

(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2008-517616

(P2008-517616A)

(43) 公表日 平成20年5月29日 (2008.5.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/745 (2006.01)	C O 7 K 14/745	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 B O 6 3
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 148 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-538515 (P2007-538515)	(71) 出願人	504238862
(86) (22) 出願日	平成17年10月28日 (2005.10.28)		アレス トレイディング ソシエテ アノ ニム
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月26日 (2007.6.26)		スイス ツェーハー 1 1 7 0 オーボンヌ ゾーマ アンデュストリエル ド ルー リエッタ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2005/004191		
(87) 国際公開番号	W02006/046072	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開日	平成18年5月4日 (2006.5.4)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	0423974.5	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成16年10月28日 (2004.10.28)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 vWFA及び／又はANT_IGドメイン含有タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、本明細書においてフォン・ウィルブランド因子A (vWFA) 及び炭疽レセプター細胞外 (ANT_IG) ドメインを含む炭疽レセプター様タンパク質として同定された新規なタンパク質 (本明細書ではINSP141、INSP142、INSP143及びINSP144と称される)、並びに疾患の診断、予防及び治療におけるこれらタンパク質及びコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:146及び/又は配列番号:148に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物であるポリペプチド。

10

【請求項 2】

(i) 配列番号:24、配列番号:128又は配列番号:132に示すアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド、

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する請求項1に記載のポリペプチド；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物。

【請求項 3】

(i) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:146及び/又は配列番号:148に示すアミノ酸配列から成るか；

20

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するか；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物である、請求項1又は2に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

(i) 配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:136、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

30

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物。

【請求項 5】

(i) 配列番号:52又は配列番号:156に示すアミノ酸配列を含むか、

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するか；又は

40

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物である、請求項4に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

(i) 配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:136、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列から成るか；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチド

50

チドと共通の抗原決定基を有するか；又は

(iii) (i) 又は (ii) 記載のポリペプチドの機能的等価物である、
請求項4又は5に記載のポリペプチド。

【請求項7】

(i) 配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；又は

(iii) (i) 又は (ii) 記載のポリペプチドの機能的等価物。

【請求項8】

(i) 配列番号:90、配列番号:137又は配列番号:141に示すアミノ酸配列を含むか、

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するか；又は

(iii) (i) 又は (ii) 記載のポリペプチドの機能的等価物である、
請求項7に記載のポリペプチド。

【請求項9】

(i) 配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を含むか；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するか；又は

(iii) (i) 又は (ii) 記載のポリペプチドの機能的等価物である、
請求項7又は8に記載のポリペプチド。

【請求項10】

(i) 配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:146及び/又は配列番号:148に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；又は

(iii) (i) 又は (ii) 記載のポリペプチドの機能的等価物。

【請求項11】

(i) 配列番号:126に示すアミノ酸配列を含むか、

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するか；又は

(iii) (i) 又は (ii) 記載のポリペプチドの機能的等価物である、
請求項10に記載のポリペプチド。

【請求項12】

(i) 配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号

10

20

30

40

50

号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:146及び/又は配列番号:148に示すアミノ酸配列を含むか；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する(i)記載のポリペプチドの断片であるか、又は(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するか；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物である、

請求項10又は11に記載のポリペプチド。

【請求項13】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148又は配列番号:150に示すアミノ酸配列と相同であり、さらにvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質であることを特徴とする、請求項1から12のいずれかの(iii)に記載の機能的等価物であるポリペプチド。

10

20

【請求項14】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148若しくは配列番号:150に示すアミノ酸配列又はその活性な断片と50%を超える配列同一性、好ましくは60%、70%、80%、90%、95%、98%又は99%を超える配列同一性を有する、請求項1から13のいずれか1項記載の断片又は機能的等価物であるポリペプチド。

30

40

【請求項15】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配

50

列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドと有意な構造的相同性を示す、請求項1から14のいずれか1項記載の機能的等価物であるポリペプチド。

【請求項 1 6】

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148又は配列番号:150に示すアミノ酸配列に由来する7つ以上のアミノ酸残基から成る、請求項1、4、7、10又は13のいずれかの(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、請求項1から14に記載の断片であるポリペプチド。

【請求項 1 7】

請求項1から16のいずれか1項記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 1 8】

INSP141、INSP142、INSP143の細胞外部分、又は、INSP144の細胞外部分を含む、請求項17に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 9】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする精製核酸分子。

【請求項 2 0】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、及び/又は又は配列番号:143に示す核酸配列を含む、又はその重複等価物若しくは断片である、請求項19に記載の精製核酸分子。

【請求項 2 1】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号

:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147又は配列番号:149に示す核酸配列から成る、又はその重複等価物若しくは断片である、請求項19に記載の精製核酸分子。 10

【請求項 2 2】

高ストリンジェンシー条件下で、請求項19から21のいずれか1項記載の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸。

【請求項 2 3】

請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項23に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 2 5】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドと特異的に結合するリガンド。 20

【請求項 2 6】

抗体である、請求項25に記載のリガンド。

【請求項 2 7】

請求項1から18のいずれか1項のポリペプチドの発現レベル若しくは活性を増加又は低下させる化合物。

【請求項 2 8】

請求項1から18のいずれか1項のポリペプチドと、前記ポリペプチドの生物学的作用のいずれも誘導することなく結合する、請求項27に記載の化合物。

【請求項 2 9】

天然の、若しくは改変された基質、リガンド、酵素、レセプター又は構造的若しくは機能的模倣物である、請求項28に記載の化合物。 30

【請求項 3 0】

疾患の治療又は診断に使用される、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項19から22のいずれか1項の核酸分子、請求項23に記載のベクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、又は請求項27から29のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 3 1】

患者の疾患を診断する方法であって、前記方法が、前記患者由来の組織で請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを判定するか、又は請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドの活性を判定し、さらに、前記発現のレベル又は活性をコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと異なるレベルを疾患の指標とする、前記疾患の診断方法。 40

【請求項 3 2】

in vitroで実施される請求項31に記載の方法。

【請求項 3 3】

a) 請求項25又は26に記載のリガンドを生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；及びb) 前記複合体を検出する工程を含む、請求項31又は32に記載の方法。

【請求項 3 4】

a) 患者由来の組織サンプルを核酸プローブと、請求項19から22のいずれか1項記載の核 50

酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体の生成を許容するストリンジェントな条件下で接触させる工程；

b) コントロールサンプルを前記プローブと、工程a) で用いられた同じ条件下で接触させる工程；及び

c) 前記サンプル中にハイブリッド複合体の存在を検出する工程

を含み、コントロールサンプルのハイブリッド複合体レベルと異なるハイブリッド複合体レベルが患者サンプルで検出されることを疾患の指標とする、請求項31又は32に記載の方法。

【請求項 3 5】

a) 患者組織由来の核酸サンプルを核酸プライマーと、請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子と前記プライマーとの間でハイブリッド複合体の生成を許容するストリンジェントな条件下で接触させる工程；

b) コントロールサンプルを前記プライマーと、工程a) で用いられた同じ条件下で接触させる工程；

c) 前記サンプル核酸を増幅する工程；及び

d) 前記患者及びコントロールの両サンプルの増幅核酸レベルを検出する工程；

を含み、コントロールサンプル中の増幅核酸レベルと顕著に異なる増幅核酸レベルが患者サンプルで検出されることを疾患の指標とする、請求項31又は32に記載の方法。

【請求項 3 6】

以下の工程を含む、請求項31又は32に記載の方法：

a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

b) 請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子を前記組織サンプルから単離する工程；及び

c) 疾患の指標として前記疾患に付随する変異の存在を前記核酸分子中に検出することによって、前記患者を疾患について診断する工程。

【請求項 3 7】

さらに、核酸分子を増幅して増幅生成物を形成する工程、及び、前記増幅生成物における変異の有無を検出する工程を含む、請求項36の方法。

【請求項 3 8】

患者における変異の有無が、前記核酸分子を前記核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブとストリンジェントな条件下で接触させ、疾患に付随する変異に対応する任意の部分で前記核酸プローブ鎖とハイブリダイズしない部分を有するハイブリッド二本鎖分子が形成される工程、及び疾患に付随する変異の有無の指標として前記プローブ鎖のハイブリダイズしない部分を検出する工程、によって検出される、請求項36又は37の方法。

【請求項 3 9】

疾患が以下を含む（ただしこれらに限定されない）、請求項31から38のいずれか1項記載の方法：細胞増殖性異常（新形成、メラノーマ、肺、結腸直腸、乳房、膵臓、頭部頸部の腫瘍、及び他の固形腫瘍を含む）、骨髄増殖性異常（例えば白血病、非ホジキンリンパ腫、白血球減少症、血小板減少症、血管増殖異常、カボジ肉腫）、自己免疫疾患/炎症性疾患（アレルギー、炎症性腸疾患、関節炎、乾癬及び気道の炎症、喘息、並びに器官移植拒絶を含む）、心脈管系異常（高血圧、浮腫、狭心症、アテローム性硬化症、血栓症、敗血症、ショック、再灌流損傷及び虚血を含む）、神経学的異常（中枢神経系疾患、アルツハイマー病、脳損傷、筋萎縮性側索硬化症及び疼痛を含む）、発育異常、代謝異常（真性糖尿病、骨粗しょう症、肥満、エイズ及び腎疾患を含む）、感染（ウイルス感染、真菌感染及び寄生虫感染、細菌感染、細菌毒素障害、炭疽、毒素（例えば細菌毒素）のブロック、癌、腫瘍内皮、大腸癌、膀胱癌、食道癌、肺癌、メラノーマ、若年性ヒアリン線維腫症（JFH）、乳児全身性ヒアリン症（ISH）、フォン・ウィルブランド病、ベスレム筋障害、栄養障害型表皮水疱症、血栓症、血小板介在凝固の調節、自己免疫疾患及び炎症、並びに他の病的状態。

【請求項 4 0】

10

20

30

40

50

前記疾患が、炎症性腸疾患、毒素関連疾患、癌、皮膚疾患、炎症、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、接触皮膚炎、アトピー性湿疹、血液及びリンパ系の癌、皮膚癌、消化器系の癌、尿路系の癌、乳癌、卵巣癌、婦人科の癌、絨毛癌、肺癌、脳腫瘍、骨腫瘍、類癌腫瘍、大腸癌、鼻咽頭癌、後腹膜肉腫、軟組織腫瘍、甲状腺癌、精巣癌又は肝癌、細菌毒素関連疾患、炭疽又はボツリヌス菌C2毒素関連疾患、クローン病又は潰瘍性大腸炎、乾癬、血液及びリンパ系の癌、皮膚癌、消化器系の癌、尿路系の癌、乳癌、卵巣癌、婦人科の癌、絨毛癌、肺癌、脳腫瘍、骨腫瘍、類癌腫瘍、鼻咽頭癌、後腹膜肉腫、軟組織腫瘍、甲状腺癌、精巣の癌又は肝癌である、請求項31から38のいずれか1項記載の方法。

【請求項 4 1】

前記疾患が、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質が関与する疾患である、請求項31から39のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項 4 2】

vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質としての、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドの使用。

【請求項 4 3】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子、請求項23に記載のベクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、又は請求項27から29のいずれか1項記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 4 4】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド又は請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子を含む、ワクチン組成物。

20

【請求項 4 5】

細胞増殖性異常（新形成、メラノーマ、肺、結腸直腸、乳房、脾臓、頭部頸部の腫瘍、及び他の固形腫瘍を含む）、骨髓増殖性異常（例えば白血病、非ホジキンリンパ腫、白血球減少症、血小板減少症、血管増殖異常、カポジ肉腫）、自己免疫疾患/炎症性疾患（アレルギー、炎症性腸疾患、関節炎、乾癬及び気道の炎症、喘息、並びに器官移植拒絶を含む）、心脈管系異常（高血圧、浮腫、狭心症、アテローム性硬化症、血栓症、敗血症、ショック、再灌流損傷及び虚血を含む）、神経学的異常（中枢神経系疾患、アルツハイマー病、脳損傷、筋萎縮性側索硬化症及び疼痛を含む）、発育異常、代謝異常（真性糖尿病、骨粗しょう症、肥満、エイズ及び腎疾患を含む）、感染（ウイルス感染、真菌感染及び寄生虫感染、細菌感染、細菌毒素障害、炭疽、毒素（例えば細菌毒素）のブロック、癌、腫瘍内皮、大腸癌、膀胱癌、食道癌、肺癌、メラノーマ、若年性ヒアリン線維腫症（JFH）、乳児全身性ヒアリン症（ISH）、フォン・ウィルブランド病、ベスレム筋障害、栄養障害型表皮水疱症、血栓症、血小板介在凝固の調節、自己免疫疾患、炎症、及び他の病的状態の治療のための医薬の製造に使用される、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子、請求項23に記載のベクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、請求項27から29のいずれか1項記載の化合物、又は請求項43に記載の医薬組成物。

30

【請求項 4 6】

vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質が関与する疾患の治療のための医薬の製造に使用される、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子、請求項23に記載のベクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、請求項27から29のいずれか1項記載の化合物、又は請求項43に記載の医薬組成物。

40

【請求項 4 7】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子、請求項23に記載のベクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、請求項27から29のいずれか1項記載の化合物、又は請求項43に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、患者の疾患を治療する方法。

【請求項 4 8】

50

健常な者における天然の遺伝子の発現又はポリペプチドの活性と比較した場合に、症状を有する患者において前記遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が低い患者について、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、ペクター、リガンド、化合物又は組成物がアゴニストである、請求項47に記載の方法。

【請求項 4 9】

健常な者における天然の遺伝子の発現又はポリペプチドの活性と比較した場合に、症状を有する患者において前記遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が高い患者について、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、ペクター、リガンド、化合物又は組成物がアンタゴニストである、請求項47に記載の方法。

【請求項 5 0】

患者からの組織における請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドの発現レベル若しくは活性、又は請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子の発現レベルを一定期間にわたってモニターすることを含み、記一定期間にわたる前記発現レベルもしくは活性のコントロールレベルへ向かう変化を疾患の緩解の指標とする、患者の疾患の治療処置をモニターする方法。

【請求項 5 1】

疾患の治療及び/又は診断で有効な化合物を同定する方法であって、前記方法が、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド又は請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子を、前記ポリペプチド又は核酸分子に対して結合親和性を有すると推定される1つ以上の化合物と接触させること、および、前記核酸分子又はポリペプチドと特異的に結合する化合物を選別すること、を含む、前記化合物の同定方法。

【請求項 5 2】

請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブを収納する第一の容器；前記核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを収納する第二の容器；及び疾患の診断を容易にするために前記プローブ及びプライマーを使用するための指示書を含む、疾患の診断に有用なキット。

【請求項 5 3】

さらに、ハイブリダイズしないRNAを消化する薬剤を保持する第三の容器を含む請求項52記載のキット。

【請求項 5 4】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも1つが請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子である、前記キット。

【請求項 5 5】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドと結合する1つ以上の抗体、及び、前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応を検出するために有用な試薬を含むキット。

【請求項 5 6】

請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチドを高レベルで又は低レベルで発現するように又は発現しないように形質転換したトランスジェニック又はノックアウト非ヒト動物。

【請求項 5 7】

請求項56に記載の非ヒトトランスジェニック動物を候補化合物と接触させ、前記動物の疾患に対する前記化合物の影響を決定することによって、前記疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 5 8】

IVFで、又は避妊薬として使用される、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項19から22のいずれか1項記載の核酸分子、請求項23に記載のペクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、請求項27から29のいずれか1項記載の化合物、又は請求項43に記載の医薬組成物。

【請求項 5 9】

避妊薬の製造に使用される、請求項1から18のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項

10

20

30

40

50

19から22のいずれか1項記載の核酸分子、請求項23に記載のベクター、請求項24に記載の宿主細胞、請求項25又は26に記載のリガンド、請求項27から29のいずれか1項記載の化合物、又は請求項43に記載の医薬組成物。

【請求項60】

vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質関連疾患の治療用又は予防用候補薬剤のスクリーニングのための標的としてのINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの使用。

【請求項61】

以下の工程を含む生物学的に活性な化合物を選別する方法：

- (i) 候補化合物をINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞と接触させる工程；
- (ii) 前記細胞の表面で前記INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドと結合する化合物、及び/又はINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの活性を調節する化合物を選別する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、本明細書においてフォン・ウィルブランド因子A (vWFA) 及び炭疽レセプター細胞外 (ANT_IG) ドメインを含む炭疽レセプター様タンパク質 (anthrax receptor-like protein) として同定された新規なタンパク質 (本明細書ではINSP141、INSP142、INSP143及びINSP144と称される)、並びに疾患の診断、予防及び治療におけるこれらタンパク質及びコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

本明細書に引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は引用により完全に本明細書に含まれる。

【背景技術】

【0002】

薬剤発見のプロセスは、機能ゲノミクスの時代が到来したために目下のところ重大な改革を受けている。“機能ゲノミクス”という用語は、機能を対象となっているタンパク質の配列に帰するためにバイオインフォマティクスツールを利用するアプローチに適用される。そのようなツールは、配列データの生産速度が、機能をこれらタンパク質配列に割り当てる研究室の能力を急速に凌駕しつつあるためにますます必要となっている。

バイオインフォマティクスツールの有効性及び正確さが増加しているので、これらのツールによって生化学的に性状を決定する通常技術は急速に置き換えられつつある。実際に、本発明の同定に用いられた高度なバイオインフォマティクスツールは、今や高度な信頼を置き得る結果を生産することができる。

配列データが利用可能になるにつれ、種々の機関及び商業的機構がそれらを調査し、重大な発見が継続的に達成されている。しかしながら、研究及び薬剤発見のための標的として、更なる遺伝子及びそれらがコードするポリペプチドの同定及び性状決定を求める持続的な要求がなお存在する。

【0003】

序論

炭疽毒素レセプター

炭疽病は、主として家畜及び野生動物、特に草食動物 (例えばウシ、ヒツジ、ウマ、ラバ及びヤギ) の疾患である。ヒトは、病気の動物 (それらの肉、骨、皮革、毛及び排出物を含む) と接触したときに偶発的に感染する。

炭疽毒素のある構成成分は、現時点では明らかではない致死的作用態様を示す。死は明らかに酸素枯渇、二次的ショック、血管透過性の亢進、呼吸器不全及び心不全による。ヒト又は動物における炭疽に起因する死は突然及び不意に発生する。循環中の致死性毒素レベルは疾患のきわめて後期に急激に増加し、血中の細菌濃度とほぼ平行する。

三つの部分から成る毒素である炭疽毒素は、炭疽病の病原菌である炭疽菌 (Bacillus a

10

20

30

40

50

anthracis) によって産生される。炭疽毒素は細菌が免疫系を回避するために役立ち、全身感染時に宿主を殺すことができる。毒素は以下の3つのタンパク質から成る：防御抗原 (PA) (単一のレセプター結合部分) 及び2つの酵素部分 (浮腫因子 (EF) 及び致死因子 (LF) と称される)。これらのタンパク質が細菌から非毒性分子としていったん遊離されるや、それらは哺乳動物細胞の表面に移動し、有毒な細胞結合性複合体としてアッセンブルする (M. Mourez et al. Nat Biotechnol 2001, 19:958-961)。

毒素の2つの成分は哺乳動物細胞のサイトゾル内で基質を酵素的に改変する。浮腫因子 (EF) はアデニレートシクラーゼであり、好中球機能の抑制及び宿主の抵抗性の障害を含む多様なメカニズムにより宿主の防御を損なう。致死因子 (LF) は亜鉛依存プロテアーゼであり、ミトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼを切断しマクロファージの溶解を引き起こす。防御抗原 (PA) (第三の成分) は、細胞レセプターと結合し、酵素成分のサイトゾルへのデリバリーを仲介する (S.H. Leppla, Anthrax toxin, In K. Aktories, I. Just, editors. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin:Springer; 2000, p.447-72)。

10

20

30

40

50

【0004】

炭疽毒素レセプター (ATR) は、腫瘍内皮マーカー8 (TEM8) 遺伝子によってコードされる。炭疽毒素は、毒素障害の第一段階を遂行するためにTEM8のタンパク質生成物を利用する。ATRの真の生理学的機能は明らかではないが、TEM8遺伝子は大腸癌でアップレギュレートされることが示された (B. StCroix et al. 2000, Science, Aug.18, 289(5482):1197-1202)。TEM8転写はまた血管形成時にもアップレギュレートされる。マウスの腫瘍内皮マーカー8 (mTEM8) 遺伝子に関する研究は、mTEM8は新生血管形成に必要とされ得ることを示唆している (E. Carson-Walter et al. (2001) Cancer Res, Sep.15, 61(18):6649-55)。

ヒトの毛細血管形態形成タンパク質2 (CMG2) はATRと類似するドメイン構成を有し、両者はそれらの完全長にわたって40%の配列同一性を共有する。CMG2は炭疽毒素のPAサブユニットと結合できることが実験的に示され、CMG2はATRと類似の態様で利用され得ることが提唱された (H.M. Scobie et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA, Apr.29, 100(9):5170-4)。CMG2の真の生理学的機能は明らかではないが、CMG2の組換え型は、コラーゲンIV型及びラミニンと結合することが示された (S. Ball et al. 2001, J Cell Sci, Aug, 114(Pt 15):2755-73)。

炭疽レセプター細胞外ドメイン (ANT_IG) は、炭疽レセプターの推定的細胞外N-末端部分に見出される。また別の炭疽レセプタードメインは前記の細胞内部分に見出され、ANT_Cと称される。これはおそらくIgスーパーファミリーの部分であり、IPT/TIGドメインと密接に関係する。IPT/TIGファミリーは、免疫グロブリン様折畳みを有するドメインから成る。これらのドメインは、細胞表面レセプター (例えばMet及びRon) においても、細胞内転写因子内と同様に (前記ドメインはDNA結合に中心的に参与する) 見出される。Ronチロシンキナーゼレセプターは、そのサブファミリーのメンバーと固有の機能的な特徴を共有する。それらはすなわち細胞分離の制御、運動性、及び細胞外マトリックスの侵襲 (スカタリング) である。

【0005】

ATRの特筆すべきある特徴は、インテグリン (I) ドメインとしてもまた知られている細胞外フォン・ウィルブランド (von Willebrand) 因子A (vWFA) ドメインである。vWFAドメインは多くの大きな細胞外タンパク質に見出されている。そのようなタンパク質の例には、補体タンパク質因子B (FB)、C2、CR3及びCR4、インテグリン並びにコラーゲンVI、VII、XII、XIV型 (S.J. Perkins et al. 1994, J Mol Biol, Apr.22, 238(1):104-19) 並びに炭疽毒素レセプター (K. Bradley et al. 2003, Biochem Pharmacol, Feb.1, 65(3):309-14) が含まれる。vWFAドメイン含有タンパク質に付随する機能には、細胞外マトリックスの成分としての作用、止血、細胞接着、及び免疫防御メカニズムが含まれる (A. Colombatti et al. 1993, Matrix, Jul. 13(4):297-306)。

インテグリンクラスのタンパク質で見出されるvWFAドメインはインテグリンIドメイン

と称される (A. Roland et al. 2003, J Biol Chem, Apr.25, 278(17):15035-15039)。炭疽毒素のPAサブユニットは、インテグリンとそれらの天然の基質との結合を髣髴させる態様でATR vWFAドメインと直接結合することが示された。このドメインの可溶性は、細胞培養で効果的な細胞外炭疽抗毒素として機能することが示された (K. Bradley et al. 2003, Biochem Pharmacol, Feb.1, 65(3):309-14)。

ほとんどのvWFAドメイン含有タンパク質に共通するモチーフは、金属イオン依存性接着部位 (MIDAS) である。MIDASモチーフは陽イオン (例えば Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 及び Ca^{2+}) 配位に必要とされ、5つの残基、Asp-x-Ser-x-Ser、Thr及びAspで構成される (H.M. Scobie et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA, Apr.29, 100(9):5170-4)。ATR/TEM8の細胞外vWFAドメイン内に存在するMIDASモチーフは、PA結合に必須の二価陽イオンをキレートする。

10

【 0 0 0 6 】

ATRの可溶性vWFAドメイン (sATR) は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 培養細胞の炭疽毒素障害を阻止するように機能することが示された (Bradley et al. Nature, 2001, 414:225-9; WO 04/052277及びWO 02/46228もまた参照されたい)。

BradleyらはまたATR/TEM8/CMG2の癌、特に腫瘍内皮、大腸癌、膀胱癌、食道癌、肺癌及びメラノーマにおける関与を論評した (Bradley et al. Biochemical Pharmacology, 2003, 65:309-314)。

ATR/TEM8に対するアンチセンス核酸が、癌と同様に炭疽菌感染の治療のために提唱された (WO 04/013313及びWO 04/052277)。

20

ATR/TEM8/CMG2は血管形成で天然の役割を有することが提唱されている (概論について以下を参照されたい: Nanda & St.Croix, Current Opinion in Oncology, 2004, 16:44-49)。TEM8の細胞外ドメインは、COOH-末端C5ドメインを介してコラーゲンVI型の3サブユニットと結合することが示された (Nanda et al. Cancer Research, 2004, 64:817-820)。PAは、ATR結合についてコラーゲンサブユニットと競合するかもしれない。Nandaらは、TEM8/C5相互作用は腫瘍の血管形成で重要な役割を果たし得ると提唱している。

CMG2遺伝子内 (特にvWFAドメイン内) の変異は、2つの対立遺伝子疾患、若年性ヒアリン線維腫症 (JFH) 及び乳児全身性ヒアリン症 (ISH; Lacy et al. PNAS 2004, 101(17):6367-6372) を引き起こす。

【 0 0 0 7 】

30

さらにまた、種々のタンパク質vWFAドメイン内のミスセンス変異はヒトの疾患をもたらす。フォン・ウィルブランド因子前駆体 (vWF) の変異はフォン・ウィルブランド病と関連している (OMIM Acc. No. 193400)。コラーゲンアルファ3 (VI) 鎖前駆体の変異はベスレム筋障害と関連している (OMIM Acc. No. 120250及び158810)。コラーゲンアルファ1 (VII) 鎖前駆体 (長鎖コラーゲン) (LCコラーゲン) の変異は栄養障害型表皮水疱症と関連している (優性形質、OMIM Acc. No. 120120; 劣性形質、OMIM Acc. No. 131750; 脛骨前部筋、優性及び劣性形質、OMIM Acc. No.226600及びOMIM Acc. No. 131850)。

A型ドメインの1以上のコピーを含むある種のタンパク質は、宿主の防御メカニズム、例えば免疫応答及び炎症に参画する (例えば以下を参照されたい: Celikel et al. Nature Structural Biology, 1998, 5:189)。

40

WO 92/17192は、野生型のフォン・ウィルブランド因子 (vWF) サブユニットの断片を模倣して生成されたモノマーポリペプチドを含む、血栓症の治療又は抑制に有効な治療組成物を開示している。WO 04/062551は、血小板介在凝固の調節を必要とする症状の診断及び/又は治療を目的とするポリペプチドであって、vWF、vWF A1ドメイン、活性化vWFのA1ドメイン、vWF A3ドメイン、gbIb及び/又はコラーゲン、前記ポリペプチドのホモログ及び/又は機能的部分に対する少なくとも1つのシングルドメイン抗体を含むポリペプチドに関する。

vWFAドメイン及びANT_IGドメイン含有タンパク質、特にATR様タンパク質の知識の増加は、上記に記載した症状及び関連症状をもたらす根幹的な経路の理解の促進、及び前記の疾患の治療により有効な遺伝子及び/又は薬剤療法の開発に極めて重要である。

50

【発明の開示】

【0008】

本発明は、本明細書において INSP141、INSP142、INSP143 及び INSP144 と称するタンパク質が同じ配列のスプライシング変種であり、それらは全て炭疽毒素レセプターと相同性を共有するという発見に基づく。特に、本発明は、本発明のポリペプチド（好ましくは INSP142）は、意外にも、乾癬の皮膚生検と同様、結腸及び回腸 IBD 生検サンプルでも限定的な発現を示すという驚くべき発見に基づく。タックマン（Taqman）分析による発現の結果は、炎症性腸疾患、皮膚疾患及び炎症における INSP142 が関与する特異的な発現パターンを示している。

これらの驚くべき特性は、本発明のポリペプチド及びそれらのコードポリヌクレオチドの特徴であり、それらを薬剤又は医薬組成物の調製に適したものにしている。

INSP141、INSP142、INSP143 及び INSP144 は全て、フォン・ウィルブランド因子 A（vWFA）ドメイン及び炭疽毒素レセプター細胞外（ANT_IG）ドメインを含むと予想される。これら2つの細胞外ドメインは、炭疽毒素レセプター（ATR）-様タンパク質のレセプター結合特性を付与する。図8及び9は、ATR-様タンパク質に関する構造的レベル及びアミノ酸レベルにおける INSP141、INSP142、INSP143 及び INSP144 タンパク質の保存された特徴を示す。vWFA ドメインは INSP141、INSP142、INSP143 及び INSP144 で同一である。INSP141 タンパク質の ANT_IG ドメインは、INSP142、INSP143 及び INSP144 の ANT_IG ドメインとはわずかに異なっている。

INSP141 及び INSP142 は分泌タンパク質であると予想され、膜貫通領域を含まない。INSP143 及び INSP144 は、シグナルペプチド及び膜貫通領域を含むと予想される。INSP143 及び INSP144 の両者については、N-末端は細胞外にあり、C-末端は細胞内にあると予想される。

【0009】

本発明の第一の特徴のある実施態様では、以下のポリペプチドが提供される：

(i) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:146 及び/又は配列番号:148 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA 及び/又は ANT_IG ドメイン含有タンパク質として、好ましくは ATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i) 又は (ii) との機能的等価物。

好ましくは、本発明のこの第一の特徴のポリペプチドは以下のポリペプチドである：

(i) 配列番号:24、配列番号:128 及び/又は配列番号:132 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA 及び/又は ANT_IG ドメイン含有タンパク質として、好ましくは ATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i) 又は (ii) の機能的等価物。

本発明のこの特徴のポリペプチドは、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:146 及び/又は配列番号:148 として上記に示す配列のいずれかの配列から成ることができる。

本発明の第一の特徴のポリペプチドは、さらにヒスチジントグを含むことができる。好ましくは、前記ヒスチジントグは前記ポリペプチドの C-末端で見出される。好ましくは、前記ヒスチジントグは 1 - 10 のヒスチジン残基（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 残基）を含む。より好ましくは、前記ヒスチジントグは 6 個のヒスチジン残基を含む。

【0010】

配列番号:2 に示す配列を有するポリペプチドは、以下では “ INSP141 エクソン 1 ポリペプ

チド”と称する。配列番号:4に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン2ポリペプチド”と称する。配列番号:6に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン3ポリペプチド”と称する。配列番号:8に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン4ポリペプチド”と称する。配列番号:10に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン5ポリペプチド”と称する。配列番号:12に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン6ポリペプチド”と称する。配列番号:14に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン7ポリペプチド”と称する。配列番号:16に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン8ポリペプチド”と称する。配列番号:18に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン9ポリペプチド”と称する。配列番号:20に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン10ポリペプチド”と称する。配列番号:22に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141エクソン11ポリペプチド”と称する。配列番号:24に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP141ポリペプチド”と称する。配列番号:128に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化INSP141ポリペプチド”と称する。配列番号:130に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化ヒスチジntag INSP141ポリペプチド”と称する。配列番号:132に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化成熟INSP141ポリペプチド”と称する。配列番号:134に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化成熟ヒスチジntag INSP141ポリペプチド”と称する。配列番号:146に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144”と称する。配列番号:148に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ ANT_IGドメインペプチド配列-INSP141”と称する。

10

20

30

40

50

【0011】

本明細書で用いられる“ INSP141ポリペプチド”という用語には、INSP141エクソン1ポリペプチド、INSP141エクソン2ポリペプチド、INSP141エクソン3ポリペプチド、INSP141エクソン4ポリペプチド、INSP141エクソン5ポリペプチド、INSP141エクソン6ポリペプチド、INSP141エクソン7ポリペプチド、INSP141エクソン8ポリペプチド、INSP141エクソン9ポリペプチド、INSP141エクソン10ポリペプチド、INSP141エクソン11ポリペプチド、INSP141ポリペプチド、クローン化INSP141ポリペプチド、クローン化ヒスチジntag INSP141ポリペプチド、クローン化成熟INSP141ポリペプチド及びクローン化成熟ヒスチジntag INSP141ポリペプチド、vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144、及びANT_IGドメインペプチド配列-INSP141を含むポリペプチドが含まれる。

【0012】

好ましくは、本発明のこの特徴のポリペプチドは、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する。“ vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として機能する”とは、例えば通常のバイオインフォマティクツールによって、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質ファミリーのポリペプチド内で保存された特徴として同定され得るアミノ酸配列又は構造的特徴を含むポリペプチドであって、ポリペプチドとリガンド又はレセプターとの相互作用が完全長の野生型ポリペプチドの機能と比較したとき実質的に損なわれないようなポリペプチドを指す。例えば、ANT_IGドメインは、“ Protein Families Database of Alignments”及びHMMsで特異的なシグネチャー（HMMER構築情報）によって規定される（PFAM, The Pfam Protein Families Database. Alex et al. Nucleic Acids Research, 2004, Database Issue 32:D138-D141）。機能性の決定は、特定のバイオインフォマティクツール（例えばPFAM）に限定されるべきではない。なぜならば、他のツールも保存ドメイン又はモチーフを検出するためにそれら自身の個別のシグネチャーを有するからである。さらにまた、適切な機能のために必須の残基であると思われる、ANT_IGドメイン及びvWFAドメイン内の保存残基は図9に示されている（例えば、13の同一の残基が、全てのファミリーメンバーのANT_IGドメインに存在している）。さらにまた、当業者は、図9に示すアラインメントから出発して、通常のツール（例えばPsi-blast）を用い、vWFAドメイン及び/又はANT_IGドメインの両

方のための特異的シグネチャーを構築することができよう。

“ATR-様タンパク質として機能する”とは、vWFA及びANT_IGの両ドメインを含み、さらにATRタンパク質と類似の特性を有するポリペプチドを指す。例えば、本発明のポリペプチドは、好ましくは毒素（より具体的には細菌毒素）と結合し、及び/又は癌を予防及び/又は治療することができる。

【0013】

本発明の第一の特徴の第二の実施態様では、以下のポリペプチドが提供される：

(i) 配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:136、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

好ましくは、本発明のこの第一の特徴のポリペプチドは以下のポリペプチドである：

(i) 配列番号:52及び/又は配列番号:136に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

本発明のこの特徴のポリペプチドは、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:136、配列番号:146及び/又は配列番号:150として上記に示す配列のいずれかの配列から成ることができる。

【0014】

配列番号:26に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン1ポリペプチド”と称する。配列番号:28に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン2ポリペプチド”と称する。配列番号:30に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン3ポリペプチド”と称する。配列番号:32に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン4ポリペプチド”と称する。配列番号:34に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン5ポリペプチド”と称する。配列番号:36に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン6ポリペプチド”と称する。配列番号:38に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン7ポリペプチド”と称する。配列番号:40に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン8ポリペプチド”と称する。配列番号:42に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン9ポリペプチド”と称する。配列番号:44に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン10ポリペプチド”と称する。配列番号:46に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン11ポリペプチド”と称する。配列番号:48に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン12ポリペプチド”と称する。配列番号:50に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142エクソン13ポリペプチド”と称する。配列番号:52に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP142ポリペプチド”と称する。配列番号:136に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“クローン化INSP142ポリペプチド”と称する。配列番号:146に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144”と称する。配列番号:150に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144”と称する。

本明細書で用いられる“INSP142ポリペプチド”という用語には、INSP142エクソン1ポリペプチド、INSP142エクソン2ポリペプチド、INSP142エクソン3ポリペプチド、INSP142

エクソン4ポリペプチド、INSP142エクソン5ポリペプチド、INSP142エクソン6ポリペプチド、INSP142エクソン7ポリペプチド、INSP142エクソン8ポリペプチド、INSP142エクソン9ポリペプチド、INSP142エクソン10ポリペプチド、INSP142エクソン11ポリペプチド、INSP142エクソン12ポリペプチド、INSP142エクソン13ポリペプチド、INSP142ポリペプチド、クローン化INSP142ポリペプチド、vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144、及びANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144を含むポリペプチドが含まれる。

好ましくは、本発明のこの特徴のポリペプチドは、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する。

【0015】

本発明の第一の特徴の第三の実施態様では、以下のポリペプチドが提供される：

(i) 配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

好ましくは、本発明のこの第一の特徴のポリペプチドは以下のポリペプチドである：

(i) 配列番号:90、配列番号:138及び/又は配列番号:141に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

本発明のこの特徴のポリペプチドは、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146及び/又は配列番号:150として上記に示す配列のいずれかの配列から成ることができる。

【0016】

配列番号:54に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン1ポリペプチド”と称する。配列番号:56に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン2ポリペプチド”と称する。配列番号:58に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン3ポリペプチド”と称する。配列番号:60に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン4ポリペプチド”と称する。配列番号:62に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン5ポリペプチド”と称する。配列番号:64に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン6ポリペプチド”と称する。配列番号:66に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン7ポリペプチド”と称する。配列番号:68に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン8ポリペプチド”と称する。配列番号:70に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン9ポリペプチド”と称する。配列番号:72に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン10ポリペプチド”と称する。配列番号:74に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン11ポリペプチド”と称する。配列番号:76に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン12ポリペプチド”と称する。配列番号:78に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP143エクソン13ポリペプチド”と称する。配列番号:80に示す配列を有するポリ

10

20

30

40

50

リペプチドは、以下では“ INSP143エクソン14ポリペプチド ”と称する。配列番号:82に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP143エクソン15ポリペプチド ”と称する。配列番号:84に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP143エクソン16ポリペプチド ”と称する。配列番号:86に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP143エクソン17ポリペプチド ”と称する。配列番号:88に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP143エクソン18ポリペプチド ”と称する。配列番号:90に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ INSP143ポリペプチド ”と称する。配列番号:138に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化INSP143ポリペプチド ”と称する。配列番号:140に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化ヒスチジントグINSP143ポリペプチド ”と称する。配列番号:142に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化成熟INSP143ポリペプチド ”と称する。配列番号:144に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ クローン化成熟ヒスチジントグINSP143ポリペプチド ”と称する。配列番号:146に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144 ”と称する。配列番号:150に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ ANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144 ”と称する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本明細書で用いられる“ INSP143ポリペプチド ”という用語には、INSP143エクソン1ポリペプチド、INSP143エクソン2ポリペプチド、INSP143エクソン3ポリペプチド、INSP143エクソン4ポリペプチド、INSP143エクソン5ポリペプチド、INSP143エクソン6ポリペプチド、INSP143エクソン7ポリペプチド、INSP143エクソン8ポリペプチド、INSP143エクソン9ポリペプチド、INSP143エクソン10ポリペプチド、INSP143エクソン11ポリペプチド、INSP143エクソン12ポリペプチド、INSP143エクソン13ポリペプチド、INSP143エクソン14ポリペプチド、INSP143エクソン15ポリペプチド、INSP143エクソン16ポリペプチド、INSP143エクソン17ポリペプチド、INSP143エクソン18ポリペプチド、INSP143ポリペプチド、クローン化INSP143ポリペプチド、クローン化ヒスチジントグINSP143ポリペプチド、クローン化成熟INSP143ポリペプチド、クローン化成熟ヒスチジントグINSP143ポリペプチド、vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144、及びANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144を含むポリペプチドが含まれる。

好ましくは、本発明のこの特徴のポリペプチドは、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する。

【 0 0 1 8 】

本発明の第一の特徴の第四の実施態様では、以下のポリペプチドが提供される：

(i) 配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:146及び/又は配列番号:150に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i) 又は(ii)の機能的等価物。

好ましくは、本発明のこの第一の特徴のポリペプチドは以下のポリペプチドである：

(i) 配列番号:126に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能するその断片であるか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有するポリペプチド；または、

(iii) (i) 又は(ii)の機能的等価物。

本発明のこの特徴のポリペプチドは、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、

配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:146及び/又は配列番号:150として上記に示す配列のいずれかの配列から成ることができる。

【0019】

配列番号:92に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン1ポリペプチド”と称する。配列番号:94に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン2ポリペプチド”と称する。配列番号:96に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン3ポリペプチド”と称する。配列番号:98に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン4ポリペプチド”と称する。配列番号:100に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン5ポリペプチド”と称する。配列番号:102に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン6ポリペプチド”と称する。配列番号:104に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン7ポリペプチド”と称する。配列番号:106に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン8ポリペプチド”と称する。配列番号:108に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン9ポリペプチド”と称する。配列番号:110に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン10ポリペプチド”と称する。配列番号:112に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン11ポリペプチド”と称する。配列番号:114に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン12ポリペプチド”と称する。配列番号:116に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン13ポリペプチド”と称する。配列番号:118に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン14ポリペプチド”と称する。配列番号:120に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン15ポリペプチド”と称する。配列番号:122に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン16ポリペプチド”と称する。配列番号:124に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144エクソン17ポリペプチド”と称する。配列番号:126に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP144ポリペプチド”と称する。配列番号:146に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144”と称する。配列番号:150に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“ANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144”と称する。

本明細書で用いられる“INSP144ポリペプチド”という用語には、INSP144エクソン1ポリペプチド、INSP144エクソン2ポリペプチド、INSP144エクソン3ポリペプチド、INSP144エクソン4ポリペプチド、INSP144エクソン5ポリペプチド、INSP144エクソン6ポリペプチド、INSP144エクソン7ポリペプチド、INSP144エクソン8ポリペプチド、INSP144エクソン9ポリペプチド、INSP144エクソン10ポリペプチド、INSP144エクソン11ポリペプチド、INSP144エクソン12ポリペプチド、INSP144エクソン13ポリペプチド、INSP144エクソン14ポリペプチド、INSP144エクソン15ポリペプチド、INSP144エクソン16ポリペプチド、INSP144エクソン17ポリペプチド、INSP144ポリペプチド、vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144、及びANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144を含むポリペプチドが含まれる。

好ましくは“vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質”は、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.0002、0.00001、0.000001又は0.0000001より低いe-値で検出されるvWFA及び/又はANT_IGドメインを含む分子であり得る。

好ましくは、本発明のこの特徴のポリペプチドは、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質として、好ましくはATR-様タンパク質として機能する。

【0020】

好ましくは、本発明のポリペプチドの活性は以下のアッセイの少なくとも1つで確認することができる：

a) Okayasuら (A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology, 1990, 98:694-702) が記載した、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発炎症性腸疾患のマウスモデル、又は

- b) Borm and Gouma (Drug Discovery Today: Disease Models, 2004, 1(4):437-443) が論評した、in vitro及びin vivoアッセイの他に炎症性腸疾患の動物モデル、又は
- c) Kamb and Lassota (Drug Discovery Today: Disease Models, 2004, 1(1):31-36) が評論した癌のモデル、又は、Odashiroら (Drug Discovery Today: Disease Models, 2005, 印刷中) が論評した皮膚癌のモデル、
- d) Gutermuthら (Drug Discovery Today: Disease Models, 2005, 印刷中) が評論した接触皮膚炎又はアトピー性湿疹のモデル、又は
- e) 正常及び癌細胞の増殖又は生存の調節、又は
- f) 実施例9に記載するアッセイ、又は
- g) 血管形成又は新生血管形成の調節、又は
- h) 細菌毒素障害、例えば炭疽毒素障害の阻止、又は
- i) 毒素、例えば細菌毒素と結合するその能力。

10

【0021】

本発明の“抗原決定基”は本発明のポリペプチドの一部であり得る。抗原決定基は抗体の結合部位又はT細胞レセプター(TCR)と結合する。あるいは、“抗原決定基”はただ1つの抗体分子が結合する本発明のポリペプチドの表面上の部位でもあり得る。一般的には、抗原はいくつかの又は多くの異なる抗原決定基を有し、多くの異なる特異性を有する抗体と反応する。好ましくは、抗体は本発明のポリペプチドと免疫特異的である。好ましくは、前記抗体は融合タンパク質の部分ではない本発明のポリペプチドと免疫特異的である。好ましくは、前記抗体はINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144又はその断片と免疫特異的である。抗原決定基は、通常は化学的に活性な表面の分子(例えばアミノ酸又は糖側鎖)群から成り、特異的な三次元の構造的特徴および特異的な荷電的特徴を有する。好ましくは、“抗原決定基”は抗原性である(すなわち特異的免疫応答を誘導する)本発明のポリペプチド上の特定の化学基を指す。

20

ポリペプチドADU02541(配列番号:168)及びIPI00480015.1/ENSP00000346942(配列番号:169)、並びにそれらのコード核酸配列は本発明の範囲から特に排除される。

【0022】

第二の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする精製核酸分子を提供する。

“精製核酸分子”という用語は、好ましくは以下の本発明の核酸分子を指す:(1)全核酸が供給細胞から単離されたときに、天然の状態で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物又は他の物質の少なくとも50%から分離された核酸分子、(2)前記“精製核酸分子”が天然の状態で結合されているポリヌクレオチドの全体又は一部分と結合していない核酸分子、(3)天然の状態で結合していないポリヌクレオチドと機能的に連結されている核酸分子、又は(4)天然の状態でより大きなポリヌクレオチド配列の部分として存在しない核酸分子。好ましくは、本発明の単離核酸分子は、実質的に、ポリペプチド製造におけるその使用又はその治療的、診断的、予防的若しくは研究的使用に関して妨げとなるであろう他のいずれの夾雑核酸分子又はその天然の環境で見出される他の夾雑物質を含まない。好ましい実施態様では、ゲノムDNA分子は本発明の範囲から特に排除される。好ましくは、10kb(キロ塩基対)、50kbp、100kbp、150kbp、200kbp、250kbp又は300kbpより大きいゲノムDNAは、特に本発明の範囲から排除される。好ましくは、“精製核酸分子”はcDNAのみから成る。

30

40

【0023】

好ましくは、前記精製核酸分子は、配列番号:1(INSP141エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号:3(INSP141エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号:5(INSP141エクソン3ポリペプチドをコードする)、配列番号:7(INSP141エクソン4ポリペプチドをコードする)、配列番号:9(INSP141エクソン5ポリペプチドをコードする)、配列番号:11(INSP141エクソン6ポリペプチドをコードする)、配列番号:13(INSP141エクソン7ポリペプチドをコードする)、配列番号:15(INSP141エクソン8ポリペプチドをコードする)、配列番号:17(INSP141エクソン9ポリペプチドをコードする)、配列番号:19(INSP

50

141エクソン10ポリペプチドをコードする)、配列番号:21 (INSP141エクソン11ポリペプチドをコードする)、配列番号23 (INSP141ポリペプチドをコードする)、配列番号:25 (INSP142エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号:27 (INSP142エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号:29 (INSP142エクソン3ポリペプチドをコードする)、配列番号:31 (INSP142エクソン4ポリペプチドをコードする)、配列番号:33 (INSP142エクソン5ポリペプチドをコードする)、配列番号:35 (INSP142エクソン6ポリペプチドをコードする)、配列番号:37 (INSP142エクソン7ポリペプチドをコードする)、配列番号:39 (INSP142エクソン8ポリペプチドをコードする)、配列番号:41 (INSP142エクソン9ポリペプチドをコードする)、配列番号:43 (INSP142エクソン10ポリペプチドをコードする)、配列番号:45 (INSP142エクソン11ポリペプチドをコードする)、配列番号:47 (INSP142エクソン12ポリペプチドをコードする)、配列番号:49 (INSP142エクソン13ポリペプチドをコードする)、配列番号:51 (INSP142ポリペプチドをコードする)、配列番号53 (INSP143エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号:55 (INSP143エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号:57 (INSP143エクソン3ポリペプチドをコードする)、配列番号:59 (INSP143エクソン4ポリペプチドをコードする)、配列番号:61 (INSP143エクソン5ポリペプチドをコードする)、配列番号:63 (INSP143エクソン6ポリペプチドをコードする)、配列番号:65 (INSP143エクソン7ポリペプチドをコードする)、配列番号:67 (INSP143エクソン8ポリペプチドをコードする)、配列番号:69 (INSP143エクソン9ポリペプチドをコードする)、配列番号:71 (INSP143エクソン10ポリペプチドをコードする)、配列番号:73 (INSP143エクソン11ポリペプチドをコードする)、配列番号:75 (INSP143エクソン12ポリペプチドをコードする)、配列番号:77 (INSP143エクソン13ポリペプチドをコードする)、配列番号:79 (INSP143エクソン14ポリペプチドをコードする)、配列番号:81 (INSP143エクソン15ポリペプチドをコードする)、配列番号:83 (INSP143エクソン16ポリペプチドをコードする)、配列番号:85 (INSP143エクソン17ポリペプチドをコードする)、配列番号:87 (INSP143エクソン18ポリペプチドをコードする)、配列番号:89 (INSP143ポリペプチドをコードする)、配列番号:91 (INSP144エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号93 (INSP144エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号:95 (INSP144エクソン3ポリペプチドをコードする)、配列番号:97 (INSP144エクソン4ポリペプチドをコードする)、配列番号:99 (INSP144エクソン5ポリペプチドをコードする)、配列番号:101 (INSP144エクソン6ポリペプチドをコードする)、配列番号:103 (INSP144エクソン7ポリペプチドをコードする)、配列番号:105 (INSP144エクソン8ポリペプチドをコードする)、配列番号:107 (INSP144エクソン9ポリペプチドをコードする)、配列番号:109 (INSP144エクソン10ポリペプチドをコードする)、配列番号:111 (INSP144エクソン11ポリペプチドをコードする)、配列番号:113 (INSP144エクソン12ポリペプチドをコードする)、配列番号:115 (INSP144エクソン13ポリペプチドをコードする)、配列番号:117 (INSP144エクソン14ポリペプチドをコードする)、配列番号:119 (INSP144エクソン15ポリペプチドをコードする)、配列番号:121 (INSP144エクソン16ポリペプチドをコードする)、配列番号123 (INSP144エクソン17ポリペプチドをコードする)、配列番号:125 (INSP144ポリペプチドをコードする)、配列番号:127 (クローン化INSP141ポリペプチドをコードする)、配列番号:129 (クローン化ヒスチジントグINSP141ポリペプチドをコードする)、配列番号:131 (クローン化成熟INSP141ポリペプチドをコードする)、配列番号:133 (クローン化成熟ヒスチジントグINSP1415ポリペプチドをコードする)、配列番号:135 (クローン化INSP142ポリペプチドをコードする)、配列番号:137 (クローン化INSP143ポリペプチドをコードする)、配列番号:139 (クローン化ヒスチジントグINSP143ポリペプチドをコードする)、配列番号:141 (クローン化成熟INSP143ポリペプチドをコードする)、配列番号:143 (クローン化成熟ヒスチジントグINSP143ポリペプチドをコードする)、配列番号:145 (vWFAドメインペプチド配列-INSP141-INSP142-INSP143-INSP144をコードする)、配列番号:147 (ANT_IGドメインペプチド配列-INSP141ポリペプチドをコードする)、配列番号:149 (ANT_IGドメインペプチド配列-INSP142-INSP143-INSP144をコードする)に示す核酸配列を含むか、又はこれら配列のいずれかの重複等価物若しくは断片である

。

本発明はさらに上記に示す核酸配列のいずれかから成る精製核酸分子を提供する。

【0024】

第三の特徴では、本発明は、高ストリンジェンシー条件下で本発明の第二の特徴の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸分子を提供する。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は以下のように規定される：50%ホルムアミド、5xのSSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20 µg/mLの変性せん断サケ精子DNAを含む溶液で42℃で一晩のインキュベーション、続いて0.1xのSSCで約65℃でフィルターを洗浄。

第四の特徴では、本発明は、ベクター（例えば発現ベクター）を提供し、前記ベクターは本発明の第二又は第三の特徴の核酸分子を含む。

第五の特徴では、本発明は、本発明の第四の特徴のベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

第六の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質と特異的に結合するリガンドを提供する。好ましくは、前記リガンドは、本発明の第一の特徴のvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質の機能を阻害する。本発明のポリペプチドに対するリガンドは種々の形態でもたらされ得る。それらの形態には天然又は改変基質、酵素、レセプター、有機小分子（例えば2000Daまで、好ましくは800Da又はそれより小さい天然又は合成小有機分子）、ペプチド模倣物、無機分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体、上述の構造的又は機能的模倣物が含まれる。本発明のvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質は細菌毒素、例えば炭疽毒素、ボツリヌス菌C2毒素と結合することができる。本発明はさらに、細菌毒素と複合体を形成した、本発明の第一の特徴のポリペプチドを提供する。

【0025】

第七の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させるために有効であるか、又は本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節するために有効な化合物を提供する。

そのような化合物は、本明細書に開示するアッセイ及びスクリーニング方法を用いて同定することができる。

本発明の第七の特徴の化合物は、前記遺伝子の発現レベル又は前記ポリペプチドの活性を増加させるか（アゴナイズ）又は低下させる（拮抗する）ことができる。

重要なことには、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144エクソンポリペプチド並びにINSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドの機能を明らかにすることによって、疾患の治療及び/又は診断に有効な化合物を同定することができるスクリーニング方法の設計が可能になる。本発明の第六及び第七の特徴のリガンド及び化合物はそのような方法を用いて同定することができる。これらの方法は本発明の特徴として含まれる。

本発明のまた別の特徴は、候補薬調節因子、特にvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質関連疾患に対して活性を有する候補薬のスクリーニングの標的としてINSP141、INSP142、INSP143及びINSP144遺伝子又はポリペプチドを使用することにある。

本発明のさらに別の特徴は、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質関連疾患の治療用化合物をスクリーニングする方法にある。前記方法は、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144遺伝子又はポリペプチド若しくは前記の断片と結合する化合物の能力を決定することを含む。

本発明のさらに別の特徴は、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質関連疾患の治療用化合物をスクリーニングする方法にある。前記方法は、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144遺伝子又はポリペプチド若しくは前記の断片の活性の調節をテストすることを含む。

【0026】

第八の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の

10

20

30

40

50

特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質が関与する疾患の治療又は診断に使用するために提供する。

本発明のポリペプチド又はその断片（例えばウィルブランド(Willebrand)因子(vWFA) A型ドメイン(VWA)及び/又はANT_IGドメインを含む断片）は、好ましくは他の炭疽毒素レセプター様タンパク質（例えばTEM8又はCMG2）が治療活性を明らかにしている疾患の診断及び/又は治療で用いられる。

特に、本発明のポリペプチドは、細菌毒素のブロックに用いることができる。本発明のポリペプチドの可溶性vWFAドメイン（MIDASモチーフにわたって、極めて重要な残基は図9に示されている）及び/又は可溶性ANT_IGドメインは、細菌毒素（例えば炭疽毒素、ボツリヌス菌C2毒素）のブロックに、したがって細菌感染の予防又は治療に用いることができる。

本発明のポリペプチドの可溶性vWFAドメイン及び/又はANT_IGドメインは、脂質尾部（例えばグリコシルホスファチジルイノシトール(GPIテール)によって固定され得る。前記尾部はブロックされる細菌毒素のPAサブユニットに対するレセプターとして機能するであろう。Liu and Heppila (J Biol Chem 2003, 278 (7):5227-5234)は、TEM8の細胞外ドメインとGPIアンカー配列uPARとを結合させることを開示している。

本発明のポリペプチド、特に本発明のポリペプチドの可溶性vWFAドメイン（MIDASモチーフを介する、極めて重要な残基は図9に示されている）及び/又は可溶性ANT_IGドメインはまた、癌の治療にも有用であり得る。

本発明のポリペプチド、特に膜結合アイソフォームINSP143及びINSP144のアンタゴニストはまた、細菌毒素に対して、及び癌の治療にも用いることができる。好ましくは、そのようなアンタゴニストはモノクローナル抗体又はアンチセンス核酸である。好ましくは、前記アンタゴニストは、vWFAドメイン（より具体的にはMIDASモチーフ）及びANT_IGドメインを標的とする。

【0027】

治療が可能な更なる疾患には、細胞増殖性異常（新形成、メラノーマ、肺、結腸直腸、乳房、膵臓、頭部頸部の腫瘍、及び他の固形腫瘍を含む）、骨髄増殖性異常（例えば白血病、非ホジキンリンパ腫、白血球減少症、血小板減少症、血管増殖性異常、カボジ肉腫）、自己免疫疾患/炎症性疾患（アレルギー、炎症性腸疾患、関節炎、乾癬及び気道の炎症、喘息、及び器官移植拒絶を含む）、心脈管系異常（高血圧、浮腫、狭心症、アテローム性硬化症、血栓症、敗血症、ショック、再灌流損傷及び虚血を含む）、神経学的異常（中枢神経系疾患、アルツハイマー病、脳損傷、筋萎縮性側索硬化症及び疼痛を含む）、发育異常、代謝異常（真性糖尿病、骨粗しょう症、肥満、エイズ及び腎疾患を含む）、感染（ウイルス感染、細菌感染、真菌感染及び寄生虫感染を含む）並びに他の病的状態が含まれる。好ましくは、前記疾患は、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質が関与するものである。vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質が関与する疾患の例には以下が含まれる：細菌感染、細菌毒素障害、炭疽、毒素（例えば細菌毒素）のブロック、癌、腫瘍内皮、大腸癌、膀胱癌、食道癌、肺癌、メラノーマ、若年性ヒアリン線維腫症(JFH)、乳児全身性ヒアリン症(ISH)、フォン・ウィルブランド病、ベスレム筋障害、栄養障害型表皮水疱症、血栓症、血小板介在凝固の調節、自己免疫疾患及び炎症。これらの分子はまた、そのような疾患の治療用医薬の製造に用いることができる。これらの分子はまた、避妊又は不妊を含む生殖異常の治療に用いることができる。

本発明者らが入手し、本明細書に開示した発現の結果は、結腸及び回腸IBD生検サンプル及び乾癬の皮膚生検におけるINSP142の意外な限定的発現を示している。この特異的な発現パターンは、炎症性腸疾患、皮膚疾患又は炎症におけるINSP142の密接な関与を結論付けた。

【0028】

本発明のポリヌクレオチド又は対応するポリペプチドを特徴付けるこれらの驚くべき特

性は、これらポリヌクレオチド又はポリペプチドを薬剤又は医薬組成物の製造に特に適切にする。

特に好ましい疾患は、炎症性腸疾患、毒素関連疾患、癌、皮膚疾患、炎症、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、接触皮膚炎、アトピー性湿疹、血液及びリンパ系の癌、皮膚癌、消化器系の癌、尿路系の癌、乳癌、卵巣癌、婦人科の癌、絨毛癌、肺癌、脳腫瘍、骨腫瘍、類癌腫瘍、大腸癌、鼻咽頭癌、後腹膜肉腫、軟組織腫瘍、甲状腺癌、精巣癌又は肝癌である。好ましくは、前記毒素関連疾患は、細菌毒素関連疾患、炭疽又はボツリヌス菌C2毒素関連疾患から選択される。好ましくは、前記炎症性疾患は、クローン病、潰瘍性大腸炎から選択される。好ましくは、前記皮膚疾患は乾癬である。好ましくは、“癌”は、血液及びリンパ系の癌、皮膚癌、消化器系の癌、尿路系の癌、乳癌、卵巣癌、婦人科の癌、絨毛癌、肺癌、脳腫瘍、骨腫瘍、類癌腫瘍、鼻咽頭癌、後腹膜肉腫、軟組織腫瘍、甲状腺癌、精巣の癌又は肝癌から選択される。

10

好ましくは、前記炎症性疾患はクローン病又は潰瘍性大腸炎から選択される。

好ましくは、前記皮膚疾患は、乾癬、接触性皮膚炎又はアトピー性湿疹である。

本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六又は第七の特徴のこれらの部分はまた、そのような疾患を治療する医薬の製造で用いることができる。

【0029】

第九の特徴では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供する。前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベル、又は本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を前記患者由来の組織で判定し、前記発現又は活性のレベルをコントロール（対照）レベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患の指標である。そのような方法は、好ましくはin vitroで実施されるであろう。同様な方法を疾患の治療を患者でモニターするために用いることができ、ポリペプチド又は核酸分子の発現又は活性のレベルがある期間にわたってコントロールレベルに対して変化すれば疾患の緩解の指標となる。

20

本発明の第一の特徴のポリペプチドを検出する好ましい方法は以下の工程を含む：（a）本発明の第六の特徴のリガンド（例えば抗体）を生物学的サンプルとリガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；及び（b）前記複合体を検出する工程。

当業者には明らかなように、例えば短いプローブによる核酸のハイブリダイゼーション、点変異解析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、及び異常なタンパク質レベルを検出するために抗体を用いる方法のように、本発明の第九の特徴に一致する多数の異なる方法が存在する。同様な方法を短期又は長期にわたって用いて、疾患の治療を患者でモニターすることができる。本発明はまた疾患を診断するこれらの方法で有用なキットを提供する。

30

好ましくは、本発明の第九の特徴の方法によって診断される疾患は、vWFA及び/又はANT-IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質が上記に記載したように関与する疾患である。

【0030】

十番目の特徴では、本発明は、vWFA及び/又はANT-IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質として本発明の第一の特徴のポリペプチドの使用を提供する。vWFA及び/又はANT-IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質としての本発明のポリペプチドの適切な使用には、細胞増殖、代謝又は分化の調節物質としての使用、レセプター/リガンド対の部分としての使用、及び生理学的又は上記に提示したリストから選択される病的状態の診断マーカーとしての使用が含まれる。さらに適切な使用には、このカテゴリーのタンパク質が関与する疾患及び状態の治療及び診断で有用なリガンド及び他のアゴニスト又はアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法における使用が含まれる。

40

十一番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のペクター、又は本発明の第

50

五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を、医薬的に許容できる担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。

【0031】

十二番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を、疾患の診断又は治療のための医薬の製造に使用するために提供する。前記疾患は例えば以下である（ただしこれらに限定されない）：細胞増殖性異常（例えば新形成、メラノーマ、肺、結腸直腸、乳房、膵臓、頭部及び頸部の腫瘍、並びに他の固形腫瘍）、骨髓増殖性異常（例えば白血病、非ホジキンリンパ腫、白血球減少症、血小板減少症、血管増殖性異常、カポジ肉腫）、自己免疫疾患/炎症性疾患（アレルギー、炎症性腸疾患、関節炎、乾癬及び気道の炎症、喘息、及び器官移植拒絶を含む）、心脈管系異常（高血圧、浮腫、狭心症、アテローム性硬化症、血栓症、敗血症、ショック、再灌流損傷及び虚血を含む）、神経学的異常（中枢神経系疾患、アルツハイマー病、脳損傷、筋萎縮性側索硬化症及び疼痛を含む）、発育異常、代謝異常（真性糖尿病、骨粗しょう症、肥満、エイズ及び腎疾患を含む）、感染（ウイルス感染、細菌感染、真菌感染及び寄生虫感染を含む）並びに他の病的状態。好ましくは、前記疾患は、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質が関与するものである。vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質が関与する疾患の例には以下が含まれる：細菌感染、細菌毒素障害、炭疽、毒素（例えば細菌毒素）のブロック、癌、腫瘍内皮、大腸癌、膀胱癌、食道癌、肺癌、メラノーマ、若年性ヒアリン線維腫症（JFH）、乳児全身性ヒアリン症（ISH）、フォン・ウィルブランド病、ベスレム筋障害、栄養障害型表皮水疱症、血栓症、血小板介在凝固の調節、自己免疫疾患及び炎症。

【0032】

十三番目の特徴では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供する。前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を患者に投与することを含む。

症状を有する患者において本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現、又は本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性が、健常な者での前記発現又は活性レベルと比較して低い疾患の場合、患者に投与されるポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物はアゴニストであるべきである。逆に、症状を有する患者において前記ポリペプチドの天然の遺伝子の発現又は活性が、健常な者での前記発現又は活性レベルと比較して高い疾患の場合、患者に投与されるポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物はアンタゴニストであるべきである。そのようなアンタゴニストの例にはアンチセンス核酸分子、リボザイム及びリガンド（例えば抗体）が含まれる。

INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドはvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質であり、したがって多くの症状で役割を有する。INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドのアンタゴニストは、それらがこれら症状を調節する方法を提供するので特に重要である。

十四番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドを高レベルで又は低レベルで発現するか、又は前記が発現されないように形質転換されたトランスジェニック、又はノックアウト非ヒト動物を提供する。そのようなトランスジェニック動物は、疾患の研究のための非常に有用なモデルであり、さらにまた、そのような疾患の治療又は診断に有効な化合物の同定のためのスクリーニング計画でも用いることができる。

【0033】

本明細書で用いられる、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチド又は核酸分子と実質的に類似する機能的又は構造的な特徴を有するタンパク質又は核酸を指す。タンパク質の機能的等価物は、特定の機能の実施のために必要とされる変化に応じてそのような変化を含むことができる。“機能的等価物”という用語は、分子の断片、変種、ハイブリッド、

変種、類似体又は化学的誘導体を含むことを意図する。

好ましくは、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチドの任意の1以上の機能的活性を示すタンパク質又は核酸分子であり得る。

好ましくは、“機能的等価物”は、生物学的活性又は機能の測定のための適切なアッセイでINSP141、INSP142、INSP143若しくはINSP144又はそれらの断片と比較して、実質的に類似の活性を示すタンパク質又は核酸であり得る。好ましくは、“機能的等価物”は、生物学的活性又は機能の測定のための適切なアッセイでINSP141、INSP142、INSP143若しくはINSP144又はそれらの断片と比較して、同一又はより高い活性を示すタンパク質又は核酸であり得る。好ましくは、“機能的等価物”は、生物学的活性又は機能の測定のための適切なアッセイにおいてINSP141、INSP142、INSP143若しくはINSP144又はそれらの断片と比較して、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、100%又はそれより高い活性を示すタンパク質又は核酸であり得る。

好ましくは、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチドと実質的に類似するin vivo又はin vitro活性を示すことができるタンパク質又は核酸であり得る。好ましくは、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチドの対応する部分が他の細胞性又は細胞外分子と相互作用する態様と実質的に類似の態様でそれら分子と相互作用することができるタンパク質又は核酸であり得る。例えば、“機能的等価物”は、免疫アッセイにおいて、本発明のポリペプチドの対応ペプチド（すなわち“機能的等価物”を達成するためにそのアミノ酸配列が改変されたペプチド）又は本発明のペプチドそのものと抗体との結合を低下させることができよう（前記抗体は本発明のポリペプチドの対応ペプチドに対して生成されたものであるとする）。等モル濃度の機能的等価物は、前述の対応するペプチドの結合を少なくとも約5%、好ましくは約5%から10%、より好ましくは約10%から25%、さらに好ましくは約25%から50%、もっとも好ましくは約40%から50%も低下させるであろう。

例えば、機能的等価物は完全に機能的であってもよいが、また1つ以上の活性を欠いていてもよい。したがって、本発明では、変動は、例えばvWFA及び/又はANT_IGドメインを所有していることを反映する前記ポリペプチドの機能に影響を与えることができる。

【0034】

本発明を利用するために用いることができる標準的な技術及び方法の概要は下記に提供される。本発明は、記載の特定の方法、プロトコル、細胞株、ベクター及び試薬に限定されないことは理解されよう。本明細書で用いられる用語は単に具体的な実施態様を記載する目的のためであり、さらに、この用語が本発明の範囲を限定することを意図しないこともまた理解されよう。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲の語句によってのみ制限される。

ヌクレオチド及びアミノ酸の標準的な略語が本明細書では用いられる。

別に指定がなければ、本発明の実施には、通常の分子生物学、微生物学、組換えDNA技術及び免疫学の技術が用いられ、前記技術は当業者の技量の範囲内である。

そのような技術は文献で完全に説明されている。参考のための特に適切な成書には以下が含まれる：Sambrook Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) ; DNA Clonig, Vokumes I and II (D.N. Glover ed. 1985) ; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984) ; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984) ; Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984) ; Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986) ; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) ; the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.)、特に154及び155巻 ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds. 1987, Academic Press, Lomdon) ; Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer Verlag, N.Y.) ; 及びHandbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds. 1986) 。

10

20

30

40

50

【0035】

本明細書で用いられる、“ポリペプチド”という用語には、2つ又は3つ以上のアミノ酸が互いにペプチド結合又は改変ペプチド結合（すなわちペプチドイソステア）によって結合されたものを含む、任意のペプチド又はタンパク質が含まれる。この用語は、短い鎖（ペプチド及びオリゴペプチド）及び長い鎖（タンパク質）の両者を指す。

本発明のポリペプチドは成熟タンパク質の形態であっても、プレ-、プロ-又はプレプロ-タンパク質であってもよい。後者は、プレ-、プロ-又はプレプロ-部分の切断によって活性化され、活性を有する成熟ポリペプチドを生成する。そのようなポリペプチドでは、前記プレ-、プロ-又はプレプロ-配列はリーダー配列又は分泌配列でもよく、又は成熟ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列でもよい。

10

本発明の第一の特徴のポリペプチドは融合タンパク質の一部を形成することができる。

例えば、1つ以上の付加されたアミノ酸配列を含むことはしばしば有利である。前記付加される配列は、分泌配列若しくはリーダー配列、プロ-配列、生成を促進する配列、又はより高い安定性を例えば組換え体の生成中に付与する配列を含むことができる。また別には、又は前記に加えて、成熟ポリペプチドは別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えばポリエチレングリコール）と融合させることができる。

さらに好ましい実施態様では、本発明のポリペプチド（INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144と少なくとも85%の相同性を有する配列を含むことができる）は融合タンパク質である。

20

これらの融合タンパク質は、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144と少なくとも85%の相同性を有する配列を、異種タンパク質配列のコード配列に対してイン-フレームで含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをクローニングすることによって入手することができる。

【0036】

本明細書で用いるとき、“異種”という用語は、ヒトINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド以外の任意のポリペプチドを指している。融合タンパク質のN-又はC-末端に含まれ得る異種配列の例には、膜結合タンパク質の細胞外ドメイン、免疫グロブリン定常領域（Fc領域）、マルチマー化ドメイン、細胞外タンパク質のドメイン、シグナル配列、輸送配列及びアフィニティークロマトグラフィーによる精製を可能にする配列が含まれる。

30

これら異種配列の多くは、発現プラスミドとして市場で入手できる。なぜならば、これら配列は、それらと融合されるタンパク質の特有の生物学的活性を顕著に損なうことなく付加的特性を提供するために融合タンパク質に一般的に含まれるためである（K. Terpe, 2003, Appl Microbiol Biotechnol, 60:523-33）。そのような付加的特性の例は、体液中でのより長い半減期、細胞外局在、又はいわゆる“ヒスチジンタグ”（Gentz et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:821-4）を形成する一連のヒスチジン若しくは“HA”タグによって可能になる容易な精製手段、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープ（Wilson et al. Cell, 1994, 37:767-78）である。必要な場合には、異種配列は、タンパク質切断によって、例えばタンパク質と異種配列との間にタンパク質切断部位を挿入し、精製融合タンパク質を適切なプロテアーゼに暴露することによって除去することができる。これらの特質は、融合タンパク質の製造及び医薬組成物の調製でのそれらの使用を促進するので融合タンパク質にとって特に重要である。例えば、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドは、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144のC-末端に融合させた6-ヒスチジンペプチドという手段によって精製することができる。融合タンパク質が免疫グロブリン領域を含むとき、融合は直接的であっても、短いリンカーペプチドを介していてもよい。短いリンカーペプチドは、長さが1-3アミノ酸残基の短いものであっても、長いもの、例えば13アミノ酸残基であってもよい。リンカーは、例えば、本発明の物質の配列と免疫グロブリン配列との間に導入された、配列E-F-M（Glu-Phe-Met）のトリペプチドであっても、またはGlu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Ph

40

50

e-Met（配列番号:151）を含む13-アミノ酸リンカー配列でもよい。生成された融合タンパク質は、改善された特性、例えば体液中での滞留時間の延長（すなわち半減期の延長）、比活性の増加、発現レベルの増加を有し、又は融合タンパク質の精製が促進される。

【0037】

好ましい実施態様では、タンパク質はIg分子の定常領域と融合される。好ましくは、例えばヒトのIgG1のCH2及びCH3ドメインのような重鎖領域と融合される。アイソフォームIgG2若しくはIgG4、又は他のIgクラス、例えばIgM又はIgAのようなIg分子の他のアイソフォームもまた、本発明の融合タンパク質の生成に適している。融合タンパク質は、モノマーでもマルチマーでも、又はヘテロ-マルチマーでもホモ-マルチマーでもよい。

INSP141、INSP142、又はINSP143若しくはINSP144の細胞外部分は、そのもの自体としても、Fc融合のような融合タンパク質の成分としても、及び/又は別の薬剤との組み合わせでも有用である。

さらに好ましい実施態様では、機能的な誘導体は、1つ以上の官能基（アミノ酸残基の1つ以上の側鎖として現れる）に結合した少なくとも1つの部分を含む。好ましくは、前記部分はポリエチレン（PEG）部分である。PEG化は、公知の方法（例えばWO99/55377に記載されている方法）によって実施することができる。

ポリペプチドは、20個の遺伝子コードアミノ酸以外の、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）又は当分野で公知である化学的改変技術によって改変されたアミノ酸を含んでいてもよい。本発明のポリペプチドに一般的に存在することができる公知の改変にはグリコシル化、脂質付加、硫酸化、例えばグルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化、及びADPリボシル化がある。他の潜在的な改変には、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、GPIアンカー形成、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、タンパク質へのトランスファー-RNA媒介アミノ酸添加（例えばアルギニル化）、及びユビキチン化が含まれる。

【0038】

改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びアミノ又はカルボキシ末端を含む、ポリペプチドのいずれの場所に生じていてもよい。実際、ポリペプチドのアミノ又はカルボキシ末端又はその両端の共有結合的改変によるブロッキングは、天然に存在するポリペプチド及び合成ポリペプチドで一般的であり、そのような改変は本発明のポリペプチドに存在し得る。

ポリペプチドに生じる改変は、しばしばどのように前記ポリペプチドが生成されるかの関数であろう。組換えによって生成されるポリペプチドの場合、改変の性質及び程度は、大きな比率で、個々の宿主細胞の翻訳後修飾能力及び注目するポリペプチドのアミノ酸配列に存在する改変シグナルによって決定されるであろう。例えば、グリコシル化パターンは宿主細胞の種々のタイプ間で変動する。

本発明のポリペプチドは任意の適切な態様で調製することができる。そのようなポリペプチドには単離された天然に存在するポリペプチド（例えば細胞培養由来の精製形態）、組換え生成ポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成により生成されたポリペプチド、又は前記方法の組合せにより生成されたポリペプチドが含まれる

本発明の第一の特徴の機能的に等価のポリペプチドは、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドと相同なポリペプチドであり得る。ポリペプチドの一方の配列が他方のポリペプチドの配列と十分に高度な同一性又は類似性を有する場合、これらの2つのポリペプチドは、本明細書で当該用語が用いられるように“相同”である。“同一性”とは、アラインメントを実施した複数の配列の個々の任意の位置においてアミノ酸残基が前記配列間で同一であることを示す。“類似性”とは、アラインメントを実施した配列の個々の任意の位置

10

20

30

40

50

においてアミノ酸残基が前記配列間で類似のタイプであることを示す。同一性及び類似性の程度は容易に計算することができる (Computational Molecular Biology, A.M. Leske, ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, D.W. Smith ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, G. von Heinje Academic Press, 1987; 及び Sequence Analysis Primer, M. Gribskov and J. Devereux eds., M. Stockton Press, New York, 1991)。

【0039】

したがって相同なポリペプチドには、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144INSP201ポリペプチドの天然の生物学的変種 (例えば前記ポリペプチドが由来する種の中での対立遺伝子座変種、又は地理的変種) 及び変異体 (例えばアミノ酸置換、挿入又は欠失を含む変異体) が含まれる。そのような変種には、1つ以上のアミノ酸残基が保存的又は非保存的アミノ酸残基 (好ましくは保存的アミノ酸残基) で置換されているポリペプチドが含まれ得る。そのような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものであってもなくてもよい。典型的な前記置換は、Ala、Val、Leu及びIle間で; Ser及びThr間で; 酸性残基Asp及びGlu間で; Asn及びGln間で; 塩基性残基Lys及びArg間で; 又は芳香族残基Phe及びTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつかアミノ酸、すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、又は1つだけのアミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失又は添加されてある。特に好ましいものは、前記タンパク質の特性及び活性を変化させないサイレント置換、付加及び欠失である。これに関してまた特に好ましいものは保存的置換である。そのような変異体には、1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドが含まれる。

【0040】

本発明にしたがえば、いずれの置換も好ましくは“保存的”又は“安全な”置換であるべきで、そのような置換は一般的には、十分に類似する化学的特性 (例えば塩基性、陽性荷電アミノ酸がまた別の塩基性、陽性荷電アミノ酸で置き換えられるべきである) を有するアミノ酸を導入し、分子の構造及び生物学的機能を保存する置換と定義される。

文献には、タンパク質の配列及び/又は構造における統計的及び物理化学的研究をもとにして保存的アミノ酸置換の選択を実施することができる多くのモデルが提供されている (S.I. Rogov and A.N. Nekrasov, 2001)。タンパク質設計実験によって、アミノ酸の特定のサブセットの使用が折りたたみ可能で活性を有するタンパク質を生成することができることが示され、タンパク質構造においてより容易に順応し、機能的及び構造的ホモログ並びにパラログの検出に用いることができるアミノ酸の“同義”置換物の分類に役立った (L.R. Murphy et al. 2000)。同義アミノ酸のグループ及びより好ましい同義アミノ酸のグループは表1に示されている。

特定の非保存的変異もまた、種々の目的をもつ本発明のポリペプチドに導入することができる。vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質のアフィニティーを低下させる変異は、再使用されリサイクルされるその能力を高め、潜在的にその治療能力を高めることができる (C.R. Robinson, 2002)。本発明のポリペプチドに最終的に存在する免疫原性エピトープはワクチンの開発に利用することができ (S. Stevanovic, 2002)、または、タンパク質の安定性を高めるために変異を選択する公知の方法に従って改変し、さらにはそれらを修正することによって除去することができる (B. van den Burg and V. Eijssink, 2002; WO02/05146, WO00/34317, WO98/52976)。

【0041】

ペプチド模倣物に含まれるアミノ酸誘導体の好ましいまた別の同義グループは表2に定義されているものである。アミノ酸誘導体の非網羅的リストにはまた以下が含まれる: アミノイソ酪酸 (Aib)、ヒドロキシプロリン (Hyp)、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-COOH、インドリン-2カルボン酸、4-ジフルオロ-プロリン、L-チアゾリジン-4-カルボン酸、L-ホモプロリン、3,4-ジヒドロ-プロリン、3,4-ジヒドロキシ-フェニルアラニン

、シクロヘキシル-グリシン及びフェニルグリシン。

“アミノ酸誘導体”とは、20の遺伝的にコードされる天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸又はアミノ酸様化学物質を指す。特に、アミノ酸誘導体は、置換又は非置換、直鎖、分枝若しくは環式アルキル部分を含むことができ、さらに1つ以上のヘテロ原子を含むことができる。アミノ酸誘導体はde novoに生成するか、又は市販の供給源 (Calbiochem-Novabiochem AG, Switzerland; Bachem, USA) から入手することができる。

タンパク質の構造及び機能を調べ、及び/又はこれを改善するために、in vitro及びin vivo翻訳系を用いる、非天然アミノ酸誘導体をタンパク質に取り込むための種々の方法が文献に開示されている (D.A. Dougherty, 2000)。非ペプチド模倣物と同様にペプチド模倣物の合成及び開発もまた当分野では周知である (A. Golebiowski et al. 2001; V.J. Hruby and P.M. Balse 2000; T.K. Sawyer, in “Structure Based Drug Design”, edited by P. Veerapandia, Marcel Dekker Inc., pg.557-663, 1997)。

典型的には、2つのポリペプチド間の30%を超える同一性は、機能的等価性を示していると考えられる。好ましくは、本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド又はその活性な断片と80%を超える配列同一性の程度を有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ85%、90%、95%、98%又は99%を超える同一性の程度を有する。

【0042】

本発明の第一の特徴の機能的等価ポリペプチドはまた、構造的アラインメントの1つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであろう。例えば、バイオペンジウム (Biopenidium (商標)) 検索データベースを作成するために用いられた検索ツールの1つの特徴を構成するインファーマティカ・ゲノムスレッダー (Inpharmatica Genome Threader) 技術を用いて (PCT出願WO01/69507を参照されたい)、現時点では未知の機能をもつ、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドと比較して低い配列同一性を有するが、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド配列と有意な構造相同性を共有するためにvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質であると予想されるポリペプチドを同定することができる。“有意な構造相同性”とは、インファーマティカ・ゲノムスレッダーが、2つのタンパク質は10%以上の確実性で構造的相同性を共有すると予想することを意味する。

本発明の第一の特徴のポリペプチドはまた、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの断片、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの機能的等価物の断片を含むが、ただし、これら断片がvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質であるか、又はvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質と共通の抗原決定基を有することを条件とする。

本明細書で用いられる、“断片”という用語は、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド、又はその機能的等価物のアミノ酸配列の一部 (全体ではない) と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記断片は、前記配列から少なくともn個の連続するアミノ酸を含むべきであり、さらに、個々の配列に応じてnは好ましくは7以上 (例えば8、10、12、14、16、18、20またはそれより多い) である。小さな断片が抗原決定基を形成することができる。

【0043】

好ましくは、本発明の核酸は長さが10 - 2000ヌクレオチド、好ましくは100 - 1750ヌクレオチド、好ましくは500 - 1500、好ましくは600 - 1200、好ましくは長さが750 - 1000ヌクレオチドである。本発明のポリペプチドは、好ましくは長さが10 - 700アミノ酸、好ましくは50 - 600、好ましくは100 - 500、好ましくは200 - 400、好ましくは長さが300 - 375アミノ酸である。

10

20

30

40

50

完全長の INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの断片は、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド内のそれぞれ2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17の隣接エクソン配列の組合せから成ることができる。

そのような断片は“独立して”いてよく、すなわちそれらは他のアミノ酸又はポリペプチドの部分ではなく、他のアミノ酸又はポリペプチドと融合してなくてもよく、それらはより大きなポリペプチド内に含まれていてもよい（それら断片は、より大きなポリペプチドの部分又は領域を形成する）。より大きなポリペプチド内に含まれているとき、本発明の断片はもっとも好ましくはただ1つの連続する領域を形成する。例えば、ある種の好ましい実施態様は、断片のアミノ末端に融合されたプレ-及び/又はプロ-ポリペプチド領域を有する断片、及び/又は断片のカルボキシ末端に融合された付加領域を有する断片に関する。しかしながら、いくつかの断片が単一のより大きなポリペプチド内に含まれていてもよい。

10

【0044】

本発明のポリペプチド又はそれらの免疫原性断片（少なくとも1つの抗原決定基を含む）を用いて、リガンド（例えばポリクローナル又はモノクローナル抗体、それらは前記ポリペプチドに対して免疫特異的である）を作成することができる。そのような抗体を利用して、本発明のポリペプチドを発現するクローンを単離又は同定するか、又は本発明のポリペプチドをアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。前記抗体はまた、当業者には明白なように、他の適用の中でとりわけ診断又は治療促進物質として利用することができる。

20

“免疫特異的”という用語は、抗体が本発明のポリペプチドに対して、従来技術の他の関連するポリペプチドに対するアフィニティーよりも実質的により強いアフィニティーを有することを意味する。本明細書で用いられる、“抗体”という用語は、完全な分子と同様に問題の抗原決定基と結合することができるその断片、例えばFab、F(ab')₂、及びFvを指す。そのような抗体は、したがって本発明の第一の特徴のポリペプチドと結合する。

“実質的により強いアフィニティー”とは、公知のvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質、好ましくはATR-様タンパク質と比較した時、本発明のポリペプチドに対するアフィニティーに測定可能な増加が存在することを意味する。

好ましくは、前記アフィニティーは、公知のvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質に対するよりも、本発明のポリペプチドに対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、10³倍、10⁴倍、10⁵倍、10⁶倍又はそれより強い。

30

好ましくは、公知のvWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質と比較した時、本発明のポリペプチドに対するアフィニティーにおいて測定可能な増加が存在する。

ポリクローナル抗体が望ましい場合は、選択した哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ヤギ又はウマを本発明の第一の特徴のポリペプチドで免疫することができる。前記動物の免疫に用いられるポリペプチドは、組換えDNA技術によって誘導しても、又は化学的に合成してもよい。所望の場合は、前記ポリペプチドは担体タンパク質と結合させることができる。ポリペプチドを化学的に結合させることができる一般的に用いられる担体には、ウシ血清アルブミン、チログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニンが含まれる。

40

続いて前記結合させたポリペプチドを用いて、動物を免疫することができる。前記免疫動物の血清を採集し、公知の方法にしたがって、例えば免疫アフィニティークロマトグラフィーによって処理する。

【0045】

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対するモノクローナル抗体もまた当業者は容易に作成することができる。ハイブリドーマ技術を用いるモノクローナル抗体を作成する一般的な方法は周知である（例えば以下を参照されたい：G. Kohler and C. Milstein, 1975, Nature 256:495-497 ; Kozbor et al. 1983, Immunology Today 4:72 ; Cole et al. 1985, 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc.）。

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対して生成されたモノクローナル抗体のパネルを

50

種々の特性、すなわちアイソタイプ、エピトープ、アフィニティーなどについてスクリーニングすることができる。モノクローナル抗体は、それらを誘導した個々のポリペプチドの精製で特に有用である。また別には、注目するモノクローナル抗体をコードする遺伝子を、例えば当分野で公知のPCR技術によってハイブリドーマから単離し、適切なベクターでクローニングし発現させることができる。

非ヒト可変領域がヒトの定常領域に結合又は融合されているキメラ抗体（例えば以下を参照されたい：Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:3439）もまた有用であり得る。

前記抗体を改変し（例えばヒト化によって）、個体における免疫原性を低下させることができる（例えば以下を参照されたい：Jones et al. Nature 1986, 321:522；Verhoeyen et al. Science 1988, 239, 1534；Kabat et al. J. Immunol. 1991, 147:1709；Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:10029；Gorman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:34181；及びHodgson et al. Bio/Technology 1991, 9:421）。本明細書で用いられる、“ヒト化抗体”という用語は、非ヒトドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメイン中のCDRアミノ酸及び選択した他のアミノ酸が、ヒト抗体中で等価なアミノ酸の代わりに代用された抗体分子を指す。したがってヒト化抗体はヒト抗体に極めて類似するが、ドナー抗体の結合能力を有する。

さらに別の態様では、前記抗体は“二重特異性”抗体であってもよい。すなわち2つの異なる抗原結合ドメインを有し、各ドメインは異なるエピトープに向けられた抗体であってよい。

ファージディスプレイ技術を用いて、関連抗体の保持についてスクリーニングしたヒトのリンパ球のPCR増幅V-遺伝子レパートリーから、又はナイーブライブラリーから、本発明のポリペプチドに対して結合活性を有する抗体をコードする遺伝子を選別することができる（J. McCafferty et al. 1990, Nature 348:552-554；J. Marks et al. 1992, Biotechnology 10:779-783）。これら抗体のアフィニティーは、チェーンシャッフリングによっても改善することができる（T. Clackson et al. 1991, Nature 352:624-628）。

上記技術によって生成された抗体は、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、それらは免疫アッセイ、放射性免疫アッセイ（RIA）又は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）における試薬として用いることができるという点で更なる有用性を有する。これらの適用では、抗体は、解析により検出可能な試薬（例えば放射性同位体、蛍光分子又は酵素）で標識することができる。

【0046】

本発明の第二及び第三の特徴の好ましい核酸分子は、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148又は配列番号:150に示す配列のポリペプチド及び機能的に等価なポリペプチドをコードする核酸分子である。これら核酸分子は、本明細書に記載する方法及び応用で用いることができる。本発明の核酸分子は好ましくは、本明細書に開示する配列に由来する少なくともnの連続するヌクレオチドを含み、ここでnは個々の配列に応じて10又はそれより大きい（例えば12、14、15、18、20、25、30、35、40又はそれより大きい）。

本発明の核酸分子はまた、上記に記載した核酸分子に対して相補的である配列を含む（例えばアンチセンス又はプローブの目的のため）。

本発明の核酸分子はRNAの形態（例えばmRNA）であってもよく、又はDNAの形態（例えばcDNA、合成DNA又はゲノムDNAを含む）であってもよい。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学的合成技術によって、又は前記の組合せによって入手することができる。前記核酸分子は、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成を用いて化学的な合成によって、ゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーから、又は生物から分離することによって調製することができる。RNA分子は一般的にはDNA配列のin vitro又はin vivo転写によって生成することができる。

【0047】

核酸分子は二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖DNAはコード鎖（センス鎖としても知られている）でもよいが、非コード鎖（アンチセンス鎖とも称される）であってもよい。

“核酸分子”という用語にはまたDNA及びRNAの類似体、例えば改変骨格を含むもの及びペプチド核酸（PNA）が含まれる。本明細書で用いられる、“PNA”という用語は、アンチセンス分子又はアンチ遺伝子作用因子を指し、前記は、複数のアミノ酸残基のペプチド骨格（好ましくはリジンで終わる）に連結された長さが少なくとも5ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。末端のリジンはこの組成物に可溶性を付与する。PNAはPEG化させて細胞内でのその寿命を延長することができる。細胞内で、PNAは相補的な一本鎖DNA及びRNAと優先的に結合し、転写物の伸長を停止させる（P. E. Nielsen 1993, Anticancer Drug Des. 8:53-63）。

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、本明細書に開示する核酸分子の1つ以上のコード配列と同一であり得る。

これらの分子はまた、遺伝暗号の縮退の結果として、ポリペプチド配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124、配列番号:126、配列番号:128、配列番号:130、配列番号:132、配列番号:134、配列番号:136、配列番号:138、配列番号:140、配列番号:142、配列番号:144、配列番号:146、配列番号:148又は配列番号:150をコードする種々の配列を有することができる。そのような核酸分子には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：成熟ポリペプチド自体のコード配列；成熟ポリペプチドのコード配列及びリーダー配列又は分泌配列をコードする配列のような付加コード配列（例えばプロ-、プレ-、又はプレプロ-ポリペプチド配列）；前述の付加コード配列を含むか、又は含まない成熟ポリペプチドのコード配列であって、更なる付加的な非コード配列と一緒に有する前記コード配列（前記更なる付加的な非コード配列には、転写されるが、翻訳されない、転写において役割を有するような非コード5'及び3'配列（終結シグナルを含む）、リボソーム結合及びmRNAの安定性に役割を果たす配列が含まれる）。前記核酸分子はまた、付加的なアミノ酸（例えば付加的な機能を提供するもの）をコードする付加的な配列を含むことができる。

【0048】

本発明の第二及び第三の特徴の核酸分子はまた、本発明の第一の特徴のポリペプチド及び断片の断片又は機能的等価物をコードすることができる。そのような核酸分子は、天然に存在する変種、例えば天然に存在する対立遺伝子座変種でもよいが、又は前記分子は天然に存在することが知られていない変種であってもよい。前記核酸分子の天然に存在しな

10

20

30

40

50

いそのような変種は変異導入技術（核酸分子、細胞又は生物に応用できる変異導入技術を含む）によって作成することができる。

この点に関する変種では、ヌクレオチド置換、欠失又は挿入によって前述の核酸分子とは異なる変種が存在する。前記置換、欠失又は挿入は1つ以上のヌクレオチドを含むことができる。前記変種は、コード領域又は非コード領域又はその両方で変異を有することができる。コード領域における変異は、保存的又は非保存的アミノ酸置換、欠失又は挿入を生じることができる。

本発明の核酸分子はまた、多様な理由のために、当分野で一般的に知られている方法（クローニング、プロセッシング及び/又は遺伝子生成物（ポリペプチド）の発現の改変を含む）を用いて操作することができる。ランダム断片化並びに遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのPCRによる再アッセンブリーによるDNAシャッフリングは、前記ヌクレオチド配列の操作に用いることができる技術として含まれる。部位特異的変異導入を用いて、新規な制限部位の挿入、グリコシル化パターンの改変、コドン優先性の変更、スプライス変種の生成、変異の導入、云々を実施することができる。

【0049】

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする核酸分子を異種配列に連結し、その結果、一体となった核酸分子は融合タンパク質をコードすることができる。そのような結合核酸分子は本発明の第二又は第三の特徴に含まれる。例えば、前記ポリペプチドの活性の阻害物質についてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、そのような結合核酸分子を用いて、市販の抗体によって認識することができる融合タンパク質を発現させることは有用であろう。融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチド配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作することができ、それによって、前記ポリペプチドを異種タンパク質から切断して別個に精製することができる。

本発明の核酸分子はまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と部分的に相補的で、したがって前記コード核酸分子とハイブリダイズする（ハイブリダイゼーション）アンチセンス分子を含む。当業者には公知のように、そのようなアンチセンス分子（例えばオリゴヌクレオチド）を設計して、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、これと特異的に結合して転写を妨げることができる（例えば以下を参照されたい：J. S. Cohen 1989, Trends in Pharm. Sci. 10:435 ; Okano 1991, J. Neurochem. 56:560 ; O'Connor J. Neurochem. 56:560(1991) ; Lee et al. Nucleic Acids Res. 6:3073(1979) ; Cooney et al. 1998, Science 241:456 ; Dervan et al. 1991, Science 251:1360)。

本明細書で用いられる、“ハイブリダイゼーション”という用語は、互いに水素結合することによる2つの核酸分子の会合を指す。典型的には、1つの分子が固相に固定され、他方は溶液中で遊離しているであろう。続いて、この2つの分子は、水素結合に適した条件下で互いに接触できるように配置される。この結合に影響を与える因子には以下が含まれる：溶媒のタイプ及び体積；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液相分子の固相との非特異的結合を阻止する薬剤（デンハルト試薬又はBLOTTO）；分子の濃度；分子の結合速度を高める化合物の使用（硫酸デキストラン又はポリエチレングリコール）；及びハイブリダイゼーションの後の洗浄条件のストリンジェンシー（上掲書（Sambrook et al.）を参照されたい）。

【0050】

標的分子と完全に相補的な分子のハイブリダイゼーションの阻害は、当分野で公知のように（例えば上掲書（Sambrook et al.）を参照されたい）ハイブリダイゼーションアッセイを用いて調べることができる。実質的に相同な分子は、文献に教示されているように、種々のストリンジェンシー条件下で完全に相同な分子の標的分子との結合に競合し、これを阻害するであろう（G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987, Methods Enzymol. 152:399-407 ; A.R. Kimmel, 1987, Methods Enzymol. 152:507-511）。

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の結合よりも非常に類似する分子の結合に有利なハイブリダイゼーション反応の条件を指す。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、50%のホルムアミド、5xのSSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウ

ム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xのデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20 µg/mLの変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中において42 で一晩のインキュベーション、続いて0.1xのSSC、約65 でのフィルターの洗浄と規定される。低ストリンジェンシー条件は、35 でのハイブリダイゼーション反応の実施を含む(上掲書(Sambrook et al.)を参照されたい)。好ましくは、ハイブリダイゼーションのために使用される条件は高ストリンジェンシー条件である。

本発明のこの特徴の好ましい実施態様は、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドをコードする核酸分子とそれらの全長にわたって少なくとも70%同一である核酸分子、及びそのような核酸分子と実質的に相補的な核酸分子である。好ましくは、本発明のこの特徴の核酸分子は、そのようなコード配列に対してその全長にわたって少なくとも80%同一である領域を含むか、又は前記と相補的な核酸分子である。これに関しては、前記のような核酸分子に対してそれらの全長にわたって、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、99%又はそれ以上同一である核酸分子が特に好ましい。この特徴で好ましい実施態様は、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドと同じ生物学的機能又は活性を保持するポリペプチドをコードする核酸分子である。

【0051】

本発明はまた、以下の工程を含む、本発明の核酸分子を検出する方法を提供する：(a) 本発明の核酸プローブを生物学的サンプルとハイブリダイズする条件下で接触させて二重鎖複合体を形成する工程；及び(b) 形成された二重鎖複合体のいずれかを検出する工程。

本発明にしたがって利用することができるアッセイとの関係でさらに下記で考察するように、上記に記載した核酸分子は、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドをコードするゲノムクローン及び完全長cDNAを単離するために、さらにこのポリペプチドをコードする遺伝子と高い配列類似性を有する相同遺伝子又はオルソログ遺伝子のcDNA及びゲノムクローンを単離するために、RNA、cDNA又はゲノムDNAの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ことができる。

これに関しては、当分野で公知の他の技術の中でとりわけ下記の技術を利用することができ、これらは例示のために下記で考察する。DNAの配列決定および解析のための方法は周知であり、当分野で一般的に利用可能である。実際、それらは本明細書で考察する本発明の実施態様の多くを実施するために用いることができる。そのような方法では、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、シーケナーゼ(US Biochemical Corp. Cleveland, OH)、Taqポリメラーゼ(Perkin Elmer)、熱安定性T7ポリメラーゼ(Amersham, Chicago, IL)、又はポリメラーゼ及びブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ(例えばGibco/BRL(Gaithersburg, MD)が市販するELONGASE Amplification System中に見出されるもの)の組合せのような酵素を用いることができる。好ましくは、配列決定プロセスは以下のような機械を用いて自動化することができる：Hamilton Micro Lab2200(Hamilton, Reno, NV)、Peltier Thermal Cycler(PTC200; MJ Research, Watertown, MA)並びにABI Catalyst及び373及び377DNA Sequencers(Perkin Elmer)。

【0052】

INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの機能と等価な機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子を単離する一つの方法は、当分野で公知の標準的方法を用いて、天然のプローブ又は人工的に設計したプローブによりゲノムDNA又はcDNAを探索することである(例えば以下を参照されたい：“Current Protocols in Molecular Biology”, Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992)。適切なコード遺伝子(配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列

番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71、配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113、配列番号:115、配列番号:117、配列番号:119、配列番号:121、配列番号:123、配列番号:125、配列番号:127、配列番号:129、配列番号:131、配列番号:133、配列番号:135、配列番号:137、配列番号:139、配列番号:141、配列番号:143、配列番号:145、配列番号:147及び/又は配列番号:149)由来の核酸配列に一致するか、又は前記と相補的な、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプローブが特に有用なプローブである。そのようなプローブは、解析によって検出することができる試薬で標識して、前記の同定を促進することができる。有用な試薬には、放射性同位元素、蛍光色素及び検出可能な生成物の形成を触媒することができる酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプローブを用いて、当業者は、ヒト、哺乳動物又は他の動物由来の注目するタンパク質をコードするゲノムDNAの相補的なコピー、cDNA又はRNAポリヌクレオチドを単離し、関連する配列(例えば前記ファミリー、タイプ及び/又はサブタイプのさらに別のメンバー)について、前記のような供給源をスクリーニングすることができる。

10

【0053】

20

多くの事例で、単離されたcDNAは、ポリペプチドをコードする領域が短く切断されている(通常は5'末端で)という点で不完全であろう。完全長のcDNAを得るために、又は短いcDNAを伸長させるためにいくつかの方法が利用可能である。そのような配列は、部分的なヌクレオチド配列を利用したり、上流の配列(例えばプロモーター及び調節エレメント)を検出するために当分野で知られている種々の方法を用いたりして伸長させることができる。例えば、利用することができるある方法は、cDNA末端迅速増幅法(Rapid Amplification of cDNA: RACE)を基にしている(例えば以下を参照されたい:Frohman et al. 1988, PNAS USA 85:8998-9002)。マラソン(Marathon(商標))テクノロジー(Clontech Laboratories Inc.)によって実施されるこの技術の最近の改変により、例えばより長いcDNAについての検索が顕著に単純化された。わずかに異なる技術("制限部位"PCRと称される)はユニバーサルプライマーを用い、既知の遺伝子座に隣接する未知の核酸配列を回収する(G. Sarkar, 1993, PCR Methods Applic. 2:318-322)。インバースPCRもまた、公知領域に基づく多岐プライマーを用いて配列を増幅又は伸長させるために用いることができる(T. Triglia et al. 1988, Nucleic Acids Res. 16:8186)。利用できるまた別の方法はキャプチャーPCRであり、前記はヒト及び酵母人工染色体DNA中の公知の配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む(M. Lagerstrom et al. 1991, PCR Methods Applic., 1:111-119)。未知の配列を回収するために利用できるまた別の方法は、Parkerらの方法である(J.D. Parker et al. 1991, Nucleic Acids Res. 19:3055-3060)。さらにまた、PCR、ネストプライマー及びプロモーターファインダー(PromoterFinder(商標))ライブラリーをゲノムDNAウォーキングのために用いてもよい(Clontech, Palo Alto, CA)。この工程ではライブラリーをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エクソン接合部の発見に有用である。

30

40

完全長cDNAをスクリーニングするとき、より大きなcDNAを含むためにサイズ選別したライブラリーを使用することが好ましい。さらにまた、ランダムプライミングされたライブラリーが、それらは遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含むという点で好ましい。オリゴdTライブラリーは完全長cDNAをもたらないという状況の場合、ランダムプライミングされたライブラリーの使用は特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、5'非転写調節領域への配列の伸張のために有用であろう。

【0054】

本発明のある実施態様では、本発明の核酸分子を染色体位置決定のために用いることが

50

できる。この技術では、核酸分子は、個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的に標的とし、これとハイブリダイズすることができる。本発明にしたがって、染色体に対して関連する配列をマッピングすることは、それら配列と遺伝子関連疾患との相関性確認において重要な工程である。いったん配列が染色体上の正確な位置に対してマッピングされたら、染色体上での配列の物理的な位置を遺伝子地図データと相関させることができる。そのようなデータは、例えば以下で見出される（V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man、ジョーンズホプキンス大学ウェルヒメディカルライブラリーからオンラインで入手できる）。同じ染色体の領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係は、続いてリンケージ解析により識別される（物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝）。これにより、ポジショナルクローニング又は他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子について探索を行っている研究者に貴重な情報が提供される。いったん遺伝的リンケージによって特定のゲノム領域に疾患又は症状が大雑把に位置決めされたら、前記領域にマッピングされる任意の配列が更なる調査のための関連遺伝子又は調節遺伝子となる。前記核酸分子はまた、転座、逆位などによる染色体上の位置の相違を正常個体、キャリア個体又は罹患個体間で検出するために用いることができる。

10

本発明の核酸分子はまた組織内分布を知るために貴重である。そのような技術は、それらをコードするmRNAを検出することによって組織内での前記ポリペプチドの発現パターンの決定を可能にする。これらの技術には、*in situ*ハイブリダイゼーション技術及びヌクレオチド増幅技術（例えばPCR）が含まれる。これらの研究から得られる結果は、生物体内での前記ポリペプチドの正常機能の指標を提供する。さらにまた、mRNAの正常な発現パターンと変異遺伝子によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、疾患における変異遺伝子の役割についての貴重な洞察を提供する。そのような不適切な発現は時間的、空間的又は定量的性質を有し得る。

20

【0055】

遺伝子サイレンシングアプローチもまた、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内因性発現をダウンレギュレートするために行うことができる。RNA干渉（RNAi）（S.M. Elbashir et al. 2001, Nature 411:494-498）は、用いることができる配列特異的転写後遺伝子サイレンシングの一方法である。短いdsRNAオリゴヌクレオチドが、*in vitro*で合成され、細胞内に導入される。これらdsRNAオリゴヌクレオチドの配列特異的結合は、標的mRNAの分解、標的タンパク質発現の低下又は除去の引き金となる。

30

上記で評価した遺伝子サイレンシングアプローチの有効性はポリペプチド発現の測定により（例えばウェスタンブロッティングによる）判定することができ、さらにRNAレベルではタックマン（TaqMan）による方法を用いることができる。

本発明のベクターは本発明の核酸分子を含み、前記はクローニングベクター又は発現ベクターであり得る。本発明の宿主細胞は原核細胞でも真核細胞でもよい（前記は本発明のベクターで形質転換、トランスフェクト又は形質導入されている）。

本発明のポリペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中で前記ポリペプチドのコード核酸分子の発現によって組換え形態で調製され得る。そのような発現方法は、当業者に周知であり、例えば以下に詳細に記載されている：Sambrook et al.（上掲書）及びFernandez & Hoeffler（1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression". Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto）。

40

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを調製するために核酸分子の維持、増殖又は発現に適した任意の系を用いることができる。多様な周知で公知の技術、例えば上掲書（Sambrook et al.）に記載されたようなもののいずれかによって、適切なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。一般的には、コード遺伝子は、制御要素（例えばプロモーター、リボソーム結合部位（細菌での発現の場合）及び場合によってオペレーター）の制御下に置かれ、それによって所望のポリペプチドをコードするDNA配列が形質転換宿主細胞内でRNAに転写される。

【0056】

50

適切な発現系の例は、例えば染色体系、エピソーム系及びウイルス由来系を含み、例えば以下に由来するベクターが含まれる：細菌性プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス（例えばバキュロウイルス、パポバウイルス（例えばSV40）、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、擬似狂犬病ウイルス及びレトロウイルス）又は前記の組合せ、例えばプラスミドとバクテリオファージ遺伝エレメント（コスミド及びファージミドを含む）に由来するベクター。ヒト人工染色体（HAC）もまた、プラスミド中に含まれ発現され得るDNAよりも大型のDNA断片のデリバリーに用いることができる。以下のベクター、pCR4-TOPO-INSP142、pCR4-TOPO-INSP141、pCR4-TOPO-INSP143-EC、pDEST12.2-INSP141-6HIS-V1、pEAK12d-INSP141-6HIS-V1、pENTR-INSP141-6HIS-V1、pEAK12d-INSP143-EC-6HIS-V1、pDEST12d-INSP143-EC-6HIS-V1、pDONR-Zeo-INSP143-EC-6HIS-V1、及びpEAK12d-INSP142-6HISが、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144に関連して本発明の特徴にしたがって使用される適切なベクターの好ましい例である。

10

特に適切な発現系には微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、タバコモザイクウイルス（TMV））又は細菌発現ベクター（例えばTi又はpBR322プラスミド）で形質転換感染させた植物細胞系；又は動物細胞系が含まれる。無細胞翻訳系もまた本発明のポリペプチドの生成に用いることができる。

20

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の宿主細胞への導入は、多くの標準的な実験室用マニュアル（例えばDavis et al. 1986, Basic Methods in Molecular Biology；及びSambrook et al. 上掲書）に記載されている方法によって実施することができる。特に適切な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング、弾道導入又は感染が含まれる（以下を参照されたい：Sambrook et al. 1989（上掲書）；Ausubel et al. 1991（上掲書）；Spector, Goldman & Leinwald, 1998）。真核細胞では、発現系は系の要求に応じて一過性でも（例えばエピソーム系）又は永久性（染色体組込み）であってもよい。

30

【0057】

コード核酸分子は、例えば翻訳されたポリペプチドの小胞体腔への又は細胞周囲間隙への又は細胞外環境への分泌のために、制御配列をコードする配列、例えばシグナルペプチド又はリーダー配列を含んでいても、又は含んでなくてもよい。これらのシグナルはポリペプチドにとって内在性であってもよいが、またそれらは異種シグナル配列であってもよい。リーダー配列は細菌宿主によって翻訳後プロセッシングで除去され得る。

制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に対してポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが所望され得る。調節配列の例は、化学的又は物理的刺激（調節性化合物の存在を含む）、種々の温度又は代謝条件に应答して遺伝子の発現を増減させる配列である。調節配列は、ベクターの非翻訳領域、例えばエンハンサー、プロモーター並びに5'及び3'非翻訳領域である。これらは宿主細胞タンパク質と相互作用し、転写及び翻訳を遂行することができる。そのような調節配列はそれらの強度及び特異性において変動し得る。利用されるベクター系及び宿主に応じて、多数の適切な転写及び翻訳エレメント（構成性、誘導性プロモーターを含む）を用いることができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、誘導性プロモーター（例えばブルスクリプトファージミド（Stratagene, LaJolla, CA）又はpSport（商標）プラスミド（Gibco BRL）のハイブリッドlacZプロモーター）などを用いることができる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターを昆虫細胞で用いることができる。植物細胞のゲノム（例えば熱ショック、RUBISCO及び貯蔵タンパク質遺伝子）又は植物ウイルス（例えばウイルスプロモーター又はリーダー配列）に由来するプロモーター又はエンハンサーをベクターにクローニングすることができる。

40

50

哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来のプロモーター又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。多数の配列コピーを含む細胞株を作成する必要がある場合は、SV 40又はEBVを土台にしたベクターを適切な選択性マーカーとともに用いることができる。

【 0 0 5 8 】

発現ベクターは、個々の核酸コード配列が適切な調節配列とともにベクター内に配置されるように構築される。調節配列に対するコード配列の配置及び方位は、コード配列が前記調節配列の“制御”下で転写されることができるようなもの、すなわち、前記制御配列でDNA分子と結合するRNAポリメラーゼが前記コード配列を転写することができるようのものである。いくつかの事例では、適切な向きで制御配列に前記配列を結合させることができるように（すなわちリーディングフレームを維持するために）、前記配列を改変する必要があるかもしれない。

10

上記制御配列及び他の調節配列は、ベクターに挿入する前に核酸コード配列と連結することができる。また別には、前記コード配列は、既に制御配列及び適切な制限部位を含む発現ベクターに直接クローニングすることができる。

組換えポリペプチドの長期的な高収量産生のためには安定な発現が好ましい。例えば、注目するポリペプチドを安定的に発現する細胞株を、ウイルス起源の複製及び/又は内因性発現エレメント及び選別可能マーカー遺伝子を同じ又は別個のベクターに含み得る発現ベクターを用いて形質転換することができる。前記ベクターの導入に続いて、前記細胞を選別培養液に切り替える前に、細胞を1-2日間富裕培養液で増殖させることができる。選別可能マーカーの目的は選択に対する耐性を付与するためであり、前記マーカーの存在は、導入された配列を発現させることができる細胞の増殖及び回収を可能にする。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンを前記細胞タイプに適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

20

【 0 0 5 9 】

発現のために宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当分野では公知であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から入手できる、以下を含む（ただしこれらに限定されない）多くの哺乳動物細胞株が含まれる：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、サル腎（COS）細胞、C127、3T3、BHK、HE K293、ボウズメラノーマ細胞及びヒト肝細胞癌（例えばHep G2）細胞並びに多数の他の細胞株。

30

バキュロウイルス系では、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料がキットの形（“MaxBac”キット）でとりわけインビトロジェン（Invitrogen, San Diego, CA）から市販されている。これらの技術は一般的に当業者には公知であり、以下に完全に記載されている：Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)。この系で使用される特に適切な宿主細胞には、例えばショウジョウバエS2及びスポドブレラSf9細胞が含まれる。

当分野で公知の多くの植物細胞培養および完全な植物遺伝子発現系が存在する。適切な植物細胞遺伝子発現系の例にはUS 5,693,506；US 5,659,122及びUS 5,608,143に記載されたものが含まれる。植物細胞培養での遺伝子発現の更なる例は以下に記載されている：Zenk, 1991, Phytochemistry 30:3861-3863。

40

特に、プロトプラストを単離し、これを培養して完全な再生植物を得て、それによって移入された遺伝子を含む完全な植物が得られる全ての植物を利用することができる。実際には、サトウキビ、サトウダイコン、綿花、果実及び他の樹木、豆類及び野菜の全ての主要な種を含む（ただしこれらに限定されない）培養細胞又は組織から全ての植物を再生することができる。

【 0 0 6 0 】

特に好ましい細菌宿主細胞の例には連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌（E. coli）、ストレプトミセス属及び枯草菌（Bacillus subtilis）細胞が含まれる。

真菌類での発現のために特に適切な宿主細胞の例には酵母細胞（例えばS. セレビシアエ）及びアスペルギルス細胞が含まれる。

50

形質転換細胞を回収するために用いることができる多数の選別系が当分野で公知である。前記の例には、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (M. Wigler et al. 1977, Cell 11:223-32) 及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (L. Lowy et al. 1980, Cell 22:817-23) 遺伝子が含まれ、前記はそれぞれ tk⁺ 又は aprt⁺ 細胞を利用することができる。

さらにまた、選別のための基準として例えば以下のように抗代謝薬、抗生物質又は除草剤耐性を用いることができる：メトトレキセート耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) (M. Wigler et al. 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70) ; npt、アミノグリコシド系のネオマイシン及び G-418 に対する耐性を付与する (F. Colbere-Garapi n et al. 1981, J. Mol. Biol. 150:1-14) ; 及び als 又は pat、それぞれクロロスルフロ ン及びホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する。さらに 別の選別可能な遺伝子が文献に記載されており、前記の例は当業者には明白であろう。

マーカー遺伝子発現の有無は注目の遺伝子もまた存在することを示唆するが、その存在 及び発現は確認する必要がある。例えば、注目する配列がマーカー遺伝子配列内に挿入さ れるならば、前記適切な配列を含む形質転換細胞はマーカー遺伝子機能が存在しないこと によって識別することができる。また別には、マーカー遺伝子をただ1つのプロモーター の存在下で本発明のポリペプチドとタンデムに配置することができる。誘導又は選別に 応答するマーカー遺伝子の発現は通常、前記タンデム遺伝子の発現も同様に示す。

【0061】

また別には、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、前記ポリペプチドを 発現する宿主細胞は、当業者に公知の多様な方法によって同定することができる。これら の方法には、DNA-DNA 又は DNA-RNA ハイブリダイゼーション及びタンパク質バイオアッセイ、例えば蛍光活性化細胞分類 (FACS) 又は免疫アッセイ技術 (例えば酵素結合免疫吸着ア ッセイ (ELISA) 及び放射性免疫アッセイ (RIA)) が含まれるが、ただしこれらに限定さ れない。前記方法は、核酸又はタンパク質の検出及び/又は定量のために膜系、溶液系、 チップ系技術を含む (以下を参照されたい : R. Hampton et al. 1990, Serological Meth ods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN ; 及び D.E. Maddox et al. 1983, J . Exp. Med. 158:1211-1216) 。

多様な標識及び結合技術が当業者には公知であり、種々の核酸アッセイ及びアミノ酸ア ッセイで用いることができる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関連する配 列の検出のために標識されたハイブリダイゼーションプローブ又は PCR プローブを生成す る手段には、オリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識又は標識ポリヌクレオチ ドを用いる PCR 増幅が含まれる。また別には、本発明のポリペプチドをコードする配列は m RNA プローブの産生のためにベクターにクローニングしてもよい。そのようなベクターは 当分野で公知であり、市販されている。前記は、適切な RNA ポリメラーゼ (例えば T7、T3 又は SP6) 及び標識ヌクレオチドを添加することによって、in vitro での RNA プローブの合 成に用いることができる。これらの方法は、多様な市販キット (Pharmacia & Upjohn, Ka lamazoo, MI ; Promega, Madison, WI ; 及び U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH) を用いて実施することができる。

【0062】

検出を容易にするために用いることができる適切なレポーター分子又は標識には、放射 性核種、酵素並びに蛍光性、化学発光性薬剤又は発色剤、および、基質、補助因子、阻害 剤、磁性粒子などが含まれる。

本発明の核酸分子もまた、トランスジェニック動物、特にげっ歯類動物の作成に用いる ことができる。そのようなトランスジェニック動物は本発明の更なる特徴を構成する。前 記は、体細胞の改変によって局所的に実施するか、又は生殖系列療法によって実施し遺伝 可能な改変を取り込ませることができる。そのようなトランスジェニック動物は、本発明 のポリペプチドの調節物質として有効な薬剤分子のための動物モデルの作成で特に有用で あり得る。

前記ポリペプチドは、組換え細胞培養から以下を含む周知の方法によって回収すること

ができる：硫安又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用によるクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及びレシチンクロマトグラフィー。高速液体クロマトグラフィーは精製に特に有用である。ポリペプチドが単離及び精製の間に変性したときは、タンパク質をリフォールディングさせるための周知の技術を用いて、活性な構造を再生することができる。

所望にしたがってタンパク質の精製を促進するために特殊化したベクター構築物を用いることもできる。前記は、本発明のポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させることによって実施される。そのような精製促進ドメインの例には、金属キレートペプチド（例えば固定金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール）、固定された免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、及びFLAGS伸長/アフィニティークロマトグラフィー系で利用されるドメイン（Immunex Corp., Seattle, WA）が含まれる。切断可能なリンカー配列（例えばXA因子又はエンテロキナーゼに対して特異的なもの）（Invitrogen, San Diego, CA）を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に含有させることによって精製を促進してもよい。そのような発現ベクターは、チオレドキシン又はエンテロキナーゼ切断部位に先行するいくつかのヒスチジン残基と融合した本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。前記ヒスチジン残基はIMAC（Porathら（J. Porath et al. 1992, Prot. Exp. Purif. 3:263-281）が記載した固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー）による精製を促進し、一方、チオレドキシン又はエンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質から本発明のポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターに関する考察は以下に提供されている：D.J. Kroll et al. 1993, DNA Cell Biol. 12:441-453。

【0063】

前記ポリペプチドをスクリーニングアッセイで使用するために発現させる場合は、一般的には、発現される宿主細胞の表面で前記ポリペプチドを産生させるのが好ましい。この場合には、宿主細胞は、例えば蛍光活性化細胞分類（FACS）又は免疫アフィニティークロマトグラフィーのような技術を用いるスクリーニングアッセイでの使用の前に採集することができる。前記ポリペプチドが培養液中に分泌される場合は、前記培養液は、発現ポリペプチドの回収及び精製のために回収することができる。ポリペプチドが細胞内で産生される場合は、ポリペプチドを回収する前に先ず細胞を溶解させねばならない。

本発明のポリペプチドは、多様な薬剤スクリーニング技術のいずれかにおいて化合物ライブラリーをスクリーニングするために用いることができる。そのような化合物は、本発明の遺伝子の発現レベル、又は本発明のポリペプチドの活性を活性化（作動）し、又は阻害（拮抗）して、更なる本発明の特徴を構成することができる。好ましい化合物は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させるか、本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節するために有効である。

アゴニスト又はアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、キメラライブラリー又は天然生成物の混合物から単離することができる。これらのアゴニスト又はアンタゴニストは、天然又は改変された基質、リガンド、酵素、レセプター又は構造的若しくは機能的模倣物であり得る。そのようなスクリーニング技術の適切な概覧のためには以下の文献を参照されたい：Coligan et al. Current Protocols in Immunology (1991) 1(2):Chapter 5)。

良好なアンタゴニストである可能性が極めて高い化合物は、その結合に際して本発明のポリペプチドの生物学的作用を誘導することなく、前記ポリペプチドと結合する分子である。潜在的なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドと結合し、それによってその活性を阻害又は消滅させる小有機分子、ペプチド、ポリペプチド及び抗体が含まれる。この態様では、正常な細胞結合分子と前記ポリペプチドとの結合が阻害され、その結果前記ポリペプチドの正常な生物学的活性が妨げられる。

そのようなスクリーニング技術で用いられる本発明のポリペプチドは、溶液中で遊離し

ていても、固相に固定されていても、細胞表面に保持されていても、又は細胞内に存在していてもよい。一般的には、そのようなスクリーニング方法は、前記ポリペプチドを発現し、結合又は機能的応答の刺激若しくは阻害を観察するためにテスト化合物と接触させる適切な細胞又は細胞膜の使用を含むことができる。続いてテスト化合物と接触させた細胞の機能的応答を、テスト化合物と接触させなかったコントロール（対照）細胞と比較する。そのようなアッセイによって、前記ポリペプチドの活性化によって生じるシグナルを前記テスト化合物がもたらすか否かを適切な検出系を用いて判定することができる。活性化の阻害因子は一般的には公知のアゴニストの存在下でアッセイし、さらにテスト化合物の存在下における前記アゴニストによる活性化に対する影響を観察する。

【0064】

本明細書に記載するアッセイタイプで検出可能なシグナルを発生させる方法は当業者には公知であろう。具体的な例は、本発明のポリペプチド又は断片（例えばLBD）をGAL4 DNA結合ドメインと融合された状態で発現する構築物を、レポータープラスミド（前記の例はpFR-Luc（Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands）である）とともに同時トランスフェクトすることである。このプラスミドはGAL4結合部位の5つのタンデムリピートをもつ合成プロモーターを含む（ルシフェラーゼ遺伝子の発現を制御する）。潜在的なリガンドが細胞に添加されると、前記リガンドはGAL4-ポリペプチド融合物と結合し、ルシフェラーゼ遺伝子の転写を誘導する。ルミネッセンスリーダーを用いて、ルシフェラーゼ発現レベルをその活性によってモニターすることができる（例えば以下を参照されたい：Lehman et al. 1995, JBC 270:12953；Pawar et al. 2002, JBC 277:39243）。

本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するさらに好ましい方法は以下の工程を含む：

（a）標識化合物又は未標識化合物を、任意の固相（例えばビーズ、プレート、マトリックス支持体、チップ）に固定した前記ポリペプチドと接触させ、前記標識を測定することによって又は化合物それ自体の存在によって前記化合物を検出する工程；又は

（b）細胞膜に前記ポリペプチドを人工的に係留する手段によって、又は化合物と前記ポリペプチドとの結合に応答し検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合させたキメラレセプターを構築することによって、細胞表面に前記ポリペプチドを発現する細胞を、前記ポリペプチドとの結合が許容される条件下でスクリーニングされるべき化合物と接触させる工程；及び

（c）化合物と前記ポリペプチドとの相互作用から生じたシグナルのレベルを前記化合物の非存在下におけるシグナルのレベルと比較することによって、前記化合物が前記ポリペプチドと結合し、これを活性化又は阻害したか否かを決定する工程。

例えば、ペプチドコアクチベーターの存在下で前記ポリペプチドと結合したリガンドのFRET検出のような方法を用いることができる（Norris et al. Science, 1999, 285:744）。

更に別の好ましい実施態様では、上記記載の一般的な方法は、さらに前記ポリペプチドのための標識又は未標識リガンドの存在下でアゴニスト又はアンタゴニストの同定を実施する工程をさらに含むことができる。

【0065】

また別の実施態様では、本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は以下の工程を含む：候補化合物と前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で、任意の固体又は細胞表面上の本発明のポリペプチドとリガンドとの結合の阻害を前記候補化合物の存在下で決定する工程、及び前記ポリペプチドと結合したリガンドの量を決定する工程。リガンドの結合を低下させることができる化合物はアゴニスト又はアンタゴニストとして作用することができる競合物質であると考えられる。好ましくは、リガンドは標識される。

より具体的には、ポリペプチドのアンタゴニスト又はアゴニスト化合物についてスクリーニングする方法は以下の工程を含む：

（a）任意の固相若しくは細胞表面上の本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを含む細胞膜と標識リガンドとをインキュベートする工程；

(b) 前記固相、全細胞又は細胞膜上のポリペプチドと結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 標識リガンド及び工程(a)の固相、全細胞又は細胞膜上に固定されたポリペプチドの混合物に候補化合物を添加し、前記混合物を平衡化させる工程；

(d) 工程(c)の後で、固定ポリペプチド又は全細胞若しくは細胞膜に結合した標識リガンドの量を測定する工程；及び

(e) 工程(b)及び(d)で結合した標識リガンドの相違を比較する工程であって、工程(d)で結合を減少させる化合物をアゴニスト又はアンタゴニストであると考え、前記工程。

10

【0066】

前記ポリペプチドはまた、多様な生理学的及び病理学的プロセスを用量依存態様で調節することが上記に記載したアッセイで見出すことができる。したがって、本発明のポリペプチドの“機能的等価物”には、同じ調節活性のいずれかを上記記載のアッセイにおいて用量依存態様で示すポリペプチドが含まれる。用量依活性の程度は本発明のポリペプチドのそれと同一である必要はないが、好ましくは、与えられた活性アッセイにおいて、前記“機能的等価物”は本発明のポリペプチドと比較して同様な用量依存性を示すであろう。

本発明の INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びに INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドは、細胞の増殖及び分化を調節することができる。したがって、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びに INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの生物学的活性は、細胞の増殖及び分化の研究を可能にする系、例えば *in vitro* 組織培養で調べることができる。

20

例えば、細胞の増殖阻害を観察するために、固形培地又は液体培地を用いることができる。固形培地では、増殖阻害を受けている細胞は、形成されたコロニーのサイズを比較することによって対象細胞群から容易に選別することができる。液体培地では、増殖阻害は、培養液の濁度又は標識チミジンのDNAへの取り込みを測定することによってスクリーニングすることができる。典型的には、ヌクレオシド類似体の新規合成DNAへの取り込みを用いて、細胞集団における増殖（すなわち活性な細胞の増殖）を測定することができる。

例えば、プロモデオキシウリジン（BrdU）をDNA標識試薬として用い、抗BrdUマウスモノクローナル抗体を検出試薬として用いることができる。この抗体は、プロモデオキシウリジンを取り込んだDNAを含む細胞とのみ結合する。多数の検出方法をこのアッセイと併用して用いることができる。前記には免疫蛍光法、免疫組織化学法、ELISA及び比色法が含まれる。プロモデオキシウリジン及び抗BrdUマウスモノクローナル抗体を含むキットがベーリンガー・マンハイム（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）から市販されている。

30

【0067】

細胞の分化に対する INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びに INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの作用は、幹細胞又は胚性細胞を種々の量の前記ポリペプチドと接触させ、幹細胞又は胚性細胞の分化に対する影響を観察することによって測定することができる。生じた細胞を組織特異的抗体及び顕微鏡検査を用いて識別することができる。

40

INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びに INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドはまた、用量依存態様で免疫系及び/又は神経系細胞の増殖及び分化を調節することが上記に記載したアッセイで見出すことができる。したがって、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びに INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドの“機能的等価物”には、上記記載のアッセイで同じ細胞増殖及び分化調節活性を用量依存態様で示すポリペプチドが含まれる。用量依活性の程度は INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びに INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドのそれと同一である必要はないが

50

、好ましくは、与えられた活性アッセイにおいて、前記“機能的等価物”はINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドと比較して実質的に同様な用量依存性を示すであろう。

【0068】

上記に記載したある実施態様では、単純な結合アッセイを用いることができる。前記アッセイでは、ポリペプチドを保持している表面へのテスト化合物の付着は、テスト化合物に直接的又は間接的に結合させた標識によって、又は標識競合物との競合を含むアッセイで検出される。また別の実施態様では、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。前記アッセイでは、ポリペプチドと結合することができる中和抗体がテスト化合物と結合について特異的に競合する。このようにして、前記ポリペプチドに対して特異的な結合アフィニティーを有するいずれのテスト化合物の存在の検出にも前記抗体を用いることができる。

10

前記ポリペプチドをコードするmRNAの細胞内での産生に対する添加されるテスト化合物の影響を検出するためのアッセイもまた設計することができる。例えば、モノクローナル又はポリクローナル抗体を用い当分野で公知の標準的な方法によって、分泌又は細胞結合ポリペプチドレベルを測定するELISAを構築することができ、適切に操作した細胞又は組織の前記ポリペプチド産生を阻害又は強化することができる化合物についての探索のために用いることができる。続いてポリペプチドと被検化合物との結合複合体の形成を測定することができる。

用いることができる薬剤スクリーニングのためのまた別の技術は、注目のポリペプチドに対して適切な結合アフィニティーを有する化合物の高処理スクリーニングを提供することができる（国際特許出願WO84/03564を参照されたい）。この方法では、大量の小さな種々のテスト化合物を固体の基質上で合成し、続いて前記を本発明のポリペプチドと反応させ洗浄する。ペプチドを固定する一つの方法は、非中和抗体を用いることである。続いて結合を当分野で周知の方法を用いて検出することができる。上述の薬剤スクリーニング技術で使用するために、精製ポリペプチドはまたプレート上に直接被覆することができる。

20

【0069】

本発明の範囲内にまた含まれるアッセイ方法は、過剰発現アッセイ又は除去アッセイにおいて本発明の遺伝子及びポリペプチドの使用を含むものである。そのようなアッセイは、細胞内のこれら遺伝子/ポリペプチドレベルの操作及び前記操作された細胞の生理学に対する前記操作の影響の判定を伴う。例えばそのような実験は、個々の遺伝子/ポリペプチドが関与するシグナリング経路及び代謝経路を明らかにし、調査対象ポリペプチドが相互作用するポリペプチドの実態に関する情報をもたらす、さらに関連する遺伝子及びタンパク質を調節する方法に関する手がかりを提供する。

30

用いることができるまた別の薬剤スクリーニング技術は、注目のポリペプチドに対する適切な結合アフィニティーを有する化合物の高処理スクリーニングを提供する（（国際特許出願WO84/03564を参照されたい）。この方法では、大量の小さな種々のテスト化合物を固体の基質上で合成し、続いて前記を本発明のポリペプチドと反応させ洗浄する。ペプチドを固定する方法は、非中和抗体を用いることである。続いて結合を当分野で周知の方法を用いて検出することができる。上述の薬剤スクリーニング技術で使用するために、精製ポリペプチドはまたプレート上に直接被覆することができる。

40

本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する適切なアッセイの例は、Rosenらが記載している（Rosen et al. Curr Opin Drug Discov Devel 2003, 6(2):24-30）。

本発明のポリペプチドを用い、当分野で公知の標準的なレセプター結合技術、例えばリガンド結合アッセイ及び架橋アッセイを介して膜結合又は可溶性レセプターを同定することができる。前記アッセイでは、ポリペプチドは放射活性同位体で標識されるか、化学的に改変されるか、又はその検出若しくは精製を促進するペプチド配列と融合され、さらに仮想的レセプターの供給源（例えば細胞の構成物、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、又は体液）とインキュベートされる。結合効率は、生物物理学的技術（例えば表面プラズモン

50

共鳴及び分光解析)を用いて測定することができる。結合アッセイはレセプターの精製又はクローニングのために用いることができるが、また、前記ポリペプチドとそのレセプターとの結合と競合するアゴニスト及びアンタゴニストを同定することもできる。スクリーニングアッセイを実施する標準的な方法は当分野では周知である。

【0070】

また別の実施態様では、本発明は、免疫関連疾患治療用INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドのアゴニスト又は刺激因子を単離又は生成するための、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド又はその断片(したがって前記断片は好ましくはINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチド遺伝子特異的断片である)の使用に関する。

10

ここで前記アゴニスト又は刺激因子は以下から成る群から選択される：

1. 特異的抗体又はその断片[a)キメラ抗体、b)ヒト化抗体、又はc)完全にヒトの抗体を同様に含む]、
2. 二重特異性又は多重特異性抗体、
3. 単鎖(例えばscFv)抗体、又は
4. 単ドメイン抗体、又は
5. 前記抗体に由来するペプチド-又は非ペプチド-模倣物、又は
6. 抗体模倣物、例えばa)アンチカリン又はb)フィブロネクチン系結合分子(例えばトリネクチン又はアドネクチン)。

抗体からペプチド-又は非ペプチド-模倣物を作成することが当分野で公知である(Saragovi et al. 1991; 及びSaragovi et al. 1992)。

20

アンチカリンもまた当分野で公知である(Vogt et al. 2004)。フィブロネクチン系結合分子はUS6818418及びWO2004029224に記載されている。

さらにまた、テスト化合物は、多様な起源、性質及び組成物であり得る。前記は例えば単離形態又は混合物若しくは組合せである、任意の小分子、核酸、脂質、ペプチド、ポリペプチドであり、前記ポリペプチドには抗体(例えばキメラ抗体、ヒト化抗体又は完全にヒトの抗体又は抗体断片を含む)、それらに由来するペプチド-又は非ペプチド-模倣物および二重特異性若しくは多重特異性抗体、単鎖(例えばscFv)若しくは単ドメイン抗体又は抗体模倣物(例えばアンチカリン又はフィブロネクチン系結合分子(例えばトリネクチン又はアドネクチン))などが含まれる。

30

【0071】

本発明はまた、上記に記載したアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質、酵素を同定する方法で有用なスクリーニングキットを含む。

本発明は、上記に記載する方法によって発見された本発明のポリペプチドの活性又は抗原性を調節する、アゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質及び酵素、並びに他の化合物を含む。

上記で述べたように、本発明の多様な構成部分(すなわち、本発明の第一の特徴のポリペプチド、本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物)が、疾患の治療又は診断で有用であり得ることが意図される。疾患の治療又は診断についての本発明の成分の有用性を判定するために、1つ以上の以下のアッセイを実施することができる。以下のアッセイのいくつかはテスト化合物がタンパク質/ペプチドであるとしているが、当業者は、本発明の他の成分もまた“テスト化合物”として用いることができるように以下のアッセイを容易に改変できることに留意されたい。

40

本発明はまた、本発明のポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物を適切な医薬担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、下記で詳しく述べるように、治療薬若しくは診断薬として、ワクチンとして、又は他の免疫原性組成物として適切であり得る。

本明細書で用いられる用語にしたがえば、ポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物[

50

X]を含む組成物は、組成物中のX+Y (Yは不純物)の合計の少なくとも85質量%がXであるときに、不純物[Y]が“実質的に除かれている”。好ましくは、Xは、組成物中のX+Yの合計の少なくとも約90質量%を構成し、より好ましくは、少なくとも約95質量%、98質量%又は99質量%ですらある。

【0072】

本医薬組成物は、好ましくは治療的に有効な量の本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物を含む。本明細書で用いられる、“治療的に有効な量”という用語は、標的の疾患又は症状を治療、軽減若しくは予防するために、又は検出可能な治療的若しくは予防的効果を示すために必要な治療薬剤の量を指す。いずれの化合物についても、先ず初めに治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイ (例えば新形成細胞の細胞培養アッセイ) で、又は動物モデル (通常はマウス、ウサギ、イヌ又はブタ) で評価することができる。前記動物モデルはまた、適切な濃度範囲及び投与ルートを決断するために用いることができる。続いて、そのような情報を用いて、ヒトに投与するための有用な用量及び経路を決断する。

ヒト対象者のための厳密な有効用量は、症状の重篤度、対象者の一般的な健康状態、年齢、体重及び性別、食事、投与の時期及び頻度、薬剤の組合せ、反応の鋭敏性、並びに治療に対する耐性/応答に左右される。前記用量は日常的な検査によって決断することができる、臨床医の裁量の範囲内である。一般的には、有効用量は、0.01mg/kgから50mg/kg、好ましくは0.05mg/kgから10mg/kgであろう。組成物は患者に個々に投与してもよいが、また他の物質、薬剤又はホルモンと組み合わせて投与してもよい。

医薬組成物はまた、治療用物質の投与のために医薬的に許容できる担体を含むことができる。そのような担体には抗体及び他のポリペプチド、遺伝子および他の治療用物質 (例えばリポソーム) が含まれるが、ただし前記担体はそれ自体、前記組成物を受容する個体に有害な抗体の産生を誘発せず、さらに不適切な毒性を生じることなく投与され得ることを条件とする。適切な担体は大きく、ゆっくりと代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸ポリマー、アミノ酸コポリマー及び不活性なウイルス粒子であり得る。

【0073】

医薬的に許容できる塩、例えば鉍酸塩 (例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩など) ; 有機酸の塩 (例えば酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩など) をここでは用いることができる。医薬的に許容できる担体についての完全な考察は以下の成書で入手できる: Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)。

治療用組成物中の医薬的に許容できる担体にはさらに液体 (例えば水、食塩水、グリセロール及びエタノール) が含まれ得る。さらにまた、補助物質 (例えば湿潤剤、乳化剤、pH緩衝物質など) もそのような組成物中に存在することができる。そのような担体は、患者による摂取のために、前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー懸濁剤などに処方することを可能にする。

いったん処方されたら、本発明の組成物は患者に直接投与することができる。治療されるべき対象者は動物であってよく、特に人間が治療され得る。

本発明で利用される医薬組成物は多数の経路によって投与することができる。前記経路には経口、静脈内、筋肉内、動脈内、脊髄内、腱鞘内、脳室内、経皮又は皮膚貫通適用 (例えばWO98/20734を参照されたい)、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内又は直腸投与が含まれるが、ただしこれらに限定されない。遺伝子銃又はヒポスプレーもまた本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。典型的には、治療用組成物は、注射可能剤として (液体溶液又は懸濁物として) ; 注射前に液体ビヒクル中の溶液又は懸濁液として調製するために適切な固体形として調製され得る。

前記組成物の直接的デリバリーは、一般的には、皮下、腹腔内、静脈内、又は筋肉内に注射することによって達成されるか、又は組織間隙腔にデリバリーすることができる。前記組成物はまた病巣に投与することもできる。投薬処置は1回投薬スケジュールでも複数回

投薬スケジュールでもよい。

【0074】

特定の疾病状態において、本発明のポリペプチドの活性が過剰な場合は、いくつかのアプローチが利用可能である。あるアプローチは、対象者に上記に記載した阻害化合物（アンタゴニスト）を、本発明のポリペプチドの機能を抑制するために有効な量で医薬的に許容できる担体と一緒に投与することを含む（前記ポリペプチドの機能の抑制は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を阻止し、又は二次シグナルを阻害しそれによって異常な症状を軽減することによって達成される）。好ましくは、そのようなアンタゴニストは抗体である。もっとも好ましくは、そのような抗体は、それらの免疫原性を最小限にするために、上記で考察したようにキメラ化及び/又はヒト化されている。

また別のアプローチでは、注目のリガンド、基質、酵素、レセプターに対する結合アフィニティーを保持するポリペプチドの可溶性形態を投与することができる。典型的には、前記ポリペプチドは注目の部分を保有する断片の形態で投与することができる。

更に別のアプローチでは、前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、発現ブロック技術を用いて（例えば上記に記載したようなアンチセンス核酸モジュールの使用（内部で生成させるか、又は別個に投与される））抑制することができる。遺伝子発現の改変は、ポリペプチドをコードする遺伝子の制御領域、5'領域、調節領域（シグナル配列、プロモーター、エンハンサー及びイントロン）の相補性配列又はアンチセンス分子（DNA、RNA又はPNA）を設計することによって達成することができる。同様に、抑制は“トリプルヘリックス”塩基対法を用いて達成することができる。トリプルヘリックスペアリングは、ポリメラーゼ、転写因子又は調節分子の結合のために十分に開き得るというダブルヘリックスの能力の阻害を惹起するので有用である。トリプレックスDNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている（J.E. Gee et al. 1994, In: B.E. Huber and B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY）。相補性配列又はアンチセンス分子はまた、転写物のリボソームへの結合を妨げることによってmRNAの翻訳を阻止するように設計することができる。そのようなオリゴヌクレオチドは投与するか、又はin vivo発現によりin situで生成させてもよい。

【0075】

さらにまた、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げることができる。リボザイムは触媒活性を有するRNAであり、天然又は合成であり得る（例えば以下を参照されたい：N. Usman et al. Curr. Opin. Struc. Biol. 1996, 6(4):527-33）。合成リボザイムは、mRNAを選択した位置で特異的切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を防げることができるように設計することができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるように、天然のリン酸リボース骨格及び天然の塩基を用いて合成することができる。また別には、リボザイムは、非天然骨格（例えば2'-O-メチルRNA）を用いて合成しリボヌクレアーゼによる分解から保護することができ、さらに改変塩基を含むことができる。

RNA分子を改変して、細胞内安定性及び半減期を高めることができる。可能な改変には、前記分子の5'及び/又は3'末端におけるフランキング配列の付加、又は前記分子の骨格内でのホスホジエステル結合以外のホスホロチオエート又は2'-O-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限定されない。この概念はPNAの作成に内在するものであり、非慣用的塩基（例えばイノシン、ケオシン及びブトシン）および、同様にアセチル-、メチル-、チオ-並びにアデニン、シチジン、グアニン、チミン及びウリジンの改変型（内在性エンドヌクレアーゼはこれらを容易に認識しない）を含有させることによって、これらの分子の全てに広く適用することができる。

本発明のポリペプチド及びその活性の過小発現に関連する異常状態を治療するために、いくつかのアプローチがまた利用可能である。あるアプローチは、対象者に前記ポリペプチドを活性化する化合物（すなわち上記に記載したアゴニスト）の治療的に有効な量を投与し、前記異常な症状を軽減することを含む。また別には、前記ポリペプチドの治療量を適切な医薬担体と一緒に投与して、ポリペプチドの注目する生理学的バランスを回復させ

ることができる。

【0076】

遺伝子療法を用い、対象者の対応する細胞による前記ポリペプチドの内在性産生を達成することができる。遺伝子療法は、修正した治療用遺伝子で欠損遺伝子を置換することによって前記ポリペプチドの不適切な産生を永久的に治療するために用いられる。

本発明の遺伝子療法はin vivo又はex vivoで実施することができる。ex vivo遺伝子療法は、患者細胞の単離及び精製、治療遺伝子の導入、及び遺伝的に変化させた細胞を前記患者に戻すこと必要とする。対照的に、in vivo遺伝子療法は患者の細胞の単離及び精製を必要としない。

前記治療用遺伝子は患者への投与のために典型的には“パッケージングされている”。

遺伝子デリバリービヒクルは、非ウイルス性（例えばリポソーム）、又は複製欠損ウイルス（例えばK.L. Berkner (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1992, 158:39-66) 記載のアデノウイルス、又はN. Muzyczka (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1992, 158:97-129 ; 及び米国特許5,252,479号) 記載のアデノ関連ウイルス (AAV)) であり得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、複製欠損レトロウイルスベクターで発現について操作することができる。続いてこの発現構築物を単離し、さらに、前記ポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージング細胞に導入することができる。その結果、前記パッケージング細胞は注目の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生することができる。in vivoで細胞を操作し、さらにin vivoで前記ポリペプチドを、発現するために、これらの産生細胞を対象者に投与することができる（以下の成書の20章を参照されたい：Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches in Human Molecular Genetics (1996), T. Strachan and A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd. (及びその中に引用された参考文献)）。

また別のアプローチは“裸のDNA”の投与であり、前記アプローチでは治療用遺伝子は血流又は筋肉組織に直接注射される。

【0077】

本発明のポリペプチド又は核酸が疾患惹起因子である状況では、本発明は、前記ポリペプチド又は核酸をワクチンとして用いて前記疾患惹起因子に対する抗体の生成を提供する。

本発明のワクチンは、予防的（すなわち感染を防ぐ）又は治療的（すなわち感染後の疾患を治療する）であり得る。そのようなワクチンは免疫抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質又は核酸を含み、前記は通常は上記に記載したように医薬的に許容できる担体と組み合わせられている。前記担体には、前記組成物を受容する個体において有害な抗体をそれ自体誘発しない任意の担体が含まれる。さらにまた、これらの担体は免疫刺激物質（“アジュバント”）として機能することができる。さらにまた、前記抗原又は免疫原は、細菌の類毒素（例えばジフテリア、破傷風、コレラ、H. ピロリ及び他の病原体由来の類毒素）と結合させることができる。

ポリペプチドは胃で分解され得るので、ポリペプチドを含むワクチンは好ましくは非経口的に（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内注射）投与される。非経口投与に適した処方物には、水性及び非水性無菌的注射溶液（抗酸化剤、緩衝物質、制菌剤、及び処方物をレシipientの血液と等張にさせる溶質を含むことができる）、及び水性及び非水性無菌的懸濁物（懸濁剤又は膨張剤を含むことができる）が含まれる。

本発明のワクチン処方物は単位用量又は多用量容器で提供することができる。例えば、封入アンプル及びバイアルは、使用直前に無菌的液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。投与量は、ワクチンの具体的な活性に左右され、日常的な実験によって容易に決定することができる。

本発明のポリペプチドと結合する抗体の遺伝的デリバリーはまた、例えば国際特許出願WO98/55607に記載されているように実施することができる。

ジェットインジェクション（例えば以下を参照されたい：www.powderject.com）と称さ

れる技術もまたワクチン組成物の処方でも有用である。

ワクチン接種及びワクチンデリバリー系のために多数の適切な方法が国際特許出願WO00/29428に記載されている

【0078】

本発明はまた、診断試薬としての本発明の核酸分子の使用に関する。本発明の核酸分子の特徴を有する遺伝子の変異型（前記は機能不全を伴う）の検出は、疾患の診断又は疾患に対する感受性（前記遺伝子の過少発現、過剰発現又は空間的若しくは時間的発現の変異により生じる）の診断に付け加えることができるか、又はそれらを明らかにできる診断的ツールを提供する。前記遺伝子に変異を有する個体は、多様な技術によってDNAレベルで検出することができる。

10

診断用核酸分子は、対象者の細胞（例えば血液、尿、唾液、組織生検又は剖検材料）から入手できる。ゲノムDNAは直接検出に用いてもよいが、又は、解析の前にPCR、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）又は他の増幅技術によって酵素的に増幅してもよい（例えば以下を参照されたい：Saiki et al. Nature 1986, 324:163-166；Bej et al. Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 1991, 26:301-334；Birkenmeyer et al. J. Virol. Meth. 1991, 35:117-126；J. Van Brunt Bio/Technology 1990, 8:291-294）。

ある実施態様では、本発明のこの特徴は患者の疾患を診断する方法を提供し、前記方法は、本発明のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを判定し、さらに前記発現レベルをコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと相違するレベルが疾患の指標となる。前記方法は、

20

（a）患者の組織サンプルと核酸プローブとを、本発明の核酸分子と前記プローブとの間でのハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で接触させる工程；

（b）コントロールサンプルを前記プローブと工程（a）で用いた条件と同じ条件下で接触させる工程；及び

（c）前記サンプルにおいてハイブリッド複合体の存在を検出する工程、を含み、コントロールサンプル中のハイブリッド複合体レベルと異なる患者サンプル中のハイブリッド複合体レベルが検出されることを疾患の指標とする。

本発明の更なる特徴は以下の工程を含む診断方法を含む：

30

（a）疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

（b）前記組織サンプルから本発明の核酸分子を単離する工程；

（c）疾患と関連した核酸分子の変異の存在を検出することにより、疾患について患者を診断する工程。

【0079】

上記の方法において核酸分子の検出を補助するために、例えばPCRを用いる増幅工程を含むことができる。

本発明の更なる特徴は以下の工程を含む診断方法を含む：

40

（a）疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

（b）前記組織サンプルから本発明の核酸分子を単離する工程；

（c）疾患と関連した核酸分子の変異の存在を検出することにより、疾患について患者を診断する工程。

上記の方法において核酸分子の検出を補助するために、例えばPCRを用いる増幅工程を含むことができる。適切なプローブは上記である程度詳細に考察されている。

欠失及び挿入は、正常な遺伝子型と比較した増幅生成物のサイズの変化によって検出することができる。点変異は、本発明の標識RNA或いは本発明の標識アンチセンスDNA配列に対して増幅DNAをハイブリダイズさせることによって識別することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によるか又は融解温度における相違を判定することによってミスマッチ二重鎖と区別することができる。患者における変異の有無は、ストリンジェントな条件下でDNAとハイブリダイズしてハイブリッド二本鎖分子を形成する核酸プローブとDNAを接触させることによって検出することができる。前記ハイブリッド二本鎖分子は、疾

50

患に関連する変異に対応する任意の部分において核酸プローブがハイブリダイズしない部分を有しており、前記プローブがハイブリダイズしない部分の有無が、DNA鎖の対応する部分における疾患関連変異の有無の指標として検出される。

このような診断は出生前および出生後検査として特に有用である。

【0080】

参照遺伝子と“変異体”遺伝子との間の点変異及び他の配列の相違は他の周知の技術、例えば直接的DNA配列決定又は一本鎖コンフォメーション多型性によって特定することができる（以下を参照されたい：Orita et al. Genomics 1989, 5:874-879）。例えば、改変PCRによって生成された二本鎖PCR生成物又は一本鎖鋳型分子とともに配列決定プライマーを用いることができる。配列決定は、放射能標識ヌクレオチドを用いる通常の工程によって、又は蛍光タグを用いる自動配列決定工程によって実施される。クローン化DNAセグメントもまたプローブとして用いて、特定のDNAセグメントを検出することができる。この方法の感度は、PCRと併用されたときに極めて強化される。さらに、点変異及び他の配列変動（例えば多型）は、上記のように、例えばただ1つのヌクレオチドが異なる配列のPCR増幅のために対立遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドを用いることにより検出することができる。

10

【0081】

DNAの配列相違はまた、変性剤含有又は非含有ゲルにおけるDNA断片の電気泳動移動度の変化によって、又は直接DNA配列決定によって検出することができる（例えば、Meyers et al. Science 1985, 230:1242）。特定の位置における配列の変化はまた、RNase及びS1保護のようなヌクレアーゼ保護アッセイ又は化学的切断方法によって示すことができる（Cotton et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 85:4397-4401）。

20

通常のゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、ミクロ欠失、異数体、転座、倒置のような変異はまたin situ解析によっても検出することができる（例えば以下を参照されたい：Keller et al. DNA Probes, 2nd Ed. (1993) Stockton Press, New York, N.Y. USA）。すなわち、細胞内のDNA又はRNA配列は、それらを単離及び/又は膜上に固定する必要なしに変異について解析することができる。フルオレッセンスin situハイブリダイゼーション（FISH）は現在のところもっとも一般的に用いられる方法であり、FISHに関しては多数の概説が存在する（例えば以下を参照されたい：Trachuck et al. Science 1990, 250:559-562；Trask et al. Trends. Genet. 1991, 7:149-154）。

30

本発明の別の実施態様では、本発明の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築し、遺伝的変種、変異及び多形性の効率的なスクリーニングを実施することができる。アレイテクノロジーの方法は周知であり、普遍的な応用性を有し、遺伝子発現、遺伝的連鎖及び遺伝的変動性を含む分子遺伝学における多様な疑問に答えるために用いることができる（例えば以下を参照されたい：M. Chee et al. Science 1996, 274:610-613）。

【0082】

ある実施態様では、前記アレイは、文献（PCT出願WO95/11995（Chee et al.）；D.J. Lockhart et al. 1996, Nat. Biotech. 14:1675-1680；M. Schena 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619）に記載された方法にしたがって調製され、使用される。オリゴヌクレオチド対は2つから100万を超える範囲であり得る。オリゴマーは、光誘導化学反応を用いて基板上の指定の領域で合成される。前記基板は紙、ナイロン若しくは他のタイプのメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライド又は任意の他の適切な固相であろう。別の特徴では、オリゴヌクレオチドは、化学的カップリング方法及びインクジェット適用装置をPCT出願WO95/25116（Balteschweiler et al.）に記載されたように用いて、基板の表面で合成することができる。別の特徴では、真空系、熱、UV、機械的又は化学的結合方法によって、ドット（又はスロット）プロットに類似する“グリッド形成（gridded）”アレイを用い、基板の表面にcDNA断片又はオリゴヌクレオチドを配列し、結合させることができる。アレイ（例えば上記に記載のもの）は手動で作成するか、又は利用可能な装置（スロットプロット又はドットプロット装置）、材料（任意の適切な固相）及び機械（

40

50

自動装置を含む)を用いて製作することができ、8、24、96、384、1536又は6144のオリゴヌクレオチド、又は2から100万を超える他の任意の数(前記100万を超える数は市販の装置の効率的な使用に役立つ)のオリゴヌクレオチドを含むことができる。

上記に考察した方法に加えて、対象者に由来するサンプルから異常に低下又は増加したレベルのポリペプチド又はmRNAを測定することを含む方法によって疾患を診断することができる。発現の低下又は増加は、ポリヌクレオチドの定量について当分野で周知の方法のいずれか(例えば核酸増幅、例えばPCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザンブロットティング及び他のハイブリダイゼーション方法)を用いて、RNAレベルで測定することができる。

【0083】

宿主由来のサンプル中の本発明のポリペプチドレベルを決定するために用いることができるアッセイ技術は当業者には周知であり、ある程度詳細に上記で考察されている(放射能免疫アッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット解析及びELISAアッセイを含む)。本発明のこの特徴は以下の工程を含む診断方法を提供する:(a)上記に記載のリガンドを生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程;及び(b)前記複合体を検出する工程。

ポリペプチドレベルを測定するためのプロトコル、例えばELISA、RIA及びFACSはさらにまた、変化した又は異常なポリペプチド発現レベルの診断の根拠を提供する。ポリペプチド発現の正常値又は標準値は、正常な哺乳動物対象、好ましくはヒトから採取した体液又は細胞抽出物を、前記ポリペプチドに対する抗体と複合体形成に適した条件下で一緒にすることによって確立される。標準的な複合体形成量は種々の方法(例えば光測定手段)によって定量することができる。

本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を、前記ポリペプチドの発現を特徴とする症状又は疾患の診断に用いるか、又は本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンド及び他の化合物で処置される患者をモニターするアッセイで用いることができる。治療薬について上記で述べた態様と同じ態様で診断のために有用な抗体を調製することができる。前記ポリペプチドのための診断アッセイには、前記抗体及びヒトの体液又は細胞若しくは組織の抽出物中で前記ポリペプチドを検出するための標識を利用する方法が含まれる。前記抗体は改変して又は改変せずに用いることができる。さらに前記抗体は、共有結合又は非共有結合によりそれらをレポーター分子と結合させることによって標識することができる。当分野で公知の極めて多様なレポーター分子を使用することができ、それらのいくつかは上記に記載されている。

【0084】

対象者、コントロールサンプル及び生検組織由来の疾患サンプルにおいて発現されるポリペプチドの量を標準値と比較する。標準値及び対象の値との間の偏差によって疾患を診断するためのパラメーターが確立される。診断アッセイは、ポリペプチド発現の有る、無し、及び過剰を識別し、さらに、治療的介入時のポリペプチドレベルの調節をモニターするために用いることができる。そのようなアッセイはまた、具体的な治療計画の有効性を判定するために動物実験、臨床試験又は個々の患者の治療のモニターで用いることができる。

本発明の診断キットは以下を含むことができる:

- (a) 本発明の核酸分子;
- (b) 本発明のポリペプチド;
- (c) 本発明のリガンド。

本発明のある特徴では、診断キットは以下を含むことができる:ストリンジェントな条件下で本発明の核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器;前記核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを含む第二の容器;及び疾患の診断を容易にするために前記プローブ及びプライマーを使用するための指示書。前記キットはさらにハイブリダイズしないRNAを消化するための試薬を保持する第三の容器を含むことができる。

本発明のまた別の特徴では、診断キットは核酸分子のアレイを含むことができ、前記分子の少なくとも1つは本発明の核酸分子である。

本発明のポリペプチドを検出するために、診断キットは、本発明のポリペプチドと結合する1つ以上の抗体；及び前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬を含むことができる。

【0085】

そのようなキットは、I-ドメイン含有タンパク質が関係する疾患又は前記疾患に対する感受性の診断で有用であろう。そのような疾患には以下が含まれ得る：細胞増殖性異常（新形成、メラノーマ、肺、結腸直腸、乳房、膵臓、頭部及び頸部の腫瘍、並びに他の固形腫瘍を含む）；骨髓増殖性異常（例えば白血病、非ホジキンリンパ腫、白血球減少症、血小板減少症、血管増殖性異常、カポジ肉腫）；自己免疫疾患/炎症性疾患（アレルギー、炎症性腸疾患、関節炎、乾癬及び気道の炎症、喘息、及び器官移植拒絶を含む）；心脈管系異常（高血圧、浮腫、狭心症、アテローム性硬化症、血栓症、敗血症、ショック、再灌流損傷及び虚血を含む）；神経学的異常（中枢神経系疾患、アルツハイマー病、脳損傷、筋萎縮性側索硬化症及び疼痛を含む）；発育異常；代謝異常（真性糖尿病、骨粗しょう症、肥満、エイズ及び腎疾患を含む）；感染（ウイルス感染、細菌感染、真菌感染及び寄生虫感染を含む）；並びに他の病的状態。好ましくは、前記疾患は、vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質が関係する疾患である。vWFA及び/又はANT_IGドメイン含有タンパク質が関係する疾患の例には、細菌感染、細菌毒素障害、炭疽、毒素（例えば細菌毒素）のブロック、癌、腫瘍内皮、大腸癌、膀胱癌、食道癌、肺癌、メラノーマ、若年性ヒアリン線維腫症（JFH）、乳児全身性ヒアリン症（ISH）、フォン・ウィルブランド病、ベスレム筋障害、栄養障害型表皮水疱症、血栓症、血小板介在凝固の調節、自己免疫疾患及び炎症が含まれる。そのようなキットはまた、生殖異常（不妊を含む）の検出のために用いることができる。

本発明の種々の特徴及び実施態様を、INSP141、INSP142、INSP143又はINSP144エクソンポリペプチド、並びにINSP141、INSP142、INSP143又はINSP144ポリペプチドに具体的に言及しながらこれから実施例によってより詳細に述べる。

細部の改変は本発明の範囲から逸脱することなく実施され得ることは理解されよう。

【0086】

表 1

アミノ酸	同義グループ	より好ましい同義グループ
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

10

20

【 0 0 8 7 】

表 2

アミノ酸	同義グループ
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, アロ-Thr, Met, D-Met, Met(0), D-Met(0), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-チアゾリジン-4-カルボン酸, D-または L-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, アロ-Thr, Met, D-Met, Met(0), D-Met(0), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, トランス-3,4, または 5-フェニルプロリン, AdaA, AdaG, cis-3,4, または 5-フェニルプロリン, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

実施例

実施例 1 : INSP141

配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22をまとめて得られたポリペプチド配列は配列番号:24であり、これはINSP141の連続エクソンの翻訳物を表している。このポリペプチド配列を、NCBI非重複データベースのBLASTpのためのクエリーとして用いた。上位10のマッチングが図1に示されている。図1から分かるように、INSP141は、炭疽毒素レセプター前駆体タンパク質と相同性を共有する。

【 0 0 8 9 】

実施例 2 : INSP142

配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50をまとめて得られたポリペプチド配列は配列番号:52であり、これはINSP142の連続エクソンの翻訳物を表している。このポリペプチド配列を、NCBI非重複データベースのBLASTpのためのクエリーとして用いた。上位10のマッチングが図2に示されている。図2から分かるように、INSP141は、炭疽毒素レセプター前駆体タンパク質と相同性を共有する。

【 0 0 9 0 】

実施例 3 : INSP143

配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、

配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88をまとめて得られたポリペプチド配列は配列番号:90であり、これはINSP143の連続エクソンの翻訳物を表している。このポリペプチド配列を、NCBI非重複データベースのBLASTpのためのクエリーとして用いた。上位10のマッチングが図3に示されている。図3から分かるように、INSP143は、炭疽毒素レセプター前駆体タンパク質と相同性を共有する。

【 0 0 9 1 】

実施例 4 : INSP144

配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、配列番号:116、配列番号:118、配列番号:120、配列番号:122、配列番号:124をまとめて得られたポリペプチド配列は配列番号:126であり、これはINSP143の連続エクソンの翻訳物を表している。このポリペプチド配列を、NCBI非重複データベースのBLASTpのためのクエリーとして用いた。上位10のマッチングが図4に示されている。図4から分かるように、INSP144は、炭疽毒素レセプター前駆体タンパク質と相同性を共有する。

【 0 0 9 2 】

実施例 5 : シグナル配列

INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144はいずれも、そのタンパク質の開始部にシグナルペプチドを有すると予想される。図6にしたがえば、シグナル配列は、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチド配列のアミノ酸1から27にわたる（すなわちINSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチド配列のMGSHESLGPYFLVFLLLLLPPPLFRA（配列番号:152））。シグナル配列の切断部位は、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチド配列の残基27と28の間である。

【 0 0 9 3 】

実施例 6 : 膜貫通性の予想

INSP141及びINSP142は分泌タンパク質であると予想される、膜貫通領域を持たない（図6及び7）。

INSP143及びINSP144は膜貫通領域を含むと予想される（図6及び7）。INSP143及びINSP144の両ペプチドについて、N-末端は細胞外にあり、C-末端は細胞内にある。

INSP141及びINSP142は可溶性アイソフォームであり、完全なアイソフォームINSP143及びINSP144の機能を調節することができよう。

【 0 0 9 4 】

実施例 7 : INSP141、INSP142及びINSP143-ECのクローニングの概要

INSP141、INSP142、INSP143、INSP144は、vWF-I/Aドメインを含む炭疽レセプター様配列の予想物のスプライス変種ファミリーである。前記配列はいずれも完全長であり、予想されるシグナルペプチドを含む。

INSP141は、11エクソンにコードされる306アミノ酸ORF（918bp）の予想物である。INSP142は、13エクソンにコードされる352アミノ酸ORF（1056bp）の予想物である。INSP143は、18エクソンにコードされる608アミノ酸ORF（1824bp）の予想物である。INSP144は、17エクソンにコードされる631アミノ酸ORF（1893bp）の予想物である。INSP141及びINSP142は分泌タンパク質であると予想される。INSP143及びINSP144はI型膜貫通タンパク質であると予想される。INSP143のクローニングされた細胞外ドメインは、INSP144の細胞外ドメインと同一である。種々の配列のエクソンのアラインメント図は図5に示されている。ORF及びクローニング配列のアミノ酸配列アラインメントは図6に示されている。予想物のヌクレオチド配列のアラインメントは図7に示されている。

【 0 0 9 5 】

7.1 ヒトcDNA鋳型の調製

種々の健常人組織の全RNAサンプル（Clontech, Stratagene, Ambion, Biochain Institute及び本研究所内の調製物）から、スーパースクリプト（Superscript）II RNaseH逆転写酵素（Invitrogen）を用い第一鎖のcDNAを製造元のプロトコルにしたがって調製した。

以下の溶液を1.5mLのエッペンドルフ管で調製した：オリゴ(dT)₁₅プライマー（500 µg/mLで1 µL）（Promega）；2 µgのヒト全RNA；1 µLの10mMのdNTPミックス（各々10mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP；中性pH）；及び滅菌蒸留水で最終体積12 µL。

続いて前記溶液を65 °Cで5分加熱し、さらに氷上で冷却した。簡単に遠心して内容物を集め、4 µLの5×第一鎖緩衝液、2 µLの0.1MのDTT、及び1 µLのRNaseOUTリコンビナントリボヌクレアーゼ阻害剤（40ユニット/µL、Invitrogen）を添加した。前記管の内容物を穏やかに混合し、42 °Cで2分間インキュベートし；続いて1 µL（200ユニット）のスーパースク립トII酵素を添加し、ピペット操作により穏やかに混合した。前記混合物を42 °Cで50分インキュベートし、続いて70 °Cで15分加熱して不活化した。cDNAと相補的なRNAを除去するために、1 µL（2ユニット）の大腸菌RNaseH（Invitrogen）を添加し、反応混合物を37 °Cで20分インキュベートした。最後の21 µLの反応混合物に179 µLの滅菌水を添加して希釈し、総体積200 µLを得た。INSP141 - INSP144の増幅のために用いるcDNA鋳型は精巣のRNAから得た。

10

【0096】

7.2 cDNAライブラリー

ヒトcDNAライブラリー（バクテリオファージラムダ（ λ ）ベクター中のライブラリー）を業者（Stratagene又はClontech）から購入するか、又は ZAP又は GT10ベクター中のライブラリーを製造元（Stratagene）のプロトコルにしたがって研究所内（Serono Pharmaceutical Research Institute）で調製した。バクテリオファージ DNAは、感染させた大腸菌宿主株の小規模培養から、ウィザードラムダプレップ（Wizard Lambda Preps）DNA精製システムを用い製造元（Promega, Corporation, Madison WI.）の指示にしたがって調製した。INSP144 - INSP144の増幅に用いたcDNAライブラリー鋳型は、精巣ライブラリー及び脳-肺-精巣混合ライブラリーである。

20

7.3 PCRのための遺伝子特異的クローニングプライマー

18から25塩基の長さを有するPCRプライマー対を、プライマーデザイナーソフトウェア（Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA）を用いて、バーチャルcDNAの仮想コード配列の増幅のために設計した。PCRプライマーは、55 ± 10 °Cに近いT_m及び40-60%のGC含量を持つように最適化させた。標的配列（INSP141）に対して高い選択性を有し非特異的プライミングはほとんど又は全くもたないプライマーを選別した。

30

【0097】

7.4 ヒトcDNA鋳型からのINSP141 - INSP144ファミリーのPCR増幅

予想されるINSP141c_{ds}の全体をカバーする985bpのcDNA断片を増幅するために、遺伝子特異的クローニングプライマー（INSP-CP1及びINSP141-CP2、表3及び図7）を設計した。前記プライマー対をヒト精巣cDNAサンプル及びPCR鋳型としてcDNAライブラリーとともに用いた。以下を含む最終体積50 µLでPCRを実施した：1×のプラチナム（Platinum（商標））Taqハイファイデリティ（High Fidelity, HiFi）緩衝液；2mMのMgSO₄；200 µMのdNTP；0.2 µMの各クローニングプライマー；1ユニットのプラチナムTaq DNAポリメラーゼハイファイデリティ（HiFi）（Invitrogen）；約20ngの鋳型cDNA；及び0×又は1×のPCRxエンハンサー溶液（Invitrogen）。

40

サイクリングは、以下のようにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて実施した：94 °C、2分；94 °Cで30秒、57 °Cで30秒、及び68 °Cで1分30秒の40サイクル；続いて68 °Cで8分の1サイクル；及び4 °Cの維持サイクル。

各増幅生成物の30 µLを1×のTAE緩衝液（Invitrogen）中の0.8%アガロースゲルで可視化した。ほぼ予想された分子量の生成物が、精巣cDNAライブラリー鋳型から増幅したPCR生成物中に観察された。これらの生成物を、キアゲン・ミンエルート（Qiagen MinElute）DNA精製システム（Qiagen）を用いてゲルから精製し、10 µLのEB緩衝液（10mMトリス・Cl（pH8.5））中に溶出させて直接サブクローニングを実施した。

【0098】

7.5 PCR生成物のサブクローニング

50

PCR生成物を、インビトロゲン社 (Invitrogen Corporation) から購入したTAクローニングキットを用い製造元が特定した条件下でトポイソメラーゼI改変クローニングベクター (pCR4-TOPO) にサブクローニングした。簡単に記せば、4 μ Lのゲル精製PCR生成物を1 μ LのTOPOベクター及び1 μ Lの塩溶液と室温で15分インキュベートした。続いて、前記反応混合物で大腸菌TOP10 (Invitrogen) を以下のように形質転換した：10 μ LアリコットのワンショットTOP10細胞を氷上で融解し、2 μ LのTOPO反応液を添加した。前記混合物を15分氷上でインキュベートし、続いて42 $^{\circ}$ Cで正確に30秒インキュベートして熱ショックを与えた。サンプルを氷に戻し、250 μ Lの温 (室温) SOC培養液を添加した。サンプルを37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪 (220rpm) しながらインキュベートした。続いて、アンピシリン (100 μ g/mL) を含むL-ブロス (LB) プレートに前記形質転換混合物を加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。

【0099】

7.6 プラスミドDNAの調製及び配列決定

アンピシリン (100 μ g/mL) を含む5mLのL-ブロス (LB) にいくつかのコロニーを接種し、220rpmで振盪しながら37 $^{\circ}$ Cで一晩増殖させた。前記5mL培養からバイオロボット8000自動システム (Qiagen) 又はウィザードプラスSVミニプレップキット (Promega cat. No. 1460) を用い、製造元の指示にしたがってミニプレッププラスミドDNAを調製した。プラスミドDNAを80 μ Lの滅菌水中に溶出させた。スペクトラマックス190分光光度計 (Molecular Devices) を用いて前記DNA濃度を測定した。ビッグダイ (BigDye) ターミネーターシステム (Applied Biosystems Cat. No. 4390246) を用い製造元の指示にしたがって、プラスミドDNA (200 - 500ng) をT3プライマーによるDNA配列決定に付した。前記プライマー配列は表3に示されている。配列決定反応物は、ダイ-エキス (Dye-Ex) カラム (Qiagen) 又はモンタージュ (Montage) SEQ96クリーンアッププレート (Millipore cat. No. LSKS09624) を用いて精製し、続いてアプライドバイオシステム3700シーケンサーで解析した。

配列解析によって、増幅領域内の予想されるINSP142配列とマッチングするクローンが同定された。INSP141、INSP142、及びINSP143のヌクレオチド配列のアラインメントは図7に示されている。前記配列はPCRによって引き起こされた誤りであると思われる置換P259Aを含んでいた。この配列 (1035bp) は、PCRプライマーの位置が原因で完全長のINSPコードではない。前記クローン化cDNA断片の配列は図7から導かれる。クローニングされたPCR生成物のプラスミドはpCR4-TOPO-INSP142 (切端形) である。

【0100】

7.7 PCRによるINSP141cds及びINSP143-細胞外ドメイン (EC) の作成

プラスミドpCR4-TOPO-INSP142 (切端形) にクローニングしたINSP142配列の部分 (INSP141及びINSP142cdsに共通である) を再増幅し、同時に最3'側INSP141-特異的23bpを生成物の3'末端に付加するために、PCR増幅プライマー対 (INSP141-AP1及びINSP141-AP2、表3及び図7) を設計した。さらに別のPCRプライマー (INSP143-AP1、表3及び図7) も設計し、プラスミドpCR4-TOPO-INSP142 (切端形) にクローニングしたINSP142配列の部分 (前記はINSP143及びINSP142cdsに共通である) を再増幅し、同時に最3'側INSP143-特異的21bpを生成物の3'末端に付加するためにINSP141-AP1とともに使用した。INSP141-AP1/INSP141-AP2及びINSP141-AP1/INSP143-AP1プライマー対を、PCR鋳型としてプラスミドpCR4-TOPO-INSP142 (切端形) とともに以下を含む50 μ Lの最終体積で用いた：1xのプラチナム (Platinum (商標)) Taqハイフィデリティー (HiFi) 緩衝液；2mMのMgSO₄；200 μ MのdNTP；各々0.2 μ Mのクローニングプライマー；1ユニットのプラチナムTaq DNAポリメラーゼハイフィデリティー (HiFi) (Invitrogen)；約300ngのプラスミドcDNA；及び0x、0.5x、1x又は2xのPCRxエンハンサー溶液 (Invitrogen)。

サイクリングは、以下のようにプログラムMJリサーチDNAエンジンを用いて実施した：94 $^{\circ}$ C、2分；94 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで1分30秒の30サイクル；続いて68 $^{\circ}$ Cで7分の1サイクル；及び4 $^{\circ}$ Cの維持サイクル。

各増幅生成物のいずれも50 μ Lを1xのTAE緩衝液 (Invitrogen) 中の0.8%アガロースゲルで可視化した。ほぼ予想された分子量の生成物を、プロメガウィザード (Promega Wiza

rd(商標)PCRプレップ(Preps)DNA精製システムを用いてゲルから精製し、50 μ Lの水に溶出させ直接サブクロニングを実施した。

【0101】

表3: INSP141, INSP142 及び INSP143-EC ドメインのクローニング及びシーケンシングプライマー

プライマー	配列 (5'-3')
INSP141-CP1	GTC ACA GGG ACA GCC AGA TA (配列番号:153)
INSP141-CP2	GCT GGT GAT GCT GAC ATT GC (配列番号:154)
INSP141-AP1	ATG GGG AGC CAT GAG TCC CTG GGG CCC TAC TTC CTG (配列番号:155)
INSP141-AP2	AGC TGA CTT CAA TAG AGT ACT CCC AAT GAT AGT GCT TTC ATT GAA GA (配列番号:156)
INSP143-AP1	GCG GAA AAT GCC ACA TGT GGT GCT GGT GAT GCT GAC ATT GCT CTT G (配列番号:157)
21M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT (配列番号:158)
M13REV	CAG GAA ACA GCT ATG ACC (配列番号:159)
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G (配列番号:160)
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG (配列番号:161)

10

20

【0102】

7.8 PCR生成物のサブクロニング

前記PCR生成物を、インビトロゲン (Invitrogen) 社から購入したTAクローニングキットを用い前記製造元が特定する条件下で、トポイソメラーゼI改変クローニングベクター (pCR4-TOPO) でサブクロニングした。簡単に記せば、4 μ Lのゲル精製PCR生成物を1 μ LのTOPOベクター及び1 μ Lの塩溶液と室温で15分インキュベートした。続いて、前記反応混合物で大腸菌TOP10 (Invitrogen) を以下のように形質転換した: 50 μ LアリコットのワンショットTOP10細胞を氷上で融解し、2 μ LのTOPO反応液を添加した。前記混合物を15分氷上でインキュベートし、続いて42 °Cで正確に30秒インキュベートして熱ショックを与えた。サンプルを氷に戻し、250 μ Lの温 (室温) SOC培養液を添加した。サンプルを37 °Cで1時間、振盪 (220rpm) しながらインキュベートした。続いて、アンピシリン (100 μ g/mL) を含むL-ブロス (LB) プレートに前記形質転換混合物を加え、37 °Cで一晩インキュベートした。

30

40

【0103】

7.9 コロニーPCR

滅菌楊枝を用いて50 μ Lの滅菌水にコロニーを接種した。続いて、MJリサーチDNAエンジンを用い、以下を含む20 μ Lの総反応体積で接種物の10 μ LアリコットをPCRに付した: 1 \times のAmpliTaq (商標) 緩衝液; 200 μ MのdNTP; 20pmoleのT7プライマー; 20pmoleのT3プライマー; 1ユニットのAmpliTaq (商標) (Applied Biosystems)。

サイクリング条件は以下のとおりであった: 94 °Cで2分; 94 °Cで30秒、48 °Cで30秒、及び72 °Cで2分の30サイクル。サンプルは、更なる解析の前に 4 °Cで維持した (維持サイクル)。

PCR反応生成物を、1 \times のTAE緩衝液中の1%アガロースゲルで解析した。ほぼ予想された分子量 (INSP141については918bp又はINSP143については1056bp (マルチクローニング部位 (MCS) が原因で +105bp) のPCR生成物を生じたコロニーを、アンピシリン (100 μ g/mL) を含む5mLのL-ブロス (LB) 中で、220rpmで振盪しながら37 °Cで一晩増殖させた。

【0104】

7.10 プラスミドDNA調製及び配列決定

前記5mL培養物からバイオロボット8000自動システム (Qiagen) 又はウィザードプラスSVミニプレップキット (Promega cat. No. 1460) を用い、製造元の指示にしたがってミニ

50

ブレッププラスミドDNAを調製した。プラスミドDNAを80 µLの滅菌水中に溶出させた。スペクトラマックス190分光光度計 (Molecular Devices) を用いて前記DNA濃度を測定した。ビッグダイ (BigDye) ターミネーターシステム (Applied Biosystems Cat. No. 4390246) を用い製造元の指示にしたがって、プラスミドDNA (200 - 500ng) をT3プライマーによるDNA配列決定に付した。前記プライマー配列は表3に示されている。配列決定反応物は、ダイ-エクス (Dye-Ex) カラム (Qiagen) 又はモンタージュ (Montage) SEQ96クリーンアッププレート (Millipore cat. No. LSKS09624) を用いて精製し、続いてアプライドバイオシステム3700シーケンサーで解析した。

配列解析によって、予想されるINSP141cdsとマッチングするクローンが同定された。この配列はPCR鋳型に存在していた置換P259Aを含んでいた。クローニングされたcDNA断片の配列は図7から推定される。クローニングされたPCR生成物のプラスミドマップはpCR4-TOP0-INSP141である。予想されるINSP143-ECドメインcdsとマッチングする第二のクローンが同定された。その配列もまたPCR鋳型に存在していた置換P259Aを含んでいた。cDNA断片クローンの配列は図7から導かれる。クローニングされたPCR生成物のプラスミドマップはpCR4-TOPO-INSP143-ECである。

【 0 1 0 5 】

実施例 8 : INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144の発現及び精製

INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドの組織分布を決定し、in vivoでの発現レベルを決定するために、本明細書に開示したヌクレオチド及びアミノ酸配列を基にして更なる実験を今や実施することができる。

INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144の転写物の存在は、種々のヒト組織由来のcDNAのPCRによって究明することができる。INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144転写物は、被検サンプルでは非常に低レベルで存在し得る。したがって、RNA調製物中の少量のゲノム夾雑物が擬似陽性結果をもたらすので、特別な注意をはらって種々のヒト組織中の転写物の存在を確認することが要求される。したがって、全てのRNAは、逆転写に使用する前にDNaseで処理されねばならない。加えて、各組織について、逆転写を行わないコントロール反応 (-ve RTコントロール) を設定することができる。

例えば、各組織からの1 µgの全RNAを用い、Multiscript逆転写酵素 (ABI) 及びランダムヘキサマープライマーを用いてcDNAを生成することができる。各組織について、逆転写酵素以外の全ての成分を加えたコントロール (-ve RTコントロール) を設定する。各組織について逆転写RNAサンプル及びマイナスRTコントロールに対してPCR反応を行う。INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144特異的プライマーは本明細書で提供する配列情報に基づいて容易に設計することができる。逆転写サンプル中に正しい分子量の生成物が存在し、マイナスRTコントロール中に生成物が存在しないことはその組織中に転写物が存在することの証拠とすることができる。上述のように生成されるものに限らず、適切なcDNAライブラリーはいずれも、INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144転写物のスクリーニングに使用することができる。

INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドの組織分布パターンはこれらのポリペプチドの機能に関してさらに有用な情報を提供するであろう。

さらにまた、適切な発現ベクターを用いて別の実験も今や実施することができる。例えば、ゲートウェイ発現クローンpDEST12.2_INSP141-6HIS-V1及びpEAK12d_INSP141-6HIS-V1をINSP141のために作成した。Revクローニングプライマーの最後の23bpは、INSP141cdsの3'末端を以前に増幅された配列 (前記は選択的スプライシング変種であった) に添加した。エントリープラスミドはpENTR_INSP141-6HIS-V1とする。ゲートウェイ発現クローンpEAK12d_INSP143-6HIS-V1及びpDEST12d_INSP143-EC-6HIS-V1をINSP143-ECのために作成した。Revクローニングプライマーの最後の21bpは、INSP143cdsの3'末端を以前に増幅された配列 (前記は選択的スプライシング変種であった) に添加した。INSP143及びINSP144は共通のクローン化細胞外領域を有する (INSP153-EC=INSP154-EC)。エントリープラスミドはpDONR-Zeo_INSP143-EC-6HIS-V1とする。

哺乳動物細胞のこれらベクターによるトランスフェクションは、INSP141、INSP142、IN

10

20

30

40

50

SP143及びINSP144タンパク質の高レベル発現を可能にし、したがってINSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドの機能的な特徴の持続的な究明を可能にする。以下の材料と方法は、そのような実験で適切なものの例である。

【0106】

細胞培養：

エプスタイン-バーウイルス核抗原を発現するヒト胎児腎293細胞（HEK293-EBNA、Invitrogen）をEx-cell VPRO無血清培養液（シードストック、維持培養液、JRH）中で浮遊物として維持した。トランスフェクションの16から20時間前（第-1日）に、細胞を2枚のT225フラスコ（50mL/フラスコ、2%FBS含有シード培養液（DMEM/F12（1:1））（JRH））に 2×10^5 細胞/mLの濃度で播種する。次の日（トランスフェクション0日目）、トランスフェクションをJetPEITM試薬（2 μ L/ μ gのプラスミドDNA、PolyPlus-トランスフェクション）を用いて実施する。各フラスコについて、プラスミドDNAをGFP（蛍光レポーター遺伝子）DNAと一緒に同時トランスフェクトする。トランスフェクション混合物を続いて2枚のT225フラスコに添加し、37（5%CO₂）で6日間インキュベートする。陽性トランスフェクションの確認は1日目及び6日目の定性的蛍光試験（Axiovert 10 Zeiss）によって実施する。

6日目（収集日）に、2枚のフラスコの上清をプールし、遠心し（例えば4で400g）、固有のアイデンティファイヤーを有する容器に入れる。あるアリコット（500 μ L）をHis-タグ付加タンパク質のQC（内部バイオプロセッシングQC）のためにとっておく。

スケールアップバッチは、ポリエチレンイミン（PolyEthylenimine）（Polysciences）をトランスフェクション剤として用いるを用いる“浮遊細胞のPEIトランスフェクション”（BP/PEI/HH/02/04参照）と称するプロトコルにしたがって作成することができる。

【0107】

精製プロセス

C-末端6Hisタグを有する組換えタンパク質を含む培養液サンプルを冷緩衝液A（50mMのNaH₂PO₄；600mMのNaCl；8.7%（w/v）グリセロール、pH7.5）で希釈する。前記サンプルを滅菌フィルター（Millipore）でろ過し、無菌的な角型培養ビン（Nalgene）で保存する。

精製は、4で自動サンプルローダー（Labomatic）に連結したVISIONワークショップ（Applied Biosystems）で実施する。精製方法は、以下の2つの連続工程で構成される：NiイオンをチャージしたPoros 20 MCカラム（Applied Biosystems）（4.6 \times 50mm、0.83mL）での金属アフィニティークロマトグラフィー、前記に続くセファデックスG-25ミディアム（Amersham Pharmacia）カラム（1.0 \times 10cm）でのゲルろ過。

最初のクロマトグラフィー工程については、金属アフィニティークラムを、30カラム体積のEDTA溶液（100mMのEDTA；1MのNaCl；pH8.0）で再生し、15カラム体積の100mMのNiSO₄溶液による洗浄でNiイオンを再チャージし、10カラム体積の緩衝液Aで洗浄してから7カラム体積の緩衝液B（50mMのNaH₂PO₄；600mMのNaCl；8.7%（w/v）グリセロール；400mMイミダゾール；pH7.5）で洗浄し、最後に15カラム体積の緩衝液A（15mMイミダゾールを含む）で平衡させる。サンプルをラボマチック（Labomatic）サンプルローダーで200mLのサンプルループに移し、続いてNi金属アフィニティークラムに10mL/分の流速で充填する。12カラム体積の緩衝液Aで、続いて28カラム体積の緩衝液A（20mMイミダゾール含有）でカラムを洗浄する。20mMイミダゾール洗浄時にゆるやかに結合している夾雑タンパク質はカラムから溶出される。組換えHis-タグ付加タンパク質は、2mL/分の流速の10カラム体積の緩衝液Bで最終的に溶出し、溶出タンパク質を収集する。

【0108】

第二のクロマトグラフィー工程については、セファデックスG-25ゲルろ過カラムを2mLの緩衝液D（1.137MのNaCl；2.7mMのKCl；1.5mMのKH₂PO₄；8mMのNaH₂PO₄；pH7.2）で再生し、続いて4カラム体積の緩衝液C（137mMのNaCl；2.7mMのKCl；1.5mMのKH₂PO₄；8mMのNaH₂PO₄；20%（w/v）グリセロール；pH7.4）で平衡させる。VISIONに一体化されているサンプルローダーによりNi-カラムから溶出したピーク画分を自動的にセファデックスG-25カラムにロードし、タンパク質を2mL/分の流速で緩衝液Cにより溶出させる。この画分を滅菌遠心フィルター（Millipore）でろ過し、-80で保存した。あるアリコットのサンプル

をSDS-PAGE (4 - 12% NuPAGEゲル; Novex) ウェスタンブロット (抗His抗体使用) で解析する。NuPAGEゲルは、0.1%クーマシーブルーR250染色溶液 (30%メタノール、10%酢酸) で室温、1時間染色し、続いてバックグラウンドが透明になりタンパク質が明瞭に見えるようになるまで20%メタノール、7.5%酢酸で脱染する。

電気泳動の後、タンパク質をゲルからニトロセルロース膜に電気転写する。この膜を緩衝液E (137mMのNaCl; 2.7mMのKCl; 1.5mMのKH₂PO₄; 8mMのNaH₂PO₄; 0.1%トウイーン20; pH7.4) 中の5%粉乳で1時間、室温でブロッキングし、その後、緩衝液E中の2.5%粉乳中の2つのウサギポリクローナル抗His抗体 (G-18及びH-15、各々0.2 µg/mL; Santa Cruz) の混合物とともに4で一晚インキュベートし、膜を緩衝液Eで洗浄し (3 × 10分)、続いて2.5%粉乳含有緩衝液Eで1/3000に希釈したHRP結合抗ウサギ二次抗体 (DAKO, HRP 0399) とともに室温で2時間インキュベートする。緩衝液Eで洗浄後 (3 × 10分)、膜をECLキット (Amersham Pharmacia) で1分間現像する。続いて、膜をハイパーフィルム (Hyperfilm, Amersham Pharmacia) に暴露し、フィルムを現像してウェスタンブロット像を視覚的に解析する。

10

クーマシー染色で検出可能なタンパク質バンドを示したサンプルについて、標準物質としてウシ血清アルブミンを用いBCAタンパク質アッセイキット (Pierce) でタンパク質濃度を決定することができる。

さらにまた、細胞株におけるこのポリペプチドの過剰発現またはノックダウンを用いて宿主細胞ゲノムの転写活性化に対する影響を決定することができる。INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144ポリペプチドの二量体化パートナー、共活性化因子、共リプレッサーはウェスタンブロットティングと組み合わせた免疫沈降および質量分析と組み合わせた免疫沈降によって同定することができる。

20

【0109】

実施例9：Tリンパ球応答を標的とするアッセイ

Fas-リガンド誘導T細胞死

このアッセイは、レセプター媒介細胞死の新規な調節因子を明らかにするであろう。

このアッセイでは、モノクローナル抗6Hisモノクローナル抗体と一緒に組換え6ヒスチジンタグ付加FasリガンドでJarkat細胞 (ヒトT細胞株) を刺激することによってT細胞アポトーシスが誘導される。死は、LDH (細胞が死ぬときに培養液に放出される細胞質酵素) の放出によって定量される。結果の読み出しは、490nmでの比色アッセイの読みである。多くの自己免疫疾患でT細胞は病原性を有することが示され、抗原特異的T細胞を制御できることは治療戦略となる (例えばクローン病患者の抗TNF- 治療)。

30

ヒトMLR：増殖及びサイトカイン分泌

この細胞系アッセイによって、別のドナー由来のPBMCによる刺激 (アロ反応性) 時のリンパ球の増殖及びサイトカインの分泌又は阻害に対する新規なタンパク質の作用が測定される。これらのアッセイは、抗原特異的T細胞及び抗原提示細胞機能に向けられる (前記機能は自己免疫疾患のいずれにおいても重要な細胞性応答である)。分泌されるサイトカイン (IL-2、4、5、10、TNF- 及びIFN-) がCBAによって定量される。

注記：増殖とサイトカイン分泌は独立した応答である。

マウスMLR：増殖

この細胞系アッセイによって、別のドナー (マウス株) 由来の脾細胞による刺激後のリンパ球の増殖又はマウス脾細胞の阻害に対する新規なタンパク質の作用が測定される。このアッセイは、Tリンパ球及び抗原提示細胞応答に対する新規なタンパク質の作用を測定し、h-MLRアッセイの陽性活性及びヒットの確認に用いることができる。このアッセイは、ヒトの疾患についてのネズミのモデルで試験されるタンパク質を選択するために用いられるであろう。

40

【0110】

スーパー抗原、TSSTで刺激したヒトPBMC：

スーパー抗原は、T細胞に影響を与える免疫系の強力な調節因子である。スーパー抗原は、免疫反応が関与する疾患、例えばIBD、アトピー性皮膚炎及び乾癬のような炎症性皮

50

膚疾患に影響を及ぼす。この細胞アッセイでは、TCRを介するが古典的な抗原に対するT細胞応答とは異なる必要条件を伴うTリンパ球活性化、特に同時刺激分子に対するTリンパ球活性化を標的とする。

ConA又はPHAで刺激したヒトPBMC：

これらの細胞系アッセイによって、2つの異なる刺激によって誘導されるサイトカインの分泌に対する新規なタンパク質の、サイトカインビーズアレイ（CBA）アッセイ（IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-5、IL-4及びIL-10）によって測定される作用が測定される。

ほとんどのサイトカインは、損傷、環境及び細胞標的に応じて二重作用（炎症誘発又は抗炎症作用）を有し得る。サイトカインの分泌を調節する能力をもついずれのタンパク質も潜在的治療能力を有し得る（例えばTNF- α 及びIFN- γ を減少させることはTh1媒介自己免疫疾患に有益であり、反対に、IL-4、IL-5を減少させることTh2-媒介疾患に有益であり、IL-10の誘導はMS及びSLEで有益であろう）。

10

【 0 1 1 1 】

単球/マクロファージ及び顆粒球応答を標的とするアッセイ

LPSで刺激したヒトPBMC：

この細胞系アッセイによって、単球/マクロファージ及び顆粒球に対して作用するLPSによって誘導されるサイトカイン（IFN- γ 、TNF- α ）の分泌に対する新規なタンパク質の作用が測定される。

IFN- γ 及びTNF- α の分泌を調節する能力をもついずれのタンパク質もTh1媒介自己免疫疾患に有益であろう。

20

好中球応答を標的とするアッセイ

好中球は、慢性関節リウマチのような炎症及び自己免疫疾患で重要である。IL-8のような白血球化学誘引物質は、細胞と微小血管内皮との間の一連の接着相互作用を開始させ、好中球の活性化、接着及び最終的に遊走を生じさせる。好中球の組織浸潤は、これら細胞の継代における特有の変化に密接に関係する細胞骨格成分の再構成に依存する。

この細胞系アッセイによって、ヒト好中球の細胞骨格再構成に対する新規なタンパク質の作用が測定される。

【 0 1 1 2 】

Bリンパ球応答を標的とするアッセイ

自己抗体および浸潤B細胞は、種々の自己免疫疾患（例えば全身性エリテマトーデス（SLE）、慢性関節リウマチ（RA）、シェーグレン症候群及び重症筋無力症）の病理発生において重要であると考えられる。注目に値する証拠が、B細胞ホメオスタシスにおける脱調節は免疫寛容に影響を与えて、病原性抗体及び持続的炎症を生じる自己反応性B細胞の不適切な生存につながることを示している。B細胞レセプターの起動開始に続くB細胞の増殖、生存及び分化において決定的な役割を果たす新規な因子の同定は、新規な治療法の開発において極めて妥当である。

30

B細胞増殖：

この細胞系アッセイによって、B細胞生存に対する新規なタンパク質の作用が測定される。

B細胞同時刺激：

この細胞系アッセイによって、B細胞同時刺激に対する新規なタンパク質の作用が測定される。

40

【 0 1 1 3 】

単球及びミクログリア応答を標的とするアッセイ

THP-1カルシウム流束：

THP-1細胞アッセイにおけるCa²⁺-流束によって、小胞体から細胞内カルシウムの放出（一般的な二次メッセンジャー事象）を起動させる能力に対する新規なタンパク質の作用が測定される。

ミクログリア細胞増殖：

ミクログリアの前駆細胞の増殖時に、多数のコロニー刺激因子（いくつかのサイトカイ

50

ンを含む)が決定的な役割を果たすことが知られている。それらの中でとりわけM-CSFは、マクロファージ/ミクログリアの成熟の最終段階に必須であり、他のいずれの因子によっても代替されない。この生物学的応答の評価が、ミクログリア活性に影響を及ぼす態様、したがってMSから潜在的な治療性能を有する分子を同定する機会を示してくれるかもしれない。

ミクログリア細胞のM-CSFに対する増殖性応答の測定のために細胞系アッセイが開発された。実現可能性と厳しい試験フェーズによって最適な結果が示された。このアッセイは96ウェルアッセイで実施され、非放射性基質を必要とし、容易に自動化される。

【0114】

実施例10：リアルタイムPCR (Taqman) による INSP142遺伝子発現レベルの解析

各サンプルからの全RNAをRT-PCRのためのスーパースクリプトIIIファースト-ストランド合成システム (Superscript III First-Strand Synthesis System; Invitrogen, Cat. No. 18080-051) を用い、20 μ Lの最終反応体積中で逆転写した。2 μ gの全RNAを50ngのランダムヘキサマープライマー、各々10mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、並びにDEPC-処理水と10 μ Lの体積中で混合した。前記混合物を65 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートし、続いて氷上で1分冷却した。以下のcDNA合成ミックスの10 μ Lを別々の試験管で調製した：2 μ Lの10xのRT緩衝液、4 μ Lの25mMのMgCl₂、2 μ Lの0.1MのDTT、1 μ LのRNaseOUT(商標)(40ユニット/ μ L)、及び1 μ LのスーパースクリプトIII RT酵素(200ユニット/ μ L)。前記cDNA合成ミックスをRNA/プライマー混合物に添加し、穏やかに混合し、25 $^{\circ}$ Cで10分さらに50 $^{\circ}$ Cで50分インキュベートした。続いて、85 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートしてRT酵素を不活化した。前記混合物を氷上で冷却し、続いて1 μ Lの大腸菌RNaseH(2ユニット/ μ L)を添加し、混合物を37 $^{\circ}$ Cで20分インキュベートした。前記混合物を氷上で冷却し、続いて滅菌水で1/250に希釈した。続いて、逆転写酵素反応の希釈物をTaqMan装置(PE Biosystems 7700)でリアルタイムPCR解析に付した。ヒトINSP142及びハウスキーピングコントロール遺伝子グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)のためのPCRプライマーを、プライマーエクスプレスソフトウェア(PE Biosystems)を用いて設計した。フォワードプライマーはエクソン11中に設計した。リバープライマーはエクソン12-13境界にわたるように設計した。このプライマーはINSP142をINSP141から区別するはずであるが、INSP143又は144からは区別できない。

前記プライマーの配列は表4に示されている。TaqMan解析に使用するための特異性及び最適プライマー濃度は、プラスミドpEAK12d-INSP142-6HISの一連の希釈に対してINSP142プライマーを試験することによって決定した。cDNAにおける潜在的なゲノムDNAの夾雑は、GAPDHイントロン配列に特異的なプライマーを用いるPCR反応を実施することによって排除した。非特異的増幅が存在しないことは、PCR生成物を4%アガロースゲル上で解析して予想される分子量の単一バンドが生成されることを解析することによって管理した。

【0115】

SYBRグリーン・リアルタイムPCR反応は、25 μ LのSYBRグリーンPCRマスターミックス(PE Biosystems)(前記に対して0.5ユニットのAmpEraseウラシルN-グリコシラーゼ(UNG, PE Biosystems)がその前に添加されてあった)、300nMの各増幅プライマー、及び5 μ LのRT-PCR生成物を含む50 μ Lの反応体積で実施した。サイクリングは、以下のようにプログラムしたABI PRISM 7700(TaqMan)検出システムを用いて実施した：50 $^{\circ}$ C、2分の1サイクル；95 $^{\circ}$ Cで10分の1サイクル；95 $^{\circ}$ Cで15秒、60 $^{\circ}$ Cで1分の40サイクル。各反応は二重に実施し、結果を平均した。

逆転写cDNAサンプルのプライマー特異的領域をこのように増幅し、それらのサイクル閾値(Ct)値を決定した。各cDNAサンプルのCt値を、ハウスキーピング遺伝子GAPDHのCt値に対して以下のように正規化した。各cDNAサンプルのGAPDH遺伝子とINSP142遺伝子との間の発現レベルの相違をCt値の相違として表した(すなわち、デルタ()Ct = Ct(GAPDH) - Ct(INSP142))。続いて、各サンプルについての結果を、式、相違倍数 = $2^{-(\Delta Ct)}$ にしたがって、検出可能なINSP142発現に要求されたサイクル数とGAPDHのそれとの相違倍数として表した。最後に、各cDNAサンプルにおけるINSP142遺伝子の発現レベルは、INSP1

10

20

30

40

50

42の相違倍数によって100を割ることによってGAPDH遺伝子発現レベル（GAPDH発現レベル＝100%として）に対して相対的に示した。

【 0 1 1 6 】

結果

INSP142プライマーをほぼ100の正常及び病的ヒト組織サンプル、初代細胞及び細胞株の他にIL18BP臨床試験から得られた44の炎症性腸疾患の結腸及び回腸生検及び38の乾癬生検のパネルで試験した。用いたプライマーは、INSP142をスプライス変種INSP141から区別することができたが、スプライス変種INSP143又はINSP144からは区別することができなかった。結果は、以下の表5 - 11に示されており、図10 - 16ではグラフにより示されている。INSP142は最初、精巣cDNAからクローニングされた。正常なヒト組織のTaqman解析によって、精巣のINSP142発現が確認されたが、発現レベルは非常に低かった（GAPDH＝100に対して0.15）（図10）。INSP142はまた皮膚及び肺及び肝臓で同様なレベルで検出された。初代細胞及び細胞株では、INSP142は、骨髄及びヒト皮膚微小血管内皮細胞（図12）、正常ヒト皮膚線維芽細胞（図13）及び末梢血顆粒球並びに好酸球由来細胞株EOL-3において同様に低レベルで検出することができた。驚くべきことに、INSP142発現は、全ての結腸及び回腸IBD生検サンプル並びに乾癬の皮膚生検で検出することができ（図15）、おそらく炎症性疾患過程におけるmRNAのアップレギュレーションであろうと推察される。初代細胞及び細胞株での発現データを基にすれば、皮膚の多数の細胞タイプが乾癬におけるINSP142の発現をもたらすことができよう。

【 0 1 1 7 】

結論

発現結果は、意外にも結腸及び回腸IBD生検サンプル及び乾癬皮膚生検標本に制限されたINSP142発現を示している。

この発現の特異的なパターンによって、炎症性腸疾患、皮膚疾患又は炎症におけるINSP142の中心的な関与が結論付けられる。

好ましくは、前記炎症性疾患はクローン病又は潰瘍性大腸炎から選択される。

好ましくは、前記皮膚疾患は乾癬、接触皮膚炎又はアトピー性湿疹である。

本発明のポリヌクレオチド又は対応するポリペプチドの特徴であるこれらの驚くべき特性によって、これらポリヌクレオチド又はポリペプチドは薬剤又は医薬組成物の調製に適切となる。本発明のポリヌクレオチド又は対応するポリペプチドは、したがって固有組織における制限された発現の予想外の発見を提示している。

【 0 1 1 8 】

表4: TaqMan PCR プライマー配列

プライマー	配列 (5'-3')
INSP142-936F	CCCTGGGCCAAAAGTAGAAAA (配列番号:162)
INSP142-1044R	AAGAGAAGGACATGTGGTGCTG (配列番号:163)
hGAPDH-F	CCACCCATGGCAAATTCC (配列番号:164)
hGAPDH-R	GATGGGATTTCCATTGATGACA (配列番号:165)
イントロン-hGAPDH-F	CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT (配列番号:166)
イントロン-hGAPDH-R	CTGTGCTCCCACTCCTGATTT (配列番号:167)

【 0 1 1 9 】

表 5 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した主要ヒト組織における INSP142 の発現

50

主要組織 収集物	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ Ct	相違倍数	GAPDH(=100)に対する 相対値
S76脳	20.56	34.02	-13.46	11268.44	0.01
S77心臓	21.36	34.10	-12.74	6841.04	0.01
S78腎臓	19.93	32.53	-12.60	6186.90	0.02
S79肝臓	22.79	33.77	-10.98	2019.80	0.05
S80肺	22.92	33.00	-10.09	1086.14	0.09
S81胎盤	21.81	33.82	-12.01	4124.49	0.02
S82骨格筋	17.74	33.86	-16.12	71220.26	0.00
S83小腸	21.65	34.50	-12.85	7383.04	0.01
S84脾臓	21.71	34.74	-13.04	8393.17	0.01
S85胸腺	21.01	32.63	-11.62	3147.52	0.03
S86子宮	21.56	32.58	-11.03	2083.80	0.05
S89脊髄	20.13	34.60	-14.47	22693.63	0.00
S90頸部	24.27	36.00	-11.73	3396.74	0.03
S91結腸	21.50	33.64	-12.14	4513.40	0.02
S92卵巣	23.24	33.83	-10.59	1541.37	0.06
S93前立腺	20.88	33.33	-12.45	5575.94	0.02
S94精巣	21.88	31.24	-9.36	654.84	0.15
S95皮膚	24.39	34.08	-9.70	828.87	0.12
S113膵臓	23.26	33.45	-10.19	1164.10	0.09
S119乳房	21.52	35.58	-14.06	17020.67	0.01
S120胃	21.66	32.61	-10.95	1978.24	0.05
S122眼	22.16	33.32	-11.16	2280.29	0.04
S147膀胱	21.46	34.08	-12.62	6295.04	0.02

10

20

【 0 1 2 0 】

表 6 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した比較ヒト組織における INSP142 の発現

30

比較組織	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ ct	相違倍数	GAPDH (=100)に 対する 相対値
S76 脳	21.31	33.81	-12.50	5789.68	0.02
S140 胎児脳	19.73	32.72	-12.98	8088.64	0.01
S77 心	22.60	35.60	-13.00	8181.72	0.01
S143 胎児心	19.89	34.15	-14.26	19580.66	0.01
S78 腎臓	20.94	33.37	-12.43	5512.82	0.02
S121 胎児腎臓	20.41	34.04	-13.63	12673.55	0.01
S130 狼瘡腎全RNA	22.79	33.98	-11.20	2347.74	0.04
S135 腎腫瘍	20.57	33.27	-12.70	6667.30	0.01
S79 肝臓	23.85	32.73	-8.88	470.18	0.21
S142 胎児肝臓	21.08	33.72	-12.64	6374.85	0.02
S127 狼瘡肝全RNA	24.39	34.07	-9.67	816.10	0.12
S131 肝硬変	22.99	35.29	-12.30	5057.32	0.02
S136 肝腫瘍	19.24	34.12	-14.88	30182.81	0.00
S80 肺	23.65	33.42	-9.76	868.58	0.12
S144 胎児肺	19.29	32.75	-13.45	11203.00	0.01
S128 狼瘡肺全RNA	21.14	36.92	-15.78	56206.04	0.00
S132 硬変肺	18.13	33.36	-15.23	38387.17	0.00
S137 肺腫瘍	22.72	34.21	-11.50	2894.56	0.03
S84 脾臓	22.24	34.84	-12.60	6229.86	0.02
S141 胎児脾臓	22.06	32.99	-10.93	1947.28	0.05
S129 狼瘡脾全RNA	23.62	33.82	-10.20	1174.15	0.09
S133 硬変脾	20.99	33.30	-12.32	5104.76	0.03
S117 ヒトユニバーサルリファレンス	17.56	33.41	-15.85	59095.31	0.00

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

表 7 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した分泌組織および免疫組織における INSP142 の発現

分泌及び免疫学的サンプル	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ ct	相違倍数	GAPDH (=100)に 対する 相対値
S87 骨髄	23.63	33.33	-9.70	831.14	0.12
S88 甲状腺	22.77	33.36	-10.59	1536.53	0.07
S115 だ腺	22.95	35.11	-12.16	4585.12	0.02
S116 副腎	21.94	34.62	-12.68	6546.78	0.02
S123 乳腺	25.03	36.20	-11.17	2302.46	0.04
S125 下垂体	23.48	34.11	-10.62	1578.89	0.06
S145 リンパ節	23.28	35.23	-11.95	3965.59	0.03
S146 脂肪組織	20.35	35.40	-15.05	33879.59	0.00
S148 虫垂	22.60	33.76	-11.17	2296.39	0.04
S149 動脈血管	22.55	35.87	-13.32	10218.47	0.01
S150 咽喉	21.03	34.87	-13.85	14750.27	0.01
S75 扁桃	25.36	37.12	-11.76	3466.37	0.03
S54 間質	22.17	34.02	-11.86	3709.47	0.03
S153 細胞HDMEC	24.32	34.27	-9.96	993.65	0.10
S157 刺激細胞HDMEC	24.36	34.63	-10.27	1237.64	0.08
S155 細胞HAoEC	21.61	34.44	-12.83	7302.87	0.01
S158 刺激細胞HAoEC	20.94	34.05	-13.11	8861.15	0.01
S11 RA2	22.78	34.43	-11.65	3204.93	0.03
S12 RA3	21.45	34.59	-13.15	9058.87	0.01
S13 OA1	26.13	39.39	-13.26	9782.59	0.01
S19 OA4	21.79	34.27	-12.47	5686.33	0.02

【 0 1 2 2 】

表 8 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した初代細胞または細胞株における INSP142 の発現

初代細胞及び細胞株1	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ ct	相違倍数	GAPDH (=100)に 対する 相対値
S1 AG1518 繊維芽細胞	21.54	34.72	-13.18	9258.32	0.01
S2 Howard Ab	21.23	33.97	-12.74	6844.32	0.01
S3 Clark N	20.59	35.30	-14.71	26795.20	0.00
S4 NF1	20.69	34.13	-13.44	11132.82	0.01
S5 NF2	22.05	33.96	-11.91	3843.39	0.03
S6 SScN2	19.93	34.16	-14.23	19207.12	0.01
S7 SSCA2	19.11	33.27	-14.16	18280.44	0.01
S15 LN1	20.23	33.88	-13.66	12923.86	0.01
S16 Lab1	17.60	34.36	-16.76	110689.17	0.00
S17 LN14	20.96	34.26	-13.29	10048.88	0.01
S18 LA13	19.11	33.88	-14.77	27965.97	0.00
S9 NHDF2	23.84	34.10	-10.26	1230.13	0.08
S10 NHDF3	24.58	34.75	-10.17	1148.35	0.09
S55 JEHC	20.53	34.16	-13.63	12655.39	0.01
S56 HT 1080	19.81	34.96	-15.15	36287.57	0.00
S57 MRC-5	20.31	35.68	-15.37	42276.07	0.00
S152 細胞Mob	21.68	34.18	-12.50	5775.85	0.02
S155 刺激細胞Mob	20.44	34.57	-14.13	17932.97	0.01
S156 刺激細胞Mob	19.60	34.06	-14.45	22429.61	0.00
S20 K1 皮膚ケラチノサイト	22.46	35.57	-13.10	8800.61	0.01
S21 K2 皮膚ケラチノサイト	22.98	34.39	-11.41	2728.24	0.04

10

20

【 0 1 2 3 】

表 9 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した免疫細胞およびCNS起源の初代細胞及び細胞株における INSP142 の発現

初期値及び細胞株2	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ ct	相違倍数	GAPDH (=100)に 対する 相対値
S30 THP-1 単球/マクロファージ	19.42	32.52	-13.10	8772.67	0.01
S35 KU812 好塩基球	18.91	32.55	-13.64	12735.76	0.01
S37 KU812 /PMA	20.29	36.16	-15.87	59778.10	0.00
S43 Jurkat	19.54	32.78	-13.24	9648.25	0.01
S58 PBMC1	21.68	33.98	-12.30	5052.75	0.02
S59 顆粒球1	23.97	33.84	-9.88	940.48	0.11
S61 PBMC2.2	22.12	33.56	-11.44	2787.83	0.04
S97 SK-N-AS	19.94	33.72	-13.78	14049.81	0.01
S98 TE671 サブクローン2	19.76	33.76	-14.00	16356.00	0.01
S99 KELLY	18.07	32.83	-14.76	27723.88	0.00
S100 U-373 MG	19.55	32.78	-13.24	9648.51	0.01
S101 U-87 MG	20.86	33.50	-12.64	6365.99	0.02
S102 T98G	18.61	33.69	-15.08	34577.36	0.00
S103 BE(2)-C	19.21	33.21	-14.00	16387.20	0.01
S104 CCF-STGG1	20.19	32.81	-12.62	6274.56	0.02
S105 TE671	20.50	34.11	-13.60	12448.79	0.01
S106 A172	19.71	33.12	-13.42	10928.99	0.01
S107 132N1	19.15	33.29	-14.14	18035.48	0.01
S108 SK-PN-DW	19.97	33.28	-13.31	10145.36	0.01
S38 MOLT-4	24.90	33.77	-8.86	465.96	0.21
S41 EOL-3	23.64	33.13	-9.49	718.73	0.14
S44 EOL-3+IL2	24.08	34.34	-10.27	1232.74	0.08

30

40

【 0 1 2 4 】

表 10 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した疾患結腸および回腸生検標本における INSP142

50

の発現

IBDプレート	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ ct	相違倍数	GAPDH (=100)に 対する 相対値
N1	24.43	33.67	-9.25	607.54	0.16
N2	22.86	32.88	-10.03	1042.30	0.10
N4	22.08	34.05	-11.97	4001.87	0.02
N5	23.15	32.65	-9.50	723.01	0.14
N9	22.73	32.10	-9.37	662.65	0.15
N10	23.38	32.67	-9.29	626.27	0.16
CD2	22.25	33.41	-11.16	2295.06	0.04
CD3	21.30	31.92	-10.62	1575.62	0.06
CD4	21.40	31.66	-10.26	1222.40	0.08
CD5	24.04	32.88	-8.85	460.18	0.22
CD6	23.46	32.31	-8.85	460.46	0.22
CD8	22.12	33.19	-11.07	2148.23	0.05
CD9	24.74	33.33	-8.58	383.93	0.26
CD10	23.18	34.11	-10.93	1950.65	0.05
CD13	24.11	32.82	-8.72	420.26	0.24
CD16	24.35	32.77	-8.42	342.90	0.29
CD17	25.58	33.02	-7.44	174.20	0.57
CD18	22.88	37.35	-14.47	22720.95	0.00
CD19	23.33	33.35	-10.02	1038.70	0.10
CD20	24.12	34.57	-10.45	1399.73	0.07
CD22	22.04	32.10	-10.05	1061.10	0.09
N11	23.60	33.78	-10.18	1160.09	0.09
N14	22.86	33.48	-10.62	1577.89	0.06
N26	23.48	35.52	-12.04	4211.20	0.02
N27	23.86	34.92	-11.06	2133.33	0.05
N29	24.61	35.11	-10.50	1449.35	0.07
N30	22.56	32.01	-9.45	697.17	0.14
CD4 bis	22.91	31.80	-8.89	475.04	0.21
CD6 bis	23.04	32.46	-9.42	683.91	0.15
CD23	25.11	32.42	-7.31	158.27	0.63
CD24	22.72	33.53	-10.81	1792.74	0.06
CD25	23.50	31.90	-8.40	336.65	0.30
CD26	23.18	32.30	-9.12	557.15	0.18
CD27	24.58	32.56	-7.98	252.07	0.40
CD28	23.15	32.50	-9.35	654.35	0.15
UC11	23.39	32.69	-9.30	630.54	0.16
UC12	22.61	33.70	-11.09	2184.24	0.05
UC13	22.96	32.15	-9.19	584.33	0.17
UC14	23.09	31.27	-8.18	290.95	0.34
UC16	23.10	32.85	-9.75	861.54	0.12
UC18	24.78	33.02	-8.24	302.49	0.33
UC19	22.74	32.58	-9.84	918.60	0.11

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

表 1 1 : RT-PCR(TaqMan) によって測定した IL18BP 臨床試験の疾患皮膚生検標本における IN SP142 の発現

乾癬	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	δ ct	相違倍数	GAPDH (=100)に 対する 相対値
#11 A2872102-2	21.03	32.84	-11.81	3593.11	0.03
#16 A2872103-1	24.86	33.95	-9.09	544.94	0.18
#28 A2872023-1	22.50	35.02	-12.51	5842.32	0.02
#36 A2872028-1	24.83	33.76	-8.94	490.55	0.20
#39 A2872025-1	24.43	32.88	-8.44	347.88	0.29
#59 E1328972-3	24.60	33.26	-8.66	403.74	0.25
#60 E1328972-2	22.21	32.91	-10.70	1658.02	0.06
#61 E1329004	24.60	33.37	-8.77	435.59	0.23
#63 E1328973-3	22.93	33.91	-10.97	2011.18	0.05
#64 E1329003-2	20.81	31.87	-11.06	2135.78	0.05
#66 E1328974-4	21.77	33.42	-11.65	3224.67	0.03
#68 E1328975-3	24.59	32.55	-7.96	249.05	0.40
#69 E1328975-4	23.59	33.57	-9.97	1005.76	0.10
#70 E1329006-1	22.27	33.00	-10.73	1693.79	0.06
#72 E1328976-4	23.54	32.71	-9.16	573.83	0.17
#73 E1329005-1	23.80	33.50	-9.70	830.24	0.12
#74 E1328977-2	24.17	32.97	-8.79	443.66	0.23
#75 E1328977-3	22.90	32.88	-9.98	1010.36	0.10
#77 E1348411-3	23.53	32.47	-8.95	493.01	0.20
#78 E1348411-2	21.64	34.12	-12.48	5716.81	0.02
#79 E1348411-1	21.83	31.29	-9.45	701.55	0.14
#80 E1348414-2	22.67	32.17	-9.49	720.55	0.14
#81 E1348414-1	22.12	32.54	-10.42	1374.76	0.07
#82 E1348446-1	23.42	31.65	-8.23	299.96	0.33
#83 E1348415-3	20.95	32.19	-11.24	2412.57	0.04
#84 E1348415-2	21.77	32.86	-11.09	2181.45	0.05
#85 E1348442-1	21.00	32.15	-11.15	2265.41	0.04
#86 E1348416-3	25.00	33.31	-8.31	317.58	0.31
#88 E1348445-1	23.70	33.27	-9.57	760.60	0.13
#91 E1317749-2	24.53	31.94	-7.41	170.59	0.59
#95 E1317719-2	24.94	32.12	-7.18	145.45	0.69
#96 E1317719-3	21.69	31.74	-10.05	1059.76	0.09
#97 E1317751-2	23.25	33.13	-9.88	943.38	0.11
#98 E1317723-2	24.09	35.40	-11.32	2550.43	0.04
#99 E1317723-3	22.10	32.31	-10.21	1186.53	0.08
#101 E1317718-2	20.26	32.63	-12.38	5312.87	0.02
#102 E1317718-3	22.52	33.42	-10.89	1899.79	0.05
#103 E1317750-2	23.82	32.43	-8.61	390.29	0.26

10

20

30

40

50

INSP141配列のリスト

<110> ARES TRADING S.A.

<120> vWFA and/or ANT_IG domain containing proteins

<130> P038568WO

<160> 167

10

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 248

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 1

atggggagcc atgagtcacct ggggccctac ttcctggctc tcctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaccatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaa 248

20

<210> 2

<211> 83

<212> PRT

<213> ヒト

30

<400> 2

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45

40

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Lys

<210> 3

50

<211> 72
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 3
gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
gaggttccaa ag 72

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> ヒト

10

<400> 4
Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
1 5 10 15

Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
20

20

<210> 5
<211> 72
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 5
cccaaattatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
cacctcagac aa 72

<210> 6
<211> 24
<212> PRT
<213> ヒト

30

<400> 6
Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys
20

40

<210> 7
<211> 82
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 7
gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
catgcaggca ggatttagaa ag 82

50

<210> 8
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 8
 Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
 1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys 10
 20 25

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 9
 gcaattcaac agatcgaaag ttccaactcc ggaa 34
 20

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 10
 Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
 1 5 10

<210> 11 30
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 11
 acaagggttcc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actgggtggca catgcatttc 60
 aggacactct cagagaa 77

<210> 12
 <211> 25 40
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 12
 Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
 1 5 10 15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
 20 25

<210> 13
<211> 69
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 13
gctcaaaagg ctcggaaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
ctggaccag 69

<210> 14 10
<211> 23
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 14
Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln 20 20

<210> 15
<211> 81
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 15
ataacagcaa ttgcagacag cccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg ctccaaggcc 60
ctgagaagca ccattgatgc c 81

<210> 16 30
<211> 27
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 16
Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
1 5 10 15

Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala 40
20 25

<210> 17
<211> 61
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 17
ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc cttcctctga gtgtgtagga 60
g 61

50

<210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 18
 Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
 1 5 10 15

10

Glu Cys Val Gly Glu
 20

<210> 19
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 19
 aaccctacca tgtggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60
 ttatttgcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg 99

20

<210> 20
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 20
 Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15

30

Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
 20 25 30

Gly

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> ヒト

40

<400> 21
 ggagtactct attgaagtca gcttga 26

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ヒト

50

<400> 22
 Ser Thr Leu Leu Lys Ser Ala
 1 5

<210> 23
 <211> 921
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 23 10
 atggggagcc atgagtcacct ggggccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatatit 120
 caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtt catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatatgtg ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttccaaag cccaaatat t cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccgagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtittcaa ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600 20
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgcccacac gtcaaaggctc tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagttaa ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgggagt 900
 actctattga agtcagcttg a 921

<210> 24
 <211> 306
 <212> PRT 30
 <213> ヒト

<400> 24
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg 40
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95 50

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140

10

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205

20

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255

30

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
 290 295 300

40

Ser Ala
 305

<210> 25
 <211> 248
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 25
 atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60

50

cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtt catttgacct ctacttcac 240
ttggacaa 248

<210> 26
<211> 83
<212> PRT
<213> ヒト

10

<400> 26
Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20 25 30
His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35 40 45
Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50 55 60
Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65 70 75 80
Leu Asp Lys

20

<210> 27
<211> 72
<212> DNA
<213> ヒト

30

<400> 27
gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
gaggttccaa ag 72

<210> 28
<211> 24
<212> PRT
<213> ヒト

40

<400> 28
Ser Gly Ser Val Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
1 5 10 15
Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
20

50

<210> 29
<211> 72
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 29
cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
cacctcagac aa 72

<210> 30 10
<211> 24
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 30
Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys 20 20

<210> 31
<211> 82
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 31
gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgccctgacg gtcacacatt 60
catgcaggca ggatttagaa ag 82

<210> 32
<211> 27
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 32
Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys 40
20 25

<210> 33
<211> 34
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 33
gcaattcaac agatcgaaag tttcaactcc ggaa 34

<210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 34
 Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
 1 5 10

<210> 35
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 35
 acaagggttcc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actgggtggca catgcatttc 60
 aggacactct cagagaa 77

<210> 36
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 36
 Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
 1 5 10 15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
 20 25

<210> 37
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 37
 gctcaaaaagg ctcggaaaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
 ctggaccag 69

<210> 38
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 38
 Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
 20

10

20

30

40

50

<210> 39
<211> 81
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 39
ataacagcaa ttgcagacag ccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg ctccaaggcc 60
ctgagaagca ccatgatgc c 81

10

<210> 40
<211> 27
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 40
Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
1 5 10 15

Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
20 25

20

<210> 41
<211> 61
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 41
ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc ctccctctga gtgtgtagga 60
g 61

30

<210> 42
<211> 21
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 42
Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
1 5 10 15

40

Glu Cys Val Gly Glu
20

<210> 43
<211> 99
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 43
aaccctacca tgggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60

50

ttatttgcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg

99

<210> 44
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 44
 Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15

10

Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
 20 25 30

Asp

<210> 45
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> ヒト

20

<400> 45
 atgaaaagcc aaccagtatc gacaataatt ccatgaattg ccctggggcca aaactagaaa 60
 aacctggaga 70

<210> 46
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ヒト

30

<400> 46
 Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
 20

<210> 47
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> ヒト

40

<400> 47
 ggagtactct attgaagtca gcttgaacaa aggcaaaaca ttcttcaaga gcaatgtcag 60
 catcaccagc accacatgt 79

<210> 48
 <211> 26
 <212> PRT

50

<213> ヒト

<400> 48

Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys
 20 25

<210> 49

<211> 15

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 49

ccttctctta agtag 15

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 50

Pro Ser Leu Lys
 1

<210> 51

<211> 1059

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 51

atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcttggtct tcttgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtaccatg gacctgactg gagaatatit 120
 caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcata 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatatgtg ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttccaaag cccaaatat t cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtittcaa ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataatctgga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagcccttg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgccctcac gtcaaaggct tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagttaa ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
 aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct 960
 ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
 gtcagcatca ccagcaccac atgtccttct ctttaagtag 1059

10

20

30

40

50

<210> 52
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 52
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95
 Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110
 Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125
 Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140
 Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160
 Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175
 Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190
 Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220
 Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg

10

20

30

40

50

[illegible]

10

20

30

40

50

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Lys

10

<210> 55
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 55
 gtctggcagc gigaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
 gaggttccaa ag 72

20

<210> 56
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 56
 Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
 1 5 10 15

Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 20

30

<210> 57
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 57
 cccaaatatt cggaatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
 cacctcagac aa 72

40

<210> 58
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 58
 Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys

50

20

<210> 59
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 59
 gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
 catgcaggca ggatttagaa ag 82 10

<210> 60
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 60
 Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
 1 5 10 15 20
 Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys
 20 25

<210> 61
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 61
 gcaattcaac agatcgaaag tttcaactcc ggaa 34 30

<210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 62
 Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
 1 5 10 40

<210> 63
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 63
 acaaggttcc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actgggtggca catgcatttc 60
 aggacactct cagagaa 77

<210> 64 50

<211> 25
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 64
 Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
 1 5 10 15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
 20 25

10

<210> 65
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 65
 gctcaaaagg ctcggaaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
 ctggaccag 69

20

<210> 66
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 66
 Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
 20

30

<210> 67
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 67
 ataacagcaa ttgcagacag ccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg ctccaaggcc 60
 ctgagaagca ccattgatgc c 81

40

<210> 68
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 68
 Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
 1 5 10 15

50

Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
20 25

<210> 69
<211> 61
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 69
ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc cttcctctga gtgtgtagga 60 10
g 61

<210> 70
<211> 21
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 70
Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser 20
1 5 10 15

Glu Cys Val Gly Glu
20

<210> 71
<211> 99
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 71 30
aaccctacca tgggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60
ttatttgtag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg 99

<210> 72
<211> 33
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 72 40
Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
1 5 10 15

Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
20 25 30

Asp

<210> 73
<211> 70 50

<212> DNA
<213> ヒト

<400> 73
atgaaaagcc aaccagtatc gacaataatt ccatgaattg ccctgggcca aaactagaaa 60
aacctggaga 70

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> ヒト

10

<400> 74
Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
1 5 10 15

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
20

<210> 75
<211> 79
<212> DNA
<213> ヒト

20

<400> 75
ggagtactct attgaagtca gcttgaacaa aggcaaaaca ttcttcaaga gcaatgtcag 60
catcaccagc accacatgt 79

<210> 76
<211> 26
<212> PRT
<213> ヒト

30

<400> 76
Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
1 5 10 15

Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys
20 25

40

<210> 77
<211> 90
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 77
ggcattttcc gcaactggct ctattttgtg ccactcctgc tgcttgtgcc actgctgctg 60
tgttgtgtct ggcggtgtg ccgcaagcag 90

<210> 78

50

<211> 30
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 78
 Gly Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln
 20 25 30

10

<210> 79
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 79
 actgtcaagg agccaccacc tgtgcagaag ccagaaaaag 39

<210> 80
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> ヒト

20

<400> 80
 Thr Val Lys Glu Pro Pro Pro Val Gln Lys Pro Glu Lys
 1 5 10

<210> 81
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> ヒト

30

<400> 81
 gagccagagc aggaaaaacc accatcacca ccaccaccgc ctccgcctcc accacctcca 60
 ctcccacctc cgccccagc tcctgtaaac acctgccccca ctgtgattat ttgttgctgt 120
 ggatgccaag gagtgggcgg gatgagaagg atagag 156

<210> 82
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> ヒト

40

<400> 82
 Glu Pro Glu Gln Glu Lys Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Val Asn Thr Cys
 20 25 30

50

Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly Cys Gln Gly Val Gly Gly Met
 35 40 45

Arg Arg Ile Glu
 50

<210> 83
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> ヒト

10

<400> 83
 ggcaatctgg ataccttttg tgacctctct cacgcaagct gccaccagggt gccatggatg 60
 tgttgtcaga gcagggacca g 81

<210> 84
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> ヒト

20

<400> 84
 Gly Asn Leu Asp Thr Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln
 1 5 10 15

Val Pro Trp Met Cys Cys Gln Ser Arg Asp Gln
 20 25

<210> 85
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> ヒト

30

<400> 85
 gggagggtacc tcagcttagc ccttgcacag tcccaatatg cacaggctcc ctgctgcccc 60
 aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc ctttccctac cacaggctcc ctgcagcccc 120
 aggatgtgcc tgagacacag 140

<210> 86
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> ヒト

40

<400> 86
 Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Ala Gln Ala
 1 5 10 15

Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His Ser Gln Glu Cys Leu Ser
 20 25 30

Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met Cys Leu Arg His Ser

50

35 40 45

<210> 87
<211> 277
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 87
ccgggagtgctctcgccctcaaacaggctcgtctgcagcccaaacatctgcctgagacacag 60
cccggagtac ttttcccaag cacagactctgtgcaaccca aagagctgcc ttcaaccag 120 10
ccgggagtgctctccccctca cctgctcctc cagggtgccgc ctccccccag ctaggtgctt 180
gaggcctccc tccaggatgc tgccgctgct gtccccactg ctcaggcaca cggcagaacc 240
ccctttgtca ctccccccct cagagcccaa ctctctaa 277

<210> 88
<211> 91
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 88 20

Arg Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys Ser Pro Asn Ile Cys
1 5 10 15

Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala Gln Thr Leu Cys Asn
20 25 30

Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys Leu Pro Leu Thr Cys
35 40 45

Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys Leu Arg Pro Pro Ser 30
50 55 60

Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg His Thr Ala Glu Pro
65 70 75 80

Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Glu Pro Asn Phe
85 90

<210> 89
<211> 1827 40
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 89
atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatatit 120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catitgacct ctacttcac 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatatgtg ggtggaggaa 300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360 50

ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgacca 420
 cttcagaaaa ttgtgacctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataatctgga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtgagga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgccctcac gtcaaagggtc tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctacatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagttaa ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
 aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct 960
 ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
 gtcagcatca ccagcaccac atgtggcatt ttccgcaact ggctctatit tgtgccactc 1080
 ctgctgcttg tgccactgct gctgtgttgt gtctggcggc tgtgccgcaa gcagactgtc 1140
 aaggagccac cactgtgca gaagccagaa aaggagccag agcaggaaaa accaccatca 1200
 ccaccaccac cgctccgcc tccaccacct ccactcccac ctccgcccc agctcctgta 1260
 aacacctgcc ccactgtgat tatttgttgc tgtggaatgcc aaggagtggg cgggatgaga 1320
 aggatagagg gcaatctgga taccttttgt gacctctctc acgcaagctg ccaccagggtg 1380
 ccatggatgt gttgtcagag cagggaccag gggaggtagc tcagcttagc ccttgcacag 1440
 tccaatatg cacaggctcc ctgctgcca aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc 1500
 ctttccctac cacaggctcc ctgcagccca aggatgtgcc tgagacacag ccgggagtgc 1560
 ctgcacctca aacaggctcg ctgcagccca aacatctgcc tgagacacag cccggagtac 1620
 ttttccaag cacagactct gtgcaaccca aagagctgcc ttcaaccag ccgggagtgc 1680
 ctccccctca cctgctctc cagggtccgc ctccccccag ctaggtgctt gaggcctccc 1740
 tccaggatgc tgccgtgct gtccccactg ctcaggcaca cggcagaacc ccctttgtca 1800
 ctccccccct cagagcccaa ctctctaa 1827

10

20

30

40

50

<210> 90
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 90
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160

10

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205

20

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255

30

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
 290 295 300

Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro
 305 310 315 320

40

Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe
 325 330 335

Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Gly Ile Phe Arg
 340 345 350

Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu
 355 360 365

50

Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln Thr Val Lys Glu Pro Pro
 370 375 380

Pro Val Gln Lys Pro Glu Lys Glu Pro Glu Gln Glu Lys Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro
 405 410 415

Pro Ala Pro Val Asn Thr Cys Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly
 420 425 430

Cys Gln Gly Val Gly Gly Met Arg Arg Ile Glu Gly Asn Leu Asp Thr
 435 440 445

Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln Val Pro Trp Met Cys
 450 455 460

Cys Gln Ser Arg Asp Gln Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln
 465 470 475 480

Ser Gln Tyr Ala Gln Ala Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His
 485 490 495

Ser Gln Glu Cys Leu Ser Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met
 500 505 510

Cys Leu Arg His Ser Arg Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys
 515 520 525

Ser Pro Asn Ile Cys Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala
 530 535 540

Gln Thr Leu Cys Asn Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Leu Thr Cys Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys
 565 570 575

Leu Arg Pro Pro Ser Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg
 580 585 590

His Thr Ala Glu Pro Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Glu Pro Asn Phe
 595 600 605

<210> 91

<211> 248

<212> DNA

10

20

30

40

50

<213> ヒト

<400> 91

atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaccatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaa 248

<210> 92

10

<211> 83

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 92

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30

20

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

30

Leu Asp Lys

<210> 93

<211> 72

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 93

gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
 gaggttccaa ag 72

40

<210> 94

<211> 24

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 94

Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
 1 5 10 15

50

Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
20

<210> 95
<211> 72
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 95 10
cccaaatatt cggaatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
cacctcagac aa 72

<210> 96
<211> 24
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 96 20
Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys
20

<210> 97
<211> 82
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 97 30
gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
catgcaggca ggatttagaa ag 82

<210> 98
<211> 27
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 98 40
Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys
20 25

<210> 99
<211> 34
<212> DNA
<213> ヒト

34

10

10

20

30

40

50

1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
20

<210> 105
<211> 81
<212> DNA
<213> ヒト

10

<400> 105
ataacagcaa ttgcagacag ccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg ctccaaggcc 60
ctgagaagca ccattgatgc c 81

<210> 106
<211> 27
<212> PRT
<213> ヒト

20

<400> 106
Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
1 5 10 15

Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
20 25

<210> 107
<211> 61
<212> DNA
<213> ヒト

30

<400> 107
ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc cttcctctga gtgtgtagga 60
g 61

<210> 108
<211> 21
<212> PRT
<213> ヒト

40

<400> 108
Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Cys Val Gly Glu
20

<210> 109
<211> 99
<212> DNA

50

<213> ヒト

<400> 109

aaccctacca tgggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60
 ttatttgcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg 99

<210> 110

<211> 33

<212> PRT

<213> ヒト

10

<400> 110

Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
 20 25 30

Asp

20

<210> 111

<211> 70

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 111

atgaaaagcc aaccagtatc gacaataatt ccatgaattg cccctgggcca aaactagaaa 60
 aacctggaga 70

30

<210> 112

<211> 23

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 112

Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
 20

40

<210> 113

<211> 79

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 113

ggagtactct attgaagtca gcttgaacaa aggcaaaaca ttcttcaaga gcaatgtcag 60
 catcaccagc accacatgt 79

50

<210> 114
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 114
 Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
 1 5 10 15

10

Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys
 20 25

<210> 115
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 115
 ggcatTTTcc gcaactggct ctatTTTgtg ccactcctgc tgctTgtgcc actgctgctg 60
 tgtTgtgtct ggcggctgtg ccgcaagcag 90

20

<210> 116
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 116
 Gly Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

30

Pro Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln
 20 25 30

<210> 117
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 117
 actgtcaagg agccaccacc tgtgcagaag ccagaaaag 39

40

<210> 118
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 118
 Thr Val Lys Glu Pro Pro Pro Val Gln Lys Pro Glu Lys
 1 5 10

50

<210> 119
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 119
 gagccagagc aggaaaaacc accatcacca ccaccaccgc ctccgcctcc accacctcca 60
 ctcccacctic cgccccagc tcctgtaaac acctgccccca ctgtgattat ttgttgctgt 120
 ggatgccaag gagtgggcgg gatgagaagg atagag 156 10

<210> 120
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 120
 Glu Pro Glu Gln Glu Lys Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15 20
 Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Val Asn Thr Cys
 20 25 30
 Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly Cys Gln Gly Val Gly Gly Met
 35 40 45
 Arg Arg Ile Glu
 50

<210> 121 30
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 121
 ggcaatctgg ataccttttg tgacctctct cacgcaagct gccaccaggt gccatggatg 60
 tgttgtcaga gcagggacca g 81

<210> 122 40
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 122
 Gly Asn Leu Asp Thr Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln
 1 5 10 15
 Val Pro Trp Met Cys Cys Gln Ser Arg Asp Gln
 20 25 50

<210> 123
 <211> 486
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 123
 gggaggtacc tcagcttagc ccttgcacag tcccaatatg cacaggctcc ctgctgcca 60
 aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc ctttccctac cacaggctcc ctgcagccca 120
 aggatgtgcc tgagacacag ccgggagtgc ctgcacctca aacaggctcg ctgcagccca 180
 aacatctgcc tgagacacag ccaacacagc agggagtgcc ttgcccgaac acaggctccc 240 10
 tgcagcccaa ggatctgcct gagacacagc ccggagtact ttcccaagc acagactctg 300
 tgcaacccaa agagctgcct tcaaccacgc cgggagtgcc tccccctcac ctgctcctcc 360
 aggtgccgcc tccccccagc taggtgcttg aggcctccct ccaggatgct gccgctgctg 420
 tccccactgc tcaggcacac ggcagaacct cctttgtcac tccccccctc agagcccaac 480
 ttctaa 486

<210> 124
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> ヒト 20

<400> 124
 Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Ala Gln Ala
 1 5 10 15
 Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His Ser Gln Glu Cys Leu Ser
 20 25 30
 Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met Cys Leu Arg His Ser Arg
 35 40 45 30
 Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys Ser Pro Asn Ile Cys Leu
 50 55 60
 Arg His Ser Gln His Ser Arg Glu Cys Leu Ala Arg Lys Gln Ala Pro
 65 70 75 80
 Cys Ser Pro Arg Ile Cys Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln
 85 90 95 40
 Ala Gln Thr Leu Cys Asn Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu
 100 105 110
 Cys Leu Pro Leu Thr Cys Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg
 115 120 125
 Cys Leu Arg Pro Pro Ser Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu
 130 135 140
 Arg His Thr Ala Glu Pro Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Glu Pro Asn 50

145

150

155

160

Phe

<210> 125
 <211> 1896
 <212> DNA
 <213> ヒト

10

<400> 125

```

atggggagcc atgagtcacct ggggccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatatit 120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtt catitgacct ctacttcatc 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatgtg ggtagaggaa 300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatat cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
caacagatcg aaagtittca ctccggaaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
gatggagaac tggtaggaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctga ccagataaca 660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
agcaccattg atgccctcac gtcaaaggct tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttcc 780
tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gtatttcatt gaaatggctt tcagaatcta 840
aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct 960
ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
gtcagcatca ccagcaccac atgtggcatt ttccgcaact ggctctatit ttgtgccactc 1080
ctgctgcttg tgccactgct gctgtgttgt gtctggcggc tgtgccgcaa gcagactgtc 1140
aaggagccac cacctgtgca gaagccagaa aaggagccag agcaggaaaa accaccatca 1200
ccaccaccac cgctccgcc tccaccacct ccactcccac ctccgcccc agctcctgta 1260
aacacctgcc ccactgtgat tatttgttgc tgtggatgcc aaggagtggg cgggatgaga 1320
aggatagagg gcaatctgga taccttttgt gacctctctc acgcaagctg ccaccagggtg 1380
ccatggatgt gtgtcagag cagggaccag gggaggtagc tcagcttagc ccttgcacag 1440
tcccaatatg cacaggctcc ctgctgcca aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc 1500
ctttccctac cacaggctcc ctgcagccca aggatgtgcc tgagacacag ccgggagtgc 1560
ctcgcctca aacaggctcg ctgcagccca aacatctgcc tgagacacag ccaacacagc 1620
agggagtgcc ttgcccgcaa acaggctccc tgcagcccaa ggatctgcct gagacacagc 1680
ccggagtact tttcccaagc acagactctg tgcaacccaa agagctgcct tcaaccagc 1740
cgggagtgcc tccccctcac ctgctcctcc aggtgccgcc tccccccagc taggtgcttg 1800
aggcctccct ccaggatgct gccgtgctg tccccactgc tcaggcacac gccagaaccc 1860
cctttgtcac tccccccctc agagcccaac ttctaa 1896

```

20

30

40

<210> 126
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 126

50

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50 55 60

10

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65 70 75 80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100 105 110

20

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
145 150 155 160

30

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
180 185 190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
210 215 220

40

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
245 250 255

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
260 265 270

50

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
 290 295 300

Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro
 305 310 315 320

Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe
 325 330 335

Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Gly Ile Phe Arg
 340 345 350

Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu
 355 360 365

Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln Thr Val Lys Glu Pro Pro
 370 375 380

Pro Val Gln Lys Pro Glu Lys Glu Pro Glu Gln Glu Lys Pro Pro Ser
 385 390 395 400

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro
 405 410 415

Pro Ala Pro Val Asn Thr Cys Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly
 420 425 430

Cys Gln Gly Val Gly Gly Met Arg Arg Ile Glu Gly Asn Leu Asp Thr
 435 440 445

Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln Val Pro Trp Met Cys
 450 455 460

Cys Gln Ser Arg Asp Gln Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln
 465 470 475 480

Ser Gln Tyr Ala Gln Ala Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His
 485 490 495

Ser Gln Glu Cys Leu Ser Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met
 500 505 510

Cys Leu Arg His Ser Arg Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys
 515 520 525

Ser Pro Asn Ile Cys Leu Arg His Ser Gln His Ser Arg Glu Cys Leu

10

20

30

40

50

530

535

540

Ala Arg Lys Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Ile Cys Leu Arg His Ser
 545 550 555 560

Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala Gln Thr Leu Cys Asn Pro Lys Ser Cys
 565 570 575

Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys Leu Pro Leu Thr Cys Ser Ser Arg Cys
 580 585 590

Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys Leu Arg Pro Pro Ser Arg Met Leu Pro
 595 600 605

Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg His Thr Ala Glu Pro Pro Leu Ser Leu
 610 615 620

Pro Pro Ser Glu Pro Asn Phe
 625 630

10

20

<210> 127
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 127

atggggagcc atgagtccct ggggccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagccct cggtaccatg gacctgactg gagaatatit 120
 caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatatgt ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccagactg tcttgccact caccicagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtittca ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagAAC tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctgga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgccctcac gtcaaaggct tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagttat ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgggagt 900
 actctattga agtcagct 918

30

40

<210> 128
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 128

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu

50

50

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
 290 295 300

Ser Ala
 305

<210> 129 10
 <211> 936
 <212> DNA
 <213> 人工配列

<220>
 <223> クローン化ヒスチジンタグ INSP141

<400> 129
 atggggagcc atgagtcacct ggggccctac ttcctgggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatatit 120
 caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatgtg ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttccaaag cccaaatat t cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcattgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtittcaa ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctgga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgccctcac gtcaaaggct tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgggag 900
 actctattga agtcagctca ccatcaccat caccat 936

20
 30

<210> 130
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> 人工配列

40

<220>
 <223> クローン化ヒスチジンタグ INSP141

<400> 130
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95

10

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140

20

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190

30

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255

40

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
 290 295 300

50

Ser Ala His His His His His His
305 310

<210> 131
<211> 837
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 131 10
ggaagccttc ggtacatggt accctgactgg agaataatttc accgcctggc cctgggctcc 60
aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca 120
ggtcacagat gccagggtc atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg 180
aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gtccaaagc 240
ccaaatattc ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt cttgccactc 300
acctcagaca agaatagaat aaaaaacggt ctgaccaac ttcagaaaaat tgtgcctgac 360
ggtcacacat tcatgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac 420
tccggaaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat 480
gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcgga aactgggggc caacgtttac 540
accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc 600 20
cacgtgtttg cagtggagaa tggcttcaag gccctgagaa gcaccattga tgccttcacg 660
tcaaaggctc gtcttgatgt gacatcgggt gagccttcct ctgagtgtgt aggagaaccc 720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcttt cagaatctaa agaaacggga tgaagtatt 780
tgcagattta tcttcaatga aagcactatc attgggagta ctctattgaa gtcagct 837

<210> 132
<211> 279
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 132
Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg
20 25 30

Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
35 40 45

Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
50 55 60

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
65 70 75 80

Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
85 90 95

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp 50

100	105	110	
Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly			
115	120	125	
Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys			
130	135	140	
Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His			10
145	150	155	
Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly			
165	170	175	
Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile			
180	185	190	
Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly			20
195	200	205	
Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys			
210	215	220	
Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro			
225	230	235	
Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg			
245	250	255	
Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly			30
260	265	270	
Ser Thr Leu Leu Lys Ser Ala			
275			
<210> 133			
<211> 855			
<212> DNA			
<213> 人工配列			40
<220>			
<223> クローン化成熟ヒスチジンタグINSP141			
<400> 133			
ggaagccttc ggtaccatgg acctgactgg agaatatctt accgcctggc cctgggctcc	60		
aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca	120		
ggtcacagat gccagggtct atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg	180		
aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gttccaaagc	240		
ccaaatattc ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt cttgccactc	300		
acctcagaca agaatagaat aaaaaacggt cttgaccaac ttcagaaaat tgtgcctgac	360		50

```

ggtcacacat tcatgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac 420
tccggaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat 480
gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcgga aactgggggc caacgtttac 540
accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc 600
cacgtgtttg cagtggagaa tggcttcaag gccctgagaa gcaccattga tgcctcacg 660
tcaaaggctc gtcttgatgt gacatcgggt gagccttcct ctgagtgtgt aggagaaccc 720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcttt cagaatctaa agaaacggga tgaagttatt 780
tgcagattta tcttcaatga aagcactatc attgggagta ctctattgaa gtcagctcac 840
catcaccatc accat 855

```

10

<210> 134
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> 人工配列

<220>
 <223> クローン化成熟ヒスチジンタグINSP141

<400> 134
 Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

20

Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg
 20 25 30

Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
 35 40 45

Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
 50 55 60

30

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 65 70 75 80

Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 85 90 95

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
 100 105 110

40

Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
 115 120 125

Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys
 130 135 140

Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
 145 150 155 160

Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly

50

165	170	175
Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val	Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile	
180	185	190
Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val	Phe Ala Val Glu Asn Gly	
195	200	205
Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu	Thr Ser Lys Val Cys	
210	215	220
Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser	Glu Cys Val Gly Glu Pro	
225	230	235
Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln	Asn Leu Lys Lys Arg	
245	250	255
Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu	Ser Thr Ile Ile Gly	
260	265	270
Ser Thr Leu Leu Lys Ser Ala His His His His	His His	
275	280	285

10

20

<210> 135
 <211> 1035
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 135

atggggagcc atgagtcacct ggggccctac ttccctgggtct tcctgctgct gctgctgctt	60
cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaccatg gacctgactg gagaatatit	120
caccgcttgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag	180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcac	240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa	300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac	360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa	420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcattgcagg caggatttag aaaggcaatt	480
caacagatcg aaagtittcaa ctccggaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact	540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg	600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctgga ccagataaca	660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga	720
agcaccattg atgccctcac gtcaaaggctc tgtcttgatg tgacatcggg ggaggcttcc	780
tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta	840
aagaaacggg atgaagttaa ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa	900
aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct	960
ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat	1020
gtcagcatca ccagc	1035

30

40

<210> 136
 <211> 345

50

<212> PRT
<213> ヒト

<400> 136

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65 70 75 80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
180 185 190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser

10

20

30

40

50

245	250	255
Val Glu Ala Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile		
260	265	270
His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys		
275	280	285
Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser		
290	295	300
Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro		
305	310	315
Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe		
325	330	335
Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser		
340	345	

10

20

<210> 137
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 137

atggggagcc atgagtccct ggggccctac ttccctggctc tcctgctgct gctgctgctt	60
cctccaccgc tttttagagc aggaagccct cggtaccatg gacctgactg gagaatatit	120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag	180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcata	240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatatgt ggtggaggaa	300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac	360
ggccagactg tcttgccact caccicagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa	420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt	480
caacagatcg aaagtittca ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact	540
gatggagAAC tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg	600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctgga ccagataaca	660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga	720
agcaccattg atgccctcac gtcaaaggct tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc	780
tctgagtgtg taggagaacc ctacatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta	840
aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa	900
aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct	960
ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat	1020
gtcagcatca ccagcaccac atgtggcatt ttccgc	1056

30

40

<210> 138
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> ヒト

50

<400> 138

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile

10

20

30

40

50

260	265	270
His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys		
275	280	285
Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser		
290	295	300
Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro		
305	310	315
		320
Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe		
	325	330
		335
Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Gly Ile Phe Arg		
	340	345
		350

10

<210> 139
 <211> 1074
 <212> DNA
 <213> 人工配列

20

<220>
 <223> クローン化ヒスチジンタグ INSP143

<400> 139

atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttccctgggtct tcctgctgct gctgctgctt	60
cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaccatg gacctgactg gagaatatit	120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag	180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtt catttgacct ctacttcata	240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatatgtg ggtggaggaa	300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatat t cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac	360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa	420
cttcagaaaa ttgtgacctga cggtcacaca ttcattgcagg caggatttag aaaggcaatt	480
caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aagggtccca gcatgattat tgctatgact	540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg	600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctgga ccagataaca	660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga	720
agcaccattg atgccctcac gtcaaagggtc tgtcttgatg tgacatcggg ggagccctcc	780
tctgagtgtg taggagaacc ctacatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta	840
aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa	900
aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct	960
ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat	1020
gtcagcatca ccagcaccac atgtggcatt ttccgccacc atcaccatca ccat	1074

30

40

<210> 140
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> 人工配列

50

<220>

<223> クローン化ヒスチジンタグINSP143

<400> 140

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30

10

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

20

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140

30

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190

40

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240

50

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
245 250 255

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
260 265 270

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
290 295 300

Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro
305 310 315 320

Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe
325 330 335

Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Gly Ile Phe Arg
340 345 350

His His His His His His
355

<210> 141

<211> 975

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 141

ggaagccttc ggtaccatgg acctgactgg agaatatctc accgcctggc cctgggctcc 60
aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca 120
ggtcacagat gccagggtc atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg 180
aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gttccaaagc 240
ccaaatatct ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt ctgtccactc 300
acctcagaca agaatagaat aaaaaacggt ctgtaccaac ttcagaaaat tgtgcctgac 360
ggtcacacat tcatgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac 420
tccggaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat 480
gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcgga aactgggggc caacgtttac 540
accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc 600
cacgtgtttg cagtggagaa tggcttcaag gccctgagaa gcaccattga tgccttcacg 660
tcaaaggctc gtcttgatgt gacatcgggtg gagccttcct ctgagtgtgt aggagaaccc 720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcttt cagaatctaa agaaacggga tgaagttatt 780
tgcagattta tcttcaatga aagcactatc attgatgaaa agccaaccag tatcgacaat 840
aattccatga attgccctgg gccaaaacta gaaaaacctg gagaggagta ctctattgaa 900
gtcagcttga acaaaggcaa aacattcttc aagagcaatg tcagcatcac cagcaccaca 960
tgtggcattt tccgc 975

<210> 142

<211> 325

<212> PRT
<213> ヒト

<400> 142

Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His Gly Pro Gly Trp Arg
20 25 30

Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
35 40 45

Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
50 55 60

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
65 70 75 80

Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
85 90 95

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
100 105 110

Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
115 120 125

Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys
130 135 140

Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
145 150 155 160

Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly
165 170 175

Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile
180 185 190

Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly
195 200 205

Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys
210 215 220

Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro
225 230 235 240

Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg

10

20

30

40

50

245	250	255
Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp		
260	265	270
Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro		
275	280	285
Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn		
290	295	300
Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr		
305	310	315
		320
Cys Gly Ile Phe Arg		
325		

10

<210> 143
 <211> 993
 <212> DNA
 <213> 人工配列

20

<220>
 <223> クローン化成熟ヒスチジンタグ INSP143

<400> 143

ggaagccttc ggtacatgg acctgactgg agaatatctt accgcctggc cctgggctcc	60
aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca	120
ggtcacagat gccagggtct atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg	180
aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gttccaaagc	240
ccaaatatct ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt ctgtccactc	300
acctcagaca agaatagaat aaaaaacggt ctgtaccaac ttcagaaaaat tgtgcctgac	360
ggtcacacat tcatgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac	420
tccggaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat	480
gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcgga aactgggggc caacgtttac	540
accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc	600
cacgtgtttg cagtggagaa tggcttcaag gccctgagaa gcaccattga tgccttcacg	660
tcaaaggctc gtcttgatgt gacatcggtg gagccttcct ctgagtgtgt aggagaaccc	720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcctt cagaatctaa agaaacggga tgaagttatt	780
tgcagattta tcttcaatga aagcactatc attgatgaaa agccaaccag tatcgacaat	840
aattccatga attgccctgg gccaaaacta gaaaaacctg gagaggagta ctctattgaa	900
gtcagcttga acaaaggcaa aacattcttc aagagcaatg tcagcatcac cagcaccaca	960
tgtggcattt tccgccacca tcaccatcac cat	993

30

40

<210> 144
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> 人工配列

<220>

50

<223> クローン化成熟ヒスチジンタグ INSP143

<400> 144

Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His Gly Pro Gly Trp Arg
20 25 30

Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
35 40 45

Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
50 55 60

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
65 70 75 80

Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
85 90 95

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
100 105 110

Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
115 120 125

Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys
130 135 140

Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
145 150 155 160

Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly
165 170 175

Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile
180 185 190

Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly
195 200 205

Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys
210 215 220

Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro
225 230 235 240

Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg
245 250 255

10

20

30

40

50

Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp
 260 265 270

Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 275 280 285

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn
 290 295 300

Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr
 305 310 315 320

Cys Gly Ile Phe Arg His His His His His His
 325 330

<210> 145

<211> 516

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 145

tttgacctct acttcatctt ggacaagtct ggcagcgtga acaataactg gattgacctt 60
 tataatgtggg tggaggaaac agtggcgagg ttccaaagcc caaatattcg gatgtgcttc 120
 atcacctact ccacagacgg ccagactgtc ttgccactca cctcagacaa gaatagaata 180
 aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt catgcaggca 240
 ggatttagaa aggcaattca acagatcgaa agtttcaact ccggaacaa ggttcccagc 300
 atgattattg ctatgactga tggagaactg gtggcacatg catttcagga cactctcaga 360
 gaagctcaaa aggctcggaa actgggggcc aacgtttaca ccctgggtgt ggctgattat 420
 aatctggacc agataacagc aattgcagac agccctggcc acgtgtttgc agtggagaat 480
 ggcttcaagg ccctgagaag caccattgat gccctc 516

<210> 146

<211> 172

<212> PRT

<213> ヒト

<400> 146

Phe Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn
 1 5 10 15

Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln
 20 25 30

Ser Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln
 35 40 45

Thr Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu
 50 55 60

10

20

30

40

50

Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala
65 70 75 80

Gly Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
85 90 95

Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
100 105 110

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu
115 120 125

10

Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
130 135 140

Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
145 150 155 160

Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu
165 170

20

<210> 147
<211> 174
<212> DNA
<213> ヒト

<400> 147

acgtcaaagg tctgtcttga tgtgacatcg gtggagccitt cctctgagtg ttaggagaaa 60
ccctaccatg tggttattca tggaaatggc tticagaatc taaagaaacg ggatgaagtt 120
atttgcagat ttatcttcaa tgaaagcact atcatctggga gtactctatt gaag 174

30

<210> 148
<211> 58
<212> PRT
<213> ヒト

<400> 148

Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

40

Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln
20 25 30

Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu
35 40 45

Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
50 55

<210> 149

50

<211> 174
 <212> DNA
 <213> ヒト

<400> 149
 acgtcaaagg tctgtcttga tgtgacatcg gtggagcctt cctctgagtg tgtaggagaa 60
 ccctaccatg tggttattca tggaaatggc tticagaatc taaagaaacg ggatgaagtt 120
 atttgcagat ttatcttcaa tgaaagcact atcatatgatg aaaagccaac cagt 174

<210> 150 10
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 150
 Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln 20 20
 20 25 30

Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu
 35 40 45

Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
 50 55

<210> 151
 <211> 13
 <212> PRT 30
 <213> 人工配列

<220>
 <223> 融合タンパク質リンカー配列

<400> 151
 Glu Phe Gly Ala Gly Leu Val Leu Gly Gly Gln Phe Met
 1 5 10

<210> 152 40
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> ヒト

<400> 152
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala 20 25 50

<210>	153		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工配列		
<220>			
<223>	プライマー INSP141-CP1		
<400>	153		10
	gtcacagga cagccagata	20	
<210>	154		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工配列		
<220>			
<223>	プライマー INSP141-CP2		20
<400>	154		
	gctggatg ctgacattgc	20	
<210>	155		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工配列		
<220>			
<223>	プライマー INSP141-AP1		30
<400>	155		
	atggggagcc atgagtcct ggggccctac ttccctg	36	
<210>	156		
<211>	47		
<212>	DNA		
<213>	人工配列		
<220>			40
<223>	プライマー INSP141-AP2		
<400>	156		
	agctgacttc aatagagtac tcccaatgat agtgctttca ttgaaga	47	
<210>	157		
<211>	46		
<212>	DNA		
<213>	人工配列		50

<220>

<223> プライマー INSP143-AP1

<400> 157

gcggaaaaatg ccacatgtgg tgctgggtgat gctgacattg ctcttg

46

<210> 158

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工配列

10

<220>

<223> プライマー 21M13

<400> 158

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 159

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工配列

20

<220>

<223> プライマー M13REV

<400> 159

caggaaacag ctatgacc

18

<210> 160

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工配列

30

<220>

<223> プライマー T7

<400> 160

taatacgact cactatagg

19

<210> 161

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工配列

40

<220>

<223> プライマー T3

<400> 161

attaaccctc actaaagg

18

50

<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工配列

<220>
<223> プライマー INSP142-936F

<400> 162
ccctgggcca aaactagaaa a 21 10

<210> 163
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工配列

<220>
<223> プライマー INSP142-1044R

<400> 163
aagagaagga catgtggtgc tg 22 20

<210> 164
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工配列

<220>
<223> プライマー hGAPDH-F 30

<400> 164
ccacccatgg caaattcc 18

<210> 165
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工配列

<220>
<223> プライマー hGAPDH-R 40

<400> 165
gatgggattt ccattgatga ca 22

<210> 166
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工配列

<220> 50

<223> プライマー イントロン-hGAPDH-F

<400> 166

cctagtccca gggctttgat t

21

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工配列

10

<220>

<223> プライマー イントロン-hGAPDH-R

<400> 167

ctgtgctccc actcctgatt t

21

<210> 168

<211> 500

<212> PRT

<213> ヒト

20

<400> 168

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35 40 45

30

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65 70 75 80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85 90 95

40

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile

50

Cys Pro Leu Leu Leu Leu Lys Gly Arg Leu Ser Gly Thr Arg Thr Arg
 420 425 430

Ala Gln Leu Gln Glu Ala Pro Gly Asn Gly Asp Ala Val Pro Gln Gly
 435 440 445

Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Val Pro
 450 455 460

Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln Ala Ser Ala
 465 470 475 480

10

Pro Cys Pro Pro Ser Ser Gly Ala Gln Ala Gln Ala His Pro Leu Arg
 485 490 495

Asp Ser Asn Met
 500

<210> 169

<211> 641

20

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> IPI00480015.1

<400> 169

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15

30

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

40

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

50

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175

10

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Val Ile Pro Ser Ser Pro
 210 215 220

Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr
 225 230 235 240

20

Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu
 245 250 255

Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile His Gly
 260 265 270

Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe
 275 280 285

30

Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp
 290 295 300

Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
 325 330 335

40

Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Arg Pro Pro Arg Pro Ser
 340 345 350

Tyr Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Gly Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr
 355 360 365

Phe Val Pro Leu Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp
 370 375 380

Arg Leu Cys Arg Lys Gln Ala Ser Ala Pro Cys Pro Pro Ser Ser Gly

50

【 0 1 2 7 】

【図 1】配列番号:24 (INSP141の全長タンパク質配列) を用いたNCBI非重複データベースに対するBLASTの上位10の結果を示す。

【図 2】配列番号:52 (INSP142の全長タンパク質配列) と前記上位5つのヒットとのBLASTにより作成されたアラインメントを示す。

【図 3】配列番号:90 (INSP143の全長タンパク質配列) を用いたNCBI非重複データベースに対するBLASTの上位10の結果を示す。

【図 4】配列番号:126 (INSP144の全長タンパク質配列) を用いたNCBI非重複データベースに対するBLASTの上位10の結果を示す。

【図 5】INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144コードエクソンのアラインメントを示す。 10

【図 6 A】INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144のORFのアラインメントを示す。INSP142のp259Aは陰影によって示されている。

【図 6 B】図 6 A続き。

【図 7 A】INSP141、INSP142、INSP143及びINSP144のヌクレオチドアラインメントを示す。大文字はコード配列を示し、小文字は非翻訳領域を示す。

【図 7 B】図 7 A続き。

【図 7 C】図 7 C続き。

【図 8】予想され、かつ、クローニングされたINSP141、INSP142、INSP143、INSP144、TMEM8及びCMGの模式図を示す。 20

【図 9】INSP141、INSP142、INSP143、INSP144、TMEM8及びCMGの細胞外vWFA及びABT_IGドメインのアミノ酸アラインメントを示す。同一残基は星印で示されている。二次構造のアサインメントはLacyらの研究 (Lacy et al. PNAS, 101(17):6367-6372) から推定することができる。各タンパク質の5つのMIDASモチーフ残基は陰影によって示されている。ATR1_HUMAN : NCBI Acc. No. q9h6x2 ; ATR2_HUMAN : NCBI Acc. No. P58335。

【図 1 0】RT-PCR(TaqMan)によって測定した主要ヒト組織におけるINSP142の発現。

【図 1 1】RT-PCR(TaqMan)によって測定した比較ヒト組織におけるINSP142の発現。

【図 1 2】RT-PCR(TaqMan)によって測定した分泌組織および免疫組織におけるINSP142の発現。

【図 1 3】RT-PCR(TaqMan)によって測定した初代細胞または細胞株におけるINSP142の発現。 30

【図 1 4】RT-PCR(TaqMan)によって測定した免疫細胞およびCNS起源の初代細胞及び細胞株におけるINSP142の発現。

【図 1 5】RT-PCR(TaqMan)によって測定した疾患結腸および回腸生検標本におけるINSP142の発現。

【図 1 6】RT-PCR(TaqMan)によって測定したIL18BP臨床試験の疾患皮膚生検標本におけるINSP142の発現。

【 図 1 】

Figure 1: NCBI 非重複データベースに対する INSP141 による BLASTp 検索の上位 10 の結果

INSP141

```
Query= INSP141
      (306 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
      1,448,673 sequences; 466,090,050 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:
```

	Score (bits)	E Value
ref XP_113625.3 similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo...	407	e-113
ref NP_766396.1 hypothetical protein 4933430J11 [Mus musculus] ...	284	1e-75
sp Q9C252 ATR_MOUSE Anthrax toxin receptor precursor (Tumor endo...	225	8e-58
ref XP_132709.1 RIKEN cDNA 2310008J16 [Mus musculus]	225	8e-58
ref NP_444262.1 tumor endothelial marker 8 isoform 2 precursor;...	223	4e-57
ref NP_115584.1 tumor endothelial marker 8 isoform 1 precursor;...	223	4e-57
ref NP_060623.2 tumor endothelial marker 8 isoform 3 precursor;...	223	4e-57
dbj BAC03731.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	193	3e-48
gb AAP04016.1 capillary morphogenesis protein 2 [Homo sapiens]	193	3e-48
dbj BA091707.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	172	8e-42

```
>ref|XP_113625.3| similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo sapiens]
      Length = 483
```

【 図 3 】

Figure 3: NCBI 非重複データベースに対する INSP143 による BLASTp 検索の上位 10 の結果

INSP143

```
Query= INSP143
      (608 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
      1,448,673 sequences; 466,090,050 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:
```

	Score (bits)	E Value
ref XP_113625.3 similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo...	1003	0.0
ref NP_766396.1 hypothetical protein 4933430J11 [Mus musculus] ...	514	e-144
sp Q9C252 ATR_MOUSE Anthrax toxin receptor precursor (Tumor endo...	290	5e-77
ref XP_132709.1 RIKEN cDNA 2310008J16 [Mus musculus]	290	5e-77
ref NP_115584.1 tumor endothelial marker 8 isoform 1 precursor;...	288	2e-76
ref NP_444262.1 tumor endothelial marker 8 isoform 2 precursor;...	281	2e-74
gb AAP04016.1 capillary morphogenesis protein 2 [Homo sapiens]	273	5e-72
dbj BAC03731.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	270	4e-71
ref NP_060623.2 tumor endothelial marker 8 isoform 3 precursor;...	266	8e-70
dbj BA091707.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	223	7e-57

```
>ref|XP_113625.3| similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo sapiens]
      Length = 483
```

【 図 2 】

Figure 2: NCBI 非重複データベースに対する INSP142 による BLASTp 検索の上位 10 の結果

INSP142

```
Query= INSP142
      (352 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
      1,448,673 sequences; 466,090,050 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:
```

	Score (bits)	E Value
ref XP_113625.3 similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo...	510	e-143
ref NP_766396.1 hypothetical protein 4933430J11 [Mus musculus] ...	336	3e-91
sp Q9C252 ATR_MOUSE Anthrax toxin receptor precursor (Tumor endo...	266	4e-70
ref XP_132709.1 RIKEN cDNA 2310008J16 [Mus musculus]	266	4e-70
ref NP_444262.1 tumor endothelial marker 8 isoform 2 precursor;...	265	8e-70
ref NP_115584.1 tumor endothelial marker 8 isoform 1 precursor;...	265	8e-70
ref NP_060623.2 tumor endothelial marker 8 isoform 3 precursor;...	265	8e-70
dbj BAC03731.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	234	2e-60
gb AAP04016.1 capillary morphogenesis protein 2 [Homo sapiens]	234	2e-60
dbj BA091707.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	199	6e-50

```
>ref|XP_113625.3| similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo sapiens]
      Length = 483
```

【 図 4 】

Figure 4: NCBI 非重複データベースに対する INSP144 による BLASTp 検索の上位 10 の結果

INSP144

```
Query= INSP144
      (631 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
      1,448,673 sequences; 466,090,050 total letters

Searching.....done

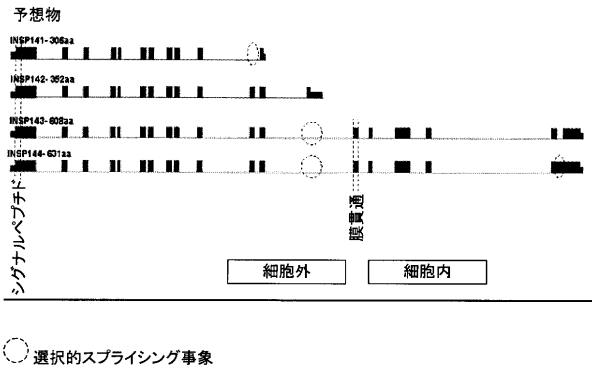
Sequences producing significant alignments:
```

	Score (bits)	E Value
ref XP_113625.3 similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo...	990	0.0
ref NP_766396.1 hypothetical protein 4933430J11 [Mus musculus] ...	503	e-141
sp Q9C252 ATR_MOUSE Anthrax toxin receptor precursor (Tumor endo...	290	5e-77
ref XP_132709.1 RIKEN cDNA 2310008J16 [Mus musculus]	290	5e-77
ref NP_115584.1 tumor endothelial marker 8 isoform 1 precursor;...	288	3e-76
ref NP_444262.1 tumor endothelial marker 8 isoform 2 precursor;...	281	2e-74
gb AAP04016.1 capillary morphogenesis protein 2 [Homo sapiens]	273	5e-72
dbj BAC03731.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	270	4e-71
ref NP_060623.2 tumor endothelial marker 8 isoform 3 precursor;...	266	8e-70
dbj BA091707.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	223	8e-57

```
>ref|XP_113625.3| similar to hypothetical protein 4933430J11 [Homo sapiens]
      Length = 483
```

【図 5】

Figure 5: INSP141, INSP142, INSP143 及び INSP144 コードエキソンのアラインメント



【図 6 A】

Figure 6: INSP141, INSP142, INSP143, INSP144 の ORF のアラインメント

	シグナルペプチド
INSP141	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
CLONEDINSP141	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
INSP142	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
CLONEDINSP142	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
INSP143	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
CLONEDINSP143	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
INSP144	MGSHESLGPY FLVFLLLLLL PPPLFRAGSL RYHGPDRWIF HRLALGSRRRA
INSP141	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
CLONEDINSP141	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
INSP142	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
CLONEDINSP142	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
INSP143	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
CLONEDINSP143	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
INSP144	HHHGFPGWRQ HNRQGOAGHR CQGSFDLYFI LDKSGSVNNN WIDLVMWVEE
INSP141	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
CLONEDINSP141	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
INSP142	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
CLONEDINSP142	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
INSP143	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
CLONEDINSP143	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
INSP144	TVARFQSPNI RMCFTYSTD GQTVLELTSD KNRIKNGLDQ LQKIVPDGHT
INSP141	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
CLONEDINSP141	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
INSP142	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
CLONEDINSP142	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
INSP143	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
CLONEDINSP143	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
INSP144	FMQAGFRKAI QQISFNSGN KVPMSIIAMT DGEIVAHAFQ DTLREAQKAR
INSP141	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
CLONEDINSP141	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
INSP142	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
CLONEDINSP142	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
INSP143	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
CLONEDINSP143	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
INSP144	KLGANVYTLG VADYNLDQIT AIADSPGHVF AVENGFKALR STIDALTSKV
INSP141	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
CLONEDINSP141	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
INSP142	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
CLONEDINSP142	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
INSP143	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
CLONEDINSP143	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
INSP144	CLDVTSEPS SECVGEPYHV VINGNGFQNL KKRDEVICRF IFNESTIIGS
INSP141	TLKSA
CLONEDINSP141	TLKSA
INSP142	KPTSIDNNNM NCPGPKLEK GEEYSIEVSL NKGITFFKSN VSITSTPCPS
CLONEDINSP142	KPTSIDNNNM NCPGPKLEK GEEYSIEVSL NKGITFFKSN VSITSTPCPS
INSP143	KPTSIDNNNM NCPGPKLEK GEEYSIEVSL NKGITFFKSN VSITSTPCPS
CLONEDINSP143	KPTSIDNNNM NCPGPKLEK GEEYSIEVSL NKGITFFKSN VSITSTPCPS
INSP144	KPTSIDNNNM NCPGPKLEK GEEYSIEVSL NKGITFFKSN VSITSTPCPS
INSP142	LK
CLONEDINSP142	FRNMLYFVPL LLLVPLLLCC VNRCLKQTV KEPPPVQKPE KEPEQEKPPS
INSP143	FR
CLONEDINSP143	FRNMLYFVPL LLLVPLLLCC VNRCLKQTV KEPPPVQKPE KEPEQEKPPS
INSP144	FRNMLYFVPL LLLVPLLLCC VNRCLKQTV KEPPPVQKPE KEPEQEKPPS
INSP143	膜貫通ドメイン
INSP144	膜貫通ドメイン

【図 6 B】

INSP143	DLSHASCHQV PWMCCQSRDQ GRVLSLALQ SOYAQAAPCCP RICFPHSQEC
INSP144	DLSHASCHQV PWMCCQSRDQ GRVLSLALQ SOYAQAAPCCP RICFPHSQEC
INSP143	LSLPQAPCSP RMCLRHSREC LALKQARCSP NICLR-----
INSP144	LSLPQAPCSP RMCLRHSREC LALKQARCSP NICLRHSQHS RECLARKQAP
INSP143	-----HS PEYFSQAQTL CNPKSCLQPS RECLPLTCCSS RCRLPPARCL
INSP144	CSFRICLRHS PEYFSQAQTL CNPKSCLQPS RECLPLTCCSS RCRLPPARCL
INSP143	RPPSRMLPLL SPLLRHTAEP PLSLPPSEPN F
INSP144	RPPSRMLPLL SPLLRHTAEP PLSLPPSEPN F

【図 7 A】

Figure 7: INSP141, INSP142, INSP143, INSP144 のヌクレオチドアラインメント

INSP143	tgtgtcagcctctctgtggccctggcagcagcagcccaagagtgaggtggggtcacagggga
INSP144	tgtgtcagcctctctgtggccctggcagcagcagcccaagagtgaggtggggtcacagggga
INSP142	tgtgtcagcctctctgtggccctggcagcagcagcccaagagtgaggtggggtcacagggga
INSP141	tgtgtcagcctctctgtggccctggcagcagcagcccaagagtgaggtggggtcacagggga
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	cagccagatATGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGCTCTTCCTGCTGCT
INSP144	cagccagatATGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGCTCTTCCTGCTGCT
INSP142	cagccagatATGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGCTCTTCCTGCTGCT
INSP141	cagccagatATGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGCTCTTCCTGCTGCT
INSP141-CP1	*****
INSP141-AP1	*****
INSP143	GCTGCTGCTTCTCCACCGCTTTTAGAGCGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP144	GCTGCTGCTTCTCCACCGCTTTTAGAGCGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP142	GCTGCTGCTTCTCCACCGCTTTTAGAGCGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP141	GCTGCTGCTTCTCCACCGCTTTTAGAGCGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	GAGAATATTTACCGCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACACCAACCATGGCCACAG
INSP144	GAGAATATTTACCGCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACACCAACCATGGCCACAG
INSP142	GAGAATATTTACCGCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACACCAACCATGGCCACAG
INSP141	GAGAATATTTACCGCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACACCAACCATGGCCACAG
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	ATGGAGGAGCAGCTGGGCGCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGCTCATTTGACCT
INSP144	ATGGAGGAGCAGCTGGGCGCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGCTCATTTGACCT
INSP142	ATGGAGGAGCAGCTGGGCGCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGCTCATTTGACCT
INSP141	ATGGAGGAGCAGCTGGGCGCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGCTCATTTGACCT
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAAATGATGACCTTTATATGTG
INSP144	CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAAATGATGACCTTTATATGTG
INSP142	CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAAATGATGACCTTTATATGTG
INSP141	CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAAATGATGACCTTTATATGTG
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	GGTGAGGAGAAACAGTGGCGAGGTTCACAAAGCCCAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP144	GGTGAGGAGAAACAGTGGCGAGGTTCACAAAGCCCAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP142	GGTGAGGAGAAACAGTGGCGAGGTTCACAAAGCCCAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP141	GGTGAGGAGAAACAGTGGCGAGGTTCACAAAGCCCAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	CTCCACAGAGCGGCAGACTGTCTTGCCACTCACTCAGACAAGAAATAGAATAAAAAACGG
INSP144	CTCCACAGAGCGGCAGACTGTCTTGCCACTCACTCAGACAAGAAATAGAATAAAAAACGG
INSP142	CTCCACAGAGCGGCAGACTGTCTTGCCACTCACTCAGACAAGAAATAGAATAAAAAACGG
INSP141	CTCCACAGAGCGGCAGACTGTCTTGCCACTCACTCAGACAAGAAATAGAATAAAAAACGG
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****
INSP143	TCTTGACCAACTTCAGAAAATTTGCTGACGGTCAACATTCATGACGAGGATTTAG
INSP144	TCTTGACCAACTTCAGAAAATTTGCTGACGGTCAACATTCATGACGAGGATTTAG
INSP142	TCTTGACCAACTTCAGAAAATTTGCTGACGGTCAACATTCATGACGAGGATTTAG
INSP141	TCTTGACCAACTTCAGAAAATTTGCTGACGGTCAACATTCATGACGAGGATTTAG
INSP143	*****
INSP144	*****
INSP142	*****
INSP141	*****

【図 7 B】

INSP143 AAAGCAATTCACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCAGCATGATTAT
 INSP144 AAAGCAATTCACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCAGCATGATTAT
 INSP142 AAAGCAATTCACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCAGCATGATTAT
 INSP141 AAAGCAATTCACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCAGCATGATTAT

 INSP143 TGCATGACTGATGGAGAACTGGTGCACATGCAATTCAGGACACTTCAGAGAAGCTCA
 INSP144 TGCATGACTGATGGAGAACTGGTGCACATGCAATTCAGGACACTTCAGAGAAGCTCA
 INSP142 TGCATGACTGATGGAGAACTGGTGCACATGCAATTCAGGACACTTCAGAGAAGCTCA
 INSP141 TGCATGACTGATGGAGAACTGGTGCACATGCAATTCAGGACACTTCAGAGAAGCTCA

 INSP143 AAAGGCTCGGAACTGGGGGCCAACGTTTACACCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
 INSP144 AAAGGCTCGGAACTGGGGGCCAACGTTTACACCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
 INSP142 AAAGGCTCGGAACTGGGGGCCAACGTTTACACCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
 INSP141 AAAGGCTCGGAACTGGGGGCCAACGTTTACACCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA

 INSP143 CCAGATAACAGCAATTCAGACAGCCTGGCCAGCTGTTTGCAGTGGAGAATGGCTTCAA
 INSP144 CCAGATAACAGCAATTCAGACAGCCTGGCCAGCTGTTTGCAGTGGAGAATGGCTTCAA
 INSP142 CCAGATAACAGCAATTCAGACAGCCTGGCCAGCTGTTTGCAGTGGAGAATGGCTTCAA
 INSP141 CCAGATAACAGCAATTCAGACAGCCTGGCCAGCTGTTTGCAGTGGAGAATGGCTTCAA

 INSP143 GGCCCTGAGAAGCAACATTCATGCTCCACGCTCAAGGCTCTGCTTGAATGACATCGGT
 INSP144 GGCCCTGAGAAGCAACATTCATGCTCCACGCTCAAGGCTCTGCTTGAATGACATCGGT
 INSP142 GGCCCTGAGAAGCAACATTCATGCTCCACGCTCAAGGCTCTGCTTGAATGACATCGGT
 INSP141 GGCCCTGAGAAGCAACATTCATGCTCCACGCTCAAGGCTCTGCTTGAATGACATCGGT

 INSP143 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAAGACCTTACCATGGTATTATGGAATGGCTT
 INSP144 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAAGACCTTACCATGGTATTATGGAATGGCTT
 INSP142 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAAGACCTTACCATGGTATTATGGAATGGCTT
 INSP141 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAAGACCTTACCATGGTATTATGGAATGGCTT

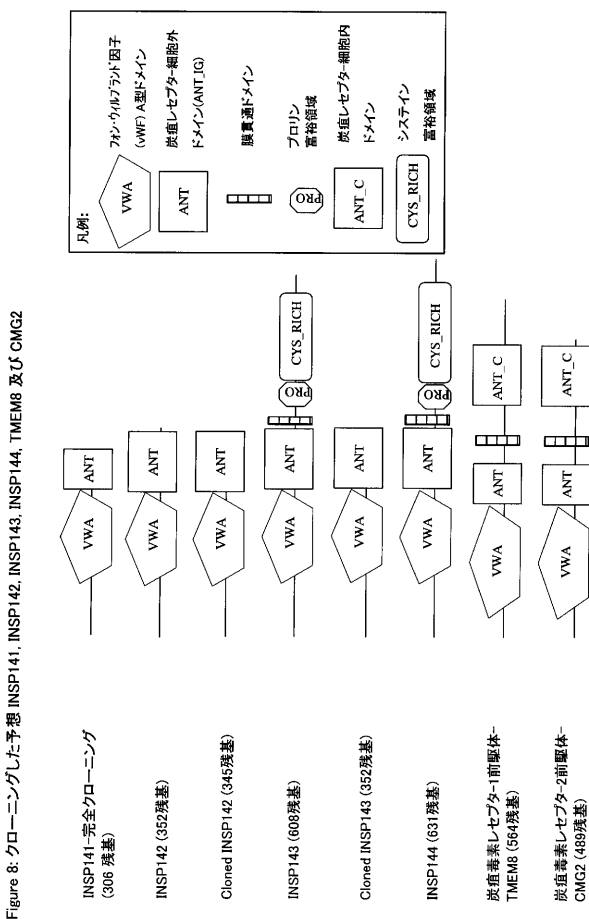
 INSP143 TCAGAACTCAAAGAAACGGGATGAAGTATTTCAGATTATCTTCAATGAAGACATAT
 INSP144 TCAGAACTCAAAGAAACGGGATGAAGTATTTCAGATTATCTTCAATGAAGACATAT
 INSP142 TCAGAACTCAAAGAAACGGGATGAAGTATTTCAGATTATCTTCAATGAAGACATAT
 INSP141 TCAGAACTCAAAGAAACGGGATGAAGTATTTCAGATTATCTTCAATGAAGACATAT

 INSP143 CATTGATGAAAGCAACAGTATTCAGCAATAATTCATGAATTCGCTGGGCAAAACCT
 INSP144 CATTGATGAAAGCAACAGTATTCAGCAATAATTCATGAATTCGCTGGGCAAAACCT
 INSP142 CATTGATGAAAGCAACAGTATTCAGCAATAATTCATGAATTCGCTGGGCAAAACCT
 INSP141 CATTG

 INSP143 AGAAAACTGGAGAGAGTACTCTTCAAGTCAGCTTGAACAAAGGCAAAACCTCTT
 INSP144 AGAAAACTGGAGAGAGTACTCTTCAAGTCAGCTTGAACAAAGGCAAAACCTCTT
 INSP142 AGAAAACTGGAGAGAGTACTCTTCAAGTCAGCTTGAACAAAGGCAAAACCTCTT
 INSP141 -----GGAGTACTCTTATTGAAGTCAGCTTga

 INSP143-AP1
 INSP144
 INSP142
 INSP141-CP2

【図 8】



【図 7 C】

(Figure 7 Cont.)

INSP143-AP1 膜貫通ドメイン INSP143-CP4
 INSP143 ---GGCATTTTCGGAQAATGCTGCTTATTTTGTGCCACTCTGCTGCTTGTGCACTGCTG
 INSP144 ---GGCATTTTCGGAQAATGCTGCTTATTTTGTGCCACTCTGCTGCTTGTGCACTGCTG

 INSP143 CTGTGTTGTGTCTGGCGGCTGTGCGCGTACGAGCATGTCAAGGAGCCACCACTGTGCGAG
 INSP144 CTGTGTTGTGTCTGGCGGCTGTGCGCGTACGAGCATGTCAAGGAGCCACCACTGTGCGAG

 INSP143 AAGCCAGAAAAGGAGCCAGAGCAGAAAACCAATCACACACACCCCTCCGCT
 INSP144 AAGCCAGAAAAGGAGCCAGAGCAGAAAACCAATCACACACACCCCTCCGCT

 INSP143 CCACCACTCCACTCCACTCCGCGCCGCGCTCTCTTAACACCTCCGCGCTGTGAT
 INSP144 CCACCACTCCACTCCACTCCGCGCCGCGCTCTCTTAACACCTCCGCGCTGTGAT

 INSP143 ATTTGTTGCTGTGATGCCAAGGAGTGGGCGGATGAGAAGGATAGAGGCAATCTGGAT
 INSP144 ATTTGTTGCTGTGATGCCAAGGAGTGGGCGGATGAGAAGGATAGAGGCAATCTGGAT

 INSP143 ACCTTTTGTGACCTCTCTCAAGCAAGTGCACCAAGTGCATGATGTTGTGTCAGAGC
 INSP144 ACCTTTTGTGACCTCTCTCAAGCAAGTGCACCAAGTGCATGATGTTGTGTCAGAGC

 INSP143 AGGACACAGGAGGATACCTCAGCTTAGCCCTTGACAGTCCCAATATGCACAGGCTCC
 INSP144 AGGACACAGGAGGATACCTCAGCTTAGCCCTTGACAGTCCCAATATGCACAGGCTCC

 INSP143 TGCTGCCCAAGATCTGCTTCCACACAGCAGAGAGTGCCTTCCCTACACAGGCTCC
 INSP144 TGCTGCCCAAGATCTGCTTCCACACAGCAGAGAGTGCCTTCCCTACACAGGCTCC

 INSP143 TGCAGCCCAAGATGTGCTGAGACACAGCAGGAGTGCCTCCCTCAACAGGCTCC
 INSP144 TGCAGCCCAAGATGTGCTGAGACACAGCAGGAGTGCCTCCCTCAACAGGCTCC

 INSP143 TGCAGCCCAAACTCTGCTGAGACACAGCAGGAGTGCCTTCCGCGCAAA
 INSP144 TGCAGCCCAAACTCTGCTGAGACACAGCAGGAGTGCCTTCCGCGCAAA

 INSP143 -----CTGCTGAGACACAGCAGGAGTACTTTTCCCAAGCA
 INSP144 CAGGCTCCCTGCAAGCCCAAGGATCTGCTGAGACACAGCAGGAGTACTTTTCCCAAGCA

 INSP143 CAGACTCTGTGAACCCAAAGAGTGCCTTCAACCCAGCAGGAGTGCCTCCCTCAAC
 INSP144 CAGACTCTGTGAACCCAAAGAGTGCCTTCAACCCAGCAGGAGTGCCTCCCTCAAC

 INSP143 TGCTCCTCCAGTGCCTGCTCCCTCCCTCAGTGTGCTTGAAGGAGTGCCTCCAGATGCTG
 INSP144 TGCTCCTCCAGTGCCTGCTCCCTCCCTCAGTGTGCTTGAAGGAGTGCCTCCAGATGCTG

 INSP143 CGCTGCTGCTCCCTGCTGCTCAGGACACAGGAGTGCCTTCTCACTCCCTCCCTCA
 INSP144 CGCTGCTGCTCCCTGCTGCTCAGGACACAGGAGTGCCTTCTCACTCCCTCCCTCA

 INSP143 GAGCCCAACTTCTaa
 INSP144 GAGCCCAACTTCTaa

【図 9】

Figure 9: INSP141, INSP142, INSP144, TMEM8 及び CMG2 の細胞外 vWFA 及び ANTJG ドメインのアミノ酸アラインメント

ATR1_HUMAN
 ATR2_HUMAN
 INSP141
 INSP142
 INSP143
 INSP144

vWFAドメイン
 -----QGGREDGGPACVGGFDLYFLDKSGSVLHWNHIEYFVQLAKHFI3PQLRMSP
 -----QGGPSCRFADLYFLDKSGSVNWNHIEYFVQLAKHFI3PQLRMSP
 GPQWRQHWQAGHRCQGSFDLYFLDKSGSVNWNHIDLYVMVETVARFQSPNIRMC
 GPQWRQHWQAGHRCQGSFDLYFLDKSGSVNWNHIDLYVMVETVARFQSPNIRMC
 GPQWRQHWQAGHRCQGSFDLYFLDKSGSVNWNHIDLYVMVETVARFQSPNIRMC
 GPQWRQHWQAGHRCQGSFDLYFLDKSGSVNWNHIDLYVMVETVARFQSPNIRMC
 *****: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ATR1_HUMAN
 ATR2_HUMAN
 INSP141
 INSP142
 INSP143
 INSP144

vWFAドメイン
 IVFSTGTTLMKLTEDREQIRGLBELQKVLFGGDTYMEHGFERASEQIYYENRQGYRTA
 IVFSSQATILPLTDGRKIKSGLEDLKRVSFVGETYIHEGLKLANBQIK-A-GGLKTS
 ITYSTGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
 ITYSTGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
 ITYSTGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
 ITYSTGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
 *****: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ATR1_HUMAN
 ATR2_HUMAN
 INSP141
 INSP142
 INSP143
 INSP144

vWFAドメイン
 SVIIALTGDELHEDLFFYSERANRSDLGAIIVCVGVKDFNETQLARIADSKDHVFPVN
 SIIIALTDGRLDGLVPSYARKEAKISRLSGASVYCVGVDFEAGLERIADSKDHVFPVN
 SMIIAMTDELVAHAFQDTLREAAKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
 SMIIAMTDELVAHAFQDTLREAAKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
 SMIIAMTDELVAHAFQDTLREAAKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
 SMIIAMTDELVAHAFQDTLREAAKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
 SMIIAMTDELVAHAFQDTLREAAKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
 *****: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ATR1_HUMAN
 ATR2_HUMAN
 INSP141
 INSP142
 INSP143
 INSP144

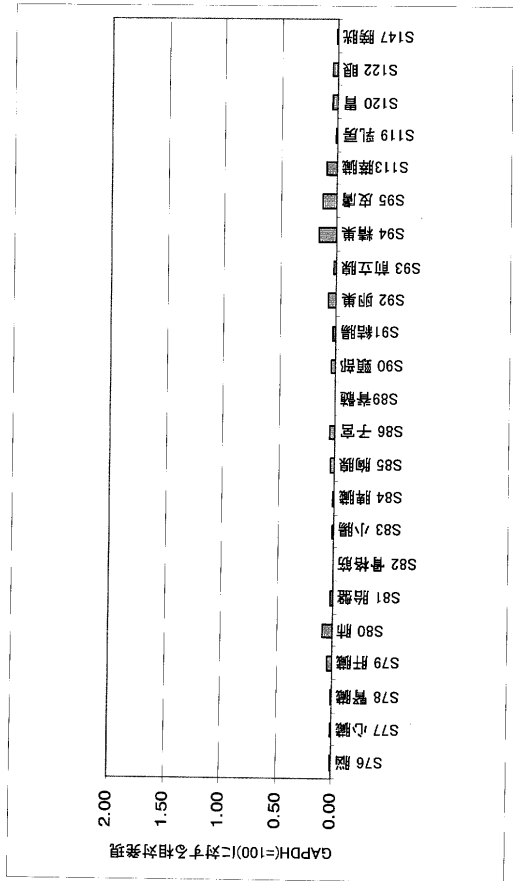
vWFA
 DGFOALQGIHSLKKSCIBILAAEPSTICAGESEFQVVRNGFPHARNVDRVLCFRIK
 GGFQALKGIINSLAQSCFLELOPFSVGVGEFVLSGFGPLGSHNSVLCFTYVN
 NGFKALRSTIDALTISKVCLDVTSVEPSECVGEPIYHVHNGFQNLKKRDEVICRFIFN
 NGFKALRSTIDALTISKVCLDVTSVEPSECVGEPIYHVHNGFQNLKKRDEVICRFIFN
 NGFKALRSTIDALTISKVCLDVTSVEPSECVGEPIYHVHNGFQNLKKRDEVICRFIFN
 NGFKALRSTIDALTISKVCLDVTSVEPSECVGEPIYHVHNGFQNLKKRDEVICRFIFN
 *****: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ATR1_HUMAN
 ATR2_HUMAN
 INSP141
 INSP142
 INSP143
 INSP144

ANTJGドメイン
 DSVTLNEKFFS
 EYTTTSVKPVS
 ESTIIGSTLLK
 ESTIIDEKPTS
 ESTIIDEKPTS
 ESTIIDEKPTS
 *****: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

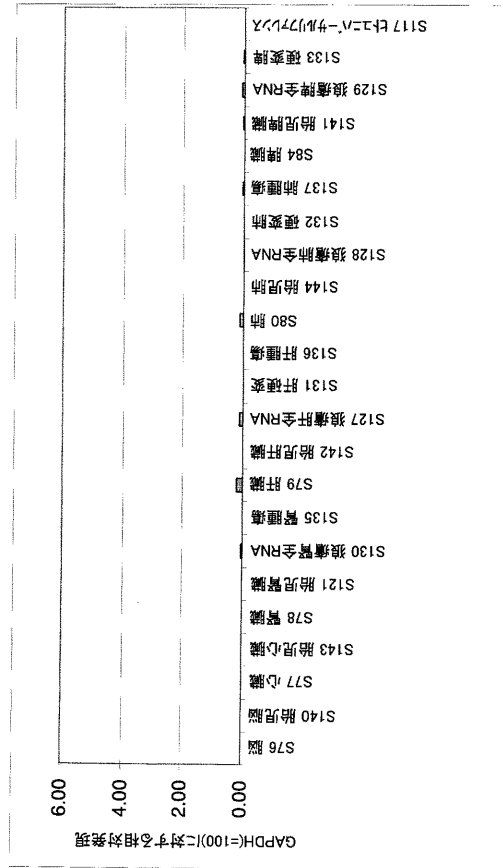
【図 10】

Figure 10: RT-PCR(TaqMan)によって測定した主要ヒト組織におけるINSP142の発現



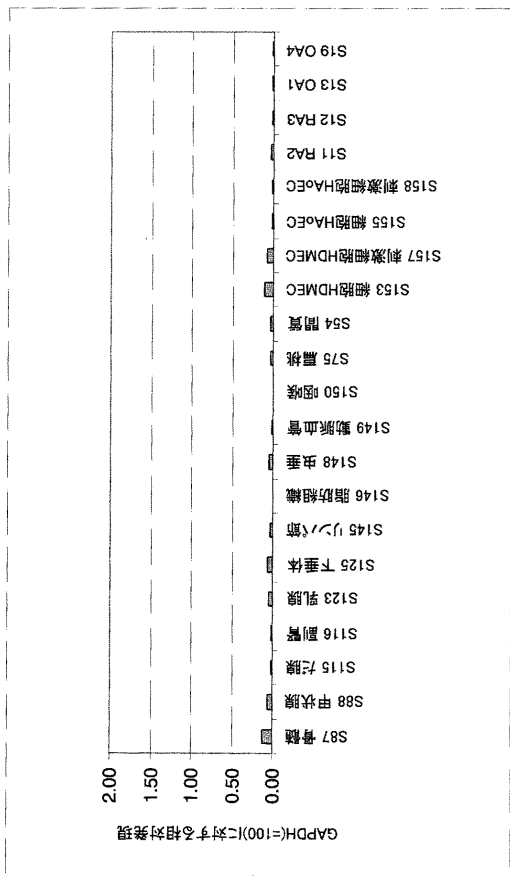
【図 11】

Figure 11: RT-PCR(TaqMan)によって測定した比較ヒト組織におけるINSP142の発現



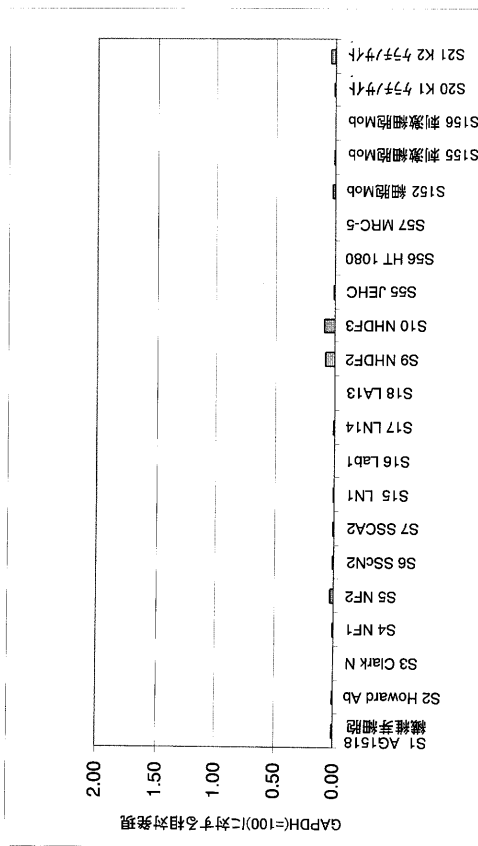
【図 12】

Figure 12: RT-PCR(TaqMan)によって測定した分泌組織および免疫組織におけるINSP142の発現

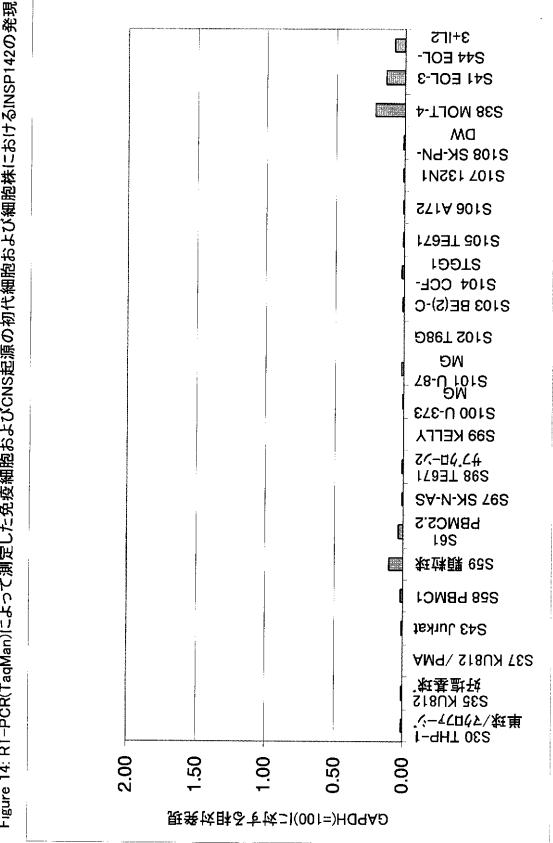


【図 13】

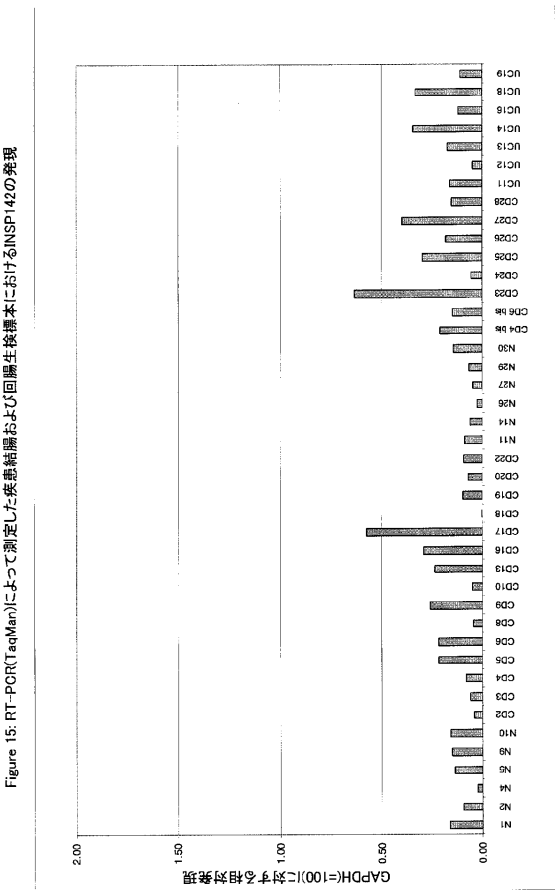
Figure 13: RT-PCR(TaqMan)によって測定した初代細胞または細胞株におけるINSP142の発現



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【配列表】

2008517616000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/195 A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE Geneseq [Online] 20 October 2003 (2003-10-20), "Propionibacterium acnes predicted ORF-encoded polypeptide #835." XP002386360 retrieved from EBI accession no. GSN:ABM36159 Database accession no. ABM36159 the whole document & WO 03/033515 A (CORIXA CORPORATION; MITCHAM, JENNIFER, L; SKEIKY, YASIR, A., W; PERSIN) 24 April 2003 (2003-04-24)</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1,3, 13-61

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2006

Date of mailing of the international search report

12/12/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kaas, Victor

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2005/004191

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 20 November 2003 (2003-11-20), "Human coding sequence, SEQ ID 1418." XP002386361 retrieved from EBI accession no. GSN:ADA53850 Database accession no. ADA53850 the whole document & EP 1 293 569 A (RESEARCH ASSOCIATION FOR BIOTECHNOLOGY) 19 March 2003 (2003-03-19)	1,3, 13-61
X	DATABASE EPO Proteins [Online] 22 March 2002 (2002-03-22), "Sequence 301 from Patent WO0210217." XP002406233 retrieved from EBI accession no. EPOP:AX393371 Database accession no. AX393371 the whole document & WO 02/10217 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; ST CROIX BRAD [US]; KINZLER KENNETH W [US]; V) 7 February 2002 (2002-02-07)	4-6, 13-61
X	US 2003/144193 A1 (ROTTMAN JAMES B ET AL) 31 July 2003 (2003-07-31) paragraph [0008] - paragraph [0035] paragraph [0064] - paragraph [0109] paragraph [0162] - paragraph [0262] sequence ID NO.2	1,3-6, 13-61
P,X	WO 2004/093804 A (FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC; LEE, ERNESTINE; HESTIR, KEVIN; CHU, KETI) 4 November 2004 (2004-11-04) SEQ ID NO: 276 and 1008	1,3-6, 13-61
X	BRADLEY K A ET AL: "Anthrax toxin receptor proteins" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 65, no. 3, February 2003 (2003-02), pages 309-314, XP002977782 ISSN: 0006-2952 cited in the application the whole document	1,3-6, 13-61
X	SCOBIE HEATHER M ET AL: "Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 9, 29 April 2003 (2003-04-29), pages 5170-5174, XP002386353 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,3-6, 13-61

International Application No. PCT/GB2005/004191

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 2,7-12 (completely),1,3-6, 13-61 (partially)

-Present claims 25, 27-30 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely binding to or modulating the level of expression or activity of the so-called "INSP141 exon 1 polypeptide" of SEQ ID NO: 2. These claims however do not give any structural or essential characteristics of said compounds. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to respectively "INSP141 exon 1 polypeptide" antibodies and "INSP142 polypeptide" antibodies as ligand (see e.g. page 34 lines 30- page 36, line 19) and respectively "INSP141 exon 1 polypeptide" sense or antisense oligonucleotides and "INSP141 exon 1 polypeptide" sense or antisense oligonucleotides as hybridizing compound (see page 37, lines 9-32).

-Although claims 47-49 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/004191**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: 2,7-12 (completely), 1,3-6, 13-61 (partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 47-49 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1,3,4-6,13-61(all partially)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2005/004191

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claim 1, 3, 13-61 (all partially)

Polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2 encoded by a nucleic acid molecule comprising the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1. Fusion protein comprising said polypeptide. Vector comprising the nucleic acid molecule. Host cell transformed with the vector. Antibody which binds to the polypeptide. Use in method of diagnosis and therapeutical treatment.

Inventions 2-75: Claims 1-61(all partially)

As invention 1 wherein the amino acid sequence of the polypeptide is as shown in respectively SEQ ID NO: 2 to 150 encoded by a nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1 to 149.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2005/004191

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03033515	A	24-04-2003	NONE	
EP 1293569	A	19-03-2003	NONE	
WO 0210217	A2	07-02-2002	AU 8306201 A CA 2416732 A1 EP 1307557 A2 JP 2004527210 T -	13-02-2002 07-02-2002 07-05-2003 09-09-2004
US 2003144193	A1	31-07-2003	US 2003134786 A1	17-07-2003
WO 2004093804	A	04-11-2004	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
 A 0 1 K 67/027 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)
 A 6 1 P 1/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/12 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 7/02 (2006.01)
 A 6 1 P 7/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/04 (2006.01)
 A 6 1 P 3/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 3/04 (2006.01)
 A 6 1 P 19/10 (2006.01)
 A 6 1 P 31/18 (2006.01)
 A 6 1 P 31/12 (2006.01)
 A 6 1 P 31/10 (2006.01)
 A 6 1 P 33/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 15/16 (2006.01)
 A 6 1 P 15/18 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)
 G 0 1 N 33/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/00 A
 C 0 7 K 16/28
 C 1 2 Q 1/68 A
 A 0 1 K 67/027
 C 1 2 Q 1/02
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 1/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 9/12
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/10 1 0 1
 A 6 1 P 7/02
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/04
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 3/04
 A 6 1 P 19/10
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 15/16
 A 6 1 P 15/18
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/53 M
 G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 33/15 Z

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 デイヴィーズ マーク ダグラス

イギリス ダブリュー 1 ティー 2 エヌユー ロンドン シャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ リミテッド内

(72)発明者 ミカロヴィッチ ディヴィッド

イギリス ダブリュー 1 ティー 2 エヌユー ロンドン シャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ リミテッド内

(72)発明者 ヨーク メラニー

スイス ツェーハー 1 2 3 2 コンフィニョン シュマン ド ヴィヨネックス 20 ア

(72)発明者 パワー クリスティン

フランス エフ - 0 1 7 1 0 トワリー リュー ド ジョンクイエ 10

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA63 BA80

4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ61 QR08 QR32 QR36 QR42

QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39

QX02

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA01 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA20

BA22 BA23 BA44 NA14 ZA012 ZA082 ZA162 ZA362 ZA422 ZA452

ZA512 ZA542 ZA592 ZA662 ZA702 ZA812 ZA862 ZA892 ZA962 ZA972

ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB262 ZB272 ZB312 ZB332 ZB352 ZB392

ZC212 ZC352 ZC552

4C087 AA02 AA03 BB63 NA14 ZA01 ZA08 ZA16 ZA36 ZA42 ZA45

ZA51 ZA54 ZA59 ZA66 ZA70 ZA81 ZA86 ZA89 ZA96 ZA97

ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB26 ZB27 ZB31 ZB33 ZB35 ZC21

ZC35 ZC55

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA50 DA75 DA86 EA20

FA74