAGAAAGG GAGAGGATAT
421 CGGTAGAGC GAGGCTCGG AACGAGAGG CCGACAGAGG AGCTCCAGG GGGAAAGCG
481 TGATATCTTT ATAGTCTGT GGGGTTTCC CACTCTGAC TTGAGCGTGT ATTTTGTGA
541 TGCTGTGAG GGGGGGAG CCGTATGAAA AACCGCAGCA ACGGAGCTA GAGTTAAAC
601 TTGACAGATG AGACAATAAC CCGTATAAAT GCTTCAATA TATTGAAAA GGAAGAGTAT
661 GAGTATCAA CATTTGCTG TGCGGCTTAT TCGGCTTTT GCGGCAATTT GCGTCTGCT
721 TTTTGTGAC CCGAAGAGC TGCTGAAGT AAAGATGCA GAAGATCAT TGGTGGCGG
781 AGTGGTTAC ATCGAAGTG ATCTCAAGC CGGTAGATC CTTGAGAGT TTGCGGCGG
841 AGAAGCTTTC CCAATGATG GCACCTTTAA AGTCTGCTA TGTGCGGCG TATTATCCG
901 TATTGATGCC GGGCAGAGC AACTGGTGC CCGCATACAC TATTCTAGA ATGACTGGT
961 TGAATACTCA CCACTCAGC AAAAGCATCT TACGAGTGC ATGACAGTAA GACATTTATG
1021 CAGTGTGCG ATAACTACG GTGATACAC TCGCGGCAAC TTACTTCTGA CAATATCTG
1081 AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTGA CACATGGGG GATCATGTA CTCGCTTGA
1141 TCGTTGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCAT ACCAAGGAG CAGCGTACA CCGATGCGC
1201 TGAGCAATG CAGCAAGCT TCGGAAGCT ATTAATGCG GAACACTTA CTCAGCTTC
1261 CCGGCAACAA CTAATAGACT GAGTGAGGC GATAAAGTT GCGAGGACG TTCTGCGCTC
1321 GGCATTCGG GCTGGCTGTT TTATTGCTGA TAATCAGGA GCGGCTGAG GTGGGTGAG
1381 CGATATCAT GCAGCACTG GGGCGGAGG TAAGCGGCTC CGATCTGAG TTATCTACAC
1441 TAGGGGAGT CAGGCACTG TGGATGAAG AATAGACAG CAGCGTACA CCGATGCGC
1501 ACTGATTAAG CATTTGTAAG GATAAATTC TGTAAGGAG GACAGCTATG GAAGTGGCA
1561 AGTTGGGAA GCGCTATCG TTGCTGAAT TGGCATATG GGGAGTAA GACGCGGAGC
1621 GTGCGATCAG GCATTTTTTT TCGCGCAAT GCAAAAGGCG CATCGCTGAG GATGCGCTT
1681 CGCATTAAT AGTAGGCTC CGGTGCGGT CAGTGGGAG ACGGACATC GCGCAGCTC
1741 CCGAGAGAGT TGGGGGAGG GTGCGGCAAT TGAACGCGT CCGAGAGAG GTGGCGGCG
1801 GTAACTGGG AAGGTGATG CGTGTACTG CTCGCGCTT TTCCGAGGG TGGGGAGAA
1861 CCGTATATA GTGAGTAGT CCGCGTGAAC GTTCTTTTC GCGAGGGTT TGCGCGGAG
1921 ACACAGGTA GTCCGCTG TGTTCCCGC GGGCTGGGCT TCTTTACGG TTATGGGCT

1981 TGCGTGCCTT GAATTACTTC CACCTGGCTG CAGTACGTGA TTCTTGATCC CGAGCTTCGG
2041 GTTGGAACTG GGTGGAGAG TTGAGGCTT TGCGCTTAAG GAGCGCCTTC GCTCTGTGCT
2101 TGAGTTGAGG CTTGGCTGG GGGCTGGGG CGCGCGGTGC GAATCTGGTG GCACCTTCGG
2161 GCTGTCTCG CTACTTTCTG TAAGTCTCTA GCATTTTAAA ATTTTGTATG ACCTGCTGGC
2221 ACGGTTTTTT TCTGGCAGA TAGTCTGTGA AATCGGGGCC AAGACGATCT GCACACTGGT
2281 ATTTGGGTTT TTGGGGCCGG GGGCGGCGAC GGGGCCCGTG GGTCCAGGCG CACATGCAATG
2341 TTGCGGAGG GGGGGCTTGC GAGCGCGGCC ACCGAGAATC GAGCGGGGT ATCTCTAAGC
2401 TGCGCGGCTT GCTCTGGTG CTGGGCTGCG GCGCGCGGT ATCGCGCGGG CTTGGGGGGG
2461 AAGGCTGGGA GCTCAAAATG GAGGACGCGG GCTCGGGAG ACGGGGGGGG TGAGTCAACC
2521 ACACAAAGGA AAGGCGCTT TCCGCTCTCA GCGCTGCGTT CATGTGACTC CAAGGAGTAC
2581 CGGGCGCGGT CCAGGCACTT CGATTAGTTC TGAGGCTTTT GAGGTACGTC GTCTTTAGGT
2641 TGGGGGAGG GGTTTTATGC GATGGAGTTT CCGCACACTG AGTGGTSSA GACTGAAGTT
2701 AGCGCAGCTT GGCATCTGAT GTAAITCTCC TTGGAATTTG CCGTTTTTGA GTTTGGATCT
2761 TGSTTCATTC TCAGGCTCA GAGAGTGGTT CAATTAATA CAGTCACTA TAGGGAGACT
2821 TCTTTCTGCC ATTTTCAGTG TGCTAAGCTA TCAGACAAGT TTGTACAAA AAGCAGGCTT
2881 CGCGACCATG GATCGCGCC TTGAGTGGCT CGAGCGGGAG CTGCGGGAGA TCGAGCGCA
2941 GGACAGCGAG CTGGCAGGGC AGCTGCTGCG GCTGGGGGCC CAGCTGCACC GACTGAAGAT
3001 GGACCAAGCC TGTACACTGC ACCAGGAGCT GCTGGATGAG GCGGAGCTGG AGCTGGAGCT
3061 GGAGCGCGGG GCGCGCTAG CCGTGGCGCC GCTGCTGGG CACTGGGCC TCACGCGCAT
3121 GAACATCAGC GCGCGCGCTT TCACCGCTTG CCACCATCAC CATCAACATT GAAACCCAGC
3181 TTTCTTGTAC AAGTGGTCTT GATGGCGCA GGTAAAGCAG CCAGGCGCTC GCGCTCCAGC
3241 TCAGCGGGG ACAGTGGCC TAGGTAGCC TGATCCAGG GACAGCGGCC AGCGGGGTGC
3301 TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCAGG TCTGCCGGG TGGCATCCCT GTGACCGCTC
3361 CCGAGTGCCT CCGTGGTTCG TGGAGCGCTT TACTCCAGTG CCACACAGCC TTGTCTTAAT
3421 AAAATTAAGT TGCATCAITT TGTTTACCTA GGTGCTCTTG TATATATATA TGGGCTGGAG
3481 GCGGCTGATA TGAGCAGG GCGCCAGGTT AACTGTGTTA TTGCACTTA TAATGTGTAC
3541 AAATAAGCA ATAGCATCAC AATTTTCACA AATAAGCAT TTTTTCACCT GCATTCAGT
3601 TGTGGTTTGT CCAAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGAATCGCTT CAGGCAACGG
3661 GCTTGGGGT CATGCACTAG GTGGCGGCTT CTTCGGGCAC CTCGAGCTGC GCGGTGACGG
3721 TGAAGCGAG CCGCTGTAG AAGGGAGGTT TCGCGGGGCC GAGGCTCTCC AGGAAGCGGG
3781 GCACCCGGCC GCGCTGGGCC GCTCCACTC CGGGGAGCAC CAGGCGCTG CCGAGACCTC
3841 TGCCCTGGTG GTGCGCGCAG AGCGCGAGG TGCGCAGGAA CCACGCGGCC TCGTTGGGCC
3901 GGTGCGGCGC CAGGAGCGCT TCCATCTGTT GCTGGCGGCG CAGCTGGA ACGCTCAACT
3961 CGCGCATGCG GGGGCGGATC TGCGCGAACA CCGCCCGCG CTCGAGCGTG CCGCGGCTGG
4021 TCGAGACCGC CACCGCGCGC CGTGTCTGCG CGACCCACAC CTTCGCGATG TCGAGCCCGA
4081 CGCGCTGAG GAAGAGTTCT TCGAGCTCGG TGACCGCGCT GATGTGGCGG TCGCGGTCGA

4141 CGGTGTGGG CGTGGCGGG TAGTCGCGA AGCGGGGGC GAGGTCGCT ACGGCCCGGG
4201 GGACGTGCTC GCGGCTGGCG AGCGCGACCG TGGGCTTGA CTGGTCATG GTGGCTTGA
4261 GAGTGCCTCT GTGCTGAGG CCACACGGCT CACCTTATA TGGAGAGTG ACCTGGAGCC
4321 GCGCGCGCCC GACTGCATCT GGTGTTTTTC GCGATGACA AGACGCTGGG CGGGGTTGT
4381 GTCATCATAG AACTAAAGAC ATGCAATAT ATTCTTCGG GGGACACGGC CAGCAAGCG
4441 GAGCACGGG CCACGGGGG GAGCAGCTG CGCCACTGCC TGAAGATCCC CTTTATTAAC
4501 CCTAAACGGG TAGCATATGC TTCCCGGTA GTAGTATATA CTATCCAGAC TAACCTTAAT
4561 TCAATGATAT ATGTTACCA ACGGGAAGCA TATGCTATCG AATTAGGTT AGTAAAGGG
4621 TCTTAGGAA CAGCGATCTG GATAGCATAT GCTATCTTAA TCTATATCTG GTAGCATAT
4681 GCTATCCTAA TCTATATCTG GGTAGCATAG GCTATCTTAA TCTATATCTG GTAGCATAT
4741 GCTATCCTAA TCTATATCTG GGTAGTATAT GCTATCCTAA TTTATATCTG GGTAGCATAG
4801 GCTATCCTAA TCTATATCTG GGTAGCATAT GCTATCCTAA TCTATATCTG GGTAGTATAT
4861 GCTATCCTAA TCTATATCTG GGTAGCATAT GCTATCCTCA TGTATATACA GTACGATAT
4921 GATACCCAGT AGTAGAGTGG GAGTGTATC CTTTGATAT GCGGCCACCT CCCAGAGAGA
4981 TCCGATGTC TGATTGCTCA CAGGTAAAT GTGCTATATG TTTTCCAGC CAGAGAGGAG
5041 TTGAGCGGG AGCTGAGTA CGTGACAACA TGGGTATGCC CAATTGCCCC ATGTTGGGAG
5101 GACGAAATG GTGACAAGAC AGATGGCGAG AAATACCA CAACGACGA TGTGTCTAC
5161 TGGGATTTA TTCTTTAGTG CGGGGAATA CAGGCTTTT AATACGATT AGGGGCTCTC
5221 CTAACAGATT ACATCACTCC TGCGCTTCTT CACCTCATC TCCATCACTT CTTTACCTC
5281 GGTGATCTCC GTATCACTCC TCGCGGGAG CCGCTTCCAC CATAGTGTGA AACCAGGGAG
5341 GCAATCTAC TCCATGCTCA AAGTGCACA CAGTCACTCT GATATGCGA GTAGGAGCGG
5401 GCTTGTCTAT AACAAGTCC TTAATCGCAT CTTTCAAAAC CTCAGCAAT ATATGAGTTT
5461 GTAAAGAGAC CATGAATAA CAGCAATGG ACTCGCTTAG CGGGCCAGGT TGTGGCGGG
5521 GTCCAGGGG CATTCCAAAG GGGAGACGAC TCAATGGTGT AAGACGACAT TGTGGATAG
5581 CAGGGGAGT TCTCGCTCT AGTGTGAAA GGGAGGCTT ACTACTCCA TATAGAACAA
5641 CACCGGGAG CCAAGTTCTT TGCTGGTAG TCTTTCTAC GTACCTCTTA CCGAGGAGAG
5701 CTCTTAAACC TTCTGAGTG TTCTCAAAAT TCGGGTTGGA ACCTCCTTGA CCACGATGCT
5761 TTCCAAACCA CCGCTCTTTT TTGCGCGTGC CTCCATCACC CTGACCGGG GGTCCAGTGC
5821 TTGGCGCTTC TCTGGGTCA TCTGGGGGCG GCGCTCATC GCGCTCCGG CCGAGGATCG
5881 GTCACCATC TGCGCACCTT TCTTGTGCT ATTCAAATA ATCGGCTTCC CTTACAGGCT
5941 GGAAGAAAG CTTCTACCT GAGGGGGGCC TGCGGGTGG AGACCGGAT GATGATGCT
6001 GACTACTGGG ACTCGTGGG CTTCTTCTC CACTGCGAG ACCTCTGCC CTGGCTCTTT
6061 CAGCACTTCC CCGCTTGGCT CTTCACCTC CTCTACCGG CGGGCTCCA CTTCTCTCTC
6121 GACCGCGGCC TCCACTACT CTGCGACCC GCGCTCATC GCGCTCCAG CCGCGGCTC
6181 CGGCACCTCC TCCAGCCCA GCACTTCCAC CAGCGCGAG TCCGCCAGT CCGAGCCGAC
6241 CAGCACCAGC CCGCTCAGCC CCACAGGCC CAGCGCTCC GGCATCTCT CAGCGCCGAG

6301 CACCTCCACC AGCCCCAGCT CCGCCAGCTC CAGCCCCACC AGCACCAGCC CCGCCAGGCC
6361 CACCAAGCCC AGCCCCCTCT GTTCCACGCT GGGTCCCTTT GCGCCCAATG CCACTTGGAC
6421 GTTTTGGGG TCTCCGAGCA CCACTCTAT TCTTGGGCC TGAATCTGAG CCGCCGGGG
6481 CTCTTGCTGT TCGCGTCTCT CCGCTCGCTC CTCTTCCCG TCTCTGCTCA TGGTATACAC
6541 CCGCTCTCT TTGAGGTCCA CTGCGCGCG AGCCTTCTGG TCCAGATGTG TCTCCCTCT
6601 CTCTAGGGC ATTTCCAGT CCGTACCTCT CCGCTCTGTC AGACATGATT CACACTAAAA
6661 GAGATCAATA GACATCTTAA TTAGAGAGC CTCACTGAA ACAGGGAGTG CAGACTCGTG
6721 CCGCTTCCAA CAGCCCCCCC ACCCTCATCC CTTTCACTGT CCGTGTGAGA CAGATCCAGG
6781 TGTGAAATTT CCGATCTCT CAGCACTTCC TGCTGCTCAT CACCAATTAC TCGCAGCGCC
6841 GAAACTCCG GCTGACATC CTCAGATTT CCGTCTGAG CCGCAAGCCA GCGCTCAAAAT
6901 TCTTGTGCCC CTTTGTGCT GAGCGGTAG GATGGGGAIT CTGCGGACCC CTCTCTTCCC
6961 TCTTCAAGGT CACCGAGAC AGATGCTACT GGGGCAAGG AAGAAAAGCT GGGTGGGGC
7021 TGTGAAGCTA AGATCTGCT ACATGATGG GCGCGGCTGT ACATCTCGCC CATCCGGGCC
7081 CTAACTCCGC CCAATTCGGC CCAITTCGCG CCGTCACTGT GACTAAITTT TTTTATTTAT
7141 GCGAGGCGCG AGCGCGCTC GCGCTCTGAG CTATTCGAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT
7201 GAGGCGCTAG GCTTTTGA AAGCTAATTT C

【 1 4 】

Figure 14

pEAK12D - sigtptIPAA2684Is-6HIs

1 GGGTAAATCT GCTGCTTGA AACAAAAA CCACGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTCCGG
61 GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTCGGAG GTAACCTGCT TACGAGAGC GCGAGTACCA
121 AATACCTGTC TTCTAGTGA GCGTAGTGA GCGACCACT TCAGAGACTC TGTAGCACGG
181 CTAACATACC TGCTCTGCT GAAGCAGTT ACCAGTGGCT GCTGCGAGTG GCGAATAGTC
241 GTGCTTACG GGTGTGACT CAAGAGATAG TTACCGGATA AGCGCGAGCT GCGGAGCTGA
301 ACGGGGGGT GTGCGACACA GCGCAGCTTG GAGCGAAGCA CTAACACCA ACTAGATAC
361 CTACAGGGTG AGCTATGAGA AAGCGGACG CTTCCCGAG GAGAGAGGG GACAGAGTAT
421 CCGGTAAAGC GCGAGGTGCG AACAGGAGG CACAGAGGG AGCTTCCAG GGAAGACGCC
481 TGTATCTTT ATAGTCTGCT CCGGTTTCCG CACTCTTGAC TTGAGGCTG ATTTTGTGA
541 TGCTGTCAG GGGGCGGAG CTAATGGAA AAGCGCAGCA ACCGAGCTA GAGTTTAAAC
601 TTGACAGATG AGACATAAC CCGTAAATAT GCTTCAATA TATTGAAAA GGAAGATGAT
661 GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCGCTTAT TCGCTTTTTC CGGCAITTTT GCTTCTGCT
721 TTTTGTCTAC CCAAGAACGC TGCTGAAAT AAAAGATGCA GAAGTCACT TGGGTGCGCG
781 AGTGGGTTAC ATCGAAGTGC ATCTCAACG CCGTAAGATC CTTGAGATT TTGCGCCGCA
841 AGAGCTTTT CCAATGATGA GCACCTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGGG TATTATCCCG
901 TATTGATGCC GGGCAAGAG AACTCGGTG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
961 TGAATACTCA CAGTCAAGC AAAAGCATCT TACGGATGCG ATGACAGTAA GAGATTTATG
1021 CAGTCTGCC ATAACTGAG GTGATACAC TCGCGCCAC TTACTTCTGA CAATCTCGG
1081 AGAGCTGAG CAGCTAACCG CTTTITTTGA CAACATGGGG GATCATGTA CTCGCTTGA
1141 TGTGTTGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCAT ACCAAGCAG GAGCGTGACA CCACGATGCC
1201 TGTAGCAATG GCAACACGT TCGGAAACT ATTAACCTGC GAACACTTGA CTCTAGCTTC
1261 CCGCAACAA CTAATAGACT GGTAGAGGC GGAATAAGTT GCGAGACCA TTCTCGCTC
1321 GCGACTTCCG GCTGCTGGT TTATGCTGA TAAATCAGGA GCGGTGAGC GTGGGTGAGC
1381 CCGTATCATT CGAGCACTGG GCGCGGATG TAGCGCTCC CPTATCTGAG TTATCTACAC
1441 TACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAAC AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGTGCCTC
1501 ACTGATTAG CATTTGTAG GATTAATTT TGTGAGGAG GACAGATAT GAGTGGGCA
1561 AGTTGGGAA CGGTATCCG TTGCTGAAT TGCGATATGT GCGATATAT GACCGCGAC
1621 GTGCACTAG CATTTTTTT CTGCGGCAAT GCAAAAAGGC CATCCGTCAG GATGGCTTT
1681 CCGCATACT AGTAGGCTC CCGTCCCGT CAGTGGGCG AGCGGACAT GCCACAGTC
1741 CCGAGAGAT TGGGGGAGG GGTGCGCAAT TGAACCGGT CTACAGAGG GTGGCGCGGG
1801 GTAACTGGG AAGTGATGT CGTGACTGG CTCCGCTTT TTCCCGAGG TGGGGGAGAA

4021	TCACACTCGCG	GTGGCGCGGG	CCGATCTCGG	GGACACACCG	CCCGCGTTGG	AGCGTTCGCG
4081	GGCGTGCTCCA	GCGCGCCACC	GGCGCGCGCT	GGTCCGCGAC	CCACACCTTG	CCGATGTCCGA
4141	GGCCGACGACG	GATCGAGGAG	AGCTTTCTCA	CGCTGGTGAC	CGCTCGGATG	TGGCGGTTGG
4201	GGTCCGACGCT	GTGGCGCGCT	GGCGGGTAGT	CGCGGACGAC	GGCGCGGACG	GTGGCTACGG
4261	CCCGCGGGACG	GTGCTCGCGG	GTGGGACGAG	GACACGTGGG	CTGTACTACTG	GTCATGGTGG
4321	CCTGCAGAGAT	CGCTCTGTGT	TGGAGGCCAC	AGCGCTCACG	TGTATATGCG	AAGTGTGACCT
4381	GGGACGCCGC	CGCCCGCGCC	CGACTCTGGT	GTTTTGCGCA	ATGCACGACG	CGTGGCGGCG
4441	GTTTTGTTGCA	CTATAGACAT	AARGACATGC	AAATATATTG	CTTCGGGGGA	CAOCCGACAG
4501	AAACCGGACG	AACGGGCGAC	GGGGATCAAG	CGACGTGGCG	CGTCAATGCA	GATCCCGGATC
4561	ATTAACTCCA	ACGCGGTGCG	ATATGTCTCG	CGGGTAGTGG	TATATACTAT	CGAGACTAAC
4621	CCTAATTCAA	TAGCATATGT	TACCAACCGG	GAAGCATATG	CTATCGAATT	AGGGTTAGTA
4681	AARGGCTGCT	AGGACAGACG	AGCTGTGATA	GCATATGTGA	TCTTAATCTA	TATCTGGGTA
4741	CGATCGTCTA	TCTTAATCTA	TATCTGGGTA	GCATAGGGTA	TCCCTAATCTA	TATCTGGGTA
4801	CGATATGCTA	TCTTAATCTA	TATCTGGGTA	GATATGTGTA	TCCCTAATTA	TATCTGGGTA
4861	GCATATGGTA	TCTTAATCTA	TATCTGGGTA	GCATATGTCA	TCTTAATCTA	TATCTGGGTA
4921	GTATATGCTA	TCTTAATCTG	TATCGGGGTA	GCATATGTCA	TCTCATGCA	TATACATGCA
4981	GCATATGATA	CCGCGTAGTA	GAGTGGGAGT	GCTATCTTTG	GCATATGTCG	CGACATGCCA
5041	AGGAGATAGCG	CATGTCGTAG	TGCTCAACAG	GAAATGTGCT	CATATGGTTT	CCAGCGTOGGA
5101	AGGAGTTGGA	CGCGGGACGT	GAGTGGTGAT	ACACATGGG	TATGCCCAAT	TGGCCGATGT
5161	TGGGTGACG	AAATATGTGA	CAGACAGAT	GGCCACAGAT	AGCCCAACAG	CAGCATGATG
5221	GTCTACTGGG	GATTATATCT	TTAGTGGGGG	GAAGAAATAC	GCCTTTTAAT	CAATTGAGGG
5281	CGTCTCTGCT	AGCTTACCAT	CAGCTCTGCC	CTTCTCCAC	CTCATCTCTA	TCACACTCTCT
5341	CATCTCGCTG	AFTCTGCTCA	TACCCCTCTG	CGGAGCGGCG	TGTACACATA	GGTGGAACATA
5401	AGGGGACGCA	TGTCTATCCA	TGCTCAARG	TGCACATGCT	CACCTTGATA	TTCGATGCTA
5461	GGCGGGGCTT	TGTCTATCCA	AGGCTGCTTA	TGCGATCTCT	CAAAACCTCA	GCAAAATATG
5521	GAGTTTGTGA	AARACAGCAT	AARTACAGCA	ATCATGCTCT	CTATGCGCGG	CGAGCTGTGT
5581	GGCGGGCTCG	AGGGCGGCTT	CCAAAGAGGA	GACATCATGA	TGGTGTAAGA	GCACATTTGT
5641	GAATGATGCA	AGGAGTTCCT	CGCCTTAGT	TATGAAGGA	GCTGTCTACT	CAGCTATGTA
5701	GCACACACG	GGCGGACGCA	GTTCCTTCGT	CGGTGATGCT	TTCATAGTGA	CTCCTAGCCA
5761	GGGAGGCTCT	TAAATCTGCT	GCAATGTGCT	CAAAATTTGG	GTGGAGACCT	CTGTCAGCAC
5821	GATGCTTTTC	AAACACACCT	CTTTTTCCT	GTGCTGCTC	ATACACTCTG	CCCGGGGCTG
5881	CAGTGTGTGG	CGCTCTCTCT	GGGTCATGCT	CGGGGGGCTG	CTCTATGCTG	CGCGGGGGCA
5941	CGTCAGGCTC	ACGATGTGCG	CCACCTCTCT	GTGGGTATTC	AAATATATGA	CTCTTCGCTA
6001	CGAGGTGGAA	AAATGTGCTT	CTACGTGGAG	AGAGGCTTGG	CGGTGGAGAC	CCGATGATG
6061	ATGACTGACT	ACTGGGACGCT	CTGGGCGCTG	TTTCTCTCAC	TGCAGCACT	CTCCCTCTCG
6121	CTCTTTCACT	ACTCTCCCCC	CTGGCTCTTT	CTGCTGCTG	ACCGCGGGG	CTCCATCTCT

【 図 1 5 】

Subject: 61 LTRMNISARREFT 72

Subject: 92-01445-1

【 図 1 6 】

Figure 16

NCBI-month-aa/NCBI-month-nt
Query= insp035
(163 letters)

Database: NCBI: Rolling month (30 days) of new/revise protein
sequences
45,458 sequences; 18,189,306 total letters

Searching.....done

	Score	E
	(bits)	Value
Sequences producing significant alignments:		
ref XP_131704.2 similar to SEC protein [Mus musculus] >gi 25021...	132	2e-31
ref NP_055540.1 START domain containing 8; KIAA0189 gene produc...	35	0.027
ref XP_135732.1 similar to Peripherin [Mus musculus] >gi 250462...	33	0.13
ref NP_731940.1 CG31306-PA [Drosophila melanogaster] >gi 231712...	32	0.23
emb CAB05940.2 Hypothetical protein ZK131.1la [Caenorhabditis e...	32	0.30

>ref|XP_131704.2| similar to SEC protein [Mus musculus]
ref|XP_204036.1| similar to SEC protein [Mus musculus]
gb|AAH30183.1| Unknown [protein for MGC:29254] [Mus musculus]
Length = 74

Score = 132 bits (331), Expect = 2e-31
Identities = 65/74 (87%), Positives = 69/74 (92%)

Query: 90 MQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLHQLLEDAEAELELEPGAGLALPLRLHLG 149
M+AQRQLAGQLRLRA+LRLK+DQ CHLHQLLEDAEAE+ELE G GL LAP LRLHLG
Sbjct: 1 MRAQRQLAGQLRLRLRLRLKMDQACHLHQLLEDAEAELELEPGAGLALPLRLHLG 60

Query: 150 LTRNNISARRFTLC 163
LTRNNISARRFTLC
Sbjct: 61 LTRNNISARRFTLC 74

Identities = 163/163 (100%), Positives = 163/163 (100%)
Frame = +1

Query: 1 MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA 60
MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA
Sbjct: 190 MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA 369

Query: 61 KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH 120
KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH
Sbjct: 370 KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH 549

Query: 121 QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC 163
QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC
Sbjct: 550 QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC 678

【 図 1 8 】

Figure 18

NCBI-est

>gb|BM014200.1|BM014200 603639895F1 NIN_MGC_87 Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:5416127 5'.
Length = 776

Score = 326 bits (836), Expect = 1e-88
Identities = 163/163 (100%), Positives = 163/163 (100%)
Frame = +2

Query: 1 MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA 60
MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA
Sbjct: 122 MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA 301

Query: 61 KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH 120
KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH
Sbjct: 302 KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH 481

Query: 121 QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC 163
QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC
Sbjct: 482 QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC 61

【 図 1 7 】

Figure 17

NCBI-nt

Query= insp035 (163 letters)
Database: All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,
or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
1,469,831 sequences; 7,238,625,236 total letters
Searching.....done

	Score	E
	(bits)	Value
Sequences producing significant alignments:		
ref NM_032648.1 Homo sapiens hypothetical protein MGC10820 [MGC...	326	4e-88
gb BC004269.1 BC004269 Homo sapiens, clone MGC:10820 IMAGE:36137...	326	4e-88
gb BC030183.1 Mus musculus, clone MGC:29254 IMAGE:5054849, mRNA...	278	1e-73
ref XM_131704.1 Mus musculus similar to SEC protein (LOC230766)...	277	3e-73
ref XM_204036.1 Mus musculus similar to SEC protein (LOC277661)...	277	3e-73

>ref|NM_032648.1| Homo sapiens hypothetical protein MGC10820 (MGC10820), mRNA
Length = 959 Score = 326 bits (836), Expect = 4e-88
Identities = 163/163 (100%), Positives = 163/163 (100%)
Frame = +1

Query: 1 MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA 60
MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA
Sbjct: 190 MSLGLLKFAVGEDEDEEGESLDSVKALTAKLQLTRRPSYLEWTAQVQSQAWRRQA 369

Query: 61 KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH 120
KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH
Sbjct: 370 KPGPGGPGDTCGFSMSDALEWLRLRLRMQAQRQLAGQLRLRAQLRLKMDQACHLH 549

Query: 121 QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC 163
QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC
Sbjct: 550 QELLDEAELELEPGAGLALAPLLRHGLTRNNISARRFTLC 678

>gb|BC004269.1|BC004269 Homo sapiens, clone MGC:10820 IMAGE:3613742, mRNA,
complete cds
Length = 959

Score = 326 bits (836), Expect = 4e-88

【配列表】

2005528083000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 02/05885
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/52 C07K16/24 A61K38/19 C12Q1/68		
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 C07K A61K C12Q		
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) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200147 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2001-441847 XPOQ2249901 & WO 01 49716 A (CORIXA CORP), 12 July 2001 (2001-07-12) SEQ ID No.612 the whole document	1-11, 13, 17-26, 28-41
X	US 6 245 966 B1 (DEGREGORI JAMES) 12 June 2001 (2001-06-12) SEQ ID No.7 abstract column 2, line 44 examples 1-6	1-11, 13, 40
<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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 August 2003		Date of mailing of the international search report 14/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chavanne, F

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05885

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	DATABASE WPI Section Ch, Week 200229 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-241625 XP002249902 & WO 02 10453 A (GENE LOGIC INC), 7 February 2002 (2002-02-07) SEQ ID No.1149 the whole document	1-11,13
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! 1 August 1990 (1990-08-01) Database accession no. P17257 XP002249851 the whole document	1-11,13
X,P	DATABASE SWISSPROT 'Online! 1 October 2002 (2002-10-01) Database accession no. Q8K0V7 XP002249850 the whole document	1-11,13
X	DATABASE EMBL 'Online! 17 March 2001 (2001-03-17) Database accession no. BC004269 XP002249898 the whole document	7-11
X	DATABASE EMBL 'Online! 31 October 2001 (2001-10-31) Database accession no. BM014200 XP002249899 the whole document	7-11
X,P	DATABASE EMBL 'Online! 6 March 2002 (2002-03-06) Database accession no. BM717054 XP002249900 the whole document	7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05885

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 12, 14-16, 17 (part), 28 (part), 30 (part)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB 02 05885

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 18, 26, 34 and 41 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 31-33 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 12, 14-16, 17 (part), 28 (part), 30 (part)

Present claims 12, 14-16, 17 (part), 28 (part) and 30 (part) relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not to be found. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search of the claimed scope is impossible.

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

PCT/GB 02/05885

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0149716	A	12-07-2001	AU 2608201 A	16-07-2001
			CA 2396036 A1	12-07-2001
			EP 1242598 A2	25-09-2002
			WO 0149716 A2	12-07-2001
			US 2002110547 A1	15-08-2002
			US 2002076414 A1	20-06-2002
US 6245966	B1	12-06-2001	NONE	
WO 0210453	A	07-02-2002	AU 8088901 A	13-02-2002
			CA 2414421 A1	07-02-2002
			WO 0210453 A2	07-02-2002
			US 2002119462 A1	29-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 3/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 39/00	A 6 1 P 39/00	
C 0 7 K 14/52	C 0 7 K 14/52	
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 16/24	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00 A	
	A 6 1 K 37/02	

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

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 ファガン リチャード ジョセフ

イギリス ロンドン ダブリュ1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 インフ
ァーマティカ

(72)発明者 ガッターリッジ アレックス

イギリス ケンブリッジシャー シービー3 7ジェイケイ ハスリングフィールド ブロード
レーン 23

(72)発明者 フェルプス クリストファー ベンジャミン

イギリス ロンドン ダブリュ1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 インフ
ァーマティカ

(72)発明者 パワー クリスチン

フランス エフ-01710 トワリ リュ デ ジョンキーユ 10

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 DA13 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 EA04 HA12

4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ20 QR32 QS32

4B065	AA93X	AA93Y	AB01	AC14	BA02	CA24	CA44	CA45	CA46	
4C084	AA02	AA07	AA13	BA01	BA08	BA22	NA14	ZA02	ZA15	ZA36
	ZA59	ZA66	ZA81	ZA89	ZA94	ZA96	ZB05	ZB07	ZB11	ZB13
	ZB15	ZB26	ZB33	ZB35	ZB38	ZC21	ZC35			
4C085	AA03	BB11	CC21	DD62	DD63	EE01				
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA15	ZA34	ZA36
	ZA59	ZA66	ZA81	ZA89	ZA94	ZA96	ZB05	ZB07	ZB08	ZB11
	ZB13	ZB15	ZB33	ZB35	ZB38	ZC21	ZC35			
4H045	AA10	AA11	AA30	BA10	CA40	DA01	DA75	EA21	EA22	EA25
	EA27	EA29	EA31	EA50	FA74					