

(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2005-509416

(P2005-509416A)

(43) 公表日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	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 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	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 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-541440 (P2003-541440)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年11月6日 (2002. 11. 6)		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30日 (2004. 4. 30)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/035562		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/039342		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年5月15日 (2003. 5. 15)		アメリカ合衆国02139マサチューセッ
(31) 優先権主張番号	60/333, 073		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11月6日 (2001. 11. 6)		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】 577、20739、または57145を使用して疼痛および有痛性傷害を処置するための方法
および組成物

(57) 【要約】

本発明は、疼痛または有痛性障害の診断および処置のための方法に関する。詳細には、本発明は、正常すなわち、有痛疾患でない状態でありそして/または疼痛に関する操作に応答した577遺伝子、20739遺伝子または57145遺伝子の発現に対して、痛覚に関連する組織におけるそれらの示差的な発現を同定する。本発明は、種々の心臓血管疾患の診断的評価および予後診断のため、およびそのような状態の素因を示す被験体の同定のための方法を記載する。本発明はまた、疼痛または有痛性障害を調節し得る化合物を同定するための方法を提供する。本発明はまた、疼痛および有痛性障害の処置としての、化合物の同定および治療的使用のための方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

疼痛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 577 核酸、20739 核酸もしくは 57145 核酸の発現または 577 ポリペプチド、20739 ポリペプチドもしくは 57145 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、疼痛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】

疼痛シグナル伝達機構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) 577、20739 または 57145 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、577 核酸、20739 核酸もしくは 57145 核酸の発現または 577 ポリペプチド、20739 ポリペプチドまたは 57145 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、疼痛シグナル伝達を調節し得る化合物を同定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 3】

細胞中の疼痛シグナル伝達を調節するための方法であって、細胞を 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 調節因子と接触させ、それによって、該細胞中の疼痛シグナル伝達を調節する工程を包含する、方法。

【請求項 4】

前記細胞が、脳細胞、神経細胞、または脊髄もしくは脊髄神経節由来の細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 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 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 調節因子が、577 ポリペプチド、20739 ポリペプチドまたは 57145 ポリペプチドの活性を調節し得る、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 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 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 調節因子が、577 核酸、20739 核酸または 57145 核酸の発現を調節し得る、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

577 ポリペプチド、20739 ポリペプチドもしくは 57145 ポリペプチドの異常な活性または 577 核酸、20739 核酸もしくは 57145 核酸の異常な発現によって特徴付けられる疼痛障害を有する被験体を処置するための方法であって、577 調節因子、20739 調節因子または 57145 調節因子を該被験体に投与し、それによって、該疼痛障害を有する被験体を処置する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

前記疼痛障害が、炎症性疼痛、慢性疼痛、神経障害性疼痛、カウザルギー、線維素血症、癌性疼痛、片頭痛 / 頭痛、および組織疼痛を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 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。

【請求項 12】

前記 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 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。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記 577 調節因子、20739 調節因子または 57145 調節因子が、577 ポリペプチド、20739 ポリペプチドまたは 57145 ポリペプチドの活性を調節し得る、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、2001 年 11 月 6 日に提出した米国仮特許出願番号 60/333,073 に対する優先権を主張する。この米国仮特許出願の内容全体が、本明細書中に参考として援用される。

【背景技術】**【0002】**

疼痛の感覚は、2つの型（末梢疼痛および中枢疼痛）に分類され得る。末梢疼痛は、広範な3つの領域（侵害受容疼痛、炎症疼痛、および神経障害性疼痛）に分類され得る。侵害受容疼痛はまた、生理学的疼痛とも呼ばれる。この侵害受容疼痛は、動物界全体にわたる防御機構として作用する。炎症疼痛は、重篤な創傷から生じ、そして/または炎症浸潤物と関連している。この炎症疼痛は、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）様薬物、ステロイド類、およびアヘン剤によって十分に制御され得る。しかし、神経障害性疼痛の病因および管理は、十分には理解されていない。神経障害性疼痛は、感覚における固有の欠損から交感ニューロンにおける結果として生じると考えられている。神経障害性疼痛は、外傷に従属し得る。

【0003】

末梢疼痛は、2つの型の一次交感ニューロンのクラス（Aδ線維およびC線維）により媒介される。これらの線維の細胞体は、脊髄神経節内部に存在する。神経障害性疼痛の発生機構は十分には理解されていないが、いくつかの要因（すなわち、化学的環境の変化、感覚ニューロン発射の異所性発生および交感神経放電）が、有痛性刺激の知覚および伝達に影響することは、明らかである。神経障害性疼痛に関連する最も一般的な症候群のうちのいくつかは、小感覚線維の破壊（または、おそらく小線維対大線維比の変化）から生じる。なぜなら、この破壊は、外傷後状況において一般的であるからである。他の疼痛病因は、糖尿病性ニューロパシーに起因する小線維損傷、薬物誘導性損傷（化学療法薬物）、アルコール症、癌に起因する損傷、ならびに種々の遺伝性小線維ニューロパシーおよび遺伝性大線維ニューロパシーから生じる。本発明者らは、末梢神経系に由来する標的は、候補化合物が血液脳関門を通過する必要がなく、それらの標的は、中心的な副作用を誘導することなく疼痛開始部位に対して作用し得るという点で、戦略的に有益でありうることを合理的に説明する。

【0004】

中心機構が痛覚の認識および調節に関与することは、長い間立証されてきた。中脳水道周囲灰白質（PAG）領域の電氣的刺激は、他の感覚的様相の欠損なしに無痛を生じる。PAGから発する下向性痛覚経路および大縫線核は、最初に侵害受容性求心性神経が終結する背面の脊髄領域に影響を与える。また、例えば延髄の巨大細胞核近傍（paragigantocellularis）のような領域の刺激は、無痛を生じる。最後に、アヘン剤レセプターは、オピオイドアルカロイドおよびオピオイドペプチドにより刺激された場合、無痛を媒介し、これらの部位は、PAG、視床核および皮質領域を含む脳内の重要な「痛覚中心」に位置する。痛覚の動物モデルからのこれらのCNS領域および脊髄視床路における遺伝子の同定は、痛覚調節の重要な標的を解明し得る。

【発明の開示】**【課題を解決するための手段】****【0005】**

本発明は、痛みを経験しているかまたは疼痛性障害に罹患した被験体の診断および処置のための方法および組成物を提供する。好ましくは、被験体はヒト（例えば、本明細書で

10

20

30

40

50

開示されている疼痛または疼痛関連疾患を有する患者)である。例えば、被験体は組織損傷(例えば、炎症、感染、虚血)から誘発される疼痛;筋骨格疾患に関連する疼痛(例えば、関節痛);歯痛;頭痛(例えば、片頭痛);手術に関連した疼痛;炎症に係する疼痛(例えば、過敏性腸症候群);または胸部疼痛を有する患者であり得る。被験体は、複合局所疼痛症候群(complex regional pain syndrome)(CRPS)、反射性交感神経性ジストロフィー(RSD)、カウザルギー、神経痛、中心性疼痛および感覚不全症候群、頸動脈圧痛、神経原性疼痛、難治性頸腕部疼痛症候群、筋膜疼痛症候群、頭蓋下顎疼痛機能不全症候群(cranio-mandibular pain dysfunction syndrome)、慢性特発性疼痛症候群、コステン疼痛機能不全、急性胸部疼痛症候群、婦人科疼痛症候群、膝蓋大腿疼痛症候群(patellofemoral pain syndrome)、前膝疼痛症候群、小児反復性腹痛、疝痛、腰痛症候群、神経因性疼痛、切断による幻肢痛、幻歯痛、または象徴不能痛を有する患者であり得る。被験体は、癌患者(例えば、脳の癌、骨の癌、または前立腺癌を有する患者)であり得る。他の実施形態において、被験体は、非ヒト動物(例えば、実験動物(例えば、慢性疼痛の関節炎ラットモデル、神経因性疼痛の慢性狭搾傷害(CCI)ラットモデル、またはフロイント完全アジュバント(FCA)の胸膜腔内注射による片側炎症痛のラットモデル))である。

10

【0006】

本明細書で使用される場合、「処置」は、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状または疾患もしくは障害に対する疾病素質を療養する、治癒、軽減、緩和、変化、治療、回復、改善するか、またはこれらに影響する目的で、患者(疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状または疾患もしくは障害に対する疾病素質を有する)への治療薬の適用もしくは投与、またはその患者から単離した組織もしくは細胞への治療薬の適用もしくは投与として定義される。治療薬としては、本明細書に記載される小分子、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、これに限定されない。本発明は、核酸分子およびタンパク質分子(下記)が、疼痛の動物モデル、ならびに疼痛に関連することが知られている末梢神経系組織および中枢神経系組織(例えば、後根神経節(DRG))において示差的に発現されるという発見に少なくとも一部基づく。本発明の方法に従って同定される、本発明の分子のモジュレーターを使用して、疼痛および有痛性状態を調節(例えば、阻害、処置または予防)し得る。

20

30

【0007】

本明細書中で使用される場合、「示差的発現」は、遺伝子の一時性発現パターンおよび/または組織発現パターンにおける、定量的差異および定性的差異の両方を含む。従って、示差的に発現される遺伝子は、有痛性疾患状態に対して正常状態において(例えば、疼痛に対する動物モデルのような実験的疼痛モデル系において)活性化される発現または不活性化される発現を有し得る。正常状態 対 処置状態または制御状態 対 実験状態で発現が異なる程度は、標準的な特徴付け技術(例えば、定量的PCR、ノーザン分析、減算ハイブリダイゼーション)によって可視化されるのに十分な大きさのみを必要とする。示差的に発現される遺伝子の発現パターンは、予後評価もしくは診断評価の一部として使用され得るか、または疼痛および有痛性障害を処置するために有用な化合物を同定するための方法において使用され得る。さらに、心臓血管疾患に関与する示差的に発現される遺伝子は、標的遺伝子を表し、その結果、標的遺伝子の発現レベルまたは標的遺伝子産物活性の調節は、有痛性疾患状態を改善するように作用し得る。標的遺伝子発現またはこの標的遺伝子産物の活性を調節する化合物は、疼痛または有痛性状態の処置において使用され得る。本明細書中に記載される遺伝子は、疼痛に関して示差的に発現され、かつ/またはそれらの産物は、疼痛に重要な遺伝子産物と相互作用し得るが、この遺伝子はまた、さらなる細胞プロセスに重要な機構にも関与し得る。

40

【0008】

(本発明の分子)

本発明の分子としては、イオンチャネル(例えば、カリウムチャネル)、トランスポー

50

ター（例えば、アミノ酸トランスポーター）、レセプター（例えば、Gタンパク質共役レセプター）および酵素（例えば、キナーゼ）が挙げられる。

【0009】

ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンおよび塩化物イオンの伝導度を選択的に媒介する膜貫通型イオンチャネルタンパク質は、感覚神経の電氣的活性を直接的に調節し、従って、侵害受容に重要である。特に、カリウムチャネルは、神経発射（neuronal firing）の頻度およびパターンの制御における主要因子（player）である。カリウムチャネルの発現およびピーク電流は、炎症および慢性疼痛の異なるモデルの後に調節されることが示されている。さらに、カルシウムイオンは、他のイオンチャネルの調節ならびにプロテインキナーゼおよび他の酵素の活性の制御を含む、重要な細胞内シグナル伝達の役割を果たす。構築された三次元構造および作用機序を有する細胞表面タンパク質として、イオンチャネルの孔形成（pore-forming）サブユニットは、理想的な薬物標的を構成する。サブユニットに加えて、これらのチャネルは、サブユニットおよびチャネル活性を調節し、かつチャネルの薬理学的操作のための優れた標的である他の相互作用タンパク質から構成され得る。従って、イオンチャネルは、疼痛および有痛性の状態を処置するのに有用である。

10

【0010】

内因性の可溶性因子は、侵害受容神経の周辺末端上またはこれらの侵害受容器から入力を受ける中枢神経上のいずれかの特異的膜貫通型レセプターに結合することによって、痛覚を媒介する。これらの可溶性因子としては、セロトニン、ヒスタミン、ブラジキニン、タキキニン（物質PおよびニューロキニンA）、オピオイド、エイコサノイド（ロイコトリエン、プロスタグランジン、トロンボキサン）、プリン、興奮性アミノ酸および種々のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、人における臨床試験を含む、成長する体の徴候は、IL-1、TNF α 、およびニューロトロフィンファミリーのメンバーが、有痛性刺激の伝達におけるいくつかの段階に関与することを示す。水素イオン（プロトン）は、痘瘡様レセプターカルシウムチャネルまたはアミロライド感受性ナトリウムチャネルの活性化によって、炎症（およびまた酸味）に付随する疼痛を媒介し得る。さらに、多数の外因性の薬剤は、内因性の可溶性因子を模倣することによって疼痛を調節する。例えば、アヘン剤の乱用は、内因性のオピオイドのためのレセプターに結合することによって無痛覚効果を及ぼし、そしてカプサイシンは、痘瘡様レセプターに結合することによって痛覚を刺激する。これらの可溶性因子のためのレセプターは、チロシンキナーゼ活性（例えば、ニューロトロフィンレセプター）、細胞質内チロシンキナーゼの漸増（例えば、TNF α およびIL-1のためのサイトカインレセプター）、イオンチャネル開口、およびGタンパク質結合レセプターを含むいくつかのシグナル伝達機構にリンクされる。これらの細胞表面レセプターは、それらの膜貫通型配置に起因して理想的な薬物標的であり、目的は、疼痛機構の制御における重要な因子（player）であり得る既知のリガンドまたは代理のリガンドを有するGタンパク質結合レセプターを発見することである。

20

30

【0011】

プロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼCのような細胞内キナーゼは、感覚神経における疼痛の応答に関与している。同様に、シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンシンターゼのような酵素は、プロスタグランジン、ロイコトリエンおよびトロンボキサンの生成に重要であると知られている。これらの特定の標的は、炎症性疼痛において重要であり得るが、長期間においてか、または神経障害性の疼痛においてのこの遺伝子ファミリーの役割は、重要である。

40

【0012】

（遺伝子番号577）

非翻訳領域を含む約1908ヌクレオチド長であるヒト577配列（配列番号1）（GI:1839269、ナトリウム依存プロリントランスポーターとしても知られる）は、約1911ヌクレオチドの配列の推定メチオニン開始コード配列を含み、終止コドンを含

50

む（配列番号 1 および 2 のコードとして示されるヌクレオチド）。このコード領域は、636 アミノ酸タンパク質をコードする（配列番号 3）（GI: 8176779）。

【0013】

TaqMan 分析によって推定されるように、577 は、脳および後根神経節（DRG）において発現される。従って、それは、侵害受容に関与し、そして疼痛および有痛性障害の処置に対する治療を発見するような潜在的な標的でありうる。

【0014】

（遺伝子番号 20739）

非翻訳領域を含む約 1635 ヌクレオチド長であるヒト 20739 配列（配列番号 4）（GI: 3608385）、P21 活性化キナーゼ 3（PAK-3）としても知られる）は、終止コドンを含む約 1632 ヌクレオチドの配列の推定メチオニン開始コード配列を含む（配列番号 4 および 5 のコードとして示されるヌクレオチド）。このコード配列は、544 アミノ酸タンパク質をコードする（配列番号 6）（GI: 3608386）。

【0015】

TaqMan 分析によって推定されるように、20739 は、脳、後根神経節（DRG）、上頸神経節（SCG）、尿管、精巣、卵巣および脊髄において発現される。さらなる TaqMan 分析は、20739 mRNA が疼痛、CFA 注入および軸索切断（axotomy）の 2 つのラットモデルにおいてアップレギュレートされたことを示唆した。インサイチュハイブリダイゼーションにおいて、DRG における 20739 の発現が、ニューロンのすべての大きさに制限されることを示唆した。DRG、SCG および脳における 20739 の発現に起因して、疼痛の 2 つの動物モデルで制御されるのとともに、20739 は、疼痛および有痛性の障害の処置に対する治療を発見するための潜在的な標的であり得る。

【0016】

（遺伝子番号 57145）

非翻訳領域を含む約 2561 ヌクレオチド長であるヒト 57145 配列（配列番号 7）（OCIT-5 としても知られる）は、終止コドンを含む約 1644 ヌクレオチドの推定メチオニン開始コード配列を含む（配列番号 7 および 8 のコードとして示されるヌクレオチド）。このコード領域は、548 アミノ酸タンパク質（配列番号 9）をコードする。

【0017】

TaqMan 分析によって評価されるように、57145 は、脳、脊髄神経節（DRG）、上頸神経節（SCG）、尿管、卵巣および脊髄において発現される。従って、これは、侵害知覚に関係し、そして疼痛および有痛性障害の処置に関する治療剤を発見するための潜在的な標的である。

【0018】

本発明の種々の局面が、以下の節においてさらに詳細に記載される。

【0019】

（I. スクリーニングアッセイ）

本発明は、577 タンパク質、20739 タンパク質もしくは 57145 タンパク質に結合するか、あるいは例えば、577 発現、20739 発現もしくは 57145 発現または 577 活性、20739 活性もしくは 57145 活性に対する刺激効果もしくは阻害効果を有するか、あるいは例えば、577 基質、20739 基質または 57145 基質の発現または活性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、すなわち候補または試験化合物または因子（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子（有機もしくは無機）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。本明細書中に記載されるアッセイを使用して同定された化合物は、疼痛および有痛性の状態を処置するために有用であり得る。

【0020】

これらのアッセイは、577 タンパク質、20739 タンパク質または 57145 タンパク質に結合する化合物、577 タンパク質、20739 タンパク質または 57145 タ

10

20

30

40

50

ンパク質と相互作用する他の細胞内タンパク質または細胞外タンパク質に結合する化合物、および577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質と他の細胞内タンパク質または細胞外タンパク質との相互作用を妨害する化合物を同定するために設計される。例えば、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質（これらは、膜貫通レセプター型タンパク質である）の場合、このような技術は、このようなレセプターに対するリガンドを同定し得る。577タンパク質リガンド、20739タンパク質リガンドもしくは57145タンパク質リガンド、または577タンパク質基質、20739タンパク質基質もしくは57145タンパク質基質は、例えば、疼痛および有痛性状態を改善するために使用され得る。このような化合物としては、ペプチド、抗体、有機低分子化合物または無機低分子化合物が挙げられるが、これらに限定されない。このような化合物としては、他の細胞タンパク質も挙げられ得る。 10

【0021】

本明細書中に記載されるようなアッセイを介して同定された化合物は、例えば、疼痛および有痛性の状態を処置するために有用であり得る。有痛性の状態が、細胞または組織における全体的に低いレベルの577遺伝子発現、20739遺伝子発現もしくは57145遺伝子発現、および/または577タンパク質、20739タンパク質もしくは57145タンパク質から生じる場合、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質と相互作用する化合物としては、結合した577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質の活性を強調または増幅する化合物が挙げられ得る。このような化合物は、577タンパク質活性、20739タンパク質活性または57145タンパク質活性のレベルの有効な増加をもたらし、従って、症状を改善する。 20

【0022】

他の場合において、577遺伝子、20739遺伝子または57145遺伝子内の変異は、疼痛を導く有害な効果を有する、異常な型または過剰量の577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質を生じさせ得る。同様に、生理学的状態は、疼痛を導く577遺伝子発現、20739遺伝子発現または57145遺伝子発現を過剰に増加させ得る。このような場合において、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質に結合する化合物は、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質の活性を阻害する化合物を同定し得る。この節に記載されるような技術により同定された化合物の有効性を試験するためのアッセイは、本明細書中に論じられる。 30

【0023】

1つの実施形態において、本発明は、577タンパク質、20739タンパク質もしくは57145タンパク質または577ポリペプチド、20739ポリペプチドまたは57145ポリペプチド、またはそれら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、577タンパク質、20739タンパク質もしくは57145タンパク質または577ポリペプチド、20739ポリペプチドもしくは57145ポリペプチド、またはそれらの生物学的に活性な部分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。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法における多くのアプローチのいずれか（生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相ライブラリーまたは液相ライブラリー；逆重畳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法を含む）を使用して取得され得る。生物学的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るが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリーまたは低分子ライブラリーに適用可能である（Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145）。 40

【0024】

分子ライブラリーの合成方法の例としては、例えば、以下において当該分野で見い出さ 50

られ得る：DeWittら(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6909;Erbら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91:11422;Zuckermannら(1994).J.Med.Chem.37:2678;Choら(1993)Science261:1303;Carrellら(1994)Angew.Chem.Int.Ed.Engl.33:2059;Carrellら(1994)Angew.Chem.Int.Ed.Engl.33:2061;およびGallopら(1994)J.Med.Chem.37:1233。

【0025】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992)Biotechniques13:412-421)、あるいはピーズ(Lam(1991)Nature354:82-84)、チップ(Fodor(1993)Nature364:555-556)、細菌(LadnerUSP5,223,409)、胞子(LadnerUSP'409)、プラスミド(Cullら(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:1865-1869)またはファージ(ScottおよびSmith(1990)Science249:386-390);(Devlin(1990)Science249:404-406);(Cwirllaら(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.87:6378-6382);(Felici(1991)J.Mol.Biol.222:301-310);(Ladner前出)上に提示され得る。

10

20

【0026】

1つの実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、577タンパク質、20739タンパク質もしくは57145タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分を発現する細胞は、試験化合物と接触され、そして577活性、20739活性もしくは57145活性を調節する試験化合物の能力が決定される。577活性、20739活性もしくは57145活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、細胞内カルシウム、IP₃、cAMP、またはジアシルグリセロールの濃度、細胞内タンパク質のリン酸化プロファイル、細胞増殖および/または遊走、例えば、無痛と関連する細胞表面接着分子または遺伝子の遺伝子発現、あるいは577調節転写因子、20739調節転写因子もしくは57145調節転写因子の活性をモニタリングすることによって、達成され得る。細胞は、哺乳動物起源の細胞(例えば、神経細胞)であり得る。1つの実施形態において、レセプタードメインと相互作用する化合物は、リガンドとして機能する(すなわち、レセプターに結合し、シグナル伝達経路を調節する)能力についてスクリーニングされ得る。リガンドの同定、およびリガンド-レセプター複合体の活性の測定は、この相互作用のモジュレーター(例えば、アンタゴニスト)の同定を導く。このようなモジュレーターは、疼痛および有痛性の状態の処置において有用であり得る。

30

【0027】

試験化合物が、基質に結合する577、20739、もしくは57145を調節するか、または577、20739、もしくは57145に結合する能力もまた決定され得る。試験化合物が、基質に結合する577、20739、もしくは57145を調節する能力の決定は、例えば、577基質、20739基質、もしくは57145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、その結果、基質の577、20739、もしくは57145への結合が、複合体中に標識された577基質、20739基質、もしくは57145基質を検出することによって、決定され得る。577、20739、または57145はまた、試験化合物が、複合体中の577基質、20739基質、または57145基質に結合する577、20739、または57145を調節する能力をモニターするために、放射性同位体または酵素標識とカップリングされ得る。試験化合物が577、20739、または57145に結合する能力を決定することは、例えば、化合物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、577、20739、または57145に対する化合物の結合が、複合

40

50

体中の標識された 577 化合物、20739 化合物、もしくは 57145 化合物を検出することによって決定され得る。例えば、化合物（例えば、577、20739、または 57145 のリガンドまたは基質）は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で、直接的または間接的のいずれかで標識され得、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検出され得る。試験化合物は、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さらに標識され得、そしてこの酵素標識は、適切な基質の産物への転換を決定することによって検出され得る。

【0028】

化合物（例えば、577、20739、または 57145 のリガンドまたは基質）が、任意の相互作用体（*interactant*）の標識化を有さない 577、20739、または 57145 と相互作用する能力を、決定することもまた、本発明の範囲内である。例えば、微小生理機能測定器（*microphysiometer*）を使用して、化合物または 577、20739、もしくは 57145 のいずれかの、標識化を有さない 577、20739、または 57145 と化合物との相互作用を検出し得る。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 577、20739、または 57145 との間の相互作用の指標として使用され得る。

【0029】

別の実施形態において、アッセイは、577、20739、または 57145 の標的分子（例えば、577、20739、または 57145 の基質）を発現する細胞と試験化合物とを接触させること、およびこの試験化合物の、577、20739、または 57145 の標的分子の活性を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）能力を決定することを包含する、細胞ベースのアッセイである。577、20739、または 57145 の標的分子の活性を調節する試験化合物の能力を決定することは、例えば、577、20739、または 57145 の標的分子に結合するか、または 577、20739、または 57145 の標的分子と相互作用する 577 タンパク質、20739 タンパク質、または 57145 タンパク質の能力を決定することによって達成され得る。

【0030】

577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 タンパク質、またはこれらの生物学的に活性なフラグメントが、577、20739、または 57145 の標的タンパク質に結合するか、または 577、20739、または 57145 の標的分子と相互作用する能力を決定することは、直接的な結合を決定するための上記の方法のうちの 1 つによって達成され得る。好ましい実施形態において、577 タンパク質、20739 タンパク質、または 57145 タンパク質の、577、20739、もしくは 57145 の標的タンパク質に結合するか、または 577、20739、もしくは 57145 の標的分子と相互作用する能力を決定することは、標的分子の活性を決定することによって達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞性の第 2 のメッセンジャー（すなわち、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、 IP_3 、 cAMP ）の誘導を検出すること、適切な基質に対する標的の触媒活性 / 酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出マーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結された標的調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、あるいは標的調節型細胞内応答（例えば、遺伝子発現）を検出することによって決定され得る。

【0031】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 タンパク質またはその生物学的に活性な部分が、試験化合物と接触され、そして試験化合物の、577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 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が決定される、無

10

20

30

40

50

細胞アッセイである。本発明のアッセイにおいて使用されるための、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分は、非５７７分子、非２０７３９分子、もしくは非５７１４５分子との相互作用に關与するフラグメント（例えば、高表面確立スコア（*high surface probability score*）を有するフラグメント）を含む。５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質への試験化合物の結合は、上記のように直接的にかまたは間接的にかのいずれかで決定され得る。好ましい実施形態において、このアッセイは、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、５７７、２０７３９、または５７１４５に結合しアッセイ混合物を形成する既知の化合物とを接触させること、このアッセイ混合物と試験化合物とを接触させること、および試験化合物が５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質と相互作用する能力を決定することを包含し、ここで、試験化合物が５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質と相互作用する能力を決定することは、この試験化合物が、既知の化合物と比較して、５７７、２０７３９、もしくは５７１４５またはその生物学的に活性な部分に優先的に結合する能力を決定することを包含する。５７７、２０７３９または５７１４５と既知の標的タンパク質との相互作用を調節する化合物は、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質、特に変異５７７タンパク質、変異２０７３９タンパク質、もしくは変異５７１４５タンパク質の活性を調節する際に有用であり得る。

10

20

30

40

50

【００３２】

別の実施形態において、このアッセイは、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質またはその生物学的に活性な部分が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物の、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の活性またはその生物学的に活性な部分を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）能力が決定される、無細胞アッセイである。試験化合物が５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の活性を調節する能力を決定することは、例えば、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質が５７７標的分子、２０７３９標的分子、もしくは５７１４５標的分子に結合する能力を決定することにより、直接的な結合を決定するための上記の方法のうちの１つにより決定することによって達成され得る。５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質が５７７標的分子、２０７３９標的分子、もしくは５７１４５標的分子に結合する能力を決定することはまた、*real-time Biomolecular Interaction Analysis*（*BIA*）．（*Sjlander, 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*）のような技術を用いて達成され得る。本明細書中で使用される場合、「*BIA*」は、いずれの相互作用体（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体を試験するための技術である。表面プラズモン共鳴の光学的現象（*optical phenomenon*）（*SPR*）の変化は、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。

【００３３】

別の実施形態において、試験化合物が５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の活性を調節する能力を決定することは、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質が５７７標的分子、２０７３９標的分子、もしくは５７１４５標的分子の下流エフェクターの活性をさらに調節する能力を決定することによって達成され得る。例えば、この適切な標的についてのエフェクター分子の活性が決定され得るか、または適切な標的へのエフェクターの結合は、以前記載したように決定され得る。

【００３４】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、５７７タンパク質、２０７３９タンパ

ク質、もしくは５７１４５タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質と結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物とを接触させること、このアッセイ混合物と試験化合物とを接触させること、および試験化合物が５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質と相互作用する能力を決定することを包含し、ここで試験化合物が５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質と相互作用する能力を決定することは、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の、５７７標的タンパク質、２０７３９標的タンパク質、もしくは５７１４５標的タンパク質に優先的に結合するか、または５７７標的タンパク質、２０７３９標的タンパク質、もしくは５７１４５標的タンパク質の活性を調節する能力を決定することを包含する。 10

【００３５】

本発明の上記のアッセイ方法の１つ以上の実施形態において、５７７、２０７３９、もしくは５７１４５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５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５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５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５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達成され得る。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／５７７、２０７３９、もしくは５７１４５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５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５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、複合体形成を実施する条件下（例えば、塩およびpHに関する生理学的条件）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分離させ得、そして５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の結合レベルまたは５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性レベルを標準的な技術を使用して決定し得る。 20 30

【００３６】

タンパク質をマトリクス上に固定するための他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質または５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の標的分子は、ビオチンとストレプトアビジンとの結合体化を使用して固定され得る。ビオチン化された５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５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。あるいは、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質または標的分子と反応性であるが、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体は、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５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５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 40 50

。このような複合体を検出するための方法には、G S T固定化複合体に関しての上記のものに加えて、5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5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5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5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。

【0037】

別の実施形態において、5 7 7発現、2 0 7 3 9発現、もしくは5 7 1 4 5発現の調節因子が、1つの方法において同定される。その方法において、細胞が、候補化合物と接触させられ、そして細胞中の5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現が、測定される。候補化合物の存在下での5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現レベルが、候補化合物の非存在下での5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現レベルと比較される。その後、その候補化合物は、この比較に基づいて、5 7 7発現、2 0 7 3 9発現、もしくは5 7 1 4 5発現の調節因子として同定され得る。例えば、5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現が、その候補化合物の非存在下よりもその存在下で多い（統計学的に有意に多い）場合、その候補化合物は、5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現が、その候補化合物の非存在下よりもその存在下で少ない（統計学的に有意に少ない）場合、その候補化合物は、5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現のインヒビターとして同定される。その細胞における5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質の発現レベルは、5 7 7 m R N A、2 0 7 3 9 m R N A、もしくは5 7 1 4 5 m R N Aまたは5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質を検出するための本明細書中に記載される方法によって測定され得る。

【0038】

本発明のなお別の局面において、5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5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、5 7 7、2 0 7 3 9、もしくは5 7 1 4 5と結合または相互作用し、5 7 7活性、2 0 7 3 9活性、もしくは5 7 1 4 5活性に関与する他のタンパク質（「5 7 7結合タンパク質、2 0 7 3 9結合タンパク質、もしくは5 7 1 4 5結合タンパク質」または「5 7 7 - b p、2 0 7 3 9 - b p、もしくは5 7 1 4 5 - b p」）を同定するために「ベイト（bait）タンパク質」として使用され得る。そのような5 7 7結合タンパク質、2 0 7 3 9結合タンパク質、もしくは5 7 1 4 5結合タンパク質は、例えば、5 7 7、2 0 7 3 9、もしくは5 7 1 4 5の媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、5 7 7タンパク質、2 0 7 3 9タンパク質、もしくは5 7 1 4 5タンパク質または5 7 7標的、2 0 7 3 9標的、もしくは5 7 1 4 5標的によるシグナルの伝播に関与している可能性もある。あるいは

は、そのような 577 結合タンパク質、20739 結合タンパク質、もしくは 57145 結合タンパク質は、577 インヒビター、20739 インヒビター、もしくは 57145 インヒビターである可能性がある。

【0039】

このツーハイブリッドシステムは、ほとんどの転写因子のモジュラー型の性質に基づく。ほとんどの転写因子は、別個の DNA 結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。簡単に述べると、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、577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 タンパク質をコードする遺伝子が、既知の転写因子（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（prey）」または「サンプル」）をコードする DNA 配列ライブラリー由来の DNA 配列が、既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。「ベイト」タンパク質と「プレイ」タンパク質とがインビボで相互作用して 577 依存性複合体、20739 依存性複合体、もしくは 57145 依存性複合体を形成し得る場合、その転写因子の DNA 結合ドメインと活性化ドメインとは、近接する。このように近くにあることにより、その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。そのレポーター遺伝子の発現が検出され得、そしてその機能的な転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そして 577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 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遺伝子を得るために使用され得る。

【0040】

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うちの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節因子が、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、そしてその因子が 577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 タンパク質の活性を調節する能力が、例えば、動物（例えば、本明細書に記載される疼痛についての動物モデル）においてインビボで確認され得る。

【0041】

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因子に関する。従って、適切な動物モデルにおいて、本明細書中に記載されるように同定された因子をさらに使用することは、本明細書中に範囲内にある。例えば、本明細書中に記載されるように同定される因子（例えば、577 調節因子、20739 調節因子、もしくは 57145 調節因子、アンチセンス 577 核酸分子、アンチセンス 20739 核酸分子、もしくはアンチセンス 57145 核酸分子、577 特異的抗体、20739 特異的抗体、もしくは 57145 特異的抗体、または 577 結合パートナー、20739 結合パートナー、もしくは 57145 結合パートナー）が、そのような因子を用いる処置の効力、毒性、または副作用を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。あるいは、本明細書中に記載されるように同定される因子が、そのような因子の作用機構を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載されるような処置のために、上記のスクリーニングアッセイにより同定された新規な因子の使用に関する。

【0042】

これらの化合物（上記のアッセイ系において同定される化合物のような化合物が挙げられるが、それらに限定されない）のいずれもが、疼痛を軽減する能力について試験され得る。疼痛を軽減する能力を示す化合物の同定のための細胞ベースのアッセイおよび動物モデルベースのアッセイは、本明細書中に記載される。

【0043】

さらに、本明細書中で記載されるような、疼痛の動物ベースのモデルを使用して、疼痛および有痛性の状態を処置し得る化合物を同定し得る。このような動物モデルは、疼痛処置において有効であり得る薬物、薬品、治療および介入の同定のための試験基質として使用され得る。例えば、動物モデルは、曝露される動物において、疼痛のこのような改善を誘発するのに十分な濃度および時間で、疼痛を処置する能力を示すと推定される化合物に

曝露され得る。この曝露に対する動物の応答は、処置の前後に疼痛の症状の逆転を評価することによってモニターされ得る。

【 0 0 4 4 】

介入に関して、疼痛の任意の局面を逆転する（すなわち、無痛覚効果を有する）任意の処置は、ヒト疼痛の治療的介入のための候補とみなされるべきである。試験薬剤の投薬量は、用量応答曲線を導くことにより決定され得る。

【 0 0 4 5 】

さらに、遺伝子発現パターンが、化合物が疼痛を改善する能力を評価するために利用され得る。例えば、1以上の遺伝子の発現パターンは、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」の一部を形成し得、次いで、これは、このような評価に用いられ得る。「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」は、本明細書中で使用される場合、所定のセットの条件下で所定の組織型または細胞型について得られたmRNA発現のパターンを含む。遺伝子発現プロファイルは、例えば、差次的ディスプレイ手順、ノーザン分析および/またはRT-PCRを利用することにより、生成され得る。1つの実施形態において、577遺伝子配列、20739遺伝子配列、もしくは57145遺伝子配列は、このような遺伝子発現プロファイルの生成および確認のために、プローブおよび/またはPCRプライマーとして使用され得る。

10

【 0 0 4 6 】

遺伝子発現プロファイルは、細胞ベースのモデル系および/または動物ベースのモデル系内で、既知の状態（心臓血管疾患あるいは正常状態のいずれか）について、特徴付けられ得る。続いて、これらの既知の遺伝子発現プロファイルは、このような遺伝子発現プロファイルの改変に対する試験化合物の効果を確認するために比較され得、そしてこのプロファイルを、より所望のプロファイルにより近くに似るようにされる。

20

【 0 0 4 7 】

例えば、化合物の投与は、疼痛疾患のモデル系の遺伝子発現プロファイルを、コントロール系により近くへと似せ得る。あるいは、化合物の投与は、コントロール系の遺伝子発現プロファイルに対して、疼痛または有痛性の疾患への模倣を開始させ得る。このような化合物は、例えば、目的の試験化合物をさらに特徴付ける際に使用され得るか、またはさらなる動物モデルの作製に使用され得る。

【 0 0 4 8 】

30

（II．細胞ベースのモデル系および動物ベースのモデル系）

疼痛に対するモデルとして機能する細胞ベースの系および動物ベースの系が本明細書中に記載される。これらの系は、種々の適用において使用され得る。例えば、細胞ベースのモデル系および動物ベースのモデル系を使用して、心臓血管疾患に関連する示差的に発現される遺伝子（例えば、577、20739または57145）をさらに特徴付け得る。さらに、動物ベースのアッセイおよび細胞ベースのアッセイは、以下に記載されるように、疼痛を改善し得る化合物を同定するようにに設計されるスクリーニングストラテジーの一部として使用され得る。従って、動物ベースのモデルおよび細胞ベースのモデルを使用して、心臓血管疾患を処置する際に有効であり得る薬物、薬品、治療および介入を同定し得る。さらに、このような動物モデルは、動物被験体においてLD50およびED50を決定するために使用され得、そしてこのようなデータは、潜在的な疼痛処置のインビボ効力を決定するために使用され得る。

40

【 0 0 4 9 】

（A．動物ベースの系）

疼痛の動物ベースのモデル系としては、非組み換え動物および操作されたトランスジェニック動物が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【 0 0 5 0 】

疼痛についての非組み換え動物モデルとしては、例えば、遺伝的モデルが挙げられ得る。

【 0 0 5 1 】

50

さらに、疼痛を示す動物モデルは、例えば、当業者に周知のトランスジェニック動物を作製するための技術とともに、上記 5 7 7 遺伝子配列、2 0 7 3 9 遺伝子配列または 5 7 1 4 5 遺伝子配列を使用することによって、操作され得る。例えば、5 7 7 遺伝子配列、2 0 7 3 9 遺伝子配列または 5 7 1 4 5 遺伝子配列は、目的の動物のゲノム内に導入され得、そして過剰発現され得るか、あるいは内因性の 5 7 7 遺伝子配列、2 0 7 3 9 遺伝子配列または 5 7 1 4 5 遺伝子配列が存在する場合、これらが、過剰発現され得るか、または 5 7 7 遺伝子発現、2 0 7 3 9 遺伝子発現または 5 7 1 4 5 遺伝子発現を過小発現するかもしれない不活化するために破壊されるかのいずれかであり得る。

【0052】

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 コード配列が導入された受精された卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞を使用して、内因性 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 配列が変更されたそれらのゲノム組換え動物または相同性組換え動物へ、外因性 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 配列が導入された非ヒトトランスジェニック動物を作製し得る。このような動物は、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 の機能および/または活性を研究するため、そして 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 活性のモジュレータ - を同定するためおよび/または評価するために有用である。本明細書で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、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、ラットまたはマウスのようなげっ歯類であり、この動物の細胞の 1 つ以上は、トランスジーンを含む。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。トランスジーンは、トランスジェニック動物が発生し細胞のゲノムへ一体化され、そして成熟動物のゲノム中に残っている外因性 DNA であり、それによって、トランスジェニック動物の 1 つ以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指示する。本明細書で使用される場合、「相同性組換え動物」は、非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、マウスであり、ここで、内因性 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 遺伝子は、動物の発生より前の、動物の細胞（例えば、動物の胚性細胞）へ導入された内因性遺伝子と外因性 DNA 分子との間での相同性組換えによって改変されている。

【0053】

本発明の方法において使用されるトランスジェニック動物は、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 コード核酸を受精した卵母細胞の雄の前核へ導入することにより、そして卵母細胞を偽妊娠雌育成動物において発生させることによって、作製され得る。5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 cDNA 配列は、非ヒト動物のゲノムへトランスジーンとして導入され得る。あるいは、ヒト 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 遺伝子の非ヒトアナログ（例えば、マウス 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 遺伝子またはラット 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 遺伝子）が、トランスジーンとして使用され得る。あるいは、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 遺伝子ホモログ（例えば、別の 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 ファミリーメンバー）が、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 配列に対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得、そしてトランスジーンとして使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、トランスジーンに含まれ、トランスジーンの発現の効率を増加させ得る。組織特異的調節配列は、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 トランスジーンに作動可能に連結し、特定の細胞への 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 タンパク質の発現を指示し得る。胚操作およびマイクロインジェクションを介しての、トランスジェニック動物、特に、マウスのような動物を作製するための方法は、当該分野において慣用的であり、例えば、米国特許第 4,736,866 号および同第 4,870,009 号（共に Leder らによる）、同第 4,873,191 号（Wagner らによる）および Hogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Pr

10

20

30

40

50

ess, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に記載されている。類似の方法が、他のトランスジェニック動物の生成ために使用される。トランスジェニック始祖動物は、その動物の組織または細胞中の577、20739または57145 mRNAの発現および/または、そのゲノムにおける577、20739または57145 トランスジーンが存在に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック始祖動物を使用して、トランスジーンを保有するさらなる動物を育種し得る。さらに、577、20739または57145 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保有する他のトランスジェニック動物に対して育種され得る。

【0054】

相同性組換え動物を作製するために、欠失、付加または置換が導入された577、20739または57145 遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製し、それによって、577、20739または57145 遺伝子を改変する（例えば、機能的に破壊する）。577、20739または57145 遺伝子は、ヒト遺伝子であり得るが、より好ましくは、ヒト577、20739または57145 遺伝子の非ヒトホモログであり得る。例えば、ラット577、20739または57145 遺伝子を使用して、相同性組換え核酸分子（例えば、マウスゲノム中の内因性577、20739または57145 遺伝子を改変するのに適したベクター）を構築し得る。好ましい実施形態において、相同性組換え核酸分子は、相同性組換えの際に、内因性577、20739または57145 遺伝子が、機能的に破壊される（すなわち、もはや機能的タンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターともいわれる）ように設計される。あるいは、相同性組換え核酸分子は、相同性組換えの際に、内因性577、20739または57145 遺伝子が、変異されるか、またはそうでなければ、改変されるが依然として機能的タンパク質をコードする（例えば、上流調節領域を改変し、それによって、内因性577、20739または57145 タンパク質を改変し得る）ように設計され得る。相同性組換え核酸分子において、577、20739または57145 遺伝子の改変された部分は、577、20739または57145 遺伝子のさらなる核酸配列によって5'側および3'側に近接し、相同性組換え核酸分子によって保有される内因性577、20739または57145 遺伝子と細胞（例えば、胚性幹細胞）中の外因性577、20739または57145 遺伝子との間で相同性組換えが生じることを可能にする。さらなる近接する577、20739または57145 核酸配列は、内因性遺伝子を有する好結果の相同性組換えにとって十分な長さである。代表的に、数キロ塩基の近接DNA（5'末端と3'末端の両方）は、相同性組換え核酸分子に含まれる（例えば、相同性組換えベクターの記載についてのThomas, K. R. およびCapecechi, M. R. (1987) Cell 51:503を参照のこと）。相同性組換え核酸分子は、細胞（例えば、胚性幹細胞株）に（例えば、電気穿孔によって）導入され、そして導入された577、20739または57145 遺伝子が、内因性577、20739または57145 遺伝子による相同的に組換えられている細胞が、選択される（例えば、Li, Eら(1992) Cell 69:915を参照のこと）。次いで、選択された細胞は、動物（例えば、マウス）の未分化胚芽細胞ヘインジェクションされ、凝集キメラを形成し得る（例えば、Bradley, A. Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells: A practical Approach, E. J. Robertson, 編 (IRL, Oxford, 1987) 113~152ページを参照のこと）。次いで、キメラ胚は、適切な偽妊娠雌育成動物へ移植され得、胚が妊娠期間に入る。生殖細胞において相同的に組換えられたDNAを有する子孫を使用して、動物の全細胞が、トランスジーンの生殖伝達による相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させる。相同性組換え核酸分子（例えば、ベクター）または相同性組換え動物を構築する方法は、Bradley, A. (1991) Current Opinion in Biotechnology 2:823~829およびLe MouellécらによるPCT国際公開番号：WO90/11354; SmithiesらによるWO91/01140; ZijlstraらによるWO92

10

20

30

40

50

/ 0 9 6 8 ; ならびに B e r n s らによる W O 9 3 / 0 4 1 6 9 においてさらに記載される。

【 0 0 5 5 】

別の実施形態において、本発明の方法における使用のための、トランスジーンの調節された発現を可能にする選択されたシステムを含むトランスジェニック非ヒト動物が、作製され得る。このようなシステムの1つの例は、バクテリオファージ P 1 の c r e / l o x P リコンビナーゼシステムである。c r e / l o x P リコンビナーゼ系の記載については、例えば、L a k s o ら (1 9 9 2) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 6 2 3 2 ~ 6 2 3 6 を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、S a c c h a r o m y c e s C e r e v i s i a e の F L P リコンビナーゼ系である (O ' G o r m a n ら (1 9 9 1) S c i e n c e 2 5 1 : 1 3 5 1 ~ 1 3 5 5) 。 c r e / l o x P リコンビナーゼ系を使用して、トランスジーンを発現を調節する場合、C r e リコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードするトランスジーンを含む動物が、必要である。このような動物は、例えば、2 種のトランスジェニック動物をつがわせることによって、「二重」トランスジェニック動物の構築を介して提供され得、そのうちの1種は、選択されたタンパク質およびリコンビナーゼをコードするトランスジーンを含む他のタンパク質を含む。

10

【 0 0 5 6 】

本明細書に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、W i l m u t , I ら (1 9 9 7) N a t u r e 3 8 5 : 8 1 0 ~ 8 1 3 および P C T 国際公開番号 W O 9 7 / 0 7 6 6 8 および W O 9 7 / 0 7 6 6 9 に記載の方法に従って作製され得る。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞 (例えば、体細胞) が単離され、そして導入されて、成長サイクルから出て、そして G₀ 相に入り得る。次いで、休止細胞は、例えば、休止細胞が単離される同じ種の動物由来の除核された卵母細胞に対して、電気パルスを紹介して融合され得る。次いで、再構築された卵母細胞は、桑実胚または未分化胚芽細胞を発生するように培養され、次いで偽妊娠雌育成動物へ移送される。この雌育成動物が産む子孫は、細胞 (例えば、体細胞) が単離される動物のクローンである。

20

【 0 0 5 7 】

次いで、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 m R N A または 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 ペプチド (5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 エピトープに対して指向された抗体を用いて免疫細胞化学的に検出された) を、容易に検出可能なレベルで発現する 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 トランスジェニック動物をさらに評価して、特徴的な痛みを提示する動物を同定するべきである。

30

【 0 0 5 8 】

(B . 細胞ベースの系)

5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 タンパク質をコードする 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 遺伝子配列を含み、発現し、さらに侵害知覚と関連する細胞表現型を示す細胞は、鎮痛性活性を示す化合物を同定するために使用され得る。このような細胞としては、非組換え単球細胞株 (例えば、U S 9 3 7 (A T C 番号 C R L - 1 5 9 3)、T H P - 1 (A T C 番号 T I B - 2 0 2)、および P 3 8 8 D 1 (A T C 番号 T I B - 6 3)) ; 内皮細胞 (例えば、ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C)、ヒト微小血管内皮細胞 (H M V E C)、およびウシ大動脈内皮細胞 (B A E C)) ; ならびに一般的な哺乳動物細胞株 (例えば、H e l a 細胞および C O S 細胞 (例えば、C O S - 7 (A T C 番号 C R L - 1 6 5 1))) そして神経細胞株が挙げられ得る。さらに、このような細胞としては、組換えトランスジェニック細胞株が挙げられ得る。例えば、上記の本発明の疼痛動物モデルは、この障害についての細胞培養モデルとして使用され得る、侵害知覚に関連する1つ以上の細胞型を含む細胞株を作製するために使用され得る。本発明の疼痛モデルトランスジェニック動物由来の初代培養物が利用され得る一方で、継続的な細胞株の作製が好ましい。トランスジェニック動物から継続的な細胞株を導くために使用され得る技術の例については、S m a l l ら、(1 9 8 5) M o l . C e l l B i o l . 5 : 6 4 2 - 6 4 8 を参照

40

50

のこと。

【0059】

あるいは、侵害知覚に関与することが既知である細胞型の細胞は、その細胞内の577、20739または57145遺伝子発現の量を増大または減少し得る配列を用いてトランスフェクトされ得る。例えば、577、20739または57145遺伝子配列は、目的の細胞のゲノムに導入され得、そしてこの細胞において過剰発現されるか、または内因性577、20739または57145遺伝子配列が存在する場合、そのような配列が過剰発現され得るか、代わりに577、20739または57145遺伝子発現を過小発現または不活性化するために破壊され得る。

【0060】

577、20739または57145遺伝子を過剰発現させるために、577、20739または57145遺伝子のコード部分は、目的の細胞型（例えば、内皮細胞）において遺伝子発現を駆動し得る調節配列に連結され得る。このような調節領域は、当業者に周知であり、過度な実験なくして、利用され得る。標的遺伝子を発現するための組換え法は、上記される。

【0061】

内因性577、20739または57145遺伝子配列の過小発現のために、このような配列は、目的の細胞型のゲノムに再び導入される場合に、内因性577、20739または57145対立遺伝子が不活性化されるように、単離および操作され得る。好ましくは、操作された577、20739または57145配列は、内因性577、20739または57145配列が、細胞ゲノムに操作された577、20739または57145配列を組み込む際に破壊されるように、遺伝子標的化を介して導入され得る。宿主細胞の577、20739または57145遺伝子を用いたトランスフェクションは、上記で議論される。

【0062】

化合物で処理されるかまたは577、20739または57145遺伝子でトランスフェクトされる細胞は、侵害知覚と関連する表現型について試験され得る。

【0063】

577、20739または57145核酸のトランスフェクションは、標準的な技術（本明細書中に記載され、例えば、Ausubel（1989）前出に記載される技術）を使用することにより達成され得る。トランスフェクトされた細胞は、組換え577、20739または57145遺伝子配列の存在について、577、20739または57145 mRNAの発現および蓄積について、ならびに組換え577、20739または57145タンパク質産生の存在について評価されるべきである。577、20739または57145遺伝子発現の減少が所望される場合において、標準的な技術は、内因性577、20739または57145遺伝子発現における減少および/または577、20739または57145タンパク質産生における減少が達成されるか否かを実証するために、使用され得る。

【0064】

（III. 予測医学）

本発明はまた、予測医学の分野に関する。この分野において、診断アッセイ、予後アッセイ、およびモニタリング臨床試験が、予後（予測）目的のために使用され、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞（例えば、内皮細胞）、組織（例えば、脈管組織））の状況において、577、20739または57145タンパク質および/または核酸の発現、ならびに577、20739または57145活性を決定し、それによって、個体が、素因に悩んでいるか、または疼痛を経験しているか否かを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が疼痛性の障害を発症する危険性があるか否かを決定するための、診断（または予測）アッセイを提供する。例えば、577、20739または57145遺伝子における変異が、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予

10

20

30

40

50

後目的または予測目的のために使用され得、それによって個体は、疼痛性の関連する障害の発症前に、予防的に処置される。

【0065】

本発明の別の局面は、臨床試験における、577、20739または57145の発現または活性に対する577、20739または57145モジュレーター（例えば、抗577、20739または57145抗体または577、20739または57145リボザイム）の影響のモニタリングに関する。

【0066】

これらおよび他の薬剤は、以下の節で、さらに詳細に記載される。

【0067】

（A．診断アッセイ）

患者が疾患に悩んでいるか否かを決定するために、被験体からの生物学的サンプルが獲得され得、そしてその生物学的サンプルは、生物学的サンプル中で、577、20739または57145タンパク質または577、20739または57145タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）を検出し得る化合物または薬剤を接触され得る。577、20739または57145 mRNAまたはゲノムDNAを検出するのに好ましい薬剤は、577、20739または57145 mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、配列番号1、4もしくは7に示される577、20739または57145核酸またはそれらの一部（例えば、少なくとも15、20、25、30、25、40、45、50、100、250または500ヌクレオチド長であり、ストリンジェントな条件下で、577、20739または57145 mRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチド）であり得る。本発明の診断アッセイにおいて使用するのに適切な他のプローブが、本明細書中に記載されている。

【0068】

サンプル中の577、20739または57145タンパク質を検出するのに好ましい薬剤は、577、20739または57145タンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体であり得、より好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。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。用語「標識」は、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をプローブまたは抗体に連結（すなわち、物理的に連結）することによるプローブまたは抗体の直接的な標識、ならびに直接的に標識された別の試薬との反応性によるこのプローブまたは抗体の間接的な標識を包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得るように、ビオチンでDNAプローブの末端を標識する一次抗体の検出が挙げられる。

【0069】

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、ならびに被験体内に存在する組織、細胞、および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビトロおよびインビボで、生物学的サンプル中の577、20739または57145 mRNA、タンパク質、またはゲノムDNAを検出し得る。例えば、577、20739または57145 mRNAを検出するためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。577、20739または57145のタンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫ソルベント検定法（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光検査法が挙げられる。577、20739または57145のゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、577、20739または57145のタンパク質を検出するためのインビボ技術としては、被験体への標識抗577、20739または57145抗体の導入が挙げられる。例えば、抗体は、被験体における存在および位

10

20

30

40

50

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を用いて、標識され得る。

【0070】

別の実施形態において、本方法はさらに、コントロール被験体からのコントロール生物学的サンプルを獲得する工程、コントロールサンプルと、577、20739または57145タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤とを接触させる工程（その結果、577、20739または57145タンパク質、mRNA、または核酸の存在が、生物学的サンプルにおいて検出される）、およびコントロールサンプル中の577、20739または57145タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と、試験サンプル中の577、20739または57145タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

10

【0071】

（B．予後アッセイ）

本発明はさらに、異常な577、20739または57145発現または活性に関連する疾患を有するかまたは発症する危険を有する被験体を同定するための方法に関する。

【0072】

本明細書中で使用される場合、用語「異常な」は、野生型の577、20739または57145の発現または活性から逸脱した、577、20739または57145の発現または活性を含む。異常な発現または活性としては、発現または活性の増加または減少、ならびに野生型の発現の発生的パターンまたは細胞下の発現のパターンに従わない、発現または活性が挙げられる。例えば、異常な577、20739または57145の発現または活性は、577、20739または57145遺伝子が、577、20739または57145遺伝子における変異によって過少発現または過剰発現される場合、ならびにこのような変異によって、非機能的577、20739または57145タンパク質または野生型の様式で機能しないタンパク質（例えば、577、20739または57145基質と相互作用しないタンパク質、または非577、20739または57145基質と相互作用するタンパク質）を生じる場合を含むことが意図される。

20

【0073】

本明細書中で記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは後述のアッセイ）は、疾患を有するかまたはそれを発症する危険を有する被験体を同定するために使用され得る。生物学的サンプルは、被験体から得られ得、そして遺伝子変更の存在または非存在について試験され得る。例えば、このような遺伝的変更は、以下のうちの少なくとも1つの存在を特定することによって検出され得る：1）577、20739または57145遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失、2）577、20739または57145遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加、3）577、20739または57145遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、4）577、20739または57145遺伝子の染色体再配置、5）577、20739または57145遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルの変更、6）577、20739または57145遺伝子の異常な改変（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターン）、7）577、20739または57145遺伝子のメッセンジャーRNA転写の非野生型スプラッシングパターンの存在、8）577、20739または57145タンパク質の非野生型レベル、9）577、20739または57145遺伝子の対立遺伝子損失、および10）577、20739または57145タンパク質の不適切な翻訳後改変。

30

40

【0074】

本明細書中に記載されるように、577、20739または57145遺伝子における遺伝的変更を検出するために使用され得る当該分野において公知の多くのアッセイが、存在する。例えば、577、20739または57145遺伝子における遺伝的変更は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと）（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、あるいは、ライゲーション連鎖反応（LCR）（例えば、Landegranら（19

50

88) Science 241:1077-1080; および Nakazawa ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364 を参照のこと) におけるプローブ/プライマーを使用して検出され得、これらのうちの後者は、577、20739 または 57145 遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る (Abravaya ら (1995) Nucleic Acids Res. 23:675-682 を参照のこと)。この方法は、被験体から生物学的サンプルを収集する工程、このサンプルの細胞から核酸 (例えば、ゲノム、mRNA またはこれらの両方) を単離する工程、(存在するならば) 577、20739 または 57145 遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、この核酸サンプルを、577、20739 または 57145 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、ならびに増幅産物の存在または非存在を検出するかあるいは増幅産物のサイズを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程を包含する。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合わせて予備的増幅工程として使用するに好ましくあり得ることが、予測される。

10

20

30

40

50

【0075】

代替の増幅法としては以下が挙げられる: 自己維持的配列複製 (self sustained sequence replication) (Guatelli, J. C. ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系 (Kwoh, D. Y. ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ (Lizardi, P. M. ら (1988) Bio-Technology 6:1197)、または他の核酸増幅法のいずれか、その後の当業者に周知の技術を使用する増幅分子の検出。これらの検出スキームは、このような分子が非常に少数で存在する場合に、核酸分子の検出に特に有用である。

【0076】

代替の実施形態において、生物学的サンプル由来の 577 遺伝子、20739 遺伝子、または 57145 遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更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、そしてフラグメント長サイズが、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は、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 (例えば、米国特許第 5,498,531 号) の使用は、リボザイム切断部位の発生または喪失によって、特異的変異の存在についてスコア付けするために使用され得る。

【0077】

他の実施形態において、577、20739、または 57145 における遺伝的変異は、生物学的サンプル由来の核酸およびコントロール核酸 (例えば、DNA または RNA) を、何百個または何千個のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイにハイブリダイズさせることによって同定され得る (Cronin, M. T. ら (1996) Human Mutation 7:244-255; Kozal, M. J. ら (1996) Nature Medicine 2:753-759)。例えば、577、20739、または 57145 における遺伝的変異は、Cronin, M. T. ら (1996) (上述) に記載されるような光生成 DNA プローブを含む 2 次元アレイにおいて同定され得る。簡単には、プローブの第 1 のハイブリダイゼーションアレイを使用して、連続的で重複するプローブの線状アレイを作製することによって、サンプルおよびコントロールにおける DNA の長鎖を通して走査して配列間の塩基変化を同定し得る。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に相補的なより小さな特定化されたプローブアレイを使用することによって、特異的変異の特徴付けを可能にする第 2 のハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、パラレルプローブセット、野生型遺伝子に対するある相補体および変異遺伝子に対する他の相補体から構成され

る。

【0078】

なお別の実施形態において、当該分野において公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、生物学的サンプル中の577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子を直接的に配列決定し得、そして生物学的サンプル中の577、20739、または57145の配列を、対応する野生型（コントロール）配列と比較することによって変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaxamおよびGilbert(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:560またはSanger(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463によって開発された技術に基づく反応が挙げられる。種々の自動化配列決定手順のいずれかが、質量分析法による配列決定（例えば、PCT国際公開番号WO94/16101; Cohenら(1996)Adv.Chromatogr.36:127-162; およびGriffinら(1993)Appl.Biochem.Biotechnol.38:147-159を参照のこと）を含む診断アッセイ(Naeve, C.W.(1995)Biotechniques 19:448-53)を行う場合に利用され得ることもまた、企図される。

10

【0079】

577遺伝子、20739遺伝子、または57145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、切断剤からの保護がRNA/RNA異種二重鎖またはRNA/DNA異種二重鎖中でミスマッチした塩基を検出するために使用される方法が挙げられる(Myersら(1985)Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の分野の技術は、野生型577配列、20739配列、または57145配列を含む（標識された）RNAまたはDNAを、組織サンプルより得られた潜在的変異RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成される異種二重鎖を提供することによって開始する。二本鎖二重鎖は、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するような二重鎖の一本鎖領域を切断する因子で処理される。例えば、ミスマッチ領域を酵素的に消化するために、RNA/DNA二重鎖はRNaseで処理され得、DNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理され得る。他の実施形態において、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二本鎖のいずれかが、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで処理され、そして、ミスマッチ領域を消化するためにピペリジンで処理される。ミスマッチ領域の消化後、次いで、生じた物質が、変異部位を決定するために変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズで分けられる。例えば、Cottonら(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:4397およびSaleebaら(1992)Methods Enzymol.217:286-295を参照のこと。好ましい実施形態において、コントロールDNAまたはRNAが、検出のために標識され得る。

20

30

【0080】

さらに別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルより得られた577 cDNA、20739 cDNA、または57145 cDNA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本鎖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」酵素と呼ばれる）を使用する。例えば、E.coliのmutY酵素は、G/Aミスマッチで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ミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994)Carcinogenesis 15:1657-1662)。例示の実施形態に従って、577配列、20739配列、または57145配列（例えば、野生型の577配列、20739配列、または57145配列）に基づくプローブは、試験細胞からのcDNA産物または他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素で処理され、そして存在する場合、切断産物は、電気泳動的プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

40

【0081】

50

他の実施形態において、電気泳動的移動度の変更を使用して、577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖コンフォメーション多型(SSCP)を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動的移動度の差異を検出し得る(Oritaら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86: 2766; Cotton(1993)Mutat. Res. 285: 125-144およびHayashi(1992)Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79もまた参照のこと)。サンプルおよびコントロールの577核酸、20739核酸、または57145核酸の一本鎖DNAフラグメントは変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動的移動度において生じた変更は、単一の塩基変化の検出さえ可能にする。DNAフラグメントは、標識されたプローブで標識されても検出されてもよい。このアッセイの感度は、(DNAではなく)RNAを用いることにより増強され得、ここで二次構造は、配列の変化により感受性である。好ましい実施形態において、目的の方法は、電気泳動的移動度の変化に基づいて二本鎖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)。

10

20

30

40

50

【0082】

なお別の実施形態において、変性剤の勾配を含有するポリアクリルアミドゲル中での変異体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)(Myersら(1985)Nature 313: 495)を使用してアッセイされる。DGGEが分析法として使用される場合、DNAは、例えば、PCRによって約40bpの高温融解GCリッチDNAのGCクランプを付加することにより完全には変性していないことを確認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DNAおよびサンプルDNAの移動度の差異を同定するための変性勾配の代わりに使用される(RosenbaumおよびReissner(1987)Biophys Chem 265: 12753)。

【0083】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：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。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーが調製され得、ここで、公知の変異が中心におかれ、次いで、完全な一致が見出される場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAにハイブリダイズする(Saikiら(1986)Nature 324: 163); Saikiら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に結合しそして標識標的DNAとハイブリダイズする場合に、PCR増幅標的DNAまたは多くの種々の変異にハイブリダイズされる。

【0084】

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使用され得る。増幅に特異的なプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に目的の変異を保有し得るか(その結果、増幅は、示差的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448)、または適切な条件下で、ミスマッチが、ポリメラーゼ伸長を防ぎ得るかまたは低減し得る場合、一方のプライマーの3'末端で目的の変異を保有し得る(Prossner(1993)Tibtech 11: 238)。さらに、切断ベース検出を作製するために、変異領域中に新規の制限部位を導入することが、好ましくあり得る(Gaspariniら(1992)Mol. Cell Probes 6: 1)。特定の実施形態において、増幅のためにTaqリガーゼを使用して増幅が行われ得ることもまた、明らかである(Barany(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189)。このような場合に、連結は、5'配列の3'末端で完全なミスマッチが存在する場合にのみ生じ、これにより、増幅の存在または非存在を探索す

ることによって特定の部位で既知の変異の存在を検出し得る。

【0085】

さらに、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して、疾患を効果的に処置するために、被験体が577モジュレーター、20739モジュレーター、または57145モジュレーター（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、核酸または低分子）を投与され得るか否かを、決定し得る。

【0086】

（C．臨床試験の間の効果のモニタリング）

本発明はさらに、577モジュレーター、20739モジュレーター、または57145モジュレーター（例えば、本明細書中において同定された577モジュレーター、20739モジュレーター、または57145モジュレーター）の、疾患の処置に対する有効性を決定するための方法を提供する。例えば、577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは577活性、20739活性、または57145活性のアプレギュレートにおいて、577モジュレーター、20739モジュレーター、または57145モジュレーターは、577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは577活性、20739活性、または57145活性のダウンレギュレート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、577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは577活性、20739活性、または57145活性のダウンレギュレートにおける577モジュレーター、20739モジュレーター、または57145モジュレーターの有効性は、577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは577活性、20739活性、または57145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、577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子、好ましくは、痛覚に關与する他の遺伝子の発現または活性が、「読み出し」すなわち特定の細胞の表現型のマーカーとして使用され得る。

【0087】

例えば（限定のためではなく）、（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）577活性、20739活性、または57145活性を調節する因子での処置によって細胞において調節される、577、20739、または57145を含む遺伝子が、同定され得る。よって、疼痛障害を罹患する被験体に対する577活性、20739活性、または57145活性を調節する因子の効果を（例えば、臨床試験において）研究するために、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、577、20739、または57145、および疼痛障害に関連する他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子発現レベル（例えば、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるようなノザンプロット分析またはRT-PCRによって、あるいは本明細書中に記載される方法の1つによって生成されるタンパク質の量を測定することによって、または577、20739、もしくは57145、または他の遺伝子の活性レベルを測定することによって、定量され得る。この方法において、遺伝子発現パターンは、577活性、20739活性、または57145活性を調節する因子に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとして働き得る。この応答状態は、個体を577活性、20739活性、または57145活性を調節する因子で処置する前、あるいはその間の種々の時点で測定され得る。

【0088】

好ましい実施形態において、本発明は、577活性、20739活性、または57145活性を調節する因子（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、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低分子）での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供し、以下の工程を包含する：（i）この因子の投与前に予め投与するサンプルを被験体から得る工程；（ii）この予め投与するサンプル中の577、20739、または57145

のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルを検出する工程；(iii) 1つ以上の後に投与するサンプルを被験体から得る工程；(iv) これらの後に投与するサンプル中の577、20739、または57145のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルを検出する工程；(v) 予め投与するサンプル中の577、20739、または57145のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルを、後に投与するサンプル中の577、20739、または57145のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルと比較する工程；ならびに(vi) よって被験体に対する因子の投与を変更する工程。例えば、因子の投与増加は、577、20739、または57145の発現または活性を、検出された（すなわち、因子の有効性を増加させる）レベルよりも高いレベルに増加することが、望ましくあり得る。あるいは、因子の投与減少は、577、20739、または57145の発現または活性を、検出された（すなわち、因子の有効性を減少させる）レベルよりも低いレベルに減少することが、望ましくあり得る。この実施形態に従って、577、20739、または57145の発現または活性は、観察可能な表現型応答の非存在下ですら、因子の有効性の指標として使用され得る。

10

【0089】

(IV. 処置方法)

本発明は、被験体（例えば、疾患の危険性のある（または疾患を罹患しそうな）ヒト）を処置する予防法および治療法の両方を提供する。処置の予防法および治療法の両方の観点で、このような処置は、薬理ゲノム学（pharmacogenomics）の分野から得られる知識に基づいて、特異的に仕立てられ（tailored）得るか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、遺伝子配列決定、統計的遺伝学および遺伝子発現分析のようなゲノム技術の、臨床開発および市場での薬物に対する適用をいう。より詳細には、この用語は、患者の遺伝子がどのように薬物に対する患者の応答（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）を決定するのにについての研究をいう。

20

【0090】

従って、本発明の別の局面は、個々の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の577分子、20739分子、または57145分子、あるいは、577モジュレーター、20739モジュレーター、または57145モジュレーターのいずれかを用いる被験体の予防処置または治療処置を仕立てるための方法を提供する。薬理ゲノム学によって、臨床医（clinician）または内科医（physician）は、この処置から最も利益を得る患者に対して予防処置または治療処置を標的化することが可能になり、そして毒性薬物関連副作用を被る患者の処置を避けることが可能になる。

30

【0091】

(A. 予防法)

1つの局面において、本発明は、577、20739、または57145の発現、あるいは577、20739、または57145の活性を調節する因子を被験体に投与することによって、被験体において疾患を予防するための方法を提供する。心臓血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症および/または血栓）の危険性のある被験体は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予防アッセイのいずれかまたはその組み合わせによって、同定され得る。予防薬の投与は、異常な577、20739、または57145の発現または活性に特徴的な症状の徴候の前に生じ得、その結果、疾患が、その進行において予防、あるいは遅延される。577、20739、または57145の異常の型に依存して、例えば、577、20739、または57145、577、20739、または57145のアゴニスト剤、あるいは577、20739、または57145のアンタゴニスト剤が、被験体の処置のために使用され得る。適切な因子は、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。

40

【0092】

(B. 治療法)

50

疼痛が改善され得る方法および組成物が、本明細書中に記載される。特定の疼痛障害が、過剰なレベルの遺伝子産物によってか、または異常な活性もしくは過剰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もたらされる。それ自体、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、疼痛の改善をもたらす。遺伝子発現レベルまたはタンパク質活性の減少のための技術は、以下に議論される。

【0093】

あるいは、特定の他の疼痛障害が、遺伝子発現レベルの非存在または減少によってかまたはタンパク質活性レベルの減少によって、少なくとも部分的にもたらされる。それ自体、このようなタンパク質の遺伝子発現および/または活性のレベルの増加は、疼痛の改善をもたらす。

10

【0094】

いくつかの場合において、疾患状態における遺伝子のアップレギュレートは、疾患状態に対応するその遺伝子産物についての保護的役割を反映する。このような遺伝子発現の増加、または遺伝子産物の活性の増加は、それが発揮する保護的効果を強化する。いくつかの疼痛状態は、このような保護的遺伝子の異常に低いレベルの活性から生じ得る。これらの場合においてもまた、遺伝子発現のレベルの増加および/またはこのような遺伝子産物の活性の増加は、疼痛の改善をもたらす。標的遺伝子発現レベルまたは標的遺伝子産物活性レベルを増加するための技術は、本明細書中に議論される。

【0095】

従って、本発明の別の局面は、治療目的で577、20739、または57145の発現または活性を調節する方法に関する。よって、例示的实施形態において、本発明の調節方法は、細胞を、577、20739、または57145、あるいは細胞（例えば、内皮細胞または卵巣細胞）に関連する577、20739、または57145のタンパク質活性の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。577、20739、または57145の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、577、20739、もしくは57145のタンパク質の天然に存在する標的分子（例えば、577、20739、または57145のリガンドまたは基質）、577、20739、または57145の抗体、577、20739、または57145のアゴニストまたはアンタゴニスト、577、20739、または57145のアゴニストまたはアンタゴニストのペプチド模倣物、あるいは、他の低分子）であり得る。1つの実施形態において、この因子は、1つ以上の577、20739、または57145の活性を刺激する。このような刺激因子の例としては、活性な577、20739、または57145のタンパク質、および細胞中に導入された577、20739、または57145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577、20739、または57145の活性を阻害する。このような阻害因子の例としては、アンチセンス577核酸分子、アンチセンス20739核酸分子、またはアンチセンス57145核酸分子、抗577抗体、抗20739抗体、または抗57145抗体、および577、20739、または57145のインヒビターが挙げられる。これらの調節法は、（例えば、細胞を因子とともに培養することによって）インピトロで、あるいは（例えば、因子を被験体に投与することによって）インピボで行われ得る。それ自体、本発明は、577、20739、または57145のタンパク質または核酸分子の、異常な発現もしくは活性または所望されない発現もしくは活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、本発明は、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）、あるいは577、20739、または57145の発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）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、本方法は、577、20739、または57145の減少した発現もしくは活性、異常な発現もしくは活性または所望されない発現もしくは活性を補う治療薬として、577、20739、または57145のタンパク質または核酸分子を投与する工程を包含する。

20

30

40

50

【0096】

577、20739、または57145の活性の刺激は、577、20739、または57145が異常にダウンレギュレートされる状況および/または577、20739、または57145の増加した活性が有益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、577、20739、または57145の活性の阻害は、577、20739、または57145が異常にアップレギュレートされる状況および/または577、20739、または57145の減少した活性が有益な効果を有するようである状況において望ましい。

【0097】

((i) 標的遺伝子の発現、合成、または活性を阻害するための方法)

10

上で考察されるように、心臓血管障害に関連する遺伝子は、遺伝子活性の増加したレベルを介してこのような障害を引き起こし得る。いくつかの場合において、このようなアップレギュレーションは、疾患状態に対して原因となるかまたは増悪させる影響を有し得る。種々の技術が、このような遺伝子および/またはタンパク質の発現、合成、または活性を阻害するために使用され得る。

【0098】

例えば、上記のアッセイを介して同定される化合物のような化合物(阻害性活性を示す)は、本発明に従って、疼痛を軽減するために使用され得る。このような分子としては、有機低分子、ペプチド、抗体などが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0099】

20

例えば、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質に対する内因性リガンドと競合する化合物が投与され得る。リガンド結合した577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の量に生じる減少は、内皮細胞生理学を調節する。この目的のために特に有用であり得る化合物は、例えば、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の可溶性タンパク質または可溶性ペプチド、例えば、1つ以上の細胞外ドメインを含むペプチド、またはその一部および/もしくはアナログ(例えば、Ig-テールド(tailed)融合タンパク質のような可溶性融合タンパク質を含む)が挙げられる(Ig-テールド融合タンパク質の産生の考察について、例えば、米国特許第5,116,964号を参照のこと)。あるいは、577レセプター部位、20739レセプター部位、または57145レセプター部位に結合するが、タンパク質を活性化しない、リガンドアナログまたは抗体のような化合物(例えば、レセプター-リガンドアンタゴニスト)は、577タンパク質活性、20739タンパク質活性、または57145タンパク質活性を阻害するのに有効であり得る。

30

【0100】

さらに、577遺伝子、20739遺伝子、または57145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、異常な577遺伝子活性、20739遺伝子活性、または57145遺伝子活性を阻害するために使用され得る。なおさらに、3重らせん分子は、異常な577遺伝子活性、20739遺伝子活性、または57145遺伝子活性を阻害する際に利用され得る。

【0101】

40

本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸分子は、代表的に、被験体に投与されるかまたはインサイチュで産生され、その結果、これらは、577タンパク質、20739タンパク質、または57145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にハイブリダイズするかまたは結合して、それによって、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。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性によって、または、例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与し得る。例えば、全身投与に関し

50

て、アンチセンス分子は、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* I II プロモーターまたは *pol* I II I プロモーターの制御下に配置されるベクター構築物が、好ましい。

【0102】

なお別の実施形態において、本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸分子は、
- アノマー核酸分子である。 - アノマー核酸分子は、相補的 RNA と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 - 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 - 6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2' - o - メチルリボヌクレオチド (Inoue ら (1987) *Nucleic Acids Res.* 15 : 6131 - 6148) またはキメラ RNA - DNA アナログ (Inoue ら (1987) *FEBS Lett.* 215 : 327 - 330) を含み得る。

10

【0103】

なお別の実施形態において、本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、これらのリボザイムが相補的領域を有する、一本鎖核酸 (例えば、mRNA) を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性 RNA 分子である。従って、リボザイム (例えば、ハンマーヘッドリボザイム (Haselhoff および Gerlach (1988) *Nature* 334 : 585 - 591 に記載される)) は、577 mRNA 転写物、20739 mRNA 転写物、または 57145 mRNA 転写物を触媒的に切断するために使用されて、それによって、577 mRNA、20739 mRNA、または 57145 mRNA の翻訳を阻害し得る。577 コード核酸、20739 コード核酸、または 57145 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 577 cDNA、20739 cDNA、または 57145 cDNA (すなわち、配列番号 1 または配列番号 3) のヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。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 577 コード mRNA、20739 コード mRNA、または 57145 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、577 mRNA、20739 mRNA、または 57145 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)。

20

30

【0104】

577、20739、または 57145 の遺伝子の発現はまた、標的細胞中で 577、20739、または 57145 の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、577、20739、または 57145 の調節領域 (例えば、577、20739、または 57145 のプロモーターおよび / またはエンハンサー) に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害され得る (例えば、Helene, C. ら (1991) *Anticancer Drug Des.* 6 (6) : 569 - 84; Helene, C. ら (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660 : 27 - 36; および Maher, L. J. (1992) *Bioassays* 14 (12) : 807 - 15 を参照のこと)。

40

【0105】

577 タンパク質、20739 タンパク質、または 57145 タンパク質に特異的であり、かつその活性を妨害する抗体もまた、577、20739、または 57145 のタン

50

パク質機能を調節または阻害するために使用され得る。このような抗体は、577、20739、または57145のタンパク質自体、あるいはこのタンパク質の部分に対応するペプチドに対して、本明細書中に記載される標準的技術を使用して作製され得る。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabフラグメント、単鎖抗体、またはキメラ抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

標的遺伝子タンパク質が細胞内であり、かつ全抗体が使用される例において、内部移行 (internalizing) 抗体が好ましくあり得る。リポフェクチンリポソームは、標的エピトープに結合するFab領域の抗体またはフラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体のフラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメイン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、標的遺伝子タンパク質に結合する抗体の可変領域のドメイン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。このようなペプチドは、当該分野で周知の方法を使用して、化学的に合成され得るかまたは組換えDNA技術を介して産生され得る (例えば、Creighton (1983)、上記; および Sambrookら、(1989) 上記に記載される)。細胞内標的遺伝子エピトープに結合する単鎖中和抗体もまた、投与され得る。このような単鎖抗体は、例えば、Marascoら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893に記載されるような技術を利用することにより、例えば、標的細胞集団内で単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。

10

20

【0107】

いくつかの場合において、標的遺伝子タンパク質は、細胞外であるか、または膜貫通タンパク質 (例えば、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質) である。577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の1つ以上の細胞外ドメインに特異的な抗体、および例えば、その活性を妨害する抗体は、疼痛または痛有性障害を処置する際に特に有用である。このような抗体は、血流から直接標的ドメインに接近できるので、特に効率的である。ペプチド投与に適切である、以下に記載の投与技術のいずれかが、それらの作用部位に対する阻害性標的遺伝子抗体を有効に投与するために使用され得る。

【0108】

(ii) 標的遺伝子活性を回復または増強するための方法

疼痛を引き起こす遺伝子は、心臓血管疾患状態では過少発現され得る。あるいは、このような遺伝子のタンパク質産物の活性が減少され、疼痛の発生に至り得る。このような遺伝子発現のダウンレギュレーションまたはタンパク質活性の減少は、疾患状態に対する原因となる効果または悪化する効果を有し得る。

30

【0109】

いくつかの場合、疾患状態においてアップレギュレートされる遺伝子が、防御効果を発揮し得る。種々の技術は、疼痛状態に回答して防御効果を発揮する遺伝子および/またはタンパク質の発現、合成、または活性を増加させるために使用され得る。

【0110】

この節に記載されるのは、577、20739、もしくは57145の活性のレベルが、疼痛が改善されるレベルに増大され得る方法である。577、20739、もしくは57145の活性のレベルは、例えば、577遺伝子、20739遺伝子、もしくは57145遺伝子の発現のレベルを増加させることにより、または存在する活性な577タンパク質、20739タンパク質、もしくは57145タンパク質のレベルを増加させることにより増加させ得る。

40

【0111】

例えば、577タンパク質、20739タンパク質、もしくは57145タンパク質は、疼痛を改善するのに十分なレベルで、このような症状を示す患者に投与され得る。以下に議論する技術のいずれかが、このような投与のために使用され得る。当業者は、以下に

50

記載するような技術を用いて、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の有効な無毒の投薬の濃度をいかにして決定するかを容易に理解する。

さらに、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質をコードするRNA配列は、疼痛を緩和されるように５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質のレベルを生じさせるのに十分な濃度で、疼痛を示す患者に投与され得る。例えば、リボソーム投与のような化合物の細胞内投与を達成する以下に議論した技術のいずれかが、このようなRNA分子の投与のために使用され得る。RNA分子は、例えば、本明細書中に記載のような組み換え技術によって生成され得る。

【０１１２】

10

さらに、被験体は、遺伝子置換療法によって処置され得る。５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の機能を有する正常な５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質の産生を指向する５７７遺伝子、２０７３９遺伝子、もしくは５７１４５遺伝子、またはそれらの部分の１つ以上のコピーが、DNAを細胞に導入する他の粒子（例えば、リボソーム）に加えて、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびレトロウイルスベクターを含むが、これらに限定されないベクターを用いて細胞に挿入され得る。さらに、上記の技術のような技術が、ヒト細胞への５７７遺伝子配列、２０７３９遺伝子配列、もしくは５７１４５遺伝子配列の導入について用いられ得る。

【０１１３】

５７７発現遺伝子配列、２０７３９発現遺伝子配列、もしくは５７１４５発現遺伝子配列を含む細胞、好ましくは、自家細胞は、疼痛の改善を可能にする位置で被験体に導入または再導入され得る。このような細胞置換技術は、例えば、遺伝子産物が分泌される場合、すなわち、細胞外遺伝子産物の場合、好ましいとされ得る。

20

【０１１４】

（Ｃ．薬学的組成物）

本発明の別の局面は、疾患を罹患する被験体を処置するための方法に関する。これらの方法は、５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の発現または５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性を調節する因子（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）、あるいはこのような因子の組合わせを、被験体に投与する工程を包含する。別の実施形態において、本方法は、減少した５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の発現または５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性、異常な５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の発現または５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性、あるいは所望されない５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の発現または５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性を補うための治療剤として５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、もしくは５７１４５タンパク質または５７７核酸分子、２０７３９核酸分子、もしくは５７１４５核酸分子を被験体に投与する工程を包含する。

30

【０１１５】

５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性の刺激は、５７７、２０７３９、もしくは５７１４５が異常にダウンレギュレートされる状況、および／または増加した５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性が有利な効果を有しそうである状況において、所望される。同様に、５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性の阻害は、５７７、２０７３９、もしくは５７１４５が異常にアップレギュレートされる状況、および／または減少した５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性が有利な効果を有しそうである状況において、所望される。

40

【０１１６】

５７７、２０７３９、もしくは５７１４５の活性を調節する因子は、このような投与に適切な薬学的組成物を用いて被験体に投与され得る。このような組成物は、典型的には因子（例えば、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含む。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、薬剤投与に

50

適合可能な溶媒、分散媒体、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のいずれかおよび全てを含むことが意図される。このような媒体及び因子の、薬学的に活性な物質への使用は、当該分野において周知である。任意の慣用的な媒体または因子が活性化化合物に適合し得ない場合を除いて、組成物におけるこれらの使用が意図される。補充される活性化化合物はまた、組成物中に組み込まれ得る。

【0117】

本発明の治療法において使用される薬学的組成物は、その意図される投与経路に適合性であ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、静脈内投与、皮内投与、皮下投与）、経口投与（例えば、吸入投与）、経皮投与（局所投与）、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液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注入水、生理食塩水溶液、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重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、酢酸、クエン酸またはリン酸）および張性の調整のための因子（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、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、ディスポーサブルシリンジまたは複数用量のバイアル中に封入され得る。

10

【0118】

注入可能な用途に適切な薬学的組成物としては、滅菌水溶液（水溶性）または滅菌水性分散物、および滅菌注入可能な溶液もしくは分散物の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与について、適切なキャリアとしては、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は滅菌されていなければならない、そして容易な注射可能性が存在する程度に流体であるべきである。組成物は、製造および保存の条件下で安定でなければならない、そして、細菌および真菌のような微生物の夾雑作用に対して保護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、溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性が、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散物の場合に必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用からの保護は、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、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合において、等張剤（例えば、糖）、ポリアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）および塩化ナトリウムを組成物中に含むことが、好ましい。注入可能な組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる因子（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含ませることによってもたらされ得る。

20

30

【0119】

滅菌注入可能な溶液は、上記で列挙した成分の1つまたは組合わせとともに、577、20739、もしくは57145の活性を調節する因子（例えば、577タンパク質、20739タンパク質、もしくは57145タンパク質のフラグメントまたは抗577抗体、抗20739抗体、もしくは抗57145抗体）を適切な溶媒中に必要とされる量で組み込み、必要ならば、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散物は、基本分散媒体および上記で列挙された成分から必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み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、これにより、予め滅菌濾過したその溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

40

【0120】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチ

50

ンカプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ (mouth wash) としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ (swish)、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、以下のいずれかの成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤 (例えば、微結晶セルロース、トラガカントガムまたはゼラチン)；賦形剤 (例えば、デンプンまたはラクトース)、崩壊剤 (例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチ)；滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes)；潤滑剤 (glidant) (例えば、コロイド状二酸化ケイ素)；甘味剤 (例えば、スクロースまたはサッカリン)；あるいは香味剤 (例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー)。

10

【0121】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤 (例えば、二酸化炭素のような気体) を含む加圧容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0122】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が、処方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、そして、例えば、経粘膜投与としては、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏 (ointment)、軟膏 (salve)、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

20

【0123】

577、20739、もしくは57145の活性を調節する因子はまた、直腸送達のための坐剤の形態 (例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤と共に) または保持浣腸の形態で調製され得る。

30

【0124】

1つの実施形態において、577、20739、もしくは57145の活性を調節する因子は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され (例えば、制御放出処方物)、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手可能である。リポソーム懸濁液 (ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する、感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む) がまた、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。

40

【0125】

投与の容易さおよび投薬の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用する投薬単位形態は、処置される被験体のための単位投薬量として適切な、物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアに関連して、所望の治療的効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、577、20739、もしくは57145の活性を調節する因子の固有の特性、および達成される特定の治療効果、ならびに被験体の処置のためのこのような因子を調合する当該分野に固有の制限に

50

よって決定され、そしてこれらに直接依存する。

【0126】

このような因子の毒性および治療効率は、例えば、LD50（集団の50%に致死的な量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な量）を決定するための、細胞培養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での用量比は、治療指数であり、そしてこれは、LD50/ED50比として表され得る。大きな治療指数を示す因子が好ましい。毒性の副作用を示す因子が使用され得るが、治療は、感染していない細胞に対する可能性のある損傷を最少にし、それによって副作用が減少するように、患部組織の部位に対してそのような因子を標的化する送達システムを設計するように、行われるべきである。

10

【0127】

細胞培養アッセイおよび動物実験によって得られたデータは、ヒトでの使用のための投与量の範囲を処方する際に使用され得る。このような577調節因子、20739調節因子、もしくは57145調節因子の投与量は、好ましくは、わずかな毒性を有するかまたは毒性を全く有さないでED50を含む、循環している濃度の範囲内である。投与量は、使用される投与量形態および利用される投与の経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の治療方法において使用される任意の因子については、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に概算され得る。用量は、細胞培養物中で決定されるような、IC50（すなわち、症状の最大の半分の抑制を達成する試験化合物の濃度）を含む、循環している血漿濃度の範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方し得る。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中でのレベルは、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。

20

【0128】

本明細書中に規定されるように、タンパク質またはポリペプチドの治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、体重1kg当たり約0.001~30mg、好ましくは体重1kg当たり約0.01~25mg、より好ましくは体重1kg当たり約0.1~20mg、およびさらにより好ましくは体重当たり約1~10mg/kg、2~9mg/kg、3~8mg/kg、4~7mg/kg、5~6mg/kgの範囲である。疾患または障害の重篤度、事前の処置、被験体の一般的な健康状態および/もしくは年齢、ならびに他の疾患の存在を含むがこれらに限定されない特定の要因が、被験体を効果的に処置するために必要とされる投与量に影響を与え得ることが、当業者に明らかである。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、単回の処置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み得る。

30

【0129】

好ましい例においては、被験体は、約0.1~20mg/kgの範囲の抗体、タンパク質またはポリペプチドを用いて、約1~10週間の間、好ましくは2~8週間の間、より好ましくは約3~7週間の間、およびさらにより好ましくは約4、5、または6週間の間、1週間に1回、処置される。処置のために使用される抗体、タンパク質またはポリペプチドの有効投与量が、特定の処置の経過にわたって増大し得るかまたは減少し得ることもまた、明らかである。投与量の変化が生じ得、そして本明細書中に記載されているような診断アッセイの結果から明白となる。

40

【0130】

本発明は、発現または活性を調節する因子を含む。因子は、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、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約10,000g/モル未満の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）、約5,000g/モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約1,000g/モル未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約500g/モル未満の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

50

の塩、エステル、および薬学的に受容可能な他の形態。低分子因子の適切な用量が当該分野の医師、獣医師または研究者の知識内の多くの要因に依存することが、理解される。低分子の用量は、例えば、処置される被験体またはサンプルの正体、サイズおよび状態に依存して、適用可能な場合、この組成物が投与される経路、およびこの低分子が有していることを開業医が所望する、本発明の核酸またはポリペプチドに対する効果にさらに依存して、変化する。

【0131】

代表的な用量は、被験体またはサンプル重量 1 kg あたり mg または μ g の量の低分子を含む（例えば、約 1 μ g / kg ~ 約 500 mg / kg、約 100 μ g / kg ~ 約 5 mg / kg、または約 1 μ g / kg ~ 約 50 mg / kg）。低分子の適切な用量は、調節されるべき発現または活性に対するこの低分子の効力に依存することがさらに理解される。このような適切な用量は、本明細書中で記載されるアッセイを使用して、決定され得る。これらの低分子の 1 つ以上が、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、獣医または研究者は、例えば、初めに比較的低い用量を処方し、続いて、適切な応答が得られるまで、この用量を増加し得る。さらに、任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは、用いられる特定の化合物の活性、被験体の年齢、細胞増殖、身体全体の健康状態、性別および食餌、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物の組合せ、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。

【0132】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）が、治療的部分（例えば、細胞毒、治療剤または放射性金属イオン）に結合され得る。細胞毒または細胞毒性剤としては、細胞に対して有害な任意の因子を含む。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、臭化エチジウム、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、ドキソルピシン、ダウノルピシン、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、プロプラノロールおよびプロマイシン、ならびにそれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、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、チオエパクロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロソスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、ならびにシス - 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、ダウノルピシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキソルピシン）、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））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

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、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有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、例えば、毒素（例えば、アブリン、リシン A、プセウドモナス体外毒素またはジフテリア毒素；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、インターフェロン、インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベータ；または生物学的応答調節因子（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」）、または他の増殖因子が挙げられる。

【0134】

このような治療的部分を抗体に結合するための技術は、周知である。例えば、Arnold, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら(編), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら, "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (第2版), Robinsonら(編), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら(編), pp. 475 - 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら(編), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985), および Thorpeら, "The Preparative And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982) を参照のこと。あるいは、抗体は、米国特許第4,676,980号 (Segal) により記載されるように、第2の抗体と結合して、抗体ヘテロ結合体を形成する。

【0135】

本発明の方法において使用される核酸分子は、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。

【0136】

(D. 薬理ゲノム学 (pharmacogenomics))

本発明の治療方法と共に、薬理ゲノム学 (すなわち、被験体の遺伝子型とこの被験体の外来化合物または薬物に対する応答との間の関係の研究) が、考慮され得る。治療剤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り、重篤な毒性または治療不良をもたらし得る。従って、医師または臨床医は、577、20739、もしくは57145の活性を調節する薬剤を投与するか否かを決定する際、ならびに577、20739、もしくは57145の活性を調節する薬剤を用いる処置の投薬量および/または治療レジメンを変更する際に、関連の薬理ゲノム学研究において得られた知識を適用することを考慮し得る。

【0137】

薬理ゲノム学は、変更された薬物処置および罹患した個人における異常な作用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 (10 - 11): 983 - 985 および Linder, M. W. ら、(1997) Clin. Chem. 43 (2): 254 - 266 を参照のこと。一般に、2つ

の型の薬理遺伝子学条件は、区別され得る。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）単一因子として伝わったか、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）単一因子として伝わった。これらの薬理遺伝子学条件は、稀な遺伝子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 - ホスフェートアミノペプチダーゼ欠損（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。

【0138】

「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」遺伝子マーカーマップ（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ⅠⅠ期の薬物試験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、数千万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の伸長において、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回起き得る。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連しないかもしれない。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、遺伝子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、遺伝子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、このような遺伝子学的に類似の個体の群に対して変更され得る。

【0139】

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、本発明の方法において使用される577タンパク質、20739タンパク質、もしくは57145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して1つの遺伝子バージョンを有することが特定の薬物応答に関連するか否かが決定され得る。

【0140】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続時間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）ならびにシトクロムP450酵素のCYP2D6およびCYP2C19）の遺伝的多型の発見は、なぜ何人かの患者が推定される薬物効果を得られないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および重篤な毒性を示すかについての説明を提供した。これらの多型は、集団における2つの表現型である、代謝が速やかな人（EM）および代謝が遅い人（PM）において現れる。PMの罹患率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は、高度に多型性であり、いくつかの変異が、PMにおいて同定されており、これらの全ては、機能的CYP2D6の非存在を生じる。CYP2D6およびCYP2C19の代謝が乏しい人は、標準的な投薬量を投与された場合、かなり頻繁に、過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が、活性な治療的部分である場合、PMは、CYP2D6形成代謝産物のモルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果について証明されるように、治療的応答を示さない。他の極端な例は、標準的な投薬量に対して応答しない、いわゆる代謝が超迅速な人である。最近、超迅速な代謝の分子的根拠が、CYP2D6遺伝子増幅に起因することが同定された。

【0141】

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、本発明の方法において使用される577分子、20739分子または57145分子または577モジュレーター、20739モジュレーターまたは57145モジュレーター）を投与された動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路のスイッチがオンになるか否かの指標を与え得る。

【0142】

1より多い上記薬理ゲノム学アプローチから生成される情報を使用して、被験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の失敗を回避し得、
従って、577活性、20739活性または57145活性を調節する薬剤で、心臓血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症）に罹患した被験体を処置するときの治療効果または予防効果を増強させ得る。

10

【0143】

（V．本発明の方法において使用される組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の方法（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）は、ベクター、好ましくは発現ベクター（577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質（またはそれらの部分）をコードする核酸を含む）の使用を含む。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、連結されている別の核酸を輸送する能力を有する核酸分子をいう。ベクターの1つのタイプは、「プラスミド」であり、「プラスミド」とは、さらなるDNAセグメントが連結され得る環状二本鎖DNAループをいう。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、このウイルスベクターにおいて、さらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクター（例えば、細菌複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）は、これらが導入される宿主細胞中で自律的に複製する能力を有する。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）が、宿主細胞に導入された場合に、この宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによりこの宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向する能力を有する。このようなベクターは、本明細書中で、「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態で存在する。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用される形態のベクターである場合、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、同等な機能を果たすこのような他の形態の発現ベクター（例えば、ウイルスベクター（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））を含むことを意図する。

20

30

【0144】

本発明の方法で使用される組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で、本発明の核酸を含む。この適切な形態とは、この組換え発現ベクターが、発現のために使用されるべき宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の調節配列を含むことを意味し、この調節配列は、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結される」は、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロでの転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入されている場合は、宿主細胞において）このヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で、調節配列に連結されていることを意味することを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel（1990）Methods Enzymol. 185:3-7に記載される。調節配列は、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおけるヌクレオチド配列（例えば、組織特異的調節配列）の発現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の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者に認識される。本発明の発現ベ

40

50

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融合ポリペプチドを含む）（例えば、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質、577タンパク質、20739タンパク質または57145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。

【0145】

本発明の方法において使用される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577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質は、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、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）（前出）において議論される。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。

10

【0146】

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、多くのアミノ酸を、そこに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つの目的を果たす：1) 組換えタンパク質の発現を増加させること；2) 組換えタンパク質の安定性を増加させること；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させることによって組換えタンパク質の精製を補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との連結部に導入され、その融合部分からの組換えタンパク質の分離、続く融合タンパク質の精製を可能にする。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、トロンピン、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。

20

30

【0147】

精製された融合タンパク質は、577活性、20739活性または57145活性のアッセイ（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577タンパク質、20739タンパク質または57145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577融合タンパク質、20739融合タンパク質または57145融合タンパク質を使用して、骨髄細胞を感染し続いて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、十分な時間が経過した後（例えば、6週間）に試験される。

40

【0148】

別の実施形態において、本発明の核酸を、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞において発現させる。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8（Seed, B. (1987) Nature 329:840）およびpMT2PC（Kaufmanら（1987）EMBO J. 6:187-195）が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、この発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントによって提供される。例えば、一般的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。原核生物細胞および真核生物細胞の両方に適切な他の発現系については、Sambrook, J. ら

50

、Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0149】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターが、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る）。

【0150】

本発明の方法は、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さらに使用し得る。すなわち、このDNA分子は、（このDNA分子の転写によって）577 mRNA、20739 mRNAまたは57145 mRNAに対するアンチセンスであるRNA分子の発現を可能にする様式で、調節配列に作動可能に連結される。アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された調節配列が選択され得、この調節配列は、種々の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続した発現を指向し、例えば、アンチセンスRNAの構成的な発現、組織特異的な発現または細胞型特異的な発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはウイルスエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が高効率調節領域の制御下で産生される、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態であり得、その活性は、これらのベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の考察については、Weintraub, H.ら、Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1 (1) 1986を参照のこと。

【0151】

本発明の別の局面は、本発明の577核酸分子、20739核酸分子または57145核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内の577核酸分子、20739核酸分子または57145核酸分子、あるいは577核酸分子、20739核酸分子または57145核酸分子が宿主細胞ゲノムの特定の部位中に相同組換えされることを可能とする配列を含む577核酸分子、20739核酸分子または57145核酸分子）が導入される宿主細胞の使用に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の被験体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もいう。特定の改変は、変異または環境的影響のいずれかに起因して次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でなくてもよく、本明細書中で使用されるようなこの用語の範囲内になお含まれる。

【0152】

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、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0153】

ベクターDNAは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞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、リン酸カルシウム共沈殿もしく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。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambroo

から (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)、および他の実験説明書において見出され得る。

【0154】

培養物中の本発明の方法で使用される宿主細胞 (例えば、原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞) を使用して、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質を産生 (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577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質が産生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、577タンパク質、20739タンパク質または57145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577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質を単離する工程を包含する。

10

【0155】

(VI. 本発明の方法において使用される単離された核酸分子)

本発明の方法は、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質をコードする単離された核酸分子またはその生物学的に活性な部分、ならびに577、20739または57145をコードする核酸分子 (例えば、577 mRNA、20739 mRNAまたは57145 mRNA) を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに十分な核酸フラグメント、および577核酸分子、20739核酸分子または57145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ためのフラグメントの使用を含む。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) およびRNA分子 (例えばmRNA)、ならびにヌクレオチドアナログを使用して産生されるDNAまたはRNAのアナログを含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは、二本鎖DNAである。

20

【0156】

本発明の方法において使用される核酸分子 (例えば、配列番号1、配列番号4もしくは配列番号7のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはその部分) は、本明細書中で提供される標準的な分子生物学的技術および配列情報を使用して単離され得る。配列番号1、配列番号4または配列番号7の核酸配列の全てまたは一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、577核酸分子、20739核酸分子または57145核酸分子は、標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術を使用して単離され得る (例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されるようにして)。

30

40

【0157】

さらに、配列番号1、配列番号4または配列番号7の全てまたは一部を含む核酸分子が、配列番号1、配列番号4または配列番号7の配列に基づいて設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって単離され得る。

【0158】

本発明の方法において使用される核酸は、cDNA、mRNA、あるいはゲノムDNAをテンプレートとして使用し、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを、標準的なPCR増幅技術に従って使用して、増幅され得る。さらに、577ヌクレオチド配列、2073

50

9ヌクレオチド配列または57145ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術によって、例えば、自動化DNA合成器を使用して、調製され得る。

【0159】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号4または配列番号7で示されるヌクレオチド配列、配列番号1、配列番号4または配列番号7で示されるヌクレオチド配列の相補体、あるいはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの一部、を含む。配列番号1、配列番号4または配列番号7で示される核酸配列に相補的な核酸分子は、配列番号1、配列番号4または配列番号7で示されるヌクレオチド配列に対して十分に相補的である核酸分子であり、その結果、この核酸分子は、配列番号1、配列番号4または配列番号7で示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし、それにより、安定な二重鎖を形成し得る。

10

【0160】

さらに別の好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号4または配列番号7で示されるヌクレオチド配列の全長、あるいはこのヌクレオチド配列のいずれかの一部と、少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0161】

さらに、本発明の方法において使用される核酸分子は、配列番号1、配列番号4または配列番号7の核酸配列の一部のみを含み得る（例えば、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577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質の一部（例えば、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質の生物学的に活性な部分）をコードするまたはフラグメント）。プローブ/プライマーは、代表的に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的に、配列番号1、配列番号4または配列番号7のセンス配列、配列番号1、配列番号1、配列番号4または配列番号7のアンチセンス配列、あるいは配列番号1、配列番号4または配列番号7の天然に存在する対立遺伝子の改変体または変異体のうち、少なくとも約12個または15個、好ましくは、約20個または25個、より好ましくは約30個、約35個、約40個、約45個、約50個、約55個、約60個、約65個、または約75個の保存的ヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。1つの実施形態において、本発明の方法において使用される核酸分子は、100より長く、100~200、200~300、300~400、400~500、500~600、600~700、700~800、800~900、900~1000、1000~1100、1100~1200、1200~1300、またはそれを超えるヌクレオチドの長さであり、かつ配列番号1、配列番号4または配列番号7の核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

20

30

【0162】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに対して有意に同一であるかまたは相同であるヌクレオチド配列が、互いに対してハイブリダイズしたまま残存するハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を記載することが意図される。好ましくは、この条件は、互いに対して、少なくとも約70%、より好ましくは、少なくとも約80%、さらにより好ましくは、少なくとも約85%または90%同一である配列が、互いに対してハイブリダイズしたまま残存する条件である。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、そしてCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons, Inc. (1995), 第2節, 第4節および第6節に見出され得る。さらなるストリンジェント条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (

40

50

1989), 第7節, 第9節および第11節に見出され得る。好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非制限例は、約65~70における4×の塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのハイブリダイゼーション(または約42~50における4×SSC+50%ホルムアミド中でのハイブリダイゼーション)、続く約65~70における1×SSCでの1回以上の洗浄を含む。好ましい、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非制限例は、約65~70における1×SSC中でのハイブリダイゼーション(または約42~50における1×SSC+50%ホルムアミド中でのハイブリダイゼーション)、続く約65~70における0.3×SSCでの1回以上の洗浄を含む。好ましい、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非制限例は、約50~60における4×SSC中でのハイブリダイゼーション(あるいは、約40~45における6×SSC+50%ホルムアミド中でのハイブリダイゼーション)、続く約50~60における2×SSCでの1回以上の洗浄を含む。上で引用した値(例えば、65~70または42~50)に対する中間の範囲もまた、本発明によって包含されることが意図される。SSPE(1×SSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、および1.25mM EDTA, pH7.4)を、ハイブリダイゼーションにおいて、SSC(1×SSCは、0.15M NaClおよび15mM クエン酸ナトリウム)および洗浄緩衝液に置き換え得；ハイブリダイゼーションの完了後に、洗浄を、それぞれ15分間実施する。50未満の塩基対長であると予測されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度(T_m)よりも5~10低いはずであり、ここで、T_mは、以下の等式に従って決定される。18未満の塩基対長のハイブリッドに関しては、T_m() = 2(A + T塩基の数) + 4(G + C塩基の数)である。18塩基対長と49塩基対長との間のハイブリッドに関しては、T_m() = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G + C) - (600/N)であり、ここで、Nは、ハイブリッドにおける塩基の数であり、そして[Na⁺]は、ハイブリダイゼーション緩衝液におけるナトリウムイオンの濃度である(1×SSCについての[Na⁺] = 0.165M)。さらなる試薬が、ハイブリダイゼーション緩衝液および/または洗浄緩衝液に添加され、核酸分子の膜(例えば、ニトロセルロースまたはナイロン膜)への非特異的なハイブリダイゼーションを減少させ得ることもまた、当業者によって理解され得、これらの試薬としては、遮断剤(例えば、BSAまたはシャケ精子キャリアDNAまたはニシン精子キャリアDNA)、洗浄剤(例えば、SDS)、キレート剤(例えば、EDTA)、フィコール、PVPなどが挙げられるが、これらに限定されない。ナイロン膜を使用する場合、特に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のさらに好ましい非制限実施形態は、約65において0.25~0.5M NaH₂PO₄、7% SDSでのハイブリダイゼーション、続く、65における0.02M NaH₂PO₄、1% SDSでの1回以上洗浄(または、代わりに0.2×SSC、1% SDS)である(例えば、ChurchおよびGilbert(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995)を参照のこと)。

【0163】

好ましい実施形態において、プローブは、さらに、このプローブに結合される標識基を含み、例えば、この標識基は、放射線同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、例えば、被験体由来の細胞サンプル中の577コード核酸、20739コード核酸または57145コード核酸のレベルを測定すること(例えば、577 mRNAレベル、20739 mRNAレベルまたは57145 mRNAレベルを検出すること)、またはゲノム577遺伝子、ゲノム20739遺伝子またはゲノム57145遺伝子に変異または欠失しているか否かを決定することによって、577タンパク質、20739タンパク質または57145タンパク質を誤発現する細胞または組織を同定するための一組の診断用試験キットとして使用され得る。

【0164】

本発明の方法は、さらに、ゲノムコードの縮重に起因して、配列番号1、配列番号4ま

たは配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子の使用を含み、従って、配列番号 1、配列番号 4 または配列番号 7 に示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 577 タンパク質、20739 タンパク質または 57145 タンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の方法に含まれる単離された核酸分子は、配列番号 3、配列番号 6 または配列番号 9 に示され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。

【0165】

本発明の方法はさらに、ヒト 577、ヒト 20739 またはヒト 57145 の対立遺伝子改変体（例えば、機能的または非機能的な対立遺伝子改変体）の使用を含む。機能的な対立遺伝子改変体は、577 活性、20739 活性または 57145 活性を維持するヒト 577 タンパク質、20739 タンパク質または 57145 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 3、配列番号 6 または配列番号 9 の 1 個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必須領域にある非必須残基の置換、欠失または挿入を含む。

10

【0166】

非機能的な対立遺伝子改変体は、577 活性、20739 活性または 57145 活性を有さないヒト 577 タンパク質、20739 タンパク質または 57145 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。非機能的な対立遺伝子改変体は、代表的に、配列番号 3、配列番号 6 または配列番号 9 のアミノ酸配列の非保存的置換、欠失、もしくは挿入または成熟前切断、あるいはタンパク質の必須残基または必須領域の置換、挿入または欠失を含む。

20

【0167】

本発明の方法は、さらに、ヒト 577 タンパク質、ヒト 20739 タンパク質またはヒト 57145 タンパク質の非ヒトオルソログを使用し得る。ヒト 577 タンパク質、ヒト 20739 タンパク質またはヒト 57145 タンパク質のオルソログは、非ヒト生物から単離され、そして同一の 577 活性、20739 活性または 57145 活性を有するタンパク質である。

【0168】

本発明の方法は、さらに、配列番号 1、配列番号 4 または配列番号 7 のヌクレオチド配列を含む核酸分子、あるいはその一部の使用を含み、ここで、変異が導入される。この変異は、「非必須」アミノ酸残基または「必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換を導き得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、577、20739 または 57145 の野生型配列（例えば、配列番号 3、配列番号 6 または配列番号 9 の配列）から変更され得る残基であり、それに対して「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明の 577 タンパク質、20739 タンパク質または 57145 タンパク質中で保存されるアミノ酸残基は、変更に対して影響を受けにくいようである。

30

【0169】

変異は、標準的な技術（例えば、部位特異的変異および PCR 媒介変異）によって、配列番号 1、配列番号 4 または配列番号 7 に導入され得る。好ましくは、保存的なアミノ酸置換は、1 個以上の推定非必須アミノ酸残基から作製される。「保存的なアミノ酸置換」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、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、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖（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、577 タンパク質、20739 タンパク質

40

50

または57145タンパク質中の推定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、例えば、飽和変異誘発によって、577コード配列、20739コード配列または57145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、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、577、20739または57145の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、配列番号4または配列番号7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、本明細書中に記載されるアッセイを使用して、決定され得る。

【0170】

本発明の別の局面は、配列番号1、配列番号4または配列番号7のヌクレオチド配列に対してアンチセンスである、単離された核酸分子の使用に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的である（例えば、二本鎖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）ヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。このアンチセンス核酸は、全577コード鎖、全20739コード鎖または全57145コード鎖、あるいはその一部のみに対して相補的であり得る。一つの実施形態において、アンチセンス核酸分子は、577、20739または57145をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、577、20739または57145をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないコード領域に隣接する5'配列および3'配列をいう（5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいう）。

【0171】

本明細書中で開示される577、20739または57145をコードするコード鎖配列を考慮すると、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickの塩基対形成の法則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、577、20739または57145 mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、アンチセンス核酸分子は、577、20739もしくは57145 mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、577、20739または57145 mRNAの翻訳開始部位の周辺の領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学合成および酵素的連結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高めるために、またはアンチセンス核酸とセンス核酸の間に形成される二重鎖の物理的安定性を高めるために設計された、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。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変されたヌクレオチドの例としては、以下が挙げられる：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオジン(-D-galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-

メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイブトキシシン (w y b u t o x o s i n e)、シュードウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル) ウラシル、(a c p 3) w、および 2 , 6 - ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンスの方向にサブクローニングされた発現ベクター (すなわち、核酸が挿入された核酸から転写された R N A は、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向の R N A である) を使用して、生物学的に生成され得る。本発明の方法で使用されるアンチセンス核酸分子は、第 I V 節でさらに上述される。

10

【 0 1 7 2 】

なお別の実施形態において、本発明の方法で使用される 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 核酸分子は、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を向上させるために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格 (b a c k b o n e) で改変され得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る (H y r u p B . ら (1 9 9 6) B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y 4 (1) : 5 - 2 3 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」すなわち「P N A」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格により置換され、4 つの天然核酸塩基のみが保持されている核酸模倣物 (例えば D N A 模倣物) をいう。P N A の天然骨格は、低いイオン強度の条件下で D N A および R N A への特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。P N A オリゴマーの合成は、前出の H y r u p B . ら (1 9 9 6) ; P e r r y - O ' K e e f e ら (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 3 : 1 4 6 7 0 - 6 7 5 に記載されているとおりの標準固相ペプチド合成プロトコールを使用して実施され得る。

20

【 0 1 7 3 】

5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 核酸分子の P N A は、本明細書中で記載する治療的適用および診断的適用に使用され得る。例えば、P N A は、例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導することによってか、または複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的な調節のためのアンチセンス因子またはアンチ遺伝子 (a n t i g e n e) 因子として使用され得る。5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 核酸分子の P N A はまた、他の酵素 (例えば S 1 ヌクレアーゼ (前出の H y r u p B . ら (1 9 9 6))) と組み合わせて使用される場合「人工制限酵素」として ; または D N A 配列決定もしくはハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして (前出の H y r u p B . ら (1 9 9 6) または P e r r y - O ' K e e f e ら (1 9 9 6) ; 前出)、遺伝子における 1 塩基対変異の分析 (例えば、P N A 指向性の P C R クランピングによる) において ; も使用され得る。

30

【 0 1 7 4 】

別の実施形態において、親油性基もしくは他のヘルパー基を P N A に付着することによって、P N A - D N A キメラの形成によって、またはリボソームもしくは当該分野で公知の他の薬物送達技術の使用によって、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 の P N A は改変され得る (例えば、それらの安定性または細胞取り込みを亢進するために)。例えば、P N A および D N A の有利な特性を組合わせ得る、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 核酸分子の P N A - D N A キメラが作製され得る。このようなキメラは、D N A 認識酵素 (例えば、R N A s e H および D N A ポリメラーゼ) が D N A 部分と相互作用することを可能にし、一方で P N A 部分が高い結合親和性および結合特異性を提供する。P N A - D N A キメラは、塩基スタッキングに関して選択された適切な長さのリンカー、多数の核酸塩基間の結合および配向を使用して連結され得る (前出の H y r u p B . ら (1 9 9 6))。P N A - D N A キメラの合成は、前出の H y r u p B . ら (1 9 9 6) および F i n n P . J . ら (1 9 9 6) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 4 (1 7) :

40

50

3 3 5 7 - 6 3 に記載されているように実施され得る。例えば、DNA鎖は、標準のホスホラミダイト結合化学を使用する固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば5' - (4 - メトキシトリチル) アミノ - 5' - デオキシ - チミジンホスホラミダイト）が、PNAとDNAの5' 末端との間として使用され得る（Mag, M. ら（1989）Nucleic Acid Res. 17: 5973 - 88）。次いで、PNAモノマーは、段階的な様式で結合され、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を産生する（前出のFinn P. J. ら（1996））。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを有するキメラ分子が合成され得る（Peterser, K. H. ら（1975）Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119 - 11124）。

10

【0175】

他の実施形態において、本発明の方法に使用されるオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加された基（例えば、インビボにおいて宿主細胞レセプターを標的化するための）、または細胞膜を横断する輸送を促進する因子（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W088/09810を参照のこと）、もしくは血液 - 脳関門を横断する輸送を促進する因子（例えば、PCT公開番号W089/10134を参照のこと）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が引き金を引く切断因子（例えば、Kroll ら（1988）Bio-Techniques 6: 958 - 976を参照のこと）または、インターカレート因子（例えば、Zon（1988）Pharm. Res. 5: 539 - 549を参照のこと）を使用して改変され得る。この目的を達成するために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションが引き金を引く架橋因子、輸送因子、またはハイブリダイゼーションが引き金を引く切断因子）と結合体化され得る。

20

【0176】

（VII. 本発明の方法に使用される単離された577、20739または57145タンパク質および抗577、20739または57145抗体）

本発明の方法は、単離された577、20739または57145タンパク質およびそれらの生物学的活性部分、ならびに抗577、20739または57145抗体を産生させるための免疫原として使用されるのに適したポリペプチドフラグメントの使用を含む。1つの実施形態において、ネイティブの577、20739または57145タンパク質は、標準のタンパク質精製技術を使用した適切な精製スキームによって細胞供給源または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、577、20739または57145タンパク質は、組換えDNA技術によって産生される。組換え発現に代わり、577、20739もしくは57145タンパク質または577、20739もしくは57145ポリペプチドは、標準のペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。

30

【0177】

本明細書中で使用される場合、577、20739または57145タンパク質の「生物学的活性部分」は、577、20739または57145活性を有する577、20739または57145タンパク質のフラグメントを含む。577、20739または57145タンパク質の生物学的活性部分は、577、20739または57145タンパク質のアミノ酸配列と十分に同一であるアミノ酸配列を含むペプチド、または577、20739もしくは57145タンパク質のアミノ酸配列由来のペプチド（例えば、配列番号3、6、9に示されるアミノ酸配列であって、全長577、20739または57145タンパク質よりは少ないアミノ酸を含みかつ、577、20739または57145タンパク質の活性を少なくとも1つ示すアミノ酸配列）を含む。代表的に、生物学的活性部分は、577、20739もしくは57145タンパク質の活性を少なくとも1つ有するドメインまたはモチーフ（例えば、アポトーシス活性の調節に関与していると考えられる577、20739または57145タンパク質のN末端領域）を含む。577、2073

40

50

9 または 5 7 1 4 5 タンパク質の生物学的活性部分は、例えば 2 5、5 0、7 5、1 0 0、1 2 5、1 5 0、1 7 5、2 0 0、2 5 0、3 0 0 またはそれより多くのアミノ酸長である、ポリペプチドであり得る。5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 タンパク質の生物学的活性部分は、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 活性を調節する開発中の薬剤についての標的として使用され得る。

【0178】

好ましい実施形態において、本発明の方法に使用される 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 タンパク質は、配列番号 3、6、9 に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 タンパク質は配列番号 3、6、9 と実質的に同一であり、配列番号 3、6、9 のタンパク質の機能的な活性を保持するが、上記の
10 小節 V で詳細に記載するように、天然の対立遺伝子バリエーションまたは変異誘発に起因して、アミノ酸配列において異なる。従って、別の実施形態において、本発明の方法に使用される 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 タンパク質は、少なくとも、約 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれより高い同一性を、配列番号 3、6、9 に対して有するアミノ酸配列を含むタンパク質である。

【0179】

2 つのアミノ酸配列、または 2 つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列は最適な比較目的（例えば、最適な配列のために、ギャップが第一および第二のアミノ酸配列もしくは核酸配列の 1 つまたは両方に導入され得、そして非同一致配列が比較目的
20 について無視され得る）について整列される。好ましい実施形態において、比較目的のために整列された参照配列の長さは、参照配列の長さの、少なくとも 3 0 % であり、好ましくは少なくとも 4 0 % であり、より好ましくは少なくとも 5 0 % であり、なおより好ましくは少なくとも 6 0 % であり、さらにより好ましくは少なくとも 7 0 %、8 0 %、または 9 0 % である（例えば、5 0 0 アミノ酸残基を有する配列番号 3、6、9 の 5 7 7、2 0 7 3 9 または 5 7 1 4 5 アミノ酸配列に対して第二の配列を整列する場合、少なくとも 7 5、好ましくは少なくとも 1 5 0、より好ましくは少なくとも 2 2 5、なおより好ましくは少なくとも 3 0 0、なおさらに好ましくは少なくとも 4 0 0 以上のアミノ酸残基が整列される）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第一配列における位置が、第二配列における対応する位
30 置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、これらの分子は、従って、その位置において同一である（本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と同等である）。2 つの配列間の同一性パーセントは、2 つの配列の最適な整列のために導入が必要とされたギャップ数および各ギャップの長さを考慮した、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【0180】

2 つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。好ましい実施形態において、2 つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ニードルマンおよびブンシュ（J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)）アルゴリズム（このアルゴリズムは、GCG ソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com> にて入手可能）の GAPP プログラムに組み込まれている）を使用し、Blosom 62 マトリックスまたは PAM 250 マトリックスのいずれかを使用し、ギャップウェイト（gap weight）は 16、14、12、10、8、6 または 4 であり、長さのウェイト（length weight）は 1、2、3、4、5 または 6 で決定される。なお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同一性パーセントは、GCG ソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com> にて入手可能）の GAPP プログラムを使用し、決定される。NW S gap dna. CMP マトリックスを使用し、ギャップウェイトは 40、50、60、70 または 80 であり、長さのウェイトは 1、2、3、4、5 または 6 で決定される。別の実施形態において、2 つのアミノ酸配列間またはヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、E
40
50

．MeyersおよびW．Millerのアルゴリズム（Comput．Appl．Biosci．4：11-17（1988））（このアルゴリズムは、ALIGNプログラム（バージョン2．0または2．0U）に組み込まれている）を使用し、PAM120ウェイト残基表（weight residue table）、12のギャップ長ペナルティ（gap length penalty）および4のギャップペナルティ（gap penalty）を使用して決定される。

【0181】

本発明の方法はまた、577、20739もしくは57145キメラタンパク質または577、20739もしくは57145融合タンパク質を使用し得る。本明細書中に使用される場合、577、20739もしくは57145「キメラタンパク質」または577、20739もしくは57145「融合タンパク質」は、非577、20739または57145ポリペプチドに作動可能に連結された577、20739または57145ポリペプチドを含む。「577、20739または57145ポリペプチド」は、577、20739または57145分子に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうのに対し、「非577、20739または57145ポリペプチド」は、577、20739または57145タンパク質と実質的に相同でないタンパク質（例えば、577、20739または57145タンパク質と異なるタンパク質、および、同じまたは異なる生物体由来のタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドのことをいう。577、20739または57145融合タンパク質において、577、20739または57145ポリペプチドは、577、20739もしくは57145タンパク質のすべてまたは一部に対応し得る。好ましい実施形態において、577、20739または57145融合タンパク質は、577、20739または57145タンパク質の少なくとも1つの生物学的活性部位を含む。別の好ましい実施形態において、577、20739または57145融合タンパク質は、577、20739または57145タンパク質の少なくとも2つの生物学的活性部位を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結される」は、577、20739または57145ポリペプチドおよび非577、20739または57145ポリペプチドがお互いにインフレームで融合されるということを示すことが企図される。非577、20739または57145ポリペプチドは、577、20739または57145ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0182】

例えば、1つの実施形態において、融合タンパク質は、GST-577融合タンパク質、GST-20739融合タンパク質、GST-57145融合タンパク質であり、ここで、577配列、20739配列または57145配列は、GST配列のC末端に融合されている。そのような融合タンパク質は、組換え577、組換え20739、または組換え57145の精製を容易にし得る。

【0183】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含む、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質である。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、577、20739、または57145の発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用を通じて増加され得る。

【0184】

本発明の方法において用いられる577融合タンパク質、20739融合タンパク質、または57145融合タンパク質は、薬学的組成物へと組み込まれ得、そしてインビボで被験体に投与され得る。577融合タンパク質、20739融合タンパク質、または57145融合タンパク質が、使用されて、577基質、20739基質、または57145基質のバイオアベイラビリティに影響し得る。577融合タンパク質、20739融合タンパク質、または57145融合タンパク質の使用は、例えば、（i）577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または変異、（ii）577遺伝子、20739遺伝子、または57145遺伝子の誤調節（misregulation）；および（iii）577タンパク質、20739

タンパク質、または５７１４５タンパク質の異常な翻訳後修飾により引き起こされる障害の処置のために治療的に有用であり得る。

【０１８５】

さらに、本発明の方法において使用される５７７融合タンパク質、２０７３９融合タンパク質、または５７１４５融合タンパク質は、被験体において抗５７７抗体、抗２０７３９抗体、または抗５７１４５抗体を産生するため、５７７リガンド、２０７３９リガンド、または５７１４５リガンドを精製するため、およびスクリーニングアッセイにおいて、５７７、２０７３９または５７１４５と５７７基質、２０７３９基質または５７１４５基質との相互作用を阻害する分子を同定するための免疫原として用いられ得る。

【０１８６】

好ましくは、本発明の方法において用いられる５７７キメラタンパク質もしくは５７７融合タンパク質、２０７３９キメラタンパク質もしくは２０７３９融合タンパク質、または５７１４５キメラタンパク質もしくは５７１４５融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ技術により生成される。例えば、種々のポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントは、慣用的な技術に従い、例えば、連結のための平滑末端または付着末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切であるように付着末端のはめ込み（filling in）、所望されない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を用いて、インフレームで、互いに連結される。別の実施形態において、この融合遺伝子は、慣用的な技術（自動ＤＮＡ合成器が挙げられる）により合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、アンカープライマーを用いて実施され、このアンカープライマーは、２つの連続する遺伝子フラグメントの間に相補的な突出部を生じ、次いで、この遺伝子フラグメントが、アニーリングおよび再増幅されてキメラ遺伝子配列を作製し得る（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley & Sons：１９９２を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）を予めコードしている多くの発現ベクターが、市販されている。５７７コード核酸、２０７３９コード核酸、または５７１４５コード核酸は、そのような発現ベクターへとクローニングされ得、その結果、この融合部分は、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質にインフレームで連結される。

【０１８７】

本発明はまた、５７７のアゴニスト（模倣物）、２０７３９のアゴニスト（模倣物）、もしくは５７１４５のアゴニスト（模倣物）または５７７のアンタゴニスト、２０７３９のアンタゴニスト、もしくは５７１４５のアンタゴニストのいずれかとして機能する、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質の改変体の使用に関する。５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質の改変体は、変異誘発（例えば、５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質の別個の点変異または短縮）により作製され得る。５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態の５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質の生物学的活性と実質的に同一な活性か、またはそのサブセットを保持し得る。５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態の５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質の１つ以上の活性を、例えば、この５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質の５７７媒介活性、２０７３９媒介活性、または５７１４５媒介活性を競合的に調節することによって阻害し得る。従って、特定の生物学的効果を、制限された機能の改変体で処理することにより誘発し得る。１つの実施形態において、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での被験体の処置は、天然に存在する形態の５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質での処置と比較して、被験体においてより少ない副作用を有する。

【０１８８】

1つの実施形態において、577アゴニスト（模倣物）、20739アゴニスト（模倣物）、もしくは57145アゴニスト（模倣物）または577アンタゴニスト、20739アンタゴニスト、もしくは57145アンタゴニストのいずれかとして機能する577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の改変体は、577タンパク質、20739タンパク質、もしくは57145タンパク質のアゴニスト活性または577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質のアンタゴニスト活性について、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の変異体（例えば、短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る。1つの実施形態において、577改変体、20739改変体、または57145改変体の多様なライブラリーは、核酸レベルにおけるコンビナトリアル変異誘発によって生成され、そして多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。577改変体、20739改変体、または57145改変体の多様なライブラリーは、例えば、潜在的な577配列、20739配列、または57145配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして、または代替的に、そこに577配列、20739配列、もしくは57145配列のセットを含む、より大きな融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイのために）発現可能であるように、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結することによって産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的な577改変体、20739改変体、または57145改変体のライブラリーを産生するために使用し得る種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動化DNA合成機において実行され、次いで合成遺伝子は、適切な発現ベクターに連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的な577配列、20739配列、または57145配列の所望のセットをコードする配列のすべての提供を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である（例えば、Narang, S. A. (1983) Tetrahedron 39:3, Itakuraら(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら(1984) Science 198:1056; Ikeら(1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照のこと）。

【0189】

さらに、577タンパク質コード配列、20739タンパク質コード配列、または57145タンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーは、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続き選択のために577フラグメント、20739フラグメント、または57145フラグメントの多様な集団を生成するために使用され得る。1つの実施形態において、コード配列フラグメントのライブラリーは、577コード配列、20739コード配列、または57145コード配列の二本鎖PCRフラグメントを、ニックが1分子あたり約1つだけ生じる条件下でヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、DNAを再生させて、異なるニックを有する生成物からセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成すること、S1ヌクレアーゼを用いる処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結すること、によって生成され得る。この方法によって、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の種々のサイズのN末端フラグメント、C末端フラグメントおよび内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導し得る。

【0190】

点変異または短縮化によって作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、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いくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって生成される遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングのために適合可能である。高スループット分析に従う、大きい遺伝子ライブラリーのスクリーニングのための最も広範に使用される技術は、代表的には、複製可能な発現ベクタ

への遺伝子ライブラリーのクローニング、得られるベクターのライブラリーでの適切な細胞の形質転換、および所望の活性の検出が、遺伝子産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でのコンビナトリアル遺伝子の発現を含む。帰納的アンサンブル変異誘発 (recursive ensemble mutagenesis) (REM) は、ライブラリーにおける機能的変異体の頻度を高める新たな技術であり、577 変異体、20739 変異体、または 57145 変異体を同定するためにスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る (Arklin および Youvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave ら (1993) Protein Engineering 6(3):327-331)。

10

【0191】

本発明の方法は、抗 577 抗体、抗 20739 抗体、または抗 57145 抗体の使用をさらに包含する。単離された 577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 タンパク質、またはその一部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体調製およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を使用して、577、20739、または 57145 を結合する抗体を生成するための免疫原として使用され得る。全長 577 タンパク質、全長 20739 タンパク質、または全長 57145 タンパク質が使用され得るか、または代替的に、577、20739、または 57145 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。577、20739、または 57145 の抗原性ペプチドは、配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 8 アミノ酸残基を含み、そして 577、20739、または 57145 のエピトープを含み、その結果、そのペプチドに対して惹起された抗体は、577 タンパク質、20739 タンパク質、または 57145 タンパク質との特異的な免疫複合体を形成する。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

【0192】

その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、そのタンパク質の表面に位置する 577、20739、または 57145 の領域 (例えば、親水性領域) ならびに高い抗原性を有する領域である。

30

【0193】

代表的には、577 免疫原、20739 免疫原、または 57145 免疫原を使用して、適切な被験体 (例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物) に免疫原を免疫することにより抗体を調製する。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現された 577 タンパク質、20739 タンパク質、もしくは 57145 タンパク質または化学合成された 577 ポリペプチド、20739 ポリペプチド、または 57145 ポリペプチドを含み得る。この調製物は、アジュバント (例えば、フロイント完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバント、または同様な免疫刺激剤) をさらに含み得る。適切な被験体を免疫原性 577 調製物、免疫原性 20739 調製物、または免疫原性 57145 調製物で免疫することにより、ポリクローナル抗 577 抗体応答、ポリクローナル抗 20739 抗体応答、またはポリクローナル抗 57145 抗体応答が惹起される。

40

【0194】

用語「抗体」とは、本明細書中で用いられる場合、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な一部 (すなわち、抗原 (例えば、577、20739、または 57145) を特異的に結合する (この抗原と免疫反応する) 抗原結合部位を含む分子) をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、酵素 (例えば、ペプシン) で抗体を処理することにより生成され得る F(ab) フラグメントおよび F(ab')₂ フラグメントが挙げられる。本発明は、577 分子、20739 分子、または 57145 分子を結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、本明細書中で使用

50

される場合、５７７、２０７３９、または５７１４５の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の１種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的には、これが免疫反応する特定の５７７タンパク質、２０７３９タンパク質、または５７１４５タンパク質に対する単一の結合親和性を提示する。

【０１９５】

ポリクローナル抗５７７抗体、ポリクローナル抗２０７３９抗体、またはポリクローナル抗５７１４５抗体は、適切な被験体に５７７免疫原、２０７３９免疫原、または５７１４５免疫原を免疫することにより、上記のように調製され得る。免疫した被験体における抗５７７抗体力価、抗２０７３９抗体力価、または抗５７１４５抗体力価は、標準的技術により（例えば、固定化した５７７、２０７３９、または５７１４５を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を用いて）経時的にモニターされ得る。所望であれば、５７７、２０７３９、または５７１４５に対する抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液から）単離され得、そしてさらに周知の技術（例えば、ＩｇＧ画分を得るためのプロテインＡクロマトグラフィー）により精製され得る。免疫後、適切な時間に、例えば、抗５７７抗体力価、抗２０７３９抗体力価、または抗５７１４５抗体力価が最も高いときに、抗体生成細胞を被験体から獲得し得、そしてこれを使用して、標準的技術（例えば、初めは、KohlerおよびMilstein（１９７５）Nature 256:495-497により記載されたハイブリドーマ技術（Brownら（１９８１）J. Immunol. 127:539-46; Brownら（１９８０）J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yehら（１９７６）Proc. Natl. Acad. Sci. US A 76:2927-31; およびYehら（１９８２）Int. J. Cancer 29:269-75もまた参照のこと）、より最近のヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら（１９８３）Immunol. Today 4:72）、EBVハイブリドーマ技術（Coleら（１９８５）、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁）またはトリオーマ（trioma）技術）によりモノクローナル抗体を調製し得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成する技術は、周知である（一般には、Kenneth, R. H., Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York（１９８０）; Lerner, E. A.（１９８１）Yale J. Biol. Med. 54:387-402; Gefter, M. L.ら（１９７７）Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照のこと）。簡潔には、不死化細胞株（代表的には骨髓腫細胞）を、上記のように５７７免疫原、２０７３９免疫原、または５７１４５免疫原で免疫した哺乳動物由来のリンパ球（代表的には、脾臓細胞）と融合し、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、５７７、２０７３９、または５７１４５を結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを同定する。

【０１９６】

リンパ球と不死化細胞株とを融合するために使用される任意の多くの周知のプロトコルは、抗５７７モノクローナル抗体、抗２０７３９モノクローナル抗体、または抗５７１４５モノクローナル抗体を生成する目的で適用され得る（例えば、G. Galfreら（１９７７）Nature 266:55052; Gefterら（１９７７）上記; Lerner（１９８１）上記; およびKenneth（１９８０）、上記を参照のこと）。さらに、当業者は、このような方法の多くのバリエーションが存在し、これらは、やはり有用であることを理解する。代表的には、不死化細胞株（例えば、骨髓腫細胞株）はリンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫したマウス由来のリンパ球と不死化マウス細胞株とを融合することにより作製され得る。好ましい不死化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養培地（「HAT培地」）に感受性であるマウス骨髓腫細胞株である。任意の多くの骨髓腫細胞株は、標準的技術に従う融合パートナーとして使用され得る（例えば、P 3

- NS 1 / 1 - Ag 4 - 1、P 3 - x 6 3 - Ag 8 . 6 5 3 または S p 2 / O - Ag 1 4 骨髓腫株)。これらの骨髓腫株は、ATCCから入手可能である。代表的には、HAT感受性マウス骨髓腫細胞を、ポリエチレングリコール(「PEG」)を使用してマウス脾臓細胞に融合する。次いで、融合から得られたハイブリドーマ細胞を、HAT培地を用いて選択する(このことにより、融合していない細胞および生成性でない融合骨髓腫細胞は死ぬ(融合していない脾臓細胞は、形質転換していないので数日後に死ぬ))。本発明のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞は、577、20739、または57145を結合する抗体について、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより(例えば、標準的ELISAアッセイを使用して)検出される。

【0197】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製するかわりに、モノクローナル抗577抗体、モノクローナル抗20739抗体、またはモノクローナル抗57145抗体を、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)を577、20739、または57145を用いてスクリーニングすることにより同定および単離し得、それによって577、20739、または57145を結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離し得る。ファージディスプレイライブラリーを生成し、そしてスクリーニングするためのキットは、市販されている(例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01; およびthe Stratagene SurfZAPTM Phage Display Kit, カタログ番号240612)。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを生成し、そしてスクリーニングする際の使用に特になじみやすい方法および試薬の例は、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号; Kangら、PCT国際公開WO92/18619; Dowerら、PCT国際公開WO91/17271; Winterら、PCT国際公開WO92/20791; Marklandら、PCT国際公開WO92/15679; Breitlingら、PCT国際公開WO93/01288; McCaffertyら、PCT国際公開WO92/01047; Garrardら、PCT国際公開WO92/09690; Ladnerら、PCT国際公開WO90/02809; Fuchsら(1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hayら(1992) Hum. Antibod. Hybridomas 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; Clarksonら(1991) Nature 352:624-628; Gramら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garradら(1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboomら(1991) Nuc Acids Res. 19:4133-4137; Barbasaら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; およびMcCaffertyら(1990) Nature 348:552-554に見出され得る。

【0198】

さらに、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含む組換え抗577抗体、抗20739抗体、または抗57145抗体(例えば、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体)は、本発明の方法の範囲内であり、これは、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により(例えば、Robinsonら、国際出願番号PCT/US86/02269; Akiraら、欧州特許出願第184,187号; Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号; Morrisonら 欧州特許出願第173,494号; Neubergerら、PCT国際公開WO 86/01533; Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Cabillyら、欧州特許出願番号第125,023号; Betterら(1988) Science 240:1041-1043; Liuら(

1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら(1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら(1987) Canc. Res. 47:999-1005; Woodら(1985) Nature 314:446-449; Shawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oiら(1986) Bio Techniques 4:214; Winter 米国特許第5,225,539号; Jonesら(1986) Nature 321:552-525; Verhoeyanら(1988) Science 239:1534; および Beidlerら(1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法を使用して)生成され得る。

【0199】

抗577抗体、抗20739抗体、または抗57145抗体は、577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質の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)577タンパク質、20739タンパク質、または57145タンパク質を検出するために使用され得る。抗577抗体、抗20739抗体、または抗57145抗体は、例えば、所定の処置レジムの効力を決定するために、臨床試験の手順の一部として、組織におけるタンパク質レベルをモニターするために診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と結合させる(すなわち、物理的に連結させる)こと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、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -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；適切な補欠分子族複合体の例には、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；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン(umbelliferone)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例には、ルミノールが挙げられ；生体発光物質の例には、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には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。

【0200】

本発明はさらに、以下の実施例により例示される。以下の実施例は、限定すると解釈されない。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の内容ならびに図および配列表は、本明細書中に参考として援用される。

【実施例】

【0201】

(実施例1: TaqmanTM分析を使用する組織分布)

この実施例は、TaqManTM手順を記載する。TaqmanTM手順は、mRNAを検出するための、定量的逆転写PCRベースのアプローチである。RT-PCR反応は、PCRの間にTaqManTMプローブを切断するために、AmpliTaq GoldTM DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性を利用する。簡潔には、cDNAを、目的のサンプル(例えば、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋、および種々の脈管)から生成して、PCR増幅のための出発物質として使用した。5'側および3'側の遺伝子特異的プライマーに加えて、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ(これは、増幅される領域に相補的である)(すなわち、TaqmanTMプローブ)を、この反応中に含めた。TaqManTMプローブは、このプローブの5'末端に共有結合した蛍光レポーター色素(例えば、FAM(6-カルボキシフルオレセイン)、TET(6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン)、JOE(6-カルボキシ-4,5-ジクロロ-2,7-ジメトキシフルオレセイン)、またはVIC)を有し、かつプローブの3'末端にクエ

ンチャー色素 (TAMRA (6 - カルボキシ - N , N , N ' , N ' - テトラメチルローダミン) を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0202】

PCR 反応の間に、プローブの切断は、レポーター色素およびクエンチャー色素を分離し、レポーターの蛍光の増大を生じる。PCR 産物の蓄積は、レポーター色素の蛍光の増加をモニタリングすることによって直接検出される。プローブがインタクトである場合、レポーター色素がクエンチャー色素に近いことは、レポーター蛍光の抑制を生じる。PCR の間、目的の標的が存在する場合、このプローブは、順方向プライマー部位と逆方向プライマー部位との間に特異的にアニーリングする。AmpliTaqTM Gold DNA ポリメラーゼの 5' - 3' ヌクレオチド分解 (nucleolytic) 活性は、プローブが標的にハイブリダイズする場合にのみ、レポーターとクエンチャーとの間でプローブを切断する。次いで、このプローブフラグメントは、標的から移動され、そして鎖の重合が続く。プローブの 3' 末端は、PCR の間のプローブの伸長を防止するためにブロックされる。このプロセスは、どのサイクルにおいても生じ、かつ産物の指数関数的蓄積を妨害しない。RNA を、トリゾール (trizol) 法を用いて調製し、そして DNase で処理して、混入しているゲノム DNA を除去した。cDNA を、標準的な技術を使用して合成した。コントロール遺伝子の検出可能な PCR 増幅を有さないサンプルにおいて生じた、逆転写酵素の非存在下でのモック cDNA 合成は、ゲノム DNA 混入物の効果的な除去を確認する。

10

【0203】

20

(等価物)

当業者は、慣用的実験に過ぎない実験を使用して、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を、認識するか、または確認し得る。このような等価物は、添付の特許請求の範囲によって包含されると意図される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Silos-Santiago, Inmaculada

<120> Methods and Compositions to Treat Pain
and Painful Disorders Using 577, 20739 or 57145

<130> MPI01-287

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1911

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<400> 1

```

atgaagaagc tccagggagc tcacctccgc aagcctgtca ccccagacct gctgatgacc 60
cccagtgacc agggcgatgt cgacctggat gtggactttg ctgcacaccg ggggaactgg 120
acaggcaagc tggacttcct gctgtcctgc attggctact gtgtaggcct ggggaatgtc 180
tggcgcttcc cctatcgagc gtacaccaat ggaggaggcg ccttcctcgt gccctacttc 240
ctcatgctgg ccatctgtgg catccccctc ttcttcctgg agctctccct gggccagttc 300
tccagcctag gggccctggc tgtctggaaa atcagccctc tcttcaaagg cgcgggcgca 360
gccatgctgc tcatcgtggg cttgggtggc atctactaca acatgatcat cgcctacgtg 420
ctcttttacc tcttgccctc cctcaccagc gacctaccct gggagcactg tggcaactgg 480
tggaacacag aactctgcct ggagcacaga gtctccaagg acggcaacgg gcccttgccc 540
ctcaacctca cctgcacctg cagccccagt gaggagtact ggagccgcta cgtcctccac 600
atccaaggca gccagggcac cggcagccct ggggagatcc gctggaaact ctgcctctgc 660
ctgctgctgg cctgggtcat cgtgttcctc tgtatcctca aggggtgtgaa gtcttcgggc 720
aagggtggtg atttcacggc caggttcccc tacctcatcc tgctcatgct gctggtcgcg 780
ggagtcaccc tcccaggggc ctggaagggc atccagttct atctcacccc ccagttccac 840
cacttggtgt ctccaagggt gtggattgaa gctgctcttc agatcttcta ttccctgggt 900
gtgggctctg gggggctcct cacccttgcc tctacaaca cgtttcacca gaacatctat 960
agagacacct tcatcgtcac tctgggcaac gccatcacca gcactcctggc tggctttgcc 1020
atcttctccg tctgtggcta catgtctcag gagctgggag tgcctgtgga ccaagtagcc 1080
aaagcaggcg ctggcctggc ctttgtcgtc tacccacagg ccatgacctat gctgcctctg 1140
tcacccttct ggtcctttct cttcttcttc atgcttctga ctctcggcct agatagccag 1200
tttgcttttc tggagaccat tgtgacagct gtgacagatg agttccata ctacctgcgg 1260
cccaagaagg cgggtgttctc agggctcctc tgcgtggcca tgtacctgat ggggctgatc 1320
ctcaccactg atgggggcat gtactggctg gtccttcttg atgactacag cgcagcttc 1380
gggctgatgg tgggtggttat caccacatgc cttgccgtga cagggtgtga tggcattcag 1440
aggttctgcc gagacatcca catgatgctg ggcttcaagc cgggcctcta ctccagggc 1500
tgctggctgt tctgtctccc agccacgctc ttggccctcc tgggtgtatag catcgtcaag 1560
taccagccct cggagtatgg cagttaccgc ttcccgcctt gggctgagct gctgggcata 1620
ctgatgggct tgcgtctctg cctcatgata ccagctggca tgcgtggtggc tgtgcttcga 1680
gaagagggct cactctggga gcggctccaa caggccagcc ggccggccat ggactgggga 1740
ccatcgctgg aggagaaccg gacgggcatg tatgtggcca cgtgggtgg gagccagtca 1800
ccaaagccac tgatggtgca catgcgcaag tacgggggca tcaccagctt cgagaacacg 1860
gccatcgagg tggaccgtga gattgcagag gaggaggagt cgatgatgtg a 1911

```

<210> 2

<211> 1911

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<220>

<221> mRNA

<222> (0)... (0)

10

20

30

40

<221> CDS

<222> (1)...(1911)

<400> 2

```

atg aag aag ctc cag gga gct cac ctc cgc aag cct gtc acc cca gac 48
Met Lys Lys Leu Gln Gly Ala His Leu Arg Lys Pro Val Thr Pro Asp
1 5 10 15

ctg ctg atg acc ccc agt gac cag ggc gat gtc gac ctg gat gtg gac 96
Leu Leu Met Thr Pro Ser Asp Gln Gly Asp Val Asp Leu Asp Val Asp
20 25 30

ttt gct gca cac cgg ggg aac tgg aca ggc aag ctg gac ttc ctg ctg 144
Phe Ala Ala His Arg Gly Asn Trp Thr Gly Lys Leu Asp Phe Leu Leu
35 40 45

tcc tgc att ggc tac tgt gta ggc ctg ggg aat gtc tgg cgc ttc ccc 192
Ser Cys Ile Gly Tyr Cys Val Gly Leu Gly Asn Val Trp Arg Phe Pro
50 55 60

tat cga gcg tac acc aat gga gga ggc gcc ttc ctc gtg ccc tac ttc 240
Tyr Arg Ala Tyr Thr Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu Val Pro Tyr Phe
65 70 75 80

ctc atg ctg gcc atc tgt ggc atc ccc ctc ttc ttc ctg gag ctc tcc 288
Leu Met Leu Ala Ile Cys Gly Ile Pro Leu Phe Phe Leu Glu Leu Ser
85 90 95

ctg ggc cag ttc tcc agc cta ggg ccc ctg gct gtc tgg aaa atc agc 336
Leu Gly Gln Phe Ser Ser Leu Gly Pro Leu Ala Val Trp Lys Ile Ser
100 105 110

cct ctc ttc aaa ggc gcc ggc gca gcc atg ctg ctc atc gtg ggc ttg 384
Pro Leu Phe Lys Gly Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Ile Val Gly Leu
115 120 125

gtg gcc atc tac tac aac atg atc atc gcc tac gtg ctc ttc tac ctc 432
Val Ala Ile Tyr Tyr Asn Met Ile Ile Ala Tyr Val Leu Phe Tyr Leu
130 135 140

ttc gcc tcc ctc acc agc gac cta ccc tgg gag cac tgt ggc aac tgg 480
Phe Ala Ser Leu Thr Ser Asp Leu Pro Trp Glu His Cys Gly Asn Trp
145 150 155 160

tgg aac aca gaa ctc tgc ctg gag cac aga gtc tcc aag gac ggc aac 528
Trp Asn Thr Glu Leu Cys Leu Glu His Arg Val Ser Lys Asp Gly Asn
165 170 175

ggg gcc ctg ccc ctc aac ctc acc tgc acc gtc agc ccc agt gag gag 576
Gly Ala Leu Pro Leu Asn Leu Thr Cys Thr Val Ser Pro Ser Glu Glu
180 185 190

tac tgg agc cgc tac gtc ctc cac atc caa ggc agc cag ggc atc ggc 624
Tyr Trp Ser Arg Tyr Val Leu His Ile Gln Gly Ser Gln Gly Ile Gly
195 200 205

agc cct ggg gag atc cgc tgg aac ctc tgc ctc tgc ctg ctg ctg gcc 672
Ser Pro Gly Glu Ile Arg Trp Asn Leu Cys Leu Cys Leu Leu Leu Ala
210 215 220

```

10

20

30

40

tgg gtc atc gtg ttc ctc tgt atc ctc aag ggt gtg aag tct tcg ggc	720
Trp Val Ile Val Phe Leu Cys Ile Leu Lys Gly Val Lys Ser Ser Gly	
225 230 235 240	
aag gtg gtg tat ttc acg gcc acg ttc ccc tac ctc atc ctg ctc atg	768
Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Tyr Leu Ile Leu Leu Met	
245 250 255	
ctg ctg gtc cgc gga gtc acc ctc cca ggg gcc tgg aag ggc atc cag	816
Leu Leu Val Arg Gly Val Thr Leu Pro Gly Ala Trp Lys Gly Ile Gln	
260 265 270	
ttc tat ctc acc ccc cag ttc cac cac ttg ttg tct tcc aag gtg tgg	864
Phe Tyr Leu Thr Pro Gln Phe His His Leu Leu Ser Ser Lys Val Trp	
275 280 285	
att gaa gct gct ctt cag atc ttc tat tcc ctg ggt gtg ggc ttc ggg	912
Ile Glu Ala Ala Leu Gln Ile Phe Tyr Ser Leu Gly Val Gly Phe Gly	
290 295 300	
ggg ctc ctc acc ttt gcc tcc tac aac acg ttt cac cag aac atc tat	960
Gly Leu Leu Thr Phe Ala Ser Tyr Asn Thr Phe His Gln Asn Ile Tyr	
305 310 315 320	
aga gac acc ttc atc gtc act ctg ggc aac gcc atc acc agc atc ctg	1008
Arg Asp Thr Phe Ile Val Thr Leu Gly Asn Ala Ile Thr Ser Ile Leu	
325 330 335	
gct ggc ttt gcc atc ttc tcc gtg ctg ggc tac atg tct cag gag ctg	1056
Ala Gly Phe Ala Ile Phe Ser Val Leu Gly Tyr Met Ser Gln Glu Leu	
340 345 350	
ggc gtg cct gtg gac caa gta gcc aaa gca ggc cct ggc ctg gcc ttt	1104
Gly Val Pro Val Asp Gln Val Ala Lys Ala Gly Pro Gly Leu Ala Phe	
355 360 365	
gtc gtc tac cca cag gcc atg acc atg ctg cct ctg tca ccc ttc tgg	1152
Val Val Tyr Pro Gln Ala Met Thr Met Leu Pro Leu Ser Pro Phe Trp	
370 375 380	
tcc ttt ctc ttc ttc ttc atg ctt ctg act ctc ggc cta gat agc cag	1200
Ser Phe Leu Phe Phe Phe Met Leu Leu Thr Leu Gly Leu Asp Ser Gln	
385 390 395 400	
ttt gcc ttt ctg gag acc att gtg aca gct gtg aca gat gag ttc cca	1248
Phe Ala Phe Leu Glu Thr Ile Val Thr Ala Val Thr Asp Glu Phe Pro	
405 410 415	
tac tac ctg cgg ccc aag aag gcg gtg ttc tca ggg ctc atc tgc gtg	1296
Tyr Tyr Leu Arg Pro Lys Lys Ala Val Phe Ser Gly Leu Ile Cys Val	
420 425 430	
gcc atg tac ctg atg ggg ctg atc ctc acc act gat ggg ggc atg tac	1344
Ala Met Tyr Leu Met Gly Leu Ile Leu Thr Thr Asp Gly Gly Met Tyr	
435 440 445	
tgg ctg gtc ctt ctg gat gac tac agc gcc agc ttc ggg ctg atg gtg	1392
Trp Leu Val Leu Leu Asp Asp Tyr Ser Ala Ser Phe Gly Leu Met Val	
450 455 460	
gtg gtt atc acc aca tgc ctt gcc gtg aca cgg gtg tat ggc att cag	1440

10

20

30

40

```

Val Val Ile Thr Thr Cys Leu Ala Val Thr Arg Val Tyr Gly Ile Gln
465                               470                               475                               480

agg ttc tgc cga gac atc cac atg atg ctg ggc ttc aag ccg ggc ctc 1488
Arg Phe Cys Arg Asp Ile His Met Met Leu Gly Phe Lys Pro Gly Leu
                               485                               490                               495

tac ttc agg gcc tgc tgg ctg ttc ctg tcc cca gcc acg ctc ttg gcc 1536
Tyr Phe Arg Ala Cys Trp Leu Phe Leu Ser Pro Ala Thr Leu Leu Ala
                               500                               505                               510

ctc ctg gtg tat agc atc gtc aag tac cag ccc tcg gag tat ggc agt 1584
Leu Leu Val Tyr Ser Ile Val Lys Tyr Gln Pro Ser Glu Tyr Gly Ser
                               515                               520                               525

tac cgc ttc ccg ccc tgg gct gag ctg ctg ggc atc ctg atg ggc ctg 1632
Tyr Arg Phe Pro Pro Trp Ala Glu Leu Leu Gly Ile Leu Met Gly Leu
                               530                               535                               540

ctg tcc tgc ctc atg atc cca gct ggc atg ctg gtg gct gtg ctt cga 1680
Leu Ser Cys Leu Met Ile Pro Ala Gly Met Leu Val Ala Val Leu Arg
545                               550                               555                               560

gaa gag ggc tca ctc tgg gag cgg ctc caa cag gcc agc cgg ccg gcc 1728
Glu Glu Gly Ser Leu Trp Glu Arg Leu Gln Gln Ala Ser Arg Pro Ala
                               565                               570                               575

atg gac tgg gga cca tcg ctg gag gag aac cgg acg ggc atg tat gtg 1776
Met Asp Trp Gly Pro Ser Leu Glu Glu Asn Arg Thr Gly Met Tyr Val
                               580                               585                               590

gcc acg ctg gct ggg agc cag tca cca aag cca ctg atg gtg cac atg 1824
Ala Thr Leu Ala Gly Ser Gln Ser Pro Lys Pro Leu Met Val His Met
                               595                               600                               605

cgc aag tac ggg ggc atc acc agc ttc gag aac acg gcc atc gag gtg 1872
Arg Lys Tyr Gly Gly Ile Thr Ser Phe Glu Asn Thr Ala Ile Glu Val
610                               615                               620

gac cgt gag att gca gag gag gag gag tcg atg atg tga 1911
Asp Arg Glu Ile Ala Glu Glu Glu Ser Met Met *
625                               630                               635

```

```

<210> 3
<211> 636
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 3
Met Lys Lys Leu Gln Gly Ala His Leu Arg Lys Pro Val Thr Pro Asp
 1                               5                               10                               15
Leu Leu Met Thr Pro Ser Asp Gln Gly Asp Val Asp Leu Asp Val Asp
                               20                               25                               30
Phe Ala Ala His Arg Gly Asn Trp Thr Gly Lys Leu Asp Phe Leu Leu
35                               40                               45
Ser Cys Ile Gly Tyr Cys Val Gly Leu Gly Asn Val Trp Arg Phe Pro
50                               55                               60
Tyr Arg Ala Tyr Thr Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu Val Pro Tyr Phe
65                               70                               75                               80
Leu Met Leu Ala Ile Cys Gly Ile Pro Leu Phe Phe Leu Glu Leu Ser

```

10

20

30

40

				85					90					95	
Leu	Gly	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Leu	Ala	Val	Trp	Lys	Ile	Ser
			100					105					110		
Pro	Leu	Phe	Lys	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Leu
			115					120					125		
Val	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Met	Ile	Ile	Ala	Tyr	Val	Leu	Phe	Tyr	Leu
			130					135				140			
Phe	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Leu	Pro	Trp	Glu	His	Cys	Gly	Asn	Trp
145					150					155					160
Trp	Asn	Thr	Glu	Leu	Cys	Leu	Glu	His	Arg	Val	Ser	Lys	Asp	Gly	Asn
				165					170					175	
Gly	Ala	Leu	Pro	Leu	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Glu
			180					185					190		
Tyr	Trp	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	His	Ile	Gln	Gly	Ser	Gln	Gly	Ile	Gly
			195					200				205			
Ser	Pro	Gly	Glu	Ile	Arg	Trp	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Ala
			210				215					220			
Trp	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Cys	Ile	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Ser	Ser	Gly
225					230					235					240
Lys	Val	Val	Tyr	Phe	Thr	Ala	Thr	Phe	Pro	Tyr	Leu	Ile	Leu	Leu	Met
				245					250					255	
Leu	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Gly	Ala	Trp	Lys	Gly	Ile	Gln
			260					265					270		
Phe	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Phe	His	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Trp
			275				280					285			
Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Phe	Gly
			290			295					300				
Gly	Leu	Leu	Thr	Phe	Ala	Ser	Tyr	Asn	Thr	Phe	His	Gln	Asn	Ile	Tyr
305					310					315					320
Arg	Asp	Thr	Phe	Ile	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ala	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu
			325						330					335	
Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Phe	Ser	Val	Leu	Gly	Tyr	Met	Ser	Gln	Glu	Leu
			340					345					350		
Gly	Val	Pro	Val	Asp	Gln	Val	Ala	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Ala	Phe
			355				360					365			
Val	Val	Tyr	Pro	Gln	Ala	Met	Thr	Met	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Phe	Trp
			370			375				380					
Ser	Phe	Leu	Phe	Phe	Phe	Met	Leu	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ser	Gln
385					390					395					400
Phe	Ala	Phe	Leu	Glu	Thr	Ile	Val	Thr	Ala	Val	Thr	Asp	Glu	Phe	Pro
			405						410					415	
Tyr	Tyr	Leu	Arg	Pro	Lys	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Gly	Leu	Ile	Cys	Val
			420					425					430		
Ala	Met	Tyr	Leu	Met	Gly	Leu	Ile	Leu	Thr	Thr	Asp	Gly	Gly	Met	Tyr
			435				440					445			
Trp	Leu	Val	Leu	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Gly	Leu	Met	Val
			450			455					460				
Val	Val	Ile	Thr	Thr	Cys	Leu	Ala	Val	Thr	Arg	Val	Tyr	Gly	Ile	Gln
465					470				475						480
Arg	Phe	Cys	Arg	Asp	Ile	His	Met	Met	Leu	Gly	Phe	Lys	Pro	Gly	Leu
			485						490					495	
Tyr	Phe	Arg	Ala	Cys	Trp	Leu	Phe	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Ala
			500					505					510		
Leu	Leu	Val	Tyr	Ser	Ile	Val	Lys	Tyr	Gln	Pro	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ser
			515				520					525			
Tyr	Arg	Phe	Pro	Pro	Trp	Ala	Glu	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Met	Gly	Leu
			530			535					540				
Leu	Ser	Cys	Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Arg
545					550					555					560
Glu	Glu	Gly	Ser	Leu	Trp	Glu	Arg	Leu	Gln	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Ala
			565						570					575	

10

20

30

40

Met Asp Trp Gly Pro Ser Leu Glu Glu Asn Arg Thr Gly Met Tyr Val
 580 585 590
 Ala Thr Leu Ala Gly Ser Gln Ser Pro Lys Pro Leu Met Val His Met
 595 600 605
 Arg Lys Tyr Gly Gly Ile Thr Ser Phe Glu Asn Thr Ala Ile Glu Val
 610 615 620
 Asp Arg Glu Ile Ala Glu Glu Glu Glu Ser Met Met
 625 630 635

<210> 4
 <211> 1635
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

10

<400> 4
 atgtctgacg gtcttgataa tgaagagaaa cccccggctc ctccactgag gatgaatagt 60
 aacaaccggg attcttcagc actcaaccac agctccaaac cacttcccat ggccccctgaa 120
 gagaagaata agaaagccag gcttgcctct atcttcccag gaggagggga taaaaccaat 180
 aagaagaagg agaaagagcg cccagagatc tctcttcctt cagactttga gcatacgatt 240
 catgtggggt ttgatgcagt caccggggaa ttacttgaa ttccagagca atgggcacga 300
 ttactccaaa cttccaacat aacaaaattg gaacagaaga agaaccaca agctgttcta 360
 gatgttctca aattctatga ttccaaagaa acagtcaaca accagaaata catgagcttt 420
 acatcaggag ataaaagtgc acatggatac atagcagccc atccttcgag tacaaaaaca 480
 gcactcgagc ctccattggc cctcctgtg tctgaagaag aagatgaaga ggaagaagaa 540
 gaagaagatg aaaatgagcc accaccagtt atcgcaacca gaccagagca taaaaaatca 600
 atctatactc gttctgtggt tgaatccatt gcttcaccag cagtaccaa taaagaggtc 660
 acaccacct ctgctgaaaa tgccaattcc agtactttgt acaggaacac agatcggcaa 720
 agaaaaaaat ccaagatgac agatgaggag atcttagaga agctaagaag cattgtgagt 780
 gttggggacc caaagaaaaa atacacaaga ttgaaaaaa ttggtcaagg ggcacaggt 840
 actgtttata cagcactaga cattgcaaca ggacaagagg tggccataaa gcagatgaac 900
 cttcaacagc aacccaagaa ggaattaatt attaatgaaa ttctggtcat gagggaaaat 960
 aagaacccta atattgttaa ttatttagat agctacttgg tgggtgatga actatgggta 1020
 gtcatggaat acttggctgg tggctctctg actgatgtgg tcacagagac ctgtatggat 1080
 gaaggacaga tagcagctgt ctgcagagag tgcccgcaag ctttggattt cctgcactca 1140
 aaccaggtga tccatagaga tataaagagt gacaatatc ttctcgggat ggatggctct 1200
 gttaaattga ctgactttgg gttctgtgcc cagatcactc ctgagcaaag taaacgaagc 1260
 actatgggtg gaaccccata ttggatggca cctgaggtgg tgactcgaag agcttatggt 1320
 ccgaaagtig atatctggtc tcttgggaatt atggcaattg aaatggtgga aggtgaaccc 1380
 ccttacctta atgaaaatcc actcagggca ttgtatctga tagccactaa tggaaactca 1440
 gagctccaga atcctgagag actgtcagct gtattccgtg acttttttaa tgcgtgtctt 1500
 gagatggatg tggataggcg aggatctgcc aaggagcttt tgcagcatcc atttttaaaa 1560
 ttagccaagc ctctctccag cctgactcct ctgattatcg ctgcaaagga agcaattaag 1620
 aacagcagcc gctaa 1635

20

<210> 5
 <211> 1635
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

30

<220>
 <221> mRNA
 <222> (0)...(0)
 <221> CDS
 <222> (1)...(1635)

<400> 5
 atg tct gac ggt ctg gat aat gaa gag aaa ccc ccg gct cct cca ctg 48
 Met Ser Asp Gly Leu Asp Asn Glu Glu Lys Pro Pro Ala Pro Pro Leu
 1 5 10 15

40

agg atg aat agt aac aac cgg gat tct tca gca ctc aac cac agc tcc 96
 Arg Met Asn Ser Asn Asn Arg Asp Ser Ser Ala Leu Asn His Ser Ser
 20 25 30

aaa cca ctt ccc atg gcc cct gaa gag aag aat aag aaa gcc agg ctt 144
 Lys Pro Leu Pro Met Ala Pro Glu Glu Lys Asn Lys Lys Ala Arg Leu
 35 40 45

cgc tct atc ttc cca gga gga ggg gat aaa acc aat aag aag aag gag 192
 Arg Ser Ile Phe Pro Gly Gly Gly Asp Lys Thr Asn Lys Lys Lys Glu
 50 55 60

aaa gag cgc cca gag atc tct ctt cct tca gac ttt gag cat acg att 240
 Lys Glu Arg Pro Glu Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Glu His Thr Ile 10
 65 70 75 80

cat gtg ggg ttt gat gca gtc acc ggg gaa ttc act gga att cca gag 288
 His Val Gly Phe Asp Ala Val Thr Gly Glu Phe Thr Gly Ile Pro Glu
 85 90 95

caa tgg gca cga tta ctc caa act tcc aac ata aca aaa ttg gaa cag 336
 Gln Trp Ala Arg Leu Leu Gln Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Glu Gln

aag aag aac cca caa gct gtt cta gat gtt ctc aaa ttc tat gat tcc 384
 Lys Lys Asn Pro Gln Ala Val Leu Asp Val Leu Lys Phe Tyr Asp Ser
 115 120 125

aaa gaa aca gtc aac aac cag aaa tac atg agc ttt aca tca gga gat 432
 Lys Glu Thr Val Asn Asn Gln Lys Tyr Met Ser Phe Thr Ser Gly Asp 20
 130 135 140

aaa agt gca cat gga tac ata gca gcc cat cct tct agt aca aaa aca 480
 Lys Ser Ala His Gly Tyr Ile Ala Ala His Pro Ser Ser Thr Lys Thr
 145 150 155 160

gca tct gag cct cca ttg gcc cct cct gtg tct gaa gaa gaa gat gaa 528
 Ala Ser Glu Pro Pro Leu Ala Pro Pro Val Ser Glu Glu Glu Asp Glu
 165 170 175

gag gaa gaa gaa gaa gaa gat gaa aat gag cca cca cca gtt atc gca 576
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Pro Pro Pro Val Ile Ala
 180 185 190

cca aga cca gag cat aca aaa tca atc tat act cgt tct gtg gtt gaa 624
 Pro Arg Pro Glu His Thr Lys Ser Ile Tyr Thr Arg Ser Val Val Glu 30
 195 200 205

tcc att gct tca cca gca gta cca aat aaa gag gtc aca cca ccc tct 672
 Ser Ile Ala Ser Pro Ala Val Pro Asn Lys Glu Val Thr Pro Pro Ser
 210 215 220

gct gaa aat gcc aat tcc agt act ttg tac agg aac aca gat cgg caa 720
 Ala Glu Asn Ala Asn Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Asn Thr Asp Arg Gln
 225 230 235 240

aga aaa aaa tcc aag atg aca gat gag gag atc tta gag aag cta aga 768
 Arg Lys Lys Ser Lys Met Thr Asp Glu Glu Ile Leu Glu Lys Leu Arg
 245 250 255

10

20

30

40

agc att gtg agt gtt ggg gac cca aag aaa aaa tac aca aga ttt gaa Ser Ile Val Ser Val Gly Asp Pro Lys Lys Lys Tyr Thr Arg Phe Glu 260 265 270	816	
aaa att ggt caa ggg gca tca ggt act gtt tat aca gca cta gac att Lys Ile Gly Gln Gly Ala Ser Gly Thr Val Tyr Thr Ala Leu Asp Ile 275 280 285	864	
gca aca gga caa gag gtg gcc ata aag cag atg aac ctt caa cag caa Ala Thr Gly Gln Glu Val Ala Ile Lys Gln Met Asn Leu Gln Gln Gln 290 295 300	912	
ccc aag aag gaa tta att att aat gaa att ctg gtc atg agg gaa aat Pro Lys Lys Glu Leu Ile Ile Asn Glu Ile Leu Val Met Arg Glu Asn 305 310 315 320	960	10
aag aac cct aat att gtt aat tat tta gat agc tac ttg gtg ggt gat Lys Asn Pro Asn Ile Val Asn Tyr Leu Asp Ser Tyr Leu Val Gly Asp 325 330 335	1008	
gaa cta tgg gta gtc atg gaa tac ttg gct ggt ggc tct ctg act gat Glu Leu Trp Val Val Met Glu Tyr Leu Ala Gly Gly Ser Leu Thr Asp 340 345 350	1056	
gtg gtc aca gag acc tgt atg gat gaa gga cag ata gca gct gtc tgc Val Val Thr Glu Thr Cys Met Asp Glu Gly Gln Ile Ala Ala Val Cys 355 360 365	1104	
aga gag tgc ctg caa gct ttg gat ttc ctg cac tca aac cag gtg atc Arg Glu Cys Leu Gln Ala Leu Asp Phe Leu His Ser Asn Gln Val Ile 370 375 380	1152	20
cat aga gat ata aag agt gac aat att ctt ctc ggg atg gat ggc tct His Arg Asp Ile Lys Ser Asp Asn Ile Leu Leu Gly Met Asp Gly Ser 385 390 395 400	1200	
gtt aaa ttg act gac ttt ggg ttc tgt gcc cag atc act cct gag caa Val Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Cys Ala Gln Ile Thr Pro Glu Gln 405 410 415	1248	
agt aaa cga agc act atg gtg gga acc cca tat tgg atg gca cct gag Ser Lys Arg Ser Thr Met Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu 420 425 430	1296	
gtg gtg act cga aaa gct tat ggt ccg aaa gtt gat atc tgg tct ctt Val Val Thr Arg Lys Ala Tyr Gly Pro Lys Val Asp Ile Trp Ser Leu 435 440 445	1344	30
gga att atg gca att gaa atg gtg gaa ggt gaa ccc cct tac ctt aat Gly Ile Met Ala Ile Glu Met Val Glu Gly Glu Pro Pro Tyr Leu Asn 450 455 460	1392	
gaa aat cca ctc agg gca ttg tat ctg ata gcc act aat gga act cca Glu Asn Pro Leu Arg Ala Leu Tyr Leu Ile Ala Thr Asn Gly Thr Pro 465 470 475 480	1440	
gag ctc cag aat cct gag aga ctg tca gct gta ttc cgt gac ttt tta Glu Leu Gln Asn Pro Glu Arg Leu Ser Ala Val Phe Arg Asp Phe Leu 485 490 495	1488	
aat cgc tgt ctt gag atg gat gtg gat agg cga gga tct gcc aag gag	1536	40

```

Asn Arg Cys Leu Glu Met Asp Val Asp Arg Arg Gly Ser Ala Lys Glu
500                               505                               510

ctt ttg cag cat cca ttt tta aaa tta gcc aag cct ctc tcc agc ctg 1584
Leu Leu Gln His Pro Phe Leu Lys Leu Ala Lys Pro Leu Ser Ser Leu
515                               520                               525

act cct ctg att atc gct gca aag gaa gca att aag aac agc agc cgc 1632
Thr Pro Leu Ile Ile Ala Ala Lys Glu Ala Ile Lys Asn Ser Ser Arg
530                               535                               540

taa
*
1635

```

10

```

<210> 6
<211> 544
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 6
Met Ser Asp Gly Leu Asp Asn Glu Glu Lys Pro Pro Ala Pro Pro Leu
1      5      10      15
Arg Met Asn Ser Asn Asn Arg Asp Ser Ser Ala Leu Asn His Ser Ser
20      25      30
Lys Pro Leu Pro Met Ala Pro Glu Glu Lys Asn Lys Lys Ala Arg Leu
35      40      45
Arg Ser Ile Phe Pro Gly Gly Gly Asp Lys Thr Asn Lys Lys Lys Glu
50      55      60
Lys Glu Arg Pro Glu Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Glu His Thr Ile
65      70      75      80
His Val Gly Phe Asp Ala Val Thr Gly Glu Phe Thr Gly Ile Pro Glu
85      90      95
Gln Trp Ala Arg Leu Leu Gln Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Glu Gln
100     105     110
Lys Lys Asn Pro Gln Ala Val Leu Asp Val Leu Lys Phe Tyr Asp Ser
115     120     125
Lys Glu Thr Val Asn Asn Gln Lys Tyr Met Ser Phe Thr Ser Gly Asp
130     135     140
Lys Ser Ala His Gly Tyr Ile Ala Ala His Pro Ser Ser Thr Lys Thr
145     150     155     160
Ala Ser Glu Pro Pro Leu Ala Pro Pro Val Ser Glu Glu Glu Asp Glu
165     170     175
Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Pro Pro Pro Val Ile Ala
180     185     190
Pro Arg Pro Glu His Thr Lys Ser Ile Tyr Thr Arg Ser Val Val Glu
195     200     205
Ser Ile Ala Ser Pro Ala Val Pro Asn Lys Glu Val Thr Pro Pro Ser
210     215     220
Ala Glu Asn Ala Asn Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Asn Thr Asp Arg Gln
225     230     235     240
Arg Lys Lys Ser Lys Met Thr Asp Glu Glu Ile Leu Glu Lys Leu Arg
245     250     255
Ser Ile Val Ser Val Gly Asp Pro Lys Lys Lys Tyr Thr Arg Phe Glu
260     265     270
Lys Ile Gly Gln Gly Ala Ser Gly Thr Val Tyr Thr Ala Leu Asp Ile
275     280     285
Ala Thr Gly Gln Glu Val Ala Ile Lys Gln Met Asn Leu Gln Gln Gln
290     295     300
Pro Lys Lys Glu Leu Ile Ile Asn Glu Ile Leu Val Met Arg Glu Asn

```

20

30

40


```

305          310          315          320
Lys Asn Pro Asn Ile Val Asn Tyr Leu Asp Ser Tyr Leu Val Gly Asp
          325          330          335
Glu Leu Trp Val Val Met Glu Tyr Leu Ala Gly Gly Ser Leu Thr Asp
          340          345          350
Val Val Thr Glu Thr Cys Met Asp Glu Gly Gln Ile Ala Ala Val Cys
          355          360          365
Arg Glu Cys Leu Gln Ala Leu Asp Phe Leu His Ser Asn Gln Val Ile
          370          375          380
His Arg Asp Ile Lys Ser Asp Asn Ile Leu Leu Gly Met Asp Gly Ser
385          390          395          400
Val Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Cys Ala Gln Ile Thr Pro Glu Gln
          405          410          415
Ser Lys Arg Ser Thr Met Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu
          420          425          430
Val Val Thr Arg Lys Ala Tyr Gly Pro Lys Val Asp Ile Trp Ser Leu
          435          440          445
Gly Ile Met Ala Ile Glu Met Val Glu Gly Glu Pro Pro Tyr Leu Asn
          450          455          460
Glu Asn Pro Leu Arg Ala Leu Tyr Leu Ile Ala Thr Asn Gly Thr Pro
465          470          475          480
Glu Leu Gln Asn Pro Glu Arg Leu Ser Ala Val Phe Arg Asp Phe Leu
          485          490          495
Asn Arg Cys Leu Glu Met Asp Val Asp Arg Arg Gly Ser Ala Lys Glu
          500          505          510
Leu Leu Gln His Pro Phe Leu Lys Leu Ala Lys Pro Leu Ser Ser Leu
          515          520          525
Thr Pro Leu Ile Ile Ala Ala Lys Glu Ala Ile Lys Asn Ser Ser Arg
          530          535          540

```

10

```

<210> 7
<211> 2520
<212> DNA
<213> Homo Sapien

```

20

```

<400> 7
ccacgcgtcc gggctttgtc tcgtgggctg gtccccagcg gctccctccc cgaacagctg 60
ctgctccagg gaggaagcgg cgcgggtgct gtccagcttc ccggtgctga aaaccggagg 120
gctcgtcatc caccactacc atgtaagggc catgagaagg gctcatcctg gcgcagcgcg 180
gacatggagg aggaattatt ccagctaaag cagctgccgg ttgtgaaatt ccgtgcaca 240
ggcgagagtg caaggctcaga ggacgacacg gcttcaggag agcatgaagt ccagattgaa 300
gggggtccacg tgggcctaga ggctgtggag ctggatgatg gggcagctgt gcccaaggag 360
tttgccaatc ccaccgatga tactttcatg gtggaagatg cagtggagc cattggcttt 420
ggaaaatttc agtggaaagct gtctgttctc actggcttgg cttggatggc tgatgccatg 480
gagatgatga tcctcagcat cctggcacca cagctgcatt gcgagtggag gctcccaagc 540
tgccaggtgg cattgtctgac ctccggtggtc tttgtaggca tgatgtccag ctccacgctc 600
tggggaaata tctcagacca gtacggcagg aaaacagggc tgaagatcag cgtgctgtgg 660
actctgtact atggcatcct tagtgcattt gcgcccgtgt atagctggat cctggtgctc 720
cggggcctgg tgggcttcgg gatcggagga gtccccagt cgggtgacgt gtatgccgag 780
ttccttccca tgaagccag agctaaatgt attttgctga ttgaggtatt ctgggccatc 840
gggacagtgt tcgaggtcgt cctggctgtg ttctgtgatg ccagcctggg ctggcgcttg 900
ctgctcatcc tctcagctgt ccgctcctc ctctttgccg tgctgtgttt ctggctgcct 960
gaaagtgcaa ggtatgatgt gctgtcaggg aaccaggaaa aggcaatcgc caccttaag 1020
aggatagcaa ctgaaaacgg agctcccatg ccgctgggga aactcatcat ctccagacag 1080
gaagaccgag gcaaaatgag ggaccttttc acacccatt ttagatggac aactttgctg 1140
ctgtggttta tatggttttc caatgcattc tcttactacg ggttagttct actcaccaca 1200
gaactcttcc aggcaggaga tgtctgcggc atctccagtc ggaagaaggc tgtagaggca 1260
aaatgcagcc tggcctgcga gtacctgagt gaggaggatt acatggactt gctgtggacc 1320
accctctctg agtttccagg tgtccttgtg actctgtgga ttattgaccg cctggggcgc 1380
aagaagacca tggccctgtg ctttgtcatc ttctccttct gcagcctcct gctgtttatc 1440

```

30

40

```

tgtgttgga gaaatgtgct cactctgtta ctcttcattg caagagcggt tttttctgga 1500
ggctttcaag cgccatattg ttacacacct gaggtctacc ccacggcaac gcggggccctc 1560
ggcctgggca cctgcagcgg catggcaaga gtgggtgtct tcatcactec gttcatcgcc 1620
caggtgatgc tggaaatctc tgtgtacctg actctggcag ttacagtggt ctgctgcctc 1680
ctggctgccc tggcctcctg ctttttgccc attgagacca aaggcggagg actgcaggag 1740
tccagccacc gggagtgggg ccaggagatg gtcggccgag gaatgcacgg tgcaggtgtt 1800
accaggtcga actctggctc tcaggaatag tgaccgatgg gggactgagc tggctcttga 1860
ggctgcagag cttggggggc tggcaggccc caactggggc actgattgtc actgccgaca 1920
tcaagaactc acccaagagt atgacctgga ccaacagggt tttgtgtctt gactcagttt 1980
gtcctcttcc attgaggtcc acccagggat ggggagatgt ttgctctagg ggttctctctg 2040
tatatgtggt gaaagctttg ttcataacct gtggatctac atgggaagac taccatatt 2100
aggagggtct ggtaatgcca gcaaccaatc agacaccacc cagagtcacc cggccaaacc 2160
ctcagtgaa caccaaaata tctctctgta gataccgtcc aggtcaggc ccatgtgaca 2220
cctgctgtcc acccaccgga cctgttcagt aggtttctcc cacaccaca gcccaggct 2280
ttcttctttg aaattgcagg cgatctaggt gtggtctgag cagctatttc ctggcagggg 2340
cccccggtt tgcctccta gagcctgacc agtggattct ctggcagatg gacatggtgc 2400
attcaactg gagccacatg cccccacca gcccctnttg gagttgcccg ttgttggcac 2460
caagagatcc agatgtgtcc tggggacagc tgggtcttgc accaggtgac aacctcaaaa 2520

```

```

<210> 8
<211> 2520
<212> DNA
<213> Homo Sapien

```

```

<220>
<221> mRNA
<222> (0)...(0)

```

```

<221> CDS
<222> (184)...(1830)

```

```

<400> 8
ccacgcgtcc gggttttgtc tegtgggctg gtccccagcg gctccctccc cgaacagctg 60
ctgctccagg gaggaagcgg cgggggtgct gtccagcttc cgggtgctga aaaccggagg 120
gctcgtcacc caccactacc atgtaagggc catgagaagg gctcatcctg gcgcagcgcg 180
gac atg gag gag gac tta ttc cag cta agg cag ctg ccg gtt gtg aaa 228
Met Glu Glu Asp Leu Phe Gln Leu Arg Gln Leu Pro Val Val Lys
1 5 10 15

```

```

ttc cgt cgc aca ggc gag agt gca agg tca gag gac gac acg gct tca 276
Phe Arg Arg Thr Gly Glu Ser Ala Arg Ser Glu Asp Asp Thr Ala Ser
20 25 30

```

```

gga gag cat gaa gtc cag att gaa ggg gtc cac gtg ggc cta gag gct 324
Gly Glu His Glu Val Gln Ile Glu Gly Val His Val Gly Leu Glu Ala
35 40 45

```

```

gtg gag ctg gat gat ggg gca gct gtg ccc aag gag ttt gcc aat ccc 372
Val Glu Leu Asp Asp Gly Ala Ala Val Pro Lys Glu Phe Ala Asn Pro
50 55 60

```

```

acc gat gat act ttc atg gtg gaa gat gca gtg gaa gcc att ggc ttt 420
Thr Asp Asp Thr Phe Met Val Glu Asp Ala Val Glu Ala Ile Gly Phe
65 70 75

```

```

gga aaa ttt cag tgg aag ctg tct gtt ctc act ggc ttg gct tgg atg 468
Gly Lys Phe Gln Trp Lys Leu Ser Val Leu Thr Gly Leu Ala Trp Met
80 85 90 95

```

```

gct gat gcc atg gag atg atg atc ctc agc atc ctg gca cca cag ctg 516

```

10

20

30

40

Ala Asp Ala Met Glu Met Met Ile Leu Ser Ile Leu Ala Pro Gln Leu	
100 105 110	
cat tgc gag tgg agg ctc cca agc tgg cag gtg gca ttg ctg acc tcg	564
His Cys Glu Trp Arg Leu Pro Ser Trp Gln Val Ala Leu Leu Thr Ser	
115 120 125	
gtg gtc ttt gta ggc atg atg tcc agc tcc acg ctc tgg gga aat atc	612
Val Val Phe Val Gly Met Met Ser Ser Ser Thr Leu Trp Gly Asn Ile	
130 135 140	
tca gac cag tac ggc agg aaa aca ggg ctg aag atc agc gtg ctg tgg	660
Ser Asp Gln Tyr Gly Arg Lys Thr Gly Leu Lys Ile Ser Val Leu Trp	
145 150 155	
act ctg tac tat ggc atc ctt agt gca ttt gcg ccc gtg tat agc tgg	708
Thr Leu Tyr Tyr Gly Ile Leu Ser Ala Phe Ala Pro Val Tyr Ser Trp	
160 165 170 175	
atc ctg gtg ctc cgg ggc ctg gtg ggc ttc ggg atc gga gga gtt ccc	756
Ile Leu Val Leu Arg Gly Leu Val Gly Phe Gly Ile Gly Gly Val Pro	
180 185 190	
cag tcg gtg acg ctg tat gcc gag ttc ctt ccc atg aaa gcc aga gct	804
Gln Ser Val Thr Leu Tyr Ala Glu Phe Leu Pro Met Lys Ala Arg Ala	
195 200 205	
aaa tgt att ttg ctg att gag gta ttc tgg gcc atc ggg aca gtg ttc	852
Lys Cys Ile Leu Leu Ile Glu Val Phe Trp Ala Ile Gly Thr Val Phe	
210 215 220	
gag gtc gtc ctg gct gtg ttc gtg atg ccc agc ctg ggc tgg cgt tgg	900
Glu Val Val Leu Ala Val Phe Val Met Pro Ser Leu Gly Trp Arg Trp	
225 230 235	
ctg ctc atc ctc tca gct gtc ccg ctc ctc ctc ttt gcc gtg ctg tgt	948
Leu Leu Ile Leu Ser Ala Val Pro Leu Leu Leu Phe Ala Val Leu Cys	
240 245 250 255	
ttc tgg ctg cct gaa agt gca agg tat gat gtg ctg tca ggg aac cag	996
Phe Trp Leu Pro Glu Ser Ala Arg Tyr Asp Val Leu Ser Gly Asn Gln	
260 265 270	
gaa aag gca atc gcc acc tta aag agg ata gca act gaa aac gga gct	1044
Glu Lys Ala Ile Ala Thr Leu Lys Arg Ile Ala Thr Glu Asn Gly Ala	
275 280 285	
ccc atg ccg ctg ggg aaa ctc atc atc tcc aga cag gaa gac cga ggc	1092
Pro Met Pro Leu Gly Lys Leu Ile Ile Ser Arg Gln Glu Asp Arg Gly	
290 295 300	
aaa atg agg gac ctt ttc aca ccc cat ttt aga tgg aca act ttg ctg	1140
Lys Met Arg Asp Leu Phe Thr Pro His Phe Arg Trp Thr Thr Leu Leu	
305 310 315	
ctg tgg ttt ata tgg ttt tcc aat gca ttc tct tac tac ggg tta gtt	1188
Leu Trp Phe Ile Trp Phe Ser Asn Ala Phe Ser Tyr Tyr Gly Leu Val	
320 325 330 335	
cta ctc acc aca gaa ctc ttc cag gca gga gat gtc tgc ggc atc tcc	1236
Leu Leu Thr Thr Glu Leu Phe Gln Ala Gly Asp Val Cys Gly Ile Ser	

10

20

30

40

340	345	350	
agt cgg aag aag gct gta gag gca aaa tgc agc ctg gcc tgc gag tac			1284
Ser Arg Lys Lys Ala Val Glu Ala Lys Cys Ser Leu Ala Cys Glu Tyr			
355	360	365	
ctg agt gag gag gat tac atg gac ttg ctg tgg acc acc ctc tct gag			1332
Leu Ser Glu Glu Asp Tyr Met Asp Leu Leu Trp Thr Thr Leu Ser Glu			
370	375	380	
ttt cca ggt gtc ctt gtg act ctg tgg att att gac cgc ctg ggg cgc			1380
Phe Pro Gly Val Leu Val Thr Leu Trp Ile Ile Asp Arg Leu Gly Arg			
385	390	395	
aag aag acc atg gcc ctg tgc ttt gtc atc ttc tcc ttc tgc agc ctc			1428
Lys Lys Thr Met Ala Leu Cys Phe Val Ile Phe Ser Phe Cys Ser Leu			
400	405	410	415
ctg ctg ttt atc tgt gtt gga aga aat gtg ctc act ctg tta ctc ttc			1476
Leu Leu Phe Ile Cys Val Gly Arg Asn Val Leu Thr Leu Leu Leu Phe			
420	425	430	
att gca aga gcg ttt att tct gga ggc ttt caa gcg gca tat gtt tac			1524
Ile Ala Arg Ala Phe Ile Ser Gly Gly Phe Gln Ala Ala Tyr Val Tyr			
435	440	445	
aca cct gag gtc tac ccc acg gca acg cgg gcc ctc ggc ctg ggc acc			1572
Thr Pro Glu Val Tyr Pro Thr Ala Thr Arg Ala Leu Gly Leu Gly Thr			
450	455	460	
tgc agc ggc atg gca aga gtg ggt gct ctc atc act ccg ttc atc gcc			1620
Cys Ser Gly Met Ala Arg Val Gly Ala Leu Ile Thr Pro Phe Ile Ala			
465	470	475	
cag gtg atg ctg gaa tcc tct gtg tac ctg act ctg gca gtt tac agt			1668
Gln Val Met Leu Glu Ser Ser Val Tyr Leu Thr Leu Ala Val Tyr Ser			
480	485	490	495
ggc tgc tgc ctc ctg gct gcc ctg gcc tcc tgc ttt ttg ccc att gag			1716
Gly Cys Cys Leu Leu Ala Ala Leu Ala Ser Cys Phe Leu Pro Ile Glu			
500	505	510	
acc aaa ggc gga gga ctg cag gag tcc agc cac cgg gag tgg ggc cag			1764
Thr Lys Gly Gly Gly Leu Gln Glu Ser Ser His Arg Glu Trp Gly Gln			
515	520	525	
gag atg gtc ggc cga gga atg cac ggt gca ggt gtt acc agg tcg aac			1812
Glu Met Val Gly Arg Gly Met His Gly Ala Gly Val Thr Arg Ser Asn			
530	535	540	
tct ggc tct cag gaa tag tgaccgatgg gggactgagc tggctctttga			1860
Ser Gly Ser Gln Glu *			
545			
ggctgcagag cttggggggc tggcaggccc caactggggc actgattgtc actgccgaca			1920
tcaagaactc acccaagagt atgacctgga ccaacagggt tttgtgtctt gactcagttt			1980
gctcatcttc attgagggtc acccagggat ggggagatgt ttgctctagg gggttctctg			2040
tatatgtggt gaaagctttg ttcataacct gtggatctac atgggaagac taccatatt			2100
aggagggtct ggtaatgcca gcaaccaatc agacaccacc cagagtcacc cggccaaacc			2160
ctcagtgaac aacccaaaata tctctctgta gataccgtcc aggetcaggc ccatgtgaca			2220
cctgctgtcc acccaccgga cctgttcagt aggtttctcc cacaccaca gccccaggct			2280

10

20

30

40

```

ttcttcttttg aaattgcagg cgatctaggt gtggtctgag cagctatttc ctggcagggg 2340
ccccccggtt tgcctcccta gagcctgacc agtggattct ctggcagatg gacatgggtgc 2400
attcaaatcg gagccacatg cccccaccca gccctntttg gagttgcccg ttgttggcac 2460
caagagatcc agatgtgtcc tggggacagc tgggtcttgc accaggtgac aacctcaaaa 2520

```

<210> 9
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 9

```

Met Glu Glu Asp Leu Phe Gln Leu Arg Gln Leu Pro Val Val Lys Phe
 1          5          10          15
Arg Arg Thr Gly Glu Ser Ala Arg Ser Glu Asp Asp Thr Ala Ser Gly
          20          25          30
Glu His Glu Val Gln Ile Glu Gly Val His Val Gly Leu Glu Ala Val
          35          40          45
Glu Leu Asp Asp Gly Ala Ala Val Pro Lys Glu Phe Ala Asn Pro Thr
          50          55          60
Asp Asp Thr Phe Met Val Glu Asp Ala Val Glu Ala Ile Gly Phe Gly
          65          70          75          80
Lys Phe Gln Trp Lys Leu Ser Val Leu Thr Gly Leu Ala Trp Met Ala
          85          90          95
Asp Ala Met Glu Met Met Ile Leu Ser Ile Leu Ala Pro Gln Leu His
          100          105          110
Cys Glu Trp Arg Leu Pro Ser Trp Gln Val Ala Leu Leu Thr Ser Val
          115          120          125
Val Phe Val Gly Met Met Ser Ser Ser Thr Leu Trp Gly Asn Ile Ser
          130          135          140
Asp Gln Tyr Gly Arg Lys Thr Gly Leu Lys Ile Ser Val Leu Trp Thr
          145          150          155          160
Leu Tyr Tyr Gly Ile Leu Ser Ala Phe Ala Pro Val Tyr Ser Trp Ile
          165          170          175
Leu Val Leu Arg Gly Leu Val Gly Phe Gly Ile Gly Gly Val Pro Gln
          180          185          190
Ser Val Thr Leu Tyr Ala Glu Phe Leu Pro Met Lys Ala Arg Ala Lys
          195          200          205
Cys Ile Leu Leu Ile Glu Val Phe Trp Ala Ile Gly Thr Val Phe Glu
          210          215          220
Val Val Leu Ala Val Phe Val Met Pro Ser Leu Gly Trp Arg Trp Leu
          225          230          235          240
Leu Ile Leu Ser Ala Val Pro Leu Leu Leu Phe Ala Val Leu Cys Phe
          245          250          255
Trp Leu Pro Glu Ser Ala Arg Tyr Asp Val Leu Ser Gly Asn Gln Glu
          260          265          270
Lys Ala Ile Ala Thr Leu Lys Arg Ile Ala Thr Glu Asn Gly Ala Pro
          275          280          285
Met Pro Leu Gly Lys Leu Ile Ile Ser Arg Gln Glu Asp Arg Gly Lys
          290          295          300
Met Arg Asp Leu Phe Thr Pro His Phe Arg Trp Thr Thr Leu Leu Leu
          305          310          315          320
Trp Phe Ile Trp Phe Ser Asn Ala Phe Ser Tyr Tyr Gly Leu Val Leu
          325          330          335
Leu Thr Thr Glu Leu Phe Gln Ala Gly Asp Val Cys Gly Ile Ser Ser
          340          345          350
Arg Lys Lys Ala Val Glu Ala Lys Cys Ser Leu Ala Cys Glu Tyr Leu
          355          360          365
Ser Glu Glu Asp Tyr Met Asp Leu Leu Trp Thr Thr Leu Ser Glu Phe
          370          375          380
Pro Gly Val Leu Val Thr Leu Trp Ile Ile Asp Arg Leu Gly Arg Lys

```

10

20

30

40

```

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

```

10

20

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 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/06	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A
/(C 1 2 Q 1/02	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 Q 1/02	
(C 1 2 Q 1/48	C 1 2 R 1:91	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 Q 1/48	Z
(C 1 2 Q 1/68	C 1 2 R 1:91	
C 1 2 R 1:91)	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 R 1:91	

(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 シロス - サンティアゴ, インマキュラーダ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 1 4, デル マー, デ マヨ ロード 2 1 2 3

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB12 GC15

4B024 AA01 AA11 CA04 HA12

4B063 QA01 QA18 QA20 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34
QX02

4C084 AA02 AA13 AA14 AA17 BA08 BA23 BA35 BA44 CA18 DB01
NA14 ZA012 ZA082 ZA362 ZB112 ZB262

4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 CC02 CC04 CC05 CC12 CC21
CC23 EE01

4C086 AA01 EA18 MA01 MA04 NA14 ZA08 ZA36 ZB11 ZB26 ZC02