

(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2005-516579**(P2005-516579A)**

(43) 公表日 平成17年6月9日(2005.6.9)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 31/7088
A61K 45/00
A61K 48/00
A61P 17/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 31/7088
A 61 K 45/00
A 61 K 48/00
A 61 P 17/00

Z N A A
A 61 K 45/00
A 61 K 48/00
A 61 P 17/00

テーマコード(参考)

2 G O 4 5
4 B O 2 4
4 B O 2 9
4 B O 6 3
4 B O 6 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-548191 (P2002-548191)
(86) (22) 出願日 平成13年12月10日 (2001.12.10)
(85) 翻訳文提出日 平成15年7月2日 (2003.7.2)
(86) 國際出願番号 PCT/US2001/047839
(87) 國際公開番号 WO2002/046475
(87) 國際公開日 平成14年6月13日 (2002.6.13)
(31) 優先権主張番号 60/254,268
(32) 優先日 平成12年12月8日 (2000.12.8)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 301062363
キュラジョン コーポレイション
アメリカ合衆国 コネチカット 06511,
ニューヘブン, ロング ワーフ
ドライブ 555, 11ティーエイチ
フロア
(74) 代理人 100107489
弁理士 大塙 竹志
(72) 発明者 ラステリー, ルカ
アメリカ合衆国 コネティカット 06437,
ギルフォード, ペバーブッシュ
レイン 52

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】障害に関連する結節硬化複合症の検出法および処置法

(57) 【要約】

障害に関連する結節硬化複合症の検出法および処置法が開示される。障害に関連する結節硬化複合症を処置するための因子の同定法もまた、開示される。1つの局面において、本発明は、1つ以上のT S C 調節核酸配列を発現し得る1つ以上の細胞を含む試験細胞集団を提供することによって、結節硬化複合症に関連する障害に対する感受性を診断し決定する方法を提供する。次いで、1つ以上の配列(T S C X 配列と呼ばれる)の発現のレベルは、参照の細胞集団における対応する核酸の発現のレベルと比較される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体において、障害に関連する結節硬化複合症に対する感受性を診断または決定する方法であって、以下：

(a) 該被験体から、TSC 1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸配列を発現し得る細胞を含む試験細胞集団を提供する工程、

(b) 該試験細胞集団中の1つ以上の該核酸配列の発現を測定する工程；

(c) 該試験細胞集団中の該核酸配列の発現を、障害に関連する結節硬化複合症に罹患していない被験体由来の少なくとも1つの細胞を含む参照プロフィール中の核酸配列の発現と比較する工程；ならびに

(d) 該試験細胞集団および該参照プロフィール中に該核酸配列の発現レベルの差異が存在する場合、その差異を同定する工程、

を包含する方法であって、

これによって、該被験体において、障害に関連する結節硬化複合症に対する感受性を診断または決定する、方法。

【請求項 2】

請求項1に記載の方法であって、ここで、前記被験体がヒトである、方法。

【請求項 3】

請求項1に記載の方法であって、ここで、障害に関連する前記結節硬化複合症が、過誤腫、過誤組織、腎癌腫、悪性の血管筋脂肪腫、メラニン減少斑、顔面血管線維腫、粒起革様斑および蹄状体線維腫からなる群から選択される、方法。

【請求項 4】

請求項1に記載の方法であって、ここで、該方法が5つ以上の前記核酸配列の発現を比較する工程を包含する、方法。

【請求項 5】

請求項1に記載の方法であって、該方法が、20以上の前記核酸配列の発現を比較する工程を包含する、方法。

【請求項 6】

請求項1に記載の方法であって、該方法が、25以上の前記核酸配列の発現を比較する工程を包含する、方法。

【請求項 7】

被験体中の障害に関連する結節硬化複合症を処置する方法であって、該方法が、TSC-1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸の発現または活性を調節する因子を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 8】

障害に関連する結節硬化複合症のための候補治療因子を同定する方法であって、以下；

(a) TSC 1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸配列を発現し得る細胞を含む試験細胞集団を提供する工程；

(b) 該試験細胞集団と試験因子を接触させる工程；

(c) 該試験細胞集団において1つ以上の該核酸配列の発現を測定する工程；

(d) 該試験細胞集団における遺伝子の発現と、結節性硬化状態が既知である少なくとも1つの細胞を含む参照細胞集団における核酸配列の発現を比較する工程；ならびに

(e) 該試験細胞集団および参照細胞集団中に該核酸配列の発現レベルの差異が存在する場合、その差異を同定する工程；

を包含する方法であって、

それによって、障害に関連する結節硬化複合症のための治療因子を同定する、方法。

【請求項 9】

選択された被験体において適切な障害に関連する結節硬化複合症の処置に適する個別化された治療因子を同定する方法であって、以下：

10

20

40

50

(a) 該被験体から、TSC1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸配列を発現し得る細胞を含む試験細胞集団を提供する工程；

(b) 該試験細胞集団と該治療因子を接触させる工程；

(c) 該試験細胞集団において1つ以上の該核酸配列の発現を測定する工程；

(d) 障害に関連する結節性硬化状態が既知の少なくとも1つの細胞を含む参照細胞集団における核酸配列の発現と、該試験細胞集団における該核酸配列の発現を比較する工程；ならびに

(e) 該試験細胞集団および参照細胞集団中に該核酸配列の発現レベルの差異が存在する場合、その差異を同定する工程；

を包含する方法であって、

これによって、該被験体に適切な治療因子を同定する、方法。

【請求項10】

被験体において障害に関連する結節硬化複合症の処置の有効性を評価する方法であって、以下：

(a) 該被験体から、TSC1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸配列を発現し得る細胞を含む試験細胞集団を提供する工程；

(b) 該試験細胞集団において1つ以上の該核酸配列の発現を検出する工程；

(c) 該試験細胞集団における該核酸配列の発現と、障害に関連する結節硬化複合症に罹患していない被験体由来の少なくとも1つの細胞を含む参照細胞集団における該核酸配列の発現を比較する工程；ならびに

(e) 該試験細胞集団および参照細胞集団中に該核酸配列の発現レベルの差異が存在する場合、その差異を同定する工程；

を包含する方法であって、

これによって、該被験体において障害に関連する結節硬化複合症の処理の有効性を評価する、方法。

【請求項11】

TSC1～8遺伝子、10～12遺伝子、15～25遺伝子またはそれらの相補鎖からなる群から選択される核酸配列を含有する、単離された核酸。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項13】

請求項12に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項14】

請求項11に記載の核酸を含む、薬学的組成物。

【請求項15】

請求項11に記載の核酸によってコードされる、ポリペプチド。

【請求項16】

請求項15に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

【請求項17】

TSC1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される2つ以上の前記核酸配列を検出する、キット。

【請求項18】

TSC1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸を検出する、アレイ。

【請求項19】

TSC1～8、10～12、15～141および142からなる群から選択される1つ以上の核酸を含む、複数の核酸。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

(発明の分野)

本発明は、結節硬化複合症（TSC）関連障害を検出および処置する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

(発明の背景)

母斑症、または「神経皮膚障害」は、病気に冒された個体における複数の器官系を冒す表現型を示す3つのメンデルの常染色体優性遺伝疾患の群である。神経皮膚障害としては、例えば、神経線維腫症（NF）、結節硬化症（TSC）、およびフォン・ヒッペル・リンダウ（VHL）が挙げられる。これらの疾患は、全て神経学的症状および皮膚科学的症状の両方を生じる。

10

【 0 0 0 3 】

結節硬化複合症（TSC）は、常染色体優性腫瘍抑制遺伝子症候群であり、これは、複数の器官系における特有の良性腫瘍（過誤腫）の発達および先天異常（過誤組織）によって特徴づけられる。脳、皮膚、心臓および腎臓が、一般に病気に冒される。皮膚および腎臓において生じるTSC病変は、平滑筋細胞、内皮細胞、脂肪細胞、および巨大神経出現細胞を含む。この複雑な細胞の構築物にもかかわらず、TSCにおける腎臓および他の病変は、クローニングおよび異型接合性（LOH）損失の分析に基づいて、事実上のクローニング性を示す。脳において、TSCは、心室囊に並ぶ上衣下結節および癲癇性放出についての病巣として働く皮質下の過誤腫の両方を生じる。TSCは、人生の1年目において自然に消失する胎児／新生児における心臓の横紋筋腫を生じる。TSCはまた、腎血管造影、肺の症候群、および他の器官系における症状に関連する。さらに、TSCはまた、複数の皮膚科学的特徴（例えば、過少メラニンの斑、顔の血管線維腫、粒起革様斑、および爪の線維腫）に関連する。

20

【 0 0 0 4 】

この疾患の分子の性質をより理解することは、TSC患者のみでなく、類似の病理によって冒されている非TSC患者においてもTSC複合症に関連する病理を処置する新しい治療手段を提供する。

30

【 0 0 0 5 】

(発明の要旨)

本発明は、Tsc2+/-ヘテロ接合および野生型同胞マウス由来の細胞において見出される発現パターンと比較した、Tsc2ノックアウトトランスジェニックマウス由来の細胞における複数の核酸配列の発現パターンにおける変化の発見に一部基づく。これらの異なって発現される核酸は、以前には記載されていない配列および、以前に示されているが、現在までTSC調節物として同定されていない核酸配列を含む。

40

【 0 0 0 6 】

種々の局面において、本発明は、結節硬化複合症（TSC）関連障害に対する感受性を診断または検出する方法、およびこれらの障害を処置する方法を含む。例えば、1つの局面において、本発明は、1つ以上のTSC調節核酸配列を発現し得る1つ以上の細胞を含む試験細胞集団を提供することによって、結節硬化複合症に関連する障害に対する感受性を診断し決定する方法を提供する。次いで、1つ以上の配列（TSCX配列と呼ばれる）の発現のレベルは、参照の細胞集団における対応する核酸の発現のレベルと比較される。参照の細胞集団は、その結節硬化複合症関連障害の状態が既知である（すなわち、参照の細胞が、結節硬化症関連障害を有するか有さないかが既知である）細胞を含む。

【 0 0 0 7 】

本発明の別の局面は、結節硬化複合症関連障害を処置するための治療剤を同定する方法を含む。この方法は、1つ以上のTSCX核酸配列を発現し得る細胞を含む試験細胞集団を被験体から提供する工程、試験細胞集団を治療剤と接触させる工程、および参照の細胞集団における核酸配列の発現に対して試験細胞集団における核酸配列の発現を比較する工程を含む。

【 0 0 0 8 】

50

本発明のさらなる局面は、特定の被験体に適切な個別化された治療剤を選択する方法を含む。この方法は、1つ以上のTSCX核酸配列を発現し得る細胞を含む試験細胞集団を被験体から提供する工程、試験細胞集団を治療剤と接触させる工程、および参照の細胞集団における核酸配列の発現に対して試験細胞集団における核酸配列の発現を比較する工程を含む。

【0009】

結節硬化複合症で調節された、新規の核酸およびそのコードされるポリペプチドもまた、提供される。

【0010】

他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中に記載された方法および材料に類似または同等の方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書中で述べられた全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体を参考として援用される。矛盾する場合、定義を含めて本発明の明細書が統制する。さらに、材料、方法および実施例は、例示のみで、限定することを意図されない。

【0011】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0012】

(詳細な説明)

本発明は、Tsc2+/+ヘテロ接合および野生型同胞マウス由来の細胞において見出される発現パターンと比較した、Tsc2ノックアウトトランスジェニックマウス由来の細胞における複数の核酸配列の発現パターンにおける変化の発見に一部基づく。

【0013】

発現パターンにおける変化は、3つの遺伝子型(i.e.)のマウス由来の10~11日の胎児から確立された神経幹細胞(NSC)およびマウス胎児の線維芽細胞株(MEF)の細胞株のGene CallingTM分析(米国特許第5,871,697号; Shimketsら、1999 Nature Biotechnology 17; 198~803、本明細書中でその全体を参考として援用される)によって同定された。

【0014】

配列分析の概略は、表1に示される。本明細書中で同定された142の単一核酸配列は、本明細書中でTSC1-142核酸もしくはTSC1-142ポリペプチド、またはTSCX核酸もしくはTSCXポリペプチドと呼ばれる。TSC1-142遺伝子フラグメントの差異発現を、Shimketsら、Nature Biotechnology 17:198~803に記載されるような非標識オリゴヌクレオチド競合アッセイを用いて確認した。

【0015】

両方の細胞株において異なって発現される遺伝子を比較することによって、TSC-/+腫瘍形成における共通の機構の理解を確認し得た。その一方で、NSC細胞株において異なって発現される遺伝子を比較することによって、TSC腫瘍の元(すなわち、子孫)である細胞において発現される遺伝子を同定した。TSC表現型に基づいて、TSC細胞において上方制御される遺伝子は、癌の進行、詳細には、腎癌および肺癌において役割を有し得る。

【0016】

T6の配列(TSC:1-26)は、公共のデータベースにおいて見出される配列に対する配列同一性が、推定の相同意を示唆する新規マウス遺伝子を表す。

【0017】

T16の他の同定された配列は、既に記載されている。いくつかの新規の配列(すなわち、TSC:1-26)について、クローニングされた配列が、クローニングされた細胞に実質

10

20

30

40

50

的に同一の配列を含む1つ以上のさらなる配列フラグメント(例えば、ESTまたはコンティグ)とともに提供される。クローン化されたフラグメントおよびさらなるフラグメントから組立てられる複合配列を含むコンセンサス配列もまた提供される。所定のTSC配列について、その発現が、本明細書中に記載される方法において用いられ得る任意の関連する核酸配列を用いて測定され得る。既に記載された配列についてデータベース登録番号が提供される。この情報は、当業者が、TSC核酸配列の発現を検出および測定するために必要な情報を推定することを可能にする。

【0018】

TSC調節遺伝子の下位集合は、さらに以下の3つのクラスに細分化され得る：

A.Tsc2ノックアウトトランスジェニックマウス由来の細胞において上方制御される
分泌タンパク質および/または膜結合タンパク質。
10

【0019】

この分類におけるタンパク質としては、血漿リン脂質移動タンパク質、リシルヒドロキシラーゼアイソフォーム2、DVS27関連タンパク質[A B 0 2 4 5 1 8]、カテプシンL、テネイシン、ADAMTS1、メタロプロテイナーゼ-2の組織インヒビター、インテグリン-5、トロンボスポンジン2(THBS2)、アスパルチルプロテアーゼ1、Cyr61、テトラスパンNET-7、システインリッチ糖タンパク質SPARC、神経のペントラキシンレセプター、ITM2B-E25Bタンパク質外皮膜タンパク質2B、膜貫通糖タンパク質NMB、およびジンクフィンガータンパク質が挙げられる。

【0020】

これらのタンパク質は、TSCおよびTSC関連疾患の処置のための抗体スクリーニングおよび抗体結合治療のための潜在的な候補である。

【0021】

B.Tsc2ノックアウトトランスジェニックマウス由来の細胞において下方制御される
分泌タンパク質および/または膜結合タンパク質。

【0022】

この分類におけるタンパク質としては、増殖/分化因子1(GDF-1)、細胞外マトリックス関連タンパク質(Sc1)、膜2型マトリックスメタロプロテイナーゼおよびトロンボスponジン1マウスが挙げられる。

【0023】

これらのタンパク質は、TSCおよびTSC関連疾患の処置のための潜在的な候補である。

【0024】

C.酵素活性を有するタンパク質

この分類におけるタンパク質としては、増殖因子を誘導する前初期遺伝子3CH134/er p、ガラクトキナーゼ1、血清誘導キナーゼ(SNK)、PAFアセチルヒドロラーゼアスパルチルプロテアーゼ1、リシルヒドロキシラーゼアイソフォーム2、ペルオキシソーマルD2、およびD4-ジエノイル-CoAレダクターゼ(Pdcr)が挙げられる。

【0025】

これらのタンパク質は、TSCおよびTSC関連疾患の処置のための低分子スクリーニングおよび低分子薬剤治療についての潜在的な候補である。

【0026】

本明細書中で考察されるTSC調節核酸としては、以下が挙げられる：

【0027】

【表1】

10

20

30

40

表1

発見された遺伝子	TSCX 割当	SEQ ID NO	Acc #	MEF + TSC2 M. +/+ vs. (15699)		MEF + TSC2 M. +/+ vs. (15699)		MEF + TSC2 M. +/+ vs. (15699)		MEF & NSC M. +/+ vs. (15699)	
				MEF + TSC2 M. +/+ vs. (15699)	MEF & NSC M. +/+ vs. (15699)	MEF & NSC M. +/+ vs. (15699)	MEF & NSC M. +/+ vs. (15699)	MEF & NSC M. +/+ vs. (15699)			
新規遺伝子フラグメント, 2520 bp	1	1	aa914498	+1.0	+1.5	-2	+2	+1.5			
新規遺伝子フラグメント, 1863 bp	2	2	aa073509	+1.0	-6	-2	-2				
新規遺伝子フラグメント, 750 bp	3	3	AA183535	+1.0	+3	+1.0	+4				
新規遺伝子フラグメント, 281 bp, ラットのステロイド感受性遺伝子1タノバク質に対して91%A公同一性 [AAF35351]	4	4		+1.0	-1.5	+1.0	NEW				
新規遺伝子フラグメント, 1568 bp, ヒトトラスパンに対して 86% SI NET-7 [AF120266]/古い脳研究	5	5		+1.0	X	+2	+6				
新規遺伝子フラグメント, 300 bp, ラット10-ホルミルテトラビロフォレートヒドロゲナーゼに対して 94% SI [MS9861]	6	6		O	O	O	+15				
新規遺伝子フラグメント, 965 bp, ラット myr3 ミオシン-1 重鎖に対して 86% SI [X74815]	7	7		-2	X	+1.0	NEW				
新規遺伝子フラグメント, 408 bp, ラット辺縁系関連膜シバク質に対して 97% SI [U91554]	8	8		O	O	+1.0	OFF				
新規遺伝子フラグメント, 777 bp, ラットニューロンのペントキシンレセプターに対して 83% SI [AF03069]	9			+1.0	+1.0	+1.0	NEW				
新規遺伝子フラグメント, 354 bp, ヒトに対して 87% SI K1AAQ631[AB014531]	10	9		+1.0	X	-2	-5				
新規遺伝子フラグメント, 955 bp	11	10		+1.0	X	-3	-8				
新規遺伝子フラグメント, 1113 bp	12	11		+2	X	+1.0	+3				
新規遺伝子フラグメント, 918 bp	13			+1.0	+1.0	+1.0	+3				
新規遺伝子フラグメント, 1166 bp	14			+1.0	+1.0	+1.0	+1D				
新規遺伝子フラグメント, 594 bp	15	12		+1.0	+1.0	+1.0	-10				
新規遺伝子フラグメント, 713 bp	16	13		O	O	+1.0	OFF				
新規遺伝子フラグメント, 306 bp, ラットリボソームタンパク質に対して 95% SI L13a [X68282]	17	14		+1.0	-2	+1.0	X				
新規遺伝子フラグメント, 66 bp, ラットリボソームタンパク質に対して 96% SI S20 [X51537]	18	15		+1.0	-2	-2	+1.0				
新規遺伝子フラグメント, 1613 bp	19	16		+1.0	+3	+1.0	-5				
新規遺伝子フラグメント, 2245 bp	20	17		+1.0	NEW	-2	-3				
新規遺伝子フラグメント, 171 bp, 86% SI ラット非筋カルデスマロン [U18419]	21	18				+1.0		+1.5			
新規遺伝子フラグメント, 491 bp, ヒト DVS27-関連タンパク質に対して 72% SI [AB024518]	22	19						+10			
新規遺伝子フラグメント, 659 bp, ヒト ATP カセット結合トランスポーター I に対して 72% SI [AF165281]	23	20		-2	X	+1.0	NEW				
新規遺伝子フラグメント, 343 bp, ヒト選択ネキシン-5 (SNX5) に対して 84% SI [AF121855]	24	21									
新規遺伝子フラグメント, 53 bp, ラットカルシウム非 依存性 - ラトロキシンレセプターに対して 84% SI [U72487]	25	22									
新規遺伝子フラグメント, 52 bp, ラット Na+,K+-ATPase α (+) アイソフォーム触媒のサブユニットに対して 98% SI [M14512]	26			-2							
MEF & NSC -/- (保存された差異発現)											

(表1の続き)

リボソームタンパク質 L8 (RPL8)	27		U67771	-9	OFF	-3	OFF
α-Bクリスタリン (p23)	28		M63170	+1.0	+20	+2	+7
腫瘍細胞DNA J様タンパク質1	29		L16953	+1.0	+2	+3	+2
インスリン様増殖因子結合タンパク質 4	30		S80566	+1.0	-2	+3	OFF
インスリン様増殖因子結合タンパク質 5 (IGFBP5)	31		L12447	+1.0	NEW	+2	+5
Rac1	32		X57277	-2	-1.5	-2	-2
増殖因子誘導前初期遺伝子 pCH134/ep	33		S64851	+1.0	+2	+1.0	+6
ホスファチジン酸ホスファーゼ2c型 (Pppa2c)	34		AF123611	+1.0	-5	+1.0	-4
アネキシン III	35		AJ001633	+1.0	NEW	+1.0	NEW
タイポギシン関連カルシウム結合タンパク質 49	36		AF049125	+1.0	-2	+1.0	OFF
C-fos オンコジーン	37		V00727	+2	+1.5	+1.0	NEW
Stra13	38		AF010305	+2	+6	+1.0	+2
E1B 19K/Bcl-2-結合タンパク質ホモログ (Nip3)	39		AF041054	+2	+5	+1.0	+3
ペルオキシソームD2, D4-ジエノイル-CoAレダクターゼ (Pdxr)	40		AF155575	+7	NEW	+2	NEW
ガラクトキナーゼI	41		AB027012	+1.0	+4	+1.0	+1.5
α-エフラーーゼ(2-ホスホ-Dグリセラートヒドロ-化)(NNE)	42		X52379	+3	+5	+3	+13
α-N-アセチルグルコサミニダーゼ	43		AF003255	+1.0	+2	+1.0	+3
非結合タンパク質 2 (UCP2)	44		AF111998	+1.0	NEW	+2	NEW
アデニヌクレオチドキアリアについてのANC1	45		X74510	+1.0	-1.5	+1.0	-2
空胞ATPaseサブユニットA遺伝子	46		U13837	+1.0	+3	+1.0	+2
S-アデノシルメチオニン脱カルボキシラーゼ /スペルミジン/スペルミンN1アセチルトランスフェラーゼ (SSAT)	47		D12780	+1.0	+2	+1.0	+5
キサンチンデヒドロゲナーゼ	48		L10244	+1.0	+5	+1.0	+4
mBOCT	49		X62932	+1.0	+9	+1.0	NEW
血漿リン脂質トランスファーティンタンパク質	50		AB012808	+1.0	OFF	+1.0	-3
リシリビドキシラーゼアイソフォーム2	51		U37226	+1.0	+2	-2	+5
カテプシンL	52		AF080572	+3	+6	+1.0	NEW
	53		J02583	+1.0	+5	+1.0	+4

10

20

(表1の続き)

エズリン	54		X60671	+2	+4	+1.0	+4
Thy-1.2 糖タンパク質	55		M12379	-2	-4	+1.0	-10
A-X アクチン	56		J04181	+5	NEW	+6	NEW
MHC クラスI重鎖前駆体 (H-2D(b))	57		U47325	+3	+2	+1.0	+4
MHC クラスI重鎖前駆体 (H-2K(b))	58		U47328	+2	NEW	+1.0	+3
クラスIのQ領域を含むMHC領域	59		AFJ11103	+1.0	+4	-2	NEW
NGF 誘導タンパク質 TIS21 (aka BTG2)	60		M64292	+2	+2	+1.0	NEW
Ndr1	61		U60593	+2	+8	+1.0	NEW
Gly96	62		X67644	+2	+3	+1.0	+2
p8 タンパク質 MEF & NSC -/- 反差異発現	63		AFJ31196	+2	+4	+1.0	+5
アドレノメデュリン前駆体	64		U77630	+1.0	OFF	+1.0	NEW
綿維芽細胞増殖因子	65		M65053	+1.0	-3	-2	+2
血清誘導キナーゼ (SNK)	66		M96163	+1.0	-3	-2	NEW
アネキシン VI	67		X13460	+1.0	-2	+1.0	NEW
アネキシン I	68		X07486	-2	-1.5	+2	+10
アネキシン II	69		D10024	+1.0	-4	+2	+2
AP-2 転写因子	70		X57012	+1.0	OFF	+1.0	+20
Jun-B	71		J03236	+2	-4	+1.0	NEW
PAFアセチルヒドロラーゼ	72		U34277	+1.0	OFF	+1.0	+12
ホスホマンノムターゼ	73		AF007267	+1.0	+3	-2	-3
ナトリウム/カリウムATPaseβサブユニット	74		X61433	+3	+8	-2	-12
チオレドキシン	75		X77585	+1.0	+1.5	+2	-3
スペルミジンシンターゼ	76		L19311	+1.0	+2	+1.0	-2
アルデヒドデヒドロゲナーゼ II	77		M74570	+2	NEW	+1.0	OFF
電位依存性アニオングルーパー	2	78	U30838	+2	+2	+1.0	-2
テネイシン	79		D90343	+1.0	-5	-2	+4
ADAMTS1	80		D67076	-2	-2	+1.0	+2

10

20

30

(表1の続き)

メタロプロテイナーゼ-2の組織ヒビター	81	M93954	+1.0	-2	+1.0	+3
インテグリンβ-5	82	AF022110	+1.0	-3	+1.0	+1.5
トロンボスホジン2 (THBS2)	83	L07803	+1.0	-6	+1.0	NEW
膜糖タンパク質M6=主なCNSミエリン タンパク質PLP/DM20ホモログ	84	S65735	+2	NEW	+1.0	-4
ケルシリン	85	J04953	+1.0	-2	+1.0	NEW
Gage 抗原 LEC-A, env NSCのみ	86	S74315	+1.0	-2	+1.0	+5
ケーリング型 (QKI)	88	U44940	+1.0	+1.0	+1.0	-1.5
mSin3B	89	L38622	+1.0	+1.0	+1.0	+2
網膜芽細胞腫感受性タンパク質 (pp105 Rb)	90	M26391	+1.0	+1.0	+1.0	+1.5
熱ショックタンパク質 (hsp-E71)	91	L40406	+1.0	+1.0	+1.0	+2
アスペルチルプロテアーゼ1	92	AF216310	+1.0	+1.0	+1.0	+10
胎盤成長因子-1 (p1GF)	93	X80171	+1.0	+1.0	+1.0	+3
増殖／分化因子 1 (GDF-1)	94	M62301	+1.0	X	+1.0	OFF
カルギザリン/S100A11	95	U41341	+1.0	+1.0	+2	+15
Cyr61	96	M32490	+2	+1.0	+1.0	+25
ADP-リボシル化因子指向GTPase 活性化タンパク質アイフォームb (Shag1)	97	AF075462	+1.0	X	-2	-2
Ca2+ /カルモジュリン依存性マロイdin キナーゼについてのCamk-2mRNA	98	X63615	+1.0	+1.0	+1.0	-10
MAPKAPK5マイトジン活性化プロテイン キナーゼ活性化プロテインキナーゼ	99	AF039840	-2	+1.0	-2	-2
p59fynをコードするFynプロトオンコジーン	100	M27266	+1.0	+1.0	+1.0	-2
β1,4N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ	101	L25885	+1.0	X	+1.0	+1.5
筋肉コーゲンホスホリーゼ (Pygm)	102	AF124787	+1.0	X	+2	OFF
タンパク質ホスファターゼ1結合タンパク質PTG	103	U89924	+1.0	X	+1.0	-4
アルギニノスクシネットシンテターゼ (Ass)	104	M31690	+2	X	+1.0	NEW
リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオン ペルオキシダーゼ(Gpx4)	105	AF045769	+1.0	+1.0	+1.0	+5
GABAトランスポーター(GAT4)	106	L04662	+1.0	+1.0	-2	OFF
重炭酸ナトリウムトランスポーター NBC1	107	AF141934	-3	X	-3	-2
グリア原纖維酸性タンパク質 (GFAP)	108	K01347	0	0	0	NEW
トロポモジュリン	109	S76831	+1.0	X	+1.0	NEW

10

20

30

(表1の続き)

システィンリッチ糖タンパク質 SPARC	110	X04017	±1.0	+1.0	-2	+10
DSD-1- プロテオクリン	111	AJ133130	±1.0	+1.0	±1.0	OFF
細胞外マトリックス関連タンパク質 (Sel)	112	U64827	±1.0	X	±1.0	-1.5
膜型マトリックスメタプロテイナーゼ	113	D86332	O	O	-2	-8
アストロタクチン	114	U48797	O	O	-2	-10
脂肪分化関連タンパク質 (ADRP)	115	M93275	±1.0	X	+2	NEW
腎細胞癌特異的タンパク質 NOVAL	116	AF232828	O	±1.0	±1.0	OFF
ニューロンのペントラキシン 1 (NPTX1)	117	U62021	-2	X	±1.0	-10
レセプター活性改変タンパク質 1 (Ramp1)	118	AF209904	±1.0	+1.0	+2	-7
少弱過激素	119	AF015768	±1.0	X	±1.0	-4
TPA-誘導 TIS11	120	X14678	+2	±1.0	±1.0	+6
ITM2B - E25B タンパク質必須膜タンパク質 2B	121	U76253	O	O	+6	NEW
NMB	122	aj251685	-4	X	±1.0	NEW
B細胞転移遺伝子1タンパク質 (BTG1)	123	L16846	±1.0	+1.0	±1.0	+2
MEF のみ						
ケラチノサイト増殖因子／線維芽細胞増殖因子-7	124	U58503	±1.0	-10	+3	X
NOV タンパク質	125	Y09257	+2	OFF	±1.0	X
TGF-β 結合タンパク質 -2	126	AF004874	±1.0	-4	+2	X
GATA-6= ジングルフィンガーライズ因子	127	S82462	±1.0	+4	±1.0	X
PDGF-α-レセプター (PDGF-α-R)	128	M84607	-2	-6	±1.0	X
脳管平滑筋α-アクチン	129	X13297	±1.0	-6	±1.0	+1.0
α-2コラーゲン VI	130	X65582	±1.0	-8	±1.0	X
チニンα4鎖	131	U69176	±1.0	-4	O	O
PGI (ピクリカン)	132	X53928	±1.0	-5	+2	X
トロンボスオブジン1	133	M87276	-2	-4	+2	X
脆弱×精神薄弱症候群タンパク質 (Fmr1)	134	L23971	±1.0	+3	±1.0	X

10

20

30

(表1の続き)

骨芽細胞特異的因子2についての Osf-2	135	D13664	±1.0	-20	±1.0	X
Ndr2	136	AB033921	±1.0	+10	+2	+1.0
P53	137	X00741				+1.0
ツベリン (Tsc2)	138	U37775	±1.0	X	-2	OFF
αグルコンダーゼIIαサブユニット	139	U92793	±1.0	±1.0	±1.0	+
DAN	140	D50263	±1.0	Q	±1.0	+3
細胞内A粒子成分	141	D49812	±1.0	±1.0	+2	+5
アネキシング	142	U29396				+1.5

解説 =

New = デノボの発現

太字 = 遺伝子がその仕事において確認された

+ 1 . 0 = 差異がない

X = 毒性がない

Q = プロセス中

P = 部分的な毒性

O = バンドなし

発現が差示的に調節される核酸配列の更なる考察を以後に続ける。

【 0 0 2 8 】

(T S C 1)

T S C 1 は、新規の 2 5 2 0 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列

40

50

を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0029】

【化1】

```

1 GGCCTCTGGCTGGGCTCGGGCTGGGCTTGGGCTCCAGCTCGGCCCTGCACCTGTGACTCGGCCGCTTGC 81
CTCCGCTGCCCATGGCCCCGTCGGCTGCAGCTCGCCCTCGCCGCGCTACTCCGCTTCAGCTCGTAGCCGCTT 161
CTCCATCTCTCGTCTGGACGGTGGTACCGACAACCGGGACTGGGGCGATGGGGCTCGCAGGTGTCCTGGCAC 241
TGTGGGTCTGGTACTCACGTGATGTACATGCAGGATTACTGGAGGACCTGGCTCAGAGGGCTGCCGCGCTTCTTC 321
GTGGGTCTCTCTCTCGGAGTCTCCGTTCCGCTTCTGCACCTTCTGGCATGGCATTGCCATACCCAGCATCAGACTCT 401
CAAAGACCGAACAGGACTACCTCTCTGTGCTGGAGCTCATTCCTCAAGTGCCCTTCTACTTAGCCTCTACG 481
CCCACCGCTACCGGGCTGACTTGCAGCATCAGCATCCTTAGTGAATTCTAACCCAGGGATGAGGTACCCACAGCCTG 561
GGGGCCCTCGGATCTGGACTCAGCTCCGAGTCAGCAAGGGAGCTAACCCAACCCCTGGGAACCTCAGAACATGGC 641
AGAGTATATGGGCCCCGTCAGTTCTCAGAAATCTGTCTGGTCCCCTTTGGGAAGATATAGAGCTTAAAGGGATAC 721
TGCCAATCTGCCAATCTGCCGTTAGCCAGCTAGAGGGCAGCTTAGACCTTCAAATAGATCTATTCTTAGCCCT 801
CTGAGGGATCTCTGTAAGTAGGGCACGACAATGAATTCAATGGTAGGATTGAACTATGGCTAGTGACAGGGCTGGG 881
ACAGGCTTCTGCTACCCAGACTTCATTGAAGCTGTGTCGGGAGGCATCAAAGCTCTGGTAAGAGAGGAATCTT 961
TAGTACAGATCTCCATCCCCGTTCCACCTGTTACCTGAAGTGTGGTAGCCAAACTCACGGTCCCTAGGGAAAT 1041
TGACAATGGCTCTTCCCTAACGAGCACAGTGGACAGAACATCCAGGTCCGTCCTACCTTCCATCAGAGTTG 1121
TTTCCATGAGGGTGTAGGCCAACCAATTCCATGTGTCGCATATCCACACATGACCACACACACCAGAGCAGGA 1201
CTCCTCGGATGAGGCTAGACTTGAGGACACAGGAAACACACCCCTGCACCTAGAAGGGCTTGGATCGGGCAACCT 1281
GGTGGGGCAAGTGGAGCTCCATCTGACTGACTCTAACCTGGCCCTACTGCACAAAGACCAACCTGACCGTGA 1361
GGACCTCCCTCCCTGCACCAAGCTAACCTCTCTCTCTGAAGGAACCTCTGAGTGGACATG 1441
GGCCCAAGGCCAACCTAACGGAGAGGGAGGGCAGGGCTGCTACTCTCTCTGTAAC CTTCTCTGATGGGTGTC 1521

TTGCACGTCTACTCTTCACTGGCACTGCCCTCAGCTCTGCCTTACCTGTGTTAGGGACTTAAGCAGAAATACA 1601
GGGGCATTAAACAGCAAAAAAAAAAAAAAATAGGGGGTGGCGGTTTGAGAGGGACAAGAGTGGCAAGATGGG 1681
GGCTCTAGCTGCTGTCACTCCCTAACGTTGGGCTACTAGACGGTATTCCCATCTCTGGTCCCCTATGGAGACCA 1761
CCAGCTGAGATCTCTTGTCTCCCAGTTCTGTCGCCAGGGTTAGGATGCCACAGACTCAACATCCCTGCAGATT 1841
CCATCTCCCCACCCCTAACGCAAGGTAGATGGAAAGGAATCTTCTTCTACCCAGCCAGACTACTGGGCTCCA 1921
AGTTGACCAGGATGTGGATTCAAGAACGGCAGGAGCTACCCACCTCTCACGCTGGTAGACTTGTCTGGCC 2001
TGTGTTGGCTCACCTGGCTTACAGTGTAAAACACCATGGACTTCTAGAGCAGGGAGATAAGGAACAGTGTCA 2081
TTCTAGAGCCTCTGCTGGTAGACGCTCTACTGATAGAGGAGGTAAGAGACTACTGACCTCCGGCTAGGCCCTGGCTAA 2161
GCCAGGGTGGCTGCGTACAACCTTTCGCGGTCTTAGCAACCTGACGATCTTATCCGAATCCCACAGGG 2241
CCCAATGTGCAGGGCTAGCCTGGGCCATCTCCCTTCACTGGGTTGGTAGCATGTTAGGAGTGGTTCTCCT 2321
GCATGATTAGCCAAGGAAGGACAAGGGACTAGAGGGCTGAGTTAGGTCCAGACTTGTCCCCCTCCAGCCATCAC 2401
AGGATGCTGGGTGACACCCACTCCACTGACGATGCCCACCAACATCCAGGAGGGTCTCCCAAGGACTTAAAGCAA 2481
ATAAAACATATATTGTTAGAAAAA (SEQ ID NO:1)

```

(T S C 2)

T S C 2 は、新規の 1863 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0030】

【化2】

10

20

30

40

1 AAGCGTGACCTAAGTCTAGCCTGGAGCCAGGGTAGAGTGGTCAATTCTTGCTGGGTGCTGCCAGGGAGGGCCAGAC 81
 CCACAGGCTACTCAAAGGCCTAGAGACCCCTCCCCAGGAGGGCTGCTGCCAGGAGGACATGTCTGGGTCCGGGA 161
 CTGAAGTCATGTGGCCTCAGCCCCCACACCCAGAAACCCGCTTCAGGCTAAGGTGTTTGCTAGTGTGTATGTT 241
 GCTGTGCTCTGGGTGAATTAGCTTCAAATCAGGACCTGGAGCCTACCCCTGGCCAGCCAGTGTGAGCTCG 321
 GTCTGTGAGATGGGAGCTACGGGCCAGTGGAGCAGCATGTGTGGAGGGCAAGGGCTGGGACCCAGTGGTTACAGAC 401
 CTGTGGCCCTCTGGAGCAACCTGGCAGCTACGGATCCCAGAAACCCCTGGGCTTCAGCTCCCGAGGGAGAGGCTC 481
 CACGTTCTTCTCCAAAATCCCTTCTTGCTGGTCTGGACCAAAGGAGTGGGAGAGGACTCGGAGGG 561
 CCTAGGGTCCCAAGTGGGAGCTGTAGCTCTAACGACACAGCATGTGAGGGACCCCTGGCTTACTCCAAAC 641
 TGGCCTGGCGCCAGGAACCTCAGGGCAGAGCAGCCAGCTGCAGCCAGCCTGCCACTATGGTATGTTCTGGCTA 721
 AGGTCCGGAGGGAGGTTGGGTATCCCTGCCTGGGTGCTGCCCTGGGCTCTCAGAACGACAATGCTGCC 801
 CCCTGGCGGTGAGCAGGCCACAAGGTGAATGTATAGCATGAGAGGGGGACTGCCAGACGTGGCTGTGAACCTGTG 881
 CTGTCTCGGAATCTGTGACCTCTGTGCGTGAGTGCCTCATCTGTGACGTTTCACTCACCGAGGCTGAAGAAAGGAAGC 961
 AGGGGAATGAAAGCAGGGTTCTCGCCCTGACCCCTGCGAGGAGACGGCTCCTACCAACTGCGGTTGGCTCATTCG 1041
 TTTCTGATTTCTGGGTGCACTTACCTACTCAATCCCAGTGGTCAACCCCTACATCCCAGGGAGTGAGCAGTCCAG 1121
 TGCCAGCTGCCCTGTGATTGGTCCCACTTACCTACTCAATCCCAGTGGTCAACCCCTACAGTCTGGTAAACAAGGAGGGCTAA 1201
 GCCACCAAACCAGAGCCGATCCCTGCCAGGAGGGATCTGCTGAGAAAATGATAGGACTGGAGGGCCCC 1281
 ACCCAAACCAAACACTCTCTGGTTATGTGAGTAGCAGAAAGATCCGGCTGGAGCATCTTCAAGCCCTCTCCGTG 1361
 CCACCCCGCCCCCCCCCCCCCATATCACTATGCAATTCTGACCCCTGCAAAGCTGCCCTACCCGGTCCAGCT 1441
 CTGTCCGGCCCAAGAGGTGGCTAGCTGGTGGCCACAGGTGACCGAGGGCTCTTGTGTTTTCATCACAGCOGTGGTG 1521
 CGCACCCCTCCATATGTGATTTGTGAGATTGCCCTCCAGTTACGGTCCCTCTGCTGATCTGCCAGTGGAC 1601
 TATGTCATCTGAATCGAGCCAGCCCCAAGTCCCTCCAGCTCTGTAGGGCATGGCTGTGTACTGTTCTGTGCT 1681
 TTTCATTTTAAACTGGTTGGGTTGATTTTATTCGTGGGAACTTTATTTTCTTGGCAATAACTAAAGTTC 1761
 TTGTCATGTAATTCTGTGGTCTCTATTGAGCTGGGTTCATGTTAAAACAATTAAAGAAACAAAAAAA
 1841 AAAAAAAAAAAAAAAAGC (SEQ ID NO:2)

10

20

30

(T S C 3)

T S C 3 は、新規の 750 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【0031】

【化3】

CTTGTATCTACTCGGTAGTTCTACTAATTCAAGACTAGTGTAAACATTCAAGTAGTTATCTAGGGTAGAT 81
 TCAAGTTTAGATGACTAACAGTTCAAGATTTCTGATCAATTAAACACTAGAGAAATAAGTGTACTAGAGAA 161
 AAAGCAGCTCATAGTTAATCTCACCAATTGGCCCTTGCTAGCTGGCTTAGTACACATAGGATAATATGTG 241
 CACGTTCTACTTGAAGTGGTAAAGTTGACTGGCTGGAAATGGTATCTCTCTGTATAAGATGGCCATTG 321
 ACACGGTACTTATGAAGCAGTTCTGGTTGATTGAGCTCTGTGAACCTGTTCATCTTGTGTTTGTGCT 401
 GAATGGAATGGAACTGGTTGAAGTAAAGGAATATTCAATTGAAACTTGTGTTCATTTGAAAGGAATGCAAGTTCA 481
 AAAATGAAAATAAAATGAAAAGGAATAATTATTGTCAGATGGTCACTTGAGTTAAAAAATGGCTGCACACAGT
 561 AAAACTGCTAAAACAAAACACTACCTCATTGGTTGCATCTTGTGAGCTACTAATTATACCAAATGTTAAA
 641 TATTATATTGTTGAGTTCAATCTGTATGGAAAAATAATTAGTAGGTCTAAAATGCCATGCTTCCAATAAGA
 721 AGTTAAAAAAATCATCAGTAATGTGAATT (SEQ ID NO:3)

40

(T S C 4)

T S C 4 は、新規の 281 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【0032】

【化4】

1 GGGCCCTCCGTCAGAGCAACTATACCCCTACCTCGGAAGGAGCAGCAGAGAGAGAGGCCACAGGCCACCAGGAGGC 81
 CCAGCAAAGCCACCAATATGGAAAGCTCTCAGCCACCCACCTCCACCCCTGGAGGTGAGCACAAGAGTTGGGC 161
 ACAAGCCGTTCCGGACAACCGGACAGACAAACGGAAACATGGCCATCAGGACCCAAATGTGGTGCAGGTCTCACAA 241
 GCCAGTAAAGGGAGCTGCCAAAAAGAAGGACAGAATT (SEQ ID NO:4)

(T S C 5)

T S C 5 は、新規の 1568 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列

50

を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0033】

【化5】

```

1 CGCGCGGGAGCCAAGATGCCTCGCGGGACTCGGAGCAGGTGCGCTACTCGCGCGCTTCCTCTATCTTGGCTCAAGTT 81
CTCTCTCATCATCTACTCCACCGTGTCTGGCTGATGGGGCCTGGCTCTGAGTGGGATCTACGCAGAGGCAGAGC 161
GGCAGAAATACAAAACCCCTGGAAGAGTGCTTCCTGCCCGCCATCATCCTCATCCTCTGGGGTGGTCATGTTCAT 241
CGTCTCTTCATCGGGTGGCTGGCTTCCCCTCGGGACAAACCTGTGCCCTGAGTCGTTATGTATATCCTGGGATCT 321
GCCGGTGTAGGGCTTATTGGTGGCTGTATTAGGGCCGCCGAAACAGACTATTGACTTTCTGACAGACAACATC 401
CGGAGAGGAATCGAGAATTACTACGATGATCTGGACTTCAAGAACATCATGGACTTTGTCAGAAGAAGTCAAGTGCTG 481
TGGCGGGGAGGACTACAGAGACTGGAGCAAACCCAGTACCATGACTGCAGGCCCGGCCCTGGCTGACGGGTTTC 561
CCTACACCTGCTCATCGGAACACGATGTTGTCACACCATGTTGCTGAGTGGACTTCAAGAACATCATGGACTTCAAGTGCTG 641
CACAGAACATCATCATCGTGCCTGACGGACACGGCTGTTGATATGGTCATGGACAACATACCATCATGGCGGC 721
CTTTACTGGCATCTGCTTCCCTCAGTTCTGGTGTCTGACCTACTGTACATCACCCGTGGAGGACATTAT 801
CTTGGAGGACTCTGTCACGGATGGATTGCTGGACCTGGTGCAAGTCCAGAACGGACACAGCAGGCACTGGATGCTGCC 881
TGTGCTATCCGATTAGCTATGCTGATTGAGCTATCTGGCCGGCACAGCAGCTCCAGCCACTGACAAAGGGTGA 961
CATCTAAAGACTACACAAGCTGGACAGGACAGCAGCTGAGCTCCCTGCCACCCACGGCGCTGACCAAAGCCAGGGTGA 1041
TGTACCTGGTATACTGTCTGATGGCACTCTCTAGGGAAAGCTGAACCCCTGTGGGATCCGGAAACAGGGATACCC 1121
CACCTCCGGTTCTGAGTCCTGGAGAACGGCAGCTCAGGGCTCCGTGTTGGCTCTTTCTGGCAGTGCCCTGGCAG 1201
TGGCATTATGCCCTCAAGGGCAGTTTGAGTATTAAAGGCAAGAAGGGAGTGTATCTGTTCTATAGGGA 1281
AGTCTGGTGCAGCCCTGGTACACTACTCTAGATGTGACGGTGTCTCAAACTCCAGGTGCTTGAGTCCTC 1361
TGTAAAGGCTCTGCTTGGCCACCCATTCTACATATGTTTTCTTTTTTTAATAACCGTGTGGTATAC 1441
AATTAACAAGAGTTCTGGTATTCAAACTAGCCACCCCTGACCGAGTCCACTCACCC CTCCCCGTAGTCATTAATT 1521
GAACAATAATATGTGTTGGGGGGTGGCTTAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:5)

```

10

20

20

30

40

(T S C 6)

T S C 6 は、新規の 300 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0034】

【化6】

```

1 gccggcttt tggaggac tccatccatg accagttgt gcagaaagt gtggaggaaag
61 taaggaaat gaaaaatccgc gaccccccgg acagggtatac caaccatggc cccgcaaaa
121 atggggccca cctggggagg ctggggagg attggcaacg tgggtgtggaa gaagggggcca
181 cactggctg tggggggaaac caaggccccaa ggccaggctt ctttttcag ccaaccgtt
241 tcacacatcg ggaggaccac atggggaga gtccttcggg cccatcatga (SEQ ID NO:6)

```

(T S C 7)

T S C 7 は、新規の 965 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0035】

【化7】

```

1 CCCACAGCTCTGCCACTCACCGGTCAGGGAGAGCAGGGCGTGACTCGATGACAAGTGCCTTAGTTGAAGAGCAC 81
ATCTCACTCATCCTCTCTCAGTACCTGATACATTCCTCTGTGCTAACCCCCCTTGGGAGGACCCACCCCTGGAGGC 161
TGGACTTGGGCGAACAGGCACACTCACCTGCACTGCCAGGGCGGGCAGGCCATCTCCGAGCCCATGGAGCCGGAC 241
CACTAAAGACTGCTGCTGGAGAAGTGGTGTCTGGCTGATGGTCTGTTCTCTGGCTCTGCTGAAATGTGGCT 321
GGCCCATGTTGGTTATGTTAATGCTGTGCTTATAATAAGAAAGAGCCCCCAGCTGTACATTATAAAAGTGAT 401
CATATACTGTATATAGAAAAATCTAGAACACATATGAATGCAAGCAGGTAGTATTCACTGTACCCATTCAAGGGTAG 481
GTTTTATTACAGGACTCGCACCGTACTACAGACGGCCCTCTCTCTGGCTAGAGAACAGTCAGTCATTCCCG 561
CACAGTCCCTCAAGCCCCCTTACCCCTTCCCTGTAGGAAATTCTCCGTGACCCCTCTGGCTCTCCCTACTTCCTA 641
AATAAAATGTAACGGAGTCAGTGCAAAAAAAAAAATGACATTATTGTGGGTATAATTCTCTAAAAACAAA 721
ACCAGTGGTATGTCATACCCACCATGTTCCCCACTTCCATGACCGTCAAAACATCTGGGATGAGCACCTGTGAG 801
CAGGAAAGTTATGCTTAAAGAAATTCTGGCCAGGGCTGGTGGCATACACCTTAAATCCAGCACTCOGGAGGCAGAGG 881
CAGGTGGATTCTGAGTTGAGGCCAGCCAGCTGGTACAAAGTGAAGTCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAACCTG 961
TCTCG (SEQ ID NO:7)

```

(T S C 8)

50

T S C 8 は、新規の 408 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0036】

【化 8】

```

1 gccgggtctg aaaaggacta ggctggcatt ggtgacaccc agcttggcgg cagccacaca
61 ggatagttt ccatagtttt ctcaacttgc atgggttacc gtcaggaaagg actggccctc
121 agtgcttta atctcaaggc cattttgcact gtttatctcg gtgtcatccc ggtaccactc
181 aaaggcaggc gcaggccaccc ctgaggctt acatttgagg gaagcttgc gtcctgttgt
241 ggttctgtt ctcttcacttcc cggtatagt ggggtggatag ttcaactgttgc ctgttgc
301 ttgtacatcc ggcaggaga ctcgttggc agccttgcac tcatatttgc ctgactgttc
361 ctctggatgtt ctcttgcacttccatggatgttgc tcaaatty (SEQ ID NO:8)

```

(T S C 10)

T S C 10 は、新規の 354 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列 10 を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0037】

【化 9】

```

1 gtgcaccaga tggttctacga ggcccttagat aagtacggga acctcagtgc tctgggcttc
61 aagcgcaagg acaagtggga ggttatdtct tactgcccgtt actacccgtat tgacgcggaaa
121 gttagccaaagg gcttcttgc gtcggcccta gagcggtgccca acagcggtgc gatcttgc
181 ttcaactctc cagaatgggtt ctctctgcgtt gtcggccacag ttttcggcagg gggatttgc
241 actggcatctt acacccacccat ctcggccggat gtcggccactt acatcttcac tgactgcggaa
301 gccaatgtca tctgtgttgc cacacagaag cagctggaaa agatctgttgc gatct (SEQ ID NO:9)

```

(T S C 11)

T S C 11 は、新規の 955 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列 20 を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0038】

【化 10】

```

1 CGGATCATCTGGTCGCACCTTGAGGCCGGAAATCGAGTTCAAACGTGCGGGGCTTCGCCGGCTCTGCTGCC 81
TTTCTCTCCATGGCAGCGCCGGGAACCTGCGCACCGCGTCATAATTCCGGAGGCTTCATCTCCATGGCGCGCCTTC 161
TATCCCATCTACTTCCGCCCTTATGCGGCTGGAGGAATACCAAGAAGGAGCAGGCTGTAATCGAGCTGGTATTGTCCA 241
GGAAGATGTGCAACCAGGGTGAAGTGTGGTCTGATCCATTGGCAGGAAATAGATGCGTCACTGTGGCAGCATGGCATGGAGAGGGAA 321
AAAGTGGACGTCTTATCCTGTGCACTCCGAGTGGGACAATAGATGCGTCACTGTGGCAGCATGGCATGGAGAGGGAA 401
CTCTCATGCTGCTAGCCAGACCCCTTGTGATAGAGACTGTGTGCAAAAGACAGTGCTTCCCTTAACTCCCTGGAGAACCTG 481
AACAGATGCCACCAATTAGGAAGTGCCTGCGGCTCCATTGACTTTGCAAGGAGCAGAGCCAGCCTGCAAGGCTGTTGTGG 561
AAGATCTGCTGCTCTGCAGTCTTATCACTTCAAGCTGTGATGTGAACACAAGAACCTGTGGCTCAAGGTCCCTGG 641
CTGCTCTGACACCTTTGAAATAAGCGATTTCAGTGCAGTCAAGGCTTGGCAAGCTGCGCTCGCAGGGTCTTGGAGGATGTT 721
TCAGTTGATAAAAATGTTCTCTTAAAGGGAGCGACTCACACTAGACTATACCAACACAGTAGATTCTGCGTGAGGCTGC 801
AAGTCACTGTGTGGAAGTGAATAGGGAGCGAGTCACACTAGACTATACCAACACAGTAGATTCTGCGTGAGGCTGC 881

AGGTATTAATGGTTCTCTTAAAGGGAGCGAGTCACACTAGACTATACCAACACAGTAGATTCTGCGTGAGGCTGC (SEQ ID NO:10)

```

(T S C 12)

T S C 12 は、新規の 1113 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【0039】

【化 11】

10

20

30

40

1 GGAGACCCAAGATCTGAACCAGCCAGGTGCTGCACAGCCTCACTTGGGAGCAGAGGCCCTGTGGGTTAACCTG 91
 GGTCTGCCAGAACAGTCCTCCCGCAGGGAAAATCTGGGTCAAGATGGAGGCTGCTCTGGAACACTGAGTGTTCAG 161
 GGAGAAAGAGTGGGAAACCGTGGCCCTTGGGCCCAGACCCCTGCAGGAGCTGCTCGCCTTGAGGAGGGAGGCAGTC 241
 TTCAGGTGCCCTGGAGGGCTTTAGGCCATCCCCACAGCAGAGTAAAGGTGGCGCTATGTCATCGGGTGGCTTGCG 321
 CTGGTAGAACGCTGTTCTACCCCTGTCAGCCTTACACTCACACACACCCAAACACACACTTCTCGGCCCTGTATG 401
 TTCAGGTGAGGAGAACAGGGAGATGGCTCATCTTCAAGCCATGTCCTGGCCCTCTTTCATGCTCTGTGGGC 481
 TTTGGCCTGCAGCTGTTCCAGAGTTAGGGATGTGATTTGTCTGTGAGGTACCCCTGCCCTAGTGGATCAGTTACAGG 561
 CCTATGTCAGCAGCACAGAGTCCCTGTCGATATCATCACAGATAGCCTGTTCCACAGAGGAGGCCAGATGTAAGT 641
 CAGACACCTCCAGCCTACCAGTCCTGCCATCAGCTTGGCTCTAATGGGCTCTGGGGCCCTGGTGTGACTG 721
 GTACAGGACACCAAGTGGCTCAGAAAGGCTGCTGCTGAGCTCAGCCACTTATTACATGGTTCAGAGCAGATCTT 801
 GTACTCTCAGACTCAAGTATGGTGTCTGTTGACAGTAGAGGTCTGCCCTACCCCTCACCTCTCCAGCACCTC 881
 TAACAAGAACCAACTCATGCCCTGGTGTCAAGTTCTGTCTGCCCTGCCCTACCTAGATATTTATTTCTGTG 961
 TTTATGAATAGTTAACGCCCTGCCCTCTGTGCCCTTCAAGCGAAACACAGAACCTAGGCTGTGCCATTGTCTCTC 1041
 ACAGTGTAAATGAAACCTCAAGGAATATGGAATAAGCCTAGACCCCTGGAGTGGTGAAGAGTAAAAAAA (SEQ ID NO:11)

10

(T S C 1 5)

T S C 1 5 は、新規の 5 9 4 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【 0 0 4 0 】

【 化 1 2 】

1 AGATCTGTTCCCTTTCTCTCTATGCTCTCTGTAGCCTACCCCTAGGGTGATCTCTAACCCAAACTAATC 81
 CCGAGGAACAGACACTGGCTCAGCTCCACCTACTACCTGGCTCACCTGTTCCAGAATCTCCATAGAAGAGGGCACTT 161
 CTTTCTCAAGTAACTCTAACATTCTCTGCAGGATAAAATCATGAGTCCAGCCTGCTGTGAACTGGGCTGTGAG 241
 CTTCCCTGCAGAAGTGTCCATTCACTTGGGTGATCTCCCGACCAAAGACTTAGGTGTTGGCCAGCACCAGTATT 321
 CTATGAATTCCCTGATCTGGAGTTGAATAGACAGGAATCAAGACCTAGGCTTTCACTGTGTGAAACCTGAGCATGTGGC 401
 GACCTGCTGGAAGCTCTCTGCTCTGTGAAGCAGGAATGCTGTCAGGCACACAGCACAAACACACCAGTGGTGGAGA 481
 CGCTAATCCAAACACACAAATTCCACAGAAATGGCACTATCCCTGGGCTCTGCCAACATGGACAAAGCTGAGAATA 561
 AACAGTGTGTTACTTGAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:12)

20

(T S C 1 6)

T S C 1 6 は、新規の 7 1 3 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【 0 0 4 1 】

【 化 1 3 】

1 CAATTGTTTTCTAACCATCTAGGAACAATACATTGCAATAATTGATAATAGGCCATCACTGTAATAAAACTTACA 81
 GACTTTTTTAATGTAAGTTGTCACCTTGTTCTGTAACCTTCACTCTGTCACACAGGTTGGCTCATAGTTG 161
 TGTTTGCTATCAGAAATAAGAAAAACACAAGTGAAGAAAATGTTGGCATGAAGTCATCCATCTGCAATGAAAAACCTAA 241
 241 AAAGACTACGGGTCACTCATGTTATATAATTATAATCTGTTCACTGTGACAAAATTGTGGGTTTGACTCACCCA
 321 AAAGACTAAACACCAAGTTCTTACAGTATCTACAGAGCTTATCTCCCTATTATTTGGAAACTCTGAGACT
 401 CCATATTGCAAGAAGTCAAGGAATAGGCCATATAAGAAAATGAGCTGTTTATTATTCCTGCAATTAGAT
 481 CTTGGGCTCATTGTTAACAGAATAAGTGTCAAAGGTAAGCTCTTGAGCTGGGAATGAGCCATGTTCCAAACCAA
 561 CACACCCCTGTGGAAATTCTGACTCTGTTCTGCAAGAACATTGAGCTCTGGCCATTCCCCCTCATTCCT 641
 ATACTAAATTCTTGAAAGACACTGGTAACAGTTGGTAGACTACAGTTGAAAAACTCAATCCTTATTCT (SEQ ID NO:13)

30

(T S C 1 7)

T S C 1 7 は、新規の 3 0 6 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローン化フラグメントにおいて最初に同定された：

【 0 0 4 2 】

【 化 1 4 】

1 ggatccctcc accctatgac aaaaaaaagc ggatgggtt ccctgctgc ctcaagggtt
 61 gttcgctg aagcttacca gaaagttgc ttacctgggg cgtctggc atgaggctgg
 121 gtggaaatc cggcacttc cggaggagaaa cggaggaaaggccaaat
 181 gcactatgg aagaagaagc agatgtttag gttacggaaa cggcaggaaa agaatgttgg
 241 gaagaaaaatc tgcaagttca cagggcttca caagacccaaac ggactcctgg tggtaacc
 301 ataaag (SEQ ID NO:14)

40

50

(T S C 1 8)

T S C 1 8 は、新規の 6 6 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【0 0 4 3】

【化 1 5】

```
1 gaattcgaat cacgcttacc agccgcacg tgaagtcgt ggagaaggaa ttgtggggact
61 tggatca (SEQ ID NO:15)
```

(T S C 1 9)

T S C 1 9 は、新規の 1 6 1 3 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【0 0 4 4】

【化 1 6】

```
1 CCAGCTCAGAGGTTCTAGGGCAGCCGGCGCTCTCTAGTTGCAGCTGGCGGCTCCTGTGGTGGCGGCTAGGGC 81
GAGCCGGATGGCTATAAGCGCGACGGTGATCAGTCGCACGCCAACGCCCTCCATCGCTCTGCCCTCAAGAGCC 161
TATTCTGTGGGTGCAAGCACCGCACGCCAGGGCGGAGCATGGGGGTGCGGTGCGGCGGGCCGGAGGCGG 241
CGGGCAGCAGTGGCTCGGTCCCCGGCCCTGGGCCGGTCCGCCCGGCCACCGCTGCTGTGCTACTACTG 321
CTGCTGGCGGGCGGAGCGCTCAGTACTCCAGCGACCTGTGAGCTGGAGGGAGTGGCTCACCGAGAGGCACCGAG 401
CAAGGAGGTGGAGCAGGTGACCTGCGCTCGCAGGCTCTGTGGAGTGGATGTACCCAACCTGGGGGCTCATTTGA 481
ACTACGGGCCAACACCTCTCACCTGCCAGAACTTGACTGTGTGATCAAGCCTTCAGGCACCTCTGGAGCCAAT 561
ATTATTTGGAAAAACTGGAGAACTAAGACTGTTGGTGGGGACATCAGAGGTGAGCTGGCAACTGCACTGTTCA 641
CCTGGAGCAGGGAGGCTTATTGGAGGGACACCCAAACAGGACATCAGCAGAAGGACACAGGCTTCCAGTATGAGC 721
TGATGAGTGGCAGAGGGACTGGACCTGACGTGCTGCCCCCTGCGGCTTGCAGTGACACTGAGCTCTCCCTT 801
GCCATGTCACAAACACTGCTGCAGTGTGGAGTACGACCAGGGCATGGGAATTCCCTTCACTGGACATGTGCACTTGG 881
CTACCTGCGGGTAAACAGGCTTCAAGGCAGAAGGACAGGGCTTCCAGCAGCTCTGAGGACAGTGGCACTGGCTGG 961
GCCATGTCACAAACACTGCTGCAGTGTGGAGTACGACCAGGGCATGGGAATTCCCTTCACTGGACATGTGCACTTGG 1041
GAGGCACAATTGGATGTGGCCAGCTTAGTGGACTTCAAGGATGACAGGAAACAGAGAAATGGGCATAAACCC 1121
CTGTGAAATCAATATGGAGTGACTTGCAAGGGTACAGTACTGTTGCTCTCAGATGAGGCACTGTTGTGGCTCAGT 1201
CGCTCTATCATATCTGATAGAGATTGCAAGACTGGTGGCATGGGCCAGCCTGGTGTAGAACTGGGAAGGTACATGCTG 1281
TTCTGACCCCTTAGGTCCCAGCAAGGATGCCCTGACCCATTGAACTGTCGTTAAAGCAAACTAAGTTATTATTTT 1361
TTTGTAAAGAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAACTCCGGCACAGGGGGTACGCCAAATGCCAAAACAGATGC 1441
TAGAACCCCTGGGGCCCCCCCACCCCAAGGGAGACACTAGCTAACCAATTATGCTT GGAAATCCCTCTGCACCGG 1521
TAGTACGAAAGGCCACGATGCCCTCAAAGCTGCCCTGGACCGAATGCAAATGACGCTAATTCTAATCCGTAATTGTA 1601
ACCGCATTCTAC (SEQ ID NO:16)
```

(T S C 2 0)

T S C 2 0 は、新規の 2 2 4 5 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【0 0 4 5】

【化 1 7】

```
1 ACGTGACCGTGAGACCCCTAGGAGCAATGGGGGGGGCTGGCTGGCTCTGATGTTGCTGGGCTCGCGTCGCAGGGC 81
CCCGCCGGCATGTGCCGGAAAGATGAAAGGTGGTGGAGGAGCCTAACACATCGGGCTGAAATAACCGTTCTGCCCG 161
GCAAGCCGCTTCAAGCCAAAGAGAGACCCCTCAGCTGATCCGGGCCCTGCATCTCTCAGACTTGCTGGCAAGTGC 241
TAGCCTAGTGGAGTCCACGTACAAGTATGAAATTCTGCCCTTCCACACAGTCACCCAGCAGCAGGAGACCTTCCGCTGG 321
ATGCCCTACAGCGGATCTGGCATCTGGCATGAGTGGAAATCATCAACAAATACCTCAAGGGCATGTGGATGACTGAT 401
GGGGACTCCCTGCACCTCCGGAGCCGGAGAGCAAGGTGGAGCTCACCTGTGGAAAGATCAACCGACTGGCCACGTGTC 481
TGAGCCAAGCACCTGTGTATGCATTGACATTGAGACCCCTTGTGCTGCCATCCCACTCTTGTAGTGTATCCAA 561
CTCTGTAGAGGCCCTGGCAGCACCGCTGGCACAGGTGGAAACAGGACCTGGCAGATGAACTGATCACACACAGGGCTAT 641
```

10

20

30

40

GAGAAGTTGCTAAGGGTACTTTCTGAGGATGCCGGCTACTAAAGGTCCAGGAGAACCATCCCACCCAGCTGGCAG 721
GAGGTCTCAAGGGCTAGGGCTTGAGACTCTGGACAATGTAGAAAGGCACATGCAGAGCTGTACAGGAGGTACAAGA 801
CTGACGAGTCTGCTGCAACAGCATGGAATCCCCACACTCAGCCCCAGAAACCACTCACTCTCAGCACCTGGTCAGCA 881
GCTCCCCATAGGTGCAATCCCAGCAGAGCATCTGCGGAGTGAACCCAGGACTACGTGGGAACATCCTGTGAGCAAGGTGGC 961
CACGAAGAATAGAAATATCTGAGCTTGAGTGTCTTCACAGAGTGAACAAAACCTGGTGTGGTAGACACGGCTCT 1041
TTTGGCATATTCTAGATCAGACACTGTCACTGACAAACAAGAGGGACCTGCTGGCCAGCCTTGTGTGCCAAAGATCC 1121
AGACAAAAATAAGATTCAAAGTTTAATTAACTTCATCACTGATAAAAAAAACTCCATGACTCTGTAAACCAATTGCATA

AATGCTATTGTAAAAAAAAAATAAACAAATGTTAACAACTTTAACAAATTCACTAAAGTAAATGGTTATGTATTATAAATAT

1281

ATATGCTATTGTAAAAAAATTAAACAAATGTTAACAACTTTAACATTCACTAAAGTAAATGGTTATGTATTATAAATAT
 1281
 GACCACATCTGGGTTAAGAAGATTCCATTACATAACATTCTCAACTAATTCTGAAGAACAAATGAACACAAGGCTTCCA
 1361 TAAGTTAACATGCCATTCTGGGGAAAGGCCTGCCAACAGGTACACAAGACTCTGACACTACCATATACTG
 1441 TTACTATTCAACACTAGAGAGTTAGACGACAAACAGGCATCAGGACAGTGGTGGTCCCA GTTCCTAGACCCATGGCCCCA
 1521 CCTCCATTACCCACACACGGGCCCTTAAGGCTCTCTCTCCCCCTCTGGCCCTTCCACCCCAGGGTAGATCCTAGAACCT 1601
 CAGCTCTAACAGGGTCTGGATGGGAAAGTGGCCCTCTGGGACGTTCTGGTCTTCCCTGCACACCTGTCC 1681
 TCAGAGCTCACGCTGATTCCAGAACAGAGCAGATGCTCAGGAAAGCTCCCCGATGGGATGGGACCCAGGGTAGCTACCGC 1761
 CTGCCTCCCCAGCCATCACACAGCCCCAGAACTGCCAGCCCCAGCCTGGAATGTCAGCCAGGAGGAGTTAACAGAG 1841
 TAGCTTACATACAACTAAAGCTTAATGTAACGTATAACACTTGTAAATTGTCCCGATGAGCTATCAATCACAAACACTG
 1921
 TCCCTGTTACACAGAGACCAAAAGCCTGACATGGAAACAGTTCATAAATATGAATAAAAATAACATCTTAAACCATG
 2001
 20 GTAACAGTACCAAAATACACATGATCTAGGTACTGAGCTAATAATCATTATCACTATAATTAAAAACAAAGTCAC
 2081 GAAATCAGGTCAATAGTTACCTTATTAAGTAGTGCTGGCTAGCTGTGGAAATGTTGAAGATCCATTCTTAAATGATATA
 2161 GGTCTTTCTATCAGTTGTCTTATTTAAAAATGCTTTAAATTCTACTATATTAACATCTAATTGGTCAC
 2241 TGATA (SEQ ID NO:17)

(T S C 2 1)

T S C 2 1 は、新規の 171 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

(0 0 4 6)

【化 1 8】

(T S C 22)

T S C 2 2 は、新規の 491 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

[0 0 4 7]

【化 1 9】

1 CAGTTGCAGAAGGGAGAAATCACGGCAGAACTCATCGAGAACCTGAAAAATGAGACCTAGAATGAAGTATTCCAACCTCCA
81 AGATTTCCCCGGCAAAGTTCAGCAGCACCGCAGCGAAGCCCTGGTCCCGCTTGCAAAAATAAGAAGATCCAACATAAG
161 ACCAAAGAATTCTGCCATGTCTACTGCATGAGACTCCGTCGGCCTCACCATAGAAAGGAGACTAGTTATTAGGA
241 AGAACCCCACGAAAAGATATTCACTAAAATCGGGTACCAAGCATGAAGAGAACTTCTCGCCTATCCACCGGATTCTAGGA
321 AGAGATCCTGCTTGCAGTATCCAAGCATTGCTGCGTCTGTTGACACATTGAGCATCCAAAGGAACCTCACTTAAACA
401 CAGTCTCTGCCCTGAGTACATACAATGACCAATCTGTTAGTTTGTGAGAATGGATGTTATGTGATCAATGT 48
TGACGACTCTG (SEQ ID NO:19)

(T S C 2 3)

T S C 2 3 は、新規の 659 bp の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【 0 0 4 8 】

【化 2 0】

```

1 ATTTGGAATTTAAGTTTATCAATGCTTCTGGAAAGCTTAGAACTGTACACGTGTGATGTCAGTCACATAGAGGAATGTG 81
CCCGGACTGCCTCATGCCCTTATTTCTGGAAATTGAAAGATAGAATGCTGACTAGCGCAGTGACAGAAAACAAT 161
GTGGTAGTCACATCTCAGGCCATATTAAAGATCCTGTAGAGCACTATTCAATTCAAGGTTGCAGATGGAGTATTTGA 241
AACATCATTACTATGTAGATGCTGGATAGGAGTGAGGGGGAGCTAGCAGATTCCCTGCCCCATTTACAGCTGATTGA 321
TGTACAGATGTAGGTTATTTGTAAGGAACTAGAACAAATGGCCACACCCCTGCTACTTGATAGCATCAATACAG 401
AAGCCAAGAAGGACCACAAAGTAACCCCTCTCCAGGGAGAGCAGTAGCTGAAATCTCTGGATAACATGATGCG 481
TCTGACCTTGGGATCCTCACCATATGGCAAACAATGGCTTGCAGGATGAGAGACACCCACTTAAACCTCTGACGGAT 561
CTCGAATGGTTCATCTTCCGTATTAACAGTCATGGAAAACAATCAACAAACTCTGCCACGTGAAATATTTTCA 641
ACTTTCTAACCCAAAGCTT (SEQ ID NO:20)

```

(T S C 2 4)

10

T S C 2 4 は、新規の 3 4 1 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【 0 0 4 9 】

【 化 2 1 】

```

1 raáttcaaac aaagcttgg acaaggcccg gttaaaaagc aaagatgtca agttggcaga
61 gacticatcg cggagaatgtt gccaacatgtt tctgaatctg caaaadaga
121 gctgataaac ttcaaacggg aagaggtggc agcatttca aagaacctaa tcgaaatgtc
181 tgaactggaa ataaaggcatg ccgaaaacaa cgtctccctg ttgcagagct gcatacgactt
241 attcaagaaac aactgacctg ttcactctga aggacaccaa tgtgaaagcc agcatcactt
301 gcacatggat cattactgca aaagaaatag ctggacttag t (SEQ ID NO:21)

```

(T S C 2 5)

T S C 2 5 は、新規の 5 3 b p の遺伝子フラグメントである。この核酸は、以下の配列を有するクローニングフラグメントにおいて最初に同定された：

【 0 0 5 0 】

【 化 2 2 】

```
1 ggatctgca aggcttggc cagctcagaa gcccacaccctt agg (SEQ ID NO:22)
```

(一般方法)

T S C X 核酸およびコードされたポリペプチドは、上記に提供する情報を用いて同定され得る。いくつかの実施形態において、T S C X 核酸およびT S C X ポリペプチドは、それぞれのT S C X ポリペプチドについて開示された種々の配列（配列番号によって参照される）を含む核酸またはポリペプチドに対応する。

【 0 0 5 1 】

30

その種々の局面ならびに実施形態において、本発明は、配列 T S C 1 ~ 1 4 2 の 1 つ以上を発現し得る少なくとも 1 つの細胞を含む試験細胞集団を提供することを含む。「発現し得る」によって、その遺伝子が、その細胞中にインタクトな形態で存在し、そして発現され得ることが意味される。次いで、T S C X 配列の 1 つ、いくつか、または全ての発現は、存在する場合、検出され、そして好ましくは、測定される。既知の配列についてデータベース登録によって提供される配列情報、または新規に記載された配列についての配列情報を用いて、T S C X 配列の発現は、当業者に周知の技術を使用して、（存在する場合）検出され、そして測定され得る。例えば、T S C X 配列に対応する配列データベース登録内または本明細書中に開示された配列内の配列は、例えば、ノーザンプロットハイブリダイゼーション解析または、特定の核酸配列を特異的に、そして好ましくは、定量的に増幅する方法において、T S C X R N A 配列を検出するためのプローブを構築するために使用され得る。別の例としては、この配列は、例えば、増幅ベースの検出方法（例えば、逆転写ベースのポリメラーゼ連鎖反応）において、T S C X 配列を特異的に増幅するためのプライマーを構築するために使用され得る。遺伝子発現における変更が遺伝子の増幅または欠失に関連する場合、試験集団と参照集団との配列の比較は、試験細胞集団および参照細胞集団における試験されたD N A 配列の相対的な量を比較することによってなされ得る。

【 0 0 5 2 】

発現はまた、タンパク質レベルで、すなわち、本明細書中に記載の遺伝子産物によってコードされたポリペプチドのレベルを測定することによって、測定され得る。このような方

40

50

法は、当該分野で周知であり、そして、例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体に基づく免疫アッセイを含む。

【0053】

次いで、試験細胞集団におけるT S C X配列の発現レベルは、参照のプロフィール由来の1つ以上の細胞におけるその配列の発現レベルと比較される。細胞の試験集団およびコントロール集団での配列の発現は、核酸配列の発現を比較するための、当該分野で認識される方法のいずれかを用いて比較され得る。例えば、発現は、米国特許第5,871,697号およびShimketsら、Nat. Biotechnol. 17:798-803に記載されるように、GENE CALLING(登録商標)方法を用いて比較され得る。種々の実施形態において、T S C 1 ~ 1 4 2 によって表される配列の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、35、40、50、100、150または全ての発現は、測定される。所望される場合、これらの配列の発現は、発現が本明細書中に記載されるパラメーターまたは状態の1つに従って変化されると知られている他の配列と一緒に測定され得る。10

【0054】

参照プロフィールは、単一の参照集団または複数個の発現パターン由来の発現パターンである。この参照プロフィールは、本明細書中に記載される状態の1つ(例えば、結節硬化複合症関連障害)が知られている、事前に試験された細胞由来の発現パターンのデータベースであり得る。結節硬化複合症関連障害としては、例えば、複数の器官系(例えば、脳、皮膚、心臓または腎臓)での過誤腫または過誤組織、腎癌腫、悪性の血管筋脂肪腫、メラニン減少斑(hypomelanotic macules)、顔面血管線維腫、粒起革様斑および蹄状体(ungula)線維腫が挙げられる。20

【0055】

いくつかの実施形態において、試験細胞は、結節硬化複合症関連障害を含むと知られているか、またはこれを有することが疑われる被検体由来の細胞サンプルに含まれる。他の実施形態において、その細胞サンプルは、原発性腫瘍(例えば、腎癌腫)を含むと知られているか、または含むことが疑われる領域由来の被検体由来である。さらなる実施形態において、その細胞サンプルは、原発性腫瘍の転移を含むと知られているか、または含むことが疑われる領域由来の被検体由来である。

【0056】

好ましくは、参照プロフィールにおける細胞は、試験細胞とできるだけ同じ組織型(例えば、脳組織、皮膚組織、心組織または腎組織)由来である。いくつかの実施形態において、コントロール細胞は、試験細胞と同じ被検体由来(例えば、試験細胞の起源の領域に近接する領域由来)である。30

【0057】

いくつかの実施形態において、試験細胞集団は、複数の参照プロフィールと比較される。複数の参照プロフィールそれぞれは、既知のパラメーターまたは状態と異なり得る。従って、試験細胞集団は、結節硬化関連障害を有することが既知の第1の参照プロフィール、および、結節硬化関連障害を有していないことが既知の第2の参照集団と比較され得る。

【0058】

種々の実施形態において、表1に列挙されるような、別個の遺伝子プロフィールで発現される遺伝子をコードする1つ以上の配列の発現は、比較される。これらの遺伝子プロフィールとしては、例えば、「MEFおよびNSC-/-の保存された差示的発現」(例えば、T S C 1 ~ 9)、「MEFおよびNSC-/-と反対の差示的発現」(T S C 1 0 ~ 1 8)、「NSCのみ」(T S C 1 9 ~ 4 4)、および「MEFのみ」(T S C 4 5 ~ 5 7)が挙げられる。いくつかの実施形態において、2つ以上の遺伝子プロフィールのメンバーの発現が比較される。40

【0059】

参照プロフィールとの試験細胞集団における遺伝子発現プロフィールの比較が、測定された状態の存在または程度を示すか示さないかは、参照プロフィールとの比較に依存する。50

例えば、そのプロフィールが結節硬化関連障害を有する細胞からなる場合、試験細胞集団および参照プロフィールでの同様の遺伝子発現レベルは、試験細胞集団での結節硬化関連障害の存在を示す。逆に、参照プロフィールが結節硬化関連障害を有しない細胞からなる場合、試験細胞集団と参照プロフィールとの間の同様の遺伝子発現プロフィールは、試験細胞集団において結節硬化関連障害が存在しないことを示す。

【0060】

種々の実施形態において、試験細胞集団におけるこのT S C X配列は、その発現レベルが、参照プロフィールにおけるT S C X転写物のレベルに対し、2.0倍、1.5倍、または1.0倍の因数内で変化する場合、その発現レベルにおいて、抗ロイコプロテアーゼ配列の発現レベルと匹敵するとみなされる。種々の実施形態において、T S C配列の発現レベルが、参照細胞集団での対応する抗ロイコプロテアーゼ配列の発現レベルの1.0倍、1.5倍、2.0倍、またはそれ以上の倍数で参照細胞集団と異なる場合、その試験細胞集団におけるT S C配列は、発現レベルが変化したとみなされ得る。10

【0061】

所望される場合、試験細胞集団と参照プロフィールとの間の差示的に発現された配列の比較は、発現が、測定されるパラメーターまたは状態に依存しないコントロール核酸について実施され得る。試験核酸および参照核酸におけるコントロール核酸の発現レベルは、比較される集団におけるシグナルのレベルを規準化するために使用され得る。

【0062】

試験細胞集団は、任意の数の細胞、すなわち1つ以上の細胞であり得、そして、インビトロ、インビボ、またはエクスピボで提供され得る。20

【0063】

他の実施形態において、試験細胞集団は、2つ以上の亜集団に分割され得る。この亜集団は、できるだけ同一の亜集団を作成するように第1の細胞集団を分割することにより作成され得る。これは、例えば、インビトロまたはエクスピボでのスクリーニング方法において適切である。いくつかの実施形態において、種々の亜集団は、コントロール薬剤および/または試験薬剤、複数の試験薬剤、あるいは、例えば、一緒に投与される1つまたは複数の試験薬剤の異なる投薬量、または種々の組み合わせに曝され得る。

【0064】

被検体は、好ましくは、哺乳動物である。この哺乳動物は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得る。30

【0065】

(結節硬化複合症関連障害の診断)

本発明は、結節硬化複合症関連障害（例えば、複数の器官系（例えば、脳、皮膚、心臓または腎臓）での過誤腫または過誤組織、腎癌腫、悪性の血管筋脂肪腫、メラニン減少斑、顔面血管線維腫、粒起革様斑および蹄状体線維腫）の感受性を診断または決定する方法を提供する。結節硬化複合症関連障害は、結節硬化複合症関連障害を有することが疑われる被検体からの細胞の試験集団由来のT S C X核酸をコードする核酸の発現を試験することによって診断される。この細胞集団は、脳の細胞を含み得るか、または代替的に、目、皮膚、心臓または腎臓の細胞を含み得る。40

【0066】

T S C X核酸の発現は、試験細胞で測定され、そして参照プロフィールにおけるこの配列の発現と比較される。参照プロフィールは、T S C障害ポジティブ参照プロフィールであり得る。「T S C障害ポジティブ参照プロフィール」によって、参照プロフィールが、結節硬化複合症関連障害を有する組織由来の細胞を含むことが意味される。あるいは、この参照プロフィールは、T S C障害ネガティブ参照プロフィールであり得る。「T S Cネガティブ参照プロフィール」によって、参照プロフィールが、結節硬化複合症関連障害を有さない組織由来の細胞を含むことが意味される。

【0067】

参照プロフィールが、T S C障害ポジティブ参照プロフィールである場合、試験集団と参50

照プロフィールとにおける T S C X 配列間の発現の類似性は、被検体における結節硬化複合症関連障害の存在を示す。逆に、試験集団と T S C 障害ポジティブ参照プロフィールとにおける T S C X 配列間の試験細胞集団中の発現における差異は、被検体において結節硬化複合症関連障害が存在しないことを示す。

【 0 0 6 8 】

参考プロフィールが T S C 障害ネガティブ参照プロフィールである場合、試験細胞集団と T S C 障害ネガティブ参照プロフィールとの間の発現パターンでの差異は、結節硬化複合症関連障害の存在を示す。逆に、試験集団と T S C 障害ネガティブ参照プロフィールとにおける T S C X 配列間の発現の類似性は、被検体において結節硬化複合症関連障害が存在しないことを示す。

10

【 0 0 6 9 】

(結節硬化複合症に関連する障害を処置する方法)

本発明は、被験体における結節硬化複合症関連の障害を処置するための方法を提供し、この方法は、1以上のT S C X 核酸またはポリペプチドの発現を調節する化合物を、それを必要とする被験体に投与することによる。投与は、結節硬化複合症関連の障害の危険性のある（または結節硬化複合症関連の障害に対して感受性の）被験体に対して予防的または治療的であり得る。結節硬化複合症関連の障害は、例えば、複数の器官系（例えば、脳、皮膚、心臓もしくは腎臓）における過誤腫または過誤組織、腎癌腫、悪性血管筋脂肪腫、メラニン減少斑、顔面（f a c i l a）血管線維腫、粒起革様斑および蹄状体線維腫であり得る。

20

【 0 0 7 0 】

治療方法は、罹患細胞が由来する組織型由來の正常細胞に対して、罹患細胞において、T S C X 核酸の発現もしくは機能を減少または阻害する工程を包含する。これらの方法において、被験体は、有効量の化合物で処置され、この化合物は、被験体においてT S C X 核酸またはポリペプチドの量を減少させる。投与は、全身的または局所的（例えば、被験体の罹患細胞のごく近傍）であり得る。発現は、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって阻害され得る。例えば、発現は、被験体に、T S C X の発現を阻害または拮抗する核酸を投与することによって阻害され得る。1つの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドが投与されて、T S C X 核酸の発現を破壊し得る。

30

【 0 0 7 1 】

あるいは、T S C X の機能は、T S C X 遺伝子産物に結合するか、さもなければT S C X 遺伝子産物の機能を阻害する化合物を投与することによって、阻害され得る。この化合物は、例えば、T S C X 核酸によってコードされるポリペプチドに対する抗体であり得る。

【 0 0 7 2 】

これらの調節方法は、エキソビオまたはインビトロで（例えば、この薬剤と共に細胞を培養することによって）実行され得るか、あるいはインビオで（例えば、この薬剤を被験体に投与することによって）実行され得る。このように、本発明は、T S C X タンパク質または核酸分子の異常な発現または活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、薬剤（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）、あるいはT S C X 核酸またはポリペプチドの発現または活性を調節（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレート）する薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、タンパク質、またはタンパク質もしくは核酸分子の組み合わせ、またはT S C X 核酸の異常な発現もしくは活性を補償する治療剤としての核酸分子の組み合わせを投与する工程を包含する。

40

【 0 0 7 3 】

利用され得る治療剤としては、例えば以下が挙げられる：(i)過剰発現配列のポリペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；(ii)過剰発現配列に対する抗体；(iii)アンチセンス核酸もしくは「機能不全」（すなわち、1以上の過剰発現配列もしくは過少発現配列のコード配列内の異種挿入物に起因する）核酸；

50

あるいは(v) モジュレータ(すなわち、過剰発現ポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変更するインヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト)。機能不全アンチセンス分子は、相同組換えによってポリペプチドの内因性機能を「ノックアウト」するために利用される(例えば、Capuccchi, Science 244: 1288-1292 1989を参照のこと)。増加または減少したレベルは、患者の組織サンプルを(例えば、生検組織から)獲得し、そしてインビトロで RNA もしくはペプチドのレベル、発現したペプチド(または発現が変更された遺伝子の mRNA)の構造および/または活性についてアッセイすることによって、ペプチドおよび/または RNA を定量することによって、容易に検出され得る。当該分野で周知の方法としては、イムノアッセイ(例えば、ウエスタンプロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動前の免疫沈降、免疫細胞化学など)および/または mRNA の発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 7 4 】

予防剤の投与は、異常な遺伝子発現に特徴的な症状の出現の前に生じ得、その結果、疾患または障害は、予防されるか、あるいは進行が遅らされる。検出される異常な発現の型に依存して、薬剤は、被験体を処置するために使用され得る。適切な薬剤は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

20

【 0 0 7 5 】

(結節硬化症関連障害を処置または予防するための、候補治療剤を同定するためのスクリーニングアッセイ)

本明細書中に開示される差示的に発現される配列はまた、結節硬化症関連障害を処置または予防する候補治療剤を同定するために使用され得る。この治療剤は、TSCX核酸を発現し得る細胞を含む細胞集団を提供することによって同定され得る。次いで、試験細胞集団における核酸配列の発現は、参照細胞集団(これは、試験薬剤に曝露されない細胞集団であるか、またはいくつかの実施形態においては試験薬剤に曝露された細胞集団である)における核酸配列の発現と比較される。比較は、同時または時間的に別個の時点で測定された試験サンプルおよび参照サンプルに対して実行され得る。後者の例は、編集された発現情報(例えば、配列データベース)(これは、種々の薬剤の投与後の、既知の配列の発現レベルについての情報を編集する)の使用である。例えば、試験薬剤の投与後の発現レベルの変更は、コントロール薬剤の投与後に核酸配列において観察される発現変化に対して比較され得る。

30

【 0 0 7 6 】

試験サンプルに曝露されていない参照細胞集団における核酸配列の発現と比較した、試験細胞集団における核酸配列の発現の減少は、この試験薬剤が、候補治療剤であることを示す。

40

【 0 0 7 7 】

この試験薬剤は、以前に記載されていない化合物であり得るか、または以前に知られているが結節硬化複合症障害を処置するための薬剤であることが知られていない化合物であり得る。

【 0 0 7 8 】

本発明はまた、このスクリーニング方法に従って同定された化合物を含む。

【 0 0 7 9 】

過少発現遺伝子の発現を刺激するか、または過剰発現遺伝子の発現を抑制する際に有効な薬剤は、結節硬化複合症関連障害を予防する能力について、そしてこのような病態生理の処置のために有用な潜在的治療剤として、さらに試験され得る。このような化合物の臨床的有用性のさらなる評価は、毒性および臨床的有効性を評価する標準的方法を使用して実行され得る。

50

【 0 0 8 0 】

(特定の個体について適切な、結節硬化複合症関連障害を処置するための治療剤の選択)
個体の遺伝的構成の差異は、種々の薬物を代謝する相対的な能力における差異を生じ得る。被験体において代謝されて、治療剤として作用する薬剤は、病態生理学的状態に特徴的な遺伝子発現パターンからの、非病態生理学的状態に特徴的な遺伝子発現パターンへの変化を誘導することによって、自明であり得る。従って、本明細書中に開示される差示的に発現されたTSCX配列は、この薬剤が、被験体において適切な治療剤であるか否かを決定するために、選択された被験体由来の試験細胞集団において、推定治療剤または予防剤が試験されることを可能にする。

【0081】

特定の被験体に適切な治療剤を同定するために、被験体由来の試験細胞集団を、治療剤、10
および1以上のTSCX1~141の発現に曝露する。

【0082】

いくつかの実施形態において、この薬剤は、薬物を活性形態に代謝する酵素を含む細胞抽出物と最初に混合される。次いで、この治療剤の活性形態は、試験細胞集団と混合され得、そして遺伝子発現が測定される。このましくは、この細胞集団は、薬剤またはこの薬剤の活性形態と、エキソビオで接触される。

【0083】

次いで、試験細胞集団中の核酸配列の発現を、参照細胞集団中の核酸配列の発現と比較する。参照細胞集団は、その結節硬化複合症状態が既知である、少なくとも1つの細胞を含む。「結節硬化複合症状態」によって、参照細胞集団が、結節硬化複合症の対象物を有することが既知の細胞を含むか否かが意味される。20

【0084】

この試験薬剤は、任意の化合物または組成物であり得る。

【0085】

(被験体における結節硬化複合症関連疾患の処置の有効性評価)

本明細書中で同定された差次的に発現したTSCX配列はまた、モニターされるべき結節硬化複合症関連疾患の一連の処置を可能にする。この方法において、試験細胞集団は、結節硬化複合症関連疾患の治療を受ける被験体から提供される。所望であれば、試験細胞集団は、処置前、処置の間または処置後の種々の時間で被験体から採取され得る。次いで、試験細胞における1つ以上のTSCX配列(例えば、TSCX:1-142)の発現が測定され、そして病理生理学的状態が知られている細胞を含む参照細胞集団と比較される。30
好ましくは、この参照細胞は、処置に曝されていない。

【0086】

参照細胞集団が処置に曝された細胞を含まない場合、試験細胞集団と参照細胞集団におけるTSCX配列の間の発現の類似性は、処置の有効性を示す。しかし、試験集団とこの参照細胞集団におけるTSCX間の発現における差異は、処置が有効で無いことを示す。

【0087】

「有効な」とは、被験体において、処置が病理生理学における低減を導くことを意味する。処置が病理生理学的に適用され得る場合、「有効な」とは、処置が病理生理学を遅らせるか、あるいは予防することを意味する。40

【0088】

有効性は、特定の病理生理学を処置するための公知の任意の方法と関連して決定され得る。

【0089】

(結節硬化複合症関連疾患有する被験体の予後評価)

結節硬化複合症関連疾患有する被験体の予後を、試験細胞集団におけるTSCX核酸の発現と、疾患状態のスペクトルにわたって患者に由来する参照プロフィールにおける配列の発現とを比較することによって評価する方法もまた提供される。試験細胞集団と参照プロフィールのTSCX核酸の遺伝子発現を比較することによってか、または被験体由来の試験細胞集団における遺伝子発現のパターンを経時的に比較することによって、被験体の50

予後が評価され得る。

【0090】

参照プロフィールは、主に非癌性細胞または癌性細胞を含む。主に非癌性細胞を含む参照プロフィールは、非癌性参照プロフィールである。主に癌性細胞を含む参照プロフィールは、癌性参照プロフィールである。いくつかの実施形態において、癌性参照プロフィールは、主に広がった癌性細胞を含む。参照プロフィールが主に非癌性細胞を含む場合、試験細胞集団におけるTSCX核酸の増加した発現は、予後が好調でないことを示す。逆に、参照プロフィールが主に癌性細胞を含む場合、試験細胞集団におけるTSCX核酸の減少した発現は、予後がより好調なことを示す。

【0091】

(薬学的組成物)

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載される1つ以上の治療化合物を含有する、薬学的組成物または治療組成物を含む。薬学的処方物としては、経口、直腸、経鼻、局所(頬側および舌下を含む)、腔または非経口(筋内、皮下および静脈内を含む)投与、あるいは吸入または噴霧による投与に適切な処方物が挙げられ得る。処方物は、適切であれば、別個の投薬量単位において好都合に表わされ得、そして薬学分野における周知の任意の方法によって調製され得る。全てのこのような薬学的方法は、液体キャリアまたは細かく碎いた固体キャリアあるいは必要に応じてその両方を活性化合物と合わせる工程、および必要な場合、所望の処方物に生成物を成形する工程を包含する。

【0092】

経口投与に適切な薬学的処方物は、個別の単位(例えば、各々が予め決められた量の活性成分を含むカプセル、カシェ剤または錠剤；散剤または顆粒剤；あるいは溶液(懸濁液)またはエマルジョンのような)として好都合に表わされ得る。この活性成分はまた、ボーラスの舐剤またはペーストとして示され得、そして純粋な形態(すなわち、キャリアを有さない)あり得る。経口投与のための錠剤およびカプセルは、好都合な賦形剤(例えば、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤または湿潤剤を含み得る。錠剤は、必要に応じて1つ以上の処方成分を伴って、圧縮または成形によって作製され得る。圧縮錠剤は、自由流動形態の活性成分(例えば、必要に応じて結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、滑沢剤、界面活性剤または分散剤と混合された粉末または顆粒)を適切な機械で圧縮することによって調製され得る。成形された錠剤は、不活性液体希釈剤を用いて湿らせた粉末化化合物の混合物を、適切な機械において成形することによって作製され得る。この錠剤は、当該分野で周知の方法に従ってコートされ得る。経口流体調製物は、例えば、水性または油性の懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ剤またはエリキシル剤の形態であり得るか、あるいは使用前に水または適切な他のビヒクルを用いて構成するための乾燥製剤として示され得る。このような液体調製物は、慣習的な添加剤(例えば、懸濁剤、乳化剤、非水性ビヒクル(食用油を含み得る)または防腐剤)を含み得る。この錠剤は、必要に応じて、その中で、活性成分の遅延された放出または制御された放出を提供するように処方され得る。

【0093】

非経口投与のための処方物は、処方物を意図された患者の血液と等張性にする、水性または非水性の滅菌注射溶液(これらは、抗酸化剤、緩衝液、抗生物質および溶質を含み得る)；ならびに水性または非水性の滅菌懸濁液(懸濁剤および増粘剤を含み得る)を含む。これらの処方物は、単回用量または複数回用量の容器において示され得(例えば、シールしたアンプルおよびバイアル)、そして使用の直前に、滅菌液体キャリア(例えば、生理食塩水、注射用水)の添加だけを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存され得る。あるいは、処方物は連続注入のために示され得る。即席の注入溶液および懸濁液は、先に記載した種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。

【0094】

直腸投与のための処方物は、通常のキャリア(例えば、ココアバターまたはポリエチレングリコール)を含む坐剤として示され得る。口(例えば、頬側または舌下)における局所投与のための処方物は、トローチ剤(ショ糖およびアラビアゴムまたはトラガカントゴム

10

20

30

40

50

のような風味付けした基剤中に活性成分を含む)、ならびに口内錠(ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアラビアゴムのような基剤中に活性成分を含む)を含む。鼻腔内投与のために、本発明の化合物は、液体噴霧または分散可能な粉末として、あるいはドロップの形態において使用され得る。ドロップは、水性または非水性基剤で処方され得、また、1つ以上の分散剤、可溶化剤または懸濁剤を含む。液体噴霧は、加圧パックから簡便に送達される。

【0095】

吸入による投与のために、化合物は、吹入器、噴霧器、加圧パックまたはエアロゾル噴霧を送達する他の簡便な手段から簡便に送達される。加圧パックは、適切なプロペラント(例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン(dichlororotetrafluoroethane)、二酸化炭素または適切な他のガス)を含み得る。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、定量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。

【0096】

あるいは、吸入および通気法による投与のために、この化合物は、乾燥粉末組成物の形態をとり得る(例えば、乳糖またはデンプンのような適切な化合物および粉末ベースの粉末混合物)。粉末が吸入または通気法を用いて投与され得る粉末組成物は、1単位の投与形態(例えば、カプセル剤、カートリッジ、ゼラチンまたはプリスター・パック)で与えられ得る。

【0097】

所望の場合、上記活性成分の徐放を与えるように適用された、上記の処方物が、用いられ得る。この薬学的組成物はまた、抗菌剤、免疫抑制剤、または保存料などの他の活性成分も含み得る。

【0098】

特に上述された成分に加えて、本発明の処方物は、課題の型の処方物(例えば、経口投与に適する組成物は、フレーバー剤を含み得る)に関連する、当該分野において慣用的な方法も含み得ることは、理解されるべきである。

【0099】

好ましい単位用量の処方物は、活性成分の、以下に示すような有効用量またはそれらの適切な画分を含む処方物である。

【0100】

各々の上記の状態について、この組成物は、1日当たり約0.1mg/kg～約250mg/kgの用量で、経口的または注射を介して投与され得る。ヒト成体のための用量の範囲は、一般的に、約5mg～約17.5g/1日であり、好ましくは、約5mg～約10g/1日であり、最も好ましくは、約100mg～約3g/1日である。離散した単位で提供される表示の錠剤または他の単位の投与形態は、便利には、そのような投与またはその複数の投与で効果的な量(例えば、約5mg～約500mg(通常100mg～約500mg)を含む単位)を含み得る。

【0101】

薬学的組成物は、好ましくは、経口的または注射(静脈注射もしくは皮下注射)によって、投与され、そして被験体に投与された正確な量は、主治医の責任である。しかし、用いられる用量は、被験体の年齢および性別、処置される正確な障害、ならびにその重篤度を含む、多くの因子に依存する。投与の経路はまた、その状態およびその重篤度に非常に依存し得る。

【0102】

(T S C X 核酸)

T S C : 1～8、10～12、および15～25(配列番号1～22)からなる群より選択される核酸配列またはその相補体を含む新規核酸ならびにこれらの核酸を含むベクターおよび細胞もまた、本発明において提供される。

【0103】

10

20

30

40

50

従って、本発明の1つの局面は、T S C X タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離されたT S C X 核酸分子に関する。T S C X をコードする核酸（例えば、T S C X m R N A ）を同定するためのハイブリゼーションプローブとしての使用に十分な核酸フラグメントおよびT S C X 核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（P C R）のプライマーとして使用するためのフラグメントもまた含まれ得る。本明細書中に使用される場合、用語「核酸分子」とは、D N A 分子（例えば、c D N A またはゲノムD N A ）、R N A 分子（例えば、m R N A ）、スクレオチドアナログを用いて作製されたD N A またはR N A のアナログ、ならびにその誘導体、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖D N A である。

10

【0104】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、用途に依存して少なくとも約10ヌクレオチド（n t ）と例えば、約6,000 n t ほどとの間の配列をいう。プローブは、同一の核酸配列、類似の核酸配列、または相補的な核酸配列の検出において用いられる。より長いプローブは、通常、天然の供給源または組換えの供給源から得られ、非常に特異的であり、そしてオリゴマーにより非常に遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖でも二本鎖でもよく、かつP C R、膜ベースのハイブリダイゼーション技術、またはE L I S A 様技術において特異性を有するように設計され得る。

【0105】

「単離された」核酸分子とは、核酸の天然供給源において存在する他の核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子の例としては、ベクターに含まれる組換えD N A 分子、異種の宿主細胞に維持される組換えD N A 分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成D N A 分子または合成R N A 分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸分子とは、その核酸が誘導される生物のゲノムD N A において天然にはその核酸に連結している（すなわち、核酸の5'末端または3'末端に配置される）、遊離の配列である。例えば、種々の実施形態において、この単離されたT S C X 核酸分子は、約50 k b 未満、約25 k b 未満、約5 k b 未満、約4 k b 未満、約3 k b 未満、約2 k b 未満、約1 k b 未満、約0.5 k b 未満、または約0.1 k b 未満の核酸配列（この核酸配列は、この核酸が誘導される細胞のゲノムD N A において天然には核酸分子に隣接している）を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、c D N A 分子）は、組換え技術によって產生された場合、他の細胞性物質または培養培地を実質的に含み得ないか、または化学合成された場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を含み得ない。

20

【0106】

本発明の核酸分子（例えば、T S C : 1 ~ 8、10 ~ 12、および15 ~ 25のいずれかのスクレオチド配列を有する核酸分子、またはそれらのスクレオチド配列のいずれかの相補体）は、標準的な分子生物学的技術および本明細書中に提供される配列情報を用いて単離され得る。これらの核酸配列の全てまたは一部をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、T S C X 核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローン技術を用いて単離され得る（例えば、S a m b r o o k ら編、M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L 第2版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 、C o l d S p r i n g H a r b o r 、N Y 、1989；およびA u s u b e l ら編、C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y 、J o h n W i l e y & S o n s 、N e w Y o r k 、N Y 、1993に記載されている）。

30

【0107】

本発明の核酸は、テンプレートおよび適切なオリゴスクレオチドプライマーとしてc D N A 、m R N A あるいは、ゲノムD N A を用いて、標準的P C R 増幅技術に従い、増幅され得る。そのように増幅された核酸は、適切なベクターへとクローニングされ得、そしてD N A 配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、T S C X スクレオチド配列に対応する

40

50

オリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術によって（例えば、自動化DNA合成機を用いて）調製され得る。

【0108】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」とは、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチド残基は、PCR反応に用いられるのに十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれらの配列から設計され得、そして特定の細胞または組織中の同一、類似または相補的なDNAまたはRNAの存在を、増幅、確認、または明らかにするために用いられる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約10ntかつ50ntほどまで（好ましくは、約15nt～約30nt）を有する核酸配列の部分を含む。これらは、化学的に合成され得、プローブとして、用いられ得る。

10

【0109】

別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、TSCX：：1～7、10～13、19～34、45～53、58～85、111～113、120、130、132～134、および138に示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、これらの任意の配列、またはこれらの任意のヌクレオチド配列の一部に示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。TSC：1～8、10～12、および15～25に示されるヌクレオチド配列と相補的である核酸分子は、示されるヌクレオチド配列に十分に相補的な分子であり、その結果、その分子は、示されるヌクレオチド配列とほとんどミスマッチしないかまたは全くミスマッチせずに水素結合し得、それにより、安定な二本鎖を形成する。

20

【0110】

本明細書中で使用される場合、用語「相補的」とは、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-Crick塩基対またはHoogsteen塩基対をいい、用語「結合」とは、2つのポリペプチドまたは化合物または関連するポリペプチドもしくは化合物あるいはそれらの組合せの間の物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合としては、イオン結合、非イオン結合、Von der Waals結合、疎水結合などが挙げられる。物理的相互作用は、直接的または間接的のいずれかであり得る。間接的相互作用とは、別のポリペプチドまたは化合物の効果を介するものであり得るか、またはそれらに起因し得る。直接的相互作用とは、別のポリペプチドまたは化合物を介して生じることも、それらの効果に起因しても生じることもないが、他の実施的な化学的中間物質を伴うことなく、存在する相互作用をいう。

30

【0111】

さらに、本発明の核酸分子は、TSC：1～8、10～12、および15～25の核酸配列の一部（例えば、プローブもしくはプライマーとして用いられ得るフラグメントか、またはTSCXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）のみを含み得る。本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の（連続する）核酸または少なくとも4個の（連続する）アミノ酸の配列（各々、核酸の場合、特定のハイブリダイゼーションを可能とし、またはアミノ酸の場合、特定のエピトープの認識を可能とするのに十分な長さ）として規定され、そして全長配列より短いせいぜいいくらかの部分である。フラグメントは、選択した核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体とは、ネイティブの化合物より直接的にかまたは改变もしくは部分的置換のいずれかによって形成された核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログとは、そのネイティブの化合物に類似するが、同一ではない構造を有する、核酸配列またはアミノ酸配列であるが、特定の成分または側鎖に関してそのネイティブの化合物と異なる。アナログは、合成でも進化的に異なる起源に由来してもよく、そして野生型に対して類似または反対の代謝活性を有し得る。

40

【0112】

誘導体およびアナログは、下記のように、その誘導体またはアナログが改変された核酸またはアミノ酸を有する場合、全長でも全長以外でもよい。本発明の核酸またはタンパク質

50

の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、同一サイズの核酸配列もしくはアミノ酸配列にわたってか、または整列した配列（この整列は、当該分野において公知のコンピューター相同性プログラムによって行われる）と比較した場合、少なくとも約45%、約50%、約70%、約80%、約95%、約98%、または約99%の同一性（好ましくは、80~99%の同一性）によって、本発明の核酸分子またはタンパク質に対して実質的に相同であるか、あるいはこの配列がコードする核酸配列が、ストリンジエントな条件、中程度にストリンジエントな条件、または低いストリンジエントな条件下で、前出されたタンパク質をコードする配列の相補体とハイブリダイズし得る領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993および以下を参照のこと。例示的なプログラムは、デフォルト設定を用いたギャッププログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX (登録商標)、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison、WI) である（これは、Smith およびWaterman のアルゴリズムを用いる (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482-489 (これは、本明細書中に参考として援用される))。

10

20

30

40

50

【0113】

「相同核酸配列」または「相同アミノ酸配列」、あるいはこれらのバリエーションとは、上で議論されるようなヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同ヌクレオチド配列は、TSCXポリペプチドのアイソフォームをコードするこれらの配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの代替的スプライシングの結果として、同じ生物の異なる組織内で発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同ヌクレオチド配列は、ヒト以外の種のTSCXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、ヒト以外の種としては、哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、および他の生物が挙げられ得る。相同ヌクレオチド配列としてはまた、本明細書中に示されるヌクレオチド配列の天然に存在する対立遺伝子改変体および変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同ヌクレオチド配列は、ヒトTSCXタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、TSCXポリペプチドおよびTSCX活性を有するポリペプチド中の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）をコードするそれらの核酸配列を含む。相同アミノ酸配列は、ヒトTSCXポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【0114】

ヒトTSCX遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織）中のTSCXホモログおよび他の哺乳動物由来のTSCXホモログの同定および/またはクローニングに使用するために設計されたプローブおよびプライマーの作製を可能とする。このプローブ/プライマーは、代表的に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的に、ストリンジエントな条件下で、TSCX配列を含む核酸の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列、またはTSCX配列を含む核酸の連続的アンチセンス鎖ヌクレオチド配列、あるいは天然に存在するこれらの配列の変異体とハイブリダイズするヌクレオチド配列領域を含む。

【0115】

ヒトTSCXヌクレオチド配列に基づくプローブは、転写物または同じタンパク質もしくは相同タンパク質をコードするゲノム配列を検出するために用いられ得る。種々の実施形態において、このプローブは、それらに付着させた標識基（例えば、この標識基は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る）をさらに含む。そのようなプローブは、（例えば、被験体中の細胞サンプル中のTSCXをコードする核酸のレベル

を測定すること（例えば、T S C X m R N A レベルを決定することまたはゲノム T S C X 遺伝子が変異または欠失しているか否かを決定すること）によって）T S C X タンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として用いられ得る。

【 0 1 1 6 】

「T S C X の生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」とは、本発明のポリペプチドの活性と必ずしも同一ではないが、類似する活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。

「T S C X の生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、T S C X の生物学的活性（T S C X タンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする T S C : 1 ~ 8、1 0 ~ 1 2、1 5 ~ 2 5 の部分を単離し、T S C X タンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そして T S C X のコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、T S C X ポリペプチドの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、必要に応じて A T P 結合ドメインを含み得る。別の実施形態において、T S C X の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、1 つ以上の領域を含む。

【 0 1 1 7 】

（T S C X 改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、開示または参照される T S C X ヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。従って、これらの核酸は、例えば、T S C : 1 ~ 8、1 0 ~ 1 2、および 1 5 ~ 2 5 に示される T S C X 核酸配列を含むヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じ T S C X タンパク質をコードする。

【 0 1 1 8 】

T S C : 1 ~ 8、1 0 ~ 1 2、および 1 5 ~ 2 5 に示されるラット T S C X ヌクレオチド配列に加えて、T S C X ポリペプチドのアミノ酸配列における変化を導く D N A 配列の多型が、ある集団内（例えば、ヒト集団）に存在することは、当業者に理解される。T S C X 遺伝子におけるそのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因してある集団内の個体間で存在し得る。本明細書中に使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」とは、T S C X タンパク質（好ましくは、哺乳動物 T S C X タンパク質）をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。そのような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、T S C X 遺伝子のヌクレオチド配列において 1 ~ 5 % の変動性を生じる。天然の対立遺伝子のバリエーションの結果であり、かつ T S C X の機能的活性を変化させない、T S C X における任意および全てのそのようなヌクレオチド改変体および生じるアミノ酸多型は、本発明の範囲内にあると意図される。

【 0 1 1 9 】

さらに、他の種由来の T S C X タンパク質をコードし、従って、T S C : 1 ~ 8、T S C : 1 0 ~ 1 2 および T S C : 1 5 ~ 2 5 のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明の T S C X D N A の天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒト T S C X 核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒト c D N A またはその一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒト T S C X の D N A は、ヒトの膜結合性 T S C X に対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合性のヒト T S C X D N A は、可溶性のヒト T S C X に対するその相同性に基づいて単離され得る。

【 0 1 2 0 】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも 6 ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で T S C : 1 ~ 8、T S C : 1 0 ~ 1 2 および T S C : 1 5 ~ 2 5 のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも 1 0、2 5、5 0、1 0 0、2 5 0、または 5 0 0 の

10

20

30

40

50

ヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジエント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

【0121】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のT S C Xタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralogs））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジエンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。10

【0122】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジエントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジエントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジエントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点（Tm）より約5℃低いように選択される。このTmは、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下）温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、Tmでは、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジエントな条件は、pH 7.0 ~ 8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01 ~ 1.0Mナトリウムイオン（またはその他の塩）であり、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、10nt ~ 50nt）について少なくとも約30℃、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60℃であるような条件である。ストリンジエントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。20

【0123】

ストリンジエント条件は、当業者に公知であり、そしてCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジエントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中の65℃でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションは、続いて、0.2×SSC、0.01% BSA中の50℃での1回以上の洗浄を行う。ストリンジエント条件下でTSC:1~8、TSC:10~12およびTSC:15~25の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。3040

【0124】

第2の実施形態では、TSC:1~8、TSC:10~12およびTSC:15~25、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジエンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55℃での6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ
50

精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて $1 \times SSC$ 、0.1% SDS中での37での1回以上の洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジエンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら(編)、1993、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、NYおよびKriegler、1990、GENE TRANSFER AND EXPRESSION、A LABORATORY MANUAL、Stockton Press、NYを参照のこと。

【0125】

第3の実施形態では、TSC:1~8、TSC:10~12およびTSC:15~25、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、5 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 mg/mlの変性サケ精子DNA、10%(重量/容量)デキストラン硫酸中での40でのハイブリダイゼーション、続いて $2 \times SSC$ 、25 mM Tris-HCl(pH 7.4)、5 mM EDTAおよび0.1% SDS中での50での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジエンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら(編)、1993、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、NYならびにKriegler、1990、GENE TRANSFER AND EXPRESSION、A LABORATORY MANUAL、Stockton Press、NY; Shilohら、1981、Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

【0126】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、TSCX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、TSCX核酸中に変化がもたらされ得るか、またはこのTSCXタンパク質の機能的能力を変化させることなく、TSCXポリペプチド配列中に直接的に変化がもたらされ得ることをさらに理解する。いくつかの実施形態において、TSC:1~8、TSC:10~12およびTSC:15~25のヌクレオチド配列が変化され、それによってコードされるTSCXタンパク質のアミノ酸配列中に変化をもたらす。例えば、種々の「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、TSC:1~8、TSC:10~12およびTSC:15~25の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、このTSCXの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のTSCXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。

【0127】

さらに、本発明のTSCXタンパク質のファミリーメンバーの間で保存されるアミノ酸残基は、変更に対して特に受け入れ難いこともまた予想される。このように、これらの保存されたドメインは、変異に対して受容可能ではないようである。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、TSCXタンパク質のメンバーの間で保存されないか、またはある程度のみ保存されるアミノ酸残基)は、活性に必須であり得ず、従って変異に対して受容可能であるようである。

【0128】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、TSCXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなTSCXタンパク質は、TSC:1~8、TSC:10~12およびTSC:15~25を含む核酸によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列とは、アミノ酸残基が異なるが、生物学的活性をなお保持する。

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、T S C : 1 ~ 8、T S C : 1 0 ~ 1 2 およびT S C : 1 5 ~ 2 5 を含む核酸によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列のうちの1つのアミノ酸配列に、少なくとも約45%の相同性の、より好ましくは60%の、そしてさらにより好ましくは少なくとも約70%、約80%、約90%、約95%、約98%の、そして最も好ましくは少なくとも約99%の相同性のアミノ酸配列を含む。

【0129】

相同的なT S C Xタンパク質をコードする単離された核酸分子は、T S C : 1 ~ 8、T S C : 1 0 ~ 1 2 およびT S C : 1 5 ~ 2 5 を含む核酸のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。10

【0130】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびP C R媒介変異誘発）によって、T S C : 1 ~ 8、T S C : 1 0 ~ 1 2 およびT S C : 1 5 ~ 2 5 を含む核酸中に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、T S C X 中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、T S C X コード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、T S C X の生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。核酸配列の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。2030

【0131】

1つの実施形態では、変異T S C Xタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：(1)他のT S C Xタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、(2)変異T S C Xタンパク質と、T S C Xのリガンドとの間の複合体形成；(3)変異T S C Xタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；(例えば、アビジンタンパク質)；(4)A T Pを結合させる能力；あるいは(5)T S C Xタンパク質抗体を特異的に結合させる能力。40

【0132】

他の特定の実施形態において、核酸とはR N A またはD N A である。そのフラグメントまたはその相補的なポリヌクレオチド配列のフラグメントは、約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの間の長さ（例えば、約10ヌクレオチド～約90ヌクレオチドの間の長さ、もしくは約10ヌクレオチド～約75ヌクレオチドの間の長さ、約10塩基～約50塩基の間の長さ、約10塩基～約40塩基の間の長さ、または約15塩基～約30塩基の間の長さ）である。

【0133】

(アンチセンス)

本発明の別の局面は、T S C X配列、またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体50

のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のTSCXコード鎖、またはそれらの一部のみに相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。TSCXタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、またはTSCX核酸配列を含む核酸に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0134】

10

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、TSCXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、TSCXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、5'配列および3'配列をいう（すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる）。

【0135】

20

本明細書中に開示されるTSCXをコードするコード鎖配列を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン・クリック型塩基対合、またはフーグスティーン型塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、TSCX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、TSCX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、TSCX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50のヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安全性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安全性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る）。

30

【0136】

40

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以下が挙げられる：5'-フルオロウラシル、5'-プロモウラシル、5'-クロロウラシル、5'-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4'-アセチルシトシン、5'-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5'-カルボキシメチルアミノメチル-2'-チオウリジン、5'-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシリルキュー-オシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1'-メチルグアニン、1'-メチルイノシン、2',2'-ジメチルグアニン、2'-メチルアデニン、2'-メチルグアニン、3'-メチルシトシン、5'-メチルシトシン、N6-アデニン、7'-メチルグアニン、5'-メチルアミノメチルウラシル、5'-メトキシアミノメチル-2'-チオウラシル、-D-マンノシリルキュー-オシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5'-メトキシウラシル、2'-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5'-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キュー-オシン、2'-チオシトシン、5'-メチル-2'-チオウラシル、2'-チオウラシル、4'-チオウラシル、5'-メチルウラシル、ウラシル-5'-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5'-オキシ酢酸(v)、5'-メチル-2'-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2',6'-ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸

50

は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る（すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である）。

【0137】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果、それらは、T S C X タンパク質をコードする細胞性mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれらに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によって、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグループにおける特異的相互作用を介してあり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによってそれらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力なpol IIプロモーターまたはpol I I I プロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が好ましい。

10

20

30

40

【0138】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、-アノマー核酸分子である。-アノマー核酸分子は、相補的RNAとの特定の二本鎖ハイブリッドを形成し、ここで、通常の-ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する(Gaultierら(1987) Nucleic Acids Res 15:6625~6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-o-メチルリボヌクレオチド(Inoueら(1987) Nucleic Acids Res 15:6131~6148)またはキメラRNA-DNAアナログ(Inoueら(1987) FEBS Lett 215:327~330)を含み得る。

【0139】

(リボザイムおよびPNA部分)

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸(例えば、mRNA)を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子であり、これらは、その一本鎖核酸に対して相補領域を有する。従って、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドラボザイム(HasselhoffおよびGerlach(1988) Nature 334:585~591に記載される))を使用して、T S C X のmRNA転写物を触媒的に切断し、それによってT S C X のmRNAの翻訳を阻害し得る。T S C X をコードする核酸に対する特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるT S C X のDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、T S C X をコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、T S C X のmRNAを使用して、RNA分子のプールから、特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら(1993) Science 261:1411~1418を参照のこと。

【0140】

あるいは、T S C X の遺伝子発現は、T S C X 核酸の調節領域(例えば、T S C X のプロモーターおよび／またはエンハンサー)に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中のT S C X 遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害さ

50

れ得る。一般には、Helene. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6 : 569 ~ 84 ; Heleneら (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660 : 27 ~ 36 ; および Maher (1992) *Bioassays* 14 : 807 ~ 15 を参照のこと。

【0141】

種々の実施形態において、TSCX核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る (Hyrupら (1996) *Bioorg Med Chem* 4 : 5 ~ 23 を参照のこと)。本明細書中で使用される用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして4つの天然の核塩基 (nucleobase) のみが保持されている核酸模倣物 (例えば、DNA模倣物) をいう。PNAの天然の骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、上記の Hyrupら (1996) ; Perry - O'Keefeら (1996) *PNAS* 93 : 14670 ~ 675において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

【0142】

TSCXのPNAは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗原剤として使用され得る。TSCXのPNAはまた、例えばPNA指向性PCRクランピングによる遺伝子における単一塩基対変異の分析において；他の酵素 (例えば、S1ヌクレアーゼ) と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素 (Hyrup B. (1996) 上記) として；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプローブもしくはプライマーとして (Hyrupら (1996) 上記；Perry - O'Keefe (1996) 、上記) 、例えば、使用され得る。

【0143】

別の実施形態において、TSCXのPNAは、例えばそれらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、PNAに脂肪親和性基または他のヘルパー基を結合することによってか、PNA-DNAキメラの形成によってか、またはリポソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、TSCXのPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、DNA認識酵素 (例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ) がDNA部分と相互作用するのを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る (Hyrup (1996) 上記)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup (1996) 上記およびFinnら (1996) *Nucl Acids Res* 24 : 3357 ~ 63において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホルアミダイトカッティング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ (例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホルアミダイト) が、PNAとDNAの5'末端との間に使用され得る (Magら (1989) *Nucl Acid Res* 17 : 5973 ~ 88)。次いで、PNAモノマーが段階様式でカッティングされ、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する (Finnら (1996) 上記)。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いてキメラ分子が合成され得る。Petersenら (1975) *Bioorg Med Chem Lett* 5 : 1119 ~ 1124 を参照のこと。

【0144】

10

20

30

40

50

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため）、または細胞膜を横切る輸送を容易にする薬剤（例えば、Let singerら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 6553~6556；Lemaitreら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648~652；PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤（例えば、Kro1ら、1988、BioTechniques 6: 958~976を参照のこと）、またはインターラーカー剤（例えば、Zon, 1988、Pharm. Res. 5: 539~549を参照のこと）で改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など）に結合され得る。

10

20

20

30

40

50

【0145】

(TSCXポリペプチド)

本発明の1つの局面は、単離されたTSCXタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログを含む。抗TSCX抗体を惹起するための免疫原としての使用のために適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態において、ネイティブなTSCXタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いる適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、TSCXタンパク質は、組換えDNA技術によって産生される。組換え発現に代わるものとして、TSCXタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成され得る。

【0146】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、TSCXタンパク質の由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、TSCXタンパク質の調製物を含み、この調製物において、TSCXタンパク質が単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、このタンパク質は分離されている。1つの実施形態において、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非TSCXタンパク質（本明細書中において「夾雫タンパク質」とも呼ばれる）を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非TSCXタンパク質を約20%未満、なにより好ましくは非TSCXタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非TSCXタンパク質を約5%未満有する、TSCXタンパク質の調製物を含む。TSCXタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、好ましくは、培養培地を実質的に含まず、すなわち、培養培地は、そのタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す。

【0147】

用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離されているTSCXタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態において、用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学前駆体または非TSCXの化学物質を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは化学前駆体または非TSCXポリペプチドを約20%未満、なにより好ましくは化学前駆体または非TSCXポリペプチドを約10%未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非TSCXポリペプチドを約5%未満有する、TSCXタンパク質の調製物を含む。

【0148】

TSCXタンパク質の生物学的に活性な部分は、十分に相同なアミノ酸配列、またはTSCXタンパク質のアミノ酸配列（例えば、全長TSCXタンパク質より少ないアミノ酸を

含み、そして T S C X タンパク質の少なくとも 1 つ以上の活性を示す、T S C X 1 ~ 2 0 を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列) に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、T S C X タンパク質の少なくとも 1 つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。T S C X タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、1 0 、 2 5 、 5 0 、 1 0 0 またはそれより多いアミノ酸であるポリペプチド長であり得る。

【 0 1 4 9 】

本発明の T S C X タンパク質の生物学的に活性な部分は、T S C X タンパク質間に保存される上記の同定されたドメインの少なくとも 1 つを含み得る。代替の、T S C X タンパク質の生物学的に活性な部分は、上記の同定された少なくとも 2 つのドメインを含み得る。
未発明の T S C X タンパク質の別の生物学的に活性な部分は、上記の同定された少なくとも 3 つのドメインを含み得る。本発明の T S C X タンパク質のなお別の生物学的に活性な部分は、上記の同定された少なくとも 4 つのドメインを含み得る。

10

【 0 1 5 0 】

さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブな T S C X タンパク質の機能的活性のうちの 1 つ以上について評価され得る。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態において、T S C X タンパク質は、これらの T S C X タンパク質の 1 つに実質的に相同であり、そして以下に詳細に議論されるように、天然の対立遺伝子改变体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、T S C X タンパク質の機能的活性を保持する。

20

【 0 1 5 2 】

特定の実施形態において、本発明は、T S C X i c 剤が投与される、哺乳動物において発現が調節されるポリペプチド配列に 8 0 % 以上であるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを含む。

【 0 1 5 3 】

(2 つ以上の配列間の相同性の決定)

2 つのアミノ酸配列または 2 つの核酸の相同性のパーセントを決定するために、配列は、最適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップは、第 1 のアミノ酸配列または核酸配列の配列中に第 2 のアミノ酸配列または核酸配列との最適な整列のために導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第 1 の配列中の位置が、第 2 の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である)。

30

【 0 1 5 4 】

核酸配列の相同性は、2 つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野において公知のコンピュータープログラム(例えば、G C G プログラムパッケージにおいて提供される G A P ソフトウェア) を用いて決定され得る。N e e d l e m a n および W u n s c h 1 9 7 0 J M o l B i o l 4 8 : 4 4 3 ~ 4 5 3 を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定(5 . 0 の G A P 作成ペナルティーおよび 0 . 3 の G A P 伸長ペナルティー) を用いて G C G G A P ソフトウェアを用いると、上記で言及される類似の核酸配列のコード領域は、T S C X : : 1 ~ 7 、 1 0 ~ 1 3 、 1 9 ~ 3 4 、 4 5 ~ 5 3 、 5 8 ~ 8 5 、 1 1 1 ~ 1 1 3 、 1 2 0 、 1 3 0 、 1 3 2 ~ 1 3 4 および 1 3 8 を含む D N A 配列の C D S (コード) 部分と、好ましくは少なくとも 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % または 9 9 % の同一性の程度を示す。

40

【 0 1 5 5 】

用語「配列同一性」は、2 つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性」のパ

50

「パーセンテージ」は、以下により算出される：この比較領域にわたって最適に整列された 2 つの配列を比較する工程、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合には A、T、C、G、U、または I）が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を得る工程、この一致した位置の数を、比較領域内の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で除算する工程、そして結果を 100 で乗算して、配列同一性のパーセンテージを得る工程。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも 80 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 85 % の配列同一性、そして頻繁には 90 ~ 95 % の配列同一性、より通常には少なくとも 99 % の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0156】

（キメラタンパク質および融合タンパク質）

本発明はまた、TSCX のキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、TSCX の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非 TSCX ポリペプチドに作動可能に連結された、TSCX ポリペプチドを含む。「TSCX ポリペプチド」は、TSCX に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、「非 TSCX ポリペプチド」は、TSCX タンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質（例えば、TSCX タンパク質とは異なり、かつ同一または異なる生物体に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。TSCX の融合タンパク質において、この TSCX ポリペプチドは、TSCX タンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態において、TSCX の融合タンパク質は、TSCX タンパク質の少なくとも 1 つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態において、TSCX の融合タンパク質は、TSCX タンパク質の少なくとも 2 つの生物学的に活性な部分を含む。さらに別の実施形態において、TSCX の融合タンパク質は、TSCX タンパク質の少なくとも 3 つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、TSCX ポリペプチドおよび非 TSCX ポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非 TSCX ポリペプチドは、TSCX ポリペプチドの N 末端または C 末端に融合され得る。

20

【0157】

例えば、1つの実施形態において、TSCX 融合タンパク質は、第 2 のタンパク質の細胞外ドメインと作動可能に連結された TSCX ドメインを含む。このような融合タンパク質は、TSCX 活性を調節する化合物のためのスクリーニングアッセイ（このようなアッセイは以下に詳細に記載される）において、さらに利用され得る。

30

【0158】

さらに別の実施形態において、この融合タンパク質は、GST-TSCX 融合タンパク質であり、ここでは TSCX 配列が、GST（すなわち、グルタチオン S - トランスフェラーゼ）配列の C 末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換え TSCX の精製を容易にし得る。

【0159】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、N 末端に異種シグナル配列を含む TSCX タンパク質である。例えば、ネイティブの TSCX シグナル配列が取り除かれ得、そして別のタンパク質からのシグナル配列と置換され得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、TSCX の発現および / または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増加され得る。

40

【0160】

なお別の実施形態において、この融合タンパク質は、TSCX - 免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここで、1つ以上のドメインを含む TSCX 配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこの TSCX - 免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上で TSCX リガントと TSCX タンパク質との間の相互作用を阻害し、そ

50

れによってインビボのTSCX媒介シグナル伝達を抑制し得る。このTSCX-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、TSCX同族リガンドのバイオアベイラビリティに影響を与える。TSCXリガンド/TSCX相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、および細胞生存を調節（例えば、促進または阻害）することに、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのTSCX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗TSCX抗体を産生するための免疫原として用いられ得、TSCXリガンドを精製し、そしてTSCXリガンドとのTSCXの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

【0161】

本発明のTSCXキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により產生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着（stagger）末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着（cohesive）末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR增幅を、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニーリングおよび再增幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバハンギングを生じるアンカーブライマーを用いて実施し得る（例えば、Ausubelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。TSCXをコードする核酸は、この融合部分がTSCXタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

【0162】

(TSCXアゴニストおよびアンタゴニスト)

本発明はまた、TSCXアゴニスト（模倣物）としてか、またはTSCXアンタゴニストとしてかのいずれかで機能するTSCXタンパク質の改変体に関する。TSCXタンパク質の改変体（例えば、TSCXタンパク質の離散した点変異または短縮型）が、変異誘発により生成され得る。TSCXタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のTSCXタンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。TSCXタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のTSCXタンパク質の1つ以上の活性を、例えば、TSCXタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することにより阻害し得る。従って、特異的生物学的效果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。1つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、TSCXタンパク質の天然に存在する形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

【0163】

TSCXアゴニスト（模倣物）としてか、またはTSCXアンタゴニストのいずれかとしてかのいずれかで機能するTSCXタンパク質の改変体は、TSCXタンパク質アゴニスト活性またはTSCXタンパク質アンタゴニスト活性のためのTSCXタンパク質の変異体（例えば短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、TSCX改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。TSCX改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なTSCX配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にTSCX配列のセットを含む（例えば、ファージディスプレイのための）より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列に酵素的に連結することにより產生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なTSC

10

20

30

30

40

50

X 改変体のライブラリーを產生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なTSCX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で周知である。例えば、Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら(1984) Annual Review Biochem 53:323; Itakuraら(1984) Science 198:1056; Ikeら(1983) Nucl Acids Res 11:477を参照のこと。

【0164】

10

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、TSCXタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、TSCXタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのTSCXフラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、TSCXコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成され得る。この方法により、TSCXタンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

20

【0165】

30

点変異または短縮により作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするための種々の技術が当該分野で公知である。このような技法を、TSCXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発(recursive ensemble mutagenesis)(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、TSCX改変体を同定し得る(ArkkinおよびYourvan(1992)PNAS 89:7811-7815; Delgraveら(1993)Protein Engineering 6:327-331)。

(抗TSCX抗体)

40

単離されたTSCXタンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を用いて、TSCXに結合する抗体を產生するための免疫原として用いられ得る。完全長のTSCXタンパク質が用いられ得るか、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のためのTSCXの抗原性ペプチドフラグメントを提供する。TSCXの抗原性ペプチドは、TSC:1~8、10~12および15~25に示される核酸配列を含む核酸によりコードされるアミノ酸配列のうちの、少なくとも8アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体がTSCXと特異的な免疫複合体を形成するように、TSCXのエピトープを含む。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも10個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも20個のアミノ酸残基、そして最も好ましくは少なくとも30個のアミノ酸残基を含む。抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、タンパク質の表面上に位置するTSCXの領域、例えば、親水性領

50

域である。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換を伴うかまたは伴わない、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824 - 3828; KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157: 105 - 142を参照のこと。この各々が、それらの全体において、本明細書中で参考として援用される。

【0166】

TSCXポリペプチド、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログを、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の产生における免疫原として利用し得る。本明細書で用いる用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含む分子をいう。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、 F_{ab} および $F_{(ab')_2}$ フラグメント、および F_{ab} 発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。当該分野で公知の種々の手順が、TSCXタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の产生のために用いられ得る。これらのタンパク質のいくつかを以下で論議する。

【0167】

ポリクローナル抗体の产生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたはその他の哺乳動物）が、ネイティブタンパク質、またはその合成改変体、あるいは前述のものの誘導体での注射により免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換えにより発現されたTSCXタンパク質または化学的に合成されたTSCXポリペプチドを含有し得る。この調製物は、アジュバントをさらに含み得る。免疫学的応答を増大するために用いられる種々のアジュバントとしては、フロイントの完全および不完全アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、Bacille Calmette-GuerinおよびCorynebacterium parvumのようなヒトアジュバント、または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。所望であれば、TSCXに対する抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され、そしてさらに、IgG画分を得るために、プロテインAクロマトグラフィーのような、周知の技術により精製され得る。

【0168】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、TSCXの特定のエピトープと免疫反応し得る、1種類の抗原結合部位のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、代表的には、モノクローナル抗体組成物は、それと免疫反応する特定のTSCXタンパク質に対し、単一の結合親和性を示す。特定のTSCXタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対するモノクローナル抗体の調製には、継続的な細胞株培養による抗体分子の产生を提供する任意の技術が利用され得る。このような技術としては、ハイブリドーマ技術（Kohler & Milstein、1975 Nature 256: 495 - 497を参照のこと）；トリオーマ（trioma）技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら、1983 Immunol. Today 4: 72）およびヒトモノクローナル抗体を產生するためのEBVハイブリドーマ技術（Coleら、1985 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc. 77 - 96頁を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体を、本発明の実施において利用し得、そしてヒトハイブリドーマを用いることによるか（Coteら、1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026 - 2030を参照のこと）、またはインビトロでヒトB細胞をエプスタイン・バーウィルスで形質転換することにより（Coleら、1985 MONOCLON 50

AL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liess, Inc. 77 - 96 頁を参照のこと) 產生し得る。

【0169】

本発明によれば、TSCXタンパク質に特異的な单鎖抗体の產生のための技術が、適合され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、 F_{ab} 発現ライブラリーの構築のための方法が適合されて(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと)、TSCXタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナル F_{ab} フラグメントの迅速かつ有効な同定を可能にし得る。非ヒト抗体は、当該分野で周知の技術により「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第5,225,539号を参照のこと。TSCXタンパク質に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントを、当該分野で公知の技術により產生し得、これには:(i)抗体分子のペプシン消化により產生される $F_{(ab')2}$ フラグメント;(ii) $F_{(ab')2}$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより產生される F_{ab} フラグメント;(iii)抗体分子のパパインおよび還元剤での処理により產生される F_{ab} フラグメント;ならびに(iv) F_v フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0170】

さらに、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含むキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体のような、組換え抗TSCX抗体(これらは、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る)は、本発明の範囲内である。このようなキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により产生され得る。この技術は例えば、以下に記載の方法を用いる:国際出願番号PCT/US86/02269;欧洲特許出願番号184,187号;欧洲特許出願番号171,496;欧洲特許出願番号173,494;PCT国際公開番号WO 86/01533;米国特許第4,816,567号;欧洲特許出願番号125,023号;Betterら(1988)Science 240:1041~1043;Liuら(1987)PNAS 84:3439~3443;Liuら(1987)J Immunol. 139:3521~3526;Sunら(1987)PNAS 84:214~218;Nishimuraら(1987)Cancer Res 47:999~1005;Woodら(1985)Nature 314:446~449;Shawら(1988)J Natl Cancer Inst. 80:1553~1559;Morrison(1985)Science 229:1202~1207;Oiら(1986)Biotechniques 4:214;米国特許第5,225,539号;Jonesら(1986)Nature 321:552~525;Verhoevenら(1988)Science 239:1534;ならびにBeidlerら(1988)J Immunol 141:4053~4060。

【0171】

1つの実施形態において、所望の特異性を保有する抗体のスクリーニングのための方法は、当該分野内で公知の酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)および他の免疫学的に媒介された技術を含むが、これに限定されない。特定の実施形態において、TSCXタンパク質の特定のドメインに対して特異的である抗体の選抜は、このようなドメインを所有しているTSCXタンパク質のフラグメントに結合するハイブリドーマの生成により容易にされる。TSCXタンパク質内の1つ以上のドメイン(例えば、TSCXファミリーのタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログの、上で同定された保存領域にまたがるドメイン)について特異的である抗体もまた、本明細書中で提供される。

【0172】

抗TSCX抗体は、TSCXタンパク質の局在化および/または定量化に関する当該分野で公知の方法において用いられ得る(例えば、適切な生理学的なサンプル中のTSCXタンパク質のレベルを測定する際の使用のために、診断的方法における使用のために、タン

10

20

30

40

50

パク質の画像化における使用のために、など）。所定の実施形態において、T S C X タンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログについての抗体（抗体由来の結合ドメインを含む）は、薬理学的に活性な化合物（本明細書中、以降において「治療剤」）として利用される。

【0173】

抗 T S C X 抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的技術（例えばアフィニティーアンチマトグラフィまたは免疫沈降）によって、T S C X を単離するために用いられ得る。抗 T S C X 抗体は、細胞からの天然の T S C X の精製、および宿主細胞において発現される組換え的に産生された T S C X の精製を容易にし得る。さらに、抗 T S C X 抗体は、（例えば、細胞溶解物または細胞上清における）T S C X タンパク質を検出するために用いられ得、T S C X タンパク質の発現の量およびパターンを評価し得る。抗 T S C X 抗体は、例えは、所定の処置レジメンの効力を決定するために、臨床試験手順の一部として、組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、を検出可能物質にその抗体を結合する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエ斯特ラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビシン／ビオチンおよびアビシン／ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられる；そして、適切な放射性物質の例としては^{1 2 5}I、^{1 3 1}I、^{3 5}S または³Hが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0174】

（T S C X 組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、T S C X タンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログをコードする核酸を含む、ベクター、好ましくは、発現ベクターに関する。本明細書において使用する場合、用語「ベクター」は、連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。1つの型のベクターは、「プラスミド」である。これはさらなるDNAセグメントが連結され得る直鎖状または環状の二本鎖DNAループをいう。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここでは、さらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは、そのベクターが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えは、細菌性の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えは、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そして、これにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指示し得る。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられる形態のベクターであるので、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価の機能を果たす、ウイルス性ベクター（例えは、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）のような、このような他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。

【0175】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における本発明の核酸の発現に適切な形態で、本発明の核酸を含む。これは、この組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結されている、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択された1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えは、インビトロの転写／翻訳系において、また

はベクターが宿主細胞に導入される場合は、宿主細胞において)そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されることを意味することを、意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことが意図される。このような調節配列としては、例えば、Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節配列としては、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指示する配列(例えば、組織特異的調節配列)が挙げられる。

10 発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの要因に依存し得ることが当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され得、それにより、本明細書に記載される核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド(融合タンパク質または融合ペプチドを含む)(例えば、TSCXタンパク質、TSCXの変異形態、融合タンパク質など)を产生し得る。

【0176】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、TSCX発現のために設計され得る。例えば、TSCXは、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを用いる)、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)にさらに考察されている。あるいは、組換え型発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0177】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有する、E. coliにおいて実施される。融合ベクターは、その中コードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ:(1)組換えタンパク質の発現を増加させるため;(2)組換えタンパク質の可溶性を増加させること;および(3)アフィニティー精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際を補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との結合部に導入されて、そして融合タンパク質の精製に続きその融合部分から組換えタンパク質を分離することを可能とする。このような酵素、およびその同族(cognate)の認識配列としては、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼが挙げられる。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ標的の組換えタンパク質に融合する、pGEX(Pharmacia Biotech Inc.; SmithおよびJohnson (1988) Gene 67: 31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられる。

【0178】

適切な誘導性非融合E. coli発現ベクターの例として、pTrc(Amrannら(1988) Gene 69: 301-315)およびpET 11d(Studierら、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)が挙げられる。

【0179】

10

20

30

40

50

E. coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力を損なった宿主細菌中でそのタンパク質を発現させることである。例えば、Gottesman、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY : METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990) 119-128を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coliにおいて優先的に利用されるコドンであるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである (Wadaら(1992) Nucleic Acids Res. 20: 211: 1~7、10~13、19~34、45~53、58~85、111~113、120、130、132~134および13518を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0180】

別の実施形態において、TSCX発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母S. cerevisiaeにおける発現のためのベクターの例としては、pYepsEc1 (Balldariら(1987) EMBO J 6: 229~234)、pMFa (KurjanおよびHerskowitz (1982) Cell 30: 933~943)、pJRY88 (Schultzら(1987) Gene 54: 113~123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.) が挙げられる。

【0181】

あるいは、TSCXは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中のタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスペクターとして、pAcシリーズ (Smithら(1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156~2165) およびpVLシリーズ (LucklowおよびSummers (1989) Virology 170: 31~39) が挙げられる。

【0182】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) およびpMT2PC (Kauffmanら(1987) EMBO J 6: 187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のために適切な他の発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0183】

別の実施形態において、その組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型中で優先的にその核酸の発現を指示し得る(例えば、組織特異的調節エレメントを、その核酸を発現するために使用する)。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的なプロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkertら(1987) Genes Dev 1: 268~277)、リンパ系特異的プロモーター(CalaméおよびEaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235~275)、T細胞レセプターの特定のプロモーター(WinotoおよびBaltimore (1989) EMBO J 8: 729~733)および免疫グロブリンの特定のプロモーター(Banerjiら(1983) Cell 33: 729~50

740 ; Queen および Baltimore (1983) Cell 33 : 741 ~ 748)、ニューロン特異的プロモーター (例えば、神経フィラメントプロモーター ; Byrne および Ruddle (1989) PNAS 86 : 5473 ~ 5477)、臍臓特異的プロモーター (Edlund ら (1985) Science 230 : 912 ~ 916)、ならびに乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター ; 米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号) が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる (例えば、マウス *hox* プロモーター (Kessel および Gruss (1990) Science 249 : 374 ~ 379) および - フェトプロテインプロモーター (Campes および Tilghman (1989) Genes Dev 3 : 537 ~ 546))。

10

【 0184 】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明の DNA 分子を含む、組換え発現ベクターを提供する。すなわち、その DNA 分子は、TSCX mRNA に対してアンチセンスである RNA 分子の発現を (その DNA 分子の転写によって) 可能にする様式で、調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型においてアンチセンス RNA 分子の持続的な発現を指示する、アンチセンス方向にクローニングされた核酸に作動可能に連結された調節配列 (例えば、ウイルスプロモーターおよび / もしくはエンハンサー) が選択され得るか、または、アンチセンス RNA の構成的発現、組織特異的発現、もしくは細胞型特異的発現を指示する調節配列が、選択され得る。そのアンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で產生され、その活性は、そのベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の考察については、例えば、Weintraub ら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - Trends in Genetics、第1巻(1) 1986 を参照のこと。

20

【 0185 】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をもいうことが、理解される。特定の改変は、変異または環境による影響のいずれかに起因して、次の世代にて生じ得るので、このような子孫は、実際には、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用される場合この用語の範囲内に含まれる。

30

【 0186 】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、TSCX タンパク質は、細菌細胞 (例えば、*E. coli*)、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞または COS 細胞) において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

40

【 0187 】

ベクター DNA は、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸 (例えば、DNA) を宿主細胞に導入するために当該分野で認識されている種々の技術をいうことを意図し、これらとしては、リン酸カルシウム共沈または塩化カルシウム共沈、DEAE デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrook ら (MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL . 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 50

ng Harbor, N.Y., 1989) および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0188】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについて、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノムに組み込み得ることが公知である。これらの組込み体を同定および選択するために、選択マーク（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マークとしては、薬物（例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート）に対する耐性を付与するものが挙げられる。選択マークをコードする核酸は、TSCXをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスクレクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーク遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【0189】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞）は、TSCXタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、TSCXタンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、本発明の方法は、TSCXタンパク質が産生されるよう、適切な培地内で本発明の宿主細胞（ここに、TSCXをコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、その培地または宿主細胞からTSCXタンパク質を単離する工程を包含する。

【0190】

（TSCX核酸を同定するためのキットおよび核酸コレクション）

別の局面において、本発明は、因子のTSCX性（TSCXicity）の調査のために役立つきットを提供する。このキットは、2つ以上のTSCX配列を検出する核酸を含み得る。好ましい実施形態において、このキットは、TSCX核酸配列のうちの3個、4個、5個、6個、8個、10個、12個、15個、20個、25個、50個、100個または全てを検出する試薬を含む。

【0191】

本発明はまた、1つ以上のTSCX応答性核酸配列を同定し得る、単離された複数の配列を含む。このキットまたは複数の配列は、例えばTSCX核酸配列に相同な配列、または1つ以上のTSCX核酸配列を特異的に同定し得る配列を含み得る。

【0192】

（実施例）

（実施例1：種々の組織における抗ロイコプロテアーゼの発現分析）

NMBの定量的分析（GenBank登録番号：X04470；表1；TSC）を、リアルタイム定量PCR（RTQ PCR；TAQMAN（登録商標））を使用して種々の正常の細胞、細胞株および組織由来、および病理状態由来の細胞、細胞株および組織由来のRNAサンプルを含有するマイクロタイプレートを用いて評価した。RTQ PCRを、Perkin-Emer Biystems ABI PRISM（登録商標）7700 Sequence Detection Systemを用いて実施した。種々のサンプルのコレクションを、プレート上に集め、そしてパネル1（正常な供給源および癌に由来する細胞および細胞株を含有する）およびパネル2（正常な供給源および癌に由来する組織（特に外科サンプルを含有する）と呼ぶ。

【0193】

最初に、RNAサンプルを、構成的に発現される遺伝子（例えば、-アクチンおよびGAPDH）に対して正規化した。RNA（合計約50ngまたはpolyA+約1ng）を、製造業者のプロトコルに従って、TAQMAN（登録商標）Reverse Transcription Reagents Kit（PE Biystems, Foster City, CA；カタログ番号N808-0234）およびランダムな6量体

10

20

30

40

50

を用いて、cDNAに転換した。反応を、20 μl 中で実施し、そして48 で30分間インキュベートした。次いで、cDNA(5 μl)を、製造業者のプロトコルに従って、

-actin T A Q M A N (登録商標) A s s a y R e a g e n t s (P E B i o s y s t e m s ; カタログ番号4310881E) およびG A P D H T A Q M A N (登録商標) A s s a y R e a g e n t s (P E B i o s y s t e m s ; カタログ番号4310884E) ならびにT A Q M A N (登録商標) u n i v e r s a l P C R M a s t e r M i x (P E B i o s y s t e m s ; カタログ番号4304447) を使用する、T A Q M A N (登録商標) 反応のために、別のプレートに移した。反応を、25 μl 中で以下のパラメーターを用いて実施した：50 で2分間；95 で10分間；95 で15秒間 / 60 で1分間(40サイクル)。結果を、C T 値(所定のサンプルが蛍光の閾値レベルを越えるサイクル)として対数目盛を使用して記録し、ここで、所定のサンプルと最も低いC T 値を有するサンプルとの間でのR N A 濃度の差分は、2のC T 乗として表される。次いで、相対的な発現の割合を、このR N A 差分の逆数をとり、そして100を乗算することによって得る。 - アクチンおよびG A P D Hについて得られた平均のC T 値を使用して、R N A サンプルを正規化した。最も高いC T 値をもたらすR N A サンプルは、さらなる希釈を必要とせず、一方、全ての他のサンプルは、それらの - アクチン / G A P D H の平均C T 値に従って、このサンプルに対して相対的に希釈した。

【0194】

正規化したR N A (5 μl)をcDNAに転換し、そしてO n e S t e p R T - P C R M a s t e r M i x R e a g e n t s (P E B i o s y s t e m s ; カタログ番号4309169) および遺伝子特異的プライマーを製造業者の説明書に従って使用する、T A Q M A N (登録商標) によって分析した。プローブおよびプライマーを、P e r k i n E l m e r B i o s y s t e m s のP r i m e r E x p r e s s S o f t w a r e パッケージ(A p p l e C o m p u t e r のM a c i n t o s h P o w e r P C 用バージョンI)または同様のアルゴリズムに従って、入力として標的配列を使用して、それぞれのアッセイについて設計した。デフォルト設定を反応条件について使用し、そして以下のパラメーターを、プライマーの選択の前に設定した：プライマー濃度 = 2 5 0 n M、プライマーの融解温度(T_m)範囲 = 5 8 ~ 6 0 、プライマーの最適T_m = 5 9 、最大のプライマー差分 = 2 、プローブは5'にGを有さない、プローブのT_mはプライマーのT_mよりも10 高くなければならない、アンプリコンの大きさは75 b p から100 b p である。選択したプローブおよびプライマー(下記を参照のこと)を、S y n t h e g e n (H o u s t o n , T X , U S A)によって合成した。プローブを、カップリングしていない色素を除去するためにH P L C によって二重精製し、そしてプローブのそれぞれ5'および3'末端へのレポーター色素およびクエンチャーカップリングを確認するために質量分析法によって評価した。それらの最終濃度は：順方向および逆方向プライマーについてはそれぞれ900 n M、そしてプローブは200 n Mであった。

【0195】

P C R 条件：各組織および各細胞株由来の正規化したR N A を、96ウェルのP C R プレート(P e r k i n E l m e r B i o s y s t e m s)の各ウェルにスポットした。P C R 溶液は、2つのプローブ(標的クローンに特異的なプローブおよび標的プローブと多重化する別の遺伝子特異的プローブ)を含み、これを1×T a q M a n^{T M} P C R M a s t e r M i x (P E B i o s y s t e m s 7700について)を使用して、5 mM M g C l₂、d N T P (d A、G、C、Uを1:1:1:2の比率で)、0.2 5 U / μl A m p l i T a q G o l d^{T M} (P E B i o s y s t e m s)、および0.4 U / μl R N a s e インヒビター、および0.25 U / μl 逆転写酵素で設定した。逆転写を、48 で30分間、続いて以下のような増幅 / P C R サイクルを実施した：95 で10分間、次いで、95 で15秒間、60 で1分間の40サイクル。

【0196】

パネル1の結果においては、以下の略号を使用する：

10

20

30

40

50

c a . = 癌腫

* = 転移によって確立された

m e t = 転移

s c e l l v a r = 小細胞改変株

n o n - s = n o n - s m = 非小

s q u a m = 扁平上皮細胞

p l . e f f = p l e f f u s i o n = 胸水

g l i o = 神経膠腫

a s t r o = 星状細胞腫、および

n e u r o = 神経芽細胞腫。

10

【0197】

(パネル2)

パネル2のプレートは、一般的には、2つのコントロールのウェルおよび94個の試験サンプルを含む。これらの試験サンプルは、National Cancer InstituteのCooperative Human Tissue Network (CHTN) またはNational Disease Research Initiative (NDRI) との親密に共同している外科医によって入手されたヒト組織から単離したRNAまたはcDNAを含む。組織は、ヒトの悪性腫瘍に由来し、そして示される場合、多くの悪性組織は、腫瘍にすぐ隣接している非癌性組織から得られる「ぴったり沿った境界 (matched margin)」を有する。これらを、正常な隣接組織と呼び、そして以下の結果において「NAT」と記載する。腫瘍組織および「ぴったり沿った境界」を、2人の別々の病理学者によって評価する（外科の病理学者、およびNDRIまたはCHTNの病理学者によって再度）。この分析は、腫瘍の分化の段階の全体的な組織病理学的評価を提供する。さらに、ほとんどのサンプルは、もともとの外科の病理報告を含み、この報告は、患者の臨床段階に関する情報を提供する。これらのぴったり沿った境界を、外科手術領域の周辺（すなわち、すぐ隣接している）組織（表4においては正常な隣接組織を「NAT」と明示する）から採取する。さらに、RNAサンプルおよびcDNAサンプルを、高齢者または突然死の被害者（事故など）について行った検死により種々のヒト組織から得た。これらの組織は、疾患を有さないことが確認され、そしてこれを、Ciontech (Palo Alto, CA)、Research Genetics、およびInvitrogenのような種々の商業的な供給源から購入した。

20

【0198】

全てのサンプルに由来するRNAの完全性を、指針としての28Sおよび18SリボソームRNAの染色強度比（2:1～2.5:1の28S:18S）、および分解産物の指標である低分子量のRNAが存在しないことを使用して、アガロースゲル電気泳動の視覚的な評価によって質を制御した。サンプルを、単一のエキソンの範囲全体を増幅するように設計したプローブおよびプライマーのセットを使用して、逆転写酵素の非存在下でRTQ PCR反応を実行することにより、ゲノムDNAの混入に対して制御した。

【0199】

NMBのTaqManTM発現プロフィールを、以下に示されるような特定の遺伝子プローブおよびプライマーセット (Ag 817) を使用して生成した：

40

【0200】

【化23】

Ag 817 順方向: 5'-TCAATGGAACCTTCAGCCTTA-3'

プローブTET: 5'-CTCACTGTGAAAGCTGCAGCACCAAG-3'-TAMRA

逆方向 : 5'-GAAGGGGTGGGTTTGAAAG-3'

表2に示されるこの結果は、41個の正常ヒト組織および55個のヒト癌細胞株に関連し、そして黒色腫細胞株におけるNMBの高い発現および乳癌細胞株MDA-Nにおける過剰発現を示す。表3に示される結果は、さらなる腫瘍組織に関連し、その多くの腫瘍組織

50

が、サンプルを入手した執刀外科医により規定されたように、正常な隣接組織（NAT）とぴったりである。このことにより、NMBが、正常な腎臓またはNATのいずれかと比較して9/9の腎腫瘍で過剰発現されることが明らかにされる。この分析は、NMBがまた、NATと比較されたいくつかの肺癌腫組織、およびNATと比較された2つの黒色腫転移において過剰発現されるというNMBの発現を最初に同定したGene CallinTMの結果を確認する。

【0201】

NCIのCGAP Sage分析は、NMBが、パネル1のTaqMan分析と一致して、いくつかの神経膠腫（H392、プールしたGBM、GBMH1110）、および1つの悪性胸部腫瘍（SKBR3）中で発現されることを示す。「ボディーマップ」と呼ばれるESTの発現についてのNCIデータは、NMBがシュワン細胞、腺癌腫およびS.細胞癌腫において発現されることを明らかにする。

10

20

NMBの遺伝子発現プロフィールおよびpMEL17とのNMBの相同性に基づいて、腎臓細胞癌腫、肺癌腫、黒色腫およびCNS癌を含むヒト腫瘍の部分集合（subset）について、モノクローナル抗体を使用するNMBの成功した標的化は、腫瘍の増殖、マトリクスの浸潤および転移の拡がりに阻害効果を有することが予想される。さらに、NMBの標的化は、TSC疾患に治療的効果を有する。さらに、NMBの潜在的な酵素活性を考慮すると、NMBは、低分子薬物をスクリーニングするための標的として使用され得る。要約すれば、これらの結果は、TSCの処置のための治療的標的としてのNMBの関連性が、TSCに影響されるいくつかの組織におけるNMBの発現／過剰発現によって増強されることを示す。

【0203】

【表2】

表2. パネル1についての Tag Man の結果

	相対的発現, % 1.2tm9581_29817
内皮細胞	0
心臓 (胎児)	5.4
脾臓	6
脾臓 ca. CAPAN 2	0
副腎 (新しいロット*)	2.7
甲状腺	19.3
唾液腺	2.7
下垂体	3.7
脳 (胎児)	0.8
脳 (全体)	2.4
脳 (扁桃)	10.6
脳 (小脳)	0.4
脳 (海馬)	1.3
脳 (視床)	1.1
大脳皮質	1.2
脊髄	17.6
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	27.2
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	13.5
CNS ca. (astro) SW1783	0.4
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	0.7
CNS ca. (astro) SF-539	52.9
CNS ca. (astro) SNB-75	7
CNS ca. (glio) SNB-19	1.3
CNS ca. (glio) U251	4.9
CNS ca. (glio) SF-295	11
心臓	23.1
骨格筋 (新しいロット*)	5.7
骨髄	0.8
胸腺	9.9
脾臓	5
リンパ節	29.7
結腸直腸	8.2
胃	5.6
小腸	8.1
結腸 ca. SW480	0
結腸 ca.* (SW480 met) SW620	35.0
結腸 ca. HT29	0
結腸 ca. HCT-116	0
結腸 ca. CaCo-2	0
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	2.4
結腸 ca. HCC-2998	40.1
胃 ca.* (肝臓 met) NCI-N87	18.2
膀胱	8.1
気管	7.4
腎臓	3.1
腎臓 (胎児)	43.7
腎臓 ca. 786-O	0
腎臓 ca. A498	4.7
腎臓 ca. RXF 393	1.5
腎臓 ca. ACHN	0
腎臓 ca. UO-31	50.8
腎臓 ca. TK-10	0
肝臓	2.5
肝臓 (胎児)	2.3
肝臓 ca. (胚芽) HepG2	0

10

20

30

40

【 0 2 0 4 】

【 表 3 】

表3. パネル2についての Tag Man の結果

組織名	相対的発現, % 2tm1063L ag817
正常な結腸 GENPAK 061003	11.8
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	0
83220 CC NAT (ODO3866)	9.1
83221 CC Gr.2 直腸S状部 (ODO3868)	1.4
83222 CC NAT (ODO3868)	7.1
83235 CC Mod Diff (ODO3920)	1.2
83236 CC NAT (ODO3920)	1.2
83237 CC Gr.2 上行結腸 (ODO3921)	4.8
83238 CC NAT (ODO3921)	5.8
83241 部分的な肝性徐由来のCC (ODO4309)	7.8
83242 肝臓 NAT (ODO4309)	2.9
87472 肺への結腸性転移 (OD04451-01)	14.6
87473 肺 NAT (OD04451-02)	19.8
正常な前立腺 Clontech At 6546-1	8.8
84140 前立腺癌 (OD04410)	2.9
84141 前立腺 NAT (OD04410)	0.7
87073 前立腺癌 (OD04720-01)	1
87074 前立腺 NAT (OD04720-02)	1.5
正常な肺 GENPAK 061010	49.3
83239 筋肉への肺性転移 (ODO4286)	74.7
83240 筋肉 NAT (ODO4286)	6.5
84136 肺悪性癌 (OD03126)	10.4
84137 肺 NAT (OD03126)	4.6
84871 肺癌 (OD04404)	27.7
84872 肺 NAT (OD04404)	7.9
84875 肺癌 (OD04565)	41.8
84876 肺 NAT (OD04565)**	3.8
85950 肺癌 (OD04237-01)	10.1
85970 肺 NAT (OD04237-02)	1.5
83255 肝臓への眼性転移 (ODO4310)	77.4
83256 肝臓 NAT (ODO4310)	1.8
84139 肺への黒色腫性転移 (OD04321)	53.6
84138 肺 NAT (OD04321)	5.8
正常な腎臓 GENPAK 061008	10.1
83786 腎臓 Ca, 核グレード2 (OD04338)	22.5
83787 腎臓 NAT (OD04338)	1.3
83788 腎臓 Ca 核グレード1/2 (OD04339)	17.2
83789 腎臓 NAT (OD04339)	2
83790 腎臓 Ca, 明細胞型 (OD04340)	11.3
83791 腎臓 NAT (OD04340)	3.7
83792 腎臓 Ca, 核グレード3 (OD04348)	12.1
83793 腎臓 NAT (OD04348)	1.9
87474 腎臓癌 (OD04622-01)	19.6
87475 腎臓 NAT (OD04622-03)	9
85973 腎臓癌 (OD04450-01)	54.7
85974 腎臓 NAT (OD04450-03)	2.7
腎臓癌 Clontech 8120613	67.8
腎臓 NAT Clontech 8120614	5.8

10

20

30

40

(表3 続き)

腎臓癌	Clontech 9010320	56.3
腎臓 NAT	Clontech 9010321	7.2
腎臓癌	Clontech 8120607	100
腎臓 NAT	Clontech 8120608	10.2
正常な子宮	GENPAK 061018	11.5
子宮癌	GENPAK 064011	2
正常な甲状腺	Clontech A+ 6570-1**	44.4
甲状腺癌	GENPAK 064010	90.1
甲状腺癌	INVITROGEN A302152	10.9
甲状腺 NAT	INVITROGEN A302153	8.3
正常な乳房	GENPAK 061019	2.4
84877 乳癌	(OD04566)	5.5
乳癌	Res. Gen. 1024	7.1
85975 乳癌	(OD04590-01)	1.7
85976 乳癌	Mets (OD04590-03)	2
87070 乳癌転移	(OD04655-05)	1.6
GENPAK 乳癌	D64006	3.4
乳癌	Clontech 9100266	11.1
乳房 NAT	Clontech 9100265	7.7
乳癌	INVITROGEN A209073	11
乳房 NAT	INVITROGEN A2090734	3.2
正常な肝臓	GENPAK 061009	6
肝臓癌	Research Genetics RNA 1026	36.3
肝臓癌	Research Genetics RNA 1025	4
対形成した肝臓癌組織	Research Genetics RNA 6004-T	10.4
対形成した肝臓組織	Research Genetics RNA 6004-N	32.1
対形成した肝臓癌組織	Research Genetics RNA 6005-T	44.4
対形成した肝臓組織	Research Genetics RNA 6005-N	40.6
肝臓癌	GENPAK 064003	18.4
正常な膀胱	GENPAK 061001	19.9
膀胱癌	Research Genetics RNA 1023	17
87071 膀胱癌	(OD04718-01)	1.4
87072 膀胱に正常な隣接	(OD04718-03)	0.9
膀胱癌	INVITROGEN A302173	43.8
正常な卵巣 Res. Gen.		39.5
卵巣癌	GENPAK 064008	10.8
87492 卵巣癌	(OD04768-07)	5
87493 卵巣 NAT	(OD04768-08)	6.2
正常な胃	GENPAK 061017	37.4
胃癌	Clontech 9060358**	7.4
NAT 胃	Clontech 9060359	14.6
胃癌	Clontech 9060397	40.9
NAT 胃	Clontech 9060396	9.9
胃癌	Clontech 9060395	20.9
NAT 胃	Clontech 9060394	22.2
胃癌	GENPAK 064005	8.6
ゲノムDNAコントロール		4.5
化学コントロール		0.1

10

20

30

40

(実施例2: CYR61の治療的標的化)

CYR61の遺伝子発現プロフィールに基づいて、腎臓細胞癌腫、肺癌腫、黒色腫およびCNS癌を含むヒト腫瘍の部分集合について、モノクローナル抗体を使用するCYR61の成功した標的化は腫瘍の増殖、マトリクスの浸潤および転移の拡がりに阻害効果を有することが予想される。さらに、CYR61の標的化は、TSC疾患に治療的効果を有すること。

【0205】

(実施例3: NET-7の治療的標的化)

NET-7は、乳癌細胞株によって過剰発現され、そしてNET-7は、ER陽性細胞株MCF7のエストラジオール処置によって調節される。NET-7の遺伝子発現プロフィールに基づいて、ヒト腫瘍(特に胸部腫瘍)の部分集合について、モノクローナル抗体を

50

使用するNET-7の成功した標的化は、腫瘍の増殖、マトリクスの浸潤および転移の拡がりに阻害効果を有することが予想される。さらに、NET-7の標的化は、TSC疾患のアドレノメデュリン前駆体（およびレセプター活性改変プロテイン1）に治療的效果を有する。

【0206】

NET-7は、いくつかの脈管系において、強力かつ持続性の血管拡張作用を有する。アドレノメデュリンに加えて、別の低血圧性ペプチド、プロアドレノメデュリン由来ペプチド（PAMP）がまた、アドレノメデュリン前駆体からプロセスされることが見い出された。PAMPは、末梢交感神経終末で神経伝達を阻害するが、アドレノメデュリンは血管平滑筋を直接的に拡張する。アドレノメデュリンは、高血圧、腎不全および鬱血性心不全の病原に関与し得る。レセプター活性改変タンパク質（RAMP）は、カルシトニンレセプター様レセプター（CRLR）を細胞表面へ輸送する1回膜貫通タンパク質である。RAMP1に輸送されたCRLRは、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）レセプターである。RAMP1は、NSCで下方制御される。その活性のため、TSC患者によるアドレノメデュリン前駆体の過剰発現は、いくつかのTSCを説明し得る。10

【0207】

（他の実施形態）

本発明は、その詳細な説明に関連して記載されているが、前述の説明は、例示を意図するものであり、そして添付される特許請求の範囲の範囲によって規定される本発明の範囲を限定しないことが理解されるべきである。他の局面、利点、および改変は、上記の特許請求の範囲内にある。20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT													
				Int'l Application No PCT/US 01/47839									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 A61K48/00 C07K14/47 C12N15/85 C12N15/10 C07K16/18 G01N33/68													
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 G01N													
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched													
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 00 64941 A (GOULD ROTHBERG BONNIE E ;CURAGEN CORP (US)) 2 November 2000 (2000-11-02) page 1, line 20 - line 30; claim 1; table 1 page 2, line 24 - line 26 page 5, line 9 - line 27 ---</td> <td style="padding: 2px;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 95 18225 A (MEDICAL RES COUNCIL ;UNIV WALES MEDICINE (GB); PERAL BELEN (GB); H) 6 July 1995 (1995-07-06) page 3, line 32 -page 4, line 14; figures 6,12 page 33, line 3 - line 14 ---</td> <td style="padding: 2px;">1-19 -/-</td> </tr> </tbody> </table>					Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 00 64941 A (GOULD ROTHBERG BONNIE E ;CURAGEN CORP (US)) 2 November 2000 (2000-11-02) page 1, line 20 - line 30; claim 1; table 1 page 2, line 24 - line 26 page 5, line 9 - line 27 ---	1-19	A	WO 95 18225 A (MEDICAL RES COUNCIL ;UNIV WALES MEDICINE (GB); PERAL BELEN (GB); H) 6 July 1995 (1995-07-06) page 3, line 32 -page 4, line 14; figures 6,12 page 33, line 3 - line 14 ---	1-19 -/-
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
A	WO 00 64941 A (GOULD ROTHBERG BONNIE E ;CURAGEN CORP (US)) 2 November 2000 (2000-11-02) page 1, line 20 - line 30; claim 1; table 1 page 2, line 24 - line 26 page 5, line 9 - line 27 ---	1-19											
A	WO 95 18225 A (MEDICAL RES COUNCIL ;UNIV WALES MEDICINE (GB); PERAL BELEN (GB); H) 6 July 1995 (1995-07-06) page 3, line 32 -page 4, line 14; figures 6,12 page 33, line 3 - line 14 ---	1-19 -/-											
<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 "&" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 15 April 2003		Date of mailing of the International search report 15 JUL 2003											
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer MORENO, C											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/47839
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] Database accession no. ak089421 XP002238412 abstract & CARNICI P ET AL: "HIGH-EFFICIENCY FULL-LENGTH cDNA CLONING" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 303, 1999, pages 19-44, XP001022979 ISSN: 0076-6879 the whole document -----</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/47839

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

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

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 7 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

1-19 partially

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 01/47839

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-19 (partially)

Involving tuberous sclerosis complex 1 nucleic acid sequence.

2. Claims: 1-19 (partially)

Involving tuberous sclerosis complex 2 nucleic acid sequences.

3. Claims: 1-19 (partially)

Subjects 3-139:
Involving tuberous sclerosis complex 3-8, 10-12, 15-142 nucleic acid sequences.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/47839

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0064941	A 02-11-2000	AU	4659000 A	10-11-2000
		CA	2369324 A1	02-11-2000
		EP	1171466 A2	16-01-2002
		WO	0064941 A2	02-11-2000
<hr/>				
WO 9518225	A 06-07-1995	AU	1322695 A	17-07-1995
		AU	1322795 A	17-07-1995
		EP	0736094 A1	09-10-1996
		EP	0733110 A1	25-09-1996
		WO	9518225 A1	06-07-1995
		WO	9518226 A1	06-07-1995
		JP	9507751 T	12-08-1997
		JP	9507752 T	12-08-1997
		US	6207374 B1	27-03-2001
		US	6380360 B1	30-04-2002
		US	6485960 B1	26-11-2002
		US	6232452 B1	15-05-2001
		AU	2892195 A	05-01-1996
		EP	0777728 A1	11-06-1997
		WO	9534649 A2	21-12-1995

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 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
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 1/02	
C 1 2 Q 1/02	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	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

Macintosh

(72)発明者 ゴールド - ロスバーグ, ボニー

アメリカ合衆国 コネティカット 0 6 4 3 7 , ギルフォード, ムース ヒル ロード 1 7
0 1

(72)発明者 マーフィー, ライアン

アメリカ合衆国 コネティカット 0 6 5 1 1 , ニュー ハベン, ロング ワルフ ドライブ
5 5 5 , 1 1 ティー エイチ フロア, キュラジェン コーポレーション

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37

FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA09 CA12 CA20 DA01 DA02 DA05
DA11 DA12 GA11 HA11 HA13 HA14

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15

4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61

QQ79 QQ89 QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR56

QR62 QR78 QR80 QR84 QS16 QS25 QS33 QS34 QX01 QX02

4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA43 CA44
CA46

4C084 AA13 AA17 NA14 ZA011 ZA891 ZB261

4C086 AA01 AA02 EA16 MA04 NA14 ZA01 ZA89 ZB26

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71
FA74