

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4354633号
(P4354633)

(45) 発行日 平成21年10月28日(2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年8月7日(2009.8.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K	14/47	(2006.01)	C 07 K	14/47	
C 07 K	16/18	(2006.01)	C 07 K	16/18	
C 12 P	21/08	(2006.01)	C 12 P	21/08	

請求項の数 24 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2000-509728 (P2000-509728)
(86) (22) 出願日	平成10年8月21日 (1998.8.21)
(65) 公表番号	特表2002-505841 (P2002-505841A)
(43) 公表日	平成14年2月26日 (2002.2.26)
(86) 國際出願番号	PCT/US1998/017296
(87) 國際公開番号	W01999/009049
(87) 國際公開日	平成11年2月25日 (1999.2.25)
審査請求日	平成17年8月19日 (2005.8.19)
(31) 優先権主張番号	60/056,453
(32) 優先日	平成9年8月21日 (1997.8.21)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	500021365 クアーク ファーマシューティカルズ、イ ンコーポレイテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア、ブレザ ントン、 サーベンタイン レーン 10 59
(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 晴夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低酸素調節性遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 および配列番号 10 からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 10 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 9 および配列番号 10 からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む、単離された核酸分子。 10

【請求項 5】

配列番号 9 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む、請求項 4 記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 10 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む、請求項 4 記載の単離された核酸分子。

【請求項 7】

配列番号 1 または配列番号 2 の塩基配列を有する、請求項 4 記載の単離された核酸分子。

。

【請求項 8】

配列番号 1 の塩基配列を有する、請求項 7 記載の単離された核酸分子。

【請求項 9】

配列番号 2 の塩基配列を有する、請求項 7 記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 9 および配列番号 10 からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 11】

配列番号 9 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する、請求項 10 記載の抗体。 10

【請求項 12】

配列番号 10 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する、請求項 10 記載の抗体。

【請求項 13】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 10 記載の抗体。

【請求項 14】

検出し得る部分に結合した、請求項 13 記載の抗体。

【請求項 15】

請求項 8 または請求項 9 記載の核酸によりコードされたポリペプチド分子。

【請求項 16】

配列番号 1 の塩基配列を有する核酸によりコードされた、請求項 15 記載のポリペプチド分子。 20

【請求項 17】

配列番号 2 の塩基配列を有する核酸によりコードされた、請求項 15 記載のポリペプチド分子。

【請求項 18】

配列番号 1 または配列番号 2 の塩基配列を有する核酸によりコードされた、単離されたポリペプチド分子。

【請求項 19】

配列番号 1 の塩基配列を有する核酸によりコードされた、請求項 18 記載のポリペプチド分子。 30

【請求項 20】

配列番号 2 の塩基配列を有する核酸によりコードされた、請求項 18 記載のポリペプチド分子。

【請求項 21】

配列番号 10 のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のポリペプチドをコードする m R N A を標的とする、R N A 分子であって、

前記標的とすることが前記 m R N A のプロセッシング、スプライシング、輸送または翻訳を防止する、上記 R N A 分子。

【請求項 22】

前記標的とすることが m R N A 分解となる、請求項 21 記載の R N A 分子。 40

【請求項 23】

前記 R N A がアンチセンス R N A である、請求項 21 記載の R N A 分子。

【請求項 24】

前記 R N A がリボザイムである、請求項 21 記載の R N A 分子。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(技術分野)

低酸素において特異的に発現する遺伝子の同定、および診断および治療介入のための遺伝子および遺伝子産物の使用。 50

【0002】**(関連技術の説明)**

組織酸素化のレベルは、正常な発育および病的過程、例えば虚血、において重要な役割を演じている。組織酸素化は、アポトーシスおよび血管形成における両者において顕著な調節の役割を演じている (Bouckら、1996; Bunnら、1996; Dorら、1997; Carmelietら、1998)。細胞増殖および生育が酸素欠乏状態(低酸素)により減少するとき、アポトーシス(総説として、Dukeら、1996を参照)および増殖阻止がおこる。血管形成(即ち、血管の生長、血管化)は、酸素低下の細胞が酸素恒常性を回復する試みとして内皮細胞の増殖および遊走を促進する因子を分泌するときに、促進される(総説として、Hanahanら、1996を参照)。

10

【0003】

虚血疾患の病理は、例えば網膜症、急性腎不全、心筋梗塞および脳卒中のような血管の狭窄または閉塞に一般的に起因する、体臓器、組織または身体の1部分への血液供給の減少を含む。それゆえ、虚血状態によって誘導されるアポトーシスおよび血管形成は、また、これらの病理に関与している。新生血管形成は網膜症および腫瘍増殖のある種の型に見られる。血管形成は主要増殖に必要であり、血管形成の遅延は、悪性腫瘍および網膜症を制御する有用な手段であることが認められている。更に、腫瘍形成性細胞をアポトーシスに変化させること(即ち、プログラム細胞死)に誘導することは有用である。

【0004】

しかしながら、これらの過程は、低酸素のような種々のストレスに反応する、多くの遺伝子によって制御される出来事の、複雑なカスケードである。低酸素ストレスに反応する、異なった遺伝子の発現は、アポトーシスあるいは血管形成のみならず、両者の引金を引くことができる。ガンにおいて、アポトーシスおよび血管形成関連遺伝子は、治療的ターゲットであることが観察された。しかし、低酸素それ自体は、より重篤な腫瘍形成表現型に寄与する、突然変異の選択における、臨界的な役割を演じている (Graeberら、1996)。それゆえ、ガンおよび虚血のみでなく治療的に利用することができ、アポトーシスあるいは血管形成を誘導し、またはその進行を遅延させる、候補遺伝子または遺伝子産物を同定することが必要とされている。疾病およびそれに関連した病理と、上向きまたは下向き調節(応答)遺伝子の間の直接的因果関係を有する、遺伝子を同定することは有用である。

20

【0005】**(発明の概要)**

本発明によれば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、および配列番号5を含む群に示された配列、またはそれらの相補的または対立遺伝子変異配列、および、それらに必要ならばヒトの相同体、を有する、低酸素応答性遺伝子をコードする、精製され、単離されおよびクローニングされた核酸配列が提供される。本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す核酸配列によりコードされるタンパク質、およびタンパク質の見本として配列番号7-11、を提供する。本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す核酸配列によりコードされるタンパク質、および配列番号7-11を含むタンパク質に対して向けられた抗体を提供する。

30

【0006】

本発明は、更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す、少なくとも1つの発現し得る核酸配列を持った、トランスジェニック動物および細胞株を提供する。本発明は更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す、少なくとも1つの核酸配列がノックアウトされた、ノックアウト真核生物を提供する。

40

【0007】

本発明は、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含む群に示す核酸配列によりコードされる、少なくとも1つのタンパク質のアンタゴニストの

50

治療的に有効な量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、血管形成を調節する方法を提供する。別に、本発明は、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6に示す核酸配列に対する、少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはそれらの配列またはそれらのタンパク質に直接的に対する優性ネガティブペプチドの、治療的に有効な量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、血管形成を調節する方法を提供する。

【0008】

本発明は更に、医薬として許容される担体中に有効成分として、配列番号2-6によりコードされたタンパク質、または配列番号7-8、10-11に示すタンパク質配列の治療的に有効な量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、血管形成またはアポトーシスを調節する方法を提供する。10

【0009】

本発明は、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6（ヒト相同体）を含む群に示す配列の1つに、作用可能に結合した発現調節配列を含む発現可能なベクターを、治療を必要とする患者に、遺伝子治療を利用して、直接投与することによる、アポトーシスを調節する遺伝子を提供する方法を提供する。

【0010】

本発明は、また、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含む群に示す配列の1つに、作用可能に結合した発現調節配列を含む発現可能なベクターを、治療を必要とする患者に、直接投与することによる、遺伝子治療を利用して血管形成を調節する遺伝子を提供する方法を提供する。20

【0011】

本発明は、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含む群に示す配列の少なくとも1つに対して向けられた、アンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的に有効な量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、低酸素状態に対する反応を調節する方法を提供する。本発明は、また、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含む群に示す配列の1つに作用可能に結合した発現調節配列を含む発現可能なベクターを、治療を必要とする患者に、直接投与することによる、遺伝子治療を利用して、低酸素調節性遺伝子を提供する方法を提供する。

【0012】

本発明は、また、配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含む群に示す、少なくとも1つの発現性遺伝子（上向き調節性）の存在または遺伝子産物について、患者からの体液または組織試料を分析し、そして、もし上向き調節性遺伝子または遺伝子産物が確かめられたなら虚血と決める、ステップを包含する、患者における虚血の存在を診断する方法を提供する。30

【0013】

（発明の詳細な説明）

本発明は、低酸素および虚血においてのみでない治療的および診断的に利用することができ、そしてアポトーシスまたは血管形成を調節する、候補遺伝子および遺伝子産物を同定するものである。調節（regulate）による、または調節（modulate）、あるいは調節（control）による、ということは、そのプロセスが、プロセスにおける変化が効果的であるのに必要な程度を、および患者に関連する病態を、誘導するあるいは阻害することを意味する。誘導あるいは阻害が予測されるかどうかは、治療されるプロセスおよび疾病から明らかであり、医学部門の当業者には周知である。本発明は、疾病およびそれに関連した病理、と上向きまたは下向き調節（応答）遺伝子の間の直接的因果関係を有する、遺伝子治療、診断および治療のための遺伝子を同定する。それは、本発明が、原因と結果の間の生理的関係によって始められることである。40

【0014】

本発明は、発現の上向き調節による低酸素状態に少なくとも反応する、および配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5を含む群に示す配列およびそれ50

らの類縁体および多型、またはそれらに対する相補的または対立変異配列を有する遺伝子をコードする、精製され、単離され、およびクローニングされた核酸ポリヌクレオチド（配列）を提供する。本発明は、更に、上向き調節されることによって低酸素ストレスに反応する公知の遺伝子（ニューロロイキン）である配列番号6を提供する。配列番号6は、ニューロロイキンのヒト配列であり、ラット配列と90%以上の相同性を有する。ヒト相同体が適当ならば使用される。ラットとヒトの配列の間には高い相同性があるので、ラット配列も必要によりプローブその他に使用することができる。

【0015】

本発明は、更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5に示す核酸配列によりコードされるタンパク質およびそれらの類縁体、およびタンパク質の見本として配列番号7および8ならびに配列番号9-11を提供する。本発明は更に、医薬として許容される担体中に有効成分として、配列番号2-6によりコードされたタンパク質、または配列番号7-8、10-11に示すタンパク質配列の治療的に有効量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、血管形成またはアボトーシスを調節する方法を提供する。

10

【0016】

タンパク質は組替え法により製造でき（総説的には、Marshakら、1996「タンパク質の精製および確認の戦略、実験課程マニュアル」、CSHL Pressを参照）、そして類縁体は、転写後プロセッシングにより製造できる。ここで使われる「類縁体」という用語は、配列番号1-8の天然の配列と比較して、それらアミノ酸／ヌクレオチド配列に、幾分の相異を有する核酸配列またはタンパク質と定義される。元々、類縁体は、機能的に関係する部分に亘って、一般的に少なくとも70%の相同性である。より好適な実施態様では、類縁体は、アミノ酸／ヌクレオチド配列に少なくとも80%の相同性であり、および95%相同性に近い。類縁体のアミノ酸またはヌクレオチド配列は、少なくとも1つの残基が欠失され、挿入され、あるいは置換されたとき、1次配列から異なるが、しかしタンパク質または核酸分は機能が残る。糖鎖形成による相異は、タンパク質類縁体を提供することができる。

20

【0017】

「機能的な関連性」は分子の生物学的性質を云い、そしてこの文脈では、天然に生じるタンパク質または核酸分子によって直接的または間接的に行われる、in vivoエフェクターまたは抗原機能または活性を意味する。エフェクター抗原機能は、レセプター結合、酵素活性または酵素調節活性、輸送体結合活性、ホルモン活性、細胞の細胞外マトリックスまたは細胞表面分子への吸着を促進または阻害する活性、あるいは機能タンパク質をコードし発現し得る核酸配列を有する構造的役割を含むが、これらを含むことには限定されない。抗原機能は、本質的に、天然に生じるタンパク質に対して生じた抗体との、交叉反応することのできるエピトープまたは抗原部位を有することを意味する。生物学的に活性な類縁体は、抗原機能をそれに加えて持っているが、その必要性はない、生来のエフェクター機能を共有している。

30

【0018】

本発明は、更に、イムノアッセイその他に使用することのできる、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す核酸配列によりコードされるタンパク質に対して向けられた抗体を提供する。

40

【0019】

抗体は、モノクローナル、ポリクローナルまたは組替え体であり得る。好都合には、抗体は、免疫原またはその1部分、例えば、配列に基く合成ペプチド、に対して調製され、あるいはクローニング技術によって組替えにより調製され得、また、天然の遺伝子産物および/またはその部分が単離されそして免疫原として使用される。免疫原は、Harlow and Lane、抗体：実験室マニュアル、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988およびBorrebaeck、抗体工学 - 実践的ガイド、W.H. Freeman and Co

50

. , 1992、に総説適に記載されているように、当業者に周知の標準的な抗体生産技術によって抗体を製造するのに使用することができる。抗体断片は、当業者に周知の方法によって、抗体およびF_ab、F(a_b)₂ およびFvを含む抗体から調整することができます。

【0020】

ポリクローナル抗体を製造するためには、宿主、例えばウサギまたはヤギ、を免疫原または免疫原断片を、一般的にはアジュバントと一緒に、そして、必要ならば、担体に結合して免疫し；免疫原に対する抗体を血清から採取する。更に、ポリクローナル抗体は、単一特異性であるように、吸着することができる。即ち、単一特異性にするために、血清中に交叉反応性抗体が残存しないように、血清を関連する免疫原に対して吸着することができる。10

【0021】

モノクローナル抗体を製造するためには、免疫原と共に適当なドナー、一般的にはマウス、の高度免疫化、および脾臓の抗体産生細胞を単離することを含む。これらの細胞を、不死性を有する細胞、例えばミエローマ細胞、に融合して、不死性を有し、必要とする抗体を分泌する融合細胞ハイブリッドを造る。細胞を、全体として、培養し、モノクローナル抗体を、使用のために培地から採集する。

【0022】

組替え抗体を製造するためには（総説的に、Hustonら、1991；Johnson and Bird, 1991；Mernaugh and Mernaugh, 1995を参照）、動物の抗体を產生するBリンパ球からのメッセンジャーRNA、またはハイブリドーマを逆転写して相補的DNAs(cDNAs)を得る。全長または部分長であり得る、抗体cDNAを増幅し、ファージまたはプラスミドにクローン化する。cDNAは、分離されたまたはリンカーによって結合された、重鎖または軽鎖cDNAの部分長であり得る。抗体、または抗体断片は、組替え抗体を得るために適当な発現系を用いて発現される。抗体cDNAは、関連する発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得ることもできる。20

【0023】

抗体は、周知である、固体支持基体に結合し、あるいは検出し得る部分に結合し、または両方をすることができる。（蛍光あるいは酵素的な部分の総説的考察は、Johnstone & Thorpe、実践免疫化学、Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982を参照。）抗体の固体支持基体への結合は、また、周知である。（総説的考察のためには、Harlow and Lane、抗体：実験室マニュアル、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988およびBorrebaek、抗体工学-実践的ガイド、W.H. Freeman and Co., 1992を参照）本発明において意図している検出し得る部分は、酵素および放射性マーカー、例えば蛍光、金属、ビオチン、金、フェリチン、アルカリ性ホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、フルオレセイン、ローダミン、トリチウム、¹⁴Cおよびヨード化、を含むが、これらには限定されない。30

【0024】

本発明は、更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す、少なくとも1つの発現し得る核酸配列を持った、トランスジェニック動物および細胞株を提供する。発現し得るとは、遺伝子あるいは、発現させるために標的ゲノム中に遺伝子を置くことによって、発現に必要な全ての調節要素の配列を含むことを意味する。本発明は、更に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す、少なくとも1つの核酸配列がノックアウトされた、ノックアウト真核生物を提供する。40

【0025】

これらのトランスジェニックおよびノックアウトは、周知の標準的方法、ならびに米国特50

許 5 , 4 8 7 , 9 9 2 、 5 , 4 6 4 , 7 6 4 、 5 , 3 8 7 , 7 4 2 、 5 , 3 6 0 , 7 3 5
 、 5 , 3 4 7 , 0 7 5 、 5 , 2 9 8 , 4 2 2 、 5 , 2 8 8 , 8 4 6 、 5 , 2 2 1 , 7 7 8
 、 5 , 1 7 5 , 3 8 5 、 5 , 1 7 5 , 3 8 4 、 5 , 1 7 5 , 3 8 3 、 4 , 7 3 6 , 8 6 6
 、 および Burke and Olson (1991) 、 Capeccchi (1989)
 、 Daviesら (1992) 、 Dickinsonら (1993) 、 Duff and Lincoln (1995) 、 Huxleyら (1991) 、 Jakobovitsら (1993) 、 Lambら (1993) 、 Pearson and Choi (1993)
) , Rothstein (1991) 、 Schedlら (1993) 、 Straussら (1993) に示された方法を使って構築される。更に、特許出願WO94/23049
 、 WO93/14200 、 WO94/06908 、 WO94/28123 は、また、情報を提供する。
 10

【0026】

更に詳しくは、いずれの周知の技術も、動物の親系列をつくるために動物に発現可能に導入遺伝子を導入するために、使用可能である。そのような技術は、前核マイクロインジェクション(米国特許4,873,191)；胚株へのレトロウイルス媒介遺伝子転移(Van der Puttenら、1985)；胚幹細胞における遺伝子ターゲッティング(Thompsonら、1989；Mansour, 1990および米国特許5,614,396)；胚の電気穿孔(Lo, 1983)；および精子媒介遺伝子転移(Lavitranoら、1989)を含むが、これらには限定されない。このような技術の総説については、Gordon (1989)を参照。
 20

【0027】

更に、直接ヒト導入遺伝子を運搬しない1つの親株は、導入遺伝子に近づくように遺伝子ターゲッティングによって修飾された相同性の内在性遺伝子を、多分、有している。即ち、内在性遺伝子は「ヒト化された」および／または突然変異したのである(Reaumeら、1996)。もし、動物およびヒトの配列が本質的に相同性であるならば、「ヒト化された」遺伝子は必要とされることを、注意しなければならない。トランスジェニック親は、また、必要により、非突然変異あるいは突然変異およびヒト化されているか、いかないか、いずれかに、過剰発現配列を運搬することができる。「導入遺伝子」という用語は、それゆえ、これら全ての可能性を云うのに使われる。

【0028】

更に、細胞は、各トランスジェニック親から導入遺伝子を運搬し、そして周知のように、初代細胞培養または細胞株を樹立するために使用される仔から単離することができる。

【0029】

適切ならば、親株は導入遺伝子に対しホモ接合性である。更に、適切ならば、導入遺伝子に相同であるゲノムにおいて、内在性非導入遺伝子は非発現性である。非発現性は、内在性遺伝子は発現されず、この非発現は仔において遺伝し得ることを、意味する。例えば、内在性相同遺伝子は、周知の方法により「ノックアウトされる」ことができた。代りに、導入遺伝子の1つを受け取る親の株は、非発現にするように内在性相同遺伝子において突然変異を運搬することができた。

【0030】

本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す核酸配列によってコードされる、少なくとも1つのタンパク質のアンタゴニストの、治療的に有効な量を患者に投与することによって、治療を必要とする患者において、血管形成を調節する方法を提供する。アンタゴニストは、以下に記載するような医薬として許容される担体で投与され、運ばれる。「アンタゴニスト」または「拮抗する」という用語は、その最も広い意味で使用される。拮抗は、遺伝子活性または遺伝子産物において阻害、不活化、遮断あるいは退行をもたらす機構または処置を含むことができる。遺伝子または遺伝子産物の阻害は、遺伝子または遺伝子産物が調節されている、相当する機能の増加を引き起こすことを注意せねばならない。拮抗の過程は、配列番号1-6の遺伝子産物に対する細胞のレセプターを遮断することを含み、以下に考察するようにアンチセン
 40
 50

ス治療を含むことができる。

【0031】

本発明は、更に、医薬として許容される担体中に、配列番号7-11からなる群から選択されたタンパク質配列である調節剤の、治療的に有効な量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、血管形成またはアポトーシスを調節する方法を提供する。調節剤は、以下に記載するような医薬として許容される担体で投与され運搬される。例えば、患者は、腫瘍形成性細胞におけるアポトーシスあるいは、例えば、肢が再接合しなければならないような傷害状態、あるいは血管再生が必要とされる移植における、血管形成を含めることが必要であろう。

【0032】

本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示す核酸配列に対して向けられた少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、または優性ネガティブペプチド(cDNAまたはペプチドとしていずれか; Hershkowitz, 1987)の治療的に有効量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、血管形成またはアポトーシスを調節する方法を提供する。本発明は、また、配列番号1;配列番号2;配列番号3;配列番号4;配列番号5;および配列番号6を含む群に示す配列の少なくとも1つに対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的に有効な量を患者に投与することによる、治療を必要とする患者における、低酸素状態に対する反応を調節する方法を提供する。医薬組成物中の有効成分としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下に記載するような医薬として許容される担体で投与され、運ばれる。

【0033】

多くの総説が、アンチセンス(AS)技術およびその巨大な治療可能性についての側面を扱っている(WrightおよびAnazodo, 1995)。この急速に発展しつつある技術の、化学的(Crooke, 1995; Uhlmannら、1990)、細胞的(Wagner, 1994)および治療的(Hananiaら、1995; Scanlonら、1995; Gewirtz, 1993)可能性に関する総説がある。比較的短期間に内に、培養初代細胞および細胞株におけるASヌクレオチド配列のin vitro使用、ならびに一過性に特異的過程を抑制したり体機能を変更するために、そのようなヌクレオチド配列をin vivoに投与することについての豊富な情報が蓄積された。更に、豊富な経験が、ヒトでの有効性を予想するために、動物モデルおよびヒトの臨床治験において、in vitroおよびin vivoで得られる。

【0034】

特異的遺伝子の発現におけるアンチセンス介入は、合成ASオリゴヌクレオチド配列の使用によって達成することができる(最近の報告として、LeFebvre-d'Hellemcourtら、1995; Agrawal, 1996; Lev-Lehmanら、1997を参照)。ASオリゴヌクレオチド配列は、問題の標的mRNAを相補しそしてRNA:AS二本鎖を形成するようデザインされた、典型的には15-30merでしかし7mer位小さい、短いDNA配列である(Wagnerら、1996)。この二本鎖形成は、関連のあるmRNAのプロセッシング、スプライシング、輸送または翻訳を防止することができる。更に、ある種のASヌクレオチド配列は、それらの標的mRNAとハイブリダイズするとき、細胞のRNaseH活性をもたらすことができ、その結果mRNA分解の結果となる(Calabrettaら、1996)。その場合、RNaseHは、二本鎖のRNA成分を切断し、そしてASを放出するかもしれません、標的RNAの付加的分子と更にハイブリダイズすることができる。更なる作用機作は、ASのゲノムDNAとの相互作用をおこし、転写的には不活性である3重らせんを生じる。

【0035】

アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する標的セグメントの配列は、配列が、相補的鑄型とのオリゴヌクレオチド2本鎖形成に重要な、適当なエネルギー関連性質を示すこと、および自己2量体化または自己相補性に対し低い可能性を示すことで選択される(A

10

20

30

40

50

n a z o d o ら、1996）。例えば、コンピュータプログラム O L I G O (プライマー解析ソフトウェア, Ver. 3.4) が、アンチセンス配列の融解温度、自由エネルギーの性状を決定するのに、そして自己2量体形成および自己相補性性状の可能性を推定するのに使用することができる。プログラムは、これら2つのパラメーター（自己2量体形成および自己相補性の可能性）の定量的推測の決定を可能にし、そして「可能性なし」または「幾分かの可能性」または「本質的に完全な可能性」の指示を与える。このプログラムを使用して、標的セグメントが一般的に、これらのパラメーターにおいて可能性なしの推定を有することで選択される。しかし、セグメントは、ある範疇の1つでは「幾分かの可能性」を有していても使用することができる。パラメーターの平衡は、周知のような選択で使用される。更に、オリゴヌクレオチドは、類縁体の置換が機能に実質的に影響しないように、必要により選択される。10

【0036】

ホスホロチオアート - アンチセンス - オリゴヌクレオチドは、通常、有効な濃度で著しい毒性を示さず、そして動物において充分な薬力学的半減期を示し (A g a r w a l ら、1996)、そしてヌクレアーゼ耐性である。細胞の発達に関連したアンチセンスが誘導する機能消失表現型は、グリア纖維酸性タンパク質 (G F A P)、ヒヨコにおける中脳蓋板の樹立 (G a l i l e o ら、1991) および N - m y c タンパク質に見られ、神経外胚葉培養における細胞の不均一性の保持に必要である（上皮性細胞対神経芽細胞、それらのコロニー形成能、腫瘍形成性および接着において異なる） (R o s o l e n ら、1990；W h t e s e l l ら、1991) ことが示された。分裂促進および血管形成性を有する、塩基性纖維芽細胞増殖因子 (b F g F) のアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害は、飽和状態および特異的な方法でグリオーマ細胞の増殖の 80% を抑制する (M o r r i o s o n, 1991)。疎水性であるので、アンチセンスオリゴヌクレオチドはリン脂質膜とよく反応する。(A k h t e r ら、1991)。細胞の原形質膜とそれらの反応に次いで、それらは、特異的なレセプターが関与すると予想される飽和機構で (Y a k u b o v ら、1989)、生細胞に能動的（または受動的）に輸送される (L o k e ら、1989)。20

【0037】

上記で考察したアンチセンスの代りに、リボザイムが利用できる。これは、化学量論的な考慮からアンチセンス療法が制限される場合に特に必要である (S a r v e r ら、1990、遺伝子調節および応用、305 - 325頁)。リボザイムは、標的 R N A における特異的部位を開裂する、R N A 触媒活性（総説として C e c h を参照）を有する R N A 分子である。リボザイムによって開裂される R N A 分子の数は化学量論的に予測した数よりも多い (H a m p e l a n d T r i t z, 1989；U h l e n b e c k, 1987)。30

【0038】

リボザイムは、R N A のホスホジエステル結合開裂を触媒する。いくつかのリボザイム構造系列が同定されている、即ち、グループエイントロン、R N a s e P、肝炎デルタウイルスリボザイム、ハンマーへッドリボザイムおよび元来タバコ輪転ウイルスサテライト R N A (S T R S V) の - 鎮 (n e g a t i v e s t r a n d) から誘導されたヘアピンリボザイムである (S u l l i v a n, 1994；米国特許 5,225,347、4-5 欄)。後者の 2 系列は、ウイロイドおよびウイルソイドから誘導され、そこで、リボザイムは、ローリングサークル型複製の間に創造された、オリゴマーからモノマーが分離すると信じられている (S y m o n s, 1989 および 1992)。ハンマーへッドおよびヘアピンリボザイムの主題は、最も普通には、遺伝子治療のために m R N A s のトランス開裂に適応することである (S u l l i v a n, 1994)。本発明において利用されるリボゾームの型は周知のように選択される。ヘアピンリボザイムは、目下、臨床治験中であり、好ましい型である。一般的に、リボザイムは長さで 30 - 100 ヌクレオチドである。40

【0039】

10

20

30

40

50

ヌクレオチドの修飾または類縁は、ヌクレオチドの治療の性質を改良するために導入することができる。改良された性質は、ヌクレアーゼ抵抗性の増加および／または細胞膜を透過する能力の増加を含む。

【0040】

ヌクレアーゼ抵抗性は、必要ならば、使用および運搬の方法に必要なアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、cDNAおよび／またはリボザイムの生物活性を妨害しない周知の方法により、もたらされる（Iyerら、1990；Eckstein, 1985；SpitzerおよびEckstein, 1988；Woolfら、1990；Shawら、1991）。ヌクレアーゼ抵抗性を増強するためにオリゴヌクレオチドになすことのできる修飾は、リン酸バックボーンのリンまたは酸素ヘテロ原子の修飾を含む。これらはメチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびモルホリノオリゴマーの調製を含む。1実施態様において、4つないし6つの3'-末端ヌクレオチド塩基の間をつなぐホスホロチオエート結合を有することによって、提供される。代りに、ホスホロチオエート結合は、全てのヌクレオチド塩基を結合する。周知の他の修飾は、生物活性が保持され、しかしヌクレアーゼに対する安定性が実質的に増加しているなら使用可能である。

10

【0041】

本発明は、また、オリゴヌクレオチドの機能に実質的に影響しない、本発明のオリゴヌクレオチドの全ての類縁体、あるいはオリゴヌクレオチドに対する修飾を含む。ヌクレオチドは、天然に生じたあるいは合成で修飾した塩基から選択することができる。天然に生じた塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルを含む。オリゴヌクレオチドの修飾した塩基は、キサンチン、ヒポキサンチン、2'-アミノアデニン、6'-メチル、2'-プロピルおよびその他のアルキルアデニン、5'-ハロウラシル、5'-ハロシトシン、6'-アザシトシンおよび6'-アザチミン、プソイドウラシル、4'-チオウラシル、8'-ハロアデニン、8'-アミノアデニン、8'-チオールアデニン、8'-チオールアルキルアデニン、8'-ヒドロキシリルアデニンおよび他の8'-置換アデニン、8'-ハログアニン、8'-アミノグアニン、8'-チオールグアニン、8'-チオアルキルグアニン、8'-ヒドロキシリルグアニンおよび他の置換グアニン、他のアザおよびデアザアデニン、他のアザおよびデアザグアニン、5'-トリフルオロメチルウラシルおよび5'-トリフルオロシトシン、を含む。

20

【0042】

更に、ヌクレオチドの類縁体は、ヌクレオチドの構造が基本的に変更され、そして治療または実験試薬としてよりよく適するように、調製することができる。ヌクレオチド類縁体の例は、DNA（またはRNA）のデオキシリボース（またはリボース）リン酸バックボーンが、ペプチドに見出されたものと類似のポリアミドバックボーンで置換されたペプチド核酸（PNA）である。PNA類縁体は、酵素による分解に対し抵抗性であり、そしてin vivoおよびin vitroで延命することが示された。更に、PNAsは、相補的DNA配列に対しDNA分子よりも、より強力に結合することが示された。この所見は、PNA鎖とDNA鎖の間の電荷反発の欠如に帰せられる。オリゴヌクレオチドを行うことのできる他の修飾は、ポリマーバックボーン、環状バックボーン、あるいは鎖状バックボーンを含む。

30

【0043】

医薬組成物の有効成分は、本発明の実施のために必要とされるヌクレアーゼ抵抗性であるオリゴヌクレオチド、または適当な配列および／またはリボザイムに対し、標的として同じ効果を有する事が示された、それらの断片を含むことができる。本発明に開示された有効成分の組み合わせは、アンチセンス配列の組み合わせを含めて使用することができる。

40

【0044】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド（および／またはリボザイム）およびcDNAは、リボ核あるいはデオキシリボ核ヌクレオチドに周知の方法により合成することができる。例えば、Applied Biosystems 380B DNA合成機を使用す

50

ることができる。断片を使用するとき、2ないしそれ以上のそのような配列が合成され、そして本発明において使用されるように、共に連結される。

【0045】

本発明のヌクレオチド配列は、直接あるいはウイルスまたは非ウイルスベクターにより運搬される。直接運搬するときは、配列は、一般的にヌクレアーゼ抵抗性にされる。代りに、配列は、以下において考察するように、配列が発現するように、発現カセットまたは構造に取り込まれることができる。一般的に、構造は、標的細胞内で配列が発現するように、適当な調節配列またはプロモーターを含む。

【0046】

ネガティブ優性ペプチドは、タンパク質の1部、即ちペプチド、をコードする部分cDNA配列を称する(Herskowitz, 1987を参照)。このペプチドは、それが誘導されたタンパク質とは異なった機能を有することができる。それは、タンパク質全体と相互作用し、その活性を阻害することができ、また他のタンパク質と作用し、それらの活性をタンパク質全体に応答して阻害することができる。ネガティブ優性は、ペプチドが天然のタンパク質を凌駕することができ、それらの活性を阻害して、細胞に致死に対する抵抗性あるいは感受性のような異なった性質を与えることを意味する。治療介入のために、ペプチドそれ自体が医薬組成物の有効成分として運搬されるか、あるいはcDNAが、アンチセンス運搬と同じような方法を利用して、細胞に運搬することができる。

【0047】

本発明は、配列番号1；配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含む群に示す配列の1つに、作用可能に結合した発現調節配列を含む発現可能なベクターを、遺伝子治療を利用して、治療を必要とする患者に、直接投与することによる、アポトーシスを調節する遺伝子、血管形成を調節する遺伝子、あるいは低酸素を調節する遺伝子を提供する方法を提供する。

【0048】

ここにおいて使用される「遺伝子治療による」とは、関連する遺伝物質(例えば、DNAまたはRNA)を、遺伝的または獲得性疾病または表現型状態を治療するか予防するために、宿主に移入することを云う。関連する遺伝物質は産物(例えば、治療的価値のあるタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、機能的RNA、アンチセンス)をコードし、in vivoでの生産が望ましい。例えば、関連する遺伝物質は、ホルモン、レセプター、酵素、ポリペプチドまたはペプチドをコードすることができる。代りに、関連する遺伝物質は、自殺遺伝子をコードする。総説として、一般的に、教科書「遺伝子治療」(Advances in Pharmacology 40, Academic Press, 1997)を参照。

【0049】

遺伝子治療に2つの基礎的アプローチが展開された：(1) ex vivoおよび(2) in vivo遺伝子治療。ex vivo遺伝子治療において、細胞は患者から取り出され、培養されたものをin vitroで処理する。一般的に、機能的な置換する遺伝子が、必要に応じて発現系と共に、適当な遺伝子運搬ベヒクル/方法(トランスフェクション、形質導入、相同的組換え、等)を経て細胞に導入され、そして修飾された細胞は培養を行い、そして宿主/患者に返還される。これら遺伝的に再移植された細胞は、in situで移入された遺伝物質を発現することが示された。

【0050】

in vivo遺伝子治療においては、標的細胞は主体から取り出されず、むしろ運搬されるべき遺伝物質は、レシピエント内である、in situでレシピエント生物の細胞に導入される。別の実施態様において、もし宿主遺伝子が欠損なら、遺伝子はin situで修復される(Culver, 1998)。これら遺伝的に返還された細胞は、in situで移入された遺伝物質を発現することが示されている。

【0051】

遺伝子発現ベヒクルは、非相同の核酸を宿主に運搬/転移することができる。発現ベヒク

10

20

30

40

50

ルは、周知のような選択方法で細胞に核酸のターゲティング、発現および転写を制御するための要素を含む。遺伝子の 5' UTR および / または 3' UTR は、しばしば発現ベヒクルの 5' UTR および / または 3' UTR により置換されることに注意しなければならない。それゆえ、ここで使われているように、発現ベヒクルは、必要とされるように、転移されるべき実際の遺伝子の 5' UTR および / または 3' UTR を含んではならず、特異的なアミノ酸をコードする領域のみを含む。

【 0 0 5 2 】

発現ベヒクルは、非相同性物質の転写を制御するプロモーターを含むことができ、選択的転写をする構成的または誘導的プロモーターのいずれかであり得る。必要な転写レベルを得るために要するエンハンサーは、随意に含むことができる。エンハンサーは、一般的に、プロモーターによって指図された基本的な転写レベルを変えるコード配列に（シスで）隣接して働く、非翻訳 DNA 配列である。発現ベヒクルは、以下に記載する選択遺伝子を含むこともできる。

10

【 0 0 5 3 】

ベクターは、公知の技術内の種々の方法のいずれか 1 つによって細胞または組織に導入することができる。そのような方法は、一般的に以下の記載に見出すことができる。Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning : A Laboratory Manual）」, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)、Ausubelら、「分子生物学における最近のプロトコル（Current Protocol in Molecular Biology）」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)、Changら、「体性遺伝子治療（Somatic Gene Therapy）」, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995)、Vegaら、「遺伝子ターゲッティング（Gene Targeting）」, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995)、Vectors : 「分子クローニングベクターおよびその使用の調査（A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses）」, Butterworth, Boston MA (1988) および Gilboaら、(1986)、および、例えば、安定または一過性のトランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔および組換えウイルスベクターとの感染を含む。これらに加えて、中枢神経系に関与するベクターについては米国特許 4,866,042、および陽性 - 陰性選択法については米国特許 5,464,764 および 5,487,992 を参照されたい。

20

【 0 0 5 4 】

感染による核酸の導入は、その他の方法よりもいくつかの利点がある。それらの感染性のためにより高い効率を得ることができる。更に、ウイルスは非常に特異的であり、特異的な細胞型において典型的に感染し繁殖する。それゆえ、それらの自然の特異性は、*in vivo* または組織内あるいは細胞の混合培養で特異的な細胞に、ベクターを標的とするのに使用することができる。ウイルスベクターは、レセプターを介在させた場合を通して、標的特異性を変更する特異的レセプターまたはリガンドとの修飾に使用することができる。

30

【 0 0 5 5 】

組換え配列を導入し発現するための DNA ウイルスベクターの特別の例は、アデノウイルス由来のベクター Adenop53TK である。このベクターは、陽性または陰性選択のいずれか、および所望の組換え配列用の発現カセットで、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (TK) を発現する。このベクターは、上皮由来のほとんどのガンおよびその他を含むアデノウイルスレセプターを有する細胞に感染するのに使用することができる。このベクターおよび類似の所望の機能を示すその他のものは、細胞の混合集団を処理するのに使用することができ、そして、例えば、細胞、組織あるいはヒトの実質の *in vitro* または *ex vivo* 培養を含むことができる。

40

50

【 0 0 5 6 】

他の特徴を、安全性を確実にするため、および／または治療効率を増強するために、ベクターに加えることができる。そのような特徴は、例えば、組換えウイルスで感染した細胞に対する陰性選択に使用することができるマーカーを含む。そのような陰性選択マーカーの例は、抗生物質ガンシクロビルに対する感受性を付与する上記したTK遺伝子である。陰性選択は、それゆえ、抗生物質の添加を通して誘導される自殺をおこすので、感染を制御することができる手段である。そのような保護は、例えば、もしウイルスベクターまたは組替え配列の変更した型を生産するような突然変異がおこれば、細胞の形質転換は起こらないことが確実になる。

【 0 0 5 7 】

特定の細胞型の発現を制限する特徴も、また、含むことができる。そのような特徴は、例えば、所望の細胞型に特異的なプロモーターおよび調節要素を含む。

【 0 0 5 8 】

更に、組換えウイルスベクターは、側方感染および標的特異性のような有利を与えるので、所望の核酸のin vivo発現に有用である。側方感染は、例えば、レトロウイルスの生活環において遺伝性であり、単一感染細胞が多くの子孫のビリオンを生産し、それが分離して近辺の細胞に感染する過程である。その結果は、大きな領域が急速に感染され、その大部分が、元のウイルス粒子によって最初に感染されたのではなくなってしまう。このことは、感染剤が娘子孫を通してのみ広がる、感染の垂直性とは対照的である。ウイルスベクターは、側方に広がることができなくとも造られる。この特徴は、もし所望の目的が、特定の遺伝子を限局された数の標的細胞にのみ導入することであるなら、有用である。

【 0 0 5 9 】

上記したように、ウイルスは、多くの場合、宿主の防御機構をのがれるために、進化した非常に特異的な感染剤である。典型的には、ウイルスは特定の細胞型に感染し繁殖する。ウイルスベクターのターゲティング特異性は、前以て定められた細胞型を特異的に標的とする自然の特異性を利用してあり、それによって組替え遺伝子を感染細胞に導入するのである。本発明の方法において使用されるベクターは、標的となる所定の細胞に依存しており、当業者にはよく知られている。例えば、もし肺ガンを治療するとすれば、そのような上皮細胞に特異的なベクターが使用される。同様に、もし造血系の疾病あるいは病的状態を治療する場合、血液細胞およびその前駆体、好ましくは造血細胞の特異的な型、に特異的であるウイルスのベクターが使用される。

【 0 0 6 0 】

レトロウイルスベクターは、感染粒子としてあるいは1回限りの最初の感染を経験するためのいずれかに機能するように構成することができる。前者の場合、ウイルスのゲノムは、新しいウイルス粒子およびRNAを合成するための全ての必要な遺伝子、調節配列およびパッケージングシグナルを保持するように修飾される。一度これら分子が合成されると、宿主細胞はRNAを、更なる感染を経験することができる新しいウイルス粒子に包み込む。ベクターのゲノムは、また、所望の組換え遺伝子をコードし発現するように作り替えられる。非感染ウイルスベクターの場合、ベクターゲノムは、通常、RNAをウイルス粒子内にカプセル化するに必要とされるウイルスの、パッケージングシグナルを破壊するよう突然変異する。そのようなシグナルがないと、形成するいかなる粒子も、ゲノムを含めず、それゆえ、続いて感染を行うことができない。ベクターの特定の型は、何に使うかの意図した応用次第である。実際のベクターは、また、周知技術内で知られており、いつでも手に入り、あるいは周知の方法を用いて当業者によって構築することができる。

【 0 0 6 1 】

組換えベクターは、いくつかの方法により投与することができる。もしウイルスベクターを使うなら、例えば、手順はそれらの標的特異性を利用することができ、従って、疾患部位に局所投与してはならない。しかし、局所投与は、迅速でより効果的治療ができ、投与は、例えば、主体に静脈または皮下注射により行うこともできる。ウイルスベクターの脊

10

20

30

40

50

髓液への注射は、特に神経変性疾患の場合における投与方法として用いることができる。注射の後、ウイルスベクターは、注射に対する適当な標的特異性を有する宿主細胞を認識するまで循環する。

【0062】

代りの投与方法は、疾病または病的状態の部位に局所的に直接接種するか、栄養分と共に部位につながっている、血管系にまたは脊髄液中に接種することによって行うことができる。局所投与は、稀釀効果がないこと、そして、それゆえに、多くの標的細胞において発現を達成するために少量の投与でよいので、有利である。更に、局所接種は、ベクターを接種領域の全ての細胞に感染するように使用できるので、別の投与形態に必要とされる標的必要条件を緩和することができる。もし発現が、投与された領域内の細胞の特定の部分集合に必要であるなら、必要な部分集合に特異的であるプロモーターおよび調節要素を、この目標を達成するために使用することができる。そのような非標的ベクターは、例えば、ウイルスベクター、ウイルスゲノム、プラスミド、ファージミド、その他であり得る。リポソームのようなトランスフェクションベヒクルも、また、上記した非ウイルスベクターを、接種領域内のレシピエント細胞に導入するのに使用することができる。そのようなトランスフェクションベヒクルは、当業者によって知られている。

10

【0063】

上記した本発明の有効成分を含む医薬組成物は、医療の実施基準に従って、個々の患者の臨床状態、投与の部位および方法、投与計画、患者の年齢、性、体重その他医療の実施者に知られている因子を考慮して、投与され服用される。ここにおいて目的とする医薬として「有効な量」は、医療の分野で知られているような考慮によって決定される。その量は、医療分野の当業者による適切な手段として選択された、生存率の改善または急速な回復、あるいは、症状およびその他の指標の改善または除去を含み、それだけには限定されない、改善を達成するに有効でなければならない。医薬組成物は、有効成分の組み合わせであり得るが、しかし少なくとも1つの有効成分を含んでいる。

20

【0064】

本発明の方法において、本発明の医薬組成物は、医薬組成物中の化合物の性質を考慮した種々の方法によって投与することができる。それらは、化合物としてあるいは医薬として許容される塩として投与することができ、そして単独で、または、医薬として許容される担体、稀釀剤、佐剤およびベヒクルとの組み合わせで投与することができる、ことに注目しなければならない。化合物は、経口、皮下または静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、および鼻内、同様にクモ膜下および点滴技術を含む非経口、によって投与することができる。化合物のインプラントもまた有用である。治療される患者は、温血動物であり、特に、ヒトを含む哺乳類である。医薬として許容される担体、稀釀剤、佐剤およびベヒクル、更にインプラント担体は、一般的に、本発明の有効成分と反応しない、不活性、非毒性固体または液状賦形剤、稀釀剤またはカプセル化材料を云う。

30

【0065】

ヒトは、一般的に、マウスまたはここにおいて例示したその他の実験動物よりも長く治療され、その治療は、疾病的経過および薬の効果の長さに比例していることが注目される。投薬は、単回投与または数日に亘る多回投与であるが、単回投与が好ましい。

40

【0066】

投薬は、単回投与または数日に亘る多回投与である。治療は、一般的に疾病的経過および薬の効果の長さおよび治療されている患者の種類に比例した期間である。

【0067】

本発明の化合物を、非経口的に投与するとき、一般的に単位投与注射可能な形態（溶液、懸濁剤、乳剤）に製剤化される。注射に適した医薬剤型は、滅菌水溶液あるいは分散剤、および滅菌注射可能溶液または分散剤に再構成するための滅菌粉末を含む。担体は、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、液状ポリエチレングリコール、その他）、それらの適当な混合物、および植物油、を含有した溶液または分散媒体であり得る。

50

【 0 0 6 8 】

適当な流動性を、例えば、レシチンのような被覆の使用により、分散剤の場合には必要な粒径の保持により、および界面活性剤の使用により、保持することができる。非水性ベヒクル、例えば綿実油、ゴマ油、オリーブオイル、大豆油、トウモロコシ油、ヒマワリ油、またはピーナツ油、およびエステル、例えばミリスチン酸イソプロピル、が化合物の組成物の溶媒系として使用される。更に、抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート剤、およびバッファーを含め、組成物の安定性、無菌性、および等張性を増強する種々の添加物を加えることができる。微生物の作用の予防は、種々の抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、その他により確保することができる。多くの場合、等張剤、例えば、砂糖、塩化ナトリウム、その他を含むことが望ましい。注射可能な医薬形態の長期の吸収は吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によりもたらされる。本発明によれば、しかし、使用されるベヒクル、稀釀剤、または添加剤のいずれも、化合物と両立しなければならない。10

【 0 0 6 9 】

滅菌注射可能溶液は、本発明の実施において利用される化合物を適当な溶媒の必要とする量に、所望により、その他の種々の成分と共にとり入れることによって調製することができる。

【 0 0 7 0 】

本発明の医薬製剤は、混合しても化学変化を起こさない担体、例えば種々のベヒクル、佐剤、添加剤、および稀釀剤を含有する注射可能な製剤において、患者に投与することができる；あるいは本発明において利用される化合物は、遅延放出皮下インプラントまたは標的送達システム、例えばモノクローナル抗体、ベクター化送達、イオン導入、ポリマー基剤、リポソーム、およびミクロスフィア、の形で、非経口的に患者に投与することができる。本発明において有用な送達システムの例としては以下を含む：5，225，182；5，169，383；5，167，616；4，959，217；4，925，678；4，487，603；4，486，194；4，447，233；4，447，224；4，439，196；および4，475，196。多くの他のそのようなインプラント、送達システム、およびモジュールは当業者に周知である。20

【 0 0 7 1 】

本発明において利用される化合物の医薬製剤は、患者に経口で投与することができる。錠剤、懸濁液、溶液、乳化液、カプセル、粉末、シロップ、その他、の化合物を投与するような通常の方法が使用される。経口または静脈内に運搬し生物活性を保持している、公知の技術が好ましい。30

【 0 0 7 2 】

1 実施態様において、本発明の化合物は、血中濃度を適当なレベルにするよう静脈内注射によって最初投与することができる。患者のレベルは、経口投与形態によって保たれる、しかし他の投与形態も、患者の状態によっておよび上に示したように、使用可能である。投与される量は、治療される患者により変化し、そして、1日当たり、約 100 ng / kg 体重から 100 mg / kg 体重と変化し、好ましくは、1日当たり、10 µg / kg から 10 mg / kg である。40

【 0 0 7 3 】

本発明は、また、実施例においてここに記載したように、配列番号 1；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 4；配列番号 5；および配列番号 6 を含む群に示す、少なくとも 1 つの発現性遺伝子（上向き調節性）の存在または遺伝子産物、または配列番号 7 - 11 に示すタンパク質について、患者からの体液または組織試料を分析し、そして、もし上向き調節性遺伝子または遺伝子産物が確かめられたなら虚血と決める、ステップを包含する、患者における虚血の存在を診断する方法を提供する。体液は、虚血の発生が起りつつある組織から分泌されたタンパク質が局在している、涙、血清、尿、汗またはその他の体液を含む。遺伝子または遺伝子産物の更なる同定方法は、イムノアッセイ、例えば E L I S A、またはラジオイムノアッセイ（R I A）であり、これらは特に試料中の遺伝子産物を同定50

するために当業者に周知のものとして使用し得る。組織試料の免疫組織化学染色も、また、同定に使用される。入手できるイムノアッセイは、特許および科学文献に広範に記載されている。例えば、米国特許3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771および5,281,521を参照。更に遺伝子の同定には、プライマーとして本発明の核酸配列を使用して、*in situ*ハイブリダイゼーション、サザンプロティング、一本鎖立体配座多型、制限エンドヌクレアーゼフィンガープリント法(REF)、PCR增幅およびDNAチップ分析法を使用することができる。

10

【0074】

上記の考察は、低酸素および虚血を調節する遺伝子の使用ならびにアポトーシスおよび血管形成を、事実を基本として行ったものである。本発明で使用された方法および利用は、以下の非制限的な実施例および添付の図面によって示すことができる。

【0075】

(実施例)

方法:

分子生物学において使用されているほとんどの技術が、当該技術において広く実用化されており、ほとんどの実務家が、特定の条件および方法を記載している標準原材料に精通している。しかしながら、便宜上、以下の節は、指針として供するものである。

20

【0076】

分子生物学における一般的方法：周知の標準的分子生物学の技術および特に記載しなかつたものは、以下にもとづいた：特に、ノーザン解析および*In Situ*分析について、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1989)、およびAusbelら、「分子生物学における最新のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」、John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland(1989)、およびPerbal、「分子クローニングへの実用的手引き(A Practical Guide to Molecular Cloning)」、John Wiley & Sons, New York(1988)、およびWatsonら、「組換えDNA(Recombinant DNA)」、Scientific American Books, New York。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)については、「PCRプロトコル：方法と応用への手引き(PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications)」、Academic Press, San Diego, CA(1990)、により一般的に行われた。

30

【0077】

その他の核酸技術に関する反応および操作は、特に断らない限り、Sambrookら、1989、「分子クローニング(Molecular Cloning)」: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、および米国特許4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659および5,272,057に一般的に記載されたようにして実施され、そしてこれらは参考することによりここにとり入れられている。

40

【0078】

更に、フローサイトメトリーと組み合せて、*In situ*(*In cell*)PCRが、特異的なDNAおよびmRNA配列を含む細胞の検出に使用することができる(Testoniら、1996, Blood 87: 3822)。

【0079】

免疫学における一般的方法：免疫学の標準的方法は周知であり、特に記載しないものは、

50

一般的に、Stitesら(編)、「基礎的および臨床的免疫学(Basic and Clinical Immunology)」(第8版)、Appleton & Lange, Norwalk, CT(1994)およびMishell and Shiigi(編)、「細胞免疫学における選ばれた方法(Selected Methods in Cellular Immunology)」, W.H. Freeman and Co., New York(1980)、に従った。入手可能なイムノアッセイは特許および科学文献に広範に記載されている。例えば、米国特許3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771および5,281,521、同様にSambrookら、「分子クローニング: 実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor, New York, 1989を参照されたい。
10

【0080】

ディファレンシャル分析

例えば、C6グリオーマ細胞またはその他の適当な細胞、細胞株あるいは組織は、正常な状態(標準酸素)または通常4ないし16時間の酸素欠乏状態(低酸素)の下で増殖される。細胞を集め、RNAを細胞質抽出物および核分画から調製する。RNA抽出に次いで、蛍光cDNAプローブを調製する。各条件(例えば、4時間の低酸素および正常酸素)で、異なった蛍光色素で標識する。例えば、プローブは、低酸素の細胞から抽出したRNAからCy3-dCTP cDNAおよび正常酸素の細胞から抽出したRNAからCy5-dCTP cDNAの混合物から構成することができる。プローブは、低酸素に曝露されたC6細胞から由来の点状のcDNAクローンを個々に含有するミクロアレーにハイブリダイゼーションするのに使われる。差次的発現(differential expression)は、アレーのクローンの各々にハイブリダイズする蛍光cDNAの量によって測定される。低酸素条件下で上向き調節(up regulated)される遺伝子は、Cy3の蛍光をCy5よりも多く有している。結果は、低酸素に非常に速く応答する、転写的に誘導されたmRNAの遺伝子を示している。
20

【0081】

ディファレンシャルディスプレイ:

逆転写: RNA 2 μgを、容量6.5 μl中オリゴdTプライマーの1 pモルと、70にて5分間加熱し、氷冷してアニールする。2 μl反応バッファー(x5)、10 mM dNTP mixの1 μl、およびSuperScript II逆転写酵素(Gibco BRL)を加える。反応を42にて1時間行う。反応を70 μlのTE(10 mM、Tris、pH=8; 0.1 mM、EDTA)を加えて停止する。
30

【0082】

分別提示に使用するオリゴヌクレオチド: オリゴヌクレオチドは、一般的にDelta RNA Fingerprinting kit(Clontech Labs. Inc.)に記載されているものである。
40

增幅反応: 各反応は、20 μlで行い、50 μMのdNTP-mix、各プライマーから1 μM、1 x ポリメラーゼバッファー、expandポリメラーゼ(Beohringen Mannheim)1単位、2 μCi [-³²P]dATPおよび1 μlのcDNA鑄型、を含む。サイクリング条件は一般的に: 95で3分、次いで94で2分間、40で5分間、68で5分間の3サイクル。これは、94で1分間27サイクル、60で2分間、68で2分間と続ける。反応は、68で7分間インキュベーションし、シーケンシング停止液(95%ホルムアミド、10 mM-NaOH、0.025%プロモフェノールブルー、0.025%キシレンシアノール)20 μlを加えることによって停止した。

【0083】

10

20

30

40

50

ゲル分析：一般的に、3 - 4 μ l を 5 % シーケンシングポリアクリルアミドゲルにかけ、試料を、遅速色素（キシレンシアノール）が底から約 2 cm になるまで 2000 ボルト / 40 ミリアンペアで電気泳動する。ゲルを、ろ紙上に転移し、減圧下に乾燥し、X 線フィルムに露光する。

【0084】

分別バンドの回収：種々のプールの間で分別を示すバンドを乾燥ゲルから切り出し、微量遠心管中に置いた。滅菌 H₂O - 50 μ l を加え、管を 100 °C に 5 分間加熱した。分別呈示に使用されると同じプライマーを使用して 49 μ l - PCR 反応に 1 μ l を加え、試料を、1 分間 94 °C 、1 分間 60 °C および 1 分間 68 °C の 30 サイクルで増幅する。10 μ l をアガロースゲル上で解析し、可視化して増幅の成功を確認する。

10

【0085】

リプレゼンティショナル - ディファレンス分析

逆転写：上記と同じ、但し、2 μ g ポリ A + 選択 mRNA と共に行う。

二本鎖 cDNA の調製：前ステップからの cDNA をアルカリ処理し、mRNA を除き、沈殿し、20 μ l - H₂O に溶解する。5 μ l バッファー、2 μ l - 10 mM - dATP 、H₂O で 48 μ l にし、そして 2 μ l ターミナル - デオキシヌクレオチド - トランスクレオチドを加える。反応は、37 °C にて 2 - 4 時間インキュベートする。5 μ l オリゴdT (1 μ g / μ l) を加え、60 °C で 5 分インキュベートした。200 mM - DTT を 5 μ l 、10 × 切断バッファー (100 nM - MgCl₂、900 mM - Hepes、pH 6.6) 10 μ l 、dNTPs (1 mM) 16 μ l 、およびクレノウ 16 単位を加え、混合物を室温で一夜インキュベートし、ds - cDNA を生成させる。TE 100 μ l を加え、フェノール / クロロホルムで抽出する。DNA が沈殿し、H₂O - 50 μ l に溶解する。

20

【0086】

リプレゼンテーションの生成：cDNA を DpnII と共に、3 μ l DpnII 反応バッファー 20 V および DpnII を 25 μ l cDNA に加えて消化し、そして 37 °C にて 5 時間インキュベートする。50 μ l - TE を加え、フェノール / クロロホルムで抽出する。cDNA が沈殿し、10 ng / μ l の濃度に溶解する。

【0087】

ドライバー：1.2 μ g DpnII 消化 cDNA . 各オリゴからの 4 μ l および 5 μ l 連結反応バッファー × 10 および 60 °C 、10 分間アニールする。2 μ l リガーゼを加え、37 °C にて一夜インキュベートする。連結反応混合物を 140 μ l TE を加えて稀釀する。増幅は、適当なプライマーおよび 2 μ l 連結反応産物を用いて 200 μ l の容量で行い、各試料につき 20 管中で繰り返した。TaqDNA ポリメラーゼを加える前に、管を 72 °C に 3 分間加熱する。PCR 条件は以下の通りである：72 °C 5 分、95 °C 1 分および 72 °C 3 分の 20 サイクル、続いて 72 °C 10 分間。各 4 反応を合わせ、フェノール / クロロホルムで抽出し、沈殿させた。増幅した DNA は、0.5 μ g / μ l の濃度に溶解し、全ての試料をプールする。

30

【0088】

サブトラクション：テスター-DNA (20 μ l) を上記の DpnII で消化し、1.2 % アガロースゲル上で分離する。DNA をゲルから抽出し、2 μ g を適当なオリゴに連結する。連結したテスター-DNA は TE で 10 ng / μ l に稀釀する。ドライバー-DNA は DpnII で消化し、最終濃度 0.5 μ g / μ l に再精製する。ドライバー-DNA 40 μ g をテスター-DNA 0.4 μ g と混合する。抽出はフェノール / クロロホルムで行い、70 % エタノール 2 回洗滌で沈殿させ、DNA を 30 mM - EPDS、pH 8.0、3 mM - EDTA、4 μ l に再懸濁し、35 μ l ミネラルオイルで重層した。98 °C 、5 分間で変成させ、67 °C に冷却し、5 M - NaCl、1 μ l を DNA に加えた。67 °C で 20 時間インキュベートする。400 μ l TE を加えて DNA を稀釀する。

40

【0089】

増幅：差引きした DNA の最終濃度 200 μ l での増幅は、以下の通りである：バッファ

50

一、ヌクレオチドおよび稀釈DNA $20\ \mu l$ を加え、72℃に加温し、Taq DNAポリメラーゼを加える。72℃で5分間インキュベートし、適当なオリゴを加える。95℃、1分、70℃、3分の10サイクルを行う。72℃で10分間インキュベートする。增幅は4つの別々の管で繰り返す。増幅したDNAをフェノール／クロロホルムで抽出し、沈殿し、4つの管全てを $40\ \mu l$ 、 $0.2 \times TE$ に合わせ、マングマメのヌクレアーゼで、以下の通り消化する： $20\ \mu l$ - DNA $4\ \mu l$ バッファーに、 $14\ \mu l$ - H_2O および $2\ \mu l$ マングマメのヌクレアーゼ（10単位/ μl ） $2\ \mu l$ をくわえる。30℃、35分間インキュベート+最初のディファレンシャル産物（DPI）。

【0090】

ドライバーでの繰り返しサブトラクションハイブリダイゼーションおよびPCR増幅：適当なオリゴヌクレオチドをもちいて、ディファレンシャル比 $1:400$ (DPII) および $1:40,000$ (DPIII)。ディファレンシャル産物を、個々のクローンの解析のためにBAMHI部位でBlue scriptベクターにクローン化する。

10

【0091】

遺伝子発現ミクロアレーを用いたディファレンシャル発現

上記したようにして単離されたメッセンジャーRNAを、逆転写反応を使って蛍光dNTPを標識し、標識cDNAプローブを生成する。mRNAを、正常酸素で培養したC6細胞から抽出し、Cy3-dCTP (Amersham) で標識し、低酸素条件下で培養したC6細胞から抽出したmRNAをCy5-dCTP (Amersham) で標識する。2つの標識cDNAプローブを混合し、そして、例えば、低酸素条件下で培養したC6細胞から調製した、cDNAライブラリー由来の2000cDNAクローンからなるミクロアレー (Schenaら、1996) にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションに続いて、ミクロアレーをレーザースキャナーを用いてスキャンし、蛍光色素の各蛍光量を、試験される元のmRNA集団の各々におけるmRNAのレベルを与える、ミクロアレー上の各cDNAにつき測定する。2つの異なった蛍光色素の間のミクロアレー上の各cDNAクローンの蛍光を比較して、2つの実験条件の間の所定の遺伝子のディファレンシャル発現を測定する。

20

【0092】

In situ分析

in situ分析は、上記した低酸素条件に曝露した分別応答によって同定された候補遺伝子について行う。発現は、2つの実験系で調べた： 固形腫瘍および低酸素網膜。

30

【0093】

固形腫瘍は、マウスに、ディファレンシャル発現に使用した元のグリオーマ細胞の注射によって生じさせた。グリオーマ細胞は腫瘍を形成し、それを摘出し、薄切り、候補遺伝子の個々の発現レベルを測定するのに使用する。固形腫瘍モデル (Benjaminiら、1997) は、候補遺伝子の発現が腫瘍の中心部に見出される低酸素領域の辺りに腫瘍が活性化していることを示し、それゆえ *in vivo* 低酸素調節性である。上向き調節は、更に、上向き調節遺伝子は、腫瘍増殖を継続するに必要な血管形成を促進することができることを、示唆している。

40

【0094】

低酸素網膜モデルは、低酸素（虚血）に曝露され、そして直接網膜症を模倣している、臓器における発現レベルを測定する。網膜における低酸素は、網膜における血管を減少させる、低酸素に新生仔ラットを曝露することによって創生される (Aloniら、1995)。正常の酸素レベルに移すと、相対的な低酸素が、血液供給の欠如によって起こる。低酸素網膜を摘出し、薄切り、候補遺伝子の発現をモニターするのに使用する。

【0095】

結果

遺伝子発現ミクロアレー分析を利用して、配列番号1-6に示す遺伝子は、低酸素条件下で分化的に発現されていることが同定された。

【0096】

50

図に示すように、低酸素条件下で差次的発現が観察された。ノーザン解析を、候補遺伝子から誘導した³²P - d C T P 標識プローブで行った。mRNA 2 μg をホルムアルデヒド含有アガロースゲルで分画し、ニトロセルロース膜にプロットし、そして標識 cDNA プローブにハイブリダイズした。低酸素の結果として発現の動力学をモニターするため、mRNA を正常酸素中の細胞から調製し、そして低酸素条件に 4 および 16 時間曝露した。解析の結果は、全ての遺伝子（配列番号 1 - 6）が、遺伝子発現ミクロアレー分析によって得られた結果で確認され、低酸素条件によって誘導されていることが示された。

【0097】

固体腫瘍モデルを使用した in situ 解析において、配列番号 1 - 6 は上向き調節され、発現している。網膜モデルにおいて、配列番号 1、2 および 6 はこのモデルで上向き調節されていることが見出された。10

【0098】

配列番号 1 (RTP801) は、配列番号 2 (RTP779) のラット相同体である。タンパク質配列は、それぞれ配列番号 9 および配列番号 10 である。これら遺伝子の両方共、遺伝子データベースに報告されていない、そして低酸素ストレス下で発現され、両者の in situ 解析で上向き調節されている。この遺伝子の発現は、adctive アポトーシスが生じている卵巣で、観察されている。その調節は、HIF-1 依存性 (Carmelietら、1998) であり、更に、その遺伝子は低酸素誘導アポトーシスに関連していることを示している。いくつかの相同体が、RTP801 の 3' UTR と転写因子（ラット）pet-1 の 5' UTR の間に見出された (Carmelietら、1998; Spenceら、1998; Fyodorovら、1998)。20

【0099】

配列番号 3 (RTP241) は 1902 bp の長さで、遺伝子データベースには報告されていない、そして低酸素ストレス下で発現され、in situ 解析で上向き調節されている。この遺伝子は、cox14 遺伝子の上流に位置している酵母の遺伝子と、いくつかの相同性を有している。この配列によりコードされるタンパク質（配列番号 7）は、シグナルペプチド領域を含み、それゆえ分泌される。

【0100】

配列番号 4 (RTP220) は、4719 bp の長さで、遺伝子データベースには報告されておらず、そして低酸素ストレス下で発現され、in situ 解析で腫瘍において、上向き調節されている。この遺伝子は、ショウジョウバエからの annillin といふかの相同性を有している。タンパク質配列は、配列番号 11 に示される。30

【0101】

配列番号 5 (RTP953 / 359) は部分遺伝子配列で、遺伝子データベースには見出されておらず、そして低酸素ストレス下で発現され、in situ 解析で両者において、上向き調節されている。

【0102】

配列番号 6 (RTP971) は、低酸素ストレス下で発現され、in situ 解析で、腫瘍において、上向き調節されている。始めの解析はラット配列を使用した。配列番号 6 は、ヒト相同体で、ラット配列と相同性が 90% より大である。予備的な配列解析に基いて、遺伝子 Neuroleukin またはその遺伝子ファミリーのメンバーであるらしい。この遺伝子は低酸素条件に反応することは報告されておらず、アストロサイトに対する新しい自発運動能因子であると報告されている。報告されている遺伝子は、解糖酵素ホスホヘキソースイソメラーゼとして、そしてニューロンの生存因子として同定されているタンパク質（配列番号 8、ヒト相同体）をコードする (Niinakura、1998; Watanebeら、1996)。40

【0103】

アストロサイト自発運動能は、脳および網膜において血管の生成（血管形成）に重要な因子である。アストロサイトは、WEGF のような血管形成因子の分泌により低酸素条件下に反応するので、酸素レベルセンサーと考えることができる。実験において、初代アスト50

ロサイト培養は樹立され、*in vitro*で無血清で増殖し、そしてアストロサイトは不死化された。しかし、低酸素条件下で培養した網膜の培養からの順化培地を、アストロサイトの培養に加えると、自動運動能が観察された。もしニューロロイキン阻害剤（Obeseら、1990）、D-エリトース-4-リン酸（1.25 mMで）を加えると、アストロサイト培養において明らかな阻害の指標が見られ、このことは、アストロサイト自動運動能（および星状化）はニューロロイキン活性に依存することを示している。その他の結果は、配列番号6は、また、HIF-1依存性であり、さらに、このことは、遺伝子は、低酸素誘導性血管形成およびアポトーシスに関連していることを示している。

【0104】

この出願を通じて、米国特許を含め、種々の刊行物が、著者によって参照され、および番号により年号および特許が参照される。刊行物の全引用は以下に一覧される。これら刊行物および特許におけるそれらの内容の開示は、本発明が関連している技術水準をより完全に記載するために、本発明に参考することにより、ここにとり入れられている。

10

【0105】

本発明において、例示的方法で記載され、使用されている用語は、むしろ限定するよりも記載の用語の本質におけるものを意図していると、理解されるべきである。

【0106】

明らかに、本発明の多くの修飾および変形が、上記の教示に照らして可能である。それゆえ、付属した特許請求の範囲の範囲内において、本発明は、特異的に記載した態様とは異なる態様で実施され得ることが、理解されるべきである。

20

【0107】

引用文献

Alonら（1995）、「血管内皮細胞増殖因子新生網膜血管生存因子として作用し、かつ、未熟児網膜症に関係を持つ」、Nat. Med., 1(10):1024-1028。

【0108】

Benjaminら（1997）、「腫瘍における血管内皮細胞増殖因子（VEGF）発現の条件的スイッチング：VEGF減退による内皮細胞脱落誘導と血管芽細胞腫様脈管退行」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(16):8761-8766。

30

【0109】

Bouckら（1996）、「いかにして腫瘍は血管形成的になるか」、Adv. Cancer Res., 69:135-174。

【0110】

Bunnら（1996）、「低酸素症における酸素センシングと分子順応」、Physiol. Rev., 76:839-885。

【0111】

BurkeおよびOlson（1991）、「酵素学における方法」、194巻、「酵母遺伝学および分子生物学への手引き」（C. Guthrie および G. Fink 編）の中の「酵母人工染色体ベクターにおけるクローンライブラリーの調製」（Academic Press, Inc.）、17章、251-270頁。

40

【0112】

Capocchi（1989）、「相同的組換えによるゲノム改変」、Science 244:1288-1292。

【0113】

Carmelietら（1998）、「低酸素仲介アポトーシス、細胞増殖および腫瘍血管形成におけるHIF-1 の役割」、Nature. 394(6692):485-490。

【0114】

Daviesら（1992）、「種間遺伝子移動に対する酵母人工染色体における標的改

50

変」、Nucleic Acids Research, 20(11):2693-2698。

【0115】

Dickinsonら(1993)、「挿入ベクターを用いた高頻度遺伝子標的化」、Human Molecular Genetics, 2(8):1299-1302。

【0116】

DuffおよびLincoln(1995)、「ヒトAPP遺伝子を含有する酵母人工染色体への病原性変異の挿入とES細胞での発現」、Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders。
10

【0117】

Dorら(1997)、「虚血誘導血管形成」、Trends Cardiovasc. Med., 7:289-294。

【0118】

Dukeら(1996)、「健康と病気における細胞自殺」、Scientific American, 80-87。

【0119】

Fyodorovら(1998)、「ニューロンnAchR遺伝子転写を活性化できるP_{et-1}、新規なETSドメイン因子」、Neurobiol., 34(2):151-163。
20

【0120】

Gallagherら(1997)、「シスプラチン耐性を付与するp53遺伝的抑制エレメントの同定」、Oncogene, 14:185-193。

【0121】

Gordon(1989)、「トランスジェニック動物」、Int'l. Rev. Cytol., 115:171-229。

【0122】

Hanahanら(1996)、「腫瘍形成期間における血管形成スイッチの型と出現機構」、Cell, 86:353-364。
30

【0123】

Herskowitz(1987)、「優性負変異による遺伝子の機能的不活性化」、Nature, 329(6136):219-222。

【0124】

Holzmayerら(1992)、「ランダムDNA断片の発現選択による優性負変異体と抑制性アンチセンスRNA配列の単離」、Nucleic Acids Res., 20(4):711-717。

【0125】

Hustonら(1991)、「酵素学における方法」(JJ Langone編)の中の「一本鎖Fv類似体と融合タンパク質のタンパク工学」(Academic Press, New York, NY)、203:46-88。
40

【0126】

Huxleyら(1991)、「酵母人工染色体上のヒトHprt遺伝子は、細胞融合によってマウス細胞に転移したとき機能的である」、Genomics, 9:742-750。

【0127】

Jakobovitsら(1993)、「ヒト由来酵母人工染色体の生殖系列伝達と発現」、Nature, 362:255-261。

【0128】

JohnsonおよびBird(1991)、「酵素学における方法」(JJ Langone編)の中の「モノクローナル抗体の一本鎖Fvb誘導体の構築と大腸菌での生産」
50

、(Academic Press, New York, NY)、203:88-99。
【0129】

Lambら(1993)、「トランスジェニックマウスでの400キロ塩基アミロイド前駆体タンパク質遺伝子の導入と発現」、Nature Genetics, 5:22-29。

【0130】

Lavitranoら(1989)、Cell, 57:717-723。

【0131】

Lo(1983)、Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814。

【0132】

Mansour(1990)、「マウス胚幹細胞における遺伝子標的化：特異的改変の哺乳動物ゲノムへの導入」、GATA, 7(8):219-227。

【0133】

MernaghおよびMernagh(1995)、「植物病理学における分子的方法」(RP Singh および US Singh編)の中の「ファージ表示組換え抗体の概観」(CRC Press Inc., Boca Raton, FL), 359-365頁。

【0134】

Niinakura(1998)、「腫瘍細胞によるオートクリン運動因子としてのニューロロイキン／ホスホヘキソースイソメラーゼ／熟成因子の発現と分泌」、Cancer Res., 58(12):2667-2674。

【0135】

Obesoら(1990)、「血管内皮腫由来細胞株：内皮細胞生物学研究モデルとしての利用」、Laboratory Investigation, 83:259-264。

【0136】

Pearson および Choi(1993)、「トランスジェニックマウスでの、酵母人工染色体由来ヒト - アミロイド前駆体タンパク質遺伝子の発現」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10578-82。

【0137】

Rothstein(1991)、「酵素学における方法」、194巻、「酵母遺伝学および分子生物学」(C. Guthrie および G. Fink編)の中の「標的化、破壊、置換、および対立遺伝子救出：酵母での組み込み型DNA形質転換」(Academic Press, Inc.), 19章、281-301頁。

【0138】

Schedlら(1993)、「チロシナーゼ遺伝子を含む酵母人工染色体は、トランスジェニックマウスでコピー数依存的発現を付与する」、Nature, 362:258-261。

【0139】

Schenkら(1996)、「平行ヒトゲノム分析：1000遺伝子の微小アレイに基づく発現監視」、PNAS(USA), 93(20):10614-10619。

【0140】

Spenceら(1998)、「PET、1-[C-11]グルコースおよびFDGを用いて定量測定したヒト悪性膠腫のグルコース代謝：FDG集中定数の分析」、Nuc Med., 39(3):440-448。

【0141】

Straussら(1993)、「マウス₁(I)コラーゲン遺伝子座に広がる酵母人工染色体の生殖株伝達」、Science, 259:1904-1907。

【0142】

Thompsonら(1989)、Cell, 56:313-321。

【0143】

10

20

30

40

50

Van der Puttenら(1985)、PNAS USA, 82: 6148-6152。

【0144】

Watana be ら(1996)、「腫瘍細胞オートクリン運動因子はニューロロイキン／ホスホヘキソースイソメラーゼポリペプチドである」、Cancer Res., 56(13): 2960-2963。

【0145】

Agrawal(1996)、「アンチセンスオリゴヌクレオチド：臨床試験に向けて」、TIBTECH, 14: 376。

【0146】

Akhter ら(1991)、「アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド類似体のりん脂質膜との相互作用」、Nuc. Res., 19: 5551-5559。

【0147】

Blaesse(1997)、「癌に対する遺伝子治療」、Scientific American, 276(6): 111-115。

【0148】

Calabretta ら(1996)、「白血病治療におけるアンチセンス戦略」、Semin. Oncol., 23: 78。

【0149】

Crooke(1995)、「アンチセンス治療学における進歩」、Hematol. Pathol., 2: 59。

【0150】

Eckstein(1985)、「ヌクレオシドチオりん酸エステル」、Ann. Rev. Biochem., 54: 367-402。

【0151】

Felgner(1997)、「遺伝子治療の非ウイルス戦略」、Scientific American, June, 1997, 102-106頁。

【0152】

Gewirtz(1993)、「ヒト白血病に対するオリゴデオキシヌクレオチドを基礎とする治療」、Stem Cells Dayt., 11: 96。

【0153】

Galileo ら(1991)、J. Cell. Biol., 112: 1285。

【0154】

Hanania ら(1995)、「ヒト疾患への遺伝子治療応用における最近の進歩」、Am. J. Med., 99: 537。

【0155】

Iyer ら(1990)、J. Org. Chem., 55: 4693-4699。

【0156】

LeFebvre-d'Hellencourt ら(1995)、「サイトカインアンチセンスオリゴヌクレオチドによる免疫抑制」、Eur. Cytokine Netw., 6: 7。

【0157】

Lev-Lehman ら(1997)、「アンチセンス治療法」(A. Cohen and S. Smicsek 編)の中の「in vitroおよびin vivoでのアンチセンスオリゴマー」、(Plenum Press, New York)。

【0158】

Locke ら(1989)、「生細胞へのオリゴヌクレオチド輸送の特性化」、PNAS USA, 86: 3474。

【0159】

Morrison(1991)、「アンチセンスオリゴヌクレオチドによる塩基性線維芽

10

30

40

50

細胞成長因子発現の抑制は、形質転換ヒト星状膠細胞の成長を阻害する」、J. Biol. Chem., 266: 728。

【0160】

Radhakrishnanら(1990)、「3H-1,2-ベンゾジチオール 3-オン-1,1-ジオキシドを硫黄転移試薬として用いた硫黄含有オリゴデオキシリボヌクレオチドの自動合成」、J. Org. Chem., 55: 4693-4699。

【0161】

Rosolennら(1990)、Cancer Res., 50: 6316。

【0162】

Scanlonら(1995)、「哺乳動物遺伝子発現のオリゴヌクレオチド仲介調節」
、FASEB J., 9: 1288。 10

【0163】

Shawら(1991)、「血清中のエキソヌクレアーゼ分解作用に安定な修飾デオキシリゴヌクレオチド」、Nucleic Acids Res., 19: 747-750。
。

【0164】

SpitzerおよびEckstein(1988)、「オリゴデオキシリボヌクレオチドのチオリん酸エステル基によるデオキシリゴヌクレオチドの阻害」、Nucleic Acids Res., 18: 11691-11704。

【0165】

Uhlmann および Peyman(1990)、「アンチセンスオリゴヌクレオチド：新治療法の原理」、Chem. Rev., 90(4): 543-584。 20

【0166】

Wagnerら(1996)、「アンチセンスヘプタヌクレオチドによる遺伝子発現の有力かつ選択的阻害」、Nature Biotechnology, 14: 840-844。

【0167】

Wagner(1994)、「アンチセンスオリゴデオキシリゴヌクレオチドを用いた遺伝子阻害」、Nature, 372: 333。

【0168】

Whitesellら(1991)、「エピソーム生産N-mycアンチセンスRNAは、初代神経外胚葉細胞株の分化能を制限する」、Mol. Cell. Biol., 11: 1360。 30

【0169】

Yakubovら(1989)、PNAS USA, 86: 6454。

【0170】

Wright & Anazodo(1995)、「アンチセンス分子と、癌および AIDS 治療に対するその能力」、Cancer J., 8: 185-189。

【0171】

Woolfら(1990)、「Xenopus oocytes(アフリカツメガエル)および胚での非修飾のおよびチオリん酸エステルのアンチセンスオリゴデオキシリゴヌクレオチドの安定性、毒性および有効性」、Nucleic Acids Res., 18: 1763-1769。 40

【0172】

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人: Einat, Paz

Skaliter, Rami

(ii) 発明の名称: 低酸素調節性遺伝子

(iii) 配列の数: 11

(i v) 通信先住所 :

(A) 受信人 : KOHN & ASSOCIATES

(B) 街 : 30500 Northwestern Hwy., Suite 401

(C) 市 : Farmington Hills

(D) 州 : ミシガン

(E) 国 : 米国

(F) 郵便番号 : 48334

(v) コンピューター読み取り形式

(A) 媒体 : フロッピーディスク

(B) コンピューター : IBM PC コンパチブル

10

(C) OS : PC - DOS / MS - DOS

(D) ソフトウェア : Patent In Release #1.0, バージョン #

1.30

(vi) 出願データ

(A) 出願番号 :

(B) 出願日 :

(C) 分類 :

(vii) 代理人 / 特許事務所情報

(A) 氏名 : Kohn, Kenneth I.

(B) 登録番号 : 30,955

20

(C) 参照番号 : 0168.00038

(ix) 電話通信情報

(A) 電話 : (248) 539-5050

(B) テレファックス : (248) 5395055

【0173】

(2) 配列番号 : 1 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1754 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

30

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iii) ハイポセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : NO

【0174】

(xi) 配列 : 配列番号 : 1 :

【化1】

CCCCCGGGGG AGGTGCGAGA GGGCTGGAAA GGACAGGTCC GGGCAGCGAT CGGGGGTTGG	60
CATCAGTTCG CTCACCCCTTC GAGAGGCAGA TCGCTCTTGT CCGCAATCTT CGCTGACCGC	120
GCTAGCTGCG GCTCTCTGTC TCCTTCGCCG AACCTCATCA ACCAGCGTCC TGGCGTCTGA	180
CCTCGCCATG CCTAGCCTTT GGGATCGTTT CTCGTCCTCC TCTTCCTCTT CGTCCTCGTC	240
CCGAACCTCG GCCGCTGATC GGCGCCCGC CTCCGCCCTGG GGGTCTCGGG CCAGAGAAAGA	300
GGGCCTTGAC CGCTGCGCGA GCCTGGAGAG CTCGGACTGC GAGTCCCTGG ACAGCAGCAA	360
CAGTGGCTTT GGGCCGGAGG AAGACTCCTC ATACCTGGAT GGGGTGTCTC TGCGTACTT	420
TGAGCTGCTC AGTGACCCCG AGGATGAGCA CCTGTGTGCC AACCTGATGC AGCTGCTGCA	480
GGAGAGCCTG TCCCAGGCGC GATTGGGCTC GCGGCGCCCT GCGCGCCTGC TGATGCCGAG	540
CCAGCTGTT AGCCAGGTGG GCAAGGAAC CCTGCGCCTG GCGTACAGCG AGCCGTGCGG	600
CCTGCGGGGG GCACTGCTGG ACGTCTGTGT GGAGCAAGGC AAGAGCTGCC ATAGTGTGGC	660
TCAGCTGGCT CTGGACCCCA GTCTAGTGC CACCTTCAG TTGACCCCTGG TGCTGCGTCT	720
GGACTCTCGC CTCTGGCCCA AGATCCAGGG CCTGTTGAGT TCTGCCAACT CTTCTTGGT	780
CCCTGGTTAC AGCCAGTCCC TGACGCTGAG CACCGGCTTC AGAGTCATCA AAAAGAAACT	840
CTACAGCTCC GAGCAGCTGC TCATTGAAGA GTGTTGAAC TCGTCCTGGA GGGGGGCCGC	900
ACTGCCCCCC AAAGTGGAGA CAAGGAATTCT GTGTTGGAGA GACCCGCAGG CAAGGACTGA	960
AGGACTGTCC CCTGTGTTAG AAAACTGACA ATAGCCACCG GAGGGGCGCA GGGCCAGGTG	1020
GGAGAAGGAA GTGTTGTCCA GGAAGTCTCT AGGTTGTGTG CAGGTGGCCC CCTGTTGGGG	1080
CACATGCCCA TCAGTACTGT AGCATGAAAC AAAGGCTTCG GAGCCACACA GGCTTCTGGC	1140
TGGATGTGTA TGTAGCATGT ATCTTATTAA TTTTTGTATT ACTGACAAGT TACAACAGCA	1200
GTTGTTGGCC AGAGTCAGAA GGGCAGCTGG TCTGCACTGG CCTCTGCCCG GGCTGTTGTGC	1260
TGGGGGGAGG CGGGGGGGAGG TCTCCGACAG TTTGTCGACA GATCTCATGG TCTGAAAGGA	1320
CCGAGCTTGT TCGTCGTTTG GTTTGTATCT TGTTTTGGGG GTGGGGGTGGG GGGATCGGAG	1380
CTTCACTACT GACCTGTTCG AGGCAGCTAT CTTACAGACT GCATGAATGT AAGAACATAGGA	1440
AGGGGGTGGG TGTTAGGATC ATTTGGGATC TTCAACACTT GAAACAAAAT AACACCAGGG	1500
AGCTGCATCC CAGCCCCATCC CGGTGCCGGT GTACTGGAGG AGTGAACGTG GAGGGGATGG	1560
GGCTGAGGGGG GGTGGGGGGC TGGAACCCCTC TCCCCCAGAG GAGCGCCACC TGGGTCTTC	1620
ATCTAGAACT GTTTACATGA AGATACTCAC GGTTCATGAA TACACTTGAT GTTCAAGTAC	1680
TAAGACCTAT GCAATATTTT TACTTTTCTA ATAAACATGT TTGTTAAAAC AAAAAAAA	1740
AAAAAAAAAA AAAA	1754

【 0 1 7 5 】

(2) 配列番号 : 2 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 7 8 2 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎮の数 : 一本鎮

(D) トポロジー : 直鎮状

(i i) 配列の種類 : c D N A

(i i i) ハイポセティカル配列 : N O

(i v) アンチセンス : N O

【 0 1 7 6 】

(x i) 配列 : 配列番号 : 2 :

【化2】

10

20

30

40

TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTGGCACG AGGGGGGAG GTGCGAGCGT GGACCTGGGA	60
CGGGTCTGGG CGGCTCTCGG TGGTGGCAC GGGTTCGCAC ACCCATTCAA GCGGCAGGAC	120
GCACTTGTCT TAGCAGTTCT CGCTGACCGC GCTAGCTGCG GCTTCTACGC TCCGGCACTC	180
TGAGTTCATC AGCAAACGCC CTGGCGTCTG TCCTCACCAT GCCTAGCCTT TGGGACCGCT	240
TCTCGTCGTC GTCCACCTCC TCTTCGCCCT CGTCCTTGCC CCGAACTCCC ACCCCAGATC	300
GGCCGCCGCG CTCAGCCTGG GGGTCGGGA CCCGGGAGGA GGGGTTGAC CGCTCCACGA	360
GCCTGGAGAG CTCGGACTGC GAGTCCCTGG ACAGCAGCAA CAGTGGCTTC GGGCCGGAGG	420
AAGACACGGC TTACCTGGAT GGGGTGTCGT TGCCCGACTT CGAGCTGCTC AGTGACCCCTG	480
AGGATGAACA CTTGTGTGCC AACCTGATGC AGCTGCTGCA GGAGAGCCTG GCCCAGGCGC	540
GGCTGGGCTC TCGACGCCCT GCGCGCCTGC TGATGCCCTAG CCAGTGGTA AGCCAGGTGG	600
GCAAAGAACT ACTGCGCCTG GCCTACAGCG AGCCGTGCGG CCTGCGGGGG GCGCTGCTGG	660
ACGCTCTCGT GGAGCAGGGC AAGAGCTGCC ACAGCGTGGG CCAGCTGGCA CTCGACCCCA	720
GCCTGGTGCC CACCTTCCAG CTGACCCCTCG TGCTGCCCT GGACTCACGA CTCTGGCCCA	780
AGATCCAGGG GCTGTTTAGC TCCGCCAACT CTCCCTTCCT CCCTGGCTTC AGCCAGTCCC	840
TGACGCTGAG CACTGGCTTC CGAGTCATCA AGAAGAACCT GTACAGCTCG GAACAGCTGC	900
TCATTGAGGA GTGTTGAACT TCAACCTGAG GGGGCCGACA GTGCCCTCCA AGACAGAGAC	960
GAETGAACCTT TTGGGGTGGG GACTAGAGGC AGGAGCTGAG GGACTGATTC CTGTGGTTGG	1020
AAAATGAGG CAGCCACCTA AGGTGGAGGT GGGGAAATAG TGTTTCCAG GAAGCTCATT	1080
GAGTTGTGTG CGGGTGGCTG TGCATTGGGG ACACATAACC CTCAGTACTG TAGCATGAAA	1140
CAAAGGCTTA GGGGCCAACA AGGCTTCCAG CTGGATGTGT GTGTAGCATG TACCTTATTA	1200
TTTTGTTAC TGACAGTTAA CAGTGGTGTG ACATCCAGAG AGCAGCTGGG CTGCTCCCGC	1260
CCCAGCCCCG CCCAGGGTGA AGGAAGAGGC ACGTGCTCCT CAGAGCAGCC GGAGGGAGGG	1320
GGGAGGTCGG AGGTCGTGGA GGTGGTTGT GTATCTTACT GGTCTGAAGG GACCAAGTGT	1380
TTTTGTTGTT TGTTTTGTAT CTTGTTTTC TGATCGGAGC ATCACTACTG ACCTGTTGTA	1440
GGCAGCTATC TTACAGACGC ATGAATGTAA GAGTAGGAAG GGGTGGGTGT CAGGGATCAC	1500
TTGGGATCTT TGACACTTGA AAAATTACAC CTGGCAGCTG CGTTTAAGCC TTCCCCCATC	1560
GTGTACTGCA GAGTTGAGCT GGCAGGGGAG GGGCTGAGAG GGTGGGGCT GGAACCCCTC	1620
CCCAGGGAGGA GTGCCATCTG GGTCTTCCAT CTAGAACTGT TTACATGAAG ATAAGATACT	1680
CACTGTTCAT GAATACACCTT GATGTTCAAG TATTAAGACC TATGCAATAT TTTTACTTT	1740
TCTAATAAAC ATGTTTGTAA AAACAAAAAA AAAAAAAAAA AA	1782

【0177】

(2) 配列番号：3に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 1900 塩基対

(B) 配列の型： 核酸

(C) 鎮の数： 一本鎮

(D) トポロジー： 直鎖状

(i i) 配列の種類： cDNA

(i i i) ハイポセティカル配列： NO

(i v) アンチセンス： NO

【0178】

(x i) 配列： 配列番号：3：

【化3】

10

20

30

40

CCATCCCTCA TAGGACTAAT TATAGGGTTG GGGGGGCCGC CCCCCCAGGT TCGAGTGGCG	60
ATGGGCCCGCG GCTGGGGCTT GCTCGTCGGA CTCTTGGCG TCGTGTGGCT GCTGCGTCG	120
GGCCAGGGCG AGGAGCACAC GCGGCACAGC GGTGTTTCTG TCAGGTTAGT	180
GGTTACCTGG ATGACTGTAC CTGTGATGTC GAGACCATCG ATAAGTTAA TAACTACAGA	240
CTTTTCCCAA GACTACAAAAA GCTCCTTGAA AGTGAECTACT TTAGATACTA CAAGGTAAC	300
TTGAGGAAGC CATGTCCTTT CTGGAATGAC ATCAACCAAT GTGGAAGAAC AGACTGTGCT	360
GTCAAACCCCT GCCATTCTGA TGAAGTCCCT GATGGAATTAGTCTGAGAG AGTCTGCGAG CTACAAGTAT	420
TCCAAGGAAG CCAACCTCCT TGAGGAGTGT GAGCAGGCTG AGCGGCTCGG AGCAGTGGAC	480
GAATCTCTGA GTGAGGAGAC CCAGAAGGCT GTTCTTCAGT GGACGAAACA CGATGATTC	540
TCAGACAGCT TCTGTGAAGT TGATGACATA CAGTCCCCCG ATGCTGAGTA TGTGGATTTA	600
CTCCTTAACC CTGAGCGCTA CACAGGCTAC AAGGGGCCGG AGCGCTGGAG GATATGGAGT	660
GTCATCTATG AAGAAAACGT CTTTAAGCCA CAGACAATTAA AAAGGCCTTT GGCTTGGGG	720
CAAGGAAAAC ATAAAGAGAA CACATTTAC AGCTGGCTAG AAGGCCTCTG TGTAGAAAAG	780
AGAGCATTCT ACAGGCTTAT ATCTGGCTA CACGCAAGCA TCAATGTACA TTTGAGTGCA	840
AGGTATCTTT TACAAGATAA TTGGCTGGAA AAGAAATGGG GTCATAATGT CACAGAGTTT	900
CAGCAGCGCT TTGATGGGGT TTTGACAGAA GGAGAAGGCC CCAGGAGGCT GAAGAACCTG	960
TACTTTCTTT ACCTGATAGA GTTAAGGGCT CTCTCTAAAG TGCTTCCGTT TTTCGAGCGC	1020
CCAGATTTTC AGCTCTTCAC TGGAAATAAA GTTCAGGATG TGAGAAAACAA AGAGTTACTT	1080
CTGGAGATTC TTCATGAAGT CAAAGTCATT CCTTTGCATT TTGATGAGAA TTCTTTTTT	1140
GGGGGGATA AAAACGAAGC ACATAACCTA AAGGAGGACT TCCGCCTACA CTTTAGAAC	1200
ATCTCGAGGA TCATGGACTG CGTCGGCTGC TTCAAGTGCC GCCTGTGGGG CAAGCTTCAG	1260
ACTCAGGGTC TGGGCACCTGC TCTGAAGATC TTGTTTCTG AAAAAGTGT CGCAAATATG	1320
CCCGAAAGCG GACCCAGTTA TGAATTCCAG CTAACCAGAC AAGAAATAGT GTCGTTGTT	1380
AATGCATTGCG GAAGGATTTC CACAAGTGTG AGAGAATTAG AGAACATTCAG ACACATTGTTA	1440
CAGAATGTT ACTGAGGAGG GCGGCTGGAA CCTGCTTGT TCTGCACAGG GGAGTCCAGA	1500
GGGCAGAAATG TCTGAGCACG GTGATTGCAG TGACCGTCT GAGCCAAACG TTCAATATCAA	1560
GCTGCCTTTG TCAAAGGAGA GATACATTGT TTAAAGTAA TGACATTGTTT AAACATTGTG	1620
TTCATGTTA ATATTATTGT GAATAAAAGT AGTATTGTTG TAATGTACAA ATTTTAATAC	1680
TAAGCAAAAG TAAGTCATT AAATTGCCCT ATGATGGGGT TGGGGATTTA GCTCAGTGGT	1740
AGAGCTCTTG CCTAGGAAGC GCAAGGCCCT GGGTTCGGTC CCCAGCTCCG AAAAAAAAGA	1800
ACCCCCCCCA CAAAAAAAT TGCCCCATA AAAAGGGTAG GTGAATCCTG CCCCAGGCTC	1860
TCCACCTAAA TTTTTTTTG AAAACTTTTT TCCCCCAAGG	1900

【0179】

(2) 配列番号：4 に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 4121 塩基対

(B) 配列の型： 核酸

(C) 鎮の数： 一本鎮

(D) トポロジー： 直鎮状

(i i) 配列の種類： cDNA

(i i i) ハイポセティカル配列： NO

(i v) アンチセンス： NO

【0180】

(x i) 配列： 配列番号：4 :

【化4】

10

20

30

40

RTTTTTTTTT CCTTTNNAAA NGGNNAAGN NTTCCCCCN CCTTCCTTCN ANTTAAAAAT	60
TTGGNANCCC AAAANGCTTN GGGGGGCNNN GGGNNCCNCNT NGGGGNTTGG GGAGTTNCNC	120
CNGGNGANNT TTNCAAGNAA NTTAAANATT TTTTCACCCA ATCNCCTTT TGGGGAAAAG	180
CCTTGCCCTTC ACCTTTCCAA AGCCAACCCG TTTTCAAAGG CTTCAGGTAC CCCCAGTTGG	240
GGAGAAGGGG CCTTTCTGGC CAACCCTTGC TGGCAACGA TTTGGTTCCCT GGGAAAGATGA	300
TGTTAACGTA ATTCAATTCTG CCAAAGCCAA AATAGTGTAA CAAGAACAGC CTGGTACCGG	360
CTTGTCTTATC CCRAATCTTC TTCTGCAAGT GGACCATCTG CTAGCATCAA TAGTAGCAGT	420
GTTTCAGCAG GAAGCTACAT GCTGTTCCCA AAGGGATGGC AATGCCTCTG TCAAGGAAAG	480
ACCCAACCTTC AAATGCTGCC GATGGGCCTT TGCTTAAAGC CTCAGTGTCC AGCCCTGTGA	540
AAGCATCTTC TTCCCTGTG AGATCCGCTC CATTCAATCAC TAGAAACTGT GAGGTGCAGA	600
GTCCTGAGCT ACTTCACAAA ACTGTTAGTC CTCTGAAAAC AGAGGTGTTG AAACCATGTG	660
AGAAGCCAAC TTTATCCCAG GCACCTTCAGC CCAAAGAGGG AGCTAACAAAG GAAGTTTGTG	720
TACAGTCACA GTCCAAGGAC AAACTTGCAA CACCAGGAGG AAGAGGAATT AAGCCTTCC	780
TGGAACGCTT TGGAGAGCGT TGTCAAGAAC ACAGTAAAGA AAGTCCAAC TGCAGAGCAT	840
TTCATAGAAC CCCAAATATC ACTCCAAATA CAAAAGCTAT CCAGGAAAGA TTATTCAAGC	900
AAAACACGTG TTTCATCTAC TACCCCAATT TAGCACAGCA GCTCAAACAG GAGCGTGAAA	960
AGGAACCTGGC GTGTCTCCGT GGCGATTG ACAAGGGCAG TCTCTGGAGT GCAGAGAAGG	1020

【化5】

ATGAAAAGTC AAGAAGCAA CAGCTAGAAA CCAACAGGAA GTTCACTGTC AGAACTCTCC	1080
CCTCAAGAAA CACCAAATTG TCTCAAGGCAC CCCCCGTGAC CTCTGTGTCA GATAAAGTGG	1140
CTGAGACTCC AACCGCAGTG AAGATTCTG GTACAGAGCC TGCAGGTTCC ACTGAAAGCG	1200
AAATGACAAA GTCCAGCCCT TTGAAAATAA CATTGTTTT AGAAGAGGAG AAGTCCTTAA	1260
AAAGTAGCATC AGACCCGGAG GTTGGAGCAGA AGACTGAAGC AGTGCATGAA GTAGAGATGA	1320
GTGTGGACGA TGAGGATATC AACAGCTCCA AGTCATTAAC GACATCTTCA GTGANITCCC	1380
TAGNGGAANG CGGAACGTGGA CNGTGGAAAA GANCCAAGGA GGAGATGGAC CAAGTGGGGA	1440
ACGGAAAGCA GCGGAGGNCA GGAAGATGTG CNGAATATCT CCTCAATNTC TTNACANGNT	1500
CCCGCTGGCT CAGACGGTTC GGCCTGGTGA ATCTACAGAA TGTAATTCTC TCACCTGAGT	1560
TGGAATTGAG AGACTATAGC CTGAGTGCTC CAAGTCCCAA ACCAGGAAAA TTCCAAAGAA	1620
CTCGTGTCCC CCGAGCAGAA TCTGGTGACA GCCTCAGTTC TGAGGACCGG GACCTTCTTT	1680
ACAGCATTGA TGCATATAGG TCTCAAAGAT TCAAAGAAC AGAACGCCCT TCCATAAAAGC	1740
AAAGTGTATTG TCGAAAGGAA GATGTTACTT CAAAATTGAG TGAAAAGAAT GGTGTCTTT	1800
CTGGTCAGT TAATATCAA CAAAAAAATGC AGGAACCTCAA TAATGACATA AATTIGCAGC	1860
AGACAGTGAT CTATCAGGCC AGCCAGGCTC TCAACTGCTG TGTTGATGAA GAGCACGGGA	1920
AAGGATCCCT GGAAGAACGCT GAGGCAGAAA GGCTCTTCT GANTGCAACT GAGAAAAGAG	1980
CACTTCTGAT TGACGAACGT AATAAGCTGA AGAGTGAAGG ACCTCAGAGG AGAAACAAAGA	2040
CCGCTGTCGC ATCCCAGAGT GGATTTGCC CATGTAAGG GTCAGTCACC TTGTCAGAGA	2100
TCTGCCTGCC TCTGAAGGCA GAGTTTGAT GCAGCACCGC GCAAAAGCCA GAGTCATCGA	2160
ATTACTACTA CTTAATTATG CTTAAAGCTG GGGCTGAGCA GATGGTGGCC ACCCCATTAG	2220
CAAGTACTGC AACTCTCTTA GTGGTGATGN CCCTGACATT CCCCACCACG TTACCCCGA	2280
ANGATTTTC CAATGACTTT GAAATAAAATG TTGAAGTTA CAGCTTGGTA CAAAAGAAAG	2340
ATTCCTTCAG GCCTGAGAAG AAGAAGAAGG CGTCCAAGTT TAAGGCTATT ACTCCAAAGA	2400
GACTCCTCAC ATCTATAACT TCRAAAAGCA GCCTTCATGC TTCAGTTATG GCCAGTCAG	2460
GAGGCTCTAG TGCTGTGCGC ACCAGCAACT TTACCTCTAGT TGGATCTCAC ACACCTCCT	2520
TATCTTCTGT TGGAGACACT AAGTTTGCTT TGGACAAGGT ACCTTTTTTG TCTCCGTTGG	2580
AAGGTCACAT CTGTTAAAAA ATAAGCTGTC AAGTGAATTG AGCTGTTGAG GAAAAGGTT	2640
TCCTTACCAT ATTGAAAGAT GTTAGTGGCTT TTGGTGCGCTG GCACCGAAGA TGGTGTGTT	2700
TCTCTGGCAA CTGTATCTCT TACTGGACTT ACCCAGATGA TGAGAGGCCA AAGAATCCCA	2760
TAGGAAGGAT AAATCTGGCC AATTGTATCA GTCATCAGAT AGAACCCAGCC AACAGAGAAT	2820
TTTGTGCAAG ACGCAACACT CTGGAATTGA TTACTGTCCG ACCACAAAGA GAAGACGATC	2880
GAGAAACTCT TGTCAGCCAT GTAGAGACAC ACTCTGTGTC ACCCAAGAAC TGGCTCTCTG	2940
CAGATACTAA AGAAGAGCGG GATCTCTGGA TGCAGAAACT CAACCAGGTC ATTGTTGATA	3000

【化6】

TTCGCCTCTG GCAGCCTGAT GCATGCTACA AGCCTGTTGG GAAGCCTTAA GCCGAGGAGC	3060
TTCTGCACCG TGAGAGACTT TGCTAGCTGT GTCTTCTTAA GAAGACAGTT AGAACAGCA	3120
GATTTGCAGG TTGTATTCTA TGCTTTAAAT ATAAAAGGGT ATGTGCAAAT ATTCACTACA	3180
TATTGTGCAG TATTATATC TTTCTATGT AAAACTTCAC CCAGTTGTC TTGCAITCGT	3240
ACATGTTGA CAGTCAAATA CTAACAATAT TCATGAGAAT TGATATCCAT GCTAAATATA	3300
ACATTAAGAG TCTTGTTTA TAGAACCTC ACTAGCCAGT TATTCATGAC AAAAACTATT	3360
ATAATCAAGT TCTGATTGT CCTTTGGAGC TGTGGGTTG AAGGTATTAA GGTCTCAAAC	3420
AGAAACATTT CAGGACATGT TTAGTAAAGA GATGAGAAAA GGCAGCAAAC ACTAGTTAA	3480
10 GCTGCTCAGA GCTGCTTCC GCAGAGCTGT GGGCAGGACA CCGTAACATT TGGGCTGCA	3540
TAGTCTATGC TGAAGGGTTA AGAGTCACAC AGCTAGTGCT CACTCTGACC CTACGTGTGC	3600
AGTGTGGGC ACCTCTCAC AGTGCTCAGG CTTTACTTAA ACAGCTATT TTCACTGTAGT	3660
TGAGGATCCT CATTAAACATG TTCAGCCTTT TCTCTTATTA CAAGAGCAAA TGAAATTGG	3720
AAAAACACAT ACATAAGGAA TTTCTACCAA GCTGCTGTGA CTACTCCTTT GCTTCCCAGA	3780
GTTCTTGTCT CGTTTCCCTT TCATGTTGAT CTAAAACACT TTACAAATCT GTTTTGAGAT	3840
CACTGAAAAA TATATAAAGC TATGCATTCC CTTTAAAGCC CAATGCCTTC TTGCAATTAA	3900
AAAATATTAC AATGCATGGC TGCAGTTTT AAATAGTCTG TGTTTCTCCT CTGACTGTCA	3960
30 GTTTATTGAT GGTTTCATTT ATAAAACACT AAATTCTATC ACTTGCCATT ATATTTCTTA	4020
CTCCATTAA ATGTGGGTTT TCTTATGTAT ATTATAAAAG TATTTTATGA CTCCTACATA	4080
AATAAATAAT GTGGAATTGT CNAAANCAA AAAAAAAA A	4121

【0181】

(2) 配列番号：5に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 2059 塩基対

(B) 配列の型： 核酸

30

(C) 鎖の数： 一本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： cDNA

(iii) ハイポセティカル配列： NO

(iv) アンチセンス： NO

【0182】

(xi) 配列： 配列番号：5：

【化7】

ACAAACCACC AAACCACCAA ACCTGTTTAC TCAGATTCA GGATTGTTCA CATATGTTTT	60
40 AACCACTCAC CCCACCTCAC AGAGGTGACC GAACCCAGGA CTTCAGTCAT GCTGGCTAG	120
CCCTGCATCC ATGAGCTGTG TGCCCTCAGG CCCTTGCTTA AGCTCCTACG TAGACGTAGA	180
TGTCCTGTT TTATTTAAGG ATTTGAAAAC CAGTCATGGG CACCATGATT TAACACAAAA	240
TACTTCAGTG TGATGGTCTA ATTCCTGAA AATAATTGTT TGTTCTCTT TCAAGGAAAA	300

【化8】

ACCAAACCTT ATGAATCCGA GCCGAACTAT TATAAGCCTT AAAATAAGGA GCCGCCGCC	360
CCACATCCC GTCACCCAGT GTTTGAGTTT GGTTGCCCTT TCTCACCTGT GTAATCACAG	420
GGTATACAAT TCATGTTCT TATGCATGAA ATTAATTTC TTTCCCTCTG TGGAGTGGG	480
CTATATTTTA GACAGGTTT TATTCGTGGA AGCTCTTCAC TGAGAGCAAT ATTTGAAGTG	540
GCTTAAGAAT TTACGTCACA GCATTTATAA ATGATATACC TCAAAGTTAT GCTCCTTGA	600
TGTCATATAA TGTCTTGAGC AGTTAGGACA GGTTGAGATG TGACATAAGA AAAAGCAGGA	660
TATGTATGTA ATGGATAGGA ATGTCACCTT ACACTGTTGT GTATTTCTC TGTCCTAAG	720
ACTTGGTGTA GTGCCAAGCA TACAGTTGGT ATCTAATTTT TGTTGATGGA AAGTGTATGG	780
ATTTAGTATA CCTTAAGTGA ATGGTGTAGC TTGTGTAACA ATGTACCCCTA TCTCCCCCTTC	840
CCTCTCACTT TTTCTTCAA ATCGCATAAT AAACCCACAG ATTAGATCAG CTTTCTGGC	900
GGCGACTTCG AAAAGTACTA AATGATCACC GCACAGAAC CAGCCCTTG AAACCCCTCAC	960
TGCTTTCACT TGCGTTCTCC CACTTGACTG TCCCTGTGTC CTCTGTCCTCT CCAAGGAAGG	1020
TCTAAACTCC TACGTCTTC GTTAACAAGC AGTTTAATTT TTAAGAAAATC TTAACCTTTTC	1080
CTGTGCTTGA CACAATTGAC AATCCCTTTC TTCAAGCCCC ACCACTCTGC GTCCCTGTAT	1140
CTGGCTTGCT CTCGGTCTC TTCCCTCTGG TCTCTTCATG TAACCGAAAT ATTAATTCCC	1200
CAGACTTTTC TTTCTTGCTC TAAGTCACTG GACCATACTC TTGTGTAATT TCCATGCAGT	1260
CATCTTATCT TAGCTTCTGT TTTCCTGCTG CGGTCACTTG GCTACCTGTT GCCACGTCTT	1320
CAAGGACTCA CTCGTTTGC GCTCCTCACT TGGTTAGTTT CAGAACATTA CACTGTTCAA	1380
GGTTCTCCAG TTCGCTCTTC TGCTCTCTGC CTGACTATCG GTGTCTACGT TCTGCTGCTT	1440
CTACTCCAAC ATTTCTATCA CTGTCTTCA ATTTTATTAA CAGTTACTCA AAGGATTTCC	1500
TGTGTTTATT TTCCCATCTC TGTTGGCCCA GATTACCGAA TTGGGCTTTC TAGAAGCATT	1560
CAGCCTCATC CCTGCTACAG GCAGTTTAG GAGCTTTTG GTGAGAGTCT CTGCTTGGTA	1620
TCTAAGACCC TCCTCTTGTG TTTGCCACTC TGCTCTGATA AGAGTGTAA AGAGTTTCC	1680
AGAAAGTCCAG AGTTGTAGCC CTCCAGACCT TCGTAGACAC CATATTTGCA TGGAGAGCCC	1740
TAGGCTCTT CTGGGAAACT CCATGCGTTC TTGAGACTCT GTGACATTAA TTACCCCTGGC	1800
CCTTCCTTGT GTCACCATTA TAGTTGCAAC CTACCTCTAT TGAATCACTT ATTGTACTGT	1860
ATATTTTATT TTAAAGTG TCCTTACTA GAATGTGAGC TCCTCAGGGG CAGGCAAAGA	1920
AACTTCATTC ATTTGGCATC TCTATAGCAT AATGTTGGT ATATGAGCAT TTAATAAAATG	1980
TTGAATAAT TGTTCACAT GACAGCTGTT CCTCATGGCG GGCGCTTCA CTGCCTTGT	2040
TGCAAAACGG GGGGGAAAA	2059

【 0 1 8 3 】

(2) 配列番号 : 6 に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1 9 8 7 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : c D N A

(i i i) ハイポセティカル配列 : N O

(i v) アンチセンス : N O

【 0 1 8 4 】

(x i) 配列 : 配列番号 : 6 :

【化9】

10

20

30

40

CTCGAGAGCT CCGCCATGGC CGCTCTCACCC CGGGACCCCC AGTTCCAGAA GCTGCAGCAA	60
TGGTACCGCG AGCACCGCTC CGAGCTGAAC CTGGCCGCC TCTTCGATGC CAACCAAGGAC	120
CGCTTCAACC ACTTCAGCTT GACCCTAAC ACCAACCATG GGCATATCCT GGTGGATTAC	180
TCCAAGAACC TGGTGACGGA GGACGTGATG CGGATGCTGG TGGACTTGGC CAAGTCCAGG	240
GGCGTGGAGG CGGCCCCGGGA GCGGATGTT AATGTGAGA AGATCAACTA CACCGAGGGT	300
CGAGCGCTGC TGCACGTGGC TCTGCGAAC CGGTCAAACA CACCCATCCT GGTAGACGGC	360
AAGGATGTGA TGCCAGAGGT CAACAAGGTT CTGGACAAGA TGAAGTCTTT CTGCCAGCGT	420
GTCCGGAGCG GTGACTGGAA GGGTACACA GGCAAGACCA TCACGGACGT CATCAACATT	480
GGCATTGTCG GCTCCGACCT GGGACCCCTC ATGGTACTG AAGCCCTAA GCCATACTCT	540
TCAGGAGGTC CCCGCGTCTG GTATGTCTCC AACATTGATG GAACTCACAT TGCCAAAACC	600
CTGGCCCAGC TGAACCGGA GTCCCTCCCTG TTCATCATTG CCTCCAAGAC CTTTACTACC	660
CAGGAGACCA TCACGAATGC AGAGACGGCG AAGGAGTGGT TTCTCCAGGC GGCCAAGGAT	720
CCTTCTGCAG TGGCGAAGCA CTTTGTGCC CTGTCTACTA ACACAACCAA AGTGAAGGAG	780
TTTGGAAATTG ACCCTCAAAA CATGTTCGAG TTCTGGGATT GGGTGGGAGG ACGCTACTCG	840
CTGTGGTCG CCATCGGACT CTCCATTGCC CTGCACGTGG GTTTTGACAA CTTCGAGCAG	900
CTGCTCTCGG GGGCTCACTG GATGGACCAAG CACTCCGCA CGACGCCCT GGAGAAGAAC	960
GCCCCCGTCT TGCTGGCCCT GCTGGGTATC TGGTACATCA ACTGCTTGG GTGTGAGACA	1020
CACGCCATGC TGCCCTATGA CCAGTACCTG CACCGCTTTG CTGCGTACTT CCAGCAGGGC	1080
GACATGGAGT CCAATGGAA ATACATCACC AAATCTGAA CCCGTGTGGA CCACCAAGACA	1140
GGCCCCATTG TGTGGGGGGA GCCAGGGACC AATGGCCAGC ATGCTTTTA CCAGCTCATC	1200
CACCAAGGCA CCAAGATGAT ACCCTGTGAC TTCCCTCATCC CGGTCCAGAC CCAGCACCCC	1260
ATACGGAAGG GTCTGCATCA CAAGATCCTC CTGGCCAATCT TCTTGGCCCA GACAGAGGCC	1320
CTGATGAGGG GAAAATCGAC GGAGGGAGCC CGAAAGGAGC TCCAGGCTGC GGGCAAGAGT	1380
CCAGAGGACC TTGAGAGGCT GCTGCCACAT AAGGCTTTG AAGGAAATCG CCCAACCAAC	1440
TCTATTGTGT TCACCAAGCT CACACCATTG ATGCTTGGAG CTTGGTCGC CATGTATGAG	1500
CACAAGATCT TCGTTCAAGGG CATCATCTGG GACATCAACA GCTTGACCA GTGGGGAGTG	1560
GAGCTGGAA AGCAGCTGGC TAAGAAAATA GAGCCTGAGC TTGATGGCAG TGCTCAAGTG	1620
ACCTCTCACG ACGCTTCTAC CAATGGGCTC ATCAACTTCA TCAAGCAGCA GCGCGAGGCC	1680
AGAGTCCAAT AAACCTCGTGC TCATCTGCAG CCTCCTCTGT GACTCCCCTT TCTCTTCTCG	1740
TCCCTCCTCC CCGGAGCCGG CACTGCATGT TCCTGGACAC CACCCAGAGC ACCCTCTGGT	1800
TGTGGGCTTG GACCACGAGC CCTTAGCAGG GAAGGCTGGT CTCCCCCAGC CTAACCCCCA	1860
GCCCCCTCCAT GTCTATGCTC CCTCTGTGTT AGAATTGGCT GAAGTGTGTT TGTGCAGCTG	1920
ACTTTTCTGA CCCATGTTCA CGTTGTTCAC ATCCCATGTA GAAAAACAAA GATGCCACGG	1980
AGGAGGT	1987

【化10】

ACCTCTCACG ACGCTTCTAC CAATGGGCTC ATCAACTTCA TCAAGCAGCA GCGCGAGGCC	1680
AGAGTCCAAT AAACCTCGTGC TCATCTGCAG CCTCCTCTGT GACTCCCCTT TCTCTTCTCG	1740
TCCCTCCTCC CCGGAGCCGG CACTGCATGT TCCTGGACAC CACCCAGAGC ACCCTCTGGT	1800
TGTGGGCTTG GACCACGAGC CCTTAGCAGG GAAGGCTGGT CTCCCCCAGC CTAACCCCCA	1860
GCCCCCTCCAT GTCTATGCTC CCTCTGTGTT AGAATTGGCT GAAGTGTGTT TGTGCAGCTG	1920
ACTTTTCTGA CCCATGTTCA CGTTGTTCAC ATCCCATGTA GAAAAACAAA GATGCCACGG	1980
AGGAGGT	1987

【0185】

(2) 配列番号：7に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 464 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(i i) 配列の種類 : タンパク質

(i i i) ハイポセティカル配列 : NO

【 0 1 8 6 】

(x i) 配列 : 配列番号 : 7 :

【 化 1 1 】

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

10

20

30

【 化 1 2 】

Pro Asp Ala Trp Arg Ile Trp Ser Val Ile Tyr Glu Glu Asn Cys Phe 195 200 205	
Lys Pro Gln Thr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Ser Gly Gln Gly Lys His 210 215 220	
Lys Glu Asn Thr Phe Tyr Ser Trp Leu Glu Gly Leu Cys Val Glu Lys 225 230 235 240	
Arg Ala Phe Tyr Arg Leu Ile Ser Gly Leu His Ala Ser Ile Asn Val 245 250 255	
His Leu Ser Ala Arg Tyr Leu Leu Asp Asn Trp Leu Glu Lys Lys 260 265 270	10
Trp Gly His Asn Val Thr Glu Phe Gln Gln Arg Phe Asp Gly Val Leu 275 280 285	
Thr Glu Gly Glu Gly Pro Arg Arg Leu Lys Asn Leu Tyr Phe Leu Tyr 290 295 300	
Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Leu Pro Phe Phe Glu Arg 305 310 315 320	
Pro Asp Phe Gln Leu Phe Thr Gly Asn Lys Val Gln Asp Val Glu Asn 325 330 335	
Lys Glu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Val Lys Ser Phe Pro Leu 340 345 350	
His Phe Asp Glu Asn Ser Phe Phe Ala Gly Asp Lys Asn Glu Ala His 355 360 365	20
Lys Leu Lys Glu Asp Phe Arg Leu His Phe Arg Asn Ile Ser Arg Ile 370 375 380	
Met Asp Cys Val Gly Cys Phe Lys Cys Arg Leu Trp Gly Lys Leu Gln 385 390 395 400	
Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe Ser Glu Lys Leu 405 410 415	
Ile Ala Asn Met Pro Glu Ser Gly Pro Ser Tyr Glu Phe Gln Leu Thr 420 425 430	
Arg Gln Glu Ile Val Ser Leu Phe Asn Ala Phe Gly Arg Ile Ser Thr 435 440 445	30
Ser Val Arg Glu Leu Glu Asn Phe Arg His Leu Leu Gln Asn Val His 450 455 460	

【0187】

(2) 配列番号：8に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 558 アミノ酸

(B) 配列の型： アミノ酸

(C) 鎮の数： 一本鎮

(D) トポロジー： 直鎮状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(iii) ハイポセティカル配列： NO

【0188】

(xi) 配列： 配列番号：8：

【化13】

Met Ala Ala Leu Thr Arg Asp Pro Gln Phe Gln Lys Leu Gln Gln Trp			
1	5	10	15
Tyr Arg Glu His Arg Ser Glu Leu Asn Leu Arg Arg Leu Phe Asp Ala			
20	25	30	
Asn Lys Asp Arg Phe Asn His Phe Ser Leu Thr Leu Asn Thr Asn His			
35	40	45	
Gly His Ile Leu Val Asp Tyr Ser Lys Asn Leu Val Thr Glu Asp Val			
50	55	60	
Met Arg Met Leu Val Asp Leu Ala Lys Ser Arg Gly Val Glu Ala Ala			
65	70	75	80
Arg Glu Arg Met Phe Asn Gly Glu Lys Ile Asn Tyr Thr Glu Gly Arg			
85	90	95	
Ala Val Leu His Val Ala Leu Arg Asn Arg Ser Asn Thr Pro Ile Leu			
100	105	110	
Val Asp Gly Lys Asp Val Met Pro Glu Val Asn Lys Val Leu Asp Lys			
115	120	125	
Met Lys Ser Phe Cys Gln Arg Val Arg Ser Gly Asp Trp Lys Gly Tyr			
130	135	140	
Thr Gly Lys Thr Ile Thr Asp Val Ile Asn Ile Gly Ile Val Gly Ser			
145	150	155	160
Asp Leu Gly Pro Leu Met Val Thr Glu Ala Leu Lys Pro Tyr Ser Ser			
165	170	175	
Gly Gly Pro Arg Val Trp Tyr Val Ser Asn Ile Asp Gly Thr His Ile			
180	185	190	
Ala Lys Thr Leu Ala Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ser Leu Phe Ile Ile			
195	200	205	
Ala Ser Lys Thr Phe Thr Thr Gln Glu Thr Ile Thr Asn Ala Glu Thr			
210	215	220	
Ala Lys Glu Trp Phe Leu Gln Ala Ala Lys Asp Pro Ser Ala Val Ala			
225	230	235	240
Lys His Phe Val Ala Leu Ser Thr Asn Thr Thr Lys Val Lys Glu Phe			
245	250	255	
Gly Ile Asp Pro Gln Asn Met Phe Glu Phe Trp Asp Trp Val Gly Gly			
260	265	270	
Arg Tyr Ser Leu Trp Ser Ala Ile Gly Leu Ser Ile Ala Leu His Val			
275	280	285	
Gly Phe Asp Asn Phe Glu Gln Leu Leu Ser Gly Ala His Trp Met Asp			
290	295	300	
Gln His Phe Arg Thr Thr Pro Leu Glu Lys Asn Ala Pro Val Leu Leu			
305	310	315	320
Ala Leu Leu Gly Ile Trp Tyr Ile Asn Cys Phe Gly Cys Glu Thr His			
325	330	335	

【化14】

Ala Met Leu Pro Tyr Asp Gln Tyr Leu His Arg Phe Ala Ala Tyr Phe
 340 345 350
 Gln Gln Gly Asp Met Glu Ser Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Lys Ser Gly
 355 360 365
 Thr Arg Val Asp His Gln Thr Gly Pro Ile Val Trp Gly Glu Pro Gly
 370 375 380
 Thr Asn Gly Gln His Ala Phe Tyr Gln Leu Ile His Gln Gly Thr Lys
 385 390 395 400
 Met Ile Pro Cys Asp Phe Leu Ile Pro Val Gln Thr Gln His Pro Ile
 405 410 415
 Arg Lys Gly Leu His His Lys Ile Leu Leu Ala Asn Phe Leu Ala Gln
 420 425 430
 Thr Glu Ala Leu Met Arg Gly Lys Ser Thr Glu Glu Ala Arg Lys Glu
 435 440 445
 Leu Gln Ala Ala Gly Lys Ser Pro Glu Asp Leu Glu Arg Leu Leu Pro
 450 455 460
 His Lys Val Phe Glu Gly Asn Arg Pro Thr Asn Ser Ile Val Phe Thr
 465 470 475 480
 Lys Leu Thr Pro Phe Met Leu Gly Ala Leu Val Ala Met Tyr Glu His
 485 490 495
 Lys Ile Phe Val Gln Gly Ile Ile Trp Asp Ile Asn Ser Phe Asp Gln
 500 505 510
 Trp Gly Val Glu Leu Gly Lys Gln Leu Ala Lys Lys Ile Glu Pro Glu
 515 520 525
 Leu Asp Gly Ser Ala Gln Val Thr Ser His Asp Ala Ser Thr Asn Gly
 530 535 540
 Leu Ile Asn Phe Ile Lys Gln Gln Arg Glu Ala Arg Val Gln
 545 550 555

【0189】

(2) 配列番号：9に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ： 229アミノ酸

(B) 配列の型： アミノ酸

(C) 鎖の数： 一本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(iii) ハイポセティカル配列： NO

【0190】

(xi) 配列： 配列番号：9：

【化15】

10

20

30

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

【0191】

30

- (2) 配列番号：10に関する情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ： 232 アミノ酸
- (B) 配列の型： アミノ酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状
- (ii) 配列の種類： タンパク質
- (iii) ハイポセティカル配列： NO

【0192】

- (xi) 配列： 配列番号：10：

40

【化16】

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

【0193】

- (2) 配列番号：11に関する情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 配列の長さ： 864アミノ酸
 (B) 配列の型： アミノ酸
 (C) 鎮の数： 一本鎮
 (D) トポロジー： 直鎮状
 (ii) 配列の種類： タンパク質
 (iii) ハイポセティカル配列： NO

30

【0194】

- (xi) 配列： 配列番号：11：
 【化17】

40

Met Ala Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Pro Thr Ser Asn Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Gly Pro Leu Leu Lys Ala Ser Val Ser Ser Pro Val Lys Ala Ser Ser
 20 25 30
 Ser Pro Val Arg Ser Ala Pro Phe Ile Thr Arg Asn Cys Glu Val Gln
 35 40 45
 Ser Pro Glu Leu Leu His Lys Thr Val Ser Pro Leu Lys Thr Glu Val
 50 55 60
 Leu Lys Pro Cys Glu Lys Pro Thr Leu Ser Gln Ala Leu Gln Pro Lys
 65 70 75 80
 Glu Gly Ala Asn Lys Glu Val Cys Leu Gln Ser Gln Ser Lys Asp Lys
 85 90 95
 Leu Ala Thr Pro Gly Gly Arg Gly Ile Lys Pro Phe Leu Glu Arg Phe
 100 105 110

【化18】

Gly Glu Arg Cys Gln Glu His Ser Lys Glu Ser Pro Thr Cys Arg Ala
 115 120 125
 Phe His Arg Thr Pro Asn Ile Thr Pro Asn Thr Lys Ala Ile Gln Glu
 130 135 140
 Arg Leu Phe Lys Gln Asn Thr Cys Phe Ile Tyr Tyr Pro Asn Leu Ala
 145 150 155 160
 Gln Gln Leu Lys Gln Glu Arg Glu Lys Glu Leu Ala Cys Leu Arg Gly
 165 170 175
 Arg Phe Asp Lys Gly Ser Leu Trp Ser Ala Glu Lys Asp Glu Lys Ser
 180 185 190
 Arg Ser Lys Gln Leu Glu Thr Asn Arg Lys Phe Thr Val Arg Thr Leu
 195 200 205
 Pro Ser Arg Asn Thr Lys Leu Ser Gln Gly Thr Pro Ser Thr Ser Val
 210 215 220
 Ser Asp Lys Val Ala Glu Thr Pro Thr Ala Val Lys Ile Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Glu Pro Ala Gly Ser Thr Glu Ser Glu Met Thr Lys Ser Ser Pro Leu
 245 250 255
 Lys Ile Thr Leu Phe Leu Glu Glu Lys Ser Leu Lys Val Ala Ser
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Glu Gln Lys Thr Glu Ala Val His Glu Val Glu Met
 275 280 285
 Ser Val Asp Asp Glu Asp Ile Asn Ser Ser Lys Ser Leu Thr Thr Ser
 290 295 300
 Ser Val Xaa Ser Leu Xaa Glu Xaa Gly Thr Gly Xaa Trp Lys Arg Xaa
 305 310 315 320
 Lys Glu Glu Met Asp Gln Val Gly Asn Gly Lys Gln Arg Gly Ala Gly
 325 330 335
 Arg Cys Ala Glu Tyr Leu Leu Asn Xaa Xaa Thr Xaa Ser Arg Trp Leu
 340 345 350
 Arg Arg Phe Gly Val Val Asn Leu Gln Asn Val Ile Ser Ser Pro Glu
 355 360 365
 Leu Glu Leu Arg Asp Tyr Ser Leu Ser Ala Pro Ser Pro Lys Pro Gly
 370 375 380
 Lys Phe Gln Arg Thr Arg Val Pro Arg Ala Glu Ser Gly Asp Ser Leu
 385 390 395 400
 Ser Ser Glu Asp Arg Asp Leu Leu Tyr Ser Ile Asp Ala Tyr Arg Ser
 405 410 415
 Gln Arg Phe Lys Glu Thr Glu Arg Pro Ser Ile Lys Gln Val Ile Val
 420 425 430
 Arg Lys Glu Asp Val Thr Ser Lys Leu Ser Glu Lys Asn Gly Val Phe
 435 440 445
 Ser Gly Gln Val Asn Ile Lys Gln Lys Met Gln Glu Leu Asn Asn Asp
 450 455 460

【化19】

Ile Asn Leu Gln Gln Thr Val Ile Tyr Gln Ala Ser Gln Ala Leu Asn
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Asp Glu Glu His Gly Lys Gly Ser Leu Glu Glu Ala Glu
 485 490 495
 Ala Glu Arg Leu Phe Leu Xaa Ala Thr Glu Lys Arg Ala Leu Leu Ile
 500 505 510
 Asp Glu Leu Asn Lys Leu Lys Ser Glu Gly Pro Gln Arg Arg Asn Lys
 515 520 525
 Thr Ala Val Ala Ser Gln Ser Gly Phe Ala Pro Cys Lys Gly Ser Val
 530 535 540
 Thr Leu Ser Glu Ile Cys Leu Pro Leu Lys Ala Glu Phe Val Cys Ser
 545 550 555 560
 Thr Ala Gln Lys Pro Glu Ser Ser Asn Tyr Tyr Tyr Leu Ile Met Leu
 565 570 575
 Lys Ala Gly Ala Glu Gln Met Val Ala Thr Pro Leu Ala Ser Thr Ala
 580 585 590
 Thr Leu Leu Val Val Met Xaa Leu Thr Phe Pro Thr Thr Leu Pro Xaa
 595 600 605
 Xaa Asp Val Ser Asn Asp Phe Glu Ile Asn Val Glu Val Tyr Ser Leu
 610 615 620
 Val Gln Lys Lys Asp Ser Leu Arg Pro Glu Lys Lys Lys Lys Ala Ser
 625 630 635 640
 Lys Phe Lys Ala Ile Thr Pro Lys Arg Leu Leu Thr Ser Ile Thr Ser
 645 650 655
 Lys Ser Ser Leu His Ala Ser Val Met Ala Ser Pro Gly Gly Leu Ser
 660 665 670
 Ala Val Arg Thr Ser Asn Phe Thr Leu Val Gly Ser His Thr Leu Ser
 675 680 685
 Leu Ser Ser Val Gly Asp Thr Lys Phe Ala Leu Asp Lys Val Pro Phe
 690 695 700
 Leu Ser Pro Leu Glu Gly His Ile Cys Leu Lys Ile Ser Cys Gln Val
 705 710 715 720
 Asn Ser Ala Val Glu Glu Lys Gly Phe Leu Thr Ile Phe Glu Asp Val
 725 730 735
 Ser Gly Phe Gly Ala Trp His Arg Arg Trp Cys Val Leu Ser Gly Asn
 740 745 750
 Cys Ile Ser Tyr Trp Thr Tyr Pro Asp Asp Glu Arg Arg Lys Asn Pro
 755 760 765
 Ile Gly Arg Ile Asn Leu Ala Asn Cys Ile Ser His Gln Ile Glu Pro
 770 775 780
 Ala Asn Arg Glu Phe Cys Ala Arg Arg Asn Thr Leu Glu Leu Ile Thr
 785 790 795 800
 Val Arg Pro Gln Arg Glu Asp Asp Arg Glu Thr Leu Val Ser His Val
 805 810 815

【化20】

Glu Thr His Ser Val Ser Pro Lys Asn Trp Leu Ser Ala Asp Thr Lys
 820 825 830
 Glu Glu Arg Asp Leu Trp Met Gln Lys Leu Asn Gln Val Ile Val Asp
 835 840 845
 Ile Arg Leu Trp Gln Pro Asp Ala Cys Tyr Lys Pro Val Gly Lys Pro
 850 855 860

【図面の説明】

本発明の、別の有用性は、添付図面に関連して考慮するとき、以下の詳細な説明を参照することによって、よりよい理解に至ると同様に、直ちに正しく認識されるであろう。

図1は、R T P 8 0 1（配列番号1）の全長cDNAクローンのin vitro翻訳を示すコンピュータスキャンである。cDNAクローンは共役転写・翻訳キット（Pro meg a）を使用してin vitroで翻訳された。翻訳産物は、アクリルアミドゲル上で分離され、X線フィルムに感光された。矢印でマークした、2つのクローンは、約30KDのサイズの予想したタンパク質を与えた。このことは推定の配列解析を確認している。

10

20

30

40

50

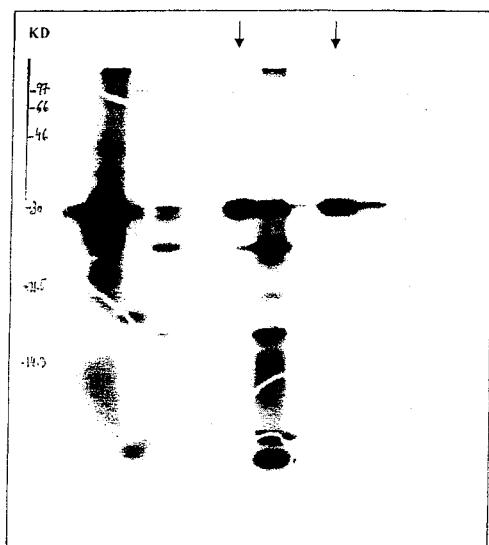
図2は、RTP801(配列番号1)のノーザンプロット解析を示すコンピュータースキヤンである。RNAは、0、4、または16時間、低酸素に曝露した、ラットC6グリオーマ細胞から抽出した。各試料からのポリA+選択mRNA(2μg)は変性アガロースゲル上で分離し、Nyttran膜にプロットし、rtp241プローブでハイブリダイズした。1.8Kbの1つのバンドは、低酸素後顕著な誘導を示すことが観察される。

図3は、RTP779(配列番号2)のノーザンプロット解析を示すコンピュータースキヤンである。RNAは、0、4、または16時間、低酸素に曝露した、ラットC6グリオーマ細胞から抽出した。各試料からのポリA+選択mRNA(2μg)は変性アガロースゲル上で分離し、Nyttran膜にプロットし、rtp779プローブでハイブリダイズした。1.8Kbの1つのバンドは、極端な差次的発現(differential expression)を示すことが観察される。10

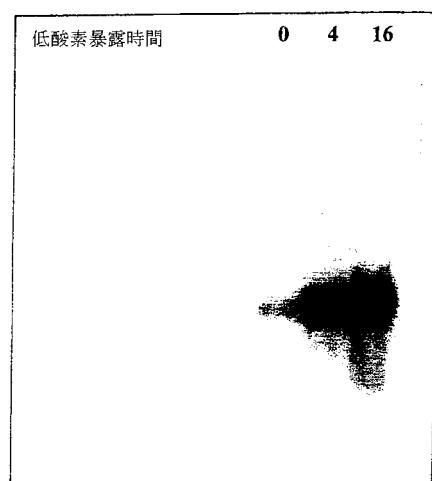
図4は、RTP241(配列番号3)のノーザンプロット解析を示すコンピュータースキヤンである。RNAは、0、4、または16時間、低酸素に曝露した、ラットC6グリオーマ細胞から抽出した。各試料からのポリA+選択mRNA(2μg)は変性アガロースゲル上で分離し、Nyttran膜にプロットし、rtp241プローブでハイブリダイズした。1.8Kbおよび4Kbの2つのバンドは、両方とも良好な差次的発現を示すことが観察される。

図5は、RTP359(配列番号5)のノーザンプロット解析を示すコンピュータースキヤンである。RNAは、0、4、または16時間、低酸素に曝露した、ラットC6グリオーマ細胞から抽出した。各試料からのポリA+選択mRNA(2μg)は変性アガロースゲル上で分離し、Nyttran膜にプロットし、rtp359プローブでハイブリダイズした。4.5Kbの1つのバンドは、良好な差次的発現を示すことが観察される。20

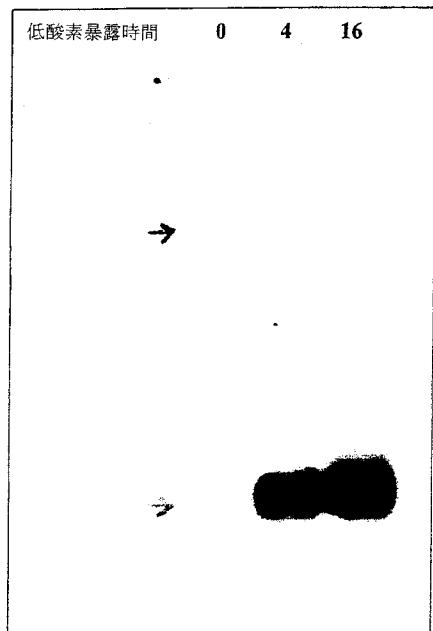
【図1】



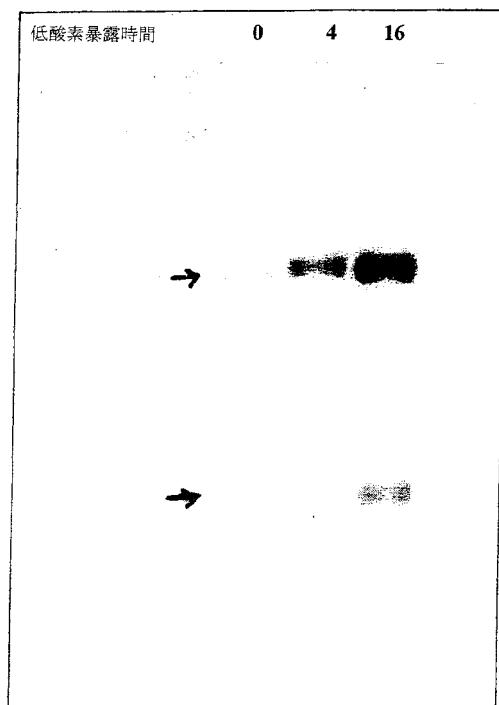
【図2】



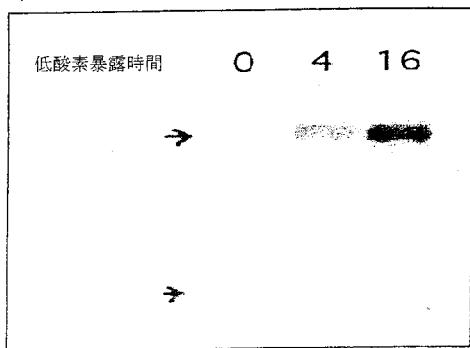
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 エイナト、パズ

イスラエル国 ネス ジオナ、ナベ ニル 1、 アパートメント 27

(72)発明者 スカリテル、ラミ

イスラエル国 ネス ジオナ、ハバニム ストリート 117、アパートメント 10

(72)発明者 ルリア、シリビイ

イスラエル国 ネス ジオナ、ハバニム ストリート 113、アパートメント 7

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 國際公開第96/039426 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)