

(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2005-508602  
(P2005-508602A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09  
C 1 2 Q 1/02

F I

C 1 2 N 15/00  
C 1 2 Q 1/02

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4  
4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2002-559860 (P2002-559860)  
(86) (22) 出願日 平成14年1月25日 (2002. 1. 25)  
(85) 翻訳文提出日 平成15年7月25日 (2003. 7. 25)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/002287  
(87) 国際公開番号 W02002/059378  
(87) 国際公開日 平成14年8月1日 (2002. 8. 1)  
(31) 優先権主張番号 60/264, 272  
(32) 優先日 平成13年1月25日 (2001. 1. 25)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503081933  
バイレクシス コーポレイション  
アメリカ合衆国 メリーランド 2087  
7, ガイザースバーグ, ペリー パー  
クウェイ 200, スイート 1エイ  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100062409  
弁理士 安村 高明  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹  
(72) 発明者 ドロブリック, ボロ  
アメリカ合衆国 メリーランド 2104  
2, エリコット シティ, ゴールド  
ン オーク ドライブ 12637  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子機能を同定するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、目的の核酸配列によってコードされる産物の1つ以上の機能性を効率的に同定するための、方法および組成物に関する。この方法は、細胞において産物を過剰発現および/または過少発現する能力、ならびにこれらの結果の組み合わせを利用して、産物の細胞性機能性またはインビボ機能性の少なくとも1つの同定を可能にする。本発明の、細胞型における目的の遺伝子配列の機能を同定する方法は、以下： a) 該細胞型の第1の集団において、該配列の全てまたは一部を過剰発現させる工程； b) 該細胞型の第2の集団において、該配列の発現を阻害する工程； c) 該第1および第2の集団における、1つ以上の細胞性因子の変化を検出する工程； d) 該1つ以上の細胞性因子の同定、または該細胞性因子に対する効果に基づいて、該目的の遺伝子配列の機能を同定する工程、を包含する。

RNA expression (in relative units)

encoded gene product	Seq 1			Seq 2			Seq 3			Seq 4			
	Con.	O	U	C	O	U	C	O	U	C	O	U	C
transcription factor 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
transcription factor 2	100	30	200	0/170	100	100	0	100	100	0	100	300	0/200
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
transcription repressor 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
transcription repressor 2	100	30	200	0/170	100	100	0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
kinase 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
kinase 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
structural protein 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
structural protein 2	100	100	100	0	300	90	210/0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
oxidoreductase 1	100	100	100	0	100	100	0	20	105	0/85	20	105	0/85
oxidoreductase 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
receptor 1	100	100	100	0	100	100	0	20	105	0/85	20	105	0/85
receptor 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
secreted protein 1	100	100	100	0	100	100	0	20	105	0/85	20	105	0/85
secreted protein 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
all known sequences	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
unknown sequences (e.g. Seq 1)	100	300	0	300/0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
Seq 2	100	100	100	0	300	0	300/0	100	100	0	100	100	0
Seq 3	100	100	100	0	200	0	210/0	300	0	300/0	100	100	0
Seq 4	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	150	50	100/50
etc...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0

\*"Con" = control cell expression  
\*O" = overexpression  
\*U" = underexpression  
\*C" = combined effect

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞型における目的の遺伝子配列の機能を同定する方法であって、以下：

- a) 該細胞型の第 1 の集団において、該配列の全てまたは一部を過剰発現させる工程；
- b) 該細胞型の第 2 の集団において、該配列の発現を阻害する工程；
- c) 該第 1 および第 2 の集団における、1 つ以上の細胞性因子の変化を検出する工程；
- d) 該 1 つ以上の細胞性因子の同定、または該細胞性因子に対する効果に基づいて、該

目的の遺伝子配列の機能を同定する工程、  
を包含する、方法。

## 【請求項 2】

前記変化が、前記細胞性因子の発現の増加および/または減少である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記変化が、前記細胞性因子の翻訳後修飾においてである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記変化が、前記細胞性因子のリン酸化またはグリコシル化においてである、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記変化が、前記細胞性因子の活性においてである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1 の集団における過剰発現が、偽型レンチウイルスベクターの使用による、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記第 2 の集団における発現の阻害が、アンチセンス配向において前記遺伝子配列の全てまたは一部を発現させ得る、偽型レンチウイルスベクターの使用による、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記細胞型が初代細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記細胞型が培養細胞株である、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記目的の遺伝子配列が、前記細胞型の細胞において発現された際に予め同定されている、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記目的の遺伝子配列が、前記細胞型の細胞において発現された際に予め同定されていない、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記目的の遺伝子配列が、前記 1 つ以上の細胞性因子をコードするか、または該細胞性因子の発現を調節する核酸に結合することによって、該 1 つ以上の細胞性因子の発現を調節する産物をコードする、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記目的の遺伝子配列が、転写アクチベーターをコードする、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記目的の遺伝子が、転写リプレッサーをコードする、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記目的の遺伝子配列が、ヒト配列である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記細胞型が、ヒト細胞型である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

50

細胞において1つ以上の細胞性因子の発現を変化させる方法であって、請求項1に記載の方法によって機能が同定された遺伝子配列を過剰発現させるか、または該遺伝子配列の発現を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項18】

細胞の表現型を変化させる方法であって、請求項1に記載の方法によって機能が同定された遺伝子配列を過剰発現させるか、または該遺伝子配列の発現を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項19】

目的の遺伝子配列の機能を、該配列の細胞性供給源に対して異種の細胞において同定する方法であって、以下：

10

a) 該細胞型の第1の集団において、該配列の全てまたは一部を過剰発現させる工程；

b) 該細胞型の第2の集団において、該配列の発現を阻害する工程；

c) 該第1および第2の集団における、1つ以上の細胞性因子の変化を検出する工程；

d) 該1つ以上の細胞性因子の同定、または該細胞性因子に対する効果に基づいて、該目的の遺伝子配列の機能を同定する工程、

を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

20

本発明は、核酸配列によってコードされる産物の1つ以上の機能性の効率的な同定のための方法、およびその方法に関する組成物に関する。この方法は、細胞における産物の過剰発現および/または過少発現する能力、あるいはこれらの結果の組み合わせを利用して、その産物の細胞性またはインビボでの機能性の少なくとも1つの同定を可能にする。

【背景技術】

【0002】

(背景技術)

人間および他の生物のゲノムの配列決定における多大な努力は、さらに分析されるべき、莫大な量の核酸およびタンパク質の配列の情報を生じた。この配列情報の大部分は、現在、生化学的特徴付けと機能的特徴付けとの両方の課題であるか、または今後、そのような課題となる。この配列情報はまた、配列自体が、構造、機能、または他の特徴が以前に同定された他の配列との比較において使用される、「バイオインフォマティクス」のための原料として働く。これらの努力に対する大きな希望および期待は、遺伝子配列によってコードされる機能性の同定を用いて、ヒトおよび他の生物における疾患のための、さらなる治療産物および処置が開発され得ることである。

30

【0003】

遺伝子配列によってコードされる機能を同定するための努力は、少なくとも初期には、実際の遺伝子産物をコードする配列、すなわち「遺伝子」に集中した。初期のアプローチは、遺伝子をマッピングおよびクローニングするためのポジショナルクローニングを使用するための道具およびストラテジーに基づく、クローンおよび配列のみの遺伝子を求めた。労働集約型であるが、ポジショナルクローニングは、種々の疾患に関連する遺伝子の位置を決定することに成功した。最初は、遺伝子マッピングは、疾患に関連する遺伝子の位置を、染色体位置のレベルで、そしてセンチモルガンの範囲で位置決定するために、関連する個体の大きなファミリーに基づいて実施された。次に、努力を有意に増加させて、研究は、センチモルガンがメガ塩基対まで減少するように、次いで最終的に、特定のヌクレオチドにまで減少するように、遺伝子を物理的にマッピングするものとなった。ポジショナルクローニングを用いた成功の例としては、嚢胞性線維症およびハンティングトン病に関連する遺伝子の同定が挙げられる。

40

【0004】

遺伝子の単離のための他のアプローチとしては、エキソントラッピング (B u c k l e

50

rら、(1991)P.N.A.S.88:4005-4009)および直接選択(Morganら、(1992)N.A.R.20:5173-5179)が挙げられる。これらの方法は、大きいゲノム領域中の潜在的な遺伝子を同定し、この遺伝子は、次いで、配列決定され、そして実際に発現される場合に遺伝子を確認する際に使用される。いくつかの場合において、通常この潜在的な遺伝子を発現する細胞は、未知であり、遺伝子の発現を確認し、そしてコードされた産物の機能性を同定することが必要なままである。

#### 【0005】

上記の2つの方法を超える、ポジショナルクローニングを用いて利用可能な第1の利点は、同定された遺伝子の遺伝子産物の機能的役割または生理学的役割に関する知識を必要としないことである。同定は、表現型形質に基づいてなされ、その後、この形質を有する特定の配列の遺伝的隔離が研究される。しかし、同定後、適切な治療の設計のための遺伝子産物の機能的役割を決定する際に、なお困難が存在し得る。コードされた産物の機能的役割が未知であると、例えば、遺伝子産物を適切に標的化するための医薬としての使用に適切な薬剤を同定することは困難なままである。さらに、同定された遺伝子が、発症からの進行および疾患の後期段階への進行にいかに関与するかは、未知のままである。

10

#### 【0006】

遺伝子の単離のためのより最近のアプローチは、ゲノム中の全ての発現された配列を同定するために設計された大規模な配列決定の試みに基づいた。ヒトおよびDrosophilaのゲノム、ならびにいくつかの微生物におけるこのような試みの完了が、最近報告されている。しかし、このような大量の配列情報の生成と共に、コードされた遺伝子産物の機能性を同定するための迅速かつ効率的な手段についての必要性は、さらに増加する。この必要性は、遺伝子機能を同定するためのさらなる方法についての、強力な商業的活動および産業的活動を導いた。

20

#### 【0007】

機能を同定するための1つの手段は、新規の配列と、その構造、機能または他の特徴がすでに同定されている他の配列との間の類似性に基づいて機能性を決定するように探求する、バイオインフォマティクスを介する。バイオインフォマティクスは、最も頻繁には、コンピュータプログラムを用いて実行され、従って、「インシリコ(in silico)」で発生すると称されている。しかし、バイオインフォマティクスの1つの欠点は、これが、遺伝子配列の仮定された機能性をおそらく確認するための出発点のみを提供することである。新規の配列が、生きた細胞および生物内で実際に発現され、そして特徴付けられるまで、支持された機能性は、証明されるべき仮説のままである。

30

#### 【0008】

割り当てられた遺伝子機能を確認するためのアプローチは、小動物モデルの使用を介する。例えば、トランスジェニックマウスは、コードされた機能性を同定するための試みにおいて、遺伝子配列の過剰発現のために使用されてきた。遺伝子配列はまた、内因性のマウス配列がもはや発現されない「ノックアウト」マウスの生成においても使用されてきた。しかし、トランスジェニックアプローチの時間および費用は、同時に少数の配列のみの研究へと、その有用性を限定してきた。

#### 【0009】

別のアプローチは、目的の遺伝子配列を過剰発現するために、細胞培養物を使用してきた。不幸にも、内因性細胞性配列が発現も過剰発現もされない「ノックアウト」細胞を確実に生成するための迅速かつ効率的な手段は存在しない。しかし、過剰発現方法は、遺伝子を送達および発現するために使用されるベクター系によって制限される。第1の問題として、既知のベクター系は、その遺伝子でトランスフェクトされる細胞の数を制限する。例えば、プラスミドベクターは、低いトランスフェクション効率を有し、従って、トランスフェクトされた細胞を単離するために、選択マーカーの使用を必要とする。しかし、プラスミドベクターからのマーカー遺伝子の発現は、検出される表現型を歪める傾向がある。なぜなら、目的の遺伝子は、その細胞において過剰発現される唯一の遺伝子ではないからである。言い換えれば、目的の遺伝子の発現は、細胞において生じる唯一の最初の混乱

40

50

ではない。このように、遺伝子機能の決定は、マーカー遺伝子の発現による歪みに起因して、有意に誤られ得る。同じ選択マーカーに媒介される歪みは、いくつかのウイルスベクター（例えば、オンコ・レトロウイルスベクター）で見られる。

【0010】

より高いトランスフェクション効率は、他のウイルスベクター（例えば、アデノウイルススペースのベクター）から入手可能であるが、これらのベクターは、しばしば、目的の遺伝子の安定な発現を提供できない。より重要なことに、このようなベクターは、しばしば、発現するためのそれ自体の多数の遺伝子を有するか、またはヘルパーウイルスによる同時感染に起因する混入の危険性を被る。ベクター遺伝子および/またはヘルパーウイルス遺伝子の発現は、再び、細胞内環境を混乱させ、そして検出される表現型を歪め、従って、遺伝子機能の決定に影響を与える。

10

【0011】

ベクターベースの過剰発現の使用に対するさらなる制限は、どの得られた表現型がトランスフェクトされた細胞において検出されるべきであるか、または検出され得るかに関する不確実性と共に見出される。さらに、このような方法は、初代細胞をほとんど使用しないが、その代わりに、細胞株、または任意の同定された遺伝子機能が、異常な細胞環境に起因することが疑わしいままである疾患細胞を使用する。

【0012】

上記の文書の引用は、上記のいずれかが関連先行技術であることの承認として意図されない。日付に関する記述またはこれらの文書の内容に関する表示の全ては、本出願人にとって入手可能な情報に基づき、そして日付の正確さまたはこれらの文書の内容に関するいずれの承認をも構成しない。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

（発明の要旨）

本発明は、未同定の遺伝子配列によってコードされる産物の1以上の機能を同定するか、または既知の遺伝子配列の1以上の機能をさらに同定もしくは確認する能力を増大させるための組成物および方法を提供する。本発明は、所定の未同定または既知の目的の遺伝子配列の1以上の機能性を、少なくとも2つの手段によって決定する。第1に、遺伝子配列またはその1以上の部分は、ベクターに挿入され、そしてコードされた遺伝子産物の発現のために細胞に導入される。発現レベルは、もちろん、減弱され得るが、好ましくは、配列は過剰発現される。発現が生じた後、このベクターを有さない正常細胞と比較した、発現、組成または内因性細胞性因子の形態における変化は、検出および分析される。このことは、どの細胞性因子が、発現または過剰発現される配列によって影響を受けるかの同定を可能にする。本発明の範囲を限定することなく、細胞性因子に対する実際の効果としては、その発現レベル（例えば、タンパク質および/またはRNAのレベルで）における変化、アミノ酸組成（例えば、サブユニットの数および型ならびに/またはスプライス改変体）における変化、および翻訳後修飾（例えば、リン酸化および/またはグリコシル化および/または脂質修飾）または位置（例えば、細胞下の位置、ならびに可溶性であること、膜結合性であること、または膜の疎水性部分へのこの因子の少なくとも一部の挿入によること）における変化が挙げられ得る。細胞性因子としては、1以上の同定された機能を有する因子、ならびに機能がいまだ同定されていない因子が挙げられる。

30

40

【0014】

第2に、未同定または既知の遺伝子配列の発現は、細胞において阻害または停止される。本発明の範囲を限定せずに、阻害は、その細胞中の配列の内因性コピーと組み換えてその発現を停止させるための、遺伝子配列の全てまたは一部の使用によるものであり得る。あるいは、遺伝子配列またはその1以上の部分は、ベクターにアンチセンス方向で挿入され得る。配列またはその部分の発現は、アンチセンス核酸を生成することが所望される場合にのみ発現されるように調節され得る。

50

## 【0015】

好ましくは、このアンチセンス配列は、アンチセンス配列の発現の際に、相補的な内因性細胞配列および「センス」配列と共にアンチセンス配列を同時局在させ得る同時局在配列に連結される。本発明のいくつかの実施形態において、アンチセンス配列は、リボザイムを標的化して、内因性mRNAを切断するために使用される。ベクターは、続いて相補的な内因性細胞性配列に結合して、その発現の阻害をもたらすアンチセンス配列の発現のために、細胞に導入される。相補的細胞性配列の発現を阻害するためのアンチセンス配列の発現（または他の手段の使用）後に、未処理の正常細胞と比較した上記のような発現、組成または細胞性因子の形態の変化が、検出および分析される。このことは、どの細胞性因子が、目的の遺伝子に対応する内因性細胞性配列（使用されるアンチセンス配列に相補的）の発現を減少または抑制することによって影響を受けるかの同定を可能にする。

10

## 【0016】

好ましくは、目的の遺伝子配列の上記過剰発現および過少発現は、内因性ベクター遺伝子配列の有意な発現もヘルパーウイルスの混入も伴わずに、高効率の形質導入をし得るウイルスベクターの使用によって実行される。このようなベクターの例としては、2000年9月22日に出願された、係属中の米国特許出願09/667,893、表題「Improved Conditionally Replicating Vectors, Methods for Their Production and Use」（これは、本明細書によって、その全体が示されるかのように、参考として援用される）に記載されるベクターが挙げられる。形質導入された細胞が初代細胞である本発明の実施形態が、さらにより好ましい。

20

## 【0017】

必要に応じて、過剰発現および過少発現のための上記ベクターは、形質導入プロセスの一部として、細胞性ゲノムに組み込まれる。

## 【0018】

本発明の好ましい形態において、細胞性因子の発現における変化が検出される。さらに、2つのアプローチからの細胞性因子の発現における検出された変化は、組み合わせられ、そして比較されて、研究中の未同定または既知の遺伝子配列の1以上の機能についてのさらなる情報を提供し得る。細胞性因子の発現における検出された変化の組み合わせは、細胞状態の混乱の際（例えば、温度シフトまたは増殖因子の添加の前もしくは後）の細胞性因子の差示的発現を研究するために使用される「サブトラクション」技術に類似する。

30

## 【0019】

過剰発現、過少発現からの結果およびそれら両方からの結果の詳細な分析により、目的の遺伝子配列の過剰発現または過少発現に起因する変化によってのみ最初に混乱される確実な細胞内環境に基づいた、目的の配列の1以上の遺伝子機能の同定が可能になる。従って、目的のこの遺伝子配列の機能は、この配列の発現における変化により影響を受ける1以上の細胞性因子の同定またはこれらに対する影響に基づいて同定される。可能な機能の非限定的な例としては、この1以上の因子の発現を調節すること、およびこの1以上の因子の活性に影響を与えることが挙げられる。

## 【0020】

この分析はまた、目的の配列に機能的に関連する1つ以上の細胞性因子の同定を可能にする。そのような1つの群の細胞性因子は、目的の配列が過剰発現するとき、増大した発現を示し、そして目的の配列の発現が阻害されるとき、減少した発現を示す。別の群の細胞性因子は上記とは反対であり、目的の配列が過剰発現するとき、減少した発現を示し、そして目的の配列の発現が阻害されるとき、増大した発現を示す。

40

## 【0021】

このように同定される細胞性因子の群は、目的の配列の発現における摂動に対する「協調応答（coordinated response）」の一部とみなされ得る。「協調応答」は、細胞の単一の調節経路、生化学経路もしくは代謝経路、または他の機能の協調応答であり得る。この協調応答はまた、細胞性因子と目的の遺伝子配列の産物との間の機

50

能的關係の同定のための方法も提供し得る。

【0022】

目的の配列の過剰発現および過少発現の両方の効果を観察することにより同定された「協調応答」細胞性因子に対する能力は、目的の配列を過剰発現、または過少発現のいずれかをするときにのみ発現の変化を示す細胞性因子の評価または考察にかかる時間を減少または削除する有利な方法を、提供する。そのような「協調応答」細胞性因子は、別々の研究、考察、および/または分析についての別々の群として容易に分類され得る。本発明は、目的の配列の発現を摂動する、同時に関連する全ての効果にかかる時間および金銭の費用を減少させるので、目的の遺伝子配列の機能性を迅速かつ効率的に同定する能力を改善する。本発明は、目的の遺伝子配列の過剰発現および過少発現の両方に関連したこれらの効果のみを目的とする方法を提供する。 10

【0023】

本発明は、目的の遺伝子配列が発現されることが既に見出されている細胞または細胞型の1つ以上の細胞性因子の変化を検出することによって、実施され得る。このような目的の遺伝子配列の非限定的な例は、特定の細胞型においてかまたは特定の疾患状態下で発現されることが見出されるオープンリーディングフレームの場合である。あるいは、本発明は、目的の遺伝子配列が、発現されたものとして検出されていない細胞または細胞型における変化を検出することによって、実施され得る。任意の動物細胞、植物細胞または微生物細胞もまた用いられ得るが、好ましくは、これらの細胞または細胞型は、ヒト細胞である。細胞中に目的の遺伝子配列を導入するための方法は、以下で議論される。 20

【0024】

従って、本発明は、目的の遺伝子配列の1つ以上の機能性の同定のための2つ以上のベクターを含む分析方法、組成物およびシステムを提供する。必要に応じて、少なくとも1つの第3のベクターが用いられ、なお別の遺伝子配列を過剰発現または過少発現し、目的の遺伝子配列の1つ以上の機能性についてのさらなる情報を提供する。

【0025】

本発明の別の局面において、遺伝子機能を同定するためのハイスループット、かつ必要に応じてコンピュータ化されているかまたはロボットにより実行される(robot implemented)システムが、提供される。そのような実施形態において、本発明は、複数の区分に配置された、ベクターおよび形質導入された細胞のライブラリーを提供する。ベクターに関して、このライブラリーは、目的の遺伝子の過剰発現のためのベクターまたは目的の遺伝子の過少発現のためのベクターのいずれかを含む。そのようなベクターのライブラリーは、細胞を形質導入するために非常に効率的に用いられ得、複数の区分において細胞のライブラリーを産生する(細胞のライブラリーの各々は、1つのベクターで形質導入された細胞を含む)。このベクターのライブラリーは、細胞の形質導入でこれらを使用する前に、必要に応じて、パッケージング(packaging)細胞中で増殖され得る。 30

【0026】

形質導入された細胞のライブラリーは、機械的に実行されるマイクロアレイまたは当該分野において公知のマイクロアレイ技術の使用によって、目的の遺伝子配列を過剰発現または過少発現する効果について分析され得る。そのような技術の例は、「遺伝子チップ」技術であり、これにより、細胞から単離されたmRNA、または対応するcDNAのハイブリダイゼーションのために用いられる単一の「チップ」を介して、大量の配列の遺伝子発現が決定される。本発明は、開示される方法の実施のための、アレイである組成物を含み、この組成物は、必要に応じて、1つ以上の目的の遺伝子配列を過剰発現および/または過少発現させる細胞由来の物質に接触している(例えば、そのような細胞由来のRNA、タンパク質、他の細胞性物質、または細胞外物質と接触している)。 40

【0027】

形質導入された細胞のライブラリーはまた、細胞性因子の効果の分析の前に、さらなる処理または状態の変化に供され得る。この細胞(従って、細胞性因子の効果)はまた、時 50

間的に分析され得る。この細胞はまた、遺伝子の機能性のさらなる決定のために、インビボの状況へと移動され得る。

【0028】

種々の方法が、細胞性因子の変化を検出するために用いられ得る。そのような方法としては、メッセンジャーRNAレベル、タンパク質発現レベル、タンパク質活性レベル、タンパク質リン酸化の効果、タンパク質もしくは核酸プロセシングの効果、RNA安定性の効果、シグナル伝達もしくはセカンドメッセンジャーの効果などの決定が挙げられる。

【0029】

本発明はまた、機能が上記の方法により同定された遺伝子配列を過剰発現するか、またはその発現を阻害することによって、細胞中の1つ以上の細胞性因子の発現、組成物、または形態を変化させるための方法を提供する。そのような方法はまた、この細胞の表現型を変化させるために用いられ得る。

10

【0030】

本発明は、活性が全く知られていないコードされた遺伝子産物の1つ以上の機能を同定する能力に勝る、多数の利点を提供する。これらとしては、以下のいくつかの活性情報が既知の遺伝子産物の機能についてのさらなる情報を提供する能力が挙げられる；1つの機能しない(functionless)遺伝子産物が発現されるとき、別の機能しない遺伝子産物を過剰発現または過少発現する能力についての情報を提供する能力；および異なる内因性配列を発現する異なる細胞型について同じ分析を実施する能力。

【0031】

本発明はまた、既知の遺伝子産物の発現を増大させるための方法も提供する。一旦目的の遺伝子配列が、所望かつ既知の細胞性遺伝子産物の発現を増大させることが見出されると、目的の遺伝子配列は、少なくとも、その後の単離または精製のためにこの産物の発現を増大させるように用いられ得る。

20

【0032】

目的の遺伝子の機能性についての知見または考察についての必要性がないことは、本発明のさらなる利点である。目的の遺伝子の機能性に関する知見がある本発明の実施形態において、本発明は、以前未知であり得た1つ以上の他の機能性を同定するためおよび/または以前知られ得ていたかまたは予想され得ていた1つ以上の他の機能性を同定するための方法を、有利に提供する。この以前知られ得ていたかまたは予想され得ていた1つ以上の他の機能性は、目的の疾患関連遺伝子配列に関して特定の関連性があり、この目的の疾患関連遺伝子配列は、本発明と組み合わせる用いられ得、この配列の1つ以上の他の機能を同定または確認し得る。例えば、本発明を限定することなく、疾患関連遺伝子配列によりコードされた産物のレベルの減少は、この疾患の有用な薬理学的処置として同定され得た。しかし、この配列の発現レベルの減少は、この処置の効果を減少させる別の細胞性因子において代償的増加を引き起こすことが予想され得る。本発明における疾患関連遺伝子配列の使用は、そのような代償の増加が生じるか否かおよび代償の細胞性因子の同一性を決定する有利な方法を提供する。この因子は、この疾患の処置を改善するために同時に減少し得る第2の標的である。

30

【0033】

本発明のなお別の利点は、遺伝子の機能性に基づく関連性が決定され得、そして機能的関連性のマップを作成するために使用され得ることである。

40

【0034】

(発明の実施の形態)

本発明は、所定の配列の遺伝子産物の1つ以上の機能性の同定のための方法および組成物を提供する。好ましくは、この配列は、ヒトであるが、1つ以上の非ヒト配列もまた、本発明と組み合わせる用いられ得、ヒト細胞における細胞性因子に対するそれらの効果(単数または複数)を同定し得る。有利なことに、コードされた機能性に関する知見についての先行条件は必要ない。しかし、上記の機能性が既知である場合、本発明は、この機能性の確認および以前は未知であったかまたは理解されていなかった機能性の可能な同定を

50

可能とする。

【0035】

好ましい実施形態において、本発明は、細胞中で所定の同定されていない遺伝子配列または既知の遺伝子配列を過剰発現するためのベクターを提供する。好ましくは、そのような発現は、厳しい (tight) および/または誘導可能な調節制御下にある。「同定されていない」配列は、細胞機能性または生化学機能性の確認がいまだされていないと考えられている。「既知の」配列は、1つ以上の細胞機能性または生化学的機能性を有するものとして確認されていると考えられている。好ましくは、この過剰発現は、他のベクターの有する配列 (例えば、選択マーカーであるが、これに限定されない) を同時発現することなく生じる。従って、細胞内環境は、目的の配列の過剰発現によってのみ影響され、そしてこの過剰発現の効果は、この配列の1つ以上の機能性をより厳密に反映する。

10

【0036】

本発明のこの実施形態に従い形質導入された細胞は、細胞性因子について分析され、この細胞性因子は、本明細書において、任意の細胞性遺伝子産物 (例えば、タンパク質またはRNA) またはそれらの代謝産物 (例えば、糖および脂質のような分子) として規定され、これらの因子は、この遺伝子配列の過剰発現によって影響される。過剰発現の効果は、この遺伝子を過剰発現しない正常な細胞と比較される。好ましくは、正常な細胞は、このベクターを用いて模擬的にトランスフェクトされるが、この遺伝子配列を発現しない。例として (本発明を限定しない)、所定の遺伝子配列 (例えば、細胞分化の誘導物質をコードする遺伝子配列) の過剰発現は、正常な細胞と比較して、1つ以上の細胞性因子 (例えば、分化または分化された段階に関連する遺伝子によってコードされた細胞性因子) をコードするRNAの発現を増大させる。あるいは、いくつかの遺伝子配列 (例えば、転写抑制因子) の過剰発現は、1つ以上の細胞性因子の発現の減少を生じる。最後に、いくつかの細胞性因子は、いくつかの遺伝子配列の過剰発現によって、影響されない。本発明は、この因子をコードするか、またはその発現を調節する核酸と結合することによって、1つ以上の細胞性因子の調節因子をコードする目的の遺伝子配列の1つ以上の機能を同定する能力を含む。

20

【0037】

別の実施形態において、本発明は、細胞において未同定または既知の遺伝子配列の発現を阻害、抑制、またはそれ以外に減少させるためのベクターを提供する。これはまた、好ましくは、他のベクター保有配列 (例えば、選択マーカーであるが、これに限定されない) の発現がない場合に生じる。従って、細胞内環境はまた、この配列の完全なまたは部分的な過少発現によってのみ影響され、そしてその影響は、この配列の1つ以上の機能をより正確に反映する。遺伝子配列のこの過少発現は、通常、細胞がこの配列を内生的に発現することを必要とするようであるが、本発明は、この配列を発現しない細胞においてもなお実施され得る。なぜなら、過少発現を引き起こすようにベクターで形質導入された細胞と、模擬形質導入細胞との間には全く有意な差異はないからである。あるいは、通常、この配列を内生的に発現し、従って、それを過少発現し得る細胞が、プローブとしてその配列の全体または一部を用いてこの分野において周知の標準的な方法 (例えば、ノーザンブロット) によってまず同定され得る。このような細胞を迅速に同定するために、「組織ブロット」 (ここで種々の細胞型に由来するRNAが調製され、そしてノーザンブロットに同時に供される) が使用され得る。

30

40

【0038】

未同定または既知の遺伝子配列を過少発現するために (しかし本発明を限定するわけではない)、それは、細胞における形質導入および発現のためのベクター中でアンチセンス方向に挿入され得る。このような発現は、好ましくは、厳しいおよび/または誘導性の調節制御下に置かれる。アンチセンス方向での全配列の挿入が当然必要であるわけではなく、そして未同定または既知の配列の1つ以上の部分を使用され得る。好ましくは、アンチセンス配列は、同時局在配列に作動可能に連結される。この同時局在配列は、アンチセンス配列との発現の際、アンチセンス配列を、相補的な内因性の細胞配列 (または「センス

50

」配列)と同じ細胞位置に対して追跡されるように同時局在し得る配列である。アンチセンス配列は、内因性 mRNA の不発現を生じるために直接的に使用され得るが、このアンチセンス配列はまた、リボザイムを内因性 RNA を切断するように方向付けるための標的化配列の一部でもあり得る。このような実施形態では、ベクターは、当然、内因性配列を標的化するために、コード化されたリボザイムの作動部分としてアンチセンス配列を発現し得るよう設計され得る。次いで、このベクターは、アンチセンス配列の発現のために細胞に導入され、次いで、この配列は、相補的な内因性の細胞配列に結合し、その発現の阻害を生じる。

#### 【0039】

抑制されるべき遺伝子配列の種々の部分に由来する種々のアンチセンス配列は、どれが細胞配列の発現を減少させるために最も適するかをまず決定するために使用され得る。本発明の1つの実施形態において、内因性細胞発現の最も完全な抑制のために、アンチセンス配列は、抑制される遺伝子配列について細胞が異種性である場合、内生的に発現された配列の保存部分に対するものであるべきである。当然、複数のアンチセンス配列もまた使用され得る。あるいは、目的の遺伝子配列は、それらの発現を抑制するために目的の遺伝子配列の内生コピーを組み換えるベクターを調製するために使用され得る。

#### 【0040】

種々の同時局在配列が内因性 RNA に対するアンチセンス分子を同時局在するために使用され得るが、好ましい配列は、U1、U2、U3、U4、U5 または U6 snRNA であり、それらの全てが、上記アンチセンス配列またはリボザイム配列に作動可能に連結され得る。より好ましくは、用いられる同時局在配列は、Dietz (USP 5, 814, 500) (これは、その全体が十分に記載されているかのように本明細書中に参考として援用される)に記載のような U1 snRNA / プロモーターカセットである。

#### 【0041】

多くの遺伝子配列について、その発現を抑制する能力は全体的に、その過少発現の結果に対して最も明瞭な情報を提供するが、配列の発現を部分的または全体的に抑制する能力が、本発明の一面であることを留意すべきである。遺伝子発現の部分的抑制は、遺伝子配列が細胞生存度に必須の産物をコードする場合、特に有利である。このような遺伝子配列は、発現の完全またはほぼ完全な抑制の際の細胞に対する致死効果によって容易に同定され得る。部分的な抑制を達成する方法に関する非限定的な例は、この配列に対して異種性である唯1つの内生的に発現された配列を標的化することである。

#### 【0042】

本発明のこの実施形態に従って形質導入された細胞は、この配列を発現する正常細胞と比較して遺伝子配列の過少発現によって影響を受ける細胞性因子について分析される。好ましくは、正常細胞はまたベクターで模擬トランスフェクトされるが、この遺伝子配列の過少発現を引き起こさない。一例として、および本発明を制限することなく、所定の遺伝子配列(例えば、転写リプレッサーをコードする配列)の過少発現は、正常細胞と比較して、1つ以上の細胞性因子(例えば、このリプレッサーにより抑制される遺伝子によりコードされる因子)をコードする RNA の発現を増大させる。あるいは、いくつかの遺伝子配列(例えば転写アクチベーター)の過少発現は、1つ以上の細胞性因子の発現減少を生じる。最後に、いくつかの細胞性因子は、いくつかの遺伝子配列の過少発現によって影響されない。

#### 【0043】

本発明の実施のために絶対的に必要ではないが、本発明に従って配列を過剰または過少発現するためのベクターは、好ましくは、100%効率までの高い効率および安定な形質導入を可能にする。あるいは、それらは、好ましくは高コピー数で、エピソームに維持されるが、本発明はまた、低コピー数エピソーム構築物を用いても実施され得る。安定な組み込みは、形質導入される細胞を適当なリガンドで刺激し、次いでこの細胞を標準条件下で培養することにより増強され得る(同時係属中の米国出願番号 09/653,088 (2000年8月31日出願、発明の名称: METHODS FOR STABLE TR

10

20

30

40

50

ANSDUCTION OF CELLS WITH VIRAL VECTORS、これは、その全体が十分に記載されているかのように本明細書によって援用される)。このようなベクターはまた、好ましくは、センス方向またはアンチセンス方向のいずれでも、目的の遺伝子以外のベクター保有配列をほとんどまたは全く発現しないように設計される。本発明のいくつかの実施形態において、このベクターは、細胞ゲノムへのこのベクターの組み込みを可能にするのに十分な配列をさらに含有する。このような組換え事象は、配列をベクター上に存在することを可能にすることに起因して相同組換えまたはインテグラーゼ媒介事象に基づき得る。非限定的な例として、レンチウイルス由来ベクターが使用される場合、正常なレンチウイルス組み込み配列は、宿主細胞ゲノムへの安定な組み込みを容易にし得る。

10

過剰または過少発現される所定の未同定または既知の遺伝子配列は、任意の供給源に由来し得、そして部分的にでさえ同定され得る。未同定または部分的に同定された配列の非限定的な例としては、遺伝子産物（RNAまたはタンパク質性の形態で）をおそらくコードすると考えられるEST（発現配列タグ）配列および任意の核酸配列の単離および特徴づけから得られる配列が挙げられる。このような配列としては、EST配列のアセンブリによって同定された配列または遺伝子産物をコードすることが他に決定された配列が挙げられる。これらの配列としては、バイオインフォマティクス分析を受け、従って他の既知のまたは特徴付けられていない配列に対して相同性を有する配列が挙げられる。一例として、および本発明を制限することなく、何の機能も割り当てられていないオープンリーディングフレームをコードする配列は、細胞におけるその機能の1つ以上を同定するために本発明において使用され得る。同様に、（例えば、バイオインフォマティクス分析に基づいて）DNA結合タンパク質に対して相同性を有するオープンリーディングフレームをコードする配列は、転写因子としてのその推定の機能性を確認するために、本発明において使用され得る。

20

#### 【0044】

既知の配列の非限定的な例は、任意の供給源に由来し得、そしてこのような例としては、1つ以上の機能性が割り当てられた配列が挙げられる。このような配列は、公に利用可能なデータベースにおける配列ならびにコード化された遺伝子産物が特徴付けられている任意の配列が挙げられる。それにも関わらず、このような配列は、既知の機能性を確認し、および/またはさらなる機能性を同定するために、本発明において使用され得る。一例として、および本発明を制限することなく、細胞質タンパク質をリン酸化するとしてもっぱら同定されたキナーゼをコードする配列は、キナーゼの核転写因子の発現上昇を引き起こすことが見出され得る。理論によって縛られないが、キナーゼは、そのキナーゼ活性によって転写因子の発現増大を直接的または間接的に生じ得る。1つの可能性は、キナーゼがそれを不活性化するために転写因子をリン酸化し、それによりフィードバックループを介してその発現の上昇を引き起こすことである。本明細書中に記載のような細胞性因子に対する他の効果もまた、1つ以上のフィードバックループを介して生じ得る。

30

#### 【0045】

さらに、人工配列（例えば、組替え融合または他のキメラ構築物、ならびに上記の配列の変異型）もまた、それらの機能を同定するために本発明において用いられ得る。本発明のこの局面は、野生型タンパク質の機能を置換し得るものとしての特定の人工タンパク質または変異誘発タンパク質の確認において、特に有利であり得る。例えば、および本発明を制限することなく、それ自体と多量体化し得るがp53のドミナントネガティブ変異形態とは多量体化し得ない、p53タンパク質の合成変異型が、野生型機能性p53について置換するその能力を確認するために、本発明において使用され得る。このような確認とともに、合成変異体は、ドミナントネガティブp53変異を含有する細胞を処理する治療状況において使用され得る。

40

#### 【0046】

本発明を実施するためのベクターへの未同定または既知の配列の導入は、任意の手段により得る。好ましくは、それは、平行に実施され得、そして複数のクローニング工程の必

50

要性およびクローニングの確認の工程の必要性を最小にする非常に効率的な手段によって実施される。より好ましくは、ベクターへの配列の挿入は、自動化技術によって実施される。非限定的な例として、目的の遺伝子配列は、まず出発ベクター中にクローニングされ得る。このベクターは、その配列が、本発明の過剰発現および過少発現ベクターに続いて導入されることを可能とし得る。これは、組換え媒介挿入系（例えば、Gateway<sup>TM</sup> クローニング系（Life Technologiesから））の使用により得る。これは、ベクター間の配列の高効率移入を可能にするために、プラスミド中のatt部位を利用する。したがって、本発明の1つの実施形態では、遺伝子配列を過剰および過少発現するためのベクターは、遺伝子配列の効率的な挿入を可能にする適切なatt部位を含有し得る。

10

**【0047】**

自動化実施形態では、遺伝子配列の挿入は、遺伝子配列のライブラリーを含有するアレイの使用に基づき得る。このような配列含有アレイは、遺伝子配列を含有する第1のライブラリーに基づいて編成された、複数のさらなるアレイを生じるために使用され得る。この複数のアレイは、続けて、1つ以上の以下を含み得る：適切なリンカーを用いて改変された遺伝子配列を含むアレイ；増幅のために改変された遺伝子配列を含むアレイ；増幅またはさらなるクローニングのために出発ベクターに導入された改変された配列を含むアレイ；出発ベクターから本発明の1つ以上のベクターに移入された配列のアレイ；および細胞を形質導入するためのそれらの使用前に適切にパッケージングされたこのようなベクターのアレイ。

20

**【0048】**

このようなアレイの使用により提供される1つの利点は、本発明に従って遺伝子配列のライブラリーを過剰または過少発現する際に、このようなアレイに存在する機構を使用し続けることができることである。例えば、パッケージングされたベクターのライブラリーを含むアレイ配置は、細胞のアレイを形質導入するために使用され得る。それは次いで、細胞性因子においてアレイの遺伝子配列の過剰および過少発現の効果を分析するために、部分的または完全に回収され得る。

**【0049】**

本発明で使用するための細胞は、任意の種類 of 細胞であり得る。機能の最適決定がなければ、この細胞は、過剰発現または過少発現される遺伝子配列と同一の生物体由来であるべきである。それにもかかわらず、配列は、この配列が細胞内でその機能（単数または複数）を決定するために発現されるその細胞に対して異種であり得る。好ましくは、この細胞はヒトであり、そして、目的の遺伝子配列は、最初は、少なくともこの配列が発現されることが見出されている細胞において、研究される。非限定的な例によって、真菌配列は、哺乳動物細胞でその機能（単数または複数）を決定するために、哺乳動物細胞中で発現され得る。本発明のこの局面は、真菌配列に対して対応する哺乳動物配列が既知である場合、特に有利である。これは、哺乳動物配列の代わりとなる程度に機能し得る真菌配列を確認するために、哺乳動物配列を過少発現する効果の比較を可能にする。そのようである場合、この真菌配列は、哺乳動物配列によってコードされる産物の代わりとなる治療剤となり得る産物を、コードし得る。

30

40

**【0050】**

本発明の実施のための好ましい細胞型は、真核生物細胞であって、より好ましくは、初代真核生物細胞であって、そして、最も好ましくは、初代哺乳動物細胞およびヒト細胞である。好ましい細胞は、以下が挙げられるがこれらに限定されないヒト組織の細胞である：神経細胞、脳細胞、上皮細胞、結合組織細胞（例えば、線維芽細胞、骨芽細胞および脂肪細胞）、血球（例えば、白血球、リンパ球、単球および好中球）、感覚細胞、筋細胞、感覚細胞（例えば、眼細胞および毛細胞）、肺細胞、心細胞、肝臓細胞、皮膚細胞、膵臓細胞、乳腺細胞、腎臓細胞、腸細胞、胃細胞、結腸細胞、前立腺細胞、卵巣細胞、および生殖細胞。培養された細胞株（上記のいずれか由来の細胞株を含む）もまた、使用され得る。しかし、本発明の別の局面において、部分的または完全な分化細胞がまた、所望され

50

る場合、使用され得る。非限定的な例として、分化細胞の使用は、過少発現された遺伝子配列が、上記の分化細胞において、単に正常に発現される場合に、好ましい。異なる細胞型の形質導入のために、ベクターは、当該分野で公知の偽型 ( p s e u d o t y p e ) およびアンフォトロピックパッキング系の使用を介して、適切にパッキングされ得る。

#### 【 0 0 5 1 】

種々の細胞型を形質導入する能力は、本発明の別の利点を提供し、ここで、種々の ( 異種の ) 細胞型における遺伝子配列の過剰発現および過少発現が、追加の情報を提供するために使用され得、従って、遺伝子機能の割り当てを向上させる。この向上は、異なる細胞型での内因性遺伝子発現の差異に部分的に起因する。従って、遺伝子配列に関する機能性の完全な範囲は、種々の細胞型中のその配列の過剰発現および過少発現を評価することによって、よりよく解明され得る。

10

#### 【 0 0 5 2 】

本発明によって同定されたような 1 つ以上の機能に基づく、異種細胞中の目的の遺伝子配列の発現はまた、上記細胞の表現型を変化させる手段を提供する。非限定的な例として、遺伝子配列の過剰発現は、この配列を正常に発現する細胞における細胞表面マーカーの発現の上昇を生じ得る。この配列を正常に発現しない異種細胞において、そこでのこの配列の発現は、異種細胞の表面上の細胞マーカーの発現を生じ得、従って、これらの異種細胞を同定および / または標的化するための新規な手段を提供する。

#### 【 0 0 5 3 】

本発明の 1 つの好ましい実施形態において、遺伝子配列を過剰発現および過少発現するための上記のベクターは、形質導入プロセスの一部として、細胞ゲノムへ組み込まれる。

20

#### 【 0 0 5 4 】

本発明のなお別の局面において、配列の過剰発現および過少発現からの細胞性因子の発現における検出された変化は、研究中の遺伝子配列の機能性についてのさらなる情報を提供するために、比較され得る。図 1 において、例えば、未同定の配列 2 ( 「 S e q 2 」 ) の過剰発現 ( O ) は、「構造タンパク質 1」の発現を増大させると示される。しかし、S e q 2 の過少発現 ( U ) は、コントロール細胞 ( C o n ) と比較して、「構造タンパク質 1」発現に対して非常に低い効果を有することが示された。このように、S e q 2 と構造タンパク質 1 との関係は、S e q 2 の過少発現が構造タンパク質 1 のバックグラウンド発現に対して最小の効果を有する一方、S e q 2 は、構造タンパク質 1 の発現を活性化するか、または他の様式で誘導するように機能する、関係であり得る。

30

#### 【 0 0 5 5 】

同様に、配列によってコードされる産物の機能的役割は、細胞性因子が同様に影響されるものを検討することによって、分析され得る。図 1 において、例えば、配列 1 ( 「 S e q 1 」 ) の過剰発現および過少発現は、同様に、「転写リプレッサー 1」および「転写リプレッサー 2」の発現に影響する。従って、S e q 1 の発現された産物は、同様の経路で、これらの 2 つのリプレッサーを調節するように機能する。一方、S e q 1 の過剰発現および過少発現は、「転写因子 2」の発現に対して反対の効果を有する。これは、S e q 1 が 2 つのリプレッサーおよび「転写因子 2」の細胞発現を同時に調節するように機能することを、示唆する。

40

#### 【 0 0 5 6 】

さらに、本発明は、未同定配列間の機能的関係を同定する手段を提供する。図 1 において、例えば、「S e q 3」および「S e q 4」は、「オキシドレダクターゼ 1」の発現に対して同一の効果を有する。これは、S e q 3 および S e q 4 の発現された産物が、少なくとも、その両方が「オキシドレダクターゼ 1」発現の調節において機能するという程度まで、互いに機能的に関係するというを示す。さらに、図 1 中の「S e q 2」の過剰発現は、「S e q 3」の発現を増大させることが示される ( 行 S e q 3 に対する S e q 2 の O 列、U 列および C 列を参照のこと ) 。

#### 【 0 0 5 7 】

図 1 の結果はまた、遺伝子配列の他の機能性を説明する。例えば、「S e q 4」は、そ

50

れ自身の発現レベルが分析される場合、それ自身の発現を自己調節することが示される。Seq 4の過剰発現は、Seq 1、Seq 2またはSeq 3が過剰発現された場合と比較して（同一のSeq列に対してSeq 1、Seq 2、Seq 3およびSeq 4についての4つの行を比較する）、同程度のSeq 4 RNA発現を生じない。これは、Seq 4の過剰発現が内因性Seq 4発現のフィードバック阻害を生じる状況を例示する。同様に、Seq 4の過少発現は、内因性Seq 4発現のフィードバック活性化に起因して、Seq 4の発現を削除しない。

**【0058】**

細胞性因子の発現における検出された変化はまた、機能的関係についてのさらなる情報を提供するために、合わせられ得る。非限定的な例として、サブトラクティブハイブリダイゼーションは、遺伝子配列を過剰発現する細胞と過少発現する細胞との間の発現されたRNAの差異を決定するために、定量的に使用され得る。例えば、遺伝子配列を過剰発現する細胞の第1群から発現された全RNAを使用して、この遺伝子配列を過少発現する細胞の第2群から発現された全RNAに対するサブトラクティブハイブリダイゼーションのためのcDNAを生成し得る。特定のRNA量が、第2群よりも第1群の細胞中で高い場合、ハイブリダイゼーション後に一本鎖分子として残った特定のRNAに対応する、過剰なcDNAがある。次いで、このcDNAは、単離され得、そして、検出され得る。サブトラクティブハイブリダイゼーションはまた、好ましくは、第1群として遺伝子配列を過少発現する細胞、および第2群としてこの配列を過剰発現する細胞を使用して、実施される。このようなサブトラクティブハイブリダイゼーションの結果は、図1中に示され、ここで（該当する場合）、「C」列の各未同定配列「Seq」に対して2つの数がある。1番目の数は、過剰発現群（O）由来のcDNAを使用したサブトラクティブハイブリダイゼーションを表し、そして、2番目の数は、過少発現群由来のcDNAを使用することを表す。

**【0059】**

さらに、サブトラクティブハイブリダイゼーションをまた使用して、コントロール細胞と特定の遺伝子を過剰または過少のいずれかに発現する細胞との間の、発現されたRNAを比較し得る。従って、コントロール細胞中で発現されたRNAは、遺伝子配列を過剰または過少発現する細胞で発現されたRNAから「差し引かれ」、上記遺伝子配列の機能についてのさらなる情報を提供し得る。このアプローチはまた、正常細胞と特定の遺伝子配列を過剰または過少に発現する細胞との間で差異的に発現されたRNAのクローニングについて、有利であり得る。

**【0060】**

図1中の結果はまた、細胞を異なる培養条件下に配置することによって、改変され得る。非限定的な例として、この細胞は、RNAが調製される前に、活発な発達および/または増殖条件、静止条件、温度変化条件、ならびに、リガンド存在下条件に配置され得る。このような条件の使用は、目的の遺伝子配列の1つ以上の機能性を決定するためのさらなる情報を提供する。

**【0061】**

本発明の別の局面において、1つ以上のさらなる遺伝子配列は、目的の第1の遺伝子の過剰発現または過少発現と組合せて、同時に過剰発現または過少発現される。非限定的な例として、および、図1に基づいて、Seq 1を過剰発現するベクターを形質導入された細胞は、その代わりに、別の配列（例えば「Seq 5」）を、同時に過剰または過少のいずれかに発現するベクターで別々に形質導入され得る。同様に、Seq 1を過少発現するベクターで形質導入された細胞は、その代わりに、Seq 5を、同時に過剰または過少のいずれかに発現するベクターで別々に形質導入され得る。このような同時的な過剰発現技術または過少発現技術は、任意の遺伝子配列の機能（単数または複数）ならびに機能的関係（単数または複数）を同定するか、または確認するためのさらなる情報を提供する。

**【0062】**

この同時アプローチの別の実施形態において、少なくとも3番目のベクターを使用して

、1つ以上のさらなる遺伝子配列を、同時に過剰発現または過少発現し得る。もちろん、このベクターは、第1の遺伝子配列を過剰発現または過少発現するために使用されるベクター（単数または複数）に適合性があるベクターである。この同時アプローチのなお別の実施形態において、第1の遺伝子配列は、同時に過剰または過少発現される1つ以上のさらなる遺伝子配列に近縁であり得る。非限定的な例として、第1の遺伝子配列は、野生型配列であり得、使用される細胞は、この配列の誤機能（misfunctioning）変異体に対してホモ接合性であり得、そして、発現されるさらなる遺伝子配列は、この誤機能変異体をコードする内因性配列のアンチセンスバージョンである。野生型配列を同時に発現すること、およびさらなる遺伝子配列を使用して誤機能変異体配列を過少発現することによって、第1の遺伝子配列の野生型活性は、細胞に対して回復され得る。

10

**【0063】**

同時アプローチの別の実施形態において、さらなる遺伝子配列は、癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子をコードし得る。

**【0064】**

本発明の別の局面は、本発明の実施のためのハイスループットシステムの使用である。この局面の1つの実施形態において、このシステムは、必要に応じて、コンピュータ化またはロボットにより実行され得、そしてまた上記に記載されるアレイの使用を包含し得る。このアプローチの1つの実施形態において、本発明は、遺伝子配列のライブラリー、それらを含む過剰発現ベクターおよび過少発現ベクター、このベクターを用いて形質導入された細胞、ならびにこの細胞の分析による細胞性因子に対する効果を提供する。好ましくは、遺伝子配列のライブラリーは、それぞれの区画が1つの遺伝子配列を含む、多数の区画に存在する。特に好ましい形式において、この区画は、マルチウェル容器（例えば、マルチウェルプレートであるが、本発明を限定しない）中に存在する。このようなマルチウェル容器は、遺伝子配列ライブラリーの全てまたは一部を含むことを考慮されたアレイであり得、そしてこのようなアレイ中に存在する配列の組織化は、細胞性因子に対する効果に関する分析まで、そして細胞性因子に対する効果に関する分析を含む、本発明の実施の全体にわたって維持され得る。本発明の実施について特に有利なことは、それぞれの区画内で細胞を形質導入するために1つの遺伝子配列のみを含むベクターを使用することである。

20

**【0065】**

本発明の別の局面において、別々のアレイが、目的の遺伝子配列を過剰発現および過少発現するために使用され得る。しかし、このような別々のアレイに含まれる細胞性因子に対する効果は、好ましくは、分析のより優れた容易さを提供するために組合わされる。非限定的な例として、そして一旦、遺伝子配列の過剰発現および過少発現の効果が、ライブラリーのそれぞれの配列について決定されると、その情報は、その結果のさらなる分析に先立って組合わされ得る。例えば、図1は、ライブラリーの配列1~4（最上の行を参照のこと）についての過剰発現（列「O」を参照のこと）および過少発現（列「U」を参照のこと）の多数の細胞性因子（左側の列を参照のこと）に対する効果の組合わせを示す。細胞性機能に関する実際の効果はまた、上記に議論される「サブトラクティブハイブリダイゼーション」のような手段によって組み合わされ得、次いで過剰発現および過少発現のデータと共に同時に分析され得る（例えば、図1における列「C」を参照のこと）。

30

40

**【0066】**

本発明の実施のためのさらなるアプローチにおいて、細胞性因子に対する過剰発現および過少発現の効果は、機械作動化し得るマイクロアレイまたはマクロアレイで実施される。このような機械は、好ましくは、細胞性因子に対する効果を決定するための遺伝子配列を過剰発現または過少発現する細胞を収集するように、部分的または完全に自動化され得る。遺伝子発現に対する効果を分析するための非限定的な例において、細胞性因子をコードする配列を含む「遺伝子チップ」は、これらの因子のどれが特定の遺伝子配列を過剰発現または過少発現することによって影響されるかを決定するために使用される。従って、RNA、またはそれに対して対応するcDNAは、細胞から単離され、標識化され、

50

そしてこのチップ上の配列に対してハイブリダイズされ得る。このようなハイブリダイゼーションの結果は、チップ上に存在するそれぞれの細胞性因子コード配列への効果を決定するために、コントロール細胞を用いて見られる効果と比較され得る。当然、多数のチップは、既知の多数の細胞性因子の分析を可能にするため、および他の未同定の配列に対するそれぞれの未同定の配列の分析を可能にするために使用され得る。さらに、同一のチップの複製物 (duplicate) が、特定の遺伝子配列を過剰にかまたは過少にかのいずれかに発現する細胞の分析のために使用される。

**【0067】**

分析に先立って、種々の配列を過剰または過少に発現する、形質導入細胞のライブラリーは、さらなる処理または変化させた条件に対して供され得る。本明細書中に記載されるさらなる配列の同時の過剰発現または過少発現に加えて、細胞は、種々の因子の存在に対して供され得、そして種々の増殖条件下で培養され得る。非限定的な例として、細胞は、種々の効果を誘導するように1つ以上のリガンドに曝され得る。あるいは、細胞は、細胞性因子に対するさらなる効果の同定を可能にするために、経時的に分析され得るか、またはインピボの環境 (context) 中に移植され得る。

10

**【0068】**

本発明のさらなる実施形態において、細胞性因子に対する効果の分析は、任意のアッセイの使用によって実施され得る。以下は、本発明の実施のさらなる非限定的な例として提供される。当然、これらの例は、部分的または完全に自動化された手段によって実施され得る。

20

**【0069】**

第1の非限定的な例においては、遺伝子配列を過剰または過少に発現する細胞が、細胞性因子のタンパク質レベルに対する効果について分析され得る。そのような場合、細胞のサンプルは、種々の細胞性因子について特異的な抗体を使用するウエスタンブロット分析において使用され得る。あるいは、この分析は、他の手段 (例えば、任意の量的イムノアッセイ) によって実施され得る。このような分析は、細胞性因子に対する効果のより完全な実態を提供するために、本明細書中に記載される遺伝子発現分析と合わせて実施され得る。なぜなら、RNA発現レベルにおける変化は、このRNAによってコードされるタンパク質のレベルの変化と常に密接に相関があるわけではないものであり得るからである。さらに、このアプローチは、発現が変化することを観察されたRNAによりコードされるタンパク質に指向される抗体のみを使用することによって、遺伝子発現分析に従い得る。

30

**【0070】**

第2の非限定的な例においては、遺伝子配列を過剰または過少に発現する細胞が、タンパク質活性に対する効果について分析され得る。これは、別のタンパク質または酵素のアクチベーターまたはインヒビターをコードする遺伝子配列について特に興味深いものであり得る。細胞のサンプルは、活性における変化を検出するために、酵素的アッセイまたは他のタンパク質アッセイにおいて使用され得る。例えば、特定のキナーゼのアクチベーターの過剰発現は、適切なアッセイにおいて、このキナーゼの検出可能な活性を増加させる。この効果は、キナーゼの遺伝子発現またはタンパク質レベルにおけるいずれかの変化にも独立であり得るかまたはあり得ない。

40

**【0071】**

第3の非限定的な例においては、タンパク質リン酸化反応に対する効果が、遺伝子配列を過剰または過少に発現する細胞において分析され得る。遺伝子配列を過剰または過少に発現する細胞は、リン酸化されたタンパク質が、リン基を介して放射性標識されるように増殖され得る。次いで、このような細胞に由来するサンプルは、タンパク質リン酸化における変化を検出するために、二次元ゲルまたは適切なイムノアッセイ (例えば、既知のリンタンパク質に対して特異的な抗体を用いる) によって分析され得る。

**【0072】**

第4の非限定的な例においては、遺伝子配列を過剰または過少に発現する細胞が、遺伝子産物でない細胞性因子に対する効果について分析され得る。例えば、種々の低分子 (例

50

えば、カルシウムイオン、ナトリウムイオン、および塩化物イオン；種々の酵素的サイクルにおける中間体；脂質など）の細胞内濃度に対する効果が、分析され得る。他の例においては、細胞表面上の種々の細胞性因子（例えば、脂質または糖）の産生および発現が、検出される。

【0073】

本発明はまた、遺伝子配列によってコードされる産物を単離する有利な手段を提供し、この手段は、この配列を過剰発現する細胞を収集し、そしてこの産物を精製することによって容易に達成され得る。

【0074】

本発明はさらに、過剰および過少に発現される配列について機能性が既知であることを必要とされないという利点を提供する。そのような場合、本発明の実施におけるバイオインフォマティクスの情報の包含は、遺伝子配列に対して機能性を正確に指定する可能性を増加させるが、バイオインフォマティクスに必要な時間および経費は、必要に応じて、削減され得る。

【0075】

さらに、本発明は、1つの未同定の遺伝子配列の機能性を別の配列へと関連づける能力（ability）を提供する。本発明はさらに、機能的に関連した遺伝子配列のファミリーの決定を提供するために、未同定の配列と既知の配列との間の機能的関連性を同定する有利な性能（capability）と、この能力との組み合わせを可能にする。個々のファミリーのメンバーの関連性は、機能的関連性に基づくマップとして表現され得、これは、別な方法では大規模な研究なしに認識されない。

【0076】

本明細書中に引用される全ての参考文献は、既に詳細に援用されるか否かによらずに、本明細書によってそれらの全体が参考文献として援用される。本明細書中に使用される場合、単数形で示される全ての用語は、単数形および複数形の両方を包含することを企図される。

【0077】

ここで、本発明を完全に記載したが、本発明と同一のものが、本発明の意図および範囲から逸脱することなく、そして過度の実験なしに、広範囲の等価なパラメータ、濃度、および条件の内に実施され得ることは、当業者によって理解される。

【0078】

本発明は、その特定の実施形態に関して記載されてきたが、本発明は、さらなる改変をし得ることが理解される。本出願は、一般に、本発明の原理に従い、そして本発明が属する分野において公知または慣例的な実施に含まれるような、そして本明細書中で前に記載した本質的な特徴に適用され得るような、本開示からのこのような逸脱を含む、本発明の任意の改変、使用、または適応を包含することが企図される。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1は、種々の目的の配列（「配列（Seq）」1～4）が過剰発現または過少発現される場合のサンプルの結果を示す。種々の細胞性遺伝子配列の発現の効果は、任意の相対的単位において「100」として示されるコントロール細胞における発現レベルに沿って表される。この図において、「配列」1～4は、同定されていないか、推定的に同定されるか、かつ/または既知の配列を表し得る。これらの結果は、評価のためのさらなる細胞性遺伝子配列（さらなる列が追加される）または過剰発現および過少発現のためのさらなる目的の配列（さらなる列が追加される）の包有に基づき随意に増加し得る。

【 図 1 】

RNA発現 (相対的単位)

コードされた遺伝子産物	配列 1			配列 2			配列 3			配列 4			
	Con.	D	U	C	O	U	C	O	U	C	O	U	C
転写因子 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
転写因子 2	100	30	200	0/170	100	100	0	100	100	0	100	200	0/200
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
転写抑制因子 1	100	30	200	0/170	100	100	0	100	100	0	100	100	0
転写抑制因子 2	100	200	30	170/0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
キナーゼ 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
キナーゼ 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
構造タンパク質 1	100	100	100	0	100	90	210/0	100	100	0	100	100	0
構造タンパク質 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
オキシドレダクターゼ 1	100	100	100	0	100	100	0	20	105	0/85	20	105	0/85
オキシドレダクターゼ 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
レセプター 1	100	100	100	0	100	100	0	20	105	0/85	20	105	0/85
レセプター 2	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
分泌タンパク質 1	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
分泌タンパク質 2	100	100	100	0	100	100	0	20	105	0/85	20	105	0/85
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
全て既知の配列	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
知られていない配列 (例えば、配列 1)	100	300	0	300/0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
Seq 2	100	100	100	0	300	0	300/0	100	100	0	100	100	0
Seq 3	100	100	100	0	300	90	210/0	300	0	300/0	100	100	0
Seq 4	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	150	50	100/50
など...	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0

"Con" = コントロール細胞発現  
 "D" = 過剰発現  
 "U" = 過少発現  
 "C" = 組み合わせ効果

Figure 1

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 02/02287

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12Q1/68 C12N15/10 C12N15/86		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 022 335 A (INTROGENE BV) 26 July 2000 (2000-07-26) abstract page 3, line 21 - line 36 page 8, line 11 - line 20 page 10, line 7 - line 12 page 15, line 37 - line 56; claims 15-29; examples 16,20,27 ----	1-16,19
X	WO 99 36516 A (FITZMAURICE WAYNE P ; HANLEY KATHLEEN M (US); LINDBO JOHN A (US); M) 22 July 1999 (1999-07-22) page 4, line 24 -page 7, line 20 page 9, line 15 -page 10, line 24 page 37, line 26 -page 40, line 16; claims 1-77; examples 1,4-6,9,16,19-22,35,36 ----- -/--	1-16,19
<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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  13 June 2003		Date of mailing of the international search report  25/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Tilkorn, A-C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 02/02287
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 01846 A (MORTIER KATHERINE ;DEVGEN NV (BE); BOGAERT THIERRY (BE); PLAETINCK) 13 January 2000 (2000-01-13) abstract; claims 1-48,85 page 8, line 34 -page 9, line 33 ----	1-16,19
A	WO 99 24563 A (NATSOULIS GEORGES ;BOSTIAN KEITH (US); ICONIX PHARMACEUTICALS INC) 20 May 1999 (1999-05-20) abstract page 2, line 12 -page 4, line 2 page 11, line 29 -page 13, line 12 page 23, line 4 - line 26 page 24, line 15 -page 34, line 2 page 37, line 1 - line 10 ----	1-16,19
A	WO 00 24912 A (CHOULIKA ANDRE ;PASTEUR INSTITUT (FR); CHILDRENS MEDICAL CENTER (U) 4 May 2000 (2000-05-04) the whole document -----	1-16,19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US 02/02287
**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:
  
2.  Claims Nos.: 17, 18  
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/US 02 02287

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 17,18

Claims 17 and 18 relate to methods involving the "gene sequence for which a function was identified by the method of claim 1". The gene sequence itself is not defined and could be any sequence. Due to this unclarity (Art 6 PCT) no search can be carried out for said claims.

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 02/02287

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1022335	A	26-07-2000	US 6413776 B1	02-07-2002
			AU 756605 B2	16-01-2003
			AU 4294799 A	30-12-1999
			CA 2301403 A1	16-12-1999
			EP 1022335 A1	26-07-2000
			JP 2002526031 T	20-08-2002
			WO 9964582 A2	16-12-1999
			US 2003027170 A1	06-02-2003
			US 2003059794 A1	27-03-2003
			US 6340595 B1	22-01-2002
			WO 9936516	A
CA 2318662 A1	22-07-1999			
EP 1045899 A2	25-10-2000			
JP 2002508957 T	26-03-2002			
US 2002092036 A1	11-07-2002			
US 2002164585 A1	07-11-2002			
US 2003027173 A1	06-02-2003			
WO 9936516 A2	22-07-1999			
US 2003027182 A1	06-02-2003			
US 2003027183 A1	06-02-2003			
US 2003024008 A1	30-01-2003			
US 2003028926 A1	06-02-2003			
US 2003041355 A1	27-02-2003			
US 2003064392 A1	03-04-2003			
US 2003097683 A1	22-05-2003			
US 6344597 B1	05-02-2002			
US 6426185 B1	30-07-2002			
US 6303848 B1	16-10-2001			
US 6468745 B1	22-10-2002			
US 6300133 B1	09-10-2001			
US 6300134 B1	09-10-2001			
US 2002165370 A1	07-11-2002			
US 2002168769 A1	14-11-2002			
US 2002164803 A1	07-11-2002			
US 2002069429 A1	06-06-2002			
WO 0001846	A	13-01-2000	AU 4907999 A	24-01-2000
			BR 9911802 A	22-01-2002
			CA 2332619 A1	13-01-2000
			CN 1323354 T	21-11-2001
			DE 29924298 U1	12-09-2002
			DE 29924299 U1	12-09-2002
			DE 1093526 T1	11-10-2001
			WO 0001846 A2	13-01-2000
			EP 1197567 A2	17-04-2002
			EP 1093526 A2	25-04-2001
			GB 2349885 A , B	15-11-2000
			GB 2362885 A , B	05-12-2001
			GB 2370275 A , B	26-06-2002
			HU 0103571 A2	28-01-2002
			JP 2002519072 T	02-07-2002
			NO 20010019 A	05-03-2001
			PL 347978 A1	06-05-2002
US 2003061626 A1	27-03-2003			
WO 9924563	A	20-05-1999	AU 1582799 A	31-05-1999
			EP 0966528 A1	29-12-1999

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 02/02287

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9924563 A		JP 2001507581 T WO 9924563 A1 US 6322973 B1	12-06-2001 20-05-1999 27-11-2001
WO 0024912 A	04-05-2000	AU 6522599 A WO 0024912 A1	15-05-2000 04-05-2000

---

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA11 DA03 HA11 HA17  
4B063 QA08 QA13 QQ08 QQ43 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR77