

(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2005-509174

(P2005-509174A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 110 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-544178 (P2003-544178)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年10月29日 (2002.10.29)		ミレニアム・ファーマシューティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月21日 (2004.4.21)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/034622		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/042358		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年5月22日 (2003.5.22)		アメリカ合衆国02139マサチューセッ
(31) 優先権主張番号	60/335,084		ツ州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリ
(32) 優先日	平成13年10月31日 (2001.10.31)		ート40番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒトアミノペプチダーゼファミリーメンバーである48149を使用する方法

(57) 【要約】

ヒトアミノペプチダーゼNをコードする、48149核酸分子と称される単離された核酸分子が開示される。本発明は、血管におけるアテローム硬化症病変の形成に関連する48149活性を調節する方法を提供する。本発明はさらに、心血管障害（例えば、アテローム硬化症）ならびに例えば、肝臓における、脂質の代謝に関連する障害を、処置、予防および診断する方法を提供する。1つの実施形態において本発明は、細胞中の脂質産生を調節するための方法を提供し、この方法は、細胞を48149調節因子と接触させ、それによって、この細胞中の脂質産生を調節する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

心血管症障害を処置し得る化合物を同定するための方法であって、該化合物が 48149 核酸発現または 48149 ポリペプチド活性を調節する能力をアッセイし、それによって、心血管症障害を処置し得る化合物を同定する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

脂質レベルを調節し得る化合物を同定するための方法であって、以下：

a) 48149 を発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程；および

b) 該試験化合物が、48149 核酸の発現または 48149 ポリペプチドの活性を調節する能力をアッセイし、それによって、脂質レベルを調節し得る化合物を同定する工程を包含する、方法。 10

【請求項 3】

細胞中の脂質産生を調節するための方法であって、細胞を 48149 調節因子と接触させ、それによって、該細胞中の脂質産生を調節する工程を包含する、方法。

【請求項 4】

前記細胞が、肝臓細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 48149 調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 48149 調節因子が、48149 ポリペプチド活性を調節し得る、請求項 3 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記 48149 調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 48149 調節因子が、48149 核酸発現を調節し得る、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

異常な 48149 ポリペプチド活性または異常な 48149 核酸発現によって特徴付けられる心血管障害を有する被験体を処置するための方法であって、48149 調節因子を該被験体に投与し、それによって、該心血管障害を有する被験体を処置する工程を包含する、方法。 30

【請求項 10】

前記心血管障害が、アテローム硬化症、心筋梗塞、発作、血栓症、動脈瘤、心不全、虚血性心疾患、狭心症、心臓突然死、高血圧性心疾患；非冠状動脈血管疾患（例えば、細動脈硬化症）、小血管疾患、ネフロパシー、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫症、喘息、高血圧症、気腫および慢性肺疾患からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 48149 調節因子が、薬学的に受容可能な処方物中で投与される、請求項 9 に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記 48149 調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 48149 調節因子が、48149 ポリペプチド活性を調節し得る、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本出願は、2001年10月31日出願の米国仮出願番号60/335,084に対する優先権を主張する。この全内容は、本明細書中で参考として援用される。

【0002】

アミノペプチダーゼN (APN/CD13) は、小さいペプチドからの、N末端の好ましくは中性のアミノ酸残基の除去を触媒する、ヒトメタロプロテアーゼである (総説については、Sanderinkら (1988) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 26:795-807; ShippおよびLook (1993) Blood 82:1052-1070を参照のこと)。このペプチダーゼは、いくつかの組織 (腎臓近位管の刷子縁膜、腸および胎盤、ならびに造血細胞を含む) 上で発現される膜貫通細胞外酵素である。造血細胞におけるAPN/CD13の発現は、骨髓系統の細胞に特異的であるとみなされてきた。なぜなら、末梢血のリンパ球ではなく、顆粒球および単球/マクロファージが、CD13抗原の表面発現を示すからである (Kehlen, A. ら (2000) J. Cellular Biochemistry 80:115-123)。しかし、APN/CD13 mRNAの発現は、内皮細胞、単球および線維芽細胞様滑膜細胞 (SFC) との細胞-細胞接触の際に、リンパ球上でアップレギュレートされる。

【0003】

アテローム硬化症は、活性化単球/マクロファージと、内皮細胞および平滑筋細胞との間の相互作用から生じる、慢性の炎症疾患であり、動脈壁によって刺激された体液性および細胞媒介性の免疫応答を含む。アテローム硬化症の病因における高コレステロール血症の役割は、十分確立されている。脂質代謝に關与する遺伝子を標的化することは、アテローム硬化症の予防に有益である。現在、コレステロール低下薬物単独では、多くの感受性の個体においてアテローム硬化症の進行を完全に防止するためには、不十分である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、アテローム硬化症血管における病変形成を予防および/または回復し、それによってアテローム硬化症の進行を減弱させる新規治療についての必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

アミノペプチダーゼファミリーメンバー (本明細書中で、「48149」と称される) のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が開示される。ヒト48149をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、配列番号1に示され、そしてヒト48149ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2に示される。さらに、ヒト48149コード領域のヌクレオチド配列は、配列番号3に示される。本出願人らは、非病変動脈壁組織と比較して、アテローム硬化症プラークにおいて、そして脂質負荷のプロセスの間にマクロファージにおいて、48149 mRNAのアップレギュレートされた発現を示した。さらに、48149 mRNAの発現は、飽和脂肪が低い食餌を与えたサルにおいて減少したが、コレステリルアミン (cholesterylamine) で処置したマーモセットにおいては増加した。従って、48149 mRNAの発現は、アテローム硬化症プラークの形成またはアテローム硬化症プラークの形成が起こりやすい条件と、正に相関する。従って、48149核酸発現または48149ポリペプチド活性の調節因子は、代謝障害および心血管障害 (例えば、アテローム硬化症) を処置または予防するために使用され得る。

【0006】

従って、1つの局面において、本発明は、48149タンパク質または48149ポリペプチド (例えば、48149タンパク質の生物学的に活性な部分) をコードする核酸分子を特徴とする。好ましい実施形態において、この単離された核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。他の実施形態において、本発明は、配列番号1、配列番号3に示されるヌクレオチド配列を有する、単離された48149核酸分子を提供する。なお他の実施形態において、本発明は、配列番号1、配列番号3に示されるヌクレオチド配列と実質的に同一な核酸分子 (例えば、天然に存在する対立遺伝子改

変体)を提供する。他の実施形態において、本発明は、配列番号1、配列番号3のヌクレオチド配列を含む核酸分子に対して、本明細書中に記載されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子を提供し、ここで、この核酸は、全長48149タンパク質またはその活性フラグメントをコードする。

【0007】

関連する局面において、本発明は、本明細書中に記載される48149核酸分子を含む核酸構築物をさらに提供する。特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、ネイティブまたは異種の調節配列に、作動可能に連結されている。また、本発明の48149核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞(例えば、48149核酸分子および48149ポリペプチドを生成するために適切なベクターおよび宿主細胞)も含まれる。

10

【0008】

別の関連する局面において、本発明は、48149コード核酸の検出のためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして適切な核酸フラグメントを提供する。

【0009】

なお別の関連する局面において、48149コード核酸分子に対してアンチセンスである単離された核酸分子が提供される。

【0010】

別の局面において、本発明は、48149ポリペプチドおよびその生物学的に活性なフラグメントまたは抗原性フラグメントを特徴とし、これらは、例えば、48149媒介障害または48149関連障害の処置および診断のために適用可能なアッセイにおける、試薬または標的として有用である。別の実施形態において、本発明は、48149活性を有する48149ポリペプチドを提供する。好ましいポリペプチドは、少なくとも1つのペプチダーゼドメイン、ならびに亜鉛配位および触媒活性に必要な細胞外ペンタペプチドコンセンサス配列を含む48149タンパク質であり、そして好ましくは、48149活性(例えば、本明細書中に記載される48149活性)を有する48149タンパク質である。

20

【0011】

他の実施形態において、本発明は、48149ポリペプチド(例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する48149ポリペプチド;配列番号2に示されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有する48149ポリペプチド;または配列番号1、配列番号3のヌクレオチド配列を含む核酸分子に対して、本明細書中に記載されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を有する48149ポリペプチド)を提供し、ここで、この核酸は、全長48149タンパク質またはその活性フラグメントをコードする。

30

【0012】

関連する局面において、本発明は、融合タンパク質を形成するために、非48149ポリペプチドに作動可能に連結された48149ポリペプチドまたはフラグメントを提供する。

【0013】

別の局面において、本発明は、48149ポリペプチドまたはそのフラグメント(例えば、48149ポリペプチドの細胞外ドメイン(例えば、48149ポリペプチドのペプチダーゼドメイン))と反応するか、またはより好ましくは特異的に結合する、抗体およびその抗原結合フラグメントを特徴とする。

40

【0014】

別の局面において、本発明は、48149ポリペプチドまたは48149核酸の発現または活性を調節する化合物についてスクリーニングする方法を提供する。

【0015】

なお別の局面において、本発明は、48149分子の活性または発現を調節(例えば、阻害)する方法を特徴とする。この方法は、48149、48149発現細胞もしくは48149発現組織、または48149の活性化因子のうち1つ以上を、48149の活性

50

または発現を調節（例えば、阻害）するのに十分な量の薬剤（例えば、48149インヒビター）と接触させる工程を包含する。この方法は、培養物中の細胞（例えば、インビトロまたはエキソビボ）に対してか、または、例えば、インビボの治療プロトコルもしくはは予防プロトコルの一部として、被験体中でインビボで、使用され得る。インビトロでの実施形態について、48149は、例えば、48149およびこの薬剤を含む混合物（例えば、再構成系）を形成することによって、この薬剤と接触され得る。他の実施形態において、48149発現細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞または肝臓細胞）または48149発現組織（例えば、心血管組織、アテローム関連組織または肝臓組織）は、培養培地にこの薬剤を添加することによって、この薬剤と接触される。

【0016】

10

この方法はまた、被験体においてインビボで実施され得る。好ましくは、この薬剤またはその薬学的に受容可能な組成物が、48149の活性または発現を阻害するのに十分な量で、被験体に投与される。この方法は、例えば、マクロファージ細胞、内皮細胞、平滑筋細胞または肝臓細胞の異常な活性を含む傷害（例えば、アテローム硬化症のような心血管障害）の、処置または予防のために、使用され得る。

【0017】

エキソビボでの実施形態について、この方法は、48149または48149発現細胞を、被験体から取り出す工程をさらに包含する。例えば、48149または48149発現細胞（例えば、48149発現マクロファージ）を含む血液が、被験体から得られ得る。48149または48149発現細胞は、48149の活性または発現を阻害するのに十分な量の薬剤で処理され得る。処理された48149発現細胞は、被験体に導入され得る。

20

【0018】

好ましい実施形態において、この方法は、投与する工程または接触させる工程の前または後に、細胞または被験体における48149核酸または48149タンパク質の発現レベルまたは活性を評価する工程をさらに包含する。例えば、被験体（例えば、心血管障害を有するかまたは心血管障害の危険性がある患者）は、この薬剤が投与される前または後に、評価され得る。この被験体が、所定のレベルを上回る48149のレベルを有する場合、治療が開始または継続され得る。

【0019】

30

好ましい実施形態において、48149は、ヒト48149である。48149の全ての形態（すなわち、活性化形態および潜在形態）が、阻害され得る。好ましくは、この薬剤は、48149の活性形態を阻害する。

【0020】

好ましい実施形態において、この薬剤は、48149（例えば、ヒト48149）の発現または活性を低減する。1実施形態において、この薬剤は、48149の活性または発現を直接阻害し得る。例えば、この薬剤は、48149タンパク質と相互作用（例えば、結合）し得、そして48149アミノペプチダーゼ活性（例えば、48149基質ポリペプチドの加水分解）をブロックまたは低減し得る。他の実施形態において、この薬剤は、48149の発現（例えば、転写、翻訳、またはmRNAもしくはタンパク質の安定性）をブロックまたは低減し得る。

40

【0021】

好ましい実施形態において、この薬剤は、低分子（例えば、2500Da未満、好ましくは1500Da未満の分子量を有する化学的因子）、化学物質、例えば、有機低分子（例えば、コンビナトリアルライブラリーまたは天然産物ライブラリーの産物）；ポリペプチド（例えば、抗体（例えば、48149特異的抗体））；ペプチド、ペプチドフラグメント（例えば、コラーゲンIフラグメントのような基質フラグメント）またはペプチド模倣物；48149核酸の発現の調節因子（例えば、インヒビター）（例えば、アンチセンス、リボザイムまたは三重らせん分子；あるいはこれらの任意の組み合わせである。

【0022】

50

好ましくは、この薬剤は、48149特異的インヒビターである。48149特異的インヒビターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：低分子48149特異的インヒビター；または抗48149抗体（例えば、ヒト化抗48149抗体、キメラ抗48149抗体、ヒト抗48149抗体または他の組換え（例えば、ファージディスプレイ）抗48149抗体）。

【0023】

他の実施形態において、この薬剤は、非特異的アミノペプチダーゼインヒビターである（すなわち、この薬剤は、2つ以上のアミノペプチダーゼを阻害する）。

【0024】

好ましい実施形態において、48149発現細胞または48149発現組織は、アテローム関連の細胞または組織（例えば、ヒトアテローム関連細胞または組織）である。好ましくは、このアテローム関連の細胞もしくは組織は、内皮細胞もしくは内皮組織、平滑筋細胞もしくは平滑筋組織、または単球もしくはマクロファージである。インビトロ実施形態において、この細胞または組織は、アテローム硬化症の病変またはプラーク（例えば、初期の、中間の、または進行した、アテローム硬化症の病変またはプラーク）と関連する（例えば、そこに位置するかまたはその近傍に位置する）。1つの好ましい実施形態において、この細胞または組織は、進行したかまたは破裂傾向のあるアテローム硬化症病変と関連する（例えば、そこに位置するかまたはその近傍に位置する）。 10

【0025】

本発明の方法を用いて処置または予防され得る心血管障害（例えば、炎症障害）の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アテローム硬化症、心筋梗塞、発作、血栓症、動脈瘤（aneurism）、心不全、虚血性心疾患、狭心症、心臓突然死、高血圧性心疾患；非冠状動脈血管疾患（例えば、細動脈硬化症）、小血管疾患、ネフロパシー、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫症、喘息、高血圧症、気腫および慢性肺疾患；あるいは介入手順（「手術性血管外傷（procedural vascular trauma）」）（例えば、血管形成術後の再狭窄、シャント、ステント、合成または天然の切除移植片、カテーテル、弁または他の移植可能デバイスの留置）に関連する心血管状態。好ましい心血管障害としては、アテローム硬化症、心筋梗塞、動脈瘤および発作が挙げられる。 20

【0026】

好ましい実施形態において、心血管障害は、異常な脂質（例えば、脂肪酸）代謝によって引き起こされる。異常な脂質代謝を含む障害の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アテローム硬化症、細動脈硬化症、高グリセリド血症、肥満、糖尿病、高コレステロール血症、黄色腫症および高脂血症。最も好ましくは、この障害は、アテローム硬化症である。 30

【0027】

他の好ましい実施形態において、48149発現細胞は、マクロファージ（例えば、単球由来マクロファージ）、内皮細胞、平滑筋細胞または肝臓細胞である。マクロファージは、非好中球媒介性の炎症状態（例えば、慢性炎症状態）に関与するので、本発明の方法はまた、非好中球媒介性の炎症状態（以下が挙げられるが、これらに限定されない：本明細書中に記載されるような、自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチ、アレルギー、多発性硬化症、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎およびネフローゼ症候群）、感染性疾患、悪性疾患、移植拒絶または対宿主移植片病、肺障害、骨障害あるいは腸障害）を包含する。 40

【0028】

他の実施形態において、48149発現細胞は、内皮細胞である。従って、本発明の方法は、内皮細胞媒介性の障害（例えば、異常な増殖、移動、新脈管形成もしくは血管新生に関与する障害；または細胞表面接着分子もしくは新脈管形成に関与する遺伝子（例えば、TIE-2、FLTおよびFLK）の異常な発現により特徴付けられる障害）を、処置、予防および／または診断するために使用され得る。内皮細胞障害としては、腫瘍形成、 50

腫瘍転移、乾癬、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、グレーブス病、虚血性疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症）、および慢性炎症疾患（例えば、慢性関節リウマチ）が挙げられる。

【0029】

好ましい実施形態において、被験体は、48149媒介性の障害または疾患（例えば、本明細書中に記載されるような心血管障害、非好中球媒介性の障害または内皮細胞障害）に罹患しているか、またはこれらの危険性があるヒトである。例えば、この被験体は、治療プロトコルまたは予防プロトコルを受けている患者である。

【0030】

好ましい実施形態において、この被験体は、アテローム硬化症に罹患しているか、またはその危険性があるヒトである。例えば、初期の、中程度の、または進行したアテローム硬化症を有するヒト。好ましくは、この被験体は、アテローム硬化症プラークの破裂に罹患しているか、またはその危険性があるヒトである。 10

【0031】

他の実施形態において、この被験体は、非ヒト動物（例えば、サルのような実験動物）である。

【0032】

本明細書中に記載される薬剤は、それら自体でか、または少なくとも1つのさらなる薬剤（本明細書中で「第二の薬剤」と称される）もしくは手順と組み合わせて投与され得る。1実施形態において、48149特異的薬剤は、非特異的アミノペプチダーゼインヒビター、またはアテローム硬化症を処置するために使用される薬物と組み合わせて投与される。 20

【0033】

なお他の実施形態において、本発明の薬剤は、単独でか、またはコレステロール低下剤と組み合わせて投与され得る。コレステロール低下剤の例としては、胆汁酸金属イオン封鎖剤（例えば、塩酸コレスチポールまたはコレスチラミン）、フィブリン酸誘導体（例えば、クロフィブレート、フェノフィブレート（*fenofibrate*）またはゲムフィブロジル（*gemfibrozil*））、チアゾリジンジオン（*thiazolidenedione*）（例えば、トログリタゾン、ピオグリタゾン（*pioglitazone*）、シグリタゾン（*ciglitazone*）、エングリタゾン（*englitazone*）、ロジグリタゾン（*rosiglitazone*））またはヒドロキシメチルグルタリルコエンザイムAレダクターゼ（HMG-CoAレダクターゼ）インヒビター（例えば、スタチン（例えば、フルバスタチン（*fluvastatin*）ナトリウム、ロバスタチン、プラバスタチンナトリウム、シンバスタチン、アトルバスタチン（*atorvastatin*）カルシウム、セリバスタチン（*cerivastatin*））、ApoA II低下剤、VLDL低下剤、ApoA I刺激剤、ならびにニコチン酸、ナイアシンまたはプロブコールのインヒビター、が挙げられる。好ましいコレステロール低下剤としては、HMG-CoAレダクターゼのインヒビター（例えば、スタチン）、ニコチン酸のインヒビターおよびナイアシンのインヒビターが挙げられる。好ましくは、コレステロール低下剤は、好ましい血漿脂質プロフィール（例えば、増加したHDLおよび／または低下したLDL）を生じる。 30 40

【0034】

他の実施形態において、本発明の薬剤は、介入手順（「手術性血管外傷」）と組み合わせて投与される。介入手段の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：例えば、血管形成術、シャント、ステント、合成または天然の切除移植片の配置、カテーテル、弁または他の移植可能デバイスの留置。

【0035】

第二の薬剤または手順は、本発明の薬剤の投与の前、それと同時にまたはその後に、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュールで、投与またはもたらされ得る。例えば、第二の薬剤および本発明の薬剤は、予め選択された期間にわたって連続的に投与され得 50

るか、またはある期間にわたって、一連の間隔を空けた投与で（すなわち、間欠的に）投与され得る。

【0036】

好ましい実施形態において、本発明の薬剤は、単独でか、または第二の薬剤もしくは手順と組み合わせて、以下のうち1つ以上を阻害（ブロック、低減または防止）する：アテローム硬化症病変の形成、発達または破裂を阻害する；脂質蓄積を阻害するか、プラーク安定性を増大するか、もしくは病変後退を促進する；膠原溶解（例えば、I型、II型またはIII型（好ましくはI型）コラーゲンの分解）、もしくはインタクトな三重らせんコラーゲンの破壊を阻害する；またはアテローム硬化症プラークの破裂を阻害する。

【0037】

好ましい実施形態において、この方法は、48149または48149発現細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞または肝臓細胞）を、血液吸引または組織生検の獲得によって、被験体から取り出す工程をさらに包含する。

【0038】

なお別の局面において、本発明は、被験体において心血管障害（例えば、本明細書中に記載される心血管障害（例えば、アテローム硬化症））を処置または予防する方法を特徴とする。この方法は、48149の活性または発現を阻害する薬剤（例えば、本明細書中に記載される薬剤）を、心血管障害を処置または予防するのに有効な量で、被験体に投与する工程を包含する。

【0039】

本発明はまた、被験体において48149媒介性の障害（例えば、新血管障害（例えば、アテローム硬化症））、内皮細胞障害、肝臓障害または非好中球媒介性の炎症障害を診断または病期分類（staging）する方法を特徴とする。この方法は、48149核酸または48149ポリペプチドの発現、活性またはプロセッシングを評価し、それによって、この疾患を診断または病期分類する工程を包含する。好ましい実施形態において、この発現または活性は、参照値と比較される。例えば、参照（例えば、正常な被験体または正常な被験体集団）に対する、48149核酸または48149ポリペプチドの発現レベルまたは活性レベルにおける差異は、この障害またはこの障害の病期を示す。

【0040】

好ましい実施形態において、この被験体は、ヒトである。例えば、この被験体は、本明細書中に記載されるような心血管障害に罹患しているか、またはその危険性のあるヒトである。好ましくは、被験体は、アテローム硬化症に罹患しているかもしくはその危険性のあるヒト；初期の、中程度の、もしくは進行したアテローム硬化症を有するヒト；またはアテローム硬化症プラークの破裂に罹患しているかもしくはその危険性のあるヒトである。他の実施形態において、この被験体は、本明細書中に記載されるような内皮細胞障害、肝臓障害または非好中球媒介性の炎症障害に罹患しているか、またはその危険性のあるヒトである。

【0041】

好ましい実施形態において、評価する工程は、インビトロまたはエキソビボで実施される。例えば、サンプル（例えば、血液サンプル、血漿サンプル、組織サンプルまたは生検）が、被験体から得られる。好ましくは、このサンプルは、48149発現細胞（例えば、アテローム関連細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞または平滑筋細胞））を含む。1実施形態において、例えば、被験体の血漿中の48149基質分解産物のレベルが、評価され得る。

【0042】

好ましい実施形態において、評価する工程は、インビボで実施される。例えば、48149関連の核酸またはポリペプチドと相互作用する薬剤（これは、48149核酸または48149ポリペプチドの活性または発現のレベルに関するシグナルが生じるように、検出可能に標識される）を被験体に投与することによる。

【0043】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態において、この方法は、以下：被験体由来のサンプル、ヒト被験体由来のサンプル（例えば、本明細書中に記載されるような心血管障害、内皮障害、肝臓障害または非好中球媒介性の障害に罹患しているか、またはその危険性がある患者由来のサンプル；例えば、アテローム硬化症に罹患しているか、またはその危険性がある患者（例えば、初期の、中程度の、または進行したアテローム硬化症を有するヒト）由来のサンプル；またはアテローム硬化症プラークの破裂に罹患しているか、もしくはその危険性のあるヒトのサンプル、に対して実施されて、その標的核酸または標的タンパク質が採取された個体が、薬物または他の処置を受けるべきか否かを決定するか；あるいは疾患または障害を処置、病期分類するために、障害または耐性についての素因について、個体を診断する。

10

【0044】

好ましい実施形態において、少なくとも1つ、2つ、3つまたは4つのアテローム硬化症関連の核酸またはポリペプチドの発現のレベルが、評価される。好ましくは、アテローム硬化症関連の核酸またはポリペプチドは、48149であり、好ましくはヒト48149である。

【0045】

好ましい実施形態において、アテローム硬化症関連核酸（例えば、48149）の発現は、シグナル実態（例えば、緑色蛍光タンパク質または他のマーカータンパク質）（これは、アテローム硬化症関連遺伝子制御エレメント（例えば、48149プロモーター）の制御下にある）の発現を評価することによって評価される。

20

【0046】

いくつかの実施形態において、1以上のアテローム硬化症関連の核酸またはポリペプチドの発現は、サンプルを、1つ以上のアテローム硬化症関連の核酸またはポリペプチドに選択的にハイブリダイズする核酸プローブと接触させることによって評価される。コントロールと比較した、1つ以上のアテローム硬化症関連の核酸またはポリペプチドのレベルの増加は、障害または障害の病期を示す。

【0047】

いくつかの実施形態において、細胞またはサンプル由来の核酸（またはタンパク質）は、ポジショナルアレイ（例えば、DNAチップアレイ）で分析される。従って、好ましい実施形態において、この方法は、以下の工程をさらに包含する：

30

複数の捕捉プローブのアレイを提供することによってサンプルを分析する工程であって、この捕捉プローブの各々は、アレイ上の他の複数の捕捉プローブから、位置的に識別可能であり、そして各位置的に識別可能なプローブは、独自の試薬（例えば、アテローム硬化症（48149）関連の核酸またはポリペプチドを同定し得る抗体または核酸プローブ）を含む、工程；ならびに

サンプルを捕捉プローブのアレイとハイブリダイズさせ、それによってサンプル配列を分析する工程。

【0048】

好ましい実施形態において、48149媒介障害は、心臓血管障害（例えば、本明細書中で記載されるような心臓血管障害）である。好ましくは、この障害は、アテローム硬化（例えば、初期、中期または進行したアテローム硬化）である。最も好ましくは、この障害は、進行した段階のアテローム硬化（例えば、破裂する傾向のあるアテローム性動脈硬化性のプラークまたは病巣によって特徴付けられたアテローム硬化性段階）である。

40

【0049】

好ましい実施形態において、この48149媒介障害は、本明細書中に記載されるような内皮障害である。

【0050】

他の実施形態において、この48149媒介障害は、本明細書中に記載されるような肝臓障害または非好中球媒介炎症性障害である。

【0051】

50

さらなる局面において、本発明は、疾患診断のためを含めて、48149核酸または48149ポリペプチドにおける遺伝子変更の存在もしくは不在（心臓血管治療に対する応答）を決定するためのアッセイを提供する。

【0052】

関連する局面において、本発明は、例えば、48149媒介障害（例えば、心臓血管障害、内皮細胞障害または非好中球媒介炎症性障害）に対する素因を同定するため、被験体を診断または処置するための、被験体を評価する方法を提供する。この方法は、被験体の核酸を提供する工程；およびa) アテローム硬化関連核酸（例えば、48149、好ましくはヒト48149）の対立遺伝子同一性を決定する工程またはb) その核酸の少なくともヌクレオチドの配列を決定する工程のいずれかを包含する。好ましい実施形態において、この方法は、上記対立遺伝子同一性または対立遺伝子配列を、その核酸の参照対立遺伝子または参照配列と比較する工程をさらに包含する。この参照対立遺伝子または参照配列は、免疫障害または機能的（例えば、正常な）免疫系に関連する。対立遺伝子改変体は、例えば、アレイ、ミスマッチ切断、電気泳動アッセイ、HPLCアッセイ、および核酸配列決定を使用して検出され得る。好ましくは、このアッセイは、アテローム硬化関連核酸（例えば、48149、好ましくはヒト48149）の、ヌクレオチド置換、および好ましくは、挿入、欠失、転座、および再配置もまた検出する。

10

【0053】

好ましい実施形態において、この方法は、アテローム硬化関連核酸（例えば、48149）発現または対立遺伝子同一性のレベルに基づいて、被験体を診断する工程および／または治療様式（例えば、特定の処置、またはその投薬量）を選択する工程をさらに包含する。

20

【0054】

別の局面において、本発明は、被験体における障害（例えば、48149媒介障害（例えば、心臓血管障害（例えば、アテローム硬化）、内皮細胞障害、肝臓障害、または非好中球媒介炎症性障害））の処置の有効性を評価するための方法の特徴とする。この方法は、1つ以上のアテローム硬化関連核酸またはポリペプチドの発現を評価し、それによりその処置の有効性を評価する工程を包含する。好ましい実施形態において、発現または活性は、参照値と比較される。処置前の発現レベルと比較して、処置後に得られたサンプルにおける1つ以上のアテローム硬化関連核酸またはポリペプチドのレベルにおける変化（例えば、減少）は、この障害の処置の有効性の指標である。

30

【0055】

好ましい実施形態において、被験体はヒトである。例えば、この被験体は、本明細書中に記載されるような心臓血管障害に罹患しているかまたは心臓血管障害の危険性を有するヒトである。好ましくは、被験体は、アテローム硬化に罹患しているか、もしくはアテローム硬化の危険性を有するヒト；初期、中期または進行したアテローム硬化のヒト；またはアテローム性動脈硬化性プラークに罹患したかもしくはアテローム性動脈硬化性プラークの危険性を有するヒトである。他の実施形態において、この被験体は、本明細書中に記載されるような、肝臓障害、非好中球媒介炎症性障害または内皮障害に罹患しているかもしくはこれらの障害の危険性を有するヒトである。

40

【0056】

好ましい実施形態において、この評価する工程は、インビトロまたはエキソビボで行われる。例えば、サンプル（例えば、血液、血漿、組織サンプル、生検）は、被験体から得られる。好ましくは、このサンプルは、アテローム関連細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞、または平滑筋細胞）、または肝細胞を含む。

【0057】

インビトロの実施形態については、この方法は、被験体由来のサンプル（例えば、組織、体液（例えば、血液）、生検）を提供する工程；および

例えば、このサンプルを、1つ以上のアテローム硬化関連核酸に選択的にハイブリダイズする核酸プローブ、または1つ以上のアテローム硬化関連ポリペプチドに特異的に結合

50

する抗体と、接触させることにより、1つ以上のアテローム硬化関連核酸またはポリペプチドの発現を評価する工程；を包含し、

ここで、処置前の発現レベルと比較して、処置後に得られたサンプルにおける上記1つ以上のアテローム硬化関連核酸またはアテローム硬化関連ポリペプチドのレベルにおける変化（例えば、減少）は、上記障害の処置の有効性の指標である。

【0058】

好ましい実施形態において、この方法は、以下のサンプルに対して行われる：被験体由来のサンプル、ヒト被験体由来のサンプル；例えば、本明細書中に記載されるような、心臓血管障害、肝臓障害、または非好中球媒介炎症性障害に罹患しているか、またはこれらの障害の危険性を有する患者のサンプル；例えば、アテローム硬化に罹患しているか、またはアテローム硬化の危険性を有する患者（例えば、初期、中期、または進行したアテローム硬化のヒト）のサンプル；あるいは、アテローム性動脈硬化性プラークの破裂に罹患しているか、またはアテローム性動脈硬化性プラークの破裂の危険性を有するヒトのサンプル。

10

【0059】

好ましい実施形態において、アテローム硬化関連核酸またはアテローム硬化関連ポリペプチドは、48149、好ましくは、ヒト48149である。

【0060】

好ましい実施形態において、このサンプルは、アテローム硬化関連細胞（たとえば、マクロファージ、内皮細胞、または平滑筋細胞）を含む。

20

【0061】

好ましい実施形態において、この方法は、アテローム硬化関連核酸の発現（例えば、48149発現）のレベルに基づいて、診断および／または治療様式（例えば、特定の処置）もしくはその投薬量を選択する工程をさらに包含する。

【0062】

好ましい実施形態において、アテローム硬化関連核酸（例えば、48149）の発現は、アテローム硬化関連遺伝子制御エレメント（例えば、48149プロモーター）の制御下にある、シグナル実体（例えば、緑色蛍光タンパク質または他のマーカータンパク質）の発現を評価することにより評価される。

【0063】

いくつかの実施形態において、細胞またはサンプル由来の核酸（またはタンパク質）は、位置アレイ（例えば、DNAチップアレイ）で分析される。従って、好ましい実施形態において、この方法は、以下の工程：

30

複数の捕捉プローブのアレイを提供することによってサンプルを分析する工程であって、ここでこの捕捉プローブの各々は、このアレイ上の複数のプローブのうちの他の捕捉プローブと位置を区別することが可能であり、そしてここで、位置を区別することが可能な捕捉プローブの各々は、特有の試薬（例えば、アテローム硬化関連核酸またはポリペプチド（例えば、48149）を同定し得る抗体または核酸プローブを含む、工程：ならびに

このサンプルを捕捉プローブのアレイとハイブリダイズさせて、それによりサンプルの配列を分析する工程、

をさらに包含する。

40

【0064】

好ましい実施形態において、この評価する工程は、インビボで行われる。例えば、この被験体に、48149関連核酸またはポリペプチドと相互作用する検出可能に標識された薬剤を投与して、48149核酸またはポリペプチドの活性または発現のレベルに対してシグナルが生成されるようにすることによる。

【0065】

なお別の局面において、本発明は、選択されたレベルの48149発現または48149活性を有する細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞または肝細胞）を選択する方法を特徴とする。

50

【0066】

好ましい実施形態において、この方法は、48149の発現を、予め選択した標準8例（例えば、コントロール細胞）と比較する。

【0067】

好ましい実施形態において、この方法は、この細胞を、結合を起こさせる条件下で、48149と選択的に結合する薬剤（例えば、抗体）と接触させる工程を包含する。一実施形態において、この薬剤は、結合した薬剤-48149複合体の分離（例えば、物理的分離）を可能にする部分とカップリングされる（例えば、結合体化される）。

【0068】

好ましい実施形態において、この方法は、活性化細胞からの休止（resting）を決定する工程を包含する。 10

【0069】

なお別の局面において、本発明は、48149の活性または発現を調節する（例えば、阻害する）能力について、薬剤（例えば、本明細書中に記載されるような薬剤（例えば、ポリペプチド、ペプチド、ペプチドフラグメント、ペプチドミメティック、低分子））を評価するかまたは同定する方法を特徴とする。このような薬剤は、本明細書中に記載されるような、心臓血管障害（例えば、アテローム硬化）、代謝障害（例えば、代謝性肝臓障害）、または非好中球媒介炎症性障害を処置または予防するために有用である。この方法は、以下の工程：

試験薬剤、48149、または48149を発現している細胞（例えば、アテローム関連細胞）；および48149基質（例えば、エンケファリンまたはケモカイン）を提供する工程； 20

上記試験薬剤、上記48149または上記48149を発現している細胞、および上記48149基質を、上記48149と上記48149基質との相互作用（例えば、活性または発現）を可能にする条件下で、接触させる工程；および

上記試験薬剤が、上記48149と上記48149基質との間の発現または活性を調節する（例えば、阻害する）か否かを決定する工程、を包含し、

ここで試験薬剤の非存在下での活性または発現に比較して、試験薬剤の存在下における上記48149と上記48149基質との間の活性または発現のレベルにおける変化（例えば、減少）は、48149と48149基質との間の相互作用の調節（例えば、阻害）の指標である。 30

【0070】

好ましい実施形態において、この方法は、インビトロまたはインビボで（例えば、被験体（例えば、アテローム硬化を有する患者）において）、アテローム関連細胞（例えば、マクロファージ、平滑筋細胞または内皮細胞）における試験薬剤を評価して、それにより48149の活性または発現における試験薬剤の効果を決定する工程をさらに包含する。

【0071】

好ましい実施形態において、接触させる工程は、インビトロまたはエキソビボで行われる。例えば、サンプル（例えば、血液サンプル）は、被験体から得られる。好ましくは、このサンプルは、アテローム関連細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞または平滑筋細胞）を含む。 40

【0072】

好ましい実施形態において、48149基質は、蛍光発生基質（例えば、FITC結合体化小ペプチド）である。好ましくは、蛍光発生基質は、切断の際に蛍光を発生する。

【0073】

いくつかの実施形態において、48149基質は、他のアミノペプチダーゼと相互作用（例えば、結合）し得る。

【0074】

好ましい実施形態において、接触させる工程は、インビボで行われる。例えば、被験体 50

に、48149核酸またはポリペプチドと相互作用する、検出可能に標識された薬剤を投与して、48149核酸または48149ポリペプチドの活性または発現のレベルに対してシグナルが生成されるようにすることによる。

【0075】

好ましい実施形態において、この試験薬剤は、48149ポリペプチドの活性または発現のインヒビター（部分的インヒビターまたは完全インヒビター）である。

【0076】

好ましい実施形態において、この試験薬剤は、ペプチド、低分子（例えば、コンビナトリアルライブラリー（例えば、ペプチドコンビナトリアルライブラリーもしくは有機コンビナトリアルライブラリーまたは天然産物ライブラリー）のメンバー）、もしくは抗体、またはその任意の組み合わせである。

【0077】

さらなる好ましい実施形態において、試験薬剤は、アンチセンス、リボザイム、三重らせん分子、またはアテローム硬化関連核酸、またはその任意の組み合わせである。

【0078】

好ましい実施形態において、複数の試験薬剤（例えば、ライブラリーメンバー）が試験される。好ましい実施形態において、複数の試験薬剤（例えば、ライブラリーメンバー）は、少なくとも 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または 10^8 の化合物を含む。好ましい実施形態において、複数の試験薬剤（例えば、ライブラリーメンバー）は、構造的特徴および機能的特徴を共有する。

【0079】

好ましい実施形態において、試験薬剤は、ペプチドまたは有機低分子である。

【0080】

好ましい実施形態において、この方法は、無細胞条件（例えば、再構成系）で行われる。

【0081】

好ましい実施形態において、この方法は、この薬剤を、試験細胞または試験動物と接触させて、48149の活性または発現に対するこの試験薬剤の効果を評価する工程をさらに包含する。

【0082】

好ましい実施形態において、48149の活性または発現を調節する薬剤の能力は、第2の系（例えば、無細胞系、細胞ベースの系、または動物系）において評価される。

【0083】

好ましい実施形態において、48149の活性または発現を調節する薬剤の能力は、細胞ベースの系（例えば、ツーハイブリッドアッセイ）において評価される。

【0084】

別の局面において、本発明は、アテローム硬化関連核酸またはポリペプチドの転写を調節（例えば、増強または低減）する能力について薬剤（例えば、本明細書中に記載される薬剤（例えば、ポリペプチド、ペプチド、ペプチドフラグメント、ペプチド模倣物、低分子））を評価または同定する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程：

細胞（例えば、アテローム関連細胞（例えば、マクロファージもしくは単球、内皮細胞、または平滑筋細胞））と試験薬剤とを接触させる工程；および

その試験薬剤が、少なくとも1つのアテローム硬化関連核酸の転写を調節（例えば、活性化または阻害）するか否かを決定する工程（ここで、このアテローム硬化関連核酸またはポリペプチドの発現レベルの変化（例えば、増加または減少）は、アテローム硬化関連核酸の発現の調節（例えば、活性化または阻害）の指標となる）、を包含する。

【0085】

好ましい実施形態において、少なくとも1つ、2つ、3つ、または4つのアテローム硬化関連核酸またはポリペプチドの発現レベルが評価される。好ましくは、アテローム硬化

10

20

30

40

50

関連核酸またはポリペプチドは、48149、好ましくはヒト48149である。

【0086】

好ましい実施形態において、少なくとも1つのアテローム硬化関連核酸（例えば、本明細書中に記載される核酸）の発現レベルは、炎症誘導剤（例えば、炎症誘導性サイトカイン（例えば、IL-1b、CD40L、TNFa、またはLPS））による細胞（例えば、アテローム硬化関連細胞（例えば、マクロファージまたは単球））の刺激後に評価される。

【0087】

好ましい実施形態において、試験薬剤は、ペプチド、低分子（例えば、コンビナトリアルライブラリー（例えば、ペプチドまたは有機物のコンビナトリアルライブラリー、または天然産物のライブラリー）のメンバー）、もしくは抗体、またはそれらの任意の組み合わせである。 10

【0088】

さらなる好ましい実施形態において、試験薬剤は、アンチセンス、リボザイム、三重らせん分子、もしくはアテローム硬化関連核酸、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0089】

好ましい実施形態において、複数の試験化合物（例えば、ライブラリーのメンバー）が試験される。好ましい実施形態において、複数の試験化合物（例えば、ライブラリーのメンバー）は、少なくとも 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または 10^8 個の化合物を含む。好ましい実施形態において、複数の試験化合物（例えば、ライブラリーのメンバー）は、構造的特徴または機能的特徴を共有する。 20

【0090】

好ましい実施形態において、試験化合物は、ペプチドまたは有機低分子である。

【0091】

好ましい実施形態において、この方法は、無細胞条件（例えば、再構成系）において実施される。

【0092】

好ましい実施形態において、この方法は、細胞（例えば、アテローム硬化関連細胞（例えば、マクロファージもしくは単球、内皮細胞、または平滑筋細胞））中で実施される。

【0093】

好ましい実施形態において、この方法はさらに、以下の工程：上記薬剤と、試験細胞または試験動物を接触させて、アテローム硬化関連核酸の転写に対する試験薬剤の効果を評価する工程、を包含する。 30

【0094】

好ましい実施形態において、アテローム硬化関連核酸の転写を調節する薬剤の能力は、第2の系（例えば、無細胞系、細胞ベースの系、または動物系）において評価される。

【0095】

好ましい実施形態において、アテローム硬化関連核酸の転写を調節する薬剤の能力は、細胞ベースの系（例えば、ツーハイブリッドアッセイ）において評価される。

【0096】

本明細書中に記載される方法を用いて同定される薬剤もまた、本発明の範囲内である。 40

【0097】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載される薬剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を特徴とする。1つの実施形態において、本発明の組成物（例えば、薬学的組成物）は、組み合わせ治療（すなわち、他の薬剤（例えば、心血管障害（例えば、アテローム硬化）を処置するのに有用な治療剤）と組み合わせた治療）において投与される。この薬剤は、プロドラッグ、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の形態であり得る。

【0098】

別の局面において、本発明は、複数のアドレスを有する二次元アレイを特徴とする。複 50

数のアドレスの各アドレスは、複数のアドレスの他の各アドレスと位置的に区別可能であり、そして複数のアドレスの各アドレスは、独特の捕捉プローブ（例えば、核酸配列またはペプチド配列）を有する。複数のアドレスの少なくとも1つのアドレスは、48149分子を認識する捕捉プローブを有する。1つの実施形態において、捕捉プローブは、核酸（例えば、48149核酸配列に相補的なプローブ）である。別の実施形態において、捕捉プローブは、ポリペプチド（例えば、48149ポリペプチドに特異的な抗体）である。上記アレイにサンプルを接触させ、そしてアレイへのサンプルの結合を検出することによる、サンプル分析方法もまた、特徴とする。

【0099】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、詳細な説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかである。 10

【0100】

非翻訳領域を含む、約3494ヌクレオチド長であるヒト48149配列（実施例1に記載されるような、配列番号1を参照のこと）は、約2904ヌクレオチドの推定のメチオニンで開始するコード配列であって、終止コドンを含む、コード配列を含む。このコード配列は、967アミノ酸のタンパク質（実施例1に記載されるような、配列番号2を参照のこと）をコードする。

【0101】

ヒト48149は、以下の領域または他の構造的特徴を含む：

配列番号2のアミノ酸約残基76～480に位置するアミノペプチダーゼドメイン（P F A M 登録番号P F 0 1 4 3 3）； 20

配列番号2のアミノ酸約385～394に位置する天然のジंकプロテアーゼモチーフ（P S 0 0 1 4 2）；

配列番号2のアミノ酸約11～33に位置する1つの膜貫通ドメイン；ならびに

配列番号2のアミノ酸約128～131、アミノ酸約234～237、アミノ酸約265～268、アミノ酸約319～322、アミノ酸約527～530、アミノ酸約573～576、アミノ酸約625～628、アミノ酸約681～684、アミノ酸約735～738およびアミノ酸約818～821に位置する10の推定のN-グリコシル化部位（P S 0 0 0 0 1）。

【0102】

P F A M識別子、P Sプレフィックスドメイン識別数およびP Fプレフィックスドメイン識別数に関する一般的な情報について、S o n n h a m m e r ら（1997）P r o t e i n 28：405～420およびh t t p：//w w w. p s c. e d u/g e n e r a l/s o f t w a r e/p a c k a g e s/p f a m/p f a m. h t m lを参照する。 30

【0103】

48149タンパク質は、アミノペプチダーゼファミリーのメンバーに共通する多数の構造的特徴を含む。実際に、ヒト48149は、ヒト骨髄原形質膜糖タンパク質D C 1 3の配列（これは、アミノペプチダーゼNとしても公知である）に同一である（L o o k ら（1989）、J. C l i n. I n v e s t. 83（4）：1299～307）。本発明 40のタンパク質分子および核酸分子をいう場合、用語「ファミリー」とは、共通の構造的ドメインまたはモチーフを有し、そして本明細書中に規定されるような十分なアミノ酸配列相同性またはヌクレオチド配列相同性を有する2つ以上のタンパク質または核酸分子を意味する。このようなファミリーメンバーは、天然に存在しても天然に存在しなくてもよく、そして同じ種由来または異なる種由来のいずれかであり得る。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第1のタンパク質および他の別個のヒト起源のタンパク質を含み得るか、あるいは、非ヒト起源（例えば、ラットまたはマウス）のホモログのタンパク質を含み得る。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能的特徴を有し得る。

【0104】

タンパク質のアミノペプチダーゼファミリーは、共通の折り畳み（f o l d）によって 50

特徴付けられる。この折り畳みは、代表的に細胞外に配置され、そして膜貫通ドメインを介して原形質膜に結合され得る。アミノペプチダーゼファミリーメンバーは、ペプチドからNH₂末端アミノ酸の除去を触媒し、代表的には、中性、塩基性、または酸性の残基に対する優先性 (preference) を有するが、アミノペプチダーゼは、このような優先性を示すにもかかわらず、広い特異性を有し得る。天然の基質は、大きなタンパク質よりもむしろペプチドであることが明らかであるが、アミノペプチダーゼがジペプチドよりもオリゴペプチドからの残基の除去においてより有効である。アミノペプチダーゼは、(例えば、小腸における) 小ペプチドの消化の最終段階において重要な役割を果たすと考えられており、そしてこれは、調節ペプチド (細胞膜でのシグナル伝達に関する調節ペプチドを含む) の加水分解的不活性化における機能が仮定される。このアミノペプチダーゼドメインは、代表的に、金属結合部位および触媒部位 (タンパク質分解に関する) の両方として作用する中性のジンクプロテアーゼモチーフを含む。

10

【0105】

48149ポリペプチドは、「アミノペプチダーゼドメイン」または「アミノペプチダーゼドメイン」と相同な領域を含み得る。

【0106】

本明細書中で使用される場合、用語「アミノペプチダーゼドメイン」は、約200~600のアミノ酸残基の長さであるアミノ酸配列を含み、そしてこのアミノ酸配列は、少なくとも300の、膜ペプチダーゼドメインプロファイル (Pfam HMM) に対する配列アラインメントについてのビットスコア (bit score) を有する。好ましくは、膜ペプチダーゼドメインは、少なくとも約200~500のアミノ酸を含み、より好ましくは約300~450のアミノ酸残基を含むか、または約400アミノ酸を含み、そして少なくとも400、好ましくは550、より好ましくは700以上の、膜ペプチダーゼドメイン (HMM) に対する配列のアラインメントについてのビットスコアを有する。この膜ペプチダーゼドメイン (HMM) は、PFAM登録番号PF01433 (<http://genome.wustl.edu/Pfam/.html>) に割り当てられている。ヒト48149の膜ペプチダーゼドメイン (配列番号2のアミノ酸76~480) と隠れたマルコフモデル由来のコンセンサスアミノ酸配列 (配列番号4) とのアラインメントを、図2に示す。

20

【0107】

好ましい実施形態において、48149ポリペプチドまたは48149タンパク質は、「膜ペプチダーゼドメイン」、または少なくとも約200~600のアミノ酸残基、より好ましくは約200~500のアミノ酸残基、または約300~450アミノ酸残基を含み、かつ「アミノペプチダーゼドメイン」と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%の相同性を有する領域 (例えば、ヒト48149のアミノペプチダーゼドメイン (例えば、配列番号2の残基76~480)) を有する。

30

【0108】

48149タンパク質配列中の「アミノプロテアーゼ」ドメインの存在を同定するため、および目的のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルを持つことの決定を行うために、このタンパク質のアミノ酸配列が、デフォルトパラメーターを用いるHMMのPFAMデータベース (例えば、PFAMデータベース、リリース2.1) に対して検索され得る (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search)。例えば、hmmsfプログラム (サーチプログラムのHMMERパッケージの一部として入手可能) は、MILPAT0063についてのファミリー特異的なデフォルトプログラムであり、そして15のスコアは、ヒットを決定するためのデフォルトの閾値スコアである。あるいは、ヒットを決定するための閾値スコアが、(例えば、8ビットに) 下げられ得る。PFAMデータベースの記載が、Sonhammerら (1997) Proteins 28 (3): 405~420に見出され得、そしてHMMの詳細な記載が、例えば、Gribskovら、(1990) Meth. E

40

50

enzymol. 183:146~159; Gribskovら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4355~4358; Kroghら、(1994) J. Mol. Biol. 235:1501~1531; および Stultzら、(1993) Protein Sci. 2:305~314に見出され得る(これらの内容は、本明細書中に参考として援用される)。検索が、PFAM HMMデータベースに対して実施され、配列番号2の約残基76~480で、ヒト48149のアミノ酸配列における「アミノプロテアーゼ」ドメインの同定を得た(図2を参照のこと)。

【0109】

好ましい実施形態において、48149タンパク質は、少なくとも1つの中性ジंकプロテアーゼモチーフを含む。本明細書中で使用される場合、「中性ジंकプロテアーゼモチーフ」は、以下の配列によって規定される少なくとも5つのアミノ酸残基の配列を含む: [GSTALIVN]-X-X-H-E-[LIVMLFW]-[DEHRKP]-H-x-[LIVMFYWGS PQ] (配列番号5)。規定されるような中性ジंकプロテアーゼモチーフは、亜鉛イオンの配位およびペプチド基質の酵素的加水分解に参与し得る。より好ましくは、中性のジंकプロテアーゼモチーフは、7アミノ酸残基以上、さらにより好ましくは10アミノ酸残基を含む。中性ジंकプロテアーゼモチーフは、例えば、Bodeら(1996)、Zoology 99:237-46に記載されており、その内容は、本明細書中に参考として援用される。ヒト48149は、配列番号2のアミノ酸残基約385-394に位置する中性ジंकプロテアーゼを含む。

【0110】

好ましい実施形態において、48149ポリペプチドまたは48149タンパク質は、少なくとも1つの中性ジंकプロテアーゼモチーフ、あるいは少なくとも5アミノ酸残基、7アミノ酸残基、または好ましくは10アミノ酸残基を含み、かつヒト48149の「中性ジंकプロテアーゼモチーフ」(例えば、配列番号2のアミノ酸残基約385~394)と少なくとも70%、80%、90%または100%の相同性を有する領域を有する。

【0111】

いくつかの実施形態において、48149タンパク質は、少なくとも1つの膜貫通ドメインを含む。本明細書中で使用される場合、用語「膜貫通ドメイン」は、リン脂質膜に広がる約15アミノ酸残基長のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも約20アミノ酸残基、22アミノ酸残基、または25アミノ酸残基を含み、リン脂質膜に広がる。膜貫通ドメインは、疎水性残基が豊富であり、代表的には、 α -ヘリックス構造を有する。好ましい実施形態において、膜貫通ドメインのアミノ酸のうちの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%以上が、疎水性(例えば、ロイシン、イソロイシン、チロシン、またはトリプトファン)である。膜貫通ドメインは、例えば、Zagotta, W. N. ら(1996) Annual Rev. Neurosci. 19:235~63(その内容は、本明細書中に参考として援用される)に記載される。

【0112】

好ましい実施形態において、48149ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、または少なくとも20アミノ酸残基、22アミノ酸残基もしくは25アミノ酸残基を含み、かつ「膜貫通ドメイン」(例えば、ヒト48149の少なくとも1つの膜貫通ドメイン(例えば、配列番号2のアミノ酸残基約11~33)と少なくとも約70%、80%、90%、95%、99%、または100%の相同性を有する領域を含む)。

【0113】

48149ファミリーメンバーは、少なくとも1つのアミノペプチダーゼドメインを含み得る。さらに、48149ファミリーメンバーは、少なくとも1つの中性ジंकプロテアーゼモチーフ(PS00142); 少なくとも1つの膜貫通ドメイン; ならびに少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、好ましくは10のN-グ

10

20

30

40

50

リコシル化部位（P S 0 0 0 0 1）を含み得る。

【0 1 1 4】

本発明の4 8 1 4 9ポリペプチドは、4 8 1 4 9媒介活性を調節し得るので、これらは、以下に記載されるような4 8 1 4 9媒介障害または4 8 1 4 9関連障害のための新規診断剤および治療剤を開発するために有用であり得る。

【0 1 1 5】

本明細書中で使用される場合、「4 8 1 4 9活性」「4 8 1 4 9の生物学的活性」または「4 8 1 4 9の機能的活性」とは、4 8 1 4 9タンパク質、4 8 1 4 9ポリペプチドまたは4 8 1 4 9核酸分子により示される活性をいう。例えば、4 8 1 4 9活性は、例えば、4 8 1 4 9応答性細胞上または4 8 1 4 9基質（例えば、タンパク質基質）に対して生理学的環境において4 8 1 4 9により示される活性であり得る。4 8 1 4 9活性は、インビボまたはインビトロで決定され得る。1つの実施形態において、4 8 1 4 9活性は、直接的な活性（例えば、4 8 1 4 9標的分子との結合）である。「標的分子」または「結合パートナー」は、4 8 1 4 9タンパク質が天然に結合または相互作用する分子である。例示的な実施形態において、4 8 1 4 9タンパク質は、ポリペプチド基質（例えば、シグナル伝達に關与する小さなポリペプチド（例えば、エンケファリンまたはケモカインM C P - 1））を加水分解する酵素である。

【0 1 1 6】

4 8 1 4 9活性はまた、間接的な活性（例えば、4 8 1 4 9タンパク質と4 8 1 4 9結合タンパク質もしくは4 8 1 4 9基質であるシグナル伝達分子との相互作用により媒介される細胞性シグナル伝達活性）であり得る。本発明の4 8 1 4 9分子のこの特徴は、アミノプロテアーゼファミリーメンバーと類似の生物学的活性を提供し得る。例えば、本発明の4 8 1 4 9タンパク質は、以下の活性：（1）ポリペプチドの加水分解；（2）ポリペプチドからNH₂末端アミノ酸の触媒反応；および（3）細胞内シグナル伝達に關連するポリペプチドの消化、の1つ以上を有し得る。さらに、本発明の4 8 1 4 9タンパク質は、これらを発現される組織において、上記のような機能を有し得る。従って、4 8 1 4 9タンパク質は、以下の活性：（4）マクロファージ活性の調節；（5）マクロファージ活性化の調節；（6）白血球活性化の調節；（7）マクロファージによる脂肪酸およびコレステロールの取り込みの調節；（8）アロテム性動脈硬化性プラーク形成の促進；または（9）脂肪酸およびコレステロール代謝の調節の1つ以上を有し得る。

【0 1 1 7】

従って、4 8 1 4 9分子は、心臓血管障害、代謝障害（例えば、肝臓での脂質代謝もしくはコレステロール代謝に關連する）または非好中球媒介性炎症障害を制御するための新規の診断標的および治療剤として作用し得る。用語「心臓血管障害」または「疾患」としては、心臓の障害、ならびに例えば、血管内の異常に高濃度な脂質によって引き起こされる循環系の血管の障害が挙げられる。

【0 1 1 8】

心臓血管障害または疾患の例としては、例えば、以下が挙げられる：アロテム性動脈硬化症、動脈瘤（aneurism）、血栓症、心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、心臓性突然死、高血圧性心疾患；非冠状血冠疾患（例えば、細動脈硬化症、小血管性疾患、ニューロパシー、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、高血圧）；あるいは治療的手順（「手順的な血管性外傷」）（例えば、血管形成術後の再狭窄、シャント、ステント、合成もしくは天然の摘出移植物の配置、体内に留置したカテーテル、弁もしくは他の移植可能なデバイス）に關連する心臓血管状態。

【0 1 1 9】

心臓に關与する疾患としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：心不全、（心肥大、左心不全および右心不全が挙げられるがこれらに限定されない）；虚血性心臓病（狭心症、心筋梗塞、慢性虚血性心臓病、動脈瘤および心臓突然死が挙げられるがこれらに限定されない）；高血圧性心臓病（全身性（左）高血圧性心臓病および肺（右）高血圧性心臓病が挙げられるがこれらに限定されない）；弁心臓病（石灰化により生じる弁変性

(例えば、石灰化大動脈狭窄症、先天性二尖大動弁の石灰化、および僧帽弁輪状石灰化、および僧帽弁のミクソイド変性(僧帽弁逸脱症)、リウマチ熱およびリウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、および非感染性贅形成(例えば、非細菌性血栓性心内膜炎および全身性エリテマトーデスの心内膜炎(リブマン・ザックス病)、カルチノイド心臓病、および心臓弁の合併症)が挙げられるがこれらに限定されない)；心筋疾患(拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、および心筋炎が挙げられるがこれらに限定されない)；心膜疾患(心内膜液浸出および心膜血腫ならびに心膜炎(急性心膜炎および治癒型心膜炎を含む)、ならびにリウマチ様心臓病が挙げられるがこれらに限定されない)；新生物性心臓病(原発性心臓腫瘍(例えば、粘液腫、脂肪腫、乳頭状弾力線維腫、横紋筋腫、および肉腫)、ならびに非心臓新生物の心臓効果が挙げられるがこれらに限定されない)；先天性心臓病(左右短絡—遅発性チアノーゼ(例えば、心房中隔欠損症、心室中隔欠損症、動脈管および房室中隔欠損症)、右左シャント—早発性チアノーゼ(例えば、ファロー四徴症、大動脈転位症、総動脈幹、三尖弁閉鎖症、および総肺静脈還流異常症)、閉塞性先天性異常(例えば、大動脈の縮窄症、肺動脈弁狭窄症および閉鎖症、ならびに大動脈狭窄症および閉鎖症、喘息、肺気腫および慢性肺疾患)、ならびに心臓移植に関する障害が挙げられるがこれらに限定されない)。

【0120】

血管に関する障害としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：損傷に対する脈管細胞壁の応答(例えば、内皮機能不全および内皮活性化および内膜肥厚)；脈管疾患(先天性異常(例えば、動静脈瘻)、アテローム性動脈硬化症、および高血圧性脈管疾患(例えば、高血圧)が挙げられるがこれらに限定されない)；炎症性疾患—脈管炎(vasculitides)(例えば、巨細胞性(側頭)動脈炎、高安動脈炎、結節性多発性動脈炎(古典的)、川崎病(皮膚粘膜リンパ節症候群)、顕微的多発性血管炎(顕微的多発性動脈炎、過敏症もしくは白血球破碎性血管炎)、ヴェーゲナー肉芽腫症、閉塞性血栓性血管炎(パーガー病)、他の障害に関連する脈管炎、および感染性動脈炎)；レーノー病；動脈瘤および解離(例えば、腹大動脈瘤、梅毒性(syphilitic)動脈瘤、および大動脈解離(解離性血腫))；静脈およびリンパ管の障害(例えば、拡張蛇行静脈、血栓性静脈炎および静脈血栓症、上大静脈の閉塞(上大静脈症候群)、下大静脈の閉塞(下大静脈症候群)、ならびにリンパ管炎およびリンパ水腫；腫瘍(良性腫瘍および腫瘍性状態を含む(例えば、血管腫、リンパ管腫、グロムス腫瘍(グロムス血管腫)、脈管拡張症、および細菌性血管腫症状、および中間悪性度(境界低悪性度悪性)腫瘍(例えば、カポジ肉腫および血管内皮腫)ならびに悪性腫瘍(例えば、血管肉腫および血管周囲細胞腫)；ならびに脈管疾患における治療介入の病理(例えば、バルーン血管形成および関連技術、ならびに脈管置換(例えば、冠動脈バイパス移植手術))。

【0121】

小管疾患としては、四肢における脈管不全、末梢神経障害および網膜症(例えば、糖尿病性網膜症)が挙げられるがこれらに限定されない。

【0122】

内皮細胞障害としては、異常性内皮細胞活性、未制御内皮細胞活性、または所望されない内皮細胞活性(例えば、増殖、移動、新脈管形成、または血管新生)によって特徴付けられる障害；あるいは細胞表面接着分子または新脈管形成に関連する遺伝子(例えば、TIE-2、FLTおよびFLK)の異常な発現によって特徴付けられる障害が挙げられる。内皮細胞障害としては、腫瘍形成、腫瘍転移、乾癬、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、グレーブズ疾患、虚血性疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症)、および慢性炎症疾患(例えば、慢性関節リウマチ)が挙げられる。

【0123】

肝臓疾患としては、脈管障害の肝性発現に関連する肝臓傷害(例えば、肝臓内胆汁流または肝臓外胆汁流いずれかの閉塞あるいは肝性循環の変更(例えば、慢性心不全、静脈閉塞病、門脈血栓症、またはバッド・キアーリ症候群から生じる))が挙げられるが、これ

らに限定されない。他の肝臓疾患としては、肝臓の線維組織中の蓄積に関連する障害（既存の繊維の崩壊および圧縮に付随する細胞外マトリクスの産生と分解との間の不均衡から生じる疾患）；および恒常性を攪乱するプロセスを含む広範な薬剤によって誘導される肝細胞壊死または肝細胞傷害（例えば、炎症プロセス、毒性傷害または変更された肝血流から生じる組織損傷、および感染（例えば、細菌感染、ウイルス感染および寄生生物感染））が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、このような障害としては、肝性傷害（例えば、内脈圧亢進症または肝線維症）が挙げられる。さらなる肝臓障害としては、代謝の先天性欠陥に起因する肝線維症（例えば、蓄積障害（例えば、ゴシェ病（脂質異常）またはグリコーゲン蓄積症）から生じる線維症）、A1-抗トリプシン欠損症；外因性物質の蓄積（例えば、保存）を媒介する障害（例えば、ヘモクロマトーシス（鉄過剰摂取症候群）および銅蓄積症（ウィルソン病））、毒性代謝物の蓄積を生じる障害（例えば、チロシン血症、果糖血症およびガラクトース血症）ならびにペルオキシソーム障害（例えば、ツェルヴェーガー症候群）が挙げられる。

【0124】

本明細書中で使用される場合、用語「アテローム性動脈硬化症」は、その臨床的意味を有することが意図される。この用語は、動脈壁における傷害形成の結果として生じる心臓血管状態をいう。狭窄は、動脈の内層におけるプラークまたは引っかき傷の形成に起因する。これらのプラークは、改変低密度リポタンパク質、酸化LDL、衰退平滑筋細胞、繊維組織、血小板クランプ、コレステロール、および時々カルシウムで充填された泡沫細胞からなる。これらは、血流が乱れた領域で形成される傾向があり、血流において高濃度のコレステロールを有するヒトにおいて最も頻繁に見い出される。プラークの数および厚さは、年齢と共に増加し、このことは、欠陥の平坦な内層の損失を引き起こし、血栓（血餅）の形成を促進する。時々、血栓の断片が分離し、栓子を形成し、この栓子は、血流を通過して移動し、より狭い脈管を遮断する。血栓または栓子は、心臓、脳、腎臓および他の器官に対する血液供給を制限し末端の器官に損傷または死を最終的に導き得る。アテローム性動脈硬化症の主要な原因は、血液中の高い循環トリグリセリドによって特徴付けられる、高コレステロール血症、高リポ蛋白血症（*hyp o a l p h o p r o t e i n e m i a*）、および高脂質血症である。これらの脂質は、動脈壁に沈着し、血流を遮断し、そして死に導くアテローム性動脈硬化型プラークを形成する。

【0125】

本明細書中で使用される場合、用語「高コレステロール血症」は、成人における高コレステロールのExpert Panel Report of the National Cholesterol Educational Program (NCEP) of Detection, Evaluation of Treatmentの指針に従って、循環全コレステロール、LDL-コレステロールおよびVLDL-コレステロールのレベルが上昇した条件である（Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39を参照のこと）。

【0126】

本明細書中で使用される場合、用語「高脂質血症」または「高脂肪血症」は、血液脂質パラメーターが、血液で上昇した条件である。この条件は、異常に高濃度の脂肪を示す。この循環血液中の脂質分画は、全コレステロール、低密度リポタンパク質、非常に低密度のリポタンパク質およびトリグリセリドである。

【0127】

本明細書中で使用される場合、用語「リポタンパク質」（例えば、VLDL、LDLおよびHDL）は、血清、血漿およびリンパにおいて見出されるタンパク質の群をいい、脂質輸送において重要である。各リポタンパク質の化学的組成物は、HDLが、より高いタンパク質対脂質の比を有するのに対して、VLDLは、より低いタンパク質対脂質の比を有するという点で異なる。

【0128】

本明細書中で使用する場合、用語「トリグリセリド」は、3つの脂肪酸分子と結合され

たグリセロールからなる、脂質または中性脂肪を意味する。

【0129】

本明細書中で使用する場合、用語「黄色腫症」は、脂肪の沈着に由来する、皮膚の黄色の腫脹またはプラークによって示される疾患である。黄色腫の存在は、通常、上昇した血液コレステロールレベルを伴う。

【0130】

本明細書中で使用する場合、用語「アポリポタンパク質B」、「アポタンパク質B」、または「ApoB」および「アポリポタンパク質E」、「アポタンパク質E」、または「ApoE」は、LDLコレステロール輸送リポタンパク質粒子のタンパク質成分をいう。デノボ合成されたコレステロールは、肝臓および腸から周辺組織まで、リポタンパク質粒子の形態で輸送される。ほとんどのアポリポタンパク質Bは、VLDLとして循環系に分泌される。 10

【0131】

本明細書中で使用される場合、用語「アポリポタンパク質A」、または「アポタンパク質A」、または「ApoA」は、HDLコレステロール輸送タンパク質のタンパク質成分をいう。

【0132】

「手術性血管外傷」は、外科的／医療機械的介入」の哺乳動物の脈管構造への効果を含むが、本明細書中上記に列挙される有機的脈管病因に起因する血管外傷も、意図されない外傷（例えば、事故に起因する）も含まない。従って、本発明の治療法の範囲内の手術上の血管外傷としては、以下が挙げられる：（1）臓器移植術（grafting or transplantation）（例えば、心臓、腎臓、肝臓などの移植術（例えば、脈管吻合術を含む））；（2）脈管手術（例えば、冠状動脈バイパス手術、生体組織検査法、心臓弁置換、動脈切除術、血栓摘出術など）；（3）経カテーテル脈管療法（TVT）（バルーンカテーテル（すなわち留置カテーテル）を使用する血管形成術（例えば、本明細書中以下に議論されるレーザー血管形成術およびPTCA手順）を含む）；（4）天然材料または合成材料を使用する血管移植術（例えば、末梢動脈再構築のために使用される、伏在静脈冠状動脈バイパス移植片、ダクロン移植片および静脈移植片などのような）；（5）動静脈連絡のために使用される機械的シャント（例えば、PTFE血液透析シャント）の配置；ならびに静脈内ステント（金属性ポリマー、プラスチックポリマーまたは生体分解性ポリマーであり得る）の配置。1995年2月15日に出願された米国特許出願第08／389,712（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。これらが形成され得る移植可能デバイスおよび生体適合物質の一般的な考察については、H. Kambicら、「Biomaterials in Artificial Organs」, Chem. Eng. News, 30（1986年4月14日）（この開示は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。 20 30

【0133】

用語「因子」は、化合物、化合物の混合物、生体高分子、ペプチド、ポリペプチド（例えば、抗体）、低分子、コンビナトリアルライブラリーのメンバー、ペプチドフラグメント、ペプチド模倣物、または生物学的材料（例えば、細菌、植物、真菌、または動物（特に、哺乳動物）の、細胞または組織）から作製された抽出物を示すために、本明細書中で使用される。因子は、例えば、本明細書中以下に記載されるスクリーニングアッセイに含めることによって、48419阻害活性について評価され得る。 40

【0134】

本明細書中で使用される場合、因子の「治療有効量」は、非好中球媒介性炎症性障害、心臓血管障害または内皮性障害、あるいはこのような処置をしない場合に予想される障害を超えた障害を有する、被験体（例えば、患者）に対して単回用量投与または複数回用量投与する際に、この被験体の48149発現または48149活性を阻害するかまたはこの被験体の生存を延長するのに有効である48419インヒビターの量をいう。

【0135】

本明細書中で使用される場合、４８１４９の「発現または活性を阻害すること」は、発現または活性（膠原溶解（例えば、コラーゲンⅠの分解））の減少、遮断をいい、必ずしも４８１４９発現または４８１４９活性の完全除去を必ずしも示すわけではない。

【０１３６】

本明細書中で使用される場合、因子の「予防有効量」は、患者に対して単回用量投与または複数回用量投与する際に、本明細書中に記載されるような障害の発症または再発を予防または遅延するのに有効である４８４１９インヒビターの量をいう。

【０１３７】

用語「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「高める」、「増加する」、「減少する」など（例えば、これらは２つの状態の間の定量的差異を示す）は、２つの状態の間の少なくとも統計的に有意な差異をいう。例えば、「４８１４９の活性または発現を阻害するための有効量」は、処置されたサンプルにおける４８１４９の活性または発現のレベルが、処置されていない細胞における４８１４９の活性または発現のレベルから統計的に有意に異なることを意味する。このような用語は、本明細書中で、例えば、発現のレベルおよび活性のレベルに対して適用される。

【０１３８】

いくつかの実施形態において、本発明の因子の治療的用途および予防的用途は、組み合わせ治療として、第２の因子（例えば、非特異的ＭＭＰインヒビター、コレステロール低下剤、または介入剤）の投与をさらに含有する。本明細書中の文脈において、用語「組み合わせる」は、因子または因子および手順が、実質的に同時に、同時または連続的にいずれかで与えられることを意味する。連続的に与えられる場合、第２の因子の投与または手順の投与の開始時に、第１の因子は、好ましくは、処置部位で有効濃度でなお検出可能である。例えば、組み合わせ治療は、１つ以上のさらなる治療剤（例えば、１つ以上のＭＭＰインヒビター、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤および／あるいは免疫抑制剤）と同時処方および／または同時投与される本発明の因子を含み得る。例えば、本発明の因子またはその抗体結合フラグメントは、１つ以上のさらなるＭＭＰインヒビターと同時処方および／または同時投与され得る。

【０１３９】

本発明の因子は、脂質低下剤と組み合わせ投与され得る。ナイアシン（niacin）とスタチンとの組み合わせを使用する現在の組み合わせ治療法は、高脂血症を処置するために使用され、ポジティブな結果を伴う（Guyton, JR. (1999) Curr Cardiol Rep. 1 (3): 244-250; Otto, C. ら、(1999) Internist (Berl) 40 (12): 1338-45）。他の有用な薬物の組み合わせは、新鮮な油、胆汁酸結合樹脂、またはスタノール（stanol）エステルおよび非スタチンの組み合わせ（例えば、ナイアシン樹脂またはフィブラート（fibrate）-ナイアシン）の添加によって導かれる組み合わせを含む（Guyton, JR. (1999)、上述）。コレステロール低下剤の投薬量および投与スケジュールの例について、Guyton, JR. (1999)、上述、Otto, C. ら、(1999)、上述、Guyton, JR ら、(1998), Am J Cardiol 82 (12A): 82U-86U; Guyton, JR ら、(1998), Am J Cardiol 82 (6): 737-43; Vega, GL ら、(1998), Am J. Cardiol 81 (4A): 36B-42B; Schechtman, G. (1996), Ann Intern Med. 125 (12): 990-1000; Nakamura, H. ら、(1993) Nippon Rinsho 51 (8): 2101-7; Goldberg, A. ら、(2000), Am J Cardiol 85 (9): 1100-5; Morgan, JM ら、(1996), J Cardiovasc. Pharmac. Ther. 1 (3): 195-202; Stein, EA ら、(1996), J Cardiovasc Pharmacol Ther 1 (2): 107-116; および Goldberg, AC (1998), Am J Cardiol 82 (12A): 35U-41U の教示が、参考として特に援用される。

10

20

30

40

50

【0140】

本明細書中で使用される場合、「コレステロール低下剤」は、血清コレステロールを低下するのに有用な薬剤（例えば、胆汁酸隔離樹脂（例えば、塩酸コレステポールまたはコレステラミン））、魚油、スタノールエステル、ApoAII低下剤、VLDL低化剤、ApoAI刺激剤、フィブリン酸誘導体（例えば、クロフィブレート、フェノフィブラート、またはゲムフィプロジル）チアゾリデンジオン（thiazolidenedione）（例えば、トログリタゾン（troglitazone）、ピオグリタゾン、シグリタゾン、エングリタゾン（englitazone）、ロシグリタゾン（rosiglitazone））、またはHMG-CoAレダクターゼインヒビター（例えば、スタチン（例えば、フルバスタチンナトリウム、ロバスタチン、プラバスタチンナトリウム、シンバスタチン、アトルバスタチン（atorvastatin）カルシウム、セリバスタチン（cerivastatin）））、およびニコチン酸、ナイアシン、またはプロブコール）を含む。

【0141】

本明細書中で使用される場合、用語「VLDL低下剤」は、トリグリセリドリッチリポタンパク質の肝臓合成を減少させるか、またはトリグリセリドリッチリポタンパク質の異化作用を増加させる薬剤（例えば、フィブラート（例えば、ゲムフィプロジル）、またはスタチン）、アポE媒介性清浄作用経路の発現を増加させる薬剤、または糖尿病におけるインシュリン感受性を改善する薬剤（例えば、チアゾリデンジオン）を含む。

【0142】

48149タンパク質、そのフラグメント、およびその配列番号2の配列の誘導体および他の改変体は、集合的に、「本発明のペプチドまたはタンパク質」あるいは「48149ポリペプチドまたは48149タンパク質」といわれる。このようなポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸分子は、集合的に、「本発明の核酸」または「48149核酸」といわれる。48149分子は、48149核酸、48149ポリペプチド、および48149抗体をいう。

【0143】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、およびDNAまたはRNAのアナログを含む。DNAアナログまたはRNAアナログは、ヌクレオチドアナログから合成され得る。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であっても良いが、好ましくは、二本鎖DNAである。

【0144】

用語「単離された核酸分子」または「精製された核酸分子」は、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を含む。例えば、ゲノムDNAに関して、用語「単離された」は、そのゲノムDNAが天然で結合している染色体から分離される核酸分子を含む。好ましくは、「単離された」核酸は、その核酸の由来する生物のゲノムDNAにおいて、その核酸に天然で隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および／または3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離された核酸分子は、その核酸の由来する細胞のゲノムDNAにおいて、天然でその核酸分子に隣接する、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満の5'側および／または3'側のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、cDNA分子）は、実質的に、他の細胞物質、または、組換え技術により生成される場合、培養培地を含まないか、あるいは、化学合成される場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。

【0145】

本明細書中で使用される場合、用語「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする」とは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を実施するための手引きは、Current Protocols

10

20

30

40

50

in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6 (これは、本明細書中で参考として援用される) において見出され得る。水性および非水性の方法は、その参考文献に記載され、そしてそのいずれかが使用され得る。本明細書中で言及される特定のハイブリダイゼーション条件は、以下の通りである：1) 約45℃で6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC) 中での低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、その後の少なくとも50℃で0.2×SSC、0.1% SDS 中での2回の洗浄（洗浄温度は、低ストリンジェンシーの条件について55℃まで上昇され得る）；2) 約45℃で6×SSC 中での中程度にストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、その後の60℃で0.2×SSC、0.1% SDS 中での1回以上の洗浄；3) 約45℃で6×SSC 中での高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、その後の65℃で0.2×SSC、0.1% SDS 中での1回以上の洗浄；そして好ましくは、4) 非常に高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、65℃で0.5Mリン酸ナトリウム、7% SDS、その後の65℃で0.2×SSC、1% SDS 中での1回以上の洗浄である。非常に高ストリンジェンシー条件 (4) が、好ましい条件であり、そして他にそうでないことが示されない限り、使用されるべき条件である。

【0146】

好ましくは、本明細書中に記載されるストリンジェンシー条件下で、配列番号1または配列番号3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。

【0147】

本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子は、天然で生じ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。例えば、天然に存在する核酸分子は、天然のタンパク質をコードし得る。

【0148】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、48149タンパク質をコードする少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。この遺伝子は、必要に応じて、非コード配列（例えば、調節配列およびイントロン）をさらに含み得る。好ましくは、遺伝子は、哺乳動物48149タンパク質またはその誘導体をコードする。

【0149】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質は、そのタンパク質が誘導された細胞または組織供給源由来の細胞物質または他の混入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た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。「実質的に含まない」は、48149タンパク質の調製物が、少なくとも10%純粋であることを意味する。好ましい実施形態において、48149タンパク質の調製物は、約30%、20%、10%、およびより好ましくは、5%未満（重量）の、非48149タンパク質（本明細書中で「混入タンパク質」とも呼ばれる）または化学前駆体もしくは非48149化学物質を有する。48149タンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え生成される場合、それはまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まない（すなわち、培養培地は、タンパク質調節物の量の約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%未満を占める）。本発明は、乾燥重量で、少なくとも0.01、0.1、1.0、および10mgの単離または精製された調製物を含む。

【0150】

「非必須」アミノ酸残基は、48149活性を喪失または実質的に変更することなく、48149の野生型配列から変更され得る残基である。好ましくは、この変更は、48149活性を実質的に変更しない（例えば、この活性は、野生型の少なくとも20%、40%、60%、70%、または80%である）。「必須」アミノ酸残基は、48149の野生型配列から変更される場合、48149活性が喪失し、その結果野生型活性の20%未満が存在するようになる残基である。例えば、48149において保存されたアミノ酸残

基は、変更特に影響を受けやすいことが予想される。

【0151】

「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、当該分野で規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（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）、 β 分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（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）を有するアミノ酸が挙げられる。従って、48149タンパク質中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同一側鎖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、別の実施形態において、変異は、48149コード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入され得（例えば、飽和変異誘発によって）、そして得られる変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、48149生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号1または配列番号3の変異誘発の後、コードされるタンパク質は、組換え発現され得、そしてタンパク質の活性が、決定され得る。

【0152】

本明細書中で使用される場合、48149タンパク質の「生物学的に活性な部分」としては、相互作用（例えば、分子内相互作用または分子間相互作用に關与する48149タンパク質のフラグメントが挙げられる。分子間相互作用は、特異的結合相互作用または酵素的相互作用であり得る（例えば、相互作用は、一過性であり得、そして共有結合は、形成されるかまたは分解される）。分子間相互作用は、48149分子と非48149分子との間、または第1の48149分子と第2の48149分子との間（例えば、二量体化相互作用）であり得る。48149タンパク質の生物学的に活性な部分としては、全長48149タンパク質より少ないアミノ酸を含み、かつ48149タンパク質の少なくとも1つの活性を示す、48149タンパク質のアミノ酸配列に十分に相同であるかまたはそれに由来するアミノ酸配列（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列）を含むペプチドが挙げられる。代表的に、生物学的に活性な部分は、48149タンパク質の少なくとも1つの活性（例えば、ポリペプチド基質（例えば、短いペプチド）の加水分解、または調節性ペプチド（例えば、細胞膜でのシグナル伝達事象に關与するペプチド）の加水分解性不活性化）を有するドメインまたはモチーフを含む。48149タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100、200またはそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。48149タンパク質の生物学的に活性な部分は、48149媒介活性（例えば、ポリペプチド基質の加水分解（例えば、短いペプチド）、または調節性ペプチド（例えば、細胞膜でのシグナル伝達事象に關与するペプチド）の加水分解性不活性化）を調節する薬剤を開発するための標的として使用され得る。

【0153】

配列間の相同性または配列同一性（これらの用語は、本明細書中で交換可能に使用される）の計算は、以下のように実施される。

【0154】

2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、ギャップは、最適な整列のために、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非相同配列は、比較目的で無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、60%、およびさらにより好ましくは、少なくとも70%、80%、90%、100%の長さである。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の配列における

位置が、第2の配列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、これらの分子は、その位置で同一である（本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等しい）。

【0155】

2つの配列間のパーセント同一性は、それらの配列により共有される同一の位置の数の関数である（ギャップの数、および、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要のある各ギャップの長さが考慮される）。

【0156】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）においてGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（（1970）J. Mol. Biol. 48:444-453）のアルゴリズムを用い、Blossum 62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4およびレングスウェイト（length weight）1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）のGAPプログラムを用い、NWsgapdna.CMPマトリクスならびにギャップウェイト40、50、60、70、または80およびレングスウェイト1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。特に好ましいセットのパラメータ（およびそうでないことが示されない限り使用されるべきパラメータ）は、Blossum 62スコアリングマトリクス（ギャップペナルティー12、ギャップエクステンデペナルティー4、およびフレームシフトギャップペナルティー5）である。

【0157】

2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE. MeyersおよびW. Miller（（1989）CABIOS, 4:11-17）のアルゴリズムを用い、PAM120ウェイトレジデューテーブル（weight residue table）、ギャップレングスペナルティー12、およびギャップペナルティー4を用いて決定され得る。

【0158】

本明細書中に記載される核酸配列およびタンパク質配列は、「問い合わせ配列」として使用され、公のデータベースに対してサーチが実施され得る（例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するために）。このようなサーチは、Altschulら（1990）J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて実施され得る。BLASTヌクレオチドサーチは、NBLASTプログラム、スコア=100、ワードレングス=12を用いて実施され、本発明の48149核酸分子に対するヌクレオチド配列ホモログが獲得され得る。BLASTタンパク質サーチは、XBLASTプログラム、スコア=50、ワードレングス=3を用いて実施され、本発明の48149タンパク質分子のアミノ酸配列ホモログが獲得され得る。比較目的でギャップアラインメント（gapped alignment）を獲得するために、Gapped BLASTが、Altschulら（1997）Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載のように使用され得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータが使用され得る。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照のこと。

【0159】

本発明の特に好ましい48149ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸と実質的に同一のアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列の文脈で、用語「実質的に同一」は、i) 第2

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列における整列されたアミノ酸残基と同一であるか、または i i) その保存的置換である十分な数または最小限の数のアミノ酸残基を含む第 1 のアミノ酸をいうよう本明細書中で使用され、その結果、第 1 および第 2 のアミノ酸配列は、共通の構造的ドメインおよび／または共通の機能的活性を有し得る。例えば、配列番号 2 に対して少なくとも約 60 %、または 65 % の同一性、おそらく、75 % の同一性、よりおそらくは 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する共通の構造的ドメインを含むアミノ酸配列は、実質的に同一であると言及される。

【0160】

ヌクレオチド配列の文脈において、用語「実質的に同一」は、第 2 の核酸配列における整列されたヌクレオチドと同一のヌクレオチドの十分な数または最小限の数のヌクレオチドを含む第 1 の核酸配列をいうよう本明細書中で使用され、その結果、第 1 および第 2 のヌクレオチド配列は、共通の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか、または共通の構造的ポリペプチドドメインもしくは共通の機能的ポリペプチド活性をコードする。例えば、配列番号 1 または 3 に対して少なくとも約 60 %、または 65 % の同一性、おそらく、75 % の同一性、よりおそらくは 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有するヌクレオチド配列は、実質的に同一であると言及される。

【0161】

「誤発現または異常な発現」は、本明細書中で使用される場合、RNA またはタンパク質のレベルでの遺伝子発現の非野生型パターンをいう。これらとしては、以下：非野生型レベルでの発現（すなわち、過剰発現または過少発現）；遺伝子が発現される時点または段階の点で野生型と異なる発現パターン（例えば、予め決定された発達期または段階での増加または減少した発現（野生型と比較した場合））；予め決定された細胞型または組織型において変更された（例えば、増加または減少した）発現（野生型と比較した場合）の点で野生型と異なる発現パターン；スプライシングサイズ、翻訳されるアミノ酸配列、翻訳後修飾、または発現されたポリペプチドの生物学的活性の点で野生型と異なる発現パターン；遺伝子の発現に対する環境的刺激または細胞外刺激の効果の点で野生型と異なる発現パターン（例えば、刺激の強度における増加または減少の存在下で増加または減少した発現パターン（野生型と比較した場合））、が挙げられる。

【0162】

「被験体」は、本明細書中で使用される場合、ヒトおよび非ヒト動物をいう。本発明の用語「非ヒト動物」としては、全ての脊椎動物（例えば、哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類（特に、高等霊長類）、ヒツジ、イヌ、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、ウシ、および非哺乳動物（例えば、ニワトリ、両生類、爬虫類））など）が挙げられる。好ましい実施形態において、被験体は、ヒトである。別の実施形態において、被験体は、実験動物または疾患モデルとして適切な動物である。

【0163】

「細胞の精製調製物」は、本明細書中で使用される場合、細胞のインビトロ調製物をいう。多細胞生物（例えば、植物および動物）由来の細胞の場合、細胞の精製調製物は、その生物から獲得される細胞のサブセットであり、完全にインタクトな生物ではない。単細胞微生物（例えば、培養細胞および微生物細胞）の場合、それは、被験体細胞の少なくとも 10 % およびより好ましくは 50 % の調製物からなる。

【0164】

本発明の種々の局面は、以下でさらに詳細に記載される。

【0165】

（単離された核酸分子）

1 つの局面において、本発明は、本明細書中に記載される 48149 ポリペプチド（例えば、全長 48149 タンパク質またはそのフラグメント（例えば、48149 タンパク

質の生物学的に活性な部分))をコードする単離または精製された核酸分子を提供する。ハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに適した核酸フラグメント(これらは、例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を同定するために使用され得る)、48149 mRNA、およびプライマー(例えば、核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマー)として使用するのに適したフラグメントもまた含まれる。

【0166】

1つの実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の一部を含む。1つの実施形態において、この核酸分子は、ヒト48149タンパク質をコードする配列(すなわち、配列番号3に示されるような、配列番号1の「コード領域」)、ならびに5'側非翻訳配列を含む。あるいは、この核酸分子は、配列番号1のコード領域(例えば、配列番号3)のみを含み得、そして例えば、通常対象配列に付随する隣接配列を含まない。別の実施形態において、核酸分子は、アミノ酸約76~480タンパク質フラグメントに対応する配列をコードする。

10

【0167】

別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号3に示されるヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の一部分の相補鎖である核酸分子を含む。他の実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列に十分相補的であり、その結果、配列番号1または3に示されるヌクレオチド配列に(例えば、本明細書中に記載されるストリンジェンシー条件下で)ハイブリダイズし得、それによって、安定な二重鎖を形成する。

20

【0168】

1つの実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1または3に示されるヌクレオチド配列の全長に対して、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上相同なヌクレオチド配列、またはその一部(好ましくは、これらのヌクレオチド配列のいずれかの同一の長さのもの)を含む。

(48149核酸フラグメント)

本発明の核酸分子は、配列番号1または3の核酸配列の一部のみを含み得る。例えば、このような核酸分子は、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメントまたは48149タンパク質の一部をコードするフラグメント(例えば、48149タンパク質の免疫原性部分または生物学的に活性な部分)を含み得る。フラグメントは、ヒト48149の膜ペプチダーゼドメインをコードする配列番号1のヌクレオチドを含み得る。48149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により、他の48149ファミリーメンバーまたはそのフラグメント、ならびに他の種由来の48149ホモログまたはそのフラグメントを同定および/またはクローニングするため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が作製され得る。

30

【0169】

別の実施形態において、核酸は、コード領域の一部または全てを含み、そして5'または3'のいずれか(または両方)の非コード領域に延びるヌクレオチド配列を含む。他の実施形態は、本明細書中に記載されるアミノ酸フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むフラグメントを含む。核酸フラグメントは、本明細書中に記載される特定のドメインもしくは部位またはそのフラグメント(特に、少なくとも50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、またはそれ以上のアミノ酸長のそのフラグメント)をコードし得る。フラグメントはまた、上記の特定のアミノ酸配列に対応する核酸配列またはそのフラグメントを含む。核酸フラグメントは、本発明以前に開示され得たフラグメントを包含するとみなされるべきでない。

40

【0170】

核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるドメイン、領域、または機能的部位に対応する配列を含み得る。核酸フラグメントはまた、本明細書中に記載される1つ以上のド

50

メイン、領域、または機能的部位を含み得る。従って、例えば、48149 核酸フラグメントは、アミノペプチダーゼドメイン、保持され、膜貫通ドメインとして機能する疎水性シグナル配列、または細胞外カルボキシ末端ドメインに対応する配列を含み得る。

【0171】

48149 プロブおよびプライマーが提供される。代表的に、プロブ／プライマーは、単離または精製されたオリゴヌクレオチドである。このオリゴヌクレオチドは、代表的に、本明細書中に記載されるストリンジェンシー条件下で、配列番号1もしくは配列番号3のセンス配列もしくはアンチセンス配列、または配列番号1もしくは配列番号3の天然に存在する対立遺伝子改変体もしくは変異体の、少なくとも約7、12、または15、好ましくは約20または25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65、または75連続するヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、約200、150、120、または100ヌクレオチド長未満である。

10

【0172】

一つの実施形態において、このプロブまたはプライマーは、固体支持体（例えば、本明細書中に記載される固体支持体）に結合される。

【0173】

プライマーの一つの例示的なキットは、コード鎖にアニーリングする順方向プライマー、および非コード鎖にアリーニングする逆方向プライマーを含む。順方向プライマーは、開始コドン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基1をコードする核酸配列）にアニーリングし得る。逆方向プライマーは、最終コドン（例えば、終止コドン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基968をコードするコドン）の直前のコドン）にアリーニングし得る。好ましい実施形態において、順方向プライマーおよび逆方向プライマーのアニーリング温度は、5℃、4℃、3℃、または2℃未満異なる。

20

【0174】

好ましい実施形態において、核酸は、少なくとも10、12、15、18、20および200未満、より好ましくは、100未満、または50未満のヌクレオチド長である、プロブである。このプロブは、本明細書中に開示された配列と、同一であるか、あるいは1もしくは2ヌクレオチド未満、または5もしくは10ヌクレオチド未満で異なるべきである。アライメントが、この比較のために必要とされる場合、この配列は、最大の相同性でアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ（looped）」アウト配列は、異なるとみなされる。

30

【0175】

プロブまたはプライマーは、以下をコードする核酸のセンス鎖またはアンチセンス鎖から誘導され得る：例えば、配列番号2のアミノ酸残基の約76～約480に位置するアミノペプチダーゼドメイン；保持され、例えば、配列番号2のアミノ酸残基の約1～75に位置する膜貫通ドメインとして機能する、疎水性シグナル配列を含む配列；または、例えば、配列番号2のアミノ酸残基約481～967に位置する細胞外カルボキシ末端ドメイン。

【0176】

別の実施形態において、プライマーのセット（例えば、48149配列の選択された領域（例えば、本明細書中に記載される、ドメイン、領域、部位または他の配列）を増幅するために使用され得る、PCRにおいて使用するために適切なプライマー）が、提供される。このプライマーは、少なくとも、5、10、または50の塩基対長、100未満、または200未満の塩基対長であるべきである。このプライマーは、同一であるか、または本明細書中に開示される配列もしくは天然に存在する改変体と一つの塩基異なるべきである。例えば、任意の以下の領域の全てまたは一部分を増幅するために適切なプライマーが提供される：例えば、配列番号2のアミノ酸残基の約76～480に位置するアミノペプチダーゼドメイン；保持され、例えば、配列番号2のアミノ酸残基の約1～75に位置する膜貫通ドメインとして機能する、疎水性シグナル配列を含む配列；または、例えば、配

40

50

列番号2のアミノ酸残基約481～967に位置する細胞外カルボキシ末端ドメイン。

【0177】

核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるポリペプチドのエピトープ保持領域をコードし得る。

【0178】

「48149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、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列の一部を単離すること（このヌクレオチド配列は、48149生物学的活性を有するポリペプチドをコードする（例えば、48149タンパク質の生物学的活性が、本明細書中に記載されている））、48149タンパク質のコード部分を（例えば、インビトロにおける組換え発現によって）発現すること、および48149タンパク質のコード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、48149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、膜ペプチダーゼドメイン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基の約76～480）を含む。48149ポリペプチドの生物学的に活性な活性部分をコードする核酸フラグメントは、300以上のヌクレオチド長を超えるヌクレオチド配列を含み得る。

【0179】

好ましい実施形態において、核酸は、約300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、またはそれ以上のヌクレオチド長であるヌクレオチド配列を含み、そして配列番号1または配列番号3の核酸分子に、本明細書中に記載されるストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。

【0180】

好ましい実施形態において、核酸フラグメントは、Genbank登録番号M22324の配列からの、少なくとも1、2、3、10、または20以上のヌクレオチドだけ異なる。差異は、長さまたは配列同一性の差異を含み得る。例えば、核酸フラグメントは、Genbank登録番号M22324の配列のヌクレオチド1～3494の領域以外の配列番号1または配列番号3からの1個以上のヌクレオチドを含み得るか；Genbank登録番号M22324の配列のヌクレオチドを全ては含まないか（例えば、Genbank登録番号M22324の配列よりも（1方の末端または両方の末端で）1個以上短い（1方の末端または両方の末端で）ヌクレオチドであり得るか）；またはオーバーラップの領域の1個以上のヌクレオチドで異なり得る。

【0181】

（48149核酸改変体）

本発明は、さらに、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列と異なる核酸分子を含む。このような差異は、遺伝的コードの縮重に起因し得、そして本明細書中に記載される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一の48149タンパク質をコードする核酸を生じる。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも1個だが、配列番号2に示される5、10、20、50、または100個のアミノ酸残基未満で異なるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。アライメントが、この比較に必要とされる場合、この配列は、最大の相同性でアライメントされるべきである。コードされたタンパク質は、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸で異なり得る。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列は、異なるとみなされる。

【0182】

本発明者らの核酸は、特定の発現系に対して、好ましい、または好ましくない、コドン有するように選択され得る。例えば、核酸は、少なくとも一つのコドン、好ましくは、コドンの少なくとも10%、または20%が、E. coli、酵母、ヒト、昆虫、またはCHO細胞中での発現に対して最適化される配列のように変更された、核酸であり得る。

【0183】

核酸改変体は、天然に存在し得、例えば、対立遺伝子改変体（同一の遺伝子座）、ホモ

ログ（異なる遺伝子座）、およびオルソログ（異なる生物）であり得るか、または天然に存在し得ない。天然に存在し得ない改変体は、ポリヌクレオチド、細胞、または生物に適用される技術を含む、変異誘発技術により作製され得る。この改変体は、ヌクレオチドの置換、欠失、転化および挿入を含み得る。改変体は、コード領域および非コード領域のいずれかまたは両方を生成し得る。この改変体は、保存的アミノ酸置換基および非保存的アミノ酸置換基（コードされた産物と比較した場合）の両方を生成し得る。

【0184】

好ましい実施形態において、核酸は、例えば、以下のような配列番号1または配列番号3の核酸と異なる：少なくとも1個のヌクレオチドだが、10、20、30、または40個未満のヌクレオチド；少なくとも1個のヌクレオチドだが、目的の核酸の1%、5%、10%または20%未満のヌクレオチド。この核酸は、5、4、3、2、または1個のヌクレオチド以下だけ異なり得る。分析の必要性がある場合、この配列は、最大相同性でアラメントされるべきである。欠失、もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列は、異なるとみなされる。

10

【0185】

オルソログ、ホモログ、および対立遺伝子改変体は、当該分野で公知の方法を使用して同定され得る。これらの改変体は、配列番号2に示されるヌクレオチド配列またはその配列のフラグメントに対して、50%、少なくとも55%、代表的に、少なくとも約70~75%、より代表的に、少なくとも約80~85%、そして最も代表的に、少なくとも約90~95%以上、同一である、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような核酸分子は、配列番号2に示されるヌクレオチド配列またはその配列のフラグメントに対して、本明細書中に記載されるストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るとして、容易に同定され得る。本発明の48149 cDNAのオルソログ、ホモログ、および対立遺伝子改変体に対応する核酸分子は、48149遺伝子と同一の染色体または遺伝子座にマッピングすることによって、さらに単離され得る。

20

【0186】

好ましい改変体としては、アミノペプチダーゼ活性（例えば、ポリペプチド基質（例えば、短いポリペプチド基質または細胞表面で機能するシグナル伝達分子（例えば、エンカルフィン（enkephalins）、サイトカイン、またはTGF β ファミリーの分子）の加水分解）と相関する改変体が挙げられる。

30

【0187】

48149（例えば、ヒト48149）の対立遺伝子改変体は、機能的タンパク質および非機能的タンパク質の両方を含む。機能的な対立遺伝子改変体は、それらのアミノペプチダーゼ活性（例えば、ポリペプチド基質（例えば、短いポリペプチド基質または細胞表面で機能するシグナル伝達分子（例えば、エンカルフィン、サイトカイン、またはTGF β ファミリーの分子））を加水分解するそれらの能力）を維持する集団内の48149タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。機能的な対立遺伝子改変体は、代表的に、配列番号2の1つ以上のアミノ酸の保存的置換のみ、あるいはタンパク質の非決定的な領域中の非決定的な残基の置換、欠失または挿入を含む。非機能的な対立遺伝子改変体は、アミノペプチダーゼ活性（例えば、ポリペプチド基質（例えば、短いポリペプチド基質または細胞表面で機能するシグナル伝達分子（例えば、エンカルフィン、サイトカイン、またはTGF β ファミリーの分子））を加水分解する能力）を有さない集団内の48149（例えば、ヒト48149）の天然に存在するアミノ酸配列改変体タンパク質である）である。非機能的対立遺伝子改変体は、代表的に、非保存的置換、欠失または挿入あるいは配列番号2のアミノ酸配列の成熟前の短縮、またはこのタンパク質の決定的残基もしくは決定的領域中の置換、挿入もしくは欠失を含む。

40

【0188】

さらに、他の48149ファミリーメンバーをコードする核酸分子（従って、配列番号1または配列番号3の48149配列と異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子）は、本発明の範囲内であることが意図される。

50

【0189】

(アンチセンス核酸分子、リボザイムおよび改変された48149核酸分子)

別の局面において、本発明は、48149に対してアンチセンスである単離された核酸分子を特徴とする。「アンチセンス」核酸は、例えば、二重鎖cDNA分子のコード鎖に対して相補的であるか、またはmRNA配列に対して相補的である、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的である、ヌクレオチド配列を含み得る。このアンチセンス核酸は、全48149コード鎖、またはその一部のみ(例えば、配列番号3に対応する、ヒト48149のコード領域)に対して相補的であり得る。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、48149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」(例えば、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域)に対してアンチセンスである。

【0190】

48149mRNAの全コード領域に対して相補的であるように、アンチセンス核酸が、設計され得るが、より好ましくは、48149 mRNAのコード領域または非コード領域の一部のみに対して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、48149 mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域(例えば、目的の標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10領域と+10領域との間)に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80以上のヌクレオチド長であり得る。

【0191】

本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用する化学合成および酵素学的ライゲーション反応を使用して、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、または分子の生物学的安定性を増加もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成された二重鎖の物理学的安定性を増加させるように設計された多様に改変されたヌクレオチドを使用して、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、使用され得る)。アンチセンス核酸がまた、核酸がアンチセンス配向でサブクロニングされた発現ベクターを生物学的に使用して産生され得る(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の節でさらに記載されている、目的の標的核酸に対するアンチセンス配向である)。

【0192】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的に、(例えば、組織部位への直接的な注入によって)被験体に投与されるか、またはこれらのアンチセンス核酸分子が、48149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、または結合することによって、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害するように、インサイチュで産生される。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与され得る。全身投与に関して、例えば、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、アンチセンス核酸分子を連結することによって、このアンチセンス分子が、選択された細胞表面上で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、本明細書中で記載されるベクターを使用して、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 IIIプロモーターの制御下で置換されるベクター構築物が、好ましい。

【0193】

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、 α -アノマー核酸分子である。 α -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここでは、通常の β -ユニットとは対照的に、鎖は互いに対して平行に走る(Gaultierら(1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-66

10

20

30

40

50

41)。アンチセンス核酸分子はまた、2'-オ-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。

【0194】

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。48149コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示される48149 cDNAのヌクレオチド配列 (すなわち、配列番号1または配列番号3) に対して相補的な1以上の配列、ならびにmRNAの切断を担う公知の触媒配列を有する配列 (米国特許第5, 093, 246号またはHaselhoffおよびGerlach (1988) *Nature* 334: 585-591を参照のこと) を含み得る。例えば、*Tetrahymena* L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が48149コードmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的であるように構築され得る。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、48149 mRNAを使用して、RNA分子のプールから特異的な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, D. およびSzostak, J. W. (1993) *Science* 261: 1411-1418を参照のこと。

【0195】

48149遺伝子の発現は、標的細胞中で48149遺伝子の転写を阻害する三重ヘリックス構造を形成するために、48149の調節領域に相補的なヌクレオチド配列 (例えば、48149プロモーターまたはエンハンサー) を標的することによって阻害され得る。一般に、Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6: 569-84; Helene, C. (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; およびMaher (1992) *Bioassays* 14: 807-15を参照のこと。三重ヘリックスの形成のために標的され得る潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加され得る。スイッチバック分子は、5'-3' 変更方法、3'-5' 変更方法で合成され、これらは、二重鎖の一方の鎖と、次いで他方の鎖との対に基づき、プリンまたはピリミジンのいずれかのかなり大きな伸張が、二重鎖の一方の鎖上に存在することの必要性を排除する。

【0196】

本発明はまた、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブ分子を提供する。代表的に、このような標識は、化学発光、蛍光、放射活性、または比色分析である。

【0197】

48149核酸分子を、塩基部分、糖部分またはホスフェート骨格において改変し、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を改善し得る。改変を有する合成オリゴヌクレオチドの非制限例として、Toulme (2001) *Nature Biotech.* 19: 17およびFariaら (2001) *Nature Biotech.* 19: 40-44を参照のこと。このようなホスホルアミダイトオリゴヌクレオチドは、有効なアンチセンス剤であり得る。

【0198】

例えば、核酸分子のデオキシリボースホスフェート骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る (Hyrup B. ら (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4: 5-23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースホスフェート骨格が偽ペプチド骨格により置換され、そして4つの天然の核酸塩基 (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の中性の骨格は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAに対する特異的なハイブリダイゼーションを可能にし得る。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup B. ら (1996) 前

出、およびPerry-O'Keefeら、Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14670-675に記載のような、標準的固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施され得る。

【0199】

48149核酸分子の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、遺伝子発現の配列特異的調節（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）のためのアンチセンス剤またはアンチジェン（antigene）剤として使用され得る。48149核酸分子のPNAはまた、例えば、PNA指向PCRクランピング（PNA-directed PCR clamping）による遺伝子内の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として（Hyrup. B. (1996)、前出）；またはDNA配列決定またはハイブリダイゼーションのプローブまたはプライマーとして（Hyrup. B. (1996)、前出；Perry-O'Keefeら (1996)、前出）使用され得る。 10

【0200】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基（例えば、インビボにおける宿主細胞レセプターを標的するため）、または細胞膜（例えば、Lettingerら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556；Lemaîtreら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652；PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）もしくは血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）を通過する輸送を容易にする試薬を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションにより誘発される切断試薬（例えば、Krolら (1988) Bio-Techniques 6:958-976を参照のこと）、または挿入剤（例えば、Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549を参照のこと）を用いて改変され得る。この目的のために、この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、またはハイブリダイゼーション誘発切断剤）に結合体化され得る。 20

【0201】

本発明はまた、本発明の48149核酸に対して相補的である少なくとも一つの領域を有する、分子ビーコンオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブ分子を含み、2つの相補的な領域は、一つの蛍光団および一つのクエンチャーを有し、この分子ビーコンは、サンプル中で本発明の48149核酸の存在をクエンチするために有用である。分子ビーコン核酸は、例えば、Lizardiら、米国特許第5,854,033号；Nazarenkoら、米国特許第5,866,336号、およびLivakら、米国特許第5,876,930号に記載されている。 30

【0202】

（単離された48149ポリペプチド）

別の局面において、本発明は、抗-48149抗体を惹起するか、または試験する（またはより一般的には、この抗体に結合する）免疫原または抗原として使用するための、単離された48149タンパク質、またはフラグメント（例えば、生物学的に活性な部分）を特徴とする。48149タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。48149タンパク質またはそのフラグメントを、組換えDNA技術によって産生または化学的に合成し得る。 40

【0203】

本発明のポリペプチドは、複数の遺伝子の存在の結果、代替の翻訳事象、代替のRNAスプライシング事象、ならびに代替の翻訳事象および翻訳後事象を惹起するポリペプチドを含む。ポリペプチドは、系（例えば、培養細胞）中で発現され得、これにより、ポリペプチドがネイティブ細胞中で発現される場合に提示されるのと実質的に同一の翻訳後改変を生じるか、または系においてネイティブ細胞中で発現される場合に提示されるのと代替 50

または欠損の翻訳後改変（例えば、グリコシル化または切断）を生じる。

【0204】

好ましい実施形態において、48149ポリペプチドは、以下の特徴の一つ以上を有する：

（i）アミノペプチダーゼ活性（例えば、ポリペプチド基質（例えば、短いポリペプチド基質または細胞表面で機能するシグナル伝達分子（例えば、エンカルフィン、サイトカイン、またはTGF β ファミリーの分子））を加水分解する能力）を有する；

（ii）1つの分子量（例えば、推定の分子量、好ましくは、48149ポリペプチド（例えば、配列番号2のポリペプチド）の翻訳後修飾の任意の寄与、アミノ酸組成または他の物理的特性を無視する）を有する；

（iii）配列番号2のポリペプチドと少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%の全体の配列類似性を有する；

（iv）マクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞、肝臓細胞、（例えば、腎臓および小腸の）上皮細胞上で見出され得る；

（v）配列番号2のアミノ酸残基約76～480と好ましくは約70%、80%、90%、95%、98%または99%の相同性を共有するアミノペプチダーゼドメインを有する；

（vi）中性のジンクプロテアーゼモチーフ（PS00142）を有する；および

（vii）タンパク質CD10／中性エンドペプチダーゼと機能的に共同し得る。

【0205】

好ましい実施形態において、48149タンパク質またはそのフラグメントは、配列番号2の対応する配列と異なる。1つの実施形態において、少なくとも1だけ異なるが、15未満、10未満または5未満のアミノ酸残基だけ異なる。別の実施形態において、配列番号2の対応する配列と、少なくとも1つの残基だけ異なるが、配列番号2の対応する配列と、その残基の20%未満、15%未満、10%未満または5%未満が異なる。（アライメントが、この比較に必要とされる場合、この配列は、最大の相同性でアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列は、差異とみなされる。）この差異は、好ましくは、非必須残基または保存的置換での差異または変化である。好ましい実施形態において、この差異は、アミノペプチダーゼドメイン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基約76～480）内に存在しない。別の好ましい実施形態において、1つ以上の差異は、アミノペプチダーゼドメイン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基約76～480）内に存在する。

【0206】

他の実施形態は、1つ以上のアミノ酸配列変化（例えば、活性に必須でないアミノ酸残基の変化）を含むタンパク質を含む。このような48149タンパク質は、配列番号2とアミノ酸配列において異なるが、生物学的活性をなお維持する。

【0207】

1つの実施形態において、このタンパク質は、配列番号2に対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%またはそれ以上相同なアミノ酸配列を含む。

【0208】

タンパク質またはフラグメント中の少なくとも1つであるが、15未満、10未満または5未満のアミノ酸残基だけ、アミノ酸約34～75および481～967によって定義される領域において配列番号2の配列から変化するが、アミノ酸約1～33および76～480によって定義された領域において配列番号2と異なるない、48149タンパク質またはフラグメントを提供する。（アライメントが、この比較に必要とされる場合、これらの配列は、最大の相同性でアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列は、差異とみなされる。）いくつかの実施形態において、この差異は、非必須残基であるか、または保存的置換であるが、他方において、この差異は必須残基であるか、または非保存的置換である。

【0209】

1つの実施形態において、48149タンパク質の生物学的活性部分は、膜ペプチダーゼドメインを含む。さらに、タンパク質の他の領域が欠失する他の生物学的活性部分は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブな48149タンパク質の1つ以上の機能的活性について評価され得る。

【0210】

好ましい実施形態において、48149タンパク質は、配列番号2において示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、48149タンパク質は、配列番号2に実質的に同一である。なお別の実施形態において、48149タンパク質は、配列番号2に実質的に同一であり、そして上記の小節に詳細に記載されるように、配列番号2のタンパク質の機能的活性を維持する。

10

【0211】

好ましい実施形態において、フラグメントは、Genbank受入番号M22324の配列によってコードされたタンパク質配列と、少なくとも1、2、3、10、20またはそれ以上のアミノ酸残基だけ異なる。差異は、長さまたは配列同一性における差異を含む。例えば、フラグメントは、配列番号1のヌクレオチド120～3021によってコードされた領域の外側の配列番号2由来の1つ以上のアミノ酸残基を含み得；M22324の配列のアミノ酸残基の全て（例えば、M22324の配列より（一端または両端で）短い1つ以上の残基）を含まず；またはオーバーラップ領域の1つ以上のアミノ酸残基だけ異なり得る。

20

【0212】

（48149キメラタンパク質または融合タンパク質）

別の局面において、本発明は、48149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、48149「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非48149ポリペプチドに連結した48149ポリペプチドを含む。「非48149ポリペプチド」は、48149タンパク質と実質的に相同性でないタンパク質（例えば、48149タンパク質と異なるタンパク質）および同一の生物または異なる生物由来の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。融合タンパク質の48149ポリペプチドは、全てまたは一部（例えば、本明細書中に記載の48149アミノ酸配列のフラグメント）に対応し得る。好ましい実施形態において、48149融合タンパク質は、48149タンパク質の少なくとも1個（または2個）の生物学的に活性な部分を含む。非48149ポリペプチドは、48149ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

30

【0213】

この融合タンパク質は、リガンドに対して高度の親和性を有する部分を含み得る。例えば、この融合タンパク質は、48149配列がGST配列のC末端に対して融合される、GST-48149融合タンパク質であり得る。このような融合タンパク質は、組換え48149の精製を容易にし得る。あるいは、この融合タンパク質は、そのN末端において、異種シグナル配列を含む48149タンパク質であり得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物の宿主細胞）において、48149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強され得る。

40

【0214】

融合タンパク質は、血清タンパク質（例えば、IgGの定常領域、またはヒトの血清アルブミン）の全てまたは一部を含み得る。

【0215】

本発明の48149融合タンパク質は、薬学的組成物に取り込まれ得、そしてインビボで被験体に投与され得る。48149融合タンパク質は、48149基質のバイオアベイラビリティに影響を与えるために使用され得る。48149融合タンパク質は、例えば、以下の(i)、(ii)および(iii)によって生じる障害の処置のために治療学的に有用であり得る：(i) 48149タンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または

50

変異；(i i) 48149 遺伝子の誤調節；および (i i i) 48149 タンパク質の異常な翻訳後改変。

【0216】

さらに、本発明の48149 融合タンパク質は、被験体において抗48149 抗体を産生して、48149 リガンドを精製するための免疫原として使用され得、および48149 と48149 基質との相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。

【0217】

融合部分（例えば、GST ポリペプチド）をすでにコードする発現ベクターが、市販されている。A 48149 をコードする核酸は、このような発現ベクター中にクローニングされ得、その結果、融合部分が48149 タンパク質にインフレームで連結される。 10

【0218】

（48149 タンパク質の改変体）

別の局面において、本発明はまた、48149 ポリペプチドの改変体（例えば、アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストとして機能する）を特徴とする。48149 タンパク質の改変体は、変異誘発（例えば、不連続な点変異）、配列の挿入もしくは欠失、または48149 タンパク質の短縮（*truncation*）によって作製され得る。48149 タンパク質のアゴニストは、48149 タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同一の活性またはサブセットを残存し得る。48149 タンパク質のアンタゴニストは、例えば、48149 タンパク質の48149 媒介活性を競合的に調節することによって、48149 タンパク質の天然に存在する形態の活性の1つ以上を阻害し得る。よって、特定の生物学的効果は、種々の限定された機能を用いる処置によって誘導され得る。好ましくは、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、48149 タンパク質の天然に存在する形態での処置と比較して被験体におけるわずかな副作用を有する。 20

【0219】

48149 タンパク質の改変体は、48149 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アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。

【0220】

48149 タンパク質をコードする配列のフラグメント（例えば、N末端フラグメント、C末端フラグメントまたは内部フラグメント）のライブラリーを使用して、48149 タンパク質の改変体のスクリーニング、続く選択のための多彩なフラグメント集団を作製し得る。システイン残基が付加または欠失されている改変体、あるいはグリコシル化されている残基が付加または欠失されている改変体が、特に好ましい。 30

【0221】

点変異または短縮によって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方法、および選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするための方法が、当該分野において公知である。このような方法は、48149 タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって作製された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適合可能である。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を高める新たな技術である機能的集合変異誘発（*recursive ensemble mutagenesis*）（REM）をスクリーニングアッセイと組合わせて使用して、48149 改変体を同定し得る（Ark in および Your van (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave ら (1993) *Protein Engineering* 6:327-331）。 40

【0222】

多彩な48149 ライブラリーを分析するために、細胞ベースのアッセイが利用され得る。例えば、発現ベクターのライブラリーが、細胞株（例えば、通常、基質依存的様式で 50

48149に応答する細胞株)にトランスフェクトされ得る。次いで、トランスフェクトされた細胞は、48149と接触させられ、そして48149基質によるシグナル伝達に対する変異体発現の効果が、(例えば、単球/マクロファージ脂質充填プロセスを測定することによって)検出され得る。次いで、プラスミドDNAは、48149基質によるシグナル伝達の阻害または増強を記録する細胞から回収され得、そして個々のクローンがさらに特徴付けられ得る。

【0223】

別の局面において、本発明は、48149ポリペプチド(例えば、非野生型活性を有するペプチド、例えば、天然に存在する48149ポリペプチドのアнтаゴニスト、アゴニストもしくはスーパーアゴニスト、例えば、天然に存在する48149ポリペプチド)を作製する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：48149ポリペプチドの配列を変更する工程(例えば、本明細書中に開示される非保存領域、ドメインまたは残基の1つ以上の残基の置換または欠失によって配列を変更する工程)；および所望の活性について変更されたポリペプチドを試験する工程。

10

【0224】

別の局面において、本発明は、天然に存在する48149ポリペプチドの生物学的活性を有する48149ポリペプチドのフラグメントまたはアナログを作製する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：例えば、1つ以上の残基の置換または欠失によって48149ポリペプチドの配列を変更する工程(例えば、本明細書中に記載される非保存領域またはドメインもしくは残基の配列を変更する工程)；および、所望の活性につ

20

【0225】

(抗48149抗体)

別の局面において、本発明は、抗48149抗体、またはそのフラグメント(例えば、その抗原結合フラグメント)を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子またはその免疫学的に活性な部分(すなわち、抗原結合部分)をいう。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、少なくとも1つ、好ましくは、2つの重鎖(H鎖)可変領域(本明細書中ではVHと略す)、および少なくとも1つ、好ましくは、2つの軽鎖(L鎖)可変領域(本明細書中ではVLと略す)を含むタンパク質をいう。VH領域およびVL領域はさらに、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれるより保存される領域で散在される「相補性決定領域」(「CDR」)と呼ばれる超可変領域に細分され得る。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、正確に規定されている(Kabat, E. A. ら(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, およびChothia, C. ら(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917(これらは参考として本明細書中に援用される)を参照のこと)。VHおよびVLの各々は、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順番で整列される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

30

40

【0226】

抗48149抗体はさらに、重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含み得、これによって、それぞれ重鎖免疫グロブリン鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖を形成する。1つの実施形態において、抗体は、2つの重鎖免疫グロブリン鎖および2つの軽鎖免疫グロブリン鎖の四量体であり、ここで、重鎖免疫グロブリン鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖は、例えば、ジスルフィド結合によって内部結合されている。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2およびCH3から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLから構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、通常、宿主の組織または因子(免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的な補体系の第一成分(C1q)を含む)への抗体の結合を媒介する。

50

【0227】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫グロブリン」は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドから構成されるタンパク質をいう。認識されるヒト免疫グロブリン遺伝子は、 κ 定常領域遺伝子、 λ 定常領域遺伝子、 α 定常領域遺伝子（IgA1およびIgA2）、 γ 定常領域遺伝子（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、 δ 定常領域遺伝子、 ϵ 定常領域遺伝子および μ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約25 KDaまたは214アミノ酸）は、NH₂-末端（約110アミノ酸）で可変領域遺伝子によってコードされ、そしてCOOH-末端で κ 定常領域遺伝子または λ 定常領域遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」（約50 KDaまたは446アミノ酸）は、同様に可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および前述の他の定常領域遺伝子のうちの1つ（例えば、 γ （約330アミノ酸をコードする））によってコードされる。

【0228】

本明細書中で使用される場合、用語抗体の「抗原結合フラグメント」（または「抗体部分」または「フラグメント」）は、抗原に特異的に結合する能力を残存する全長抗体の1つ以上のフラグメント（例えば、48149ポリペプチドまたはそのフラグメント）をいう。抗48149抗体の抗原結合フラグメントの例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：（i）VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインから構成される一価フラグメント、Fabフラグメント；（ii）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結される2つのFabフラグメントから構成される二価フラグメント、F(ab')₂；（iii）VHドメインおよびCH1ドメインから構成されるFdフラグメント；（iv）抗体の単一のアームのVLドメインおよびVHドメインから構成されるFvフラグメント；（v）VHドメインから構成されるdAbフラグメント（Wardら（1989）Nature 341：544-546）；ならびに（vi）単離された相補性決定領域（CDR）。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン（VLおよびVH）は、別々の遺伝子によってコードされるが、これらのドメインは、これらを単一のタンパク質鎖として作製させ得る合成リンカーによって組換え法を使用して連結される、ここで、VL領域およびVH領域は、対をなして一価分子（一本鎖Fv（scFv））として公知である；例えば、Birdら（1988）Science 242：423-426；およびHoustonら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85：5879-5883を参照のこと）を形成する。このような単鎖抗体はまた、用語抗体の「抗原結合フラグメント」内に含まれる。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の慣用的技術を使用して取得され、そしてこれらのフラグメントは、インタクトな抗体と同一の様式で、有用性についてスクリーニングされる。

【0229】

抗48149抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。他の実施形態において、抗体は、例えば、ファージディスプレイ法またはコンビナトリアル法によって組換え的に産生され得る。

【0230】

抗48149抗体を作製するためのファージディスプレイ法およびコンビナトリアル法は、以下に記載されるように当該分野において公知である：Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、国際公開番号WO92/18619；Dowerら、国際公開番号WO91/17271；Winterら、国際公開番号WO92/20791；Marklandら、国際公開番号WO92/15679；Breitlingら、国際公開番号WO93/01288；McCaffertyら、国際公開番号WO92/01047；Garrardら、国際公開番号WO92/09690；Ladnerら、国際公開番号WO90/02809；Fuchsら（1991）Bio-Technology 9：1370-1372；Hayら（1992）Hum Antibod Hybri domas 3：81-85；Huseら（1989）Science 246：1275-1281；Griffithsら（1993）EMBO J 12：725-

734; Hawkinsら(1992) J Mol Biol 226:889-896; Clacksonら(1991) Nature 352:624-628; Gramら(1992) PNAS 89:3576-3580; Garradら(1991) Bio-Technology 9:1373-1377; Hoogenboomら(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; ならびに Barbassら(1991) PNAS 88:7978-7982 (これら全ての内容は、本明細書中に参考として援用される)。

【0231】

1つの実施形態において、抗48149抗体は、完全なヒト抗体(例えば、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体を産生するように遺伝子操作されているマウスにおいて作製された抗体)、または非ヒト抗体(例えば、げっ歯類(マウスまたはラット)抗体、ヤギ抗体、霊長類(例えば、サル)抗体、ラクダ抗体)である。好ましくは、非ヒト抗体は、げっ歯類(マウス抗体またはラット抗体)である。げっ歯類抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。

【0232】

ヒトモノクローナル抗体は、マウス系以外にヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを使用して作製され得る。目的の抗原で免疫したこれらのトランスジェニックマウスからの脾臓細胞を使用して、ヒトタンパク質からのエピトープに対して特異的親和性を有するヒトmAbを分泌するハイブリドーマを産生する(例えば、Woodら、国際公開番号WO91/00906, Kucherlapatiら、PCT公開WO91/10741; Lonbergら、国際公開WO92/03918; Kayら、国際公開92/03917; Lonberg, N. ら 1994 Nature 368:856-859; Green, L. L. ら 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. ら 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggemanら 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuailionら 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggemanら 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326を参照のこと)。

【0233】

抗48149抗体は、可変領域またはその一部(例えば、CDR)が非ヒト生物(例えば、ラットまたはマウス)において作製される抗体であり得る。キメラ抗体、CDR移植された抗体、およびヒト化抗体は、本発明の範囲内である。非ヒト生物(例えば、ラットまたはマウス)において作製され次いでヒトでの抗原性を減少させるように(例えば、可変フレームワーク領域または定常領域において)改変された抗体は、本発明の範囲内である。

【0234】

キメラ抗体は、当該分野において公知の組換えDNA技術によって産生され得る。例えば、マウス(または他の種)モノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子は、マウスFcをコードする領域を除去するために制限酵素で消化され、そしてヒトFc定常領域をコードする遺伝子の等価な部分が置換される(Robinsonら、国際特許出願PCT/US86/02269; Akiraら、欧州特許出願184,187; Taniguchi, M., 欧州特許出願171,496; Morrisonら、欧州特許出願173,494; Neubergerら、国際出願WO86/01533; Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Cabillyら、欧州特許出願125,023; 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, Canc. Res. 47:999-1005; Woodら(1985) Nature 314:446-449; ならびに Shawら、1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559

を参照のこと)。

【0235】

ヒト化抗体またはCDR移植された抗体は、ドナーCDRで置換された少なくとも1つまたは2つ（しかし、一般に3つ全て）のレシピエント（重鎖免疫グロブリン鎖および／または軽鎖免疫グロブリン鎖の）CDRを有する。抗体は、非ヒトCDRの少なくとも一部で置換され得るか、またはCDRのいくつかのみが、非ヒトCDRで置換され得る。48149またはそのフラグメントに対するヒト化抗体の結合に必要とされるCDRの数を置換することだけが必要である。好ましくは、ドナーは、げっ歯類抗体（例えば、ラット抗体またはマウス抗体）であり、そしてレシピエントは、ヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークである。一般に、CDRを提供する免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、そしてフレームワークを提供する免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。1つの実施形態において、ドナー免疫グロブリンは、非ヒト（例えば、げっ歯類）である。アクセプターフレームワークは、天然に存在する（例えば、ヒト）フレームワークまたはコンセンサスフレームワーク、あるいはこれらに約85%以上、好ましくは、90%、95%、99%以上同一である配列である。

【0236】

本明細書中で使用される場合、用語「コンセンサス配列」は、あるファミリーの関連する配列において最も頻繁に生じるアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列をいう（例えば、Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987を参照のこと)。あるファミリーのタンパク質において、コンセンサス配列中の各位置が、そのファミリー中のその位置で最も頻繁に存在するアミノ酸によって占められる。2つのアミノ酸が同等に頻繁に生じる場合、いずれもコンセンサス配列中に含まれ得る。「コンセンサスフレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域をいう。

【0237】

抗体は、当該分野において公知の方法によってヒト化され得る。ヒト化抗体は、抗原結合に直接関与しないFv可変領域の配列をヒトFv可変領域からの等価な配列で置換することによって生成され得る。ヒト化抗体を生成するための一般的な方法は、Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207、Oira, 1986, BioTechniques 4:214、ならびにQueenら米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号および同第5,693,762号（これらの全ての内容が、本明細書中に参考として援用される）によって提供される。これらの方法は、重鎖または軽鎖のうちの少なくとも1つからの免疫グロブリンFv可変領域の全てまたは一部をコードする核酸配列を単離する工程、操作する工程、および発現する工程を包含する。このような核酸の供給源は、当業者に周知であり、例えば、48149ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する抗体を産生するハイブリドーマより取得され得る。次いで、ヒト化抗体をコードする組換えDNAまたはそのフラグメントは、適切な発現ベクター中にクローニングされ得る。

【0238】

ヒト化抗体またはCDR移植された抗体は、CDR移植またはCDR置換によって産生され得、ここで、免疫グロブリン鎖のCDRのうち1つ、2つまたは全てが置換され得る。例えば、米国特許第5,225,539号；Jonesら 1986 Nature 321:552-525；Verhoeyanら 1988 Science 239:1534；Beidlerら 1988 J. Immunol. 141:4053-4060；Winter 米国特許第5,225,539号（これら全ての内容が本明細書中に参考として明らかに援用される）を参照のこと。Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するために使用され得るCDR移植方法を記載する（1987年3月26日に出願されたUK特許出願GB2188638A；Winter 米国特許第5,225,539号（この内容は参考として明らかに援用される）。

【0239】

特定のアミノ酸が置換、欠失または付加されているヒト化抗体もまた、本発明の範囲内である。好ましいヒト化抗体は、例えば、抗原に対する結合を改善するようにフレームワーク領域にアミノ酸置換を有する。例えば、ヒト化抗体は、ドナーフレームワーク残基と同一のフレームワーク残基を有するか、またはレシピエントフレームワーク残基以外の別のアミノ酸と同一のフレームワーク残基を有する。このような抗体を生成するために、ヒト化免疫グロブリン鎖の選択された少数のアクセプターフレームワーク残基は、対応するドナーアミノ酸で置換され得る。好ましい置換の位置は、CDRに隣接するアミノ酸残基またはCDRと相互作用し得るアミノ酸残基を含む（例えば、米国特許第5,585,089号を参照のこと）。ドナーからアミノ酸を選択するための基準は、米国特許第5,585,089号（例えば、米国特許第5,585,089号の12～16欄、例えば、米国特許第5,585,089号の12～16欄（これらの内容は、本明細書中に参考として援用される））に記載される。抗体をヒト化するための他の技術は、Padlanら、EP519596 A1（1992年12月23日公開）に記載される。

10

【0240】

好ましい実施形態において、抗体は、精製された48149抗原、またはそのフラグメント（例えば、本明細書中に記載される膜ペプチダーゼフラグメント）、膜関連抗原、組織（例えば、粗組織調製物、細胞全体、好ましくは、生きた細胞、溶解された細胞、または細胞画分（例えば、膜画分））で免疫することによって作製され得る。

【0241】

全長48149タンパク質または48149の抗原性ペプチドフラグメントは、免疫原として使用され得るか、または他の免疫原（例えば、細胞、膜調製物など）で作製された抗48149抗体を同定するために使用され得る。48149の抗原性ペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含むべきであり、そして48149のエピトープを包含する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、なおより好ましくは少なくとも20アミノ酸残基、そして最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基を含む。

20

【0242】

48149のフラグメントは、例えば、免疫原として使用され得るか、または抗体の特異性を特徴付けするために使用され得る。例えば、約171～190、約250～272または約321～339の残基を含む48149のフラグメントは、48149タンパク質の親水性領域に対する抗体を作製するために使用され得る。同様に、約10～37、約273～291、または約232～259の残基を含む48149のフラグメントは、48149タンパク質の疎水性領域に対する抗体を作製するために使用され得る；約25～968、約30～968または約35～968の残基を含む48149のフラグメントは、48149タンパク質の細胞外領域に対する抗体を作製するために使用され得る；約40～700、約55～600または約70～500の残基を含む48149のフラグメントは、48149タンパク質のアミノペプチダーゼ領域に対する抗体を作製するために使用され得る。

30

【0243】

これらの領域、または本明細書中で記載される他の領域もしくはドメインのいずれかと反応性である抗体、あるいはこれらの領域、または本明細書中で記載される他の領域もしくはドメインのいずれかに特異的な抗体が、提供される。

40

【0244】

ネイティブな48149タンパク質にのみ結合する抗体、変性されたかもしくはさもなくば非ネイティブな48149タンパク質にのみ結合する抗体、または両方に結合する抗体は、本発明の範囲内である。線状エピトープまたは立体配座のエピトープを有する抗体は、本発明の範囲内である。立体配座エピトープは、時折、ネイティブな48149タンパク質に結合するが変性された48149タンパク質には結合しない抗体を同定することによって同定され得る。

50

【0245】

48149の領域である抗原性ペプチドによって含まれる好ましいエピトープは、タンパク質の表面上（例えば、親水性領域、および高い抗原性を有する領域）に位置する。例えば、ヒト48149タンパク質配列のEmini表面確立分析を使用して、48149タンパク質の表面に位置される特に高い確率を有し、よって抗体産生を標的化するために有用な表面残基を構成する可能性のある領域を示し得る。

【0246】

好ましい実施形態において、抗体は、48149タンパク質の細胞外部分に結合し得る（例えば、抗体は、48149タンパク質を発現する細胞全体に結合し得る）。好ましい実施形態において、抗体は1つ以上の精製された抗原、膜関連抗原、組織（例えば、組織切片、細胞全体、好ましくは、生きた細胞、溶解された細胞、または細胞画分（例えば、膜画分））に結合し得る。

10

【0247】

抗48149抗体は、単鎖抗体であり得る。単鎖抗体（scFv）は、操作され得る（例えば、Colcher, D. ら（1999）Ann N Y Acad Sci 880:263-80; およびReiter, Y.（1996）Clin Cancer Res 2:245-52を参照のこと）。単鎖抗体は、同一の標的48149タンパク質の異なるエピトープに対する特異性を有する多価抗体を精製するために二量体化されても多量体化され得る。

【0248】

好ましい実施形態において、抗体は、エフェクター機能を有し、そして／または補体を結合し得る。他の実施形態において、抗体は、エフェクター細胞を漸増させも補体を結合もしない。

20

【0249】

好ましい実施形態において、抗体は、Fcレセプターを結合する能力が減少されているかまたはこの能力がない。例えば、抗体は、Fcレセプターに対する結合を支持しないアイソタイプもしくはサブタイプ、フラグメント、または他の変異体であり、例えば、抗体は、変異誘発されたかまたは欠失されたFcレセプター結合領域を有する。

【0250】

好ましい実施形態において、抗48149抗体は、48149ポリペプチドの膜ペプチダーゼ活性（例えば、単球／マクロファージ脂質負荷プロセス）を変更（例えば、増加または減少）する。

30

【0251】

抗体は、毒素（例えば、ポリペプチド毒素（例えば、リシンもしくはジフテリア毒素またはその活性なフラグメント））、または放射活性核、または画像化剤（例えば、放射活性な、酵素的な、もしくは他の画像化剤（例えば、NMR造影剤））に結合され得る。検出可能な放射活性放射または蛍光を生じる標識が好ましい。

【0252】

抗48149抗体（例えば、モノクローナル抗体）を使用して、標準的技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって48149を単離し得る。さらに、抗48149抗体を使用して、このタンパク質発現の量およびパターンを評価するために、（例えば、細胞溶解物または細胞上清において）48149タンパク質を検出し得る。抗48149抗体を診断的に使用して、臨床試験手順の一部として（例えば、所定の処置レジメンの効力を決定するために）組織中のタンパク質レベルをモニタリングし得る。検出は、抗体を検出可能な物質に結合する（すなわち、物理的に連結する）こと（すなわち、抗体標識）によって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射活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ステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；

40

50

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ロセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；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；そして適切な放射活性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0253】

本発明はまた、抗48149抗体（例えば、本明細書中に記載される抗48149抗体）をコードする核酸を含む。この核酸を含むベクターおよびこの核酸で形質転換された細胞（特に抗体を産生するために有用な細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞またはリンパ球）））もまた含まれる。 10

【0254】

本発明はまた、抗48149抗体（例えば、本明細書中に記載される抗体）を作製する細胞株（例えば、ハイブリドーマ）、および48149抗体を作製するためにこの細胞を使用する方法もまた、含む。

【0255】

（組換え発現ベクター、宿主細胞および遺伝子操作された細胞）

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含むベクター、好ましくは、発現ベクターを含む。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送し得る核酸分子をいい、プラスミド、コスミドまたはウイルスベクターを含み得る。ベクターは、自律的な複製を行い得るか、または宿主DNA内に組み込み得る。ウイルスベクターとしては、例えば、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が挙げられる。 20

【0256】

ベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適切な形態で48149核酸を含み得る。好ましくは、組換え発現ベクターは、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列を含む。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。調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、ならびに組織特異的調節配列および／または誘導性配列を指向する配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質発現レベルなどのような因子に依存し得る。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され得、これにより本明細書中に記載されるような核酸によってコードされるタンパク質またはポリペプチド（融合タンパク質またはポリペプチドを含む）（例えば、48149タンパク質、48149タンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を産生し得る。 30

【0257】

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48149タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、E. coli、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、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、さらにGoeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CAに議論される。あるいは、組換え発現ベクターは、（例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して）インビトロで転写および翻訳され得る。 40

【0258】

原核生物におけるタンパク質発現は、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向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用いて、ほとんどE. coliにて行われる。融合ベクターは、多くのアミノ酸にこのベクター中で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付加する。このような融合ベクターは、典型的に以下の3つの目的で働く：1）組換えタンパク質の発 50

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ため；および3）アフィニティ精製における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において補助するため。しばしば、タンパク質分解性切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との連結部に導入され、そして融合タンパク質の精製、続く融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にする。このような酵素およびこれらの同族認識配列は、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；Smith, D. B. およびJohnson, K. S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）（これらはそれぞれ、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を標的組換えタンパク質に融合する）が挙げられる。

10

【0259】

精製された融合タンパク質は、48149活性アッセイ（例えば、以下に詳細に記載される直接アッセイまたは競合アッセイ）において、または48149タンパク質に特異的な抗体を生成するために使用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現される融合タンパク質を使用して、骨髄細胞を感染し、続いてこの細胞を照射したレシピエントに移植し得る。次いで、被験体レシピエントの病理学は、十分な時間（例えば、6週間）が経過した後に試験される。

【0260】

20

E. coliにおける組換えタンパク質発現を最大化することは、その組換えタンパク質をタンパク質分解性切断する減弱した能力を有する宿主細菌中でタンパク質を発現することである（Gottesman, S., (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California 119-128）。別の戦略は、各アミノ酸に対する個々のコドンがE. coli中で優先的に利用されるものであるように、発現ベクター中に挿入されるべき核酸の核酸配列を変更することである（Wadara (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的DNA合成技術によって行われ得る。

30

【0261】

48149発現ベクターは、酵母発現ベクター、昆虫細胞内での発現のためのベクター（例えば、バキュロウイルス発現ベクター）または哺乳動物細胞内での発現に適切なベクターであり得る。

【0262】

哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、ウイルス調節エレメントによって提供され得る。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由来である。

【0263】

別の実施形態において、プロモーターは、誘導性プロモーター（例えば、ステロイドホルモンによって調節されるプロモーター、ポリペプチドホルモンによって（例えば、シグナル伝達経路によって）調節されるプロモーター、または異種ポリペプチドによって調節されるプロモーター（例えば、テトラサイクリン誘導系、「Tet-On」および「Tet-Off」；例えば、Clontech Inc., CA, GossenおよびBujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547, ならびにPaillard (1989) Human Gene Therapy 9:983を参照のこと））である。

40

【0264】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントが核酸の発現に使用され

50

る)。適切な組織特異的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；Pinkertr(1987) Genes Dev. 1:268-277)、リンパ特異的プロモーター(Calame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 33:729-740; 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、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター(Edlundら(1985) Science 230:912-916)、および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号および欧州特許出願公開番号264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーター（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 α -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))がまた、含まれる。

【0265】

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。種々の細胞型のアンチセンスRNAの、構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指示する、アンチセンスの向きでクローニングされた核酸に対して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／またはエンハンサー）が選択され得る。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、または弱毒化されたウイルスの形態であり得る。

【0266】

本発明の別の局面は、本明細書中に記載される核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内の48149核酸分子、または48149核酸分子が宿主細胞ゲノムの特定の部位中に相同的に組換えることを可能とする配列を含む48149核酸分子）を含有する宿主細胞を提供する。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、特定の被験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いう。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変が次の世代において生じ得るので、このような子孫は、実際、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ようなこの用語の範囲内に含まれる。

【0267】

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、48149タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞、酵母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細胞(CHO)またはCOS細胞（アフリカミドリザル腎臓細胞CV-1を起源とするSV40細胞；Gluzman(1981) Cell 11:23:175-182））で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0268】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して宿主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）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、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。

【0269】

本発明の宿主細胞を使用して、48149タンパク質を生成（すなわち、発現）し得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して48149タンパク質を生成す

るための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、48149タンパク質が生成されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（この中に、48149タンパク質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、培地または宿主細胞から48149タンパク質を単離する工程を包含する。

【0270】

別の局面において、本発明は、細胞、または48149トランスジーンを含有する細胞もしくはそれ以外に48149を誤って発現する（*misexpress*）細胞からの精製調製物を特徴とする。この細胞調製物は、ヒト細胞または非ヒト細胞（例えば、げっ歯類細胞（例えば、マウス細胞もしくはラット細胞）、ウサギ細胞、またはブタ細胞）からなり得る。好ましい実施形態において、細胞は48149トランスジーン（例えば、48149の異種形態、例えば、（非ヒト細胞の場合の）ヒト由来の遺伝子）を、含有する。この48149トランスジーンは、誤って発現（例えば、過剰発現または寡少発現（*underexpress*））され得る。別の好ましい実施形態において、細胞は、内在性48149を誤って発現する遺伝子（例えば、遺伝子発現が損なわれる遺伝子（例えば、ノックアウト））を含有し得る。このような細胞は、変異した48149対立遺伝子、または誤って発現された48149対立遺伝子に関係する障害を研究するためのモデル、または薬物スクリーニングにおける使用のためのモデルとして働き得る。

10

【0271】

別の局面において、本発明は、本発明の48149ポリペプチドをコードする核酸で形質転換されたヒト細胞（例えば、マクロファージ、内皮細胞、肝細胞、造血幹細胞、肝幹細胞）を、特徴とする。

20

【0272】

また、細胞、好ましくはヒト細胞（例えば、造血細胞（例えば、マクロファージ）、内皮細胞、肝臓細胞、または線維芽細胞）が提供され、この細胞中では、内因性48149が、正常では内因性48149遺伝子の発現を制御しない調節配列の制御下にある。細胞（例えば、細胞株または微生物）中の内因性遺伝子の発現特徴は、挿入された調節エレメントが内因性48149遺伝子に作動可能に連結されるように、細胞のゲノム中に異種性のDNA調節エレメントを挿入することによって改変され得る。例えば、「転写的にサイレント」（例えば、正常では発現されない）であるか、または極低レベルでのみ発現される内因性48149遺伝子を、その細胞中で正常に発現される遺伝子産物の発現を促進し得る調節性エレメントを挿入することによって、活性化し得る。標的化相同組換えのような技術を使用して、例えば、1991年5月16日に公開されたChappel、米国特許第5,272,071号；WO 91/06667に記載されるように、異種性DNAを挿入し得る。

30

【0273】

好ましい実施形態において、本明細書中に記載された組換え細胞は、被験体における置換治療のために使用され得る。例えば、誘導性プロモーター（例えば、ステロイドホルモンレセプター調節性プロモーター）に作動可能に連結された48149ポリペプチドをコードする核酸を、ヒト組換え細胞または非ヒト組換え細胞（例えば、哺乳動物組換え細胞、例えば、ブタ組換え細胞）に導入する。この細胞を培養し、そして生体適合性材料（例えば、ポリリジンアルギネート）中にカプセル充填し、続いて被験体中に移植する。例えば、Lanza（1996）Nat. Biotechnol. 14:1107；Jokira（2001）Nat. Biotechnol. 19:35；および米国特許第5,876,742号を参照のこと。48149ポリペプチドの生成を、被験体への因子（例えば、ステロイドホルモン）の投与によって、被験体中で調節し得る。別の好ましい実施形態において、移植された組換え細胞は、48149ポリペプチドに特異的な抗体を発現および分泌する。この抗体は、本明細書中に記載される、任意の抗体または任意の抗体誘導体であり得る。

40

【0274】

50

(トランスジェニック動物)

本発明は、非ヒトトランスジェニック動物を提供する。このような動物は、48149タンパク質の機能および／または活性を研究するため、ならびに48149の活性の調節因子を同定および／または評価するために、有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、その動物の細胞の1つ以上がトランスジーンを含有する、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットもしくはマウスによくなげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。トランスジーンとは、好ましくは、トランスジェニック動物の細胞のゲノム中に組み込まれるか、またはゲノム中に生じる、外因性DNAまたは再配置（例えば、内因性染色体DNAの欠失）である。トランスジーンは、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型もしくは組織においてコードされる遺伝子産物の発現を指令し得、他のトランスジーン（例えば、ノックアウト）は、発現を減少させる。従って、トランスジェニック動物は、内因性48149遺伝子が、例えば、内因性遺伝子と、その動物の発生前にその動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）中に導入された外因性DNAとの間の相同組換えによって、変更された動物である。

10

20

30

40

50

【0275】

イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、トランスジーンの前発現の効率を増加させるためにトランスジーン中に含まれ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に対して48149タンパク質の発現を指向するために、本発明のトランスジーンに作動可能に連結され得る。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおける48149トランスジーンの前存在および／またはこの動物の組織もしくは細胞における48149 mRNAの前発現に基づいて、同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物を使用して、トランスジーンを保有するさらなる動物を育種する。さらに48149タンパク質をコードするトランスジーンを保有するトランスジェニック動物は、さらに、他のトランスジーンを有する他のトランスジェニック動物と交配され得る。

【0276】

48149タンパク質または48149ポリペプチドは、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物において発現され得る（例えば、このタンパク質またはペプチドをコードする核酸が、動物のゲノム中に導入され得る）。好ましい実施形態において、この核酸を、組織特異的なプロモーター（例えば、母乳特異的プロモーターまたは卵特異的プロモーター）の制御下に配置し得、そして動物により産生される母乳または卵から回収され得る。適切な動物は、マウス、ブタ、ウシ、ヤギおよびヒツジである。

【0277】

本発明はまた、例えば、以下に考察されるような、トランスジェニック動物由来の細胞集団を包含する。

【0278】

(使用)

本明細書中に記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体は、以下の方法の1以上に使用され得る：a) スクリーニングアッセイ；b) 予測的な医薬品（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験のモニタリング、および薬理遺伝学）；ならびにc) 処置方法（例えば、治療および予防）。

【0279】

本発明の単離された核酸分子を使用して、48149タンパク質を（例えば、遺伝子治療の適用における、宿主細胞中の組換え発現ベクターを介して）発現し得、（例えば、生物学的サンプル中の）48149 mRNAを検出し得、または48149遺伝子中の遺伝子の変更を検出し得、そして以下にさらに記載されるように、48149の活性を調節し得る。48149タンパク質を使用して、48149基質または48149インヒビターの不十分な生成または過剰な生成によって特徴付けられる障害を処置し得る。さらに、48149タンパク質を使用して、天然に存在する48149の基質についてスクリーニングし得、48149活性を調節する薬物または化合物をスクリーニングし得、ならびに

48149野生型タンパク質と比較して、減少した活性、異常な活性または所望されない活性を有する、48149タンパク質または48149タンパク質形態の生成物の不十分な生成または過剰な生成によって特徴付けられる障害（例えば、異常な単球／マクロファージ脂質充填プロセス、アテローマ、または肝臓における異常な脂質代謝）を、処置し得る。さらに、本発明の抗48149抗体を使用して、48149タンパク質を検出および単離し得、48149タンパク質の生物利用能を調節し得、そして48149活性を調節し得る。

【0280】

例えば、本発明の48149ポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）能力について化合物を評価する方法を提供する。この方法は、以下を包含する：本発明の48149ポリペプチドと化合物とを接触させる工程；および化合物がこの本発明の48149ポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）か、または複合体を形成する能力を評価する工程。この方法は、インビトロ（例えば、無細胞系）でか、またはインビボ（ツーマイブリッド相互作用トラップアッセイ）で実施され得る。この方法を使用して、本発明の48149ポリペプチドと相互作用する、天然に存在する分子を同定し得る。またこの方法を使用して、本発明の48149ポリペプチドの天然インヒビターまたは合成インヒビターを見出し得る。スクリーニング方法を、以下により詳細に考察する。

【0281】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、48149タンパク質に結合するか、例えば48149発現もしくは48149活性に対する刺激作用もしくは阻害作用を有するか、または例えば48149基質の発現または活性化に対する刺激作用または阻害作用を有する、モジュレーター、すなわち候補または試験の化合物または因子（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプトイド、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中でスクリーニングアッセイともいわれる）を提供する。このように、同定された化合物を使用して、治療プロトコル中で標的遺伝子産物（例えば、48149遺伝子）の活性を調節し得るか、標的遺伝子産物の生物学的機能を調節し得るか、または正常な標的遺伝子の相互作用を無効化（*destruct*）する化合物を、同定し得る。

【0282】

1つの実施形態において、本発明は、48149タンパク質もしくは48149ポリペプチド、またはその生物学的に活性な部分の基質である、候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の実施形態において、本発明は、48149タンパク質もしくは48149ポリペプチド、またはその生物学的に活性な部分の活性に結合するかまたはその活性を調節する、候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

【0283】

1つの実施形態において、48149タンパク質の活性は、以下の通りにアッセイされ得る。第1に、膜貫通ドメインを欠損するが、精製タグ（例えば、His-6タグ）を含む48149タンパク質の組換えフラグメントは、生成され得、そして例えば、金属イオンキレートクロマトグラフィーによって精製され得る。このようなフラグメントは、精製後に基質分子（例えば、エンケファリン（*enkephalin*）、サイトカインのTGF β ファミリーの分子）とインビトロでインキュベートされ得、そして基質分子のタンパク質分解を、例えば、基質分子の免疫沈降およびその任意の物理特性が改変されたか否かを測定することによって観察し得る。例えば、タンパク質分解した基質分子の移動度は、ポリアクリルアミドゲル上で改変され得る。あるいは、このアッセイは、48149タンパク質が細胞（例えば、マクロファージ細胞）中に発現される細胞ベースのアッセイであり得、そして48149タンパク質の活性は、細胞がシグナル伝達分子（例えば、エンケファリン、サイトカインまたはTGF β 分子、すなわち48149基質）にどのように応答するかを測定することによってアッセイされる。

【0284】

本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー方法（生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー（ペプチドの機能を有するが、酵素的分解に対して耐性であるがそれでもなお生物学的に活性なままである、新規の非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー；例えば、Zuckermann, R. N. ら（1994）J. Med. Chem. 37: 2678-85を参照のこと）；空間的にアドレス可能な並行の固相または溶液相ライブラリー；デコンボリューション（deconvolution）を必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー方法を含む）における任意の多くのアプローチを使用して獲得され得る。生物学的ライブラリーアプローチおよび、ペプチドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されず、一方、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（Lam（1997）Anticancer Drug Des. 12: 145）。

10

【0285】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、以下において、当該分野で見出され得る：DeWittら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909；Erbら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422；Zuckermannら（1994）、J. Med. Chem. 37: 2678；Chora（1993）Science 261: 1303；Carrellら（1994）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059；Carellら（1994）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061；およびGallopら（1994）J. Med. Chem. 37: 1233。

20

【0286】

化合物のライブラリーは、溶液中に存在し得るか（例えば、Houghten（1992）Bio/techniques 13: 412~421）、ビーズ上（Lam（1991）Nature 354: 82~84）、チップ上（Fodor（1993）Nature 364: 555~556）、細菌上（Ladner、米国特許第5, 223, 409号）、芽胞上（Ladner、特許第5, 223, 409号）、プラスミド上（Cullら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865~1869）またはファージ上（ScottおよびSmith（1990）Science 249: 386~390；Devlin（1990）Science 249: 404~406；Cwirllaら（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6387~6382；Felicci（1991）J. Mol. Biol. 222: 301~310；Ladner 前出）であり得る。

30

【0287】

1つの実施形態では、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、ここで48149タンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、試験化合物と接触させ、そして試験化合物が48149活性を調節する能力を決定する。試験化合物が48149活性を調節する能力の決定を、例えば、単球／マクロファージ脂質充填プロセスをモニターすることによって成し得る。例えばこの細胞は、哺乳動物由来（例えば、ヒト）であり得る。

40

【0288】

試験化合物が化合物（例えば、48149基質）に結合する48149を調節する能力、または48149に結合する能力をまた、評価し得る。このことは、例えば、化合物（例えば、基質）を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得、その結果、複合体中の標識された化合物（例えば、基質）を検出することによって、化合物（例えば、基質）の48149への結合を決定し得る。あるいは、48149を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせて、複合体中で試験化合物が48149基質に結合する48149を調節する能力をモニタリングし得る。例えば、化合物（例えば、48149基質）を、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で、直接的または間接

50

的のいずれかで標識し得、そしてこの放射性同位体が、放射線放射の直接的な計数によってか、またはシンチレーション計数によってかで検出され得る。あるいは、化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そして適切な基質産物への変換を定量することによって、この酵素標識を検出し得る。

【0289】

化合物（例えば、48149基質）が、任意の相互作用体（interactant）の標識化を有する48149またはこれを有さない48149と相互作用する能力を、評価し得る。例えば、微小生理機能測定器（microphysiometer）を使用して、化合物または48149のいずれかの、標識化を有さない48149との化合物の相互作用を測定し得る。McConnell, H. M. ら（1992）Science 257:1906-1912。本明細書中で使用される場合、「微小生理機能測定器」（例えば、Cytosensor）は、光でアドレス可能な電位差測定センサー（LAPS）を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する、分析装置である。この酸性化速度の変化は、化合物と48149との間の相互作用の指標として使用され得る。

【0290】

なお別の実施形態において、48149タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させ、そして試験化合物が48149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を評価する、無細胞アッセイを提供する。本発明のアッセイに使用するための48149タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分としては、非48149分子と相互作用する役割を持つフラグメント（例えば、高い表面存在可能性スコアを有するフラグメント）が挙げられる。

【0291】

本発明の無細胞アッセイにおいて、単離したタンパク質（例えば、48149タンパク質またはその生物学的に活性な部分）の可溶性形態および／または膜結合形態を、使用し得る。膜結合形態のタンパク質を使用する場合、可溶化剤を利用することが望ましい。このような可溶化剤の例としては、以下のような非イオン性界面活性剤が挙げられる：n-オクタシルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton（登録商標）X-100、Triton（登録商標）X-114、Thesit（登録商標）、イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル）_n（Isotridecypoly（ethylene glycol ether）_n）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate）（CHAPS）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシー-1-プロパンスルホネート（3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane sulfonate）（CHAPSO）、またはN-ドデシル=N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート。

【0292】

無細胞アッセイは、2つの成分が相互作用しそして結合し、従って除去および／または検出され得る複合体を形成し得る条件下かつそのために十分な時間をかけて、標的遺伝子タンパク質および試験化合物の反応混合物を調製する工程を、包含する。

【0293】

2つの分子間の相互作用をまた、例えば、蛍光エネルギー転移（FET）を使用して検出し得る（例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号；Stavrianopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照のこと）。第1「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、その放射した蛍光エネルギーが、第2「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、次いで吸収エネルギーに起因して蛍光発光し得るように、選択される。あるいは、この「ドナー」タンパク質分子は、単に、トリプトフ

10

20

30

40

50

ァン残基の天然の蛍光エネルギーを利用してもよい。異なる光波長を放射する標識を選択して、その結果、「アクセプター」分子標識は、「ドナー」分子標識から識別され得る。これら標識間のエネルギー転移の効率、分子を隔てる距離に関係するので、これら分子間の空間関係の評価し得る。分子間で結合が生じる状態では、このアッセイにおいて「アクセプター」分子標識の蛍光放射は最大となるはずである。FET結合事象を、当該分野で周知の標準的な蛍光検出手段を介して（例えば、蛍光測定器を用いて）、簡便に測定し得る。

【0294】

別の実施形態において、48149タンパク質が標的分子に結合する能力の決定を、リアルタイムの生体分子相互作用分析（*Biomolecular Interaction Analysis*）（BIA）を使用して達成し得る（例えば、Sjolander, S. および Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338~2345、ならびに Szaboら (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699~705を参照のこと）。「表面プラズモン共鳴（*surface plasmon resonance*）」または「BIA」は、いずれの相互作用物（例えば、BIAcore）も標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を検出する。結合表面の質量の変化（結合事象を表す）は、表面付近の光の屈折率の変化（表面プラズモン共鳴の光学的現象（*optical phenomenon*）（SPR））を生じ、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用され得る、検出可能なシグナルを生じる。

10

20

【0295】

1つの実施形態において、標的遺伝子産物または試験基質を、固相上に係留する（*anchor*）。固相上に係留した標的遺伝子産物／試験化合物の複合体を、反応終了時に検出し得る。好ましくは、標的遺伝子産物を固相表面上に係留し得、そして（係留されていない）試験化合物を、本明細書中で考察される検出可能な標識で、直接的または間接的のいずれかで標識し得る。

【0296】

48149、抗48149抗体またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を容易にし、そしてこのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の48149タンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での48149タンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するのに適切な任意の容器内で成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方をマトリックスに結合することを可能にするドメインを追加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／48149の融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ／標的の融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（*Sigma Chemical, St. Louis, MO*）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いで、これらを、試験化合物と混ぜ合わせるか、あるいは試験化合物および非吸着の標的タンパク質または48149タンパク質のいずれかと混ぜ合わせ、そしてこの混合物を、複合体形成に貢献する条件下（例えば、塩およびpHに関して生理学的条件）でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば、上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離させ得、そして48149結合レベルまたは48149活性レベルを標準的な技術を使用して決定し得る。

30

40

【0297】

48149タンパク質または標的分子のいずれかをマトリックス上に固定するための他の技術としては、ビオチンとストレプトアビジンとの複合体化を使用することが挙げられ

50

る。ビオチン化された48149タンパク質または標的分子を、当該分野において公知の技術を使用して、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製し得（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford、IL）、そしてストレプトアビジンでコーティングした96ウェルのプレート（Pierce Chemical）のウェル中に固定し得る。

【0298】

このアッセイを行うために、非固定化成分を、係留された成分を含むコーティングされた表面に添加する。反応の完了後、形成された任意の複合体が固相表面上で依然として固定化されているような条件下で、未反応成分を取り除く（例えば、洗浄によって）。固相表面上に係留された複合体の検出を、多くの方法で達成し得る。これまで固定化されない成分を予め標識する場合、表面上に固定化された標識の検出は、複合体が形成されることを示す。これまで固定化されない成分が予め標識されない場合、間接標識を使用して、表面上に係留された複合体を検出し得る：例えば、固定化成分に特異的な標識抗体の使用（次いで、この抗体は、直接的にか、または例えば標識された抗Ig抗体で間接的に標識され得る）。

10

【0299】

1つの実施形態において、48149タンパク質または標的分子と反応性であるが、48149タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体を利用して、アッセイを実施する。このような抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的または48149タンパク質が、抗体の結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定化複合体に関しての上記のものに加えて、48149タンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびに48149タンパク質または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

20

【0300】

あるいは、無細胞アッセイを液相中で行い得る。このようなアッセイにおいて、以下に挙げられる任意の多くの標準的な技術によって、反応生成物を未反応成分から分離するが、これらに限定されない：差次的遠心分離（例えば、Rivas, G. および Minton, A. P. (1993) Trends Biochem Sci 18:284-7を参照のこと）；クロマトグラフィー（ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー）；電気泳動（例えば、Ausubel, F. ら、編、Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York. を参照のこと）；および免疫沈降（例えば、Ausubel, F. ら、編 (1999) Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley: New Yorkを参照のこと）。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者に公知である（例えば、Heegaard, N. H., (1998) J Mol Recognit 11:141-8; Hage, D. S., および Tweed, S. A. (1997) J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 699:499-525を参照のこと）。さらに、蛍光エネルギー転移をまた、本明細書中に記載されるように、うまく使用して、溶液からの複合体のさらなる精製なしに結合を検出し得る。

30

40

【0301】

好ましい実施形態において、このアッセイは、48149タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、48149を結合する公知化合物と接触させてアッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物が48149タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、試験化合物が48149タンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、公知化合物と比較した場合、試験化合物が、好ましく48149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、または標的分子の活性を調節する能力を決定する工程を包含する。

【0302】

50

本発明の標的遺伝子産物は、インビボで、1つ以上の細胞性高分子または細胞外高分子（例えば、タンパク質）と相互作用し得る。この考察の目的のために、このような細胞性高分子および細胞外高分子は、本明細書中で、「結合パートナー」といわれる。このような相互作用を無効化する化合物は、標的遺伝子産物の活性を調節するのに有用であり得る。このような化合物としては、抗体、ペプチドおよび低分子のような分子が挙げられ得るが、これらに限定されない。この実施形態における使用のための好ましい標的遺伝子／生成物は、本明細書中で同定された48149遺伝子である。代替の実施形態において、本発明は、試験化合物が、48149標的分子の下流のエフェクターの活性の調節を介して、48149タンパク質の活性を調節する能力を決定するための方法を、提供する。例えば、これまでに記載されたように、適切な標的に対するエフェクター分子の活性を決定し得るか、またはエフェクターの適切な標的に対する結合を決定し得る。

10

【0303】

標的遺伝子産物と、その細胞性結合パートナーまたは細胞外結合パートナーとの間の相互作用を妨害する化合物を同定するために、標的遺伝子産物および結合パートナーを含有する反応混合物を、2つの成分が複合体を形成し得るような条件下かつそのために十分な時間をかけて、調製する。阻害性因子を試験するために、反応混合物を試験化合物の存在下および非存在下で提供する。試験化合物は、最初に、反応混合物中に含まれ得るか、またはある時点で添加され得、続いて標的遺伝子およびその細胞性結合パートナーまたは細胞外結合パートナーを添加する。コントロールの反応混合物を、試験化合物なしでかまたはプラセボと一緒にインキュベートする。次いで、標的遺伝子産物と、細胞性結合パートナーまたは細胞外結合パートナーとの間の任意の複合体の形成を検出する。コントロール反応中で複合体を形成するが、試験化合物を含有する反応混合物中では複合体を形成しないことは、化合物が標的遺伝子産物と相互作用性結合パートナーとの相互作用を妨害することを示す。さらに、試験化合物および正常な標的遺伝子産物を含有する反応混合物中の複合体形成をまた、試験化合物および変異体標的遺伝子産物を含有する反応混合物中の複合体形成と比較し得る。この比較は、変異体標的遺伝子産物の相互作用を無効化するが、正常な標的遺伝子産物の相互作用は無効化しない化合物を同定することが望ましい場合に、重要であり得る。

20

【0304】

これらのアッセイは、不均一形式または均一形式で行われ得る。不均一系アッセイは、標的遺伝子産物またはその結合パートナーのいずれかを固相上に係留する工程、および反応終了時に固相上に係留された複合体を検出する工程を、包含する。均一系アッセイにおいて、全反応を液相中で実行する。別のアプローチにおいて、試験される化合物についての差次的な情報を獲得するために、反応物の添加の順序を変化し得る。例えば、標的遺伝子産物とその結合パートナーとの間の相互作用を、例えば、競合によって妨害する試験化合物を、試験基質の存在下で反応を行うことによって同定し得る。あるいは、形成された複合体を無効化する試験化合物（例えば、複合体から成分のうちの1つを置き換える、より高い結合定数を有する化合物）を、複合体が形成した後に反応混合物中に試験化合物を添加することによって試験し得る。種々の形式を、以下に簡潔に記載する。

30

【0305】

不均質のアッセイ系において、標的遺伝子産物または反応性（i n t e r a c t i v e）細胞結合パートナーもしくは細胞外結合パートナーのいずれかは、固体表面（例えば、マイクロタイタープレート）上に固着され、一方で非固着種が直接または間接的に標識される。固着種は、非共有結合または共有結合によって固定され得る。あるいは、固着される種に特異的な固定化抗体は、固体表面への種の固着のために使用され得る。

40

【0306】

アッセイを行うために、固定化種のパートナーは、試験化合物でコーティングされた表面か、試験化合物でコーティングされていない表面に曝露される。反応が完結した後、未反応の成分が除去され（例えば、洗浄によって）、そして任意の形成された複合体は、固体表面上に固定化されたままである。非固定化種が前標識される場合、表面上に固定化さ

50

れた標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。非固定化種が前標識されていない場合、間接標識は、表面に固着された複合体を検出するために使用され得る；例えば、始めに非固定化種に特異的な標識抗体を用いて（次いで、抗体は、例えば、標識化抗Ig抗体で直接標識され得るかまたは間接的に標識され得る）。反応成分の添加の順番に依存して、複合体形成を阻害するか、または予め形成された複合体を破壊する試験化合物が、検出され得る。

【0307】

あるいは、この反応は、試験化合物の存在下または非存在下で液体層で実行され得、反応産物は、未反応成分から分離され、そして複合体が検出される；例えば、溶液中で形成される任意の複合体を固着させる結合成分の1つに特異的な固定化抗体、および固着された複合体を検出する他のパートナーに特異的な標識化抗体を用いて。再度、液相への反応物の添加の順番に依存して、複合体を阻害するか、または予め形成された複合体を破壊する試験化合物が、同定され得る。

10

【0308】

本発明の代替の実施形態において、均質のアッセイが使用され得る。例えば、標的遺伝子産物のおよび反応性細胞結合パートナー産物または細胞外結合パートナー産物の予め形成された複合体は、標的遺伝子産物が標識されるか、またはその結合パートナーが標識されるかのいずれかで調製されるが、標識によって生成されるシグナルは、複合体形成に起因してクエンチされる（このアプローチを免疫アッセイのために利用する米国特許第4,109,496号を参照のこと）。予め形成された複合体由来の種の1つと競合し、そして置換する試験物質の添加は、バックグラウンドを上回るシグナルの生成を生じる。この方法において、標的遺伝子産物結合パートナー相互作用を破壊する試験物質が、同定され得る。

20

【0309】

なお別の局面において、48149タンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第5,283,317号；Zervosら、(1993) Cell 72:223~232；Maduraら(1993) J. Biol. Chem. 268:12046~12054；Bartelら(1993) Biotechniques 14:920~924；Iwabuchiら(1993) Oncogene 8:1693-1696；およびBrent WO94/10300を参照のこと）において「ベイト(bait)タンパク質」として使用され得、48149（「48149-結合タンパク質」または「48149-bp」）と結合または相互作用し、そして48149活性に関する他のタンパク質を同定し得る。このような48149-bpは、例えば、48149媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、48149タンパク質または48149標的によるシグナルのアクティベーターまたはインヒビターであり得る。

30

【0310】

ツーハイブリッドシステムは、大半の転写因子のモジュラー性質に基づき、これは別個のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。手短には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物において、48149タンパク質をコードする遺伝子は、公知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他の構築物において、同定されていないタンパク質（「プレイ(play)」または「サンプル」）をコードするDNA配列のライブラリー由来のDNA配列は、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。（あるいは：48149タンパク質は、活性化ドメインに融合され得る）。「ベイト」タンパク質および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して48149依存性複合体を形成し得る場合、転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、密接に近くにされる。このように近くにするにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結したレポーター遺伝子（例えば、lacZ）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そして4814

40

50

9 タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために使用され得る。

【0311】

別の実施形態において、48149発現のモジュレーターが、同定される。例えば、細胞または細胞を含有しない混合物は、候補化合物と接触させられ、そして48149 mRNAまたはタンパク質の発現は、候補化合物の非存在下で48149 mRNAまたはタンパク質の発現のレベルに相関して評価された。48149 mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりもその存在下で大きい場合、候補化合物は、48149 mRNAまたはタンパク質発現の刺激因子として同定される。あるいは、48149 mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりもその存在下でより少ない（統計学的に有意に少ない）場合、候補化合物は、48149 mRNAまたはタンパク質発現のインヒビターとして同定される。48149 mRNAまたはタンパク質発現のレベルが、48149 mRNAまたはタンパク質の検出について本明細書中に記載される方法によって決定され得る。

【0312】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるアッセイの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節剤は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そして48149タンパク質の活性を調節する因子の能力は、例えば、動物（例えば、アテローム性動脈硬化症の動物モデル）においてインビボで確認され得る。

【0313】

本発明は、さらに上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤に関する。従って、このような薬剤での処置の効果、毒性、副作用、または作用機構を決定するための適切な動物モデルにおいて、本明細書中で記載されるように同定された薬剤（例えば、48149調節剤、アンチセンス48149核酸分子、48149特異的抗体、または48149結合パートナー）をさらに使用することは本発明の範囲内である。さらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤は、本明細書中に記載されたような処置のために使用され得る。

【0314】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定された核酸配列の一部またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として使用され得る。例えば、これらの配列は、以下のために使用され得る：（i）染色体上のその各々の遺伝子をマップするため（例えば、遺伝性疾患に関連する遺伝子領域を位置決めするため、または48149と疾患を関係付けるため）；（ii）わずかな生物学的サンプルからの個体を同定するため（組織タイピング）；および（iii）生物学的サンプルの法医学的同定における補助。これらの適用は、以下の小節に記載される。

【0315】

（染色体マッピング）

48149ヌクレオチド配列またはその一部は、48149遺伝子の位置を染色体上にマッピングするために使用され得る。このプロセスは、染色体マッピングといわれる。染色体マッピングは、疾患と関連する遺伝子と48149配列との相関において有用である。

【0316】

手短には、48149遺伝子は、48149ヌクレオチド配列からPCRプライマー（好ましくは15-25 bp長）を調製することによって染色体にマッピングされ得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングについて有用であり得る。48149配列に対応するヒト遺伝子を含むこれらのハイブリッドのみが、増幅したフラグメントを産生する。

【0317】

各細胞株が、単一のヒト染色体、または少数のヒト染色体、および完全なセットのマウス染色体のいずれかを含む、体細胞ハイブリッドのパネルは、特定のヒト染色体に対する

個々の遺伝子の容易なマッピングを可能にし得る (D' E u s t a c h i o P. ら (1983) Science 220:919-924)。

【0318】

他のマッピングストラテジー (例えば、インサイチュハイブリダイゼーション (Fan, Y. ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6223-27に記載される)、標識化フローソート染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的 cDNA ライブラリーに対するハイブリダイゼーションによる事前選択) は、染色体の位置に対する 48149 のマッピングのために使用され得る。

【0319】

中期染色体拡散 (spread) に対する DNA 配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) は、1 工程にて正確な染色体位置を提供するためにさらに使用され得る。この FISH 技術は、500 塩基または 600 塩基程度の長さの DNA 配列を用いて使用され得る。しかし、1,000 塩基よりも大きいクローンは、特有の染色体位置に結合する傾向がより高く、簡単な検出のために十分なシグナル強度を有する。好ましくは、1,000 塩基、より好ましくは 2,000 塩基が、適切な時間で良好な結果をえるために十分である。この技術の概説について、Verma ら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques ((1988) Pergamon Press, New York) を参照のこと。

【0320】

染色体マッピングのための試薬は、単一の染色体またはその染色体の単一部位をマークするために個々に使用され得るか、または試薬のパネルが複数の部位および／または複数の染色体をマークするために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際にマッピングの目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内でより保存されがちであり、従って、染色体マッピング中のクロスハイブリダイゼーションの機会を増加させる。

【0321】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理学的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る (このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University Welch Medical Library を介してオンラインで利用可能)。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Egeland, J. ら (1987) Nature, 325:783-787 に記載される、連鎖分析 (物理学的に隣接した遺伝子の共同遺伝 (co-inheritance)) によって同定され得る。

【0322】

さらに、48149 遺伝子に関する疾患に罹患した個体と罹患していない個体との間の DNA 配列における相違が、決定され得る。変異が、いくつかまたは全ての罹患した個体において見出されるが、罹患していない個体では見出されない場合、変異は、特定の疾患の原因因子であるようである。罹患した個体および罹患していない個体の比較は、最初に一般に、染色体における構造的改変 (例えば、その DNA 配列に基づく PCR を用いて染色体拡散から観察可能であるか、または検出可能である欠失または転座) を探すことを含む。最終的に、いくらかの個体由来の遺伝子の完全な配列決定は、変異の存在を確認するため、および多型から変異を区別するために実行され得る。

【0323】

(組織タイピング)

48149 配列は、例えば、制限フラグメント長多型 (RFLP) を用いて生物学的サンプルから個体を同定するために使用され得る。この技術において、個体のゲノム DNA は、1 つ以上の制限酵素で消化され、フラグメントは分離され (例えば、サザンブロットにて)、そしてプローブされて同定のためのバンドを産生する。本発明の配列は、RFLP のためのさらなる DNA マーカーとして有用である (米国特許第 5,272,057 号

10

20

30

40

50

に記載される)。

【0324】

さらに、本発明の配列はまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の1塩基ずつのDNA配列を決定するために使用され得る。従って、本明細書中に記載される48149ヌクレオチド配列は、その配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製するために使用され得る。次いで、これらのプライマーは、個体のDNAを増幅し、次いでその配列を決定するために使用され得る。この様式で調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、特有の個体識別子を提供し得る。なぜならば、それぞれの個体は、対立遺伝子の差異に起因してこのようなDNA配列の特有のセットを有するからである。

10

【0325】

対立遺伝子改変体は、これらの配列のコード領域においてある程度まで生じ、そして非コード領域でかなりの程度生じる。いくつかの程度に対して、本明細書中に記載される配列の各々は、ある程度まで標準として使用され得、この基準に対して個体由来のDNAが同定の目的のために比較され得る。より多くの数の多型が、非コード領域で生じるために、より少ない配列しか、個体を区別するために必要でない。配列番号1の非コード配列は、それぞれ100塩基の非コード増幅配列を産生する約10~1,000個のプライマーのパネルを用いて、ポジティブな個体の同定を提供し得る。予測されるコード配列(例えば、配列番号3の配列)が使用される場合、ポジティブな個体の同定のためにより適した数のプライマーは、500~2,000である。

20

【0326】

本明細書中に記載される48149ヌクレオチド配列由来の試薬のパネルが、個体について特有の識別データベースを作成するために使用される場合、これらの同様の試薬が、個体から組織を同定するために後に使用され得る。特有の同定データベースを用いると、生きていても、死んでいても、個体のポジティブな同定は、非常に小さい組織サンプルからなされ得る。

【0327】

(法医学的生物学における部分的48149配列の使用)

DNAベースの同定技術はまた、法医学的生物学において使用され得る。このような同定をするために、PCR技術は、組織(例えば、毛髪および皮膚)、または体液(例えば、犯罪現場で見出された血液、唾液、もしくは精液)のような非常に小さい生物学的サンプルから得られたDNA配列を増幅するために使用され得る。次いで、増幅された配列は、標準と比較され得、これによって生物学的サンプルの起源の同定を可能にする。

30

【0328】

本発明の配列は、ポリヌクレオチド試薬(例えば、ヒトゲノム中の特定の遺伝子座に標的化されるPCRプライマー)を提供するために使用され得、これは、例えば、別の「同定マーカー」(すなわち、特定の個体に特有の別のDNA配列)を提供することによってDNAベースの法医学的識別子の信頼性を増強し得る。上述のように、実際の塩基配列情報は、制限酵素生成フラグメントによって形成されたパターンに対する正確な代替として、同定のために使用され得る。配列番号1の非コード領域に標的化された配列(例えば、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基の長さを有する配列番号1の非コード領域由来のフラグメント)は、特にこの使用に適切である。

40

【0329】

本明細書中に記載される48149ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド試薬(例えば、特定の組織を同定するために例えば、インサイチュハイブリダイゼーション技術で使用され得る標識化プローブまたは標識可能プローブ)を提供するためにさらに使用され得る。これは、法医学者が、未知の起源の組織が示される場合において非常に有用であり得る。このような48149プローブのパネルは、種および/または器官型によって組織を同定するために使用され得る。

【0330】

50

類似の様式において、これらの試薬（例えば、４８１４９プライマーまたはプローブは、汚染について組織培養をスクリーニングするために使用され得る（すなわち、培養物中の異なる型の細胞の混合物の存在についてのスクリーニング）。

【０３３１】

（予測医学）

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイおよび治験のモニタリングが、それによって個体を処置するために予後（予測）目的で使用される、予測医学の分野に関する。

【０３３２】

一般に、本発明は、被験体が、病巣に関連する障害についての危険性があるか、または４８１４９をコードする遺伝子のミス発現か否かを決定する方法を提供する。

10

【０３３３】

このような障害としては、例えば、４８１４９遺伝子のミス発現に関する障害、心臓血管の障害（例えば、アテローム性動脈硬化症）、代謝障害（例えば、肝臓の代謝障害）、または非好中球媒介炎症性障害が挙げられる。

【０３３４】

この方法は、以下の１つ以上を包含する：

被験体の組織において、４８１４９遺伝子の発現に影響する変異の存在または非存在を検出する工程、または遺伝子の発現を制御する領域における変異（例えば、５'制御領域における変異）の存在または非存在を検出する工程；

被験体の組織において、４８１４９遺伝子の構造を改変する変異の存在または非存在を検出する工程；

20

被験体の組織において、mRNAレベルで４８１４９遺伝子のミス発現を検出する工程（例えば、非野生型のmRNAレベルを検出する工程）；

被験体の組織において、タンパク質レベルで遺伝子のミス発現を検出する工程（例えば、非野生型の４８１４９ポリペプチドレベルを検出する工程）

好ましい実施形態において、この方法は、以下の少なくとも１つの存在を確証する工程を包含する：４８１４９遺伝子由来の１つ以上のヌクレオチドの欠失；遺伝子への１つ以上のヌクレオチドの挿入、点変異（例えば、遺伝子の１つ以上のヌクレオチドの置換）、遺伝子の全体の染色体再配列（例えば、転座、逆位、または欠失）。

【０３３５】

30

例えば、遺伝的病巣を検出するための工程としては、以下が挙げられる：（i）配列番号１由来のセンス配列もしくはアンチセンス配列または天然に存在するその変異体、または４８１４９遺伝子と天然に会合する５'もしくは３'の隣接配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含むオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマー、を提供する工程；（ii）プローブ／プライマーを、組織の核酸に曝露する工程；ならびに核酸に対するプローブ／プライマーのハイブリダイゼーション（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション）によって、遺伝的病巣の存在または非存在を検出する工程。

【０３３６】

好ましい実施形態において、ミス発現を検出する工程は、以下の少なくとも１つの存在を確認する工程を包含する：４８１４９遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルにおける改変；遺伝子のメッセンジャーRNA転写の非野生型スプライシングパターンの存在；または非野生型の４８１４９レベル。

40

【０３３７】

本発明の方法は、出生前か、または被験体の子孫が障害の危険性を有するか否かを決定するために使用され得る。

【０３３８】

好ましい実施形態において、本方法は、４８１４９遺伝子の構造、障害の危険性について指標である異常な構造を決定する工程を包含する。

【０３３９】

好ましい実施形態において、本方法は、被験体由来のサンプルを、４８１４９タンパク

50

質に対する抗体またはその遺伝子と特異的にハイブリダイズする核酸と接触させる工程を包含する。これらおよび他の実施形態は以下に考察される。

【0340】

(診断および予後アッセイ)

本発明の診断および予後アッセイは、48149分子の発現レベルを評価するための方法および48149分子の配列中のバリエーションおよび変異を同定するための方法を包含する。

【0341】

(発現モニタリングおよびプロファイリング)

生物学的サンプル中の48149タンパク質または核酸の存在、レベル、または非存在は、試験被験体から生物学的サンプルを得ることおよび生物学的サンプル中で48149タンパク質または核酸の存在が検出されるように、その生物学的サンプルを48149タンパク質または48149タンパク質をコードする核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNA)を検出し得る化合物または薬剤と接触させることによって評価され得る。用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞および生物学的流体、ならびに被験体中に存在する組織、細胞、および流体を含む。好ましい生物学的サンプルは、血清である。48149遺伝子の発現のレベルは、多くの方法で測定され得、この方法として以下が挙げられるがこれらに限定されない: 48149遺伝子にコードされるmRNAを測定する方法; 48149遺伝子にコードされるタンパク質の量を測定する方法; または48149遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定する方法。

【0342】

48149遺伝子に対応する細胞内のmRNAのレベルは、インサイチュ形式およびインビトロ形式の両方によって決定され得る。

【0343】

単離されたmRNAは、ハイブリダイゼーションアッセイあるいは増幅アッセイ(サザン解析またはノザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解析およびプローブアレイを含むがこれらに限定されない)において使用され得る。mRNAレベルの検出のための一つの好ましい診断方法は、単離されたmRNAを、検出される遺伝子によってコードされるmRNAにハイブリダイズし得る核酸分子(プローブ)と接触させる工程を包含する。核酸プローブは、例えば、全長の48149核酸(例えば、配列番号1の核酸)、またはその部分(例えば、少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さであり、そしてストリンジェント条件下で48149mRNAまたは48149ゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするために十分なオリゴヌクレオチド)であり得る。プローブは、アレイの番地(address)(例えば、下に記載のアレイ)上に配置され得る。診断アッセイにおける用途のための他の適切なプローブが、本明細書中に記載される。

【0344】

一つの形式において、mRNA(またはcDNA)は、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲルで電気泳動し、ゲルからニトロセルロースのような膜にmRNAを移すことによって表面に固定され、そしてプローブに接触させられる。別の形式において、例えば、下に記載の2次元遺伝子チップアレイにおいて、このプローブは、表面に固定され、そしてmRNA(またはcDNA)が、プローブに接触させられる。当業者は、48149遺伝子にコードされるmRNAのレベルを検出する用途のために、公知のmRNA検出方法を採用し得る。

【0345】

48149の1つにコードされるmRNAのサンプル中のレベルは、例えば、rtPCR(Mullis(1987)米国特許第4,683,202号)、リガーゼ連鎖反応(Barany(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189~193)、自己持続性(self sustained)配列複製(Guattelliら、(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874~

1878)、転写性増幅システム(Kwohら、(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173~1177)、Q-Beta Replicase(Lizardiら、(1988) Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardiら、米国特許第5,854,033号)または任意の他の核酸増幅方法による核酸増幅(当該分野で公知の技術を使用する増幅化分子の検出が続く)で評価され得る。本明細書中で使用される場合、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域(それぞれプラス鎖およびマイナス鎖、またはその逆も同様)にアニールし得、そして間に短い領域を有する核酸分子の対として規定される。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域に隣接する。このようなプライマーは、適切な条件下そして適切な試薬を用いて、プライマーに隣接されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。 10

【0346】

インサイチュ方法に関して、細胞サンプルまたは組織サンプルは、調製/処理され、そして支持体(代表的にはガラススライド)に固定され、そして次いで、解析される48149遺伝子をコードするmRNAにハイブリダイズし得るプローブと接触させられ得る。

【0347】

別の実施形態において、この方法は、コントロールサンプルを、48149 mRNAまたはゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤と接触させ、そしてコントロールサンプル中の48149 mRNAまたはゲノムDNAの存在を試験サンプル中の48149 mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較する工程をさらに含む。なお別の実施形態において、米国特許第5,695,937号に記載されるような遺伝子発現の連続解析が、48149転写物レベルを検出するために使用される。 20

【0348】

48149にコードされるタンパク質のレベルを決定するために、種々の方法が使用される。一般に、これらの方法は、サンプル中のタンパク質レベルを評価するために、このタンパク質に選択的に結合する薬剤(例えば、抗体)をサンプルと接触させる工程を包含する。好ましい実施形態において、この抗体は、検出可能な標識を有する。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント(例えば、FabまたはF(ab')₂)が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする(すなわち、物理的に連結する)ことによるプローブあるいは抗体の直接標識、および検出可能な物質との反応性によるプローブあるいは抗体の間接標識を含むことが意図される。検出可能な物質の例は、本明細書中に提供される。 30

【0349】

この検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中の48149タンパク質を検出するために使用され得る。48149タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、免疫蛍光、酵素免疫アッセイ(EIA)、放射性免疫アッセイ(RIA)、およびウエスタンブロット解析が挙げられる。48149タンパク質の検出のためのインビボ技術としては、被験体中に標識化抗48149抗体を導入する技術が挙げられる。例えば、この抗体は、被験体中の存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーで標識され得る。別の実施形態において、このサンプルが標識され(例えば、ビオチン化され)、次いで、抗体(例えば、(下に記載されるように)抗体アレイ上に位置付けられた抗48149抗体)に接触させられる。このサンプルは、例えば、蛍光標識に結合されたアビジンを用いて検出され得る。 40

【0350】

別の実施形態において、この方法は、コントロールサンプルを48149タンパク質を検出し得る化合物あるいは薬剤と接触させ、そしてコントロールサンプル中の48149タンパク質の存在を、試験サンプル中の48149タンパク質の存在と比較する工程をさらに含む。 50

【0351】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける48149の存在を検出するためのキットを含む。例えば、このキットは、生物学的サンプル中の48149タンパク質または48149 mRNAを検出し得る化合物または薬剤；および標準物質を備え得る。この化合物または薬剤は、適切な容器に充填され得る。このキットは48149タンパク質または核酸を検出するためにキットを使用するための指示書をさらに備え得る。

【0352】

抗体ベースのキットに関して、このキットは、以下を備え得る：（１）本発明のマーカに相当するポリペプチドに結合する（例えば、固体支持体に接着された）１次抗体、および、必要に応じて（２）ポリペプチドまたは１次抗体のいずれかに結合し、検出可能な薬剤に結合体化される異なる２次抗体。

10

【0353】

オリゴヌクレオチドベースのキットに関して、このキットは、以下を備え得る：（１）本発明のマーカに相当するポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド）、または（２）本発明のマーカに相当する核酸分子を増幅するために有用なプライマーの対。このキットはまた、緩衝剤、防腐剤、またはタンパク質安定化剤を備え得る。このキットはまた、検出可能な薬剤（例えば、酵素または基質）を検出するために必要な構成要素を備え得る。このキットはまた、アッセイされ得、そして備えられた試験サンプルと比較され得る、コントロールサンプルまたはコントロールサンプルの系列を備え得る。このキットの各構成要素は、個々の容器内に封入され得、そして種々の容器は全て、このキットを使用して実施されるアッセイの結果を説明するための指示書とともに、単一の包装内であり得る。

20

【0354】

本明細書中に記載される診断方法は、誤って発現された（*misexpressed*）か、または異常であるか、もしくは望まれない48149発現もしくは48149活性に関連する、疾患または障害を有するか、あるいはこれらの疾患または障害を発生する危険性が高い被験体を同定し得る。本明細書中で使用される場合、用語「望まれない」は、アテローム動脈硬化症、異常な単球／マクロファージ脂質充填プロセスまたは制御を外れた（*deregulated*）細胞増殖のような生物学的応答に関連する望まれない現象を含む。

30

【0355】

一つの実施形態において、異常であるか、または望まれない48149発現もしくは48149活性に関連する疾患あるいは障害が同定される。試験サンプルが、被験体から得られ、そして48149タンパク質または核酸（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）が評価される。ここで、48149タンパク質または48149核酸のレベル（例えば、存在または非存在）は、異常であるか、または望まれない48149発現もしくは48149活性に関連する疾患あるいは障害を有するか、あるいはこれらの疾患または障害を発生する危険性が高い被験体について診断的である。本明細書中で使用される場合、「試験サンプル」は、目的の被験体から得られる生物学的サンプル（生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織を含む）をいう。

40

【0356】

本明細書中に記載される予後アッセイは、被験体が、異常であるか、または望まれない48149発現もしくは48149活性に関連する疾患あるいは障害を処置するための薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬剤候補）を投与し得るかどうか決定するために使用され得る。例えば、このような方法は、被験体が48149遺伝子の誤発現に関連する、心臓血管障害（例えば、アテローム動脈硬化症）、代謝障害（例えば、肝臓の代謝障害）、または非好中球媒介炎症性障害のための薬剤で効果的に処置され得るかどうか決定するために使用され得る。

【0357】

50

別の局面において、本発明は、複数のデジタル形式でコードされたデータレコードを有するコンピューター媒体を特徴とする。各データレコードは、サンプル中の48149の発現のレベルおよびそのサンプルの記述子を表す値を備える。サンプルの記述子は、そのサンプル、そのサンプルが由来する被験体（例えば、患者）、診断、または処置（例えば、好ましい処置）の識別子であり得る。好ましい実施形態において、このデータレコードはさらに、48149以外の遺伝子（例えば、48149障害に関連する他の遺伝子、またはアレイ上の他の遺伝子）の発現のレベルを表す値を備え得る。このデータレコードは、表（例えば、関連型データベース（例えば、OracleまたはSybaseデータベース環境のSQLデータベース）のようなデータベースの部分である表）として構築され得る。

10

【0358】

サンプルの評価方法もまた特徴とする。この方法は、例えば、被験体由来のサンプルを提供する工程、およびそのサンプルの遺伝子発現プロファイルを決する工程を包含し、ここで、このプロファイルは、48149発現レベルを表す値を含む。この方法は、その値またはそのプロファイル（すなわち、複数の値）と参照値または参照プロファイルとを比較する工程をさらに包含し得る。このサンプルの遺伝子発現プロファイルは、本明細書中に記載される任意の方法によって（例えば、サンプル由来の核酸を提供する工程およびこの核酸とアレイを接触させる工程によって）得られ得る。この方法は、被験体におけるアテローム動脈硬化症を診断するために使用され得、ここで、48149発現の増加は、その被験体がアテローム動脈硬化症を有しているかまたは有する傾向にあることの指標である。この方法は、被験体におけるアテローム動脈硬化症のための処置をモニターするために使用され得る。例えば、遺伝子発現プロファイルは、処置された被験体由来のサンプルについて決定され得る。このプロファイルは、参照プロファイルまたは処置前もしくは障害の発症前の被験体から得たプロファイルと比較され得る（例えば、Golubら（1999）Science 286:531を参照のこと）。

20

【0359】

なお別の局面において、本発明は試験化合物の評価法（上記の「スクリーニングアッセイ」もまた参照のこと）を特徴とする。この方法は、細胞および試験化合物を提供する工程；その試験化合物を細胞と接触させる工程；接触された細胞についての被験体発現プロファイルを得る工程；ならびにその被験体発現プロファイルと1つ以上の参照プロファイルとを比較する工程、を包含する。このプロファイルは、48149発現レベルを表す値を含む。好ましい実施形態において、この被験体発現プロファイルは、標的プロファイル（例えば、正常細胞についてのプロファイルまたは所望の条件の細胞についてのプロファイル）と比較される。この試験化合物は、被験体発現プロファイルが接触されなかった細胞から得た発現プロファイルよりも標的プロファイルにより類似しているかどうかを好都合に評価される。

30

【0360】

別の局面において、本発明は、被験体を評価する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：a) 被験体（例えば、介護者（例えば、被験体からサンプルを得る介護者）からサンプルを得る工程；b) そのサンプルについての被験体発現プロファイルを決する工程。必要に応じて、この方法は、以下の工程のいずれかまたは両方をさらに包含する：c) その被験体発現プロファイルを、1つ以上の参照発現プロファイルと比較する工程；およびd) 被験体参照プロファイルに最も類似である参照プロファイルを選択する工程。この被験体発現プロファイルおよび参照プロファイルは、48149発現レベルを表す値を含む。種々の慣習的な統計学的測定が、2つの参照プロファイルを比較するために使用され得る。1つの考えられる測定基準は、2つのプロファイルの間の差異である、距離ベクター（distance vector）の長さである。被験体プロファイルおよび参照プロファイルの各々は、多次元ベクターとして表され、ここで、各次元は、プロファイル中の値である。

40

【0361】

50

この方法は、介護者に結果を伝達する工程をさらに包含し得る。この結果は、被験体発現プロフィール、被験体発現プロフィールと、別のプロフィール、最も類似の参照プロフィール、または前述の任意の記述子との比較の結果であり得る。この結果は、コンピュータネットワークを通して伝達され得、例えば、この結果は、コンピュータ伝達（例えば、搬送波に包埋されるコンピュータデータ信号）の形態であり得る。

【0362】

また、実行可能なコードを有するコンピュータ媒体も特徴とされ、このコンピュータ媒体は、以下の工程をもたらす：被験体の発現プロフィールを受信する；参照発現プロフィールのデータベースにアクセスする；そしてi) 被験体発現プロフィールに最も類似のマッチング (matching) 参照プロフィールを選択するかまたはii) 少なくとも1つの参照プロフィールに対する被験体発現プロフィールの類似性についての少なくとも1つの比較スコアを決定する。この被験体発現プロフィールおよび参照発現プロフィール各々は、48149発現レベルを表す値を含む。

10

【0363】

(アレイおよびその使用)

別の局面において、本発明は、複数のアドレスを有する基材を含むアレイを特徴とする。その複数のアドレスのうち少なくとも1つのアドレスは、48149分子（例えば、48149核酸または48149ポリペプチド）に特異的に結合する捕捉プローブを含む。このアレイは、 1 cm^2 あたり少なくとも10、50、100、200、500、1,000、2,000、または10,000以上のアドレスの密度を有し得、そしてこれらの範囲であり得る。好ましい実施形態において、複数のアドレスは、少なくとも10、100、500、1,000、5,000、10,000、50,000のアドレスを含む。好ましい実施形態において、この複数のアドレスは、10、100、500、1,000、5,000、10,000、または50,000以下のアドレスを含む。この基材は、スライドガラス、ウェーハ（例えば、シリカまたはプラスチック）、質量分析プレートのような二次元基材、またはゲルパッドのような三次元基材であり得る。複数のアドレスに加えて、アドレスがアレイ上に配置され得る。

20

【0364】

好ましい実施形態において、複数のアドレスのうちの少なくとも1つのアドレスは、48149核酸（例えば、センス鎖またはアンチセンス鎖）に特異的にハイブリダイズする核酸捕捉プローブを含む。1つの好ましい実施形態において、複数のアドレスのサブセットのアドレスは、48149に対する核酸捕捉プローブを有する。このサブセットの各アドレスは、48149核酸の異なる領域にハイブリダイズする捕捉プローブを含み得る。別の好ましい実施形態において、このサブセットのアドレスは、48149核酸に対する捕捉プローブを含む。このサブセットの各アドレスは、独特であり、48149の異なる改変体（例えば、対立遺伝子改変体、または全ての可能性のある仮定改変体）と重複しており、かつ相補的である。このアレイは、ハイブリダイゼーションによる48149の配列決定のために使用され得る（例えば、米国特許第5,695,940号を参照のこと）。

30

【0365】

アレイは、種々の方法（例えば、写真平版（例えば、米国特許第5,143,854号；同第5,510,270号；および同第5,527,681号を参照のこと）、機械的方法（例えば、米国特許第5,384,261号に記載されるような正流法 (directed-flow method)）、ピンベース方法 (pin-based method)（例えば、米国特許第5,288,514に記載される）、およびビーズベース技術 (bead-based technique)（例えば、PCT US/93/04145に記載される））によって作製され得る。

40

【0366】

別の好ましい実施形態において、複数のアドレスのうち少なくとも1つは、48149ポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合するポリペプチド捕捉プローブを含

50

む。このポリペプチドは、天然に存在する、48149ポリペプチドの相互作用パートナーであり得る。好ましくは、このポリペプチドは、モノクローナル抗体または単鎖抗体のような抗体（例えば、本明細書中で記載される抗体（上記の「抗48149抗体」を参照のこと））であり得る。

【0367】

別の局面において、本発明は、48149の発現を分析する方法を特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：上記のようなアレイを提供する工程；このアレイを、サンプルと接触させる工程；およびこのアレイへの48149分子（例えば、核酸またはポリペプチド）の結合を検出する工程。好ましい実施形態において、このアレイは、核酸アレイであり得る。必要に応じて、この方法は、アレイとの接触の前または接触の間にサンプル由来の核酸を増幅させる工程をさらに包含する。 10

【0368】

別の実施形態において、このアレイは、アレイ中の遺伝子の組織特異性を確認するために、組織中の遺伝子発現（特に、48149の発現）をアッセイするために使用され得る。十分な数の多様なサンプルが分析される場合、クラスター化（例えば、階層クラスター化、k方法クラスター化（*k-means clustering*）、*Bayesian*クラスター化など）を使用して、48149と同時調節される他の遺伝子を同定し得る。例えば、このアレイは、複数の遺伝子の発現の定量化のために使用され得る。従って、組織特異性のみならず、組織中の一連の遺伝子の発現レベルもまた確認される。定量データは、その組織発現自体およびその組織中の発現レベルに基づいて、遺伝子をグループ化（例えば、クラスター化）するために使用され得る。 20

【0369】

例えば、遺伝子発現のアレイ分析は、48149発現における細胞-細胞相互作用の影響を評価するために使用され得る。第1組織は摂動され得、そして第1組織と相互作用する第2組織由来の核酸が分析され得る。この脈絡において、生物学的刺激に対する応答における、別の細胞型に対する1つの細胞型の影響が測定（例えば、遺伝子発現レベルでの細胞-細胞相互作用の影響をモニターすること）され得る。

【0370】

別の実施形態において、細胞は、治療剤と接触される。この細胞の発現プロファイルはアレイを使用して決定され、そしてこの発現プロファイルは、薬剤と接触されない類似の細胞のプロファイルと比較される。例えば、このアッセイは、治療剤の望ましくない影響に基づく分子を決定または分析するために使用され得る。薬剤が、ある細胞型を処置するために治療的に投与されるが、別の細胞型に対しては望ましくない効果を有している場合、本発明は、この望ましくない効果に基づく分子を決定するためのアッセイを提供し、従って、反作用する薬剤を同時投与する機会、またはそうでなければ望ましくない効果を処置する機会を提供する。同様に、単一の細胞型内でさえも、望ましくない生物学的効果が分子レベルで測定され得る。従って、標的遺伝子以外の発現における薬剤の効果が確認され得、そして反作用され得る。 30

【0371】

別の実施形態において、アレイは、時間に対して、アレイ中の1つ以上の遺伝子の発現をモニターするために使用され得る。例えば、異なる時点で得られるサンプルは、アレイと共にプローブされ得る。このような分析は、48149関連疾患もしくは障害の発症を同定および／または特徴付け得；そして48149関連疾患もしくは障害と関連する細胞形質転換などを処理する。この方法はまた、48149関連疾患もしくは障害の処置および／または進行も評価し得る。 40

【0372】

このアレイはまた、正常細胞および異常細胞中の1つ以上の遺伝子の異なる発現パターンを確認するために有用である。このことは、診断処置または治療処置のための分子標的として作用し得る一連の遺伝子（例えば、48149を含む）を提供する。

【0373】

別の局面において、本発明は、複数のアドレスを有するアレイを特徴とする。この複数のアドレスの各々は特有のポリペプチドを含む。この複数のアドレスのうち少なくとも1つのアドレスは、その上に配置された48149ポリペプチドまたはそのフラグメントを有する。ポリペプチドアレイを産生する方法は、当該分野において、以下に記載される：例えば、De Wildtら(2000). Nature Biotech. 18, 989-994; Luekingら(1999). Anal. Biochem. 270, 103-111; Ge, H. (2000). Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath, G., およびSchreiber, S. L. (2000). Science 289, 1760-1763; ならびにWO 99/51773 A1。好ましい実施形態において、複数のアドレスの各々は、48149ポリペプチドまたはそのフラグメントに対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%または99%同一である、その上に配置されるポリペプチドを有する。例えば、48149ポリペプチドの多重変異体(例えば、対立遺伝子変異体、部位特異的変異体、ランダム変異体、またはコンビナトリアル変異体によってコードされる)は、複数の個々のアドレスに配置され得る。複数のアドレスに加えて、アドレスがそのアレイに配置され得る。 10

【0374】

このポリペプチドアレイは、48149結合化合物(例えば、48149ポリペプチドに特異的な、被験体由来のサンプル中の抗体)または48149結合タンパク質もしくはリガンドの存在を検出するために使用され得る。 20

【0375】

このアレイはまた、同一の細胞または異なる細胞中の他の遺伝子の発現に対する遺伝子発現の効果を確認する(たとえば、他の遺伝子の発現に対する48149発現の効果を確認する)ために有用であり得る。このことは、例えば、最終標的または下流標的が調節され得ない場合、治療介入のための代替分子標的の選択を提供する。

【0376】

別の局面において、本発明は、複数のプローブを分析する方法を特徴とする。この方法は、例えば、遺伝子発現を分析するために有用である。この方法は、以下の工程を包含する：複数のアドレスを有する、二次元アレイを提供する工程であって、複数のアドレスの各々は、特有の捕捉プローブを有する複数のアドレスを互いに位置的に区別可能であり、例えば、ここで、この捕捉プローブは、48149を発現する細胞または被験体由来であるかまたは、例えば、細胞と48149核酸もしくはタンパク質との接触、またはその細胞または被験体への48149核酸もしくはタンパク質の投与によって48149媒介性応答が誘発された細胞もしくは被験体由来である、工程；複数のアドレスを有する二次元アレイを提供する工程であって、この複数のアレイの各々は、互いの複数のアドレスとは位置的に区別され、そして複数のアドレスの各々は、特有の捕捉プローブを有しており、例えば、ここで、この捕捉プローブは、48149を発現しない(または48149陽性の複数の捕捉プローブの場合のように高度に発現しない)細胞または被験体由来であるか、あるいは48149媒介性応答が誘発されていない(または第1のサンプル中よりもより少ない程度まで誘発されている)、細胞または被験体由来である、工程；このアレイと、1つ以上の問い合わせプローブ(好ましくは、48149核酸、ポリペプチド、または抗体以外)とを接触させる工程；およびそれによって複数の捕捉プローブを評価する工程。結合(例えば、核酸の場合、複数のアドレスにおける捕捉プローブとのハイブリダイゼーション)は、例えば、核酸、ポリペプチド、または抗体に結合された標識から生成される信号によって検出される。 30 40

【0377】

別の局面において、本発明は、複数のプローブまたはサンプルを分析する方法を特徴とする。この本発明の方法は、例えば、遺伝子発現を分析するために有用である。この方法は、以下の工程を包含する：複数のアドレスを有する二次元アレイを提供する工程であって、複数のアドレスの各々は、特有の捕捉プローブを有する複数のアドレスを各々に位置 50

的に区別可能である、工程；そのアレイを、48149を発現するかもしれない誤発現する細胞もしくは被験体由来の第1サンプル、あるいは例えば、48149核酸もしくはタンパク質の細胞との接触、または細胞もしくは被験体への48149核酸もしくはタンパク質の投与によって48149媒介性応答が誘発された細胞もしくは被験体由来の第1サンプルと接触させる工程；複数のアドレスを有する二次元アレイを提供する工程であって、複数のアドレスの各々は、複数のアドレスを互いに位置的に区別可能であり、そしてその複数のアレイの各々は、特有の捕捉プローブを有している、工程；およびそのアレイを、48149を発現しない（または48149陽性の複数の捕捉プローブの場合のように高度に発現しない）細胞もしくは被験体由来の第2サンプル、あるいは48149媒介性応答が誘発されない（または第1サンプルよりもより少ない程度に誘発される）細胞もしくは被験体由来である第2サンプルと接触させる工程；および第1サンプルの結合と、第2サンプルの結合とを比較する工程。結合（例えば、核酸の場合、複数のアドレスにおける捕捉プローブとのハイブリダイゼーション）は、例えば、核酸、ポリペプチド、または抗体に結合された標識から生成される信号によって検出される。同一のアレイが、両方のサンプルのために使用され得るか、または異なるアレイが使用され得る。異なるアレイが使用される場合、捕捉プローブを有する複数のアドレスは、両方のアレイに存在しているべきである。

10

【0378】

別の局面において、本発明は、48149を分析する（例えば、構造、機能、または他の核酸配列もしくはアミノ酸配列との関連を分析する）方法の特徴とする。この方法は、以下の工程：48149核酸配列またはアミノ酸配列を提供する工程；この48149配列を、配列のコレクション（例えば、核酸配列データベースまたはタンパク質配列データベース）由来の1つ以上（好ましくは、複数の）の配列と比較する工程を包含し、それによって48149を分析する。

20

【0379】

（改変体または変異体の検出）

本発明の方法はまた、48149遺伝子における遺伝性変化を検出するために使用され得、それによって、変更された遺伝子を有する被験体が、48149タンパク質の活性化における誤調節または核酸発現によって特徴付けられる障害（例えば、心臓血管障害（例えば、アテローム動脈硬化症）、代謝性障害（例えば、肝臓の代謝性障害）、または非好中球媒介炎症性障害）についての危険性があるか否かを決定する。好ましい実施形態において、この方法は、被験体由来のサンプルにおいて、48149タンパク質をコードする遺伝子の強度に影響を及ぼす少なくとも1つの変化、または48149遺伝子の誤発現によって特徴付けられる、遺伝的变化の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、このような遺伝的变化は、以下のうちの少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：1）48149遺伝子由来の1つ以上のヌクレオチドの欠失；2）48149遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；3）48149遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換；4）48149遺伝子の染色体再配置；5）48149遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルにおける変化；6）ゲノムDNAのメチル化パターンのような、48149遺伝子の異常な改変；7）48149遺伝子のメッセンジャーRNA転写の非野生型スプライシングパターンの存在；8）48149タンパク質の非野生型レベル；9）48149遺伝子の対立遺伝子欠失；および10）48149タンパク質の不適切な翻訳後改変。

30

40

【0380】

変化（a l t e r a t i o n）は、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、または連結鎖反応（LCR）において、プローブ／プライマー用いずに検出され得、これらの後者は、48149遺伝子における点変異を検出するのに特に有用であり得る。この方法は、以下の工程を包含し得る：被験体から細胞のサンプルを回収する工程；サンプルから核酸（例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方）を単離する工程；48149遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅（存在する場合）が生

50

じるような条件下で、核酸サンプルを、48149遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させる工程；および増幅産物の存在または非存在を検出する工程；または増幅産物のサイズを検出する工程およびコントロールサンプルと長さを比較する工程。PCRおよび／またはLCRが、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される任意の技術と組み合わせて、予備増幅工程として使用することが所望され得ることが予測される。あるいは、本明細書中に記載され得るかまたは当該分野で公知の他の増幅法が、使用され得る。

【0381】

別の実施形態において、サンプル細胞由来の48149遺伝子中の変異が、制限酵素の切断パターンにおける変化を検出することによって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールDNAが単離され、（必要に応じて）増幅され、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、フラグメント長サイズが、例えば、ゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズの差異が、サンプルDNA中の変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用（例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと）は、リボザイム切断部位の発生または欠失による、特異的変異の存在についてのスコア付けのために使用され得る。

【0382】

他の実施形態において、48149中の遺伝的変異がサンプルおよびコントロール核酸（例えば、DNAまたはRNA、二次元配列（例えば、チップベースアレイ（chip based array）））のハイブリダイゼーションによって同定され得る。このようなアレイは、複数のアドレスを含み、これらの各々は、互いに位置的に区別可能である。異なるプローブは、複数のアドレスの各々に配置される。プローブは、48149核酸またはその推定改変体（例えば、対立遺伝子改変体）の領域に相補的であり得る。プローブは、48149核酸の領域に対する1つ以上のミスマッチ（例えば、不安定化ミスマッチ）を有し得る。このアレイは、高密度のアドレスを有し得る（例えば、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る）（Cronin, M. T. ら（1996）*Human Mutation* 7:244-255；Kozal, M. J. ら（1996）*Nature Medicine* 2:753-759）。例えば、48149における遺伝的変異は、Cronin, M. T. ら（前出）に記載されるような光生成DNAプローブを含む2次元アレイ中で同定され得る。簡単にいうと、プローブの第1ハイブリダイゼーションアレイは、連続的な重複プローブの線形アレイを作成することによって配列間の塩基変化を同定するために、サンプルおよびコントロール中のDNAの長い伸展を介して走査するために使用され得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程の後、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さく、特定化されたプローブアレイを使用することによって、特定の変異の特徴付けを可能にする第2ハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、平行プローブセットからなり、一方は、野生型遺伝子に相補的であり、そして他方は、変異遺伝子に相補的である。

【0383】

なお別の実施形態において、当該分野で公知である任意の種々の配列決定反応は、サンプル48149の配列と、対応する野生型（コントロール）配列との比較によって、48149遺伝子の直接的な配列決定および変異の検出に使用され得る。自動化配列決定手段は、診断アッセイ（（1995）*Biotechniques* 19:448）を実施する場合に利用され得、これは、質量分析による配列決定を含む。

【0384】

48149遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、RNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二重鎖中のミスマッチ塩基を検出するために使用される切断剤からの保護する方法が挙げられる（Myersら（1985）*Science* 230:1242；Cottonら（1988）*Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397；Saleebaら（1992）*Methods Enzymol.* 217:286-295）。

10

20

30

40

50

【0385】

なお別の実施形態において、このミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルから得た48149cDNA中の点変異を検出およびマッピングするために規定された系において二重鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（「DNAミスマッチ修復」酵素とよばれる）を使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチにおいてAを切断し、そしてHeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにおいてTを切断する（Hsuら（1994）Carcinogenesis 15:1657-1662；米国特許第5,459,039号）。

【0386】

他の実施形態において、電気泳動度における変化は、48149遺伝子中の変異を同定 10
するために使用される。例えば、単鎖コンフォメーション多型（SSCP）は、変異体核
酸と野生型核酸との間の電気泳動度の差異を検出するために使用され得る（Oritaら
（1989）Proc Natl. Acad. Sci USA:86:2766, Cotton（1993）Mutat. Res. 285:125-144もまた参照のこと；お
よびHayashi（1992）Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73
-79）。サンプルおよびコントロールの48149核酸の一本鎖DNAフラグメントは
、変性されそして再編成を可能にする。単鎖核酸の2次構造は、配列に従って変化し、電
気泳動度において生じる変化は、単一の塩基変化の検出さえも可能にする。DNAフラグ
メントは、標識化プローブを用いて標識または検出され得る。このアッセイの感受性は、
（DNAよりもむしろ）RNAを使用することによって増強され得、2次構造は、配列に 20
おける変化に対してより感受性である。好ましい実施形態において、対象方法は、電気泳
動度における変化に基づいて二重鎖のヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分
析を利用する（Keenら（1991）Trends Genet 7:5）。

【0387】

なお別の実施形態において、変性の勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける変異フ
ラグメントまたは野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動（DGGE）を使
用してアッセイされる（Myersら（1985）Nature 313:495）。分
析法としてDGGEが使用される場合、DNAは、例えば、PCRによって約40bpの
高融解性のGCリッチDNAのGCクランプを加えることによって完全に変性しないこと
を保証するために改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールお 30
よびサンプルのDNAの移動度における差異を同定するために変性勾配の場所において使
用される（RosenbaumおよびReissner（1987）Biophys Chem 265:12753）。

【0388】

点変異を検出するための他の技術の例としては、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダ
イゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長が挙げられるが、これらに限定
されない（Saikiら（1986）Nature 324:163）；Saikiら（
1989）Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:6230）。点変異
を検出するさらなる方法は、Xuら（（2001）Nature Biotechnol 19:148）に記載されるようなオリゴヌクレオチドの化学結合である。隣接オリ 40
ゴヌクレオチドのうちの1つは、問い合わせ部位に選択的にアニールし、サンプル核酸の
問い合わせ部位におけるヌクレオチドが問い合わせオリゴヌクレオチドに相補的である場
合、共に結合し；結合は、例えば、オリゴヌクレオチドに結合する蛍光色素によってモニ
ターされ得る。

【0389】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と組み合
わせて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチ
ドは、分子の中心（そのために、増幅は差次的ハイブリダイゼーションに依存する）（G
ibbsら（1989）Nucleic Acids Res. 17:2437-244
8）またはプライマーの最後の3'末端において目的の変異を保有し得、ここで、適切な 50

条件下において、ミスマッチは、ポリメラーゼ伸長を防止し得るかまたは減少させ得る (Prossner (1993) Tibtech 11:238)。さらに、切断ベースの検出を作成するために変異の領域に新規の制限部位を導入することが所望され得る (Gaspariniら (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅のための Taq リガーゼを使用して実施され得ることが予測される (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189)。このような場合において、結合は、5' 配列の 3' 末端において完璧なマッチが存在する場合にのみ生じ、このことは、増幅の存在または非存在を探索することによって特異的部位における既知の変異の存在を検出することを可能にさせる。

【0390】

10

別の局面において、本発明は、オリゴヌクレオチドのセットを特徴とする。このセットは、複数のオリゴヌクレオチドを含み、それらの各々は、48149 核酸に対して、少なくとも部分的に相補的 (例えば、少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%、または 99% 相補的) である。

【0391】

好ましい実施形態において、このセットは、第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドを含む。この第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドは、配列番号1または配列番号1の相補体の、同一の位置または異なる位置にハイブリダイズし得る。異なる位置は、異なり得るが重複しているか、または同一の鎖において非重複であり得る。この第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドは、同一の鎖または異なる鎖の部位にハイブリダイズし得る。

20

【0392】

このセットは、例えば、SNPを同定するためにか、または48149の特異的対立遺伝子を同定するために有用であり得る。好ましい実施形態において、このセットの各オリゴヌクレオチドは、疑問位置において異なるヌクレオチドを有する。1つの実施形態において、このセットは、2つのオリゴヌクレオチドを含み、その各々は、例えば、二対立遺伝子 (b i a l l e l i c) の位置または多型位置において、異なる対立遺伝子に相補的である。

【0393】

別の実施形態において、このセットは、4つのオリゴヌクレオチドを含み、その各々は、疑問位置において異なるヌクレオチド (例えば、アデニン、グアニン、シトシン、またはチミジン) を有する。この疑問位置は、SNPまたは変異の部位であり得る。別の好ましい実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、互いに配列において同一である (長さにおける差異を除いて)。このオリゴヌクレオチドは、ある対立遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが第2の対立遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと区別され得る信号を提供するように、異なる標識を用いて提供され得る。なお別の実施形態において、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのセットは、問い合わせ位置に加えて、ある位置にヌクレオチド変化を有する (例えば、オリゴヌクレオチドの T_m を減少させるための変異の不安定化)。別の実施形態において、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのセットは、非天然ヌクレオチド (例えば、イノシン) を有する。好ましい実施形態において、このオリゴヌクレオチドは、固体支持体 (例えば、アレイの異なるアドレスまたは異なるビーズもしくはナノ粒子) に結合される。

30

40

【0394】

好ましい実施形態において、このオリゴヌクレオチドのセットは、例えば、PCRによる特異的増幅、または48149核酸の検出のために使用され得る。

【0395】

本明細書中で記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実行され得、これは、例えば、48149遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族の病歴を示す患者を診断するための臨床設定において、便利に使用され得る。

50

【0396】

(代理マーカーとしての48149分子の使用)

本発明の48149分子はまた、障害または疾患状態のマーカーとして、疾患状態の前駆体についてのマーカーとして、疾患状態の素因のためのマーカーとして、薬物活性のマーカーとして、または被験体の薬理ゲノム学的プロファイルのマーカーとして有用である。本明細書中に記載される方法を使用して、本発明の48149分子の存在、非存在および/または量が検出され得、そしてインビボでの1つ以上の生物学的状態と相関され得る。例えば、本発明の48149分子は、1つ以上の障害または疾患状態についての代理マーカーまたは疾患状態を導く状態についての代理マーカーとして作用し得る。本明細書中で使用される場合、「代理マーカー」は、疾患または障害の非存在もしくは存在、または疾患もしくは障害の進行（例えば、腫瘍の存在または非存在を伴う）と相関する目的の生物学的マーカーである。このようなマーカーの存在または量は、疾患に依存しない。従って、これらのマーカーは、処置の特定のコースが、疾患状態または障害の減少において有効であるか否かを示すために作用し得る。代理マーカーは、疾患状態もしくは障害の存在もしくは程度が、標準的な方法論（例えば、初期段階腫瘍）を介して評価することが困難な場合、または疾患進行の評価が、潜在的に危険な臨床的終点が達成される前に所望される場合に特に使用される（例えば、心臓血管疾患の評価が、代理マーカーとしてコレステロールレベルを使用してなされ得、そしてHIV感染の分析が、代理マーカーとしてHIV RNAレベルを使用してなされ得、心筋梗塞または十分に進行したAIDSの望ましくない臨床的結果の進行においても同様に）。当該分野における代理マーカーの使用の例としては、以下が挙げられる：K o o m e n ら（2000）J. Mass. Spectrom. 35:258-264；およびJ a m e s（1994）AIDS Treatment News Archive 209。

【0397】

本発明の48149分子はまた、薬力学的マーカーとして有用である。本明細書中で使用される場合、「薬力学的マーカー」は、薬物の効果に特異的に関連する目的の生化学的マーカーである。薬力学的マーカーの存在または量は、薬物が投与される疾患の状態または障害には関連せず、それ故、このマーカーの存在または量は、被験体における薬物の存在または活性を示す。例えば、薬力学的マーカーは、生物学的組織における薬物の濃度を示し得、マーカーは、薬物のレベルに関連して、この組織の中で、発現するかもしくは転写されるか、または発現も転写もされないかのいずれかである。この様態において、薬物の分布または取込みは、薬力学的マーカーによってモニターされ得る。同様に、薬力学的マーカーの存在または量は、薬物の代謝生成物の存在または量に関連し得、その結果、マーカーの存在または量は、インビボでの薬物の相対的分解速度を示す。薬力学的マーカーは、薬物効果の検出の感度の増加において、特に薬物が低用量で投与される場合に、特に有益である。少量の薬物でさえ、マーカー（例えば48149マーカー）の転写または発現を、複数回活性化するために十分であり得るので、増幅されたマーカーは、薬物そのものよりも容易に検出可能な量で存在し得る。また、マーカーは、マーカーそのものの性質に起因してより容易に検出され得；例えば、本明細書中に記載される方法を使用して、抗48149抗体は、48149タンパク質マーカーのための免疫ベースの検出系において使用され得るか、または48149特異的放射標識プローブは、48149 mRNAマーカーを検出するために使用され得る。さらに、薬力学的マーカーの使用は、直接観測が可能な範囲を超える薬物処置に起因する危険性の機構ベースの予測を提供し得る。当該分野における薬力学的マーカーの使用の例としては、M a t s u d a ら、米国特許第6,033,862号；H a t t i s ら、（1991）Env. Health Perspect. 90:229-238；S c h e n t a g（1999）Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 補遺3:S21-S24；およびN i c o l a u（1999）Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 補遺3:S16-S20が挙げられる。

【0398】

本発明の48149分子はまた、薬理ゲノム学的 (pharmacogenomic) マーカーとして有用である。本明細書中で使用される場合、「薬力学的マーカー」は、被験体における特定の臨床的薬物応答または薬物感受性に関連する客観的な生物学的マーカーである (例えば、McLeodら、(1999) Eur. J. Cancer 35:1650-1652を参照のこと)。薬理ゲノム学的マーカーの存在または量は、薬物の投与前に、特定の薬物または薬物のクラスに対して予測される被験体の応答に関連する。被験体における1つ以上の薬理ゲノム学的マーカーの存在または量を評価することによって、被験体に対して最も適切であり、またはより大きな成功の程度を有すると予測される薬物療法が、選択され得る。例えば、被験体における特定の腫瘍マーカーに対する、RNAまたはタンパク質 (例えば、48149タンパク質またはRNA) の存在または量に基づいて、被験体中に存在する可能性のある特定の腫瘍の処置に対して最適化された、薬物または処置の過程が選択され得る。同様に、48149 DNAにおける特定の配列の変異の存在または非存在は、48149薬物応答に関連し得る。従って、薬理ゲノム学的マーカーの使用によって、治療を施与する必要なしに、各被験体に対して最も適切な治療の適用が可能になる。

【0399】

(薬学的組成物)

本発明の核酸およびポリペプチド、これらのフラグメント、ならびに抗48149抗体 (本明細書中では、「活性化合物」ともいわれる) は、薬学的組成物に組込まれ得る。このような組成物は、代表的には、核酸分子、タンパク質、または抗体および薬学的に受容可能なキャリアを包含する。本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。補充活性化合物はまた、組成物に組込まれ得る。

【0400】

薬学的組成物は、その意図される投与の経路に適合するように処方される。投与経路の例としては、非経口投与 (例えば、静脈投与、皮内投与、皮下投与)、経口 (例えば、吸入) 投与、経皮 (局所的) 投与、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用、または皮下適用に使用される溶液または懸濁物は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈液 (例えば、注射用の水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒)；抗菌剤 (例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン)；抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム)；キレート剤 (例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸)；緩衝液 (例えば、酢酸、クエン酸またはリン酸) および張度の調整のための薬剤 (例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース)。pHは、酸または塩基 (例えば、塩酸または水酸化ナトリウム) で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジまたはガラスもしくはプラスチック製の複数用量バイアル中に封入され得る。

【0401】

注射用途に適する薬学的組成物は、滅菌水溶液 (水溶性の場合) または滅菌分散物および滅菌注射可能な溶液または分散物の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアは、生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を含む。全ての場合において、組成物は、滅菌状態でなければならず、容易に注射可能である程度の流体であるべきである。この組成物は、製造および貯蔵の状態下で安定であるべきであり、細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、およびこれらの適切な混合物を含む溶媒または分散性媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング (例えば、レシチン) の使用、分散物の場合、必要な粒子径の維持および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤 (例えば、パラベ

ン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロザールなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール（*mannitol*）、ソルビトール）、塩化ナトリウム）を組成物中に含むことが好ましい。注射可能な組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、ステアリン酸モノアルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含有することによって、引き起こされる。

【0402】

滅菌注射可能な溶液は、上に列挙される成分の1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒中に、必要な量で活性な化合物を組込むことによって（必要な場合、その後、濾過滅菌することによって）調製され得る。一般的に、分散物は、基本分散媒体および上に列挙される成分からの他に必要とされる成分を含有する滅菌ビヒクルに、活性な化合物を組込むことによって調製される。滅菌注入可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これらは、前に濾過滅菌されたその溶液から、活性な成分および任意のさらに所望される成分の粉末を生じる。

10

【0403】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈物または食用キャリアを含む。経口治療投与の目的について、活性な化合物は、賦形剤に組込まれ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤（例えば、ゼラチンカプセル剤）の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての用途のための流体キャリアを使用して、調製され得る。薬学的に適合可能な結合剤および／またはアジュバント物質は、組成物の一部として含有され得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分または類似した性質の化合物のいずれかを含み得る：結合剤（例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、スターチまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸）、*Primogel*、またはコーンスターチ；潤沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたは*Sterote*）；流動促進剤（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味料（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香料（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、または、オレンジ香料）。

20

【0404】

吸入による投与について、化合物は、加圧された容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレーの形態で送達され、これは適切な噴射体（例えば、二酸化炭素のような気体）、または噴霧器を備える。

30

【0405】

全身投与はまた、経粘膜的手段または経皮的手段によってであり得る。経粘膜的投与または経皮的投与について、浸透されるべき障害に適切な浸透剤は、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に当該分野で公知であり、例えば、経粘膜的投与のための界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜的投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成され得る。経皮的投与について、活性な化合物は、当該分野で一般的に公知のものとして、軟膏（*ointment*）、軟膏剤（*salve*）、ゲル、またはクリーム中に処方される。

【0406】

化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、従来の坐剤基剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド）を有する）または停留浣腸の形態で調製され得る。

40

【0407】

1つの実施形態において、活性な化合物は、キャリアと共に調製され、このキャリアは、身体からの迅速な除去に対して化合物を保護し、例えば、徐放性処方物（移植片および微小カプセル化送達系を含む）である。生体分解性、生体適合性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。このような処方物の調製方法は、当業者に明らかである。これらの材料はまた、*Alza Corporation*および*Nova Pharmaceuticals, Inc.* から市販入手され得る。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する感染細胞に対して標的化されたりポソ

50

ムを含む) はまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第 4, 522, 811 号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【0408】

投与の容易さおよび投薬量の一様性のために、単位投薬形態での経口的組成物または非経口的組成物を処方することは有利である。本明細書中で使用される場合、単位投薬形態は、処置される被験体に対する単位投薬量として適切な、物理的に別個の単位をいい；各単位は、必要な薬学的なキャリアに関連する所望の治療効果を生成するように計算された所定の量の活性な化合物を含む。

【0409】

このような化合物の毒性および治療効率は、例えば、LD50（集団の50%に対して致死である用量）およびED50（集団の50%における治療有効用量）を決定することについて、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、そしてこの比は、比LD50/ED50として示され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物が使用され得る一方で、非感染細胞に対する潜在的な傷害を最小化するための罹患組織の部位にこのような化合物を標的化する送達システムを設計するために配慮し、それによって副作用を減少するべきである。

【0410】

細胞培養物アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける用途のための投薬量範囲を処方することにおいて使用され得る。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんどかまたは全く有さずに、ED50を含む循環濃度の範囲内に入る。投薬量は、使用される用量形態または使用される投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから見積もられ得る。用量は、動物モデルにおいて処方され得、細胞培養物において決定されるIC50（すなわち、症状の最高阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成する。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

【0411】

本明細書中に定義される場合、治療有効量のタンパク質またはポリペプチド（すなわち、有効投薬量）は、約0.001~30mg/体重1kg、好ましくは約0.01~25mg/体重1kg、より好ましくは約0.1~20mg/体重1kg、およびさらにより好ましくは約1~10mg/体重1kg、2~9mg/体重1kg、3~8mg/体重1kg、4~7mg/体重1kg、または5~6mg/体重1kgの範囲にある。このタンパク質またはポリペプチドは、1週間に1回、約1~10週間の間、好ましくは2~8週間の間、より好ましくは3~7週間、およびさらにより好ましくは約4、5または6週間投与され得る。当業者は、特定の因子が、効率的に被験体を処置するために必要な投薬量およびタイミングに影響し得、これらの因子としては、疾患または障害の重篤度、以前の処置、一般的な健康状態および/または被験体の年齢、ならびに他に存在する疾患が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体での被験体の処置は、単一処置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み得る。

【0412】

抗体について、好ましい投薬量は、0.1mg/体重1kg（一般的に、10mg/kg~20mg/kg）である。抗体が脳において作用する場合、50mg/kg~100mg/kgの投薬量が、通常適切である。一般的に、部分的なヒト抗体および完全なヒト抗体は、人体内で他の抗体より長い半減期を有する。従って、より低い投薬量およびより少ない投与頻度は、しばしば可能である。改変（例えば、脂質化）は、抗体を安定化させ、そして取り込みおよび組織貫通（例えば、脳への）を強化するために使用され得る。抗

10

20

30

40

50

体の脂質化のための方法は、Cruikshankら、((1997) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193)によって記載される。

【0413】

本発明は、発現または活性を調節する薬剤を包含する。薬剤は、例えば低分子であり得る。例えば、このような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物（例えば、ペプトイド）、アミノ酸、アミノ酸類似物、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似物、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似物、1モル当たり約10,000gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、1モル当たり約5,000gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物、1モル当たり約1,000gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物、1モル当たり約500gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に受容可能な形態が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0414】

例示的な用量は、被験体1kgまたはサンプル重量1kg当たりの低分子のミリグラム量またはマイクログラム量を含む（例えば、約1μg/kg～約500mg/kg、約100μg/kg～約5mg/kg、約1μg～約50μg/kg）。さらに、低分子の適切な用量は、調節されるべき発現または活性という点で低分子の有効性に依存する。1つ以上のこれらの低分子が本発明のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するために動物（例えば、ヒト）に投与される場合、医師、獣医師、または研究者は、例えば、まず相対的に低い用量を、続いて適切な応答が得られるまで漸増量の用量を処方し得る。さらに、任意の特定の動物被験体に対する特定の用量レベルが、使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、体重、一般的健康状態、性別、および食事、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物の組み合わせ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む種々の因子に依存することが理解される。

20

【0415】

抗体（またはそのフラグメント）は、治療部分（例えば、細胞毒、治療剤または放射性イオン）に結合体化され得る。細胞毒または細胞毒性剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、メイタンシノイド（例えば、メイタンシノール（米国特許第5,208,020号を参照のこと）、CC-1065（米国特許第5,475,092号、同第5,585,499号、同第5,846,545号を参照のこと）およびこれらの類似物質またはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトキサレート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）クロラムブシル、CC-1065、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾシン（streptozotocin）、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および抗分裂薬剤（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソールおよびメイタンシノイド）が挙げられるがこれらに限定されない。放射性イオンとしては、ヨウ素、イットリウム、およびプラセオジウムが挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

50

【0416】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を調節するために使用され得、薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定するように解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所定の生物学的応答を保持するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、トキシン（例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリアトキシン）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子；または生物学的応答変更因子（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、あるいは他の増殖因子が挙げられ得る。

【0417】

あるいは、抗体は、二次抗体と結合され、Segal（米国特許第4,676,980号）によって記載されるような抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

【0418】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され、遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）または定位注射（例えば、Chenら、（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057を参照のこと）によって、被験体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる徐放マトリクスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞（例えば、レトロウイルスベクター）からインタクトで産生され得る場合、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含み得る。

【0419】

薬学的組成物は、投与のための指示書と共に容器、パック、またはディスペンサー中に含まれ得る。

【0420】

（治療方法）

本発明は、障害の危険性（またはそれに対して感受性である）被験体あるいは異常型または望まれない48149の発現または活性に関連する障害を有する被験体を処置する予防法または治療法の両方を提供する。本明細書中に使用される場合、用語「治療」は、患者に対する治療剤の適用または投与、患者から単離された組織または細胞株に対する治療剤の適用または投与として定義され、この患者は、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を有し、この目的は、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を、治療、回復、緩和、軽減、改変、矯正、好転、改善または作用することである。治療剤としては、低分子、ペプチド、抗体、リボザイムおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0421】

処置の予防法および治療法の両方に関して、このような処置は、薬理ゲノム学の分野から得られる知識に基づいて、特異的に合わせられるか（tailor）または改変され得る。本明細書中で使用される場合、「薬理ゲノム学」は、ゲノム技術（例えば、遺伝子配列決定）、統計遺伝学、および臨床的開発および市場においての薬物に対する遺伝子発現分析の適用をいう。より具体的には、この用語は、患者の遺伝子が薬物に対する彼または彼女の応答（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）をどのように決定するかの研究をいう。従って、本発明の別の局面は、個体の薬物応答遺伝子型に従う、本発明の48149分子または48149調節因子のいずれかでの個々の予防処置または治療処置を合わせるための方法を提供する。薬理ゲノム学は、臨床医または医師が、最も治療の恩恵を受ける患者に対する予防処置または治療処置を導き得、そして毒性薬物関連副作用を受ける患者の処置を避け得るようにする。

【0422】

1つの局面において、本発明は、48149または48149発現または少なくとも1つの48149活性を調節する薬剤を被験体に投与することによって、患者における異常なまたは望まれない48149の発現または活性に関連する疾患または状態を予防する方法を提供する。異常なまたは望まれない48149の発現または活性によって引き起こされるまたはそれに起因する疾患に対する危険性にある被験体は、例えば、本明細書中に記載されるような診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたは組み合わせによって同定され得る。予防剤の投与は、48149異常型の症状特性の発症の前に生じ得、その結果、疾患または障害は、予防されるか、あるいは、その進行が遅延される。48149の異常型（例えば、48149、48149アゴニストまたは48149アンタゴニスト）の型に依存することは、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。

【0423】

いくつかの48149障害は、異常なレベルの遺伝子産物または異常な活性を示す遺伝子産物の存在によって、少なくとも部分的に引き起こされ得る。このようにして、このような遺伝子産物のレベルおよび／または活性の減少は、障害の症状の改善を引き起こす。

【0424】

48149分子は、心臓血管障害または腺維組織の肝臓中で蓄積に関連する障害を制御するための新規の診断的標的および治療剤として作用し得る。さらに、48149分子は、特定のウイルス疾患（B型肝炎、C型肝炎、および単純ヘルペスウイルス（HSV）が挙げられるが、これらに限定されない）の病因において重要な役割を果たし得る。48149活性の調節因子は、ウイルス疾患を制御するために使用され得る。この調節因子は、ウイルス感染組織またはウイルス関連組織線維症（特に、肝臓および肝臓線維症）の処置および／または診断において使用され得る。また、48149調節因子は、ウイルス関連癌腫（特に、肝細胞癌）の処置および／または診断において使用され得る。

【0425】

添付される実施例に記載されるように、48149 mRNAの発現は、多数の腫瘍サンプル（胸部腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、および頸部腫瘍が挙げられる）ならびに腫瘍が誘導された正常組織において検出された。48149の発現は、正常胸部組織および正常結腸組織と比較して、それぞれ、胸部腫瘍および結腸腫瘍において減少される傾向にあった。対照的に、48149 mRNAの発現は、正常卵巣組織と比較して、試験された全ての卵巣腫瘍において増大された。従って、48149分子は、48149遺伝子が、例えば、胸部、卵巣、肺、結腸および頸部の癌または非悪性の障害に発現される任意の前述の異常な活性に関する障害を制御するための新規の診断標的および治療剤として作用し得る。

【0426】

議論されるように、48149障害の首尾よい処置は、標的遺伝子産物の発現または活性を阻害する役目を果たす技術によって、もたらされ得る。例えば、ネガティブな調節性活性を示すことが証明されている化合物（例えば、上記のアッセイを使用して同定される因子）が、本発明に従って使用され、48149障害の症状を予防および／または改善し得る。このような分子としては、以下が挙げられ得るがこれらに限定されない：ペプチド、ホスホペプチド、有機低分子または無機低分子、あるいは抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、または単鎖抗体、ならびにFab、F(ab')₂およびFab発現ライブラリーフラグメント、scFV分子、ならびにそれらのエピトープ結合フラグメントを含む）。

【0427】

さらに、標的遺伝子の発現を阻害するアンチセンス分子およびリボザイム分子もまた、本発明に従って使用され、標的遺伝子発現レベルを低下させ得、それによって、標的遺伝子活性レベルは、効果的に減少される。なおさらに、三重らせん分子が、標的遺伝子活性レベルを低下させる際に利用され得る。アンチセンス分子、リボザイム分子および三重ら

せん分子は、上で議論されている。

【0428】

変異体遺伝子発現を低下または阻害するための、アンチセンス分子、リボザイム分子および／または三重らせん分子の使用もまた、正常な標的遺伝子の対立遺伝子によって産生されるmRNAの転写（三重らせん）および／または翻訳（アンチセンス、リボザイム）を低下または阻害し得、その結果、存在する正常な標的遺伝子産物の濃度が、正常な表現型で必要とされる濃度よりも低くあり得る可能性がある。このような場合、正常な標的遺伝子活性を示す標的遺伝子ポリペプチドをコードおよび発現する核酸分子は、遺伝子治療法によって、細胞に導入され得る。あるいは、この標的遺伝子が細胞外タンパク質をコードする例において、正常な標的遺伝子タンパク質を、細胞または組織に同時に投与して、

10

【0429】

核酸分子が、48149発現によって特徴付けられる疾患を処置または予防する際に利用され得る別の方法は、48149タンパク質に特異的なアプタマー分子の使用を介する。アプタマーは、三次構造を有する核酸分子であり、これは、タンパク質リガンドに特異的に結合し得る（例えば、Osborneら、(1997) Curr. Opin. Chem Biol. 1:5-9; および Patel, D. J. (1997) Curr Opin Chem Biol 1:32-46を参照のこと）。核酸分子は、多くの場合において、治療タンパク質分子が標的細胞に導入され得るよりも、より簡便に標的細胞に導入

20

【0430】

標的遺伝子産物に特異的であり、かつ標的遺伝子産物活性を低下させる抗体が、作製され得る。従って、このような抗体は、ネガティブな調節技術が、48149障害の処置に適している場合に投与され得る。抗体の記載については、上記の抗体の節を参照のこと。

【0431】

抗体産生を刺激するために、48149タンパク質またはエピトープで、動物またはヒト被験体を注射することが、被験体に対して有害である環境下において、抗イディオタイプ抗体の使用によって、48149に対する免疫応答を生じさせることが可能である（例えば、Herlyn, D. (1999) Ann Med 31:66-78; ならびに Bhattacharya-Chatterjee, M. および Foon, K. A. (1998) Cancer Treat Res. 94:51-68を参照のこと）。抗イディオタイプ抗体が哺乳動物またはヒト被験体に導入される場合、48149タンパク質に特異的であるべき、抗-抗イディオタイプ抗体の産生が刺激されるはずである。48149発現によって特徴付けられる疾患に対するワクチンもまた、この様式で作製され得る。

30

【0432】

標的抗原が細胞内であり、かつ全抗体が使用される例において、内部移行抗体が好ましくあり得る。リポフェクチンまたはリポソームを使用して、標的抗原を細胞内に結合するFab領域の抗体またはフラグメントを送達し得る。抗体のフラグメントが使用される場合、標的抗原に結合する最小の阻害性フラグメントが、好ましい。例えば、抗体のFv領域に対応するアミノ酸配列を有するペプチドが、使用され得る。あるいは、細胞内標的抗原に結合する一本鎖中和抗体もまた、投与され得る。このような一本鎖抗体は、例えば、標的細胞集団内の一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現させることによって、投与され得る（例えば、Marascoら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893を参照のこと）。

40

【0433】

標的遺伝子発現、合成および／または活性を阻害する、同定された化合物は、48149障害を予防、処置または回復するのに治療学的に有効な用量で、患者に投与され得る。治療学的に有効な用量とは、その障害の症状を回復させるのに十分な、化合物の量をいう

50

。このような化合物の毒性および治療効果は、上記のような標準的な薬理学的手順によって、決定され得る。

【0434】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投薬量範囲を処方する際に、使用され得る。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんど有さないかまたは全く有さない ED_{50} を含む循環濃度範囲内にある。投薬量は、用いられる投薬形態および用いられる投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療学的に有効な用量は、細胞培養アッセイから、最初に確立され得る。用量は、動物モデルにおいて処方され得、細胞培養物中で決定されるような IC_{50} （すなわち、症状の最大半減阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環プラズマ濃度範囲に達する。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定し得る。プラズマレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって、測定され得る。

【0435】

個体に対する有効な用量を決定する別の例は、試験被験体の血清中の「遊離」化合物および「結合」化合物のレベルを直接的にアッセイする能力である。このようなアッセイは、分子のインプリンティング技術によって作製される抗体模倣物および／または「バイオセンサ」を使用し得る。48149活性を調節し得る化合物は、テンプレート、または「インプリンティング分子」として使用され、この化合物の触媒試薬との重合化の前に、重合可能なモノマーを空間的に組織化する。インプリントされた分子のその後の除去は、化合物の繰り返し「ネガ (negative image)」を含むポリマーマトリクスを残し、そして生物学的アッセイ条件下で、分子に選択的に再結合することができる。この技術の詳細な総説は、Ansell, R. J. ら (1996) *Current Opinion in Biotechnology* 7: 89-94 および Shea, K. J. (1994) *Trends in Polymer Science* 2: 166-173 において参照され得る。このような「インプリントされた」アフィニティーマトリクスは、リガンド結合アッセイに適合し、これによって、固定化モノクローナル抗体の構成要素は、適切にインプリントされたマトリクスによって置き換えられる。この方法における、このようなマトリクスの使用の例は、Vlatakis, G. ら (1993) *Nature* 361: 645-647 において参照され得る。同位体標識の使用によって、48149の発現または活性を調節する化合物の「遊離」濃度は、容易にモニタリングされ得、そして IC_{50} の算出に使用され得る。

【0436】

このような「インプリントされた」アフィニティーマトリクスはまた、光子放射特性が標的化合物の局在性および選択的結合によって測定可能に変化する蛍光群を含むように設計され得る。これらの変化は、適切な光ファイバーデバイスを使用し、次いで、試験被験体における用量を、その個々の IC_{50} に基づいて迅速に最適化することによって、実時間で容易にアッセイされ得る。このような「バイオセンサ」の基本的な例は、Kriz, D. ら (1995) *Analytical Chemistry* 67: 2142-2144 において議論されている。

【0437】

本発明の別の局面は、治療目的のための、48149発現または活性を調節する方法に関する。従って、例示的な実施形態において、本発明の調節方法は、細胞を、48149またはこの細胞に関連する48149タンパク質活性の1つ以上の活性を調節する因子と接触させる工程を包含する。48149タンパク質活性を調節する因子は、本明細書中に記載されるような因子（例えば、核酸またはタンパク質、48149タンパク質の天然に存在する標的分子（例えば、48149基質またはレセプター）、48149抗体、48149アゴニストまたはアンタゴニスト、48149アゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド模倣物、または他の低分子）であり得る。

【0438】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、この因子は、1つ以上の48149活性を刺激する。このような刺激性因子の例としては、活性な48149タンパク質および48149をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この因子は、1つ以上の48149活性を阻害する。このような阻害因子の例としては、アンチセンス48149核酸分子、抗48149抗体、および48149インヒビターが挙げられる。これらの調節方法は、インビトロにおいてか（例えば、この因子とともに細胞を培養することによって）、またはインビボにおいて（例えば、この因子を被験体に投与することによって）行われ得る。このように、本発明は、48149タンパク質または核酸分子の、異常なまたは望ましくない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ている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、因子（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因子）、または48149発現もしくは活性を調節する（例えば、アップレギュレートするかまたはダウンレギュレートする）因子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、48149タンパク質または核酸分子を、低下した、異常なまたは望ましくない48149発現または活性を補償する治療として、投与する工程を包含する。

10

20

30

40

50

【0439】

48149活性の刺激は、48149が異常にダウンレギュレートする状況、および／または48149活性の増加が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。例えば、48149活性の刺激は、48149がダウンレギュレートする状況、および／または48149活性の増加が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。同様に、48149活性の阻害は、48149が異常にアップレギュレートする状況、および／または48149活性の低下が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。

【0440】

（薬理ゲノム学（*pharmacogenomics*））

本発明の48149分子、および因子、または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ような、48149活性（例えば、48149遺伝子発現）に対する刺激効果もしくは阻害効果を有するモジュレーターは、異常な48149活性または望ましくない48149活性に関連する障害（例えば、心臓血管障害（例えば、アテローム動脈硬化症）、代謝障害（例えば、肝臓の代謝障害）、または非好中球媒介炎症性障害））に関連する48149を（予防的にかまたは治療的に）処置するために、個体に投与され得る。このような処置とともに、薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と、外来性化合物もしくは薬物に対するその個体の応答との間の関係の研究）が、考慮され得る。治療の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血液濃度との間の関係を変更することによって、毒性または治療不全を与えるように導き得る。従って、医師または臨床医は、48149分子または48149モジュレーターを投与するか否かを決定し、そして48149分子または48149モジュレーターでの処置における、投薬量および／または治療レジメンを変更する際に、等価な薬理ゲノム学研究において得られた知識を考慮し得る。

【0441】

薬理ゲノム学は、変更された薬物配置および罹患した個人の異常な活性に起因する薬物に対する応答における、臨床学的に有意な遺伝的変異を処置する。例えば、Eichelbaum, M. ら、(1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23:983-985およびLinder, M. W. ら、(1997) Clin. Chem. 43:254-266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学条件は、異なり得る。遺伝的条件は、薬物が身体に作用する様式を変更する（変更された薬物作用）単一因子として普及したか、または遺伝的条件は、身体が薬物に作用する様式を変更する（変更された薬物代謝）単一因子として普及した。これらの薬理ゲノム学条件は、稀なゲノム欠損としてかまたは天然に存在する多型としてかの、いずれかとして生じ得る。例えば、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠損（G6PD）は、一般的な遺

伝性酵素病であり、ここで、主な臨床学的合併症は、酸化薬剤（抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0442】

「ゲノムワイドアソシエーション (genome-wide association)」として知られている、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための、1つの薬理ゲノム学アプローチは、すでに知られているゲノム関連マーカー（例えば、「二座対立遺伝子」ゲノムマーカーマップ（これは、60,000~100,000の多型またはヒトゲノム上の可変性部位からなり、これらの各々が、2つの改変体を有する））からなるヒトゲノムの高解像度マップに、主に依存する。このような高解像度ゲノムマップは、特定の観察された薬物応答または副作用に関連したマーカーを同定するために、第II期/第III期の薬物試行に参加した統計学的に有意な数の患者の各々のゲノムのマップと比較され得る。あるいは、このような高解像度マップは、ヒトゲノムにおいて、数億の公知の一塩基多型 (SNP) の組み合わせから生じ得る。本明細書中で使用される場合、「SNP」は、DNAの伸張において、単一ヌクレオチド塩基において生じる一般的な変更である。例えば、SNPは、DNAの1000塩基毎に1回起こる。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連し得ない。このようなSNPの発生に基づくゲノムマップが与えられると、個体は、個々のゲノムにおいて、SNPの特定のパターンに依存して、ゲノムのカテゴリーに分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、ゲノム学的に類似の個体の間で共通であり得る特性を考慮して、このようなゲノム学的に類似の個体の群に対して変更され得る。

10

20

【0443】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法は、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。この方法に従って、薬物の標的をコードする遺伝子が既知である場合（例えば、本発明の48149タンパク質）、その遺伝子の全ての共通の改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する1つの遺伝子バージョンが特定の応答に関連するか否かが決定され得る。

【0444】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。例えば、薬物（例えば、本発明の48149分子または48149モジュレーター）を投薬された動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路が変化するか否かの指標を与え得る。

30

【0445】

1より多い上記薬理ゲノム学アプローチから得られる情報を使用して、個体の予防的処置または治療的処置のための、適切な投薬量および処置レジメンを決定し得る。この知識は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害反応または治療不全を回避し得、それによって、48149分子または48149モジュレーター（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイのうちの1つによって同定されるモジュレーター）で被験体を処置する場合、治療効果または予防効果を増強させる。

【0446】

本発明はさらに、本発明の48149遺伝子の1つ以上によってコードされる遺伝子産物の1つ以上の活性を調節する因子の同定に基づく、新たな因子、または組み合わせを同定するための方法を提供し、ここで、これらの産物は、治療因子に対する細胞の耐性に関連し得る。詳細には、本発明の48149遺伝子によってコードされるタンパク質の活性は、因子の耐性を克服するために、因子を同定するための基礎として使用され得る。耐性タンパク質の1つ以上の活性をブロックすることによって、標的細胞（例えば、ヒト細胞）は、未改変標的細胞に耐性である因子を用いた処置に対して感受性になる。

40

【0447】

48149タンパク質の発現または活性に対する、因子（例えば、薬物）の影響のモニタリングが、臨床試験において適用され得る。例えば、48149遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートした48149活性を増加させるために、本明細書

50

中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される因子の効果は、48149遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートした48149活性の低下を示す被験体の臨床試験において、モニタリングされ得る。あるいは、48149遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートした48149活性を低下させるために、スクリーニングアッセイによって決定される因子の効果は、48149遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートした48149活性の増加を示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。このような臨床試験において、48149遺伝子の発現または活性、好ましくは、例えば、48149関連障害に参与している他の遺伝子の発現または活性は、「読み出し (read out)」または特定の細胞の表現型のマーカーとして、使用され得る。

10

【0448】

(48149情報科学)

48149分子の配列は、その使用を容易にするように、種々の媒体において提供される。配列は、単離された核酸分子またはアミノ酸分子ではなく、製品(48149を含む)として提供され得る。このような製品は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列(例えば、オープンリーディングフレーム)を、天然においてかまたは精製された形態で存在している場合、ヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列、またはそれらのサブセットを試験するのに直接的に適用可能ではない手段を使用した製造試験を可能にする形態で、提供し得る。この配列情報はまた、48149全長ヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列、部分的なヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列、多型配列(一塩基多型を含む(SNP))、エピトープ配列などを含み得るがこれらに限定されない。好ましい実施形態において、この製品は、機械読み取り可能な媒体(例えば、磁気情報記憶デバイス、光学情報記憶デバイス、化学情報記憶デバイスまたは機械情報記憶デバイス)である。

20

【0449】

本明細書中で使用される場合、「機械読み取り可能な媒体」とは、機械(例えば、デジタルコンピューターまたはアナログコンピューター)によって直接的に読み取りおよびアクセスされ得る、任意の媒体をいう。コンピューターの非限定的な例としては、デスクトップPC、ラップトップ、メインフレーム、サーバ(例えば、ウェブサーバ、ネットワークサーバ、またはサーバファーム(server farm))、ハンドホールドデジタルアシスタント、ページャー、携帯電話などが挙げられる。コンピューターは、スタンドアローン型であり得るか、またはコミュニケーションネットワーク(例えば、ローカルエリアネットワーク(例えば、VPNまたはイントラネット))、ワイドエリアネットワーク(例えば、ExtranetまたはInternet)、またはテレホンネットワーク(例えば、ワイヤレス、DSL、またはISDNネットワーク)に接続され得る。機械読み取り可能な媒体としては、以下が挙げられるがこれらの限定されない: 磁気記憶媒体(例えば、フロッピー(登録商標)ディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ); 光学記憶媒体(例えば、CD-ROM); 電子記憶媒体(例えば、RAM、ROM、EPROM、EEPROM、フラッシュメモリなど); およびこれらの分類のハイブリッド(例えば、磁気/光学記憶媒体)。

30

【0450】

種々のデータ記憶構造体は、本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を記憶する機械読み取り可能な媒体を作製する当業者に利用可能である。データ記憶構造体の選択は、一般に、記憶情報にアクセスするように選択される手段に基づく。さらに、種々のデータプロセッサプログラムおよびフォーマットを使用して、本発明のヌクレオチド配列情報をコンピューター読み取り可能な媒体に記憶し得る。配列情報は、市販のソフトウェア(例えば、WordPerfectおよびMicrosoft Word)にフォーマットされた、ワードプロセッシングテキストファイルに表示され得るか、またはデータベース適用(DB2、Sybase、Oracleなど)に記憶されたASCIIファイルの形態で表示され得る。当業者は、データプロセッサ構造フォーマット(例えば、テキストファイルまたはデータベース)の任意の数を容易に適用して、本発明のヌクレオチド配列情報

40

50

を記憶するコンピューター読み取り可能な媒体を獲得し得る。

【0451】

好ましい実施形態において、配列情報は、リレーショナルデータベース（例えば、SybaseまたはOracle）に記憶される。このデータベースは、配列（核酸配列および／またはアミノ酸配列）情報を記憶するための第一のテーブルを有し得る。この配列情報は、テーブルの列の1つの領域（例えば、第一欄）に記憶され得、そしてその配列についての識別子は、テーブルの列の別の領域（例えば、第二欄）に記憶され得る。このデータベースは、第二のテーブル（例えば、記憶アノテーション（annotation））を有し得る。第二のテーブルは、配列識別子についての領域、記述子についての領域、またはアノテーションテキストを有し得る（例えば、記述子は、配列の機能性、アノテーションが参照する配列における初期の位置についての領域、およびアノテーションが参照する配列における最終的な位置についての領域をいう）。核酸配列に対するアノテーションについての非限定的な例としては、多型（例えば、SNP）翻訳調節部位およびスプライス接合部が挙げられる。アミノ酸配列に対するアノテーションについての非限定的な例としては、ポリペプチドドメイン（例えば、本明細書中に記載されるドメイン）；活性部位および他の官能性アミノ酸；ならびに改変部位が挙げられる。

【0452】

コンピューター読み取り可能な形態の、本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を提供することによって、当業者は、種々の目的についての配列情報に慣習的にアクセスし得る。例えば、当業者は、コンピューター読み取り可能な形態の本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を使用して、標的配列または標的構造モチーフを、データ記憶手段内に記憶された配列情報と比較し得る。検索を使用して、特定の標的配列または標的モチーフに一致する、本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。この検索は、BLAST検索または他の慣用的な配列比較（本明細書中に記載される検索）であり得る。

【0453】

従って、1つの局面において、本発明は、48149を分析する方法（例えば、構造、機能、または1種以上の他の核酸配列もしくはアミノ酸配列に対する関連性を分析する方法）を特徴に持つ。本発明は、以下の工程を包含する：48149核酸配列またはアミノ酸配列を提供する工程；48149配列を第二の配列（例えば、配列の集合（例えば、核酸配列データまたはタンパク質配列データ）由来の、1つ以上、好ましくは、複数の配列）と比較して、それによって48149を分析する工程。この方法は、機械（例えば、コンピューター）においてかまたは当業者によって手動で、行われ得る。

【0454】

この方法は、48149配列とデータベースの配列との間の配列同一性を評価する工程を包含する。この方法は、第二のサイトにおいて、例えば、Internetを通じて、データベースにアクセスすることによって、行われ得る。

【0455】

本明細書中で使用される場合、「標的配列」は、6つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸の、DNA配列またはアミノ酸配列のいずれかであり得る。当業者は、標的配列が長くなれば、標的配列が、データベースにおいてランダムな発生率として表されないようであることを、容易に認識し得る。標的配列の代表的な配列長は、約10～100アミノ酸であるか、または約30～300ヌクレオチド残基である。しかし、商業的に重要なフラグメント（例えば、遺伝子発現およびタンパク質プロセッシングに関与する、配列フラグメント）は、より短い長さのフラグメントであり得ることが十分認識されている。

【0456】

コンピューターソフトウェアは、公的に利用可能であり、これにより、当業者は、分析および他の配列との比較のために、コンピューター読み取り可能な媒体に提供された配列情報にアクセスすることができる。種々の公知のアルゴリズムは、公開されており、そして検索手段を行うための種々の市販のソフトウェアが、本発明のコンピューターベースのシステムにおいて使用されており、そして使用され得る。このようなソフトウェアの例と

しては、Mac Pattern (EMBL)、BLASTNおよびBLASTX (NCBI) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0457】

従って、本発明は、48149配列の配列のコンピューター読み取り可能な記憶を行う方法の特徴とし、この方法は、コンピューター読み取り可能なマトリクスに配列を記憶させる工程を包含する。好ましい実施形態において、この記憶は、以下の1つ以上を含む：ORFの同定；ドメイン、領域、または部位の同定；転写の開始の同定；転写ターミネーターの同定；タンパク質の全長アミノ酸配列；またはそれらの成熟形態；翻訳領域の5'末端。

【0458】

別の局面において、本発明は、配列を分析する方法の特徴とする。この方法は、48149配列、または記録を、機械読み取り可能な形態で提供する工程；第二の配列を48149配列と比較する工程；それによって、配列を分析する工程、を包含する、比較は、配列同一性について配列を比較する工程、または1つの配列が他の配列内に含まれるか否かを決定する工程（例えば、48149配列が比較された配列を含むか否かを決定する工程）を包含する。好ましい実施形態において、48149配列または第二の配列は、例えば、第一のサイトにて、第一のコンピューターに記憶され、そして比較が行なわれ、読み取られるか、または例えば、第二のサイトにて、第二のコンピューターに記憶される。例えば、48149配列または第二の配列は、1つのコンピューターにおいて、公的なデータベースまたは特許データベースに記録され得、そして比較の結果が行われ、読み取られるか、または第二のコンピューターに記憶される。好ましい実施形態において、この記憶は、以下の1つ以上を含む：ORFの同定；ドメイン、領域、または部位の同定；転写の開始の同定；転写ターミネーターの同定；タンパク質の全長アミノ酸配列、またはそれらの成熟形態；翻訳領域の5'末端。

【0459】

別の局面において、本発明は、被験体が48149関連疾患または48149関連障害、あるいは48149関連疾患または48149関連障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を実施するための命令を保持する、機械読み取り可能な媒体を提供し、ここで、この方法は、被験体に関連する48149配列情報を決定する工程、および48149配列情報に基づいて、被験体が48149関連疾患または48149関連障害、あるいは48149関連疾患または48149関連障害の素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいはこの疾患、障害または素因の状態について、特定の処置を推奨する工程、を包含する。

【0460】

本発明はさらに、電子システムおよび／またはネットワークにおいて、被験体が48149関連疾患もしくは障害、または48149関連疾患に対する素因を有するか否かを決定する方法を提供し、ここで、この方法は、被験体に関する48149配列情報を決定する工程、そして48149配列情報に基づいて、被験体が48149関連疾患もしくは障害、または48149関連疾患もしくは障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、および／あるいは疾患、障害または素因の状態について特定の処置を推奨する工程を包含する。好ましい実施形態において、この方法はさらに、被験体に関する情報（例えば、表現型情報または遺伝子型情報）を入手する工程、および／または被験体に関する表現型情報をネットワークから得る方法を包含する。この方法は、データベース（例えば、リレーショナルデータベース）に蓄積され得る。別の実施形態において、この方法はさらに、データベース（例えば、他の被験体に関する記録について）を評価する工程、この被験体の48149配列をデータベース中の48149配列と比較し、これによりこの被験体が48149関連疾患または48149関連障害であるか否か、あるいは48149関連疾患または48149に関連する障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、を包含する。

【0461】

本発明はまた、被験体が４８１４９関連疾患または４８１４９関連障害を有するか否かあるいはこのような素因を有するか否かを決定するための方法を、ネットワークで提供し、本方法は、この被験体から４８１４９配列情報および／もしくはそれに関する情報を受ける工程、この被験体に関する表現型情報を受ける工程、４８１４９に対応するネットワークおよび／または４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害（例えば、心臓血管障害（例えば、アテローム動脈硬化症）、代謝障害（例えば、肝臓の代謝障害）、または非好中球媒介炎症性障害）に対応するネットワークから情報を入手する工程、そして、１つ以上の表現型情報、４８１４９情報（例えば、配列情報および／またはそれに関連する情報）、および入手された情報に基いて、この被験体が４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害を有するか否かまたは４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、を包含する。本方法はさらに、疾患状態、障害状態または疾患前状態に対する特定の処置を推奨する工程を包含する。

10

【０４６２】

本発明はまた、被験体が４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害を有するか否かまたは４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、本方法は、４８１４９に関連する情報を受ける工程（例えば、配列情報および／またはそれに関連する情報）、被験体に関する表現型情報を受ける工程、４８１４９に関連するネットワークおよび／または４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害に関連するネットワークから情報を入手する工程、そして表現型情報、４８１４９情報および入手した情報に基いて、この被験体が４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害を有するか否かまたは４８１４９関連疾患もしくは４８１４９関連障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、を包含する。本方法はさらに、疾患状態、障害状態または疾患前状態に対する特定の処置を推奨する工程を包含する。

20

【０４６３】

本発明はさらに、限定と解釈されるべきではない以下の実施例によって例示される。本出願を通して引用される全ての参考文献、特許および公開された特許出願は、本明細書中に参考として援用される。

【実施例】**【０４６４】**

（実施例１：ヒト４８１４９ cDNA の同定および特徴付け）

30

ヒト４８１４９核酸配列を、以下に記載する：

【０４６５】

【化 1 - 1】

TAATTTTTGCCCAGTCTGCCTGTTGTGGGGCTCCTCCCCTTTGGGGATATAAGCCCGGCC
TGGGGCTGCTCCGTTCTCTGCCTGGCCTGAGGCTCCCTGAGCCGCCTCCCCACCATCACC
ATGGCCAAGGGCTTCTATATTTCCAAGTCCCTGGGCATCCTGGGGATCCTCCTGGGCGTG
GCAGCCGTGTGCACAATCATCGCACTGTCAGTGGTGTACTCCCAGGAGAAGAACAAGAAC
GCCAACAGCTCCCCCGTGGCCTCCACCACCCCGTCCGCCTCAGCCACCACCAACCCCGCC
TCGGCCACCACCTTGGACCAAAGTAAAGCGTGGAATCGTTACCGCCTCCCCAACACGCTG
AAACCCGATTCTTACCAGGTGACGCTGAGACCGTACCTCACCCCCAATGACAGGGGCGCTG
TACGTTTTTAAGGGCTCCAGCACCGTCCGTTTCACCTGCAAGGAGGCCACTGACGTCATC
ATCATCCACAGCAAGAAGCTCAACTACACCCCTCAGCCAGGGGCACAGGGTGGTCCTGCGT
GGTGTGGGAGGCTCCCAGCCCCCGACATTGACAAGACTGAGCTGGTGGAGCCACCGAG
TACCTGGTGGTGCACCTCAAGGGCTCCCTGGTGAAGGACAGCCAGTATGAGATGGACAGC
GAGTTCGAGGGGAGTTGGCAGATGACCTGGCGGGCTTCTACCGCAGCGAGTACATGGAG
GGCAATGTCAGAAAGGTGGTGGCCACTACACAGATGCAGGCTGCAGATGCCCGGAAGTCC
TTCCCATGCTTCGATGAGCCGGCCATGAAGGCCGAGTTCAACATCACGCTTATCCACCCC
AAGGACCTGACAGCCCTGTCCAACATGCTTCCCAAAGGTCCCAGCACCCCACTTCCAGAA
GACCCCAACTGGAATGTCACTGAGTTCCACACCACGCCCAAGATGTCCACGTACTTGCTG
GCCTTCATTGTCACTGAGTTCGACTACGTGGAGAAGCAGGCATCCAATGGTGTCTTGATC
CGGATCTGGGCCCCGGCCAGTGCCATTGCGGCGGGCCACGGCGATTATGCCCTGAACGTG
ACGGGCCCCATCCTTAACCTCTTTGCTGGTCATTATGACACACCCCTACCCACTCCCCAAA
TCAGACCAGATTGGCCTGCCAGACTTCAACGCCGGCGCCATGGAGAACTGGGGACTGGTG
ACCTACCGGGAGAACTCCCTGCTGTTTCGACCCCTGTCTCCTCCAGCAGCAACAAGGAG
CGGGTGGTCACTGTGATTGCTCATGAGCTGGCCCACCAGTGGTTTCGGGAACCTGGTGACC
ATAGAGTGGTGGAAATGACCTGTGGCTGAACGAGGGCTTCGCCTCCTACGTGGAGTACCTG
GGTGCTGACTATGCGGAGCCCACCTGGAACCTTGAAAGACCTCATGGTGCTGAATGATGTG
TACCGCGTGATGGCAGTGGATGCACTGGCCTCCTCCCACCCGCTGTCCACACCCGCCTCG
GAGATCAACACGCCGGCCAGATCAGTGAGCTGTTTGACGCCATCTCCTACAGCAAGGGC
GCCTCAGTCCTCAGGATGCTCTCCAGCTTCTGTCCGAGGACGTATTCAAGCAGGGCCTG
GCGTCTTACCTCCACACCTTTGCCTACCAGAACACCATCTACCTGAACCTGTGGGACCAC
CTGCAGGAGGCTGTGAACAACCGGTCCATCCAACCTCCCCACCACCGTGCGGGACATCATG
AACCGCTGGACCTGCAGATGGGCTTCCCGGTCATCACGGTGGATACCAGCACGGGGACC
CTTTCCCAGGAGCACTTCCTCCTTGACCCCGATTCCAATGTTACCCGCCCCCTCAGAATTC
AACTACGTGTGGATTGTGCCCATCACATCCATCAGAGATGGCAGACAGCAGCAGGACTAC
TGGCTGATAGATGTAAGAGCCCAGAACGATCTCTTCAGCACATCAGGCAATGAGTGGGTC

10

20

30

40

【 0 4 6 6 】

【化 1 - 2】

CTGCTGAACCTCAATGTGACGGGCTATTACCGGGTGAACCTACGACGAAGAGAACTGGAGG
 AAGATTCAGACTCAGCTGCAGAGAGACCACTCGGCCATCCCTGTCATCAATCGGGCACAG
 ATCATTAATGACGCCTTCAACCTGGCCAGTGCCCATAAAGTCCCTGTCACTCTGGCGCTG
 AACAAACACCTCTTCTGATTGAAGAGAGACAGTACATGCCCTGGGAGGCCGCCCTGAGC
 AGCCTGAGCTACTTCAAGCTCATGTTTGACCGCTCCGAGGTCTATGGCCCCATGAAGAAC
 TACCTGAAGAAGCAGGTACACCCCTCTTCATTCACTTCAGAAATAATACCAACAACCTGG
 AGGGAGATCCCAGAAAACCTGATGGACCAGTACAGCGAGGTTAATGCCATCAGCACCGCC
 TGCTCCAACGGAGTTCCAGAGTGTGAGGAGATGGTCTCTGGCCTTTTCAAGCAGTGGATG
 GAGAACCCCAATAATAACCCGATCCACCCCAACCTGCGGTCCACCGTCTACTGCAACGCT
 ATCGCCCAGGGCGGGGAGGAGGAGTGGGACTTCGCCTGGGAGCAGTTCCGAAATGCCACA
 CTGGTCAATGAGGCTGACAAGCTCCGGGCAGCCCTGGCCTGCAGCAAAGAGTTGTGGATC
 CTGAACAGGTACCTGAGCTACACCCTGAACCCGGACTTAATCCGGAAGCAGGACGCCACC
 TCTACCATCATCAGCATTACCAACAACGTCATTGGGCAAGGTCTGGTCTGGGACTTTGTGTC
 CAGAGCAACTGGAAGAAGCTTTTTTAACGATTATGGTGGTGGCTCGTTCTCCTTCTCCAAC
 CTCATCCAGGCAGTGACACGACGATTCTCCACCGAGTATGAGCTGCAGCAGCTGGAGCAG
 TTCAAGAAGGACAACGAGGAAACAGGCTTCGGCTCAGGCACCCGGGCCCTGGAGCAAGCC
 CTGGAGAAGACGAAAGCCAACATCAAGTGGGTGAAGGAGAACAAGGAGGTGGTGCTCCAG
 TGGTTTACAGAAAACAGCAAATAGCCCCAGCCCTTGAAGTACCCGGCCCCGATGCAAG
 GTGCCCACATGTGTCCATCCCAGCGGCTGGTGCAGGGCCTCCATTCTTGGAGCCCGAGGC
 ACCAGTGTCTCTCCCTCAAGGACAAAGTCTCCAGCCACGTCTCTCTGCTGTGAGCCA
 GTCTAGTTCTCTGATGACCCAGGCTGCCTGAGCACCTCCAGCCCTGCCCTCATGCCAA
 CCCC GCCCTAGGCCTGGCATGGCACCTGTCGCCCAGTGCCCTGGGGCTGATCTCAGGGAA
 GCCCAGCTCCAGGGCCAGATGAGCAGAAGCTCTCGATGGACAATGAACGGCCTTGCTGGG
 GGCCGCCCTGTACCCTCTTTTACCTTTCCCTAAAGACCCTAAATCTGAGGAATCAACAGG
 GCAGCAGATCTGTATATTTTTTTCTAAGAGAAAATGTAAATAAAGGATTTCTAGATGAAA
 AAAAAAAAAAAAAA (配列番号 1).

10

20

30

ヒト 4 8 1 4 9 配列 (配列番号 1) は、約 3 4 9 4 ヌクレオチド長である。この核酸配列は、開始コドン (A T G) および終止コドン (T A G) を含み、上記においてこれらに下線を付す。開始コドンと終止コドンとの間およびそれらを含む領域は、約 2 9 0 4 ヌクレオチドのメチオニンで開始されるコード配列であり、終止コドン (配列番号 1 ; 配列番号 3 の「コード (c o d i n g) 」と示されるヌクレオチド) を含む。このコード配列は、9 6 7 アミノ酸のタンパク質 (配列番号 2) をコードし、これを以下に記載する：

【 0 4 6 7 】

【化 2 - 1】

MAKGFYISKSLGILGILLGVAAVCTIIALSVMVYSQEKKNANSSPVASTTPSASATTNPA
 SATTLDDQSKAWNRYRLPNTLKPDSYQVTLRPYLTPNDRGLYVFKGSSTVRFTCKEATDVI
 IHSKKLNYTLSQGHRVVLRGVGGSQPPDIDKTELVEPTEYLVVHLKGSVLKDSQYEMDS
 EFEGELADDLAGFYRSEYMEGNVRKVVATTQMQAADARKSFPCFDEPAMKAEFNITLIHP

40

【 0 4 6 8 】

【化 2 - 2】

KDLTALSNMLPKGPSTPLPEDPNWNVTEFHTTPKMSTYLLAFIVSEFDYVEKQASNGVLI
RIWARPSAIAAGHGDYALNVTGPILNFFAGHYDTPYPLPKSDQIGLPDFNAGAMENWGLV
TYRENSLLFDPLSSSSSNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTIEWWDLWLNEGFASYVEYL
GADYAEPTWNKDLMLVNDVYRVMVDALASSHPLSTPASEINTPAQISELFDALISYSKG
ASVLRMLSSFLSEDFVKQGLASYLHTFAYQNTIYLNLDHLEAVNNRSIQLPTTVRDIM
NRWTLQMGFPVITVDTSTGTLSQEHFLDPDSNVTRPSEFNYYVWIVPITSIRDGRQQQDY
WLIDVRAQNDLFSTSGNEWVLLNLTGYYRVNYDEENWRKIQTQLQRDHSAPVINRAQ
IINDAFNLASAHKVPVTLALNNTLFLIEERQYMPWEAALSSLSYFKLMFDRSEVYGPMKN
YLKKQVTPFLFIHFRNNTNNWREIPENLMDQYSEVNAISTACSNVPECEEMVSGLFKQWM
ENPNNNPIHPNLRSTVYCNAIAQGGEEWDFAWEQFRNATLVNEADKLRAALACSKELWI
LNRYLSYTLNPDILRKQDATSTIISITNNVIGQGLVWDFVQSNWKKLFNDYGGGSFSFSN
LIQAVTRRFSTEYELQQLQFKKDNEETGFGSGTRALEQALEKTKANIKWVKENKEVVLQ
WFTENSK (配列番号 2).

10

(実施例 2 : TaqMan 分析による 48149 mRNA の組織分布)

内因性ヒト 48149 遺伝子発現を、TaqMan 技術を使用する Perkin-Elmer / ABI 7700 Sequence Detection System を用いて測定した。簡単に、TaqMan 技術は、5' 末端に蛍光色素 (典型的には、6-FAM) および 3' 末端に消光色素 (典型的には、TAMRA) を結合した第 3 の遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (プローブという) の添加を用いる標準的な RT-PCR に依存する。蛍光的にタグ化したオリゴヌクレオチドがインタクトな場合、5' 色素からの蛍光シグナルは消光されている。PCR が進むにつれて、Taq ポリメラーゼの 5' から 3' への核分解 (nucleolytic) 活性は、標識されたプライマーを消化し、蛍光シグナルとして検出される、6-FAM で標識された遊離ヌクレオチドを生成する。蛍光がまず放出および検出される、PCR サイクルは、試験サンプル中の目的の遺伝子の開始量に直接比例し、従って、最初のテンプレート濃度の定量的測定を提供する。サンプルは、5' 末端が異なる蛍光団 (典型的には、VIC) で標識されているハウスキーピング遺伝子 (例えば、GAPDH) に特異的な、第 2 のセットのプライマー / プローブの添加によって内的に制御され得る。

20

30

【0469】

種々のヒト組織中の 48149 のレベルを決定するために、プライマー / プローブセットを設計した。全 RNA を、Qiagen からの RNeasy キットを使用して一連のヒト組織から調製した。第一鎖 cDNA を、オリゴ-dT プライマーおよび Superscript II 逆転写酵素 (Gibco / BRL) を使用して 1 μg の全 RNA から調製した。約 50 ng の全 RNA から得られた cDNA を、TaqMan 反応ごとに使用した。試験した組織は、表 1 ~ 5 に示されるヒト組織およびいくつかの細胞株を含む。48149 mRNA は、広範な組織で検出され、結腸、小腸、冠状平滑筋細胞、脾臓、肝臓、血球、腎臓および心臓 (表 1 ~ 2) 、ならびに種々の腫瘍およびいくつかの肺腫瘍細胞株 (表 3 ~ 4) において著しく発現した。重要なことに、ポリ不飽和脂肪を含む食事を与えたサルと比較して、48149 発現が、飽和脂肪酸を含む食事を与えたサルにおいて増加したことがわかった (表 5) 。

40

【0470】

(表 1 : 48149 mRNA の正規化発現)

【0471】

【表 1 - 1】

組織	相対的発現
正常な動脈	0.1427
罹患した大動脈	0.0641
正常な静脈	0.2433
冠状 SMC	9.5519
HUVEC	1.791
血管種	0.509
正常な心臓	0.1929
心臓 CHF	0.0369
腎臓	0.5908
骨格筋	9.8545
正常な脂肪	0.7504
脾臓	6.3899
一次骨芽細胞	1.4905
分化型破骨細胞	0.5325
正常な皮膚	1.4548
正常な脊髄	0.043
正常な脳皮質	0.007
正常な脳海馬	0.0094
神経	0.0995
DRG (脊髄神経節)	0.0675
正常な胸部	1.543
胸部腫瘍	0.1534
正常な卵巣	0.2133

10

20

30

【 0 4 7 2 】

【表 1 - 2】

卵巣腫瘍	0.2441
正常な前立腺	2.9707
前立腺腫瘍	1.603
唾液腺	0.0786
正常な結腸	138.2163
結腸腫瘍	2.022
正常な肺	1.57
肺腫瘍	0.1354
肺 COPD	1.4957
結腸 IBD	3.9745
正常な肝臓	5.5627
肝臓線維症	1.3526
正常な脾臓	0.22
正常な扁桃	0.2662
正常なリンパ腺	0.0837
正常な小腸	19.0377
マクロファージ	5.8595
骨髄	0.7224
BM-MNC	6.0034
活性化 PBMC	0.7504
好中球	2.2986
巨核球	2.9604
赤血球	0.0168
ポジティブコントロール	0.1208

10

20

30

ヒト 48149 mRNA の発現は、脳皮質組織は例外であるが、試験された全組織で検出された。最も高いレベルの 48149 発現を、正常な結腸組織で検出した。48149 発現の相対的に高いレベルを提示した他の組織としては、小腸、冠状平滑筋細胞、脾臓、肝臓および血球（例えば、マクロファージおよび骨髄単核細胞）が挙げられる。腫瘍（例えば、胸部、前立腺、結腸および肺）から得られた大部分の組織が、対応する正常組織と比較して、48149 発現の減少を示した。表 1 に使用される略語としては、以下が挙げられる：SMC、平滑筋細胞；HUVEC、ヒト臍静脈内皮細胞；CHF、うっ血性心不全；COPD、慢性閉塞性肺疾患；IBD、炎症性腸疾患；BM-MNC、骨髄単核細胞；および PBMC、末梢血単核細胞。

40

【0473】

（表 2：高度血管化新生組織における 48149 mRNA の発現）

【0474】

【表 2】

組織	相対的発現
ONC 101 血管腫	17.28
ONC 102 血管腫	3.61
ONC 103 血管腫	16.92
CHT 1273 膠芽細胞腫	3.08
CHT 216 膠芽細胞腫	2.15
CHT 501 膠芽細胞腫	21.27
NDR 203 正常な腎臓	81.05
PIT 213 腎臓細胞癌	17.89
CHT 732 ウィルムス腫瘍	2.78
CHT 765 ウィルムス腫瘍	16.18
NDR 295 皮膚	6.30
CHT 1424 子宮腺癌	3.13
CHT 1238 神経芽細胞腫	2.79
BWH 78 胎児の副腎	1.71
BWH 74 胎児の腎臓	65.38
BWH 4 胎児の心臓	5.41
MPI 849 正常な心臓	30.93
CLN 746 脊髄	4.10
TCH002 血管腫	0.00
TCH003 血管腫	6.80
TCH004 血管腫	2.21

10

20

30

40

48149 mRNA の発現は、多数の高度血管化新生組織（血管腫（hemangioma）、膠芽細胞腫、腎臓（胎児および正常な成人）、ウィルムス腫瘍、皮膚、子宮癌、神経芽細胞腫、胎児の副腎、心臓（胎児および正常な成人）および脊髄を含む）において検出された。48149 の発現は、成人および胎児の腎臓において最も高かった。高いレベルの48149 発現はまた、正常な心臓組織で検出され、そしていくつかの異常な増殖（例えば、血管腫、膠芽細胞腫、腎臓細胞癌およびウィルムス腫瘍）を検出した。腎臓細胞癌において検出された48149 mRNA 発現のレベルは、胎児および成人の腎臓組織で検出されたレベルよりも非常に低かった。

【0475】

（表 3：腫瘍学サンプルにおける48149 mRNA の発現）

【0476】

【表 3 - 1】

組織	相対的発現
PIT 400 胸部 N	67.45
PIT 372 胸部 N	67.45
CHT 558 胸部 N	3.51
CLN 168 胸部 T: IDC	0.74
MDA 304 胸部 T: MD-IDC	5.84
NDR 58 胸部 T: IDC	8.12
NDR 05 胸部 T: IDC	24.01
CHT 562 胸部 T: IDC	1.82
NDR 138 胸部 T ILC (LG)	15.15
CHT 1841 リンパ腺 (胸部 met)	10.31
PIT 58 肺 (胸部 met)	14.83
PIT 208 卵巣 N	0.00
CHT 620 卵巣 N	2.10
CLN 03 卵巣 T	5.72
CLN 17 卵巣 T	639.49
MDA 25 卵巣 T	15.57
MDA 216 卵巣 T	49.04
CLN 012 卵巣 T	44.04
MDA 185 肺 N	9.59
CLN 930 肺 N	16.01
MDA 183 肺 N	24.69
MPI 215 肺 T--SmC	1.85
MDA 259 肺 T-PDNSCCL	21.79
CHT 832 肺 T-PDNSCCL	13.89
MDA 262 肺 T-SCC	14.28

10

20

30

【 0 4 7 7 】

40

【表 3 - 2】

CHT 793 肺 T-ACA	0.34
CHT 331 肺 T-ACA	5.96
CHT 405 結腸 N	246.56
CHT 523 結腸 N	380.24
CHT 371 結腸 N	843.82
CHT 382 結腸 T: MD	4.96
CHT 528 結腸 T: MD	510.51
CLN 609 結腸 T	3.68
CHT 372 結腸 T: MD-PD	96.72
CHT 340 結腸 - 肝臓 Met	115.82
NDR 100 結腸 - 肝臓 Met	46.39
PIT 260 肝臓 N(女性)	69.35
CHT 1653 頸扁平上皮 CC	1.40
CHT 569 頸扁平上皮 CC	0.10
A24 HMVEC-Arr	70.56
C48 HMVEC-Prol	173.74

10

20

30

48149 mRNA の発現を、多数の腫瘍サンプル（胸部腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍および頸部腫瘍）、ならびに腫瘍を誘導した正常な組織において検出した。48149 の発現は、正常胸部組織および正常結腸組織と比較して、それぞれ、胸部腫瘍および結腸腫瘍において減少される傾向にあった。対照的に、48149 mRNA の発現は、正常卵巣組織と比較して、試験された全ての卵巣腫瘍において増大された。最後に、静止（arrested）HMVECと比較して、増殖性のHMVECにおいてアップレギュレートされたので、48149 mRNA の発現を、ヒト血管内皮細胞（HMVEC）において検出した。表3において使用される略語としては、以下が挙げられる：N、正常；T、腫瘍；IDC、侵襲性腺管癌；ILC、侵襲性小葉癌；MD、中程度の分化型；SmC、小細胞癌；PDNSCC、未分化型非小細胞癌；SCC、扁平上皮癌；およびACA、腺癌。

【0478】

（表4：肺細胞株における48149 mRNA の発現）

【0479】

【表4-1】

組織	相対的発現
NHBE	24.77

40

【0480】

【表 4 - 2】

A549 (BA)	32.02
H460 (LCLC)	0.00
H23 (AC)	5.66
H522 (AC)	0.00
H125 (AC/SCC)	435.28
H520 (SCC)	0.00
H69 (SCLC)	0.00
H345 (SCLC)	0.00
H460 INCX 24時間	0.00
H460 p16 24時間	0.00
H460 INCX 48時間	0.00
H460 p16 48時間	0.00
H460 INCX 安定な Plas	0.00
H460 p16 安定な Plas	0.00
H460 NA-寒天	0.00
H460 Incx 安定な寒天	0.00
H460 p16 安定な寒天	0.00
H125 Incx 96時間	646.18
H125 p53 96時間	257.03
H345 Mock 144時間	0.00
H345 Gluc 144時間	0.00
H345 VIP 144時間	0.00

10

20

30

48149 mRNA の増大した発現を、いくつかの肺細胞株（NHBE細胞、肺癌細胞株 A549 および H125 腺扁平上皮癌細胞を含む）で検出した。48149 mRNA の発現は、空ベクターでトランスフェクトした H125 細胞と比較して、p53 発現構築物でトランスフェクトされた H125 細胞において減少された。

【0481】

（表 5：Wake Forest サンプルにおける 48149 mRNA の発現）

【0482】

【表 5 - 1】

40

動物/食事	相対的発現
#800 CHOW DIET	2.216

【0483】

【表 5 - 2】

#813 CHOW DIET	4.749
#842 CHOW DIET	22.592
#909 CHOW DIET	6.354
#816 CHOW DIET	5.456
#824 CHOW DIET	0.268
#830 CHOW DIET	0.623
#905 CHOW DIET	1.492
#826 CHOW DIET	1.212
#844 CHOW DIET	0.489
#846 CHOW DIET	0.875
#908 CHOW DIET	0.095
#815 CHOW DIET	0.112
#798 CHOW DIET	0.194
#932 CHOW DIET	0.645
#800 POLY DIET W/OUT CHOL	0.998
#813 POLY DIET W/OUT CHOL	1.055
#842 POLY DIET W/OUT CHOL	0.046
#909 POLY DIET W/OUT CHOL	0.082
#816 POLY DIET W/OUT CHOL	0.160
#824 POLY DIET W/OUT CHOL	0.543
#830 POLY DIET W/OUT CHOL	0.985
#905 POLY DIET W/OUT CHOL	0.581
#826 MONO DIET W/OUT CHOL	0.032
#844 MONO DIET W/OUT CHOL	0.044
#846 MONO DIET W/OUT CHOL	0.147
#908 MONO DIET W/OU CHOL	0.299
#815 MONO DIET W/OUT CHOL	0.558
#798 MONO DIET W/OUT CHOL	0.269
#932 MONO DIET W/OUT CHOL	0.028
#926 MONO DIET W/OUT CHOL	0.113
#800 POLY DIET W/ CHOL	0.482
#813 POLY DIET W/ CHOL	12.7355
#842 POLY DIET W/ CHOL	1.714

10

20

30

40

【表 5 - 3】

#909 POLY DIET W/ CHOL	1.070
#816 POLY DIET W/CHOL	0.082
#824 POLY DIET W/CHOL	0.170
#830 POLY DIET W/CHOL	0.585
#905 POLY DIET W/CHOL	1.246
#826 MONO DIET W/ CHOL	1.556
#844 MONO DIET W/CHOL	1.345
#846 MONO DIET W/CHOL	0.054
#908 MONO DIET W/ CHOL	0.230
#815 MONO DIET W/ CHOL	0.938
#798 MONO DIET W/CHOL	2.262
#932 MONO DIET W/CHOL	4.401
#926 MONO DIET W/CHOL	7.987

10

20

表 5 は、特定の食事を与えられた Wake Forest サルの肝臓における 48149 mRNA の発現を示す。これらのサルが、ポリ不飽和の食事を与えられた場合、「固形飼料 (chow)」の食事 (diet) すなわち、脂肪酸 (飽和脂肪酸をふくむ) の通常の食事制限レベルを含む食事) を与えられたサルと比較して、データは、8 匹のうちの 6 匹のサル (番号 (#) 800、#813、#842、#909、#816、#824、#830 および #905 を参照のこと) において減少した 48149 発現を示す。ポリ不飽和脂肪を強調する食事は、心保護的 (cardioprotective) であり、そして動脈においてアテローム硬化型のプラークの形成を制限するか、または予防すると予測される。従って、このような食事に対する応答において下方制御される遺伝子は、アテローム硬化性プラークの形成に関与し得る。さらに、これらのサルが、コレステラミンで補充された単不飽和脂肪を含むの食事を与えられた場合、「固形飼料」食事またはコレステラミンを欠損した単不飽和脂肪を含む食事のいずれかを与えられたサルと比較して、データは、8 匹のうちの 3 匹のマルモセット (番号 (#) 826、#844、#846、#908、#815、#798、#932 および #926 を参照のこと) において増加した 48149 mRNA 発現を示す。コレステラミン処置は、アテローム硬化性プラークの形成を刺激する。従って、コレステラミン処置に対する応答において発現の増加を提示する遺伝子は、アテローム硬化症に関与すると考えられる。

30

【0485】

48149 発現が、アテローム硬化症とポジティブに相関する観察を追跡調査するために、正常であるかまたはアテローム硬化性の病巣を含む、動脈組織サンプルを、48149 核酸プローブを使用して、インサイチュハイブリダイゼーションによって分析した。アテローム硬化性の組織サンプルの全ては、分析された正常な動脈サンプルと比較して、48149 mRNA の増加した発現を含んだ。同様に、ApoE ノックアウトマウス由来の動脈組織 (これは、遺伝的にアテローム硬化症に影響を受け易い) を、インサイチュハイブリダイゼーションによって分析した。アテローム硬化性プラークを含む ApoE ノックアウト由来動脈サンプルの全ては、正常な動脈サンプルに対して 48149 mRNA の高い発現を提示した。48149 mRNA の有意な発現は、ApoE ノックアウト由来動脈のアテローム硬化性プラークに存在するマクロファージに局在され、再び、アテローム硬化症における 48149 の役割を示唆する。

40

【0486】

50

(実施例3：ノーザン分析による48149 mRNAの組織分布)

種々のRNAサンプルでのノーザンブロットハイブリダイゼーションを、標準的条件下で行い得、そしてストリンジェントな条件下(すなわち、65℃での0.2×SSC)で洗浄し得る。48149 cDNA(配列番号1)の全てまたは一部に対応するDNAプローブを使用し得る。このDNAを、供給業者の指示書に従って、Prime-It Kit(Stratagene, La Jolla, CA)を使用して³²P-dCTPで放射標識した。マウス造血組織および内分泌組織、ならびに癌細胞株(Clontech, Palo Alto, CA)由来のmRNAを含むフィルターを、ExpressHybハイブリダイゼーション溶液(Clontech)中でプローブし得、そして製造業者の推奨に従って高ストリンジェンシーで洗浄した。

10

【0487】

(実施例4：細菌細胞における48149の組換え発現)

本実施例において、48149を、組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合ポリペプチドとして、E. coli中に発現させ、そしてこの融合ポリペプチドを、単離および特徴付けする。特に、48149をGSTに融合させ、そしてこの融合ポリペプチドを、E. coli(例えば、PEB199株)に発現させる。PEB199でのGST-48149融合タンパク質の発現を、IPTGで誘導する。この組換え融合ポリペプチドを、グルタチオンビーズでのアフィニティクロマトグラフィーによって、誘導したPEB199株の粗細菌溶解物から精製する。細菌溶解物から精製したポリペプチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を使用して、生じた融合ポリペプチドの分子量

20

【0488】

(実施例5：COS細胞における組換え48149タンパク質の発現)

COS細胞(例えば、COS-7細胞、CV-1起源SV40細胞; Gluzman(1981) Cell 123:175-182)における48149遺伝子を発現させるために、Invitrogen Corporation(San Diego, CA)によるpCDNA/Ampベクターを使用する。このベクターは、SV40複製起点、アンピシリン耐性遺伝子、E. coli複製起点、ポリリンカー領域が続くCMVプロモーター、ならびにSV40イントロンおよびポリアデニル化部位を含む。48149タンパク質全体をコードするDNAフラグメント、ならびにこのフラグメントの3'末端にイン

30

フレームで融合されたHAタグ(Wilsonら(1984) Cell 37:767)またはFLAGタグを、このベクターのポリリンカー領域にクローニングし、これにより、CMVプロモーターの制御下で組換えタンパク質の発現を配置する。

【0489】

このプラスミドを構築するために、48149 DNA配列を、2つのプライマーを使用するPCRによって増幅する。5'プライマーは、目的の制限部位、次いで、開始コドンから始まる48149コード配列の約20ヌクレオチドを含む; 3'末端配列は、目的の他の制限部位に対する相補配列、翻訳終止コドン、HAタグまたはFLAGタグ、および48149コード配列の最後の20ヌクレオチドを含む。PCR増幅したフラグメントおよびpCDNA/Ampベクターを、適切な制限酵素で消化し、このベクターを、CIA

40

P酵素(New England Biolabs, Beverly, MA)を使用して脱リン酸化する。好ましくは、この選択された2つの制限部位は異なり、その結果、48149遺伝子は、正確な方向で挿入される。連結混合物を、E. coli細胞(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CAより入手可能なHB101株、DH5α株、SURE株を使用し得る)に形質導入し、この形質導入した培養物を、アンピシリン培地プレートにプレーティングし、耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを、形質転換体から単離し、そして正確なフラグメントの存在について制限分析により試験する。

【0490】

引き続きCOS細胞を、リン酸カルシウム法または塩化カルシウム共沈法、DEAE-

50

デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクションあるいはエレクトロポレーションを使用して、48149-pcDNA/AmpプラスミドDNAでトランスフェクトする。宿主細胞をトランスフェクトするための他の適切な方法を、Sambrook, J., Fritsh, E. F., およびManiatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに見出し得る。48149ポリペプチドの発現を、放射標識(NEN, Boston, MAより入手可能な³⁵S-メチオニンまたは³⁵S-システインを使用し得る)およびHA特異的モノクローナル抗体を使用する免疫沈降(Harlow, E. およびLane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)によって検出する。簡単には、細胞を、³⁵S-メチオニン(または³⁵S-システイン)で8時間標識する。次いで、この培養培地を収集し、そして界面活性剤(RIPA緩衝液(150mM NaCl、1%NP-40、0.1% SDS、0.5% DOC、50mM Tris (pH7.5))を使用して細胞を溶解する。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体で沈降させる。次いで、沈降したポリペプチドを、SDS-PAGEによって分析する。

【0491】

あるいは、48149コード配列を含むDNAを、適切な制限部位を使用してpCDNA/Ampベクターのポリリンカーに直接クローニングする。生じたプラスミドを、上記の様式にてCOS細胞にトランスフェクトし、そして48149ポリペプチドの発現を、放射標識および48149特異的モノクローナル抗体を使用する免疫沈降によって検出する。

(等価物)

当業者は、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態の多くの等価物を認識するか、または慣用的にすぎない実験法を使用してこれらの等価物を確認し得る。このような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれるべきであることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0492】

【図1】図1は、ヒト48149のヒドロパシープロットを示す。相対的に疎水性の残基を水平な点線より上に示し、そして相対的に親水性の残基を水平な点線より下に示す。ヒト48149のアミノ酸配列における位置に対応する数字が示される。本発明のポリペプチドは、以下を含むフラグメントを包含する：疎水性配列(すなわち点線より上の配列)の全てまたは一部(例えば、配列番号2のアミノ酸約10~35の配列、アミノ酸約273~291の配列、およびアミノ酸約232~259の配列)；親水性配列(すなわち、点線より下の配列)の全てまたは一部(例えば、配列番号2のアミノ酸約171~190の配列、アミノ酸約250~272の配列、およびアミノ酸約321~339の配列)。

【図2】図2は、ヒト48149の膜ペプチダーゼドメインとPFAMによる隠れマルコフモデル(HMM)由来のコンセンサスアミノ酸配列とのアライメントを示す。上の配列は、コンセンサスアミノ酸配列(配列番号4)であり、一方、下のアミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸76~480に対応する。

【図3】図3は、酸化した低密度リポタンパク質(OxLDL)で、6時間、48時間、または96時間のいずれかの時間処理したマクロファージ細胞、ならびにOxLDLの非存在下で6時間または48時間のいずれかの時間増殖させたマクロファージ細胞における48149 mRNAの発現増加を示す。

【図4】図4は、8時間脂質ローディングアッセイにおいて、改変された低密度リポタンパク質(LDL)とともにインキュベートしたマクロファージにける48149 mRNAの発現を示す。脂質ローディングアッセイの間の、マクロファージによる脂質およびコレステロールの取り込みは、アロテム発生の際の泡沫細胞形成(すなわち、アロテム

性動脈硬化性プラーク形成)に表現型的に類似する。従って、脂質ローディングアッセイの経過中にアップレギュレートされる遺伝子は、アロテーム発生に関連すると考えられる。このデータは、マクロファージが、穏やかに酸化されたLDL (miOxLDL)に8時間曝露される場合に、48149 mRNAの非常に高い発現を実証し、そして適度に酸化されたLDL (moOxLDL)もしくはアセチル化されたLDL (acLDL)に8時間曝露される場合に、48149 mRNAの高発現を実証する。対照的に、48149 mRNA発現は、どのようなLDL粒子にも曝露されていないマクロファージ細胞(単球)において非常に低い。

【図5A】図5Aは、アロテーム性動脈硬化症を発症する遺伝的素因のある、ApoEノックアウトマウスにおけるマウス48149 mRNAの発現を示す。図5Aにおいて、8~30週齢(wk)のApoEノックアウトマウスの動脈における48149の発現を示す。マウスの加齢につれて、48149の発現は、アロテーム性動脈硬化性プラークが形成される傾向のない動脈領域(すなわち、大動脈(abd)の腹腔(下方)部分)と比べて、アロテーム動脈硬化性プラークが形成される傾向のある動脈領域(すなわち、大動脈の弓部分)において増加する。

10

【図5B】図5Bは、アロテーム性動脈硬化症を発症する遺伝的素因のある、ApoEノックアウトマウスにおけるマウス48149 mRNAの発現を示す。図5Bにおいて、38週齢(wk)のApoEノックアウトマウスから得られた動脈サンプルにおける48149の発現を示す。分析された全てのマウスにおいて、48149の発現は、大動脈abd組織と比べて、大動脈弓部分において増加する。このことは、アロテーム性動脈硬化性病変の形成と48149の発現との間の相関を示す。

20

【図6】図6は、ポリ不飽和脂肪酸のみを含む餌を摂取している場合と比較して、正常レベルの規定食脂肪酸(dietary fatty acid)(飽和脂肪酸を含む)を含む餌(chow)を摂取している場合の、サルにおける48149 mRNAの発現を示す。餌を与えた場合、試験した8匹のうち6匹のサルが48149発現の増加したレベルを示す。このデータはまた、実施例2の表5における管状形成を提示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chun, Miyoung

<120> METHODS OF USING 48149, A HUMAN
AMINOPEPTIDASE FAMILY MEMBER

<130> MPI01-174

<150> 60/335,084

<151> 2001-10-31

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3494

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

```

taatttttgc ccagttctgccc tgttgtgggg ctctccccct ttggggatat aagccccggc 60
tggggctgct ccgtttctctg cctggcctga ggctccctga gccgcctccc caccatcacc 120
atggccaagg gcttctatat ttccaagtc ctgggcatcc tggggatcct cctgggctgt 180
gcagccgtgt gcacaatcat cgcactgtca gtggtgtact ccaggagaa gaacaagaac 240
gccaacagct ccccggtggc ctccaccacc ccgtccgcct cagccaccac caaccccgcc 300
tcggccacca ccttgagcca aagtaaagcg tggaatcgtt accgcctccc caacacgctg 360
aaacccgatt cctaccaggt gacgtgaga cgtacctca ccccaatga caggggctgt 420
tacgttttta agggctccag caccgtccgt ttcaacctga aggaggccac tgacgtcatc 480
atcatccaca gcaagaagct caactacacc ctacgccagg ggcacagggt ggtcctgctg 540
ggtgtgggag gctcccagcc ccccgacatt gacaagactg agctggtgga gccaccgag 600
tacctgggtg tgcacctcaa gggtccctgt gtgaaggaca gccagtatga gatggacagc 660
gagttcgagg gggagttggc agatgacctg gcgggcttct accgcagoga gtacatggag 720
ggcaatgtca gaaagggtgt ggccactaca cagatgcagg ctgcagatgc ccggaagtc 780
ttcccatgct tcgatgagcc ggccatgaag gccaggttca acatcacgct tatccacccc 840
aaggacctga cagccctgtc caacatgctt cccaaaggtc ccagcaccac acttccagaa 900
gaccccaact ggaatgtcac tgagttccac accacgcca agatgtccac gtacttgtgt 960
gccttcattg tcagtgtggt cgactacgtg gagaagcagg catccaatgg tgtcttgatc 1020
cggatctggg cccggcccag tgccattgct gcgggccacg gcgattatgc cctgaacgtg 1080
acggggccca tccttaactt ctttgcctgt cattatgaca caccctaccc actcccaaaa 1140
tcagaccaga ttggcctgcc agacttcaac gccggcgcca tggagaactg gggactggtg 1200
acctaccggg agaactccct gctgttcgac cccctgtcct cctccagcag caacaaggag 1260
cgggtggtca ctgtgattgc tcatgagctg gccaccagt ggttcgggaa cctggtgacc 1320
atagagtggg ggaatgacct gtggttgaac gagggcttcg cctcctacgt ggagtacctg 1380
ggtgctgact atgcggagcc cacttggaac ttgaaagacc tcatggtgct gaatgatgtg 1440
taccgctgta tggcagtgga tgcactggcc tctccacc cgtgttccac accgcctcg 1500
gagatcaaca cgcgggcccc gatcagtgag ctgtttgacg ccattctcta cagcaagggc 1560
gcctcagttc tcaggatgct ctccagcttc ctgtccgagg acgtattcaa gcagggctgt 1620
gcgtctacc tcacacctt tgctaccag aacaccatct acctgaacct gtgggaccac 1680
ctgcaggagg ctgtgaacaa ccggtccatc caactcccca ccaccgtcg ggacatcatg 1740
aaccgctgga ccctgcagat gggcttcccg gtcatcacgg tggataccag cacggggacc 1800
ctttcccagg agcaacttct ccttgacccc gattccaatg ttaccgccc ctcagaattc 1860
aactacgtgt ggattgtgcc catcacatcc atcagagatg gcagacagca gcaggactac 1920
tggtgatag atgtaagagc ccagaacgat ctcttcagca catcaggcaa tgagtgggtc 1980
ctgctgaacc tcaatgtgac gggctattac cgggtgaact acgacgaaga gaactggagg 2040
aagattcaga ctcagctgca gagagaccac tcggccatcc ctgtcatcaa tcgggcacag 2100
atcattaatg acgccttcaa cctggccagt gcccataagg tccctgtcac tctggcgctg 2160
aacaacaccc tcttctgat tgaagagaga cagtacatgc cctgggaggc cgcctgagc 2220
agcctgagct acttcaagct catgtttgac cgctccgagg tctatggccc catgaagaac 2280

```

10

20

30

40

```

tacctgaaga agcagggtcac acccctcttc attcacttca gaaataatac caacaactgg 2340
agggagatcc cagaaaaacct gatggaccag tacagcgagg ttaatgccat cagcaccgcc 2400
tgctcccaacg gagttccaga gtgtgaggag atggtctctg gccttttcaa gcagtggatg 2460
gagaacccca ataataaccc gatccacccc aacctgcggt ccaccgtcta ctgcaacgct 2520
atcgcccagg gcggggagga ggagtgggac ttgcctggg agcagttccg aaatgccaca 2580
ctgggtcaatg aggtgacaa gctccgggca gccctggcct gcagcaaaga gttgtggatc 2640
ctgaacaggt acctgagcta caccctgaac ccggacttaa tccggaagca ggacgccacc 2700
tctaccatca tcagcattac caacaacgtc attgggcaag gtctgtgtctg ggactttgtc 2760
cagagcaact ggaagaagct ttttaacgat tatgggtggtg gctcgttctc cttctccaac 2820
ctcatccagg cagtgacacg acgattctcc accgagtatg agctgcagca gctggagcag 2880
ttcaagaagg acaacgagga aacaggcttc ggctcaggca cccgggccct ggagcaagcc 2940
ctggagaaga cgaagccaa catcaagtgg gtgaaggaga acaaggaggt ggtgctccag 3000
tggttcacag aaaacagcaa atagtcccca gcccttgaag tcaccgggcc ccgatgcaag 3060
gtgcccacat gtgtccatcc cagcggctgg tgcagggcct ccattcctgg agcccgaggc 3120
accagtgtcc tcccctcaag gacaaagtct ccagcccacy ttctctctgc ctgtgagcca 3180
gtctagtctc tgatgaccca ggctgcctga gcacctccca gccctgtccc ctcagtccaa 3240
ccccgcccta ggcctggcat ggcacctgtc gcccagtgcc ctggggctga tctcagggaa 3300
gcccagctcc agggccagat gaggagaagc tctcgatgga caatgaacgg ccttgctggg 3360
ggccgcctctg taccctctttt cacccttccc taaagaccct aaatctgagg aatcaacagg 3420
gcagcagatc tgtatatttt tttctaagag aaaatgtaaa taaaggattt ctagatgaaa 3480
aaaaaaaaaa aaaa 3494

```

<210> 2
<211> 967
<212> PRT
<213> Homo sapien

```

<400> 2
Met Ala Lys Gly Phe Tyr Ile Ser Lys Ser Leu Gly Ile Leu Gly Ile
 1          5          10          15
Leu Leu Gly Val Ala Ala Val Cys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Val Val
 20          25          30
Tyr Ser Gln Glu Lys Asn Lys Asn Ala Asn Ser Ser Pro Val Ala Ser
 35          40          45
Thr Thr Pro Ser Ala Ser Ala Thr Thr Asn Pro Ala Ser Ala Thr Thr
 50          55          60
Leu Asp Gln Ser Lys Ala Trp Asn Arg Tyr Arg Leu Pro Asn Thr Leu
 65          70          75          80
Lys Pro Asp Ser Tyr Gln Val Thr Leu Arg Pro Tyr Leu Thr Pro Asn
 85          90          95
Asp Arg Gly Leu Tyr Val Phe Lys Gly Ser Ser Thr Val Arg Phe Thr
100          105          110
Cys Lys Glu Ala Thr Asp Val Ile Ile Ile His Ser Lys Lys Leu Asn
115          120          125
Tyr Thr Leu Ser Gln Gly His Arg Val Val Leu Arg Gly Val Gly Gly
130          135          140
Ser Gln Pro Pro Asp Ile Asp Lys Thr Glu Leu Val Glu Pro Thr Glu
145          150          155          160
Tyr Leu Val Val His Leu Lys Gly Ser Leu Val Lys Asp Ser Gln Tyr
165          170          175
Glu Met Asp Ser Glu Phe Glu Gly Glu Leu Ala Asp Asp Leu Ala Gly
180          185          190
Phe Tyr Arg Ser Glu Tyr Met Glu Gly Asn Val Arg Lys Val Val Ala
195          200          205
Thr Thr Gln Met Gln Ala Ala Asp Ala Arg Lys Ser Phe Pro Cys Phe
210          215          220
Asp Glu Pro Ala Met Lys Ala Glu Phe Asn Ile Thr Leu Ile His Pro
225          230          235          240
Lys Asp Leu Thr Ala Leu Ser Asn Met Leu Pro Lys Gly Pro Ser Thr
245          250          255
Pro Leu Pro Glu Asp Pro Asn Trp Asn Val Thr Glu Phe His Thr Thr

```

10

20

30

40

40

Glu Val Asn Ala Ile Ser Thr Ala Cys Ser Asn Gly Val Pro Glu Cys
 755 760 765
 Glu Glu Met Val Ser Gly Leu Phe Lys Gln Trp Met Glu Asn Pro Asn
 770 775 780
 Asn Asn Pro Ile His Pro Asn Leu Arg Ser Thr Val Tyr Cys Asn Ala
 785 790 795 800
 Ile Ala Gln Gly Gly Glu Glu Glu Trp Asp Phe Ala Trp Glu Gln Phe
 805 810 815
 Arg Asn Ala Thr Leu Val Asn Glu Ala Asp Lys Leu Arg Ala Ala Leu
 820 825 830
 Ala Cys Ser Lys Glu Leu Trp Ile Leu Asn Arg Tyr Leu Ser Tyr Thr
 835 840 845
 Leu Asn Pro Asp Leu Ile Arg Lys Gln Asp Ala Thr Ser Thr Ile Ile
 850 855 860
 Ser Ile Thr Asn Asn Val Ile Gly Gln Gly Leu Val Trp Asp Phe Val
 865 870 875 880
 Gln Ser Asn Trp Lys Lys Leu Phe Asn Asp Tyr Gly Gly Gly Ser Phe
 885 890 895
 Ser Phe Ser Asn Leu Ile Gln Ala Val Thr Arg Arg Phe Ser Thr Glu
 900 905 910
 Tyr Glu Leu Gln Gln Leu Glu Gln Phe Lys Lys Asp Asn Glu Glu Thr
 915 920 925
 Gly Phe Gly Ser Gly Thr Arg Ala Leu Glu Gln Ala Leu Glu Lys Thr
 930 935 940
 Lys Ala Asn Ile Lys Trp Val Lys Glu Asn Lys Glu Val Val Leu Gln
 945 950 955 960
 Trp Phe Thr Glu Asn Ser Lys
 965

10

<210> 3
 <211> 2904
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

20

<400> 3
 atggccaagg gcttctatat ttccaagtcc ctgggcatcc tggggatcct cctgggctgtg 60
 gcagccgtgt gcacaatcat cgcactgtca gtggtgtact ccaggagaa gaacaagaac 120
 gccaacagct ccccggtggc ctccaccacc ccgtccgcct cagccaccac caaccccgcc 180
 tcggccacca ccttggaacca aagtaaagcg tggaatcggt accgcctccc caacacgctg 240
 aaacccgatt cctaccagggt gacgctgaga ccgtacctca cccccaatga caggggctgtg 300
 tacgttttta agggctccag cacggtccgt ttccactgca aggaggccac tgacgtcatc 360
 atcatccaca gcaagaaget caactacacc ctccagccagg ggcacagggt ggtcctgcgt 420
 ggtgtgggag gctcccagcc ccccgacatt gacaagactg agctggtgga gccaccgag 480
 tacctggtgg tgcacctcaa gggtccctg gtgaaggaca gccagtatga gatggacagc 540
 gagttcgagg gggagttggc agatgacctg gcggtcttct accgcagcga gtacatggag 600
 ggcaatgtca gaaagggtgt ggccactaca cagatgcagg ctgcagatgc ccggaagtcc 660
 ttcccatgct tcgatgagcc ggccatgaag gccgagttca acatcacgct tatccacccc 720
 aaggacctga cagccctgtc caacatgctt cccaaaggtc ccagcaccac acttccagaa 780
 gaccccaact ggaatgtcac tgagttccac accacgccca agatgtccac gtacttgcgt 840
 gccttcattg tcagtgaagt cgactacgtg gagaagcagg catccaatgg tgtcttgatc 900
 cggatctggg cccggcccag tgccattgcy gcgggccacg gcgattatgc cctgaacgtg 960
 acgggccccca tccttaactt ctttgctggt cattatgaca caccctaccc actcccaaaa 1020
 tcagaccaga ttggcctgcc agacttcaac gccggcgcca tggagaactg gggactggtg 1080
 acctaccggg agaactccct gctgttcgac cccctgtcct cctccagcag caacaaggag 1140
 cgggtggtca ctgtgattgc tcatgagctg gccaccagt ggttcgggaa cctgggtgacc 1200
 atagagtggg ggaatgacct gtggctgaac gagggcttcg cctcctacgt ggagtacctg 1260
 ggtgctgact atgcggagcc cacctggaac ttgaaagacc tcatggtgct gaatgatgtg 1320
 taccgcgtga tggcagtggg tgcactggcc tcctccacc cgctgtccac accgcctcg 1380
 gagatcaaca cgccggccca gatcagtgag ctgtttgacg ccattctcta cagcaagggc 1440
 gcctcagtc tccagtgct ctccagctc ctgtccgagg acgtattcaa gcagggcctg 1500

30

40

```

gcgtcctacc tccacacctt tgcctaccag aacaccatct acctgaacct gtggggaccac 1560
ctgcaggagg ctgtgaacaa cgggtccatc caactcccca ccaccgtgcg ggacatcatg 1620
aaccgctgga ccttgacagat gggcttcccg gtcacacagg tggataccag cacggggacc 1680
ctttcccagg agcacttcct ccttgacccc gattccaatg ttacccgccc ctcagaattc 1740
aactacgtgt ggattgtgcc catcacatcc atcagagatg gcagacagca gcaggactac 1800
tggctgatag atgtaagagc ccagaacgat ctcttcagca catcaggcaa tgagtgggtc 1860
ctgtgaacc tcaatgtgac gggctattac cgggtgaact acgacgaaga gaactggagg 1920
aagattcaga ctgagctgca gagagaccac tcggccatcc ctgtcatcaa tcgggcacag 1980
atcattaatg acgccttcaa cctggccagt gcccataagg tccctgtcac tctggcgtg 2040
aacaacaccc tcttctgat tgaagagaga cagtacatgc cctgggaggc cgccctgagc 2100
agcctgagct acttcaagct catgtttgac cgctccgagg tctatggccc catgaagaac 2160
tacctgaaga agcagggtcac acccctcttc attcacttca gaaataatac caacaactgg 2220
agggagatcc cagaaaacct gatggaccag tacagcgagg ttaatgccat cagcaccgcc 2280
tgctccaacg gagtccaga gtgtgaggag atgggtctctg gccctttcaa gcagtggatg 2340
gagaacccca ataataaccc gatccacccc aacctgcggt ccaccgtcta ctgcaacgct 2400
atcgcccagg gcggggaggga ggagtgggac ttgcctctggg agcagttccg aaatgccaca 2460
ctgggtcaatg aggtgacaa gctccgggca gccctggcct gcagcaaaga gttgtggatc 2520
ctgaacaggt acctgagcta caccctgaac ccggacttaa tccggaagca ggacgccacc 2580
tctaccatca tcagcattac caacaacgtc attgggcaag gtctggtctg ggactttgtc 2640
cagagcaact ggaagaagct ttttaacgat tatgggtggtg gctcgttctc cttctccaac 2700
ctcatccagg cagtgcacg acgattctcc accgagtatg agctgcagca gctggagcag 2760
ttcaagaagg acaacgagga aacaggcttc ggctcaggca cccgggccct ggagcaagcc 2820
ctggagaaga cgaagccaa catcaagtgg gtgaaggaga acaaggagggt ggtgctccag 2880
tggttcacag aaaacagcaa atag 2904

```

<210> 4
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Consensus Sequence

```

<400> 4
Leu Pro Thr Thr Val Lys Pro Leu His Tyr Asp Leu Thr Leu Lys Pro
1          5          10          15
Lys Phe Gly Phe Leu Pro Glu Lys Pro Asn Tyr Ala Asp Glu Lys Asn
20          25          30
Phe Thr Phe Ser Gly Ser Val Thr Ile Thr Leu Thr Asn Gln Thr Lys
35          40          45
Ala Ala Thr Asp Glu Ile Val Leu His Ala Lys Asp Leu Thr Ile Ser
50          55          60
Ser Thr Gly Glu Gly Val Arg Val Thr Leu Val Leu Val Asn Gly Ser
65          70          75          80
Gln Lys Leu Pro Glu Ser Val Glu Phe Ser Leu Gln Asp Glu Thr Asp
85          90          95
Phe Leu Ala Val Asp Asp Asn Lys Glu Lys Leu Thr Ile Asn Leu Pro
100         105         110
Glu Ala Leu Ser Ala Gly Gln Gly Gly Ser Pro Tyr Thr Leu Glu Ile
115         120         125
Glu Tyr Glu Gly Lys Leu Asn Asp Ile Ser Met Leu Gly Phe Tyr Arg
130         135         140
Ser Glu Tyr Thr Asp Gly Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Met Ala Thr Thr
145         150         155         160
Gln Phe Glu Glu Pro Thr Asp Ala Arg Arg Ala Phe Pro Cys Phe Asp
165         170         175
Glu Pro Ser Phe Lys Ala Thr Phe Thr Ile Thr Ile Ile His Pro Lys
180         185         190
Gly Thr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Glu Ile Ser Lys Asp Asp Asp
195         200         205
Gly Pro Thr Arg Val Ile Thr Thr Phe Glu Thr Thr Pro Lys Met Ser

```

10

20

30

40

【図 3】

マクロファージ-脂質セット番号 1
48149 発現

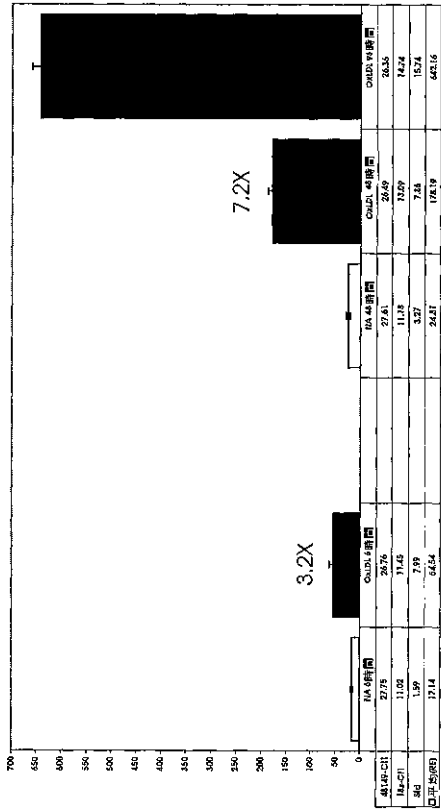


FIGURE 3

【図 4】

48149 マクロファージ脂質ローディング番号 3

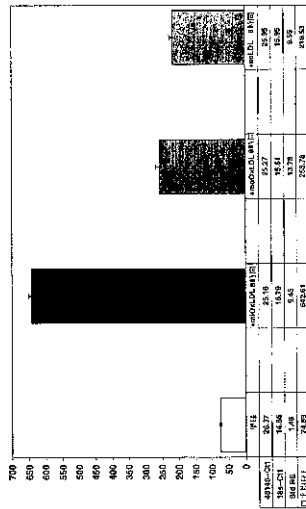


FIGURE 4

【図 5 A】

m48149 ApoE (9%) 病変バネル

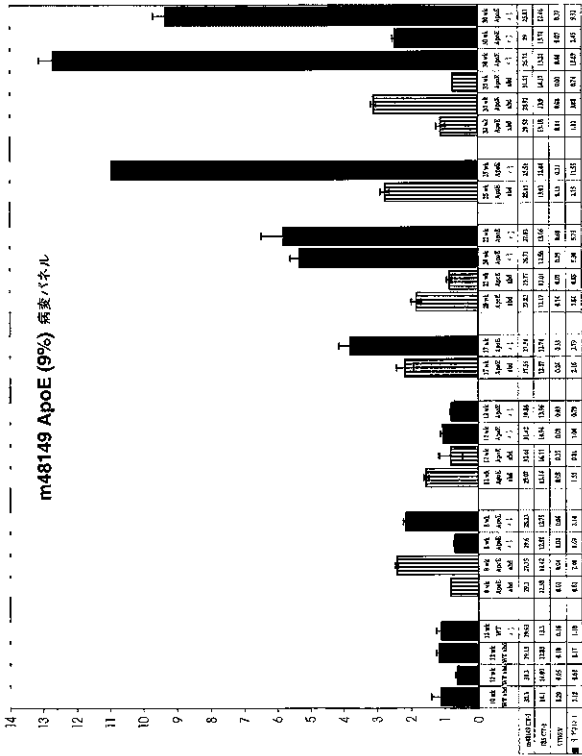


FIGURE 5A

【図 5 B】

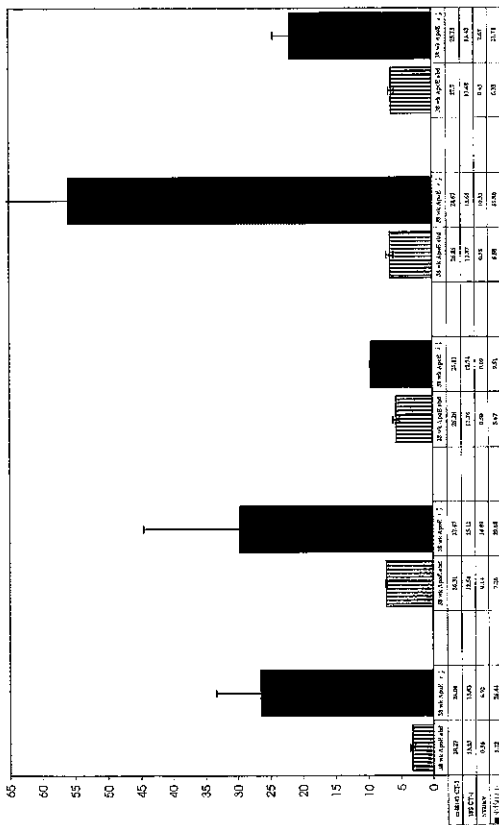


FIGURE 5B

【图 6】

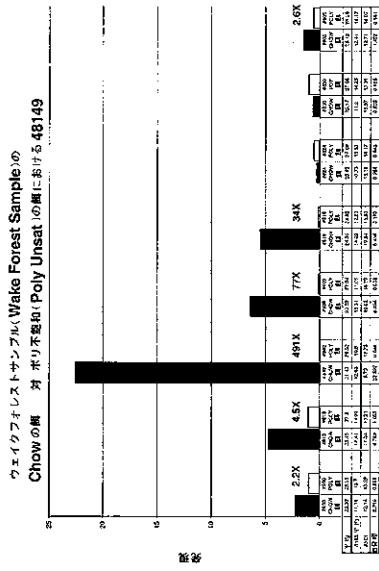


FIGURE 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/34622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12Q 1/37, 1/68; C12N 9/48		
US CL : 435/24, 6, 212		
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) U.S. : 435/24, 6, 212		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PASQUALINI, R. et al. Aminopeptidase N Is a Receptor for Tumor-Homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis. Cancer Research. 1 February 2000. Vol. 60, pages 722-727. see particularly pages 725-727.	1, 2, 4
A	LENDECKEL, U. et al. Role of Alanyl Aminopeptidase In Growth and Function of Human T Cells. Int. J. Molecular Medicine. 1999. Vol. 4, pages 17-27.	1, 2, 4
A	RIEMANN, D. et al. CD-13- Not Just a Marker in Leukemia Typing. Immunology Today. February 1999. Vol. 20, No. 2, pages 83-88.	1, 2, 4
Y	SAIKI, I. et al. Role of Aminopeptidase N (CD13) in Tumor-Cell Invasion and Extracellular Matrix Degradation. Int. J. Cancer. 1993. Vol. 54, pages 137-143. see particularly 140-141.	1, 2, 4
Y	FUJII, H. et al. Human Melanoma Invasion and Metastasis Enhancement By High Expression of Aminopeptidase N/CD13. Clin. Exp. Metastasis. 1995. Vol. 13, pages 337-344, see page 337.	1, 2, 4
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 March 2004 (30.03.2004)		27 MAY 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Rebecca E. Prouty <i>J. Roberts Jr.</i> Telephone No. 571-272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/0622

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 2, and 4, drawn to methods of screening for modulators of 48149(aminopeptidase N) expression or activity.

Group II, claim(s) 3 and 5-8, drawn to methods of modulating lipid production in a cell using a 48149 modulator.

Group III, claim(s) 9-13, drawn to methods of treating a cardiovascular disorder using a 48149 modulator.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the only shared technical feature of the three methods is the use of a 48149 (aminopeptidase N) modulator. However, aminopeptidase N modulators were known in the art and thus do not constitute a shared special technical feature under PCT Rule 13.2. See for example, Pasqualini et al. who teach aminopeptidase N inhibitors including an APN antibody, and the chemical inhibitors bestatin and actinonin or Tokicka et al. who disclose aminopeptidase N inhibitors including an APN antibody, and the chemical inhibitors bestatin, amastatin, chymostatin and antipain.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

EAST, MEDLINE, SCISEARCH, LIFESCI, BIOTECHDS, BIOSIS, EMBASE, CAS, NTIS, EMBIOBASE, BIOTECHNO, WPI
search terms: aminopeptidase N, CD13, inhibit? or modulat?, inflammat? or cardiovascular or atherosclero? or lipid or cholesterol?

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/64	
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チューン, ミヨング

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 8, ベルモント, カントリー クラブ レーン
8 8

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CA25 CA26 CB01 DA12 DA13 DA14 DA20 DA36
DA37 FB02 FB03 FB05 FB06 FB15
4B024 AA01 BA14 CA04 CA09 CA12 DA02 EA04 GA11 HA08 HA20
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ36 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR42
QR48 QR50 QR62 QR77 QS03 QS25 QS33 QS34 QS36 QS39
QX01
4C084 AA02 AA13 BA44 DC32 ZA362 ZA372 ZA402 ZA422 ZA452 ZA542
ZA592 ZA812 ZB262 ZC332
4C085 AA13 AA14 BB22 DD62 DD63 DD88
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 ZA36 ZA37 ZA40 ZA42 ZA45 ZA54
ZA59 ZA81 ZB26 ZC33