

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4062551号
(P4062551)

(45) 発行日 平成20年3月19日(2008.3.19)

(24) 登録日 平成20年1月11日(2008.1.11)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	14/475	(2006.01)	C O 7 K 14/475
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-546989
(86) (22) 出願日	平成10年3月31日(1998.3.31)
(65) 公表番号	特表2001-526535(P2001-526535A)
(43) 公表日	平成13年12月18日(2001.12.18)
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/006324
(87) 国際公開番号	W01998/049296
(87) 国際公開日	平成10年11月5日(1998.11.5)
審査請求日	平成17年3月30日(2005.3.30)
(31) 優先権主張番号	60/044, 427
(32) 優先日	平成9年4月29日(1997.4.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/045, 157
(32) 優先日	平成9年4月30日(1997.4.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	リジェネロン ファーマシューティカルズ 、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059 1-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777
(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(72) 発明者	バレンズエラ, デイビッド エム. アメリカ合衆国 ニューヨーク 1101 O, フランクリン スクエア, グランジ ストリート 216

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトケルペロスタンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトケルペロスをコードする単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1 に記載のヒトケルペロスのコード領域からなるヌクレオチド配列；および

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、
からなる群より選択された配列を有する、単離された核酸分子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 3】

前記核酸分子が、宿主細胞においてその発現を指向し得る発現制御配列に作動可能に連結される、請求項 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

プラスミドである、請求項 2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 5】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する、単離されたヒトケルペロスタンパク質。

【請求項 6】

宿主細胞中に請求項 2、3 または 4 に記載のベクターを含む、ヒトケルペロスの産生のための、宿主-ベクター系。

【請求項 7】

10

20

前記宿主細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項6に記載の宿主 - ベクター系。

【請求項 8】

ヒトケルペロスを産生する方法であって、

該ヒトケルペロスの産生を可能にする条件下で、請求項6または7に記載の宿主 - ベクター系の細胞を増殖する工程、および

このように産生した該ヒトケルペロスを回収する工程を包含する、方法。

【請求項 9】

請求項5に記載のヒトケルペロスに特異的に結合する、抗体。

10

【請求項 10】

モノクローナル抗体である、請求項9に記載の抗体。

【請求項 11】

ポリクローナル抗体である、請求項9に記載の抗体。

【請求項 12】

請求項5に記載のヒトケルペロス、およびキャリアを含む、組成物。

【請求項 13】

請求項9、10、または11に記載の抗体、およびキャリアを含む、組成物。

【請求項 14】

請求項8に記載の方法によって産生される、ポリペプチド。

20

【請求項 15】

免疫グロブリン定常領域に融合した、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するヒトケルペロスを含む、リガンド体。

【請求項 16】

前記免疫グロブリン定常領域が、ヒト Ig G 1 の F c 部分である、請求項15に記載のリガンド体。

【発明の詳細な説明】

本国際出願は、1997年4月30日に提出された米国仮出願60/045,157および1997年4月29日に提出された米国仮出願60/044,427の優先権を主張する。本明細書に引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、各個々の刊行物、特許、または特許出願が、参考として援用されることが特別におよび個別に指示されるように、参考として本明細書に援用される。

30

序論

発明の分野

本発明の分野は、細胞機能を調節し、そして特に神経発生を誘導するか、または骨形成タンパク質に拮抗するタンパク質である。

背景

細胞増殖、分化、および機能の天然のレギュレーターは、重要な医薬、臨床的および実験室ツール、治療介入のための標的を提供した。種々のこのようなレギュレーターは、基本的な細胞分化および発生経路に深い効果を有することが示されている。例えば、最近クローニングされたXenopusケルペロスタンパク質は、脊椎動物胚の前部内胚葉における頭部構造の形成を誘導する。同様に、ノギン(noggin)タンパク質は、脊椎動物胚の頭部構造を誘導し、そして血液および間葉のような腹側発生運命から、筋肉および脊索のような背側発生運命まで中胚葉発生運命を向けなおし得、そして後部神経発生運命に表皮発生運命を向けなおし得る。コルディン(chordin)の活性は、ノギンの活性と類似であり、作用の普通のメカニズム - すなわち骨形成タンパク質(BMP)と拮抗し、それによってその機能を阻止すること - を反映する。BMPは、異なる生物学的状況で多様な生物学的活性を有し、これには、軟骨、骨、および結合組織の誘導、ならびに腎臓、歯、腸、皮膚、および髪の毛の発生における役割が含まれる。

40

TGF スーパーファミリーの異なるメンバーは、異なる発生運命に従うように細胞に指図

50

し得、例えば、TGF は、平滑筋を形成するように神経堤を誘導するが、BMP2は、同じ細胞を神経になるように誘導する。Xenopusの実験では、解離した動物キャップ (cap) 細胞 (予定外胚葉) は、BMP4に応答して表皮になるが、アクチビンに応答して中胚葉になる。アクチビンとBMP4との間の配列同一性は低いので、これらが異なる発生運命を誘導することは驚くべきことではない。配列に非常に密接した関連があるBMPスーパーファミリーのメンバーが、異なる発生運命を誘導し得ることは、より驚くべきことである。著しい例は、筋肉へBMPを浸透させた注入したマトリクスの移植から得る; 効果が組織学的にモニターされる場合、BMP2、4、および7は、軟骨内骨形成を誘導するが、関連分子のBMP12/GDF7は、腱に類似の結合組織を誘導する。同様に、BMP4は、菱脳神経堤で細胞死を誘導し得るが、関連タンパク質のドーサリンは誘導しない。

10

異なるBMPファミリーメンバーは、異なる発生運命を誘導し得るので、次いでBMPのサブセットのブロッキングにおいて特異性を有するBMPアンタゴニストは、細胞に提示されるBMPのバランスを変化し得、したがって細胞発生運命を変化させ得る。ヒト健康および疾患における相対的BMP発現の重要性の点で、細胞機能およびBMP機能のレギュレーター、特に例えばノギンおよびケルペロスは、臨床的およびバイオテクノロジーの適用の宿主とともに価値のある試薬を提供する。本発明は、細胞機能のレギュレーターの新しいファミリーに関する。

関連文献

Bouwmeester, T. ら (1996) Nature 382:595-601は、Xenopusケルペロス遺伝子のクローニングを記載し、そしてその生物学的活性を記載する他に、Xenopusケルペロスタンパク質の推定アミノ酸配列を提供する。Lamb, T.M. ら (1993) Science 262:713-718; Smith, W.C. ら (1992) Cell 70:829-840; Smith, W.C. ら (1993) Nature 361:547-549; および Zimmerman, L.B. ら (1996) Cell 86:599-606は、ノギンタンパク質の単離および機能を記載する。Piccolo, S. ら (1996) Cell 86:589-598, Sasai, Y. ら (1995) Nature 376:333-336、および Sasai, Y. ら (1994) Cell 79:779-790は、コルディンタンパク質に関する。Enomoto ら (1994) Oncogene 9:2785-2791 および Ozaki ら (1996) Jpn. J. Cancer Res. 87:58-61は、DAN遺伝子のヒトおよびマウスホモログを記載する。

20

発明の要旨

本発明は、ヒトケルペロスタンパク質および関連する核酸に関連する方法および組成物を提供する。ヒトケルペロスドメインを含みそしてヒトケルペロス特異的活性を有するタンパク質が含まれる。タンパク質は、本発明の核酸で形質転換された宿主細胞から組換え産生され得る。本発明は、特異的抗体のような結合薬剤、ならびに診断 (例えば、ヒトケルペロス転写物についての遺伝子ハイブリダイゼーションスクリーニング)、治療 (例えば、ヒトケルペロス遺伝子発現を調節するための遺伝子治療)、および生物薬剤学産業 (例えば、リード薬理学的薬剤について化学ライブラリーをスクリーニングするための試薬) において本発明の組成物を製造および使用する方法を提供する。

30

本発明のヒトケルペロスタンパク質に好ましい使用は、添加されたタンパク質が、培地の成分および/または細胞の生理機能に変化をもたらす細胞外表面と特異的に相互作用する条件下で、細胞または細胞周囲の培地を外因性ヒトケルペロスタンパク質と接触させることによって、細胞外表面を含む細胞の生理機能を改変することを含む。生物学的に活性な薬剤についてスクリーニングする方法も好ましく、この方法は、薬剤の存在がなければ、タンパク質が参照親和性で結合標的を特異的に結合する条件下で、細胞外ヒトケルペロスタンパク質特異的結合標的および候補薬剤の存在下でヒトケルペロスタンパク質をインキュベートする工程; 薬剤で偏った親和性を決定するために、結合標的に対するタンパク質の結合親和性を検出する工程であって、ここで薬剤で偏った親和性と参照親和性との間の差が、薬剤が結合標的へのタンパク質の結合を調節することを示す、工程を包含する。

40

【図面の簡単な説明】

図1 - レーン1でヒトBMP2へのヒトケルペロスの結合を示すウエスタンブロット。ヒトノギン欠失ミューテインの添加は、レーン2に示されるようなヒトBMP2へのヒトケルペロスの結合をブロックする。非特異的結合についてのコントロールはレーン3に示される。

50

発明の詳細な説明

本発明は、天然のヒトケルペロスタンパク質およびヒトケルペロスアミノ酸配列を含む組換えタンパク質、またはアッセイで識別可能なヒトケルペロス特異的活性を有するその機能的ヒトケルペロスタンパク質ドメインを含む、ヒトケルペロスタンパク質を提供する。したがって、タンパク質は、開示された天然のヒトケルペロスタンパク質の欠失変異体であり得、そして例えば、非ヒトケルペロスポリペプチドとの融合産物として提供され得る。本発明のヒトケルペロスタンパク質ドメインは、ヒトケルペロス特異的活性または機能を有し、そして互いにならびにb57、DAN、およびノギンとは機能的に異なる。

理論に結びつけずに、発明者らは、発現される場所、および胚におけるRNA注入の効果に基づくケルペロスの発生学的効果についての仮説を組み立てた。ケルペロスは、シュペーマン形成体で発現されるので、発明者らは、ケルペロスが神経誘導のようなシュペーマン形成体の効果のいくつかのメディエーターであると考え、ケルペロスは、心臓原基になる領域では発現されるので、発明者らは、ケルペロスが、神経板の背側 - 腹側パターンまたは前方 - 後方パターンのいずれかに影響を及ぼすと考える。カエルでは、ケルペロスは、最前部内中胚葉を占める。カエルにおけるケルペロスのこの局在した発現は、心臓原基を生じ得る。ケルペロスは腹側中胚葉を背方化し得ずそして腹方化したカエル胚での軸形成をレスキューしないが、セメント腺 (cement gland)、脳、および嗅板のような前方神経構造の形成を促進することが公知である。ケルペロスは、BMP-2およびBMP-4を直接結合しそしてそれらの生物学的活性を阻害することが示されているタンパク質であるb57への相同性を示す。この効果はまた、シュペーマン形成体でまた発現されそして神経外胚葉を誘導することが示されている、関連のないタンパク質のノギンによって媒介されることが示されている。推論によって、ケルペロスはまた、BMP活性の直接的インヒビターであり得、そしてこれは、その公知の生物学的効果を説明し得る。

ケルペロスについての多くの適用が、その特性から示唆される。ノギンおよびb57に類似の、ケルペロスは、心臓疾患および神経学的障害、ならびに異所性骨形成、軟骨または軟骨性プラークから生じるまたは含む病理学的症状の研究および処置に有用であり得る。さらに、ケルペロスcDNAは、細胞株におけるタンパク質についてのアッセイにおける抗体の使用、あるいはオリゴヌクレオチドプライマーに対する配列類似性を有するものを増幅するための、ならびにどれくらいのケルペロスが存在するかを知るための、PCRテストにおけるプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの使用を介する、診断ツールとして有用であり得る。もちろん、ヒトケルペロスの単離はまた、推定レセプター、他のケルペロス結合タンパク質を単離するための、および/またはそのアンタゴニスト特性を研究するため解決の鍵を提供する。

ヒトケルペロス特異的活性または機能は、便利なインビトロ、細胞ベースの、またはインビボアッセイ - 例えば、インビトロ結合アッセイ、細胞培養アッセイ動物で (例えば、免疫応答、遺伝子治療、トランスジェニックなど) などによって決定され得る。結合アッセイは、結合標的のヒトケルペロスタンパク質との特異的分子相互作用が上昇する任意のアッセイを包含する。結合標的は、天然結合標的、または抗体のような特異的免疫タンパク質のような非天然結合標的、または以下に記載のアッセイで同定されるもののようなヒトケルペロス特異的薬剤であり得る。一般的に、結合特異性は、バイオアッセイ (例えば、注入された胚外胚葉から神経組織を誘導する能力)、TGF タンパク質結合平衡定数 (通常は、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約 $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^9 M^{-1}$)、本発明のタンパク質が異種宿主 (例えば、齧歯類またはウサギ) においてヒトケルペロス特異的抗体を誘起する能力、ヒトケルペロス発現細胞においてネガティブ変異体として機能する能力などによって、アッセイされる。

本発明のタンパク質は、単離され得るかまたは純粋であり得る - 「単離された」タンパク質は、その天然状態で関連する物質のいくつかにもはや伴われず、および所定の試料中の総タンパク質の重量の好ましくは少なくとも約0.5%、およびより好ましくは少なくとも約5%を構成するものであり; 「純粋な」タンパク質は、所定の試料中の総タンパク質の重量の少なくとも約90%、および好ましくは少なくとも約99%を構成する。本発明のタン

10

20

30

40

50

パク質およびタンパク質ドメインは、合成されるか、組換え技術によって産生されるか、または細胞から精製され得る。種々の分子および生化学的方法は、本発明の組成物の生化学合成、分子発現、および精製に利用可能であり、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel編, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)を参照のこと。天然ヒトケルペロススタンパク質を単離する代表的方法は、cDNAライブラリー(例えば、Xenopus卵巣細胞に由来するもの)を発現させる工程、および胚軸形成について発現産物をアッセイする工程を包含する。ヒトケルペロススタンパク質を検出することに従うこの方法および他のバイオアッセイは、Lemaire, P.ら(1995) Cell 81:85-94; Smith, W.C.およびHarland, R.M.(1992) Cell 70:829-40; Smith, W.C.およびHarland, R.M.(1991) Cell 67:753-765; Piccolo, S.ら(1996) Cell 86:589-98; およびZimmerman, L.B.ら(1996) Cell 86:599-606に記載されている。

本発明のタンパク質は、免疫原、スクリーニングアッセイにおける標的、細胞増殖、分化、および/または機能を調節するための生物活性試薬などとしての使用を含む、種々の使用を見いだす。例えば、本発明は、添加されたタンパク質が、細胞の生理機能の変化をもたらすために培地および/または細胞外表面の成分と特異的に相互作用する条件下で、細胞または細胞の周囲の培地を外因性ヒトケルペロススタンパク質と接触されることによって、細胞外表面を含む細胞の生理機能を改変する方法を提供する。これらの方法によれば、細胞外表面は、形質膜結合レセプターを含み; 外因性ヒトケルペロスとは、細胞によって作成されないか、あるいは、そうであれば、非天然レベル、時間、または生理学的場所で発現されるタンパク質をいい; そして、適切な培地は、インビトロ培養培地、ならびに血液、滑液などのような生理学的液体を含む。本発明のタンパク質の効果的投与は、望ましくない(例えば、異所性)骨形成を減少し、形態形成タンパク質(例えば、BMP依存的神経芽種および神経膠腫)を必要とする細胞増殖を阻害し、移植または注入などのための細胞とのような、培養物中で形態形成因子依存的細胞発生運命/分化を変化させるために使用され得る。タンパク質は、マイクロインジェクション、組換え酵素のプロモーター特異的発現、脂質小胞の標的化送達などのような何らかの便利な方法によって、細胞の特異的集団に導入、発現、または抑制され得る。

本発明は、天然および非天然ヒトケルペロス特異的結合薬剤、このような薬剤を同定および製造する方法、ならびに診断、治療、および薬剤開発におけるそれらの使用を提供する。ヒトケルペロス特異的結合薬剤は、体性の組換えられたタンパク質レセプター様特異的抗体またはT細胞抗原レセプターのような、ヒトケルペロス特異的レセプターを含み(例えば、HarlowおよびLane(1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoryを参照のこと)、そしてまた、1、2、および3-ハイブリッドスクリーニングのようなアッセイで同定された他の天然結合薬剤、ならびに以下に記載のような化学ライブラリーのスクリーニングで同定された非天然結合薬剤を含む。特定の目的の薬剤は、ヒトケルペロス機能を調節する。

本発明は、ヒトケルペロス核酸を提供し、これは翻訳可能な転写物、ハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマー、診断核酸などとしての使用、ならびにヒトケルペロス遺伝子および遺伝子転写物の存在を検出することおよび追加のヒトケルペロスホモログおよび構造的アナログをコードする核酸を検出または増幅することにおける使用を含む、広範な適用を見いだす。

本発明の核酸は、合成/非天然配列であり、および/または単離され、すなわち、所定の画分に存在する総核酸の重量の好ましくは少なくとも約0.5%、より好ましくは少なくとも約5%を構成する、天然状態に関連する物質のいくつかにもはや伴われず、そして通常は組換えであり、これは、非天然配列または天然の染色体上で連結される配列以外のヌクレオチドに連結された天然配列を含むことを意味する。本明細書に開示されるヌクレオチド配列を含む核酸およびそのフラグメントは、天然の染色体上で連結される配列以外の配列にすぐに隣接した、または10kb以下、好ましくは2kb以下のもとのままのランキング領域に隣接した、このような配列またはフラグメントを末端に含み、天然の染色体上で連

10

20

30

40

50

結される配列以外の配列によってすぐに隣接する。核酸は通常RNAまたはDNAであるが、改変された安定性などを提供するために他の塩基またはヌクレオチドアナログを含む核酸を使用するために、しばしば有利である。

開示されたヒトケルペロスタンパク質のアミノ酸配列は、選択された発現系に最適化されたヒトケルペロスタンパク質をコードする核酸を翻訳し戻すために使用されるか (Hollerら (1993) Gene 136:323-328 ; Martinら (1995) Gene 154:150-166)、または天然ヒトケルペロスにコードする核酸配列の単離における使用のための縮重オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを生成するために使用される (「GCG」ソフトウェア、Genetics Computer Group, Inc., Madison, WI)。ヒトケルペロスをコードする核酸は、発現ベクターの一部であり得、そして例えば、発現およびスクリーニングのために、トランスジェニック動物のために、ヒトケルペロス媒介したシグナル伝達に関連する疾患のための候補薬物の効率のような機能的な研究などのために、組換え宿主細胞に組み込まれ得る。発現系は、代わりの翻訳後プロセッシングによってヒトケルペロスタンパク質構造のおよび機能的な改変をもたらすために選択および/または適合される。

本発明はまた、ヒトケルペロスcDNA特異的配列を有しおよび配列番号1との特異的ハイブリダイゼーションをもたらすために十分な、核酸ハイブリダイゼーションプローブおよび複製/増幅プライマーを提供する。特異的ハイブリダイゼーションを証明することは、一般的に、ストリンジェント条件を必要とし、例えば、42 °Cの温度にて5 × SSPE (0.18M NaCl, 0.01M NaPO₄, pH7.7, 0.001M EDTA) 緩衝液に30%ホルムアミドを含む緩衝液中でハイブリダイズし、そして0.2 × SSPEで42 °Cでの洗浄にかける場合に結合したままであり; 好ましくは、42 °Cの温度にて5 × SSPE緩衝液に50%ホルムアミドを含む緩衝液中でハイブリダイズし、そして42 °Cで0.2 × SSPE緩衝液で42 °Cでの洗浄にかける場合に結合したままであることである。ヒトケルペロスcDNAホモログはまた、BLASTXのようなアラインメントアルゴリズムを使用して他のタンパク質と区別され得る (Altschulら (1990) Basic Local Alignment Search Tool, J. Mol. Biol. 215:403-410)。

ヒトケルペロスハイブリダイゼーションプローブは、臨床的および実験室試料において野生型および変異体対立遺伝子を同定することにおける使用を見いだす。変異体対立遺伝子は、高い処理能力比の臨床診断のための対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) プローブを生成するために使用される。ヒトケルペロス核酸はまた、活性ヒトケルペロスの細胞発現または細胞内濃度または利用可能性を調節するために使用される。ヒトケルペロス阻害核酸は、代表的には、開示された天然ヒトケルペロスコード配列の相補物を含むアンチセンス一本鎖配列である。所定のヒトケルペロスタンパク質の発現のアンチセンス調節は、遺伝子調節配列に作動可能に連結されたアンチセンス核酸を用い得る。細胞は、遺伝子の転写が、内因性ヒトケルペロスをコードするmRNAに結合し得るアンチセンス転写物を得るように配向されたプロモーター配列とともにヒトケルペロス配列を含むベクターでトランスフェクトされる。アンチセンス核酸の転写は、構成的または誘導性であり得、そしてベクターは、安定な染色体外維持または組込みを提供し得る。あるいは、所定のヒトケルペロスタンパク質をコードするゲノムDNAまたはmRNAに結合する一本鎖アンチセンス核酸は、標的されたタンパク質の発現における実質的な減少を生じる濃度で、宿主中または宿主から一時的に単離された、標的細胞に投与され得る。ヒトケルペロス発現の富化は、対応する遺伝子産物の機能的な発現を増加させるヒトケルペロス核酸を、標的された細胞タイプに導入することによって行われる。このような核酸は、ヒトケルペロス発現ベクター、内因性対立遺伝子の機能的な発現をアップレギュレートするベクター、または変異体対立遺伝子の標的化修正のための置換ベクターであり得る。核酸を生存細胞に導入するための技法は当該技術分野で公知であり、そしてレトロウイルスベースのトランスフェクション、ウイルスコートタンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションなどを含む。

本発明は、ヒトケルペロス調節可能細胞機能のレベルで活性な薬剤について、薬剤、化合物、またはリード化合物を同定する効率的な方法を提供する。一般的に、これらのスクリーニング方法は、天然のヒトケルペロス結合標的とのヒトケルペロス相互作用を調節する化合物についてアッセイする工程を包含する。結合薬剤についての広範な種々のアッセイが

10

20

30

40

50

提供され、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、免疫アッセイ、細胞ベースのアッセイなどが含まれる。好ましい方法は、リード化合物についての化学ライブラリーの自動化された費用効果的な高い処理能力比のスクリーニングに従う。

インビトロ結合アッセイは、ヒトケルペロスタンパク質を含む成分の混合物を用い、これは、他のペプチドまたはポリペプチド、例えば、検出またはアンカーのためのタグなどとの融合産物の一部であり得る。アッセイ混合物は、天然のヒトケルペロス結合標的を含む。天然のままの結合標的が使用され得るが、その部分が、アッセイで便利に測定可能な本発明のヒトケルペロスに対する結合親和性およびアビディティを提供する限り、その部分を使用することが頻繁に好ましい。アッセイ混合物はまた、候補薬理学的薬剤を含む。候補薬剤は、多くの化学クラスを含むが、代表的には、これらは有機化合物、好ましくは小有機化合物であり、そして合成または天然化合物のライブラリーを含む広範な種々のソースから得られる。塩、緩衝液、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、デタージェント、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤などのような種々の他の薬剤も含まれ得る。混合物成分は、必須の結合剤を提供する任意の順で添加され得、そしてインキュベーションは、最適な結合を容易にする任意の温度で行われ得る。混合物は、候補薬理学的薬剤の存在がなければ、ヒトケルペロスが、参照結合親和性で細胞結合標的、その一部、またはアナログを特異的に結合する条件下で、インキュベートされる。インキュベーション期間は、最適結合について選択されるが、また、迅速な高い処理能力比スクリーニングを容易にするために最小にされる。

インキュベーション後、ヒトケルペロスと1つ以上の結合標的との間の薬剤で偏った結合は、任意の便利な方法によって検出される。無細胞結合タイプアッセイについて、分離工程は、しばしば、結合していない成分から結合したものを分離するために使用される。分離は、沈殿、固定化など、次いで例えば、メンブラン濾過またはゲルクロマトグラフィーによる洗浄によって行われ得る。無細胞結合アッセイについては、成分の1つは、通常、標識を含むかまたはカップリングされる。標識は、放射活性、発光、光学、または電子密度などのような直接的検出、またはエピトープタグ、酵素などのような間接的検出を提供し得る。種々の方法は、例えば、光学または電子密度、放射性放出、非放射性エネルギー転移による、標識および他のアッセイ成分の性質に依存して標識を検出するために使用され得、あるいは抗体結合体などで間接的に検出され得る。薬剤の存在下での結合親和性と比較して、薬剤の不在下で標的に対するヒトケルペロスタンパク質の結合親和性の差は、薬剤が対応する結合標的へのヒトケルペロスタンパク質の結合を調節することを示す。本明細書で使用される場合、差は、統計学的に有意であり、そして好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも90%差を示す。

本発明は、培地と接触して細胞外表面を含む細胞の生理機能を改変する方法を提供し、この方法は、タンパク質が、細胞の生理機能の変化をもたらすように、培地の成分および細胞外表面の少なくとも1つと特異的に相互作用する条件下で、外因性ヒトケルペロスタンパク質と培地とを接触させる工程を包含する。

本発明はさらに、生物学的に活性な薬剤についてスクリーニングする方法を提供し、この方法は、a) 薬剤の存在がなければ、タンパク質が、参照親和性で結合標的に特異的に結合する条件下で、細胞外ヒトケルペロスタンパク質特異的結合標的および候補薬剤の存在下でヒトケルペロスタンパク質をインキュベートする工程;b) 薬剤で偏った親和性を決定するために、この結合標的に対するこのタンパク質の結合親和性を検出する工程であって、薬剤で偏った親和性と参照親和性との間の差が、この薬剤がこの結合薬剤へのこのタンパク質の結合を調節することを示す、工程、を包含する。

本発明の1つの実施態様は、本明細書に記載のアミノ酸配列を含む単離されたヒトケルペロスタンパク質またはヒトケルペロス特異的活性を有するそのフラグメントである。

本発明の他の実施態様は、本明細書に記載のアミノ酸配列を含むヒトケルペロスタンパク質またはヒトケルペロス特異的活性を有するそのフラグメントをコードする組換え核酸である。

さらに他の実施態様は、本明細書に記載のヌクレオチド配列を含む単離された核酸、また

10

20

30

40

50

は少なくとも18の連続した塩基を有しそして天然のヒトケルペロスcDNAの存在下で本明細書に記載の配列を有する核酸と特異的にハイブリダイズするために十分なそのフラグメントである。

出願人は、BMPへの結合についてヒトケルペロスと競合し得る分子についてスクリーニングする方法を発明し、この方法は、a) ヒトケルペロスがBMPに結合し得る条件下で、ヒトケルペロスの存在下で、BMPを有する分子を含む疑いがある試料をBMPと接触させる工程；およびb) 分子のBMPへの結合を検出する工程を包含する。

好ましい実施態様では、ヒトケルペロスは、検出可能に標識され、そして、放射性物質、蛍光物質、酵素活性を有する物質、酵素の基質として作用し得る物質（比色分析で検出可能な反応に関連する酵素および基質が好ましい）に、または好ましくは検出可能に標識された抗体分子である抗体分子によって認識され得る物質に、共有または非共有結合したヒトケルペロスを含むが、これらに限定されない。

限定していない実施例によって、この方法は、概念的にELISAアッセイに類似するアッセイによって行われ得る。例えば、BMPは、プラスチックマルチウェルプレートのような固体支持体に結合され得る。コントロールとして、ヒトケルペロスBMP結合ドメインを含みそしてMycタグ付けされている既知量の分子は、次いでウェルに導入され得、そしてBMPを結合する任意のタグ付けされた分子は、次いで、Mycタグに対して配向されたりポーター抗体によって同定され得る。次いで、このアッセイシステムは、i) タグ付けした分子に結合し、またはii) BMPに結合しそしてそれによってタグ付けした分子によってBMPへの結合をブロックし得る分子について、テスト試料をスクリーニングするために使用され得る。例えば、ヒトケルペロスBMP結合ドメインを含む既知量のタグ付けした分子とともに目的の推定分子を含むテスト試料は、ウェルに導入され得、そしてBMPに結合するタグ付けした分子の量が測定され得る。テストウェル中の結合したタグ付けした分子の量をコントロールウェル中の量と比較することによって、BMPに結合するタグ付けした分子をブロックし得る分子を含む試料が同定され得る。このように同定された目的の分子は、当業者に周知の方法を使用して単離され得る。

一旦BMP結合のブロッカーが見いだされると、当業者にとって、ブロッカーがタグ付けした分子にまたはBMPに結合しているかどうかを決定するための二次アッセイ、ならびにブロッカー分子が結合した分子の生物学的活性を中和し得るかどうかを決定するアッセイを行うことが公知である。

本発明はまた、例えば、診断適用においてタンパク質の検出に有用である、本発明に記載のヒトケルペロスタンパク質に対する抗体を提供する。このヒトケルペロスタンパク質を指向するモノクローナル抗体の調製について、培養物中での連続的細胞株によって抗体分子の産生を提供する任意の技法が使用され得る。例えば、KohlerおよびMilstein (1975, *Nature* 256:495-497) によって最初に開発されたハイブリドーマ技法、ならびにトリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kozborら, 1983, *Immunology Today* 4:72)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技法 (Coleら, 1985, 「*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*」, Alan R. Liss, Inc. 77-96頁) などは、本発明の範囲内である。

診断または治療使用のためのモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体またはキメラヒト-マウス（または他の種）モノクローナル抗体であり得る。ヒトモノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の多くの技法のいずれかによって作成され得る（例えば、Tengら, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:7308-7312；Kozborら, 1983, *Immunology Today* 4:72-79；Olssonら, 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16）。ヒト定常領域とともにマウス抗原結合ドメインを含むキメラ抗体分子が調製され得る (Morrisonら, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851、Takedaら, 1985, *Nature* 314:452)。

当該技術分野で公知の種々の手順は、本明細書に記載のヒトケルペロスタンパク質のエピトープに対するポリクローナル抗体の産生のために使用され得る。抗体の産生のために、種々の宿主動物が、ヒトケルペロスタンパク質、またはそのフラグメントもしくはその誘導体の注射によって免疫投与され得、この宿主動物にはウサギ、マウス、およびラットが

10

20

30

40

50

挙げられるが、これらに限定されない。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてフロイントアジュバント（完全および不完全）、無機ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン）、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント（例えば、BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) および *Corynebacterium parvum*) を含むが、これらに限定されない。

分泌されたヒトケルペロスタンパク質エピトープに対する抗体の分子クローンは、公知の技法によって調製され得る。組換えDNA方法論（例えば、Maniatisら, 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと）は、モノクローナル抗体分子、またはその抗原結合領域をコードする核酸配列を構築するために使用され得る。

本発明は、抗体分子ならびにこのような抗体分子のフラグメントを提供する。分子のイデオタイプを含む抗体フラグメントは、公知の技法によって生成され得る。例えば、このようなフラグメントには：抗体分子のペプシン切断によって生成され得る $F(ab')_2$ フラグメント； $F(ab')_2$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得る Fab' フラグメント；および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって生成され得る Fab フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。抗体分子は、公知の技法、例えば、免疫吸着または免疫アフィニティークロマトグラフィー、HPLC（高液体クロマトグラフィー）のようなクロマトグラフ方法、またはそれらの組み合わせによって、精製され得る。

本発明はさらに、骨形成タンパク質（BMP）の活性のアンタゴニストとしてヒトケルペロスタンパク質またはそのフラグメントを使用する方法を提供する。好ましくは、本発明は、骨形成タンパク質（BMP）の機能を拮抗する方法を提供し、これは、このBMPをヒトケルペロスタンパク質またはそのフラグメントと接触させる工程を包含する。本発明の方法は、ヒトケルペロスまたはそのフラグメントがBMPに結合する条件下で行われる。本発明のさらに好ましい実施態様では、ヒトケルペロスまたはそのフラグメントは、BMP2またはBMP4の機能を拮抗するために使用される。

BMPに対するアンタゴニストは、動物、特にヒトのBMP関連障害を予防および処置するために有用であり得る。従って、本発明の目的は、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトにおける疾患状態において、BMPの機能を効果的に拮抗する物質を同定することであった。本発明の他の目的は、BMPを阻害する新規化合物を調製することであった。本発明のさらに他の目的は、哺乳動物における疾患状態においてBMPの機能を拮抗する方法を開発することであった。本発明の目的はまた、BMPの機能に関連する障害を予防または処置する方法を開発することであった。

正常な骨形成における役割の他に、BMPは、異常な骨成長を促進する疾患に関連するようである。例えば、BMPは、患者が任意の運動を妨げる異常な「二次骨格」を生長させる、進行性骨化性線維形成異常症（FOP）として公知の疾患の原因となる役割を果たすことが報告されていた。

従って、本発明の目的は、進行性骨化性線維形成異常症（FOP）を含むが、これらに限定されない疾患または障害の処置のための新規分子を提供することである。ヒトケルペロスはBMPを結合するので、この疾患のための治療薬剤としての希望を提供する。さらに、異常な骨成長は、股関節置換手術後に発生し得、従って手術結果を悪くする。これは、病理学的骨成長およびヒトケルペロスのようなBMPのバインダーが治療的に有用であり得る状況のより一般的な例である。ヒトケルペロスはまた、外傷、火傷、または脊髄損傷後の骨の病理学的成長のような、異常な骨成長の他の形態を処置するために有用であり得る。さらに、ヒトケルペロスは、転移性前立腺ガンまたは骨肉腫と関連して見られる異常な骨成長と関連したBMPの望ましくない作用を処置または予防するために有用であり得る。

さらなる実施態様では、本発明のヒトケルペロス核酸、タンパク質、フラグメント、およびペプチドは、哺乳動物においてBMP活性を拮抗するために使用され得る。

10

20

30

40

50

本発明はまた、本明細書に記載のようなヒトケルペロス分子および適切なキャリアを含む組成物を提供する。ヒトケルペロスを含み得る活性成分は、注射（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、神経内、神経周囲、脊髄内、室内、硝子体内、鞘内など）を含むがこれらに限定されない任意の適切な経路によって、上皮または粘膜皮膚裏層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を介する吸収によって、あるいは持続放出移植（細胞または組織移植を含む）によって、インビボで全身または局所投与のために適切なキャリア中で処方されるべきである。

投与の態様に依存して、活性成分は、生理食塩水のような液体キャリア中で処方され得るか、リポソーム、マイクロカプセル、ポリマー、またはワックスペースおよび制御放出調製物中に組み込まれ得るか、あるいは錠剤、丸剤、またはカプセル形態に処方され得る。処方物に使用される活性成分の濃度は、必要とされる有効用量および使用される投与の態様に依存する。使用される用量は、有効な活性成分の循環血漿濃度を達成するために十分であるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデルテストシステムに由来する用量 - 応答曲線から外挿され得る。

以下の実施例は、説明の目的で提供され、そして限定の目的ではない。

実施例 1 - ヒトケルペロス遺伝子のクローニングおよび配列決定

ヒトゲノムライブラリー (Genome Systems, Inc.-Human release II BAC-4435) を、マウスESTクローン (GenBank登録番号AA120122; クローン番号538769) からPCRによって得られる約314ヌクレオチド長のマウスプローブにハイブリダイズさせた。マウスプローブにハイブリダイズするヒトクローンからのDNAを、制限酵素で切断し、サザンブロットし、そしてハイブリダイズさせた。マウスプローブにハイブリダイズするDNAフラグメントを精製し、次いで市販のクローニングキット (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen Cat# K2700-20) を使用してサブクローニングし、そしてABI 373A DNAシーケンサーおよびTaqジデオキシターミネーターサイクル配列決定キット (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) を使用して配列決定した。得られた配列は、170位のアミノ酸トレオニンから始まり停止コドンを越える点までのポリペプチドをコードするヒトケルペロスのセグメントに対応した (配列番号2を参照のこと)。次いで、RACE手順を使用して、以下のように全長ヒトケルペロスヌクレオチド配列を得た。オリゴヌクレオチドを、部分ヒト配列に基づいて設計し、そして逆転写酵素反応およびPCRのためのプライマーとして使用した。約1.2Kbフラグメントを単離し、そして配列決定し、そしてヒトケルペロス配列の残りを

実施例 2 - ヒトケルペロス (hCer) 発現プラスミドpRG629の構築

hケルペロスについての遺伝子をコードするDNAフラグメントを、プライマーN1-hCer (5'-AAACATGATGCAGGATGGCCGCCAG-3') およびC1-hCer (5'-GAGAGCGCCGCTCATTAAGCTGAAACTCCTGGATAAAGGAATCCTGGG-3') を使用してpMT21.hCer.FcからPCR増幅した。得られる769bpフラグメントを、Not1で切断し、次いでカナマイシン耐性についての遺伝子をコードする高コピーベクターのpRG461のPme 1-Not 1部位にライゲートした。このベクターは、Pme1部位に挿入された遺伝子の転写を指向するファージT7 1.1プロモーターを含む。pRG461を、Regeneronで構築した。クローンを同定し、そしてpRG629と命名し、構築物をDNA配列分析によって確認し、次いでエレクトロポレーションによってE.coli株RFJ143に形質転換した。RFJ143は、Regeneronで構築されたE.Coli株であり、そして本質的にE.coli K12株W3110 lacIQ ZpL8 Z+Y+fhuA 322-405 ara (DE3) である。

実施例 3 - ヒトケルペロスタンパク質の精製

pRG629を含むE.coli株RFJ143を、LB培地 (Difco) 中で増殖させ、そしてhケルペロスの発現を、1mM IPTGの添加によって誘導した。誘導した細胞を遠心分離によって収集し、10容量の100mM Tris-HCl, pH 8.5、20mM EDTAに再懸濁し、そしてNiro-Soave Panda細胞破碎機 (Niro-Soave) の通過によって溶解して、封入体を放出した。細胞ライセートを、遠心分離し、そしてペレットを、10容量の6Mグアニジニウム-HCl、100mM Tris-HCl, pH 8.5

10

20

30

40

50

、10mM EDTA、100mM Na₂SO₃、10mM Na₂S₄O₆に再懸濁し、そして室温にて16時間攪拌した。溶解した封入体を、8M尿素、50mM Tris-HCl、pH 8.0、200mM NaCl、1mM EDTAで平衡化したSephacryl S-300カラム (Pharmacia) で分画した。hケルベロスを含む画分をプールし、4容量の6M尿素、20mM MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、pH 6.0で希釈し、次いで6M尿素、20mM MES、pH 6.0で平衡化したSP-Sepharose (Pharmacia) カラムにロードし、そして6M尿素、20mM MES、pH 6.0においてNaClの直線勾配でカラムから溶出した。精製したケルベロスを、3.5M尿素、50mM Tris-HCl、pH 8.5、0.1mM EDTA、0.5mMシステインに対して10容量の緩衝液での希釈によってリフォールディングし、次いで4にてインキュベーションを行った。2日のインキュベーション後、リフォールディング混合物を、4M尿素、50mM Tris-HCl、pH 9.5、0.1mM EDTA、20%グリセロールで平衡化したQ-Sepharoseカラム (Pharmacia) にロードし、そして同じ緩衝液での直線NaClグラジエントで溶出した。hケルベロスを含む画分をプールし、そして20mM Tris-HCl、pH 8.0、150mM NaCl、0.1mM EDTAに対して透析した。透析物を0.1%TFAで酸性にし、0.1%TFA、10%アセトニトリルで平衡化したJupiter C5カラム (Phenomenex) にロードし、1.3%/分で30%から50%まで増加するアセトニトリルグラジエントで溶出した。hケルベロスを含む画分をプールし、減圧下で乾燥し、次いで20mM Tris-HCl、pH 8.0、150mM NaCl、0.1mM EDTAに再懸濁した。

10

実施例 4 - ヒトケルベロスがヒトBMP2に結合する証明

E.coliで発現されそしてリフォールディングされるヒトケルベロス (1µg/ml) を、ヒトノギンタンパク質 (hNG B2、2µg/ml) の不在または存在下でhBMP2 (1µg/ml) とともに同時インキュベートした。ヒトノギンは、高い親和性でBMP2と結合する。hNG B2は、ヒトノギンと同一の生物学的活性を示すがヘパリンへの減少した結合を有するヒトノギンの欠失ムテインである。従って、ノギン (hNG B2) の添加は、過剰のノギンがhCERおよびBMP2を越えて添加されるならば、hCERのBMP2への結合を阻害するべきである。

20

hCERとBMPとの間の安定な複合体の形成を、プロテインG-セファロースビーズ (Pharmacia) に結合した抗hCER抗血清を使用するhCERおよび関連タンパク質を免疫沈降することによって決定した。結合反応を、20mM Tris pH 7.6、150mM NaCl、0.1% Tween 20 (TBST)、1mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) から構成される結合緩衝液で行った。結合を、懸濁液中にプロテインG-セファロースを保つために連続混合しながら、1mlの反応容量で、25にて1時間進行させ、その後の時点で、ビーズを遠心分離で落とし、TBSTで1回洗浄し、新しいエッペンドルフチューブに移動させ、次いでTBSTで3回以上洗浄した。ビーズに結合したタンパク質を、25µlのLaemmli SDS-PAGE試料緩衝液の添加によって溶解し (Sambrookら -A Cloning Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)、4~12% NuPAGE/MESグラジエントゲル (Novex) にロードし、そして還元条件下で泳動した。タンパク質を、その後Immobilon P (Millipore) に移し、そしてそれぞれのタンパク質に対して惹起したポリクローナル抗血清を使用して、BMP2またはBMP4の存在についてウエスタンブロットした。図1に示され得るように、hCERは、hBMP2に結合する (レーン1)。hNG B2の添加は、hBMP2に結合しそしてhCERに結合する能力をブロックすることによって、この相互作用をブロックする (レーン2)。これは、hBMP2においてhCERによって認識されるエピトープが、ノギンによって認識されるエピトープと同じまたは重複するか、あるいはBMP2およびBMP4へのノギンの結合が、hCERの結合を立体障害することを示す。hCERが反応から除外されるならば、hBMP2のビーズへの結合はなく (レーン3)、これはhBMP2のビーズへの非特異的結合がないこと、および観察される結合がhCER依存的であることを示す。hCERのBMP4との相互作用を試験した場合、ならびにまたhCER-FLAG、hCER-myc、およびhCER-FcのようなhCERの種々のタグ付けした形態を使用した場合に、同一の結果が得られていることに留意すべきである。タグ付けした形態は、標準的遺伝子操作技法 (例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NYを参照のこと) を使用して産生され得る。

30

40

実施例 5 - ヒトケルベロスの組織発現

50

本発明者らは、異なる成人ヒト組織から調製したポリA+mRNAの分析によってヒトケルペロスの発現を試験した。表1は、テストした組織、およびこれらの組織において検出されたhケルペロスの発現の相対的レベルを挙げる。

表1

<u>組織</u>	<u>hCERの発現の相対的レベル</u>
心臓	検出不可能
脳	検出不可能
胎盤	検出不可能
肺	検出不可能

肝臓	検出不可能	
骨格筋	検出不可能	
腎臓	検出不可能	
膵臓	検出不可能	
脾臓	検出不可能	
胸腺	検出不可能	
前立腺	検出不可能	10
精巣	検出不可能	
卵巣	検出不可能	
小腸	中程度	
結腸（粘膜裏層）	低い	
末梢血リンパ球	検出不可能	
胃	高い	20
甲状腺	非常に低い	
脊髄	非常に低い	
リンパ節	中程度	
気管	検出不可能	
副腎	検出不可能	
骨髄	検出不可能	
骨格（筋肉のみ）	検出不可能	30
子宮（内膜なし）		
（筋肉のみ）	低い	
結腸（粘膜なし）		
（筋肉のみ）	非常に低い	
小腸（筋肉のみ）	高い（スクリーニングしたすべての組織のうち最高）	
膀胱（筋肉のみ）	検出不可能	40
心臓（筋肉のみ）	検出不可能	
胃（筋肉のみ）	高い	
前立腺（筋肉のみ）	検出不可能	

参考文献：

Bouwmeester, T., Kim, S. H., Sasai, Y., Lu, B., and De, R. E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.

Furuta, Y., Piston, D. W., and Hogan, B. L. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124, 2203-12.

10

Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G., and Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-95.

Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De, R. E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.

20

Smith, W. C., and Harland, R. M. (1992). Expression cloning of noggin a new dorsalizing factor localized to the spemann organizer in *xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-840.

Zimmerman, L. B., Jesus, E. J. M. D., and Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.

30

上記の本発明は理解の明確さの目的で例示および実施例によって詳細に説明しているが、添付の請求の範囲の意図または範囲を逸脱することなく、ある変化および改変が行われ得ることは、本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかである。

ヒトケルベロスヌクレオチド配列 - 配列番号 1

10 20 30 40 50 60
 .ATG CAT CTC CTC TTA TTT CAG CTG CTG GTA CTC CTG CCT CTA GGA AAG ACC ACA CGG CAC CAG GAT
 70 80 90 100 110 120 130
 GGC CGC CAG AAT CAG AGT TCT CTT TCC CCC GTA CTC CTG CCA AGG AAT CAA AGA GAG CTT CCC ACA
 140 150 160 170 180 190
 GGC AAC CAT GAG GAA GCT GAG GAG AAG CCA GAT CTG TTT GTC GCA GTG CCA CAC CTT GTA GCC ACC
 200 210 220 230 240 250 260
 AGC CCT GCA GGG GAA GGC CAG AGG CAG AGA GAG AAG ATG CTG TCC AGA TTT GGC AGG TTC TGG AAG
 270 280 290 300 310 320 330
 AAG CCT GAG AGA GAA ATG CAT CCA TCC AGG GAC TCA GAT AGT GAG CCC TTC CCA CCT GGG ACC CAG
 340 350 360 370 380 390
 TCC CTC ATC CAG CCG ATA GAT GGA ATG AAA ATG GAG AAA TCT CCT CTT CCG GAA GAA GCC AAG AAA
 400 410 420 430 440 450 460
 TTC TGG CAC CAC TTC ATG TTC AGA AAA ACT CCG GCT TCT CAG GGG GTC ATC TTG CCC ATC AAA AGC
 470 480 490 500 510 520
 CAT GAA GTA CAT TGG GAG ACC TGC AGG ACA GTG CCC TTC AGC CAG ACT ATA ACC CAC GAA GGC TGT
 530 540 550 560 570 580 590
 GAA AAA GTA GTT GTT CAG AAC AAC CTT TGC TTT GGG AAA TGC GGG TCT GTT CAT TTT CCT GGA GCC
 600 610 620 630 640 650 660
 GCG CAG CAC TCC CAT ACC TCC TGC TCT CAC TGT TTG CCT GCC AAG TTC ACC ACG ATG CAC TTG CCA
 670 680 690 700 710 720
 CTG AAC TGC ACT GAA CTT TCC TCC GTG ATC AAG GTG GTG ATG CTG GTG GAG GAG TGC CAG TGC AAG
 730 740 750 760 770 780 790
 GTG AAG ACG GAG CAT GAA GAT GGA CAC ATC CTA CAT GCT GGC TCC CAG GAT TCC TTT ATC CCA GGA

10

20

30

800
GTT TCA GCT TGA

ヒトケルベロスアミノ酸配列 - 配列番号 2

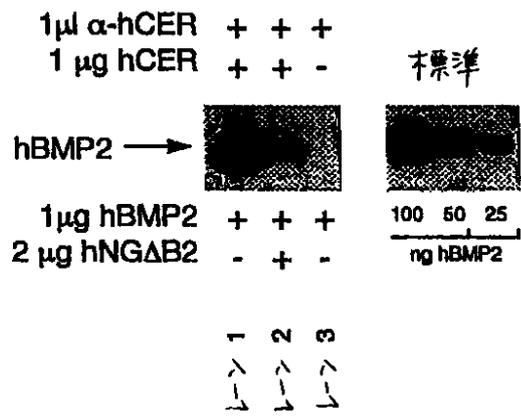
10 20
 Met His Leu Leu Leu Phe Gln Leu Leu Val Leu Leu Pro Leu Gly Lys Thr Thr Arg His Gln Asp
 30 40
 Gly Arg Gln Asn Gln Ser Ser Leu Ser Pro Val Leu Leu Pro Arg Asn Gln Arg Glu Leu Pro Thr
 50 60
 Gly Asn His Glu Glu Ala Glu Glu Lys Pro Asp Leu Phe Val Ala Val Pro His Leu Val Ala Thr
 70 80
 Ser Pro Ala Gly Glu Gly Gln Arg Gln Arg Glu Lys Met Leu Ser Arg Phe Gly Arg Phe Trp Lys
 90 100
 Lys Pro Glu Arg Glu Met His Pro Ser Arg Asp Ser Asp Ser Glu Pro Phe Pro Pro Gly Thr Gln
 120 130
 Ser Leu Ile Gln Pro Ile Asp Gly Met Lys Met Glu Lys Ser Pro Leu Arg Glu Glu Ala Lys Lys
 140 150
 Phe Trp His His Phe Met Phe Arg Lys Thr Pro Ala Ser Gln Gly Val Ile Leu Pro Ile Lys Ser
 160 170
 His Glu Val His Trp Glu Thr Cys Arg Thr Val Pro Phe Ser Gln Thr Ile Thr His Glu Gly Cys
 180 190
 Glu Lys Val Val Val Gln Asn Asn Leu Cys Phe Gly Lys Cys Gly Ser Val His Phe Pro Gly Ala
 200 210
 Ala Gln His Ser His Thr Ser Cys Ser His Cys Leu Pro Ala Lys Phe Thr Thr Met His Leu Pro
 230 240
 Leu Asn Cys Thr Glu Leu Ser Ser Val Ile Lys Val Val Met Leu Val Glu Glu Cys Gln Cys Lys
 250 260
 Val Lys Thr Glu His Glu Asp Gly His Ile Leu His Ala Gly Ser Gln Asp Ser Phe Ile Pro Gly
 267
 Val Ser Ala

40

50

【 図 1 】

Figure 1



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 A
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 0 7 K	16/22 (2006.01)	C 0 7 K	16/22
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08

(72)発明者 ロジャス, エドゥアルド エイ.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10605, ホワイト プレインズ, ロングビュー アベニュー
 39, アpartment 304

(72)発明者 エコノミデス, アリス エヌ.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10027, ニューヨーク, マウント モリス パーク ウェスト
 12

(72)発明者 スタール, ニール イー.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10512, カーメル, ケント ショアー ドライブ, アール.
 デー. ナンバー10

審査官 中村 正展

(56)参考文献 国際公開第99/001553 (WO, A1)
 Dev. Biol., 1998年 2月, vol. 194, 135-151
 Mech. Dev., 1997年11月, vol. 68, 45-57
 Nature, 1996年, vol. 382, 595-601

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
 C07K 14/475
 C07K 16/22
 C07K 19/00
 C12N 1/00 - 1/38
 C12N 5/10
 C12P 21/02
 C12P 21/08
 JSTPlus(JDream2)
 PubMed
 BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)
 CA/DISSABS(STN)
 WPIDS(STN)
 SCISEARCH/CONFSCI(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/PDB/Geneseq