

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 520577**

( P2003 - 520577A )

(43)公表日 平成15年7月8日 (2003.7.8)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		45/00	4 B 0 6 4
		48/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 56数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 532164(P2001 - 532164)

(86) (22)出願日 平成12年10月19日 (2000.10.19)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月15日 (2002.4.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/29072

(87)国際公開番号 W001/029178

(87)国際公開日 平成13年4月26日 (2001.4.26)

(31)優先権主張番号 09/422,153

(32)優先日 平成11年10月21日 (1999.10.21)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(81)指定国 EP ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , J P

(71)出願人 スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406 - 0939、キング・オブ・プルシア、スウェードランド・ロード709番

(72)発明者 スーザン・ビー・ディロン

アメリカ合衆国94507カリフォルニア州アラモ、イムリー・ブレイス266番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 ( 外 2 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 E P O一次応答遺伝子 1、E P R G 1

(57)【要約】

E P R G 1 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドならびにかかるポリペプチドの組換え技法による生成方法が開示される。治療および治療のための診断アッセイにおいて E P R G 1 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用する方法もまた開示される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 (i) 配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも

- (a) 70%の同一性；
- (b) 80%の同一性；
- (c) 90%の同一性；または
- (d) 95%の同一性

を有する群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；

(ii) 配列番号4のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド；または

(iii) 配列番号4のアミノ酸配列である単離ポリペプチド

よりなる群から選択される単離ポリペプチド。

【請求項2】 (i) 配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも

- (a) 70%の同一性；
- (b) 80%の同一性；
- (c) 90%の同一性；または
- (d) 95%の同一性

を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(ii) 配列番号4のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して全長にわたって少なくとも

- (a) 70%の同一性；
- (b) 80%の同一性；
- (c) 90%の同一性；または
- (d) 95%の同一性

を有するヌクレオチド配列を含む単離ヌクレオチド；

(iii) 配列番号3の全長にわたって配列番号3のものに対して少なくとも

- (a) 70%の同一性；

- (b) 80%の同一性；
- (c) 90%の同一性；または
- (d) 95%の同一性

を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(iv) 配列番号4のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(vi) 配列番号3のポリヌクレオチドである単離ポリヌクレオチド；または

(vi) 配列番号3の配列またはそのフラグメントを有する標識プローブを用いてストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる単離ポリヌクレオチド；または  
該単離ポリヌクレオチドに対して相補的なヌクレオチド配列よりなる群から選択される単離ポリヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1記載のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体。

【請求項4】 (i) 請求項1記載のポリペプチドの活性または発現の増強を必要とする対象の治療法であって、

(a) 治療上有効量の、該ポリペプチドに対するアゴニストを該対象に投与すること；および/または

(b) インビボにおいて該ポリペプチド活性の生成をもたらすような形態で該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを該対象に投与すること  
を含む方法；または

(ii) 請求項1記載のポリペプチドの活性または発現の阻害を必要とする対象の治療法であって、

(a) 治療上有効量の、該ポリペプチドに対するアンタゴニストを該対象に投与すること；および/または

(b) 該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子を該対象に投与すること；および/または

(c) 治療上有効量の、該ポリペプチドとそのリガンド、基質または受容体について競争するポリペプチドを該対象に投与すること

を含む方法。

【請求項5】 対象における請求項1記載のポリペプチドの発現または活性に関連した該対象における疾患または疾患に対する感受性を診断する方法であって、

(a) 該対象のゲノム中の該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列における変異の存在または不在を調べること；および/または

(b) 該対象由来の試料中の該ポリペプチド発現の存在または量を分析すること

を含む方法。

【請求項6】 請求項1記載のポリペプチドの機能を刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 候補化合物に直接または間接的に結合した標識を用いることによって該ポリペプチド（または該ポリペプチドを有する細胞もしくは膜）またはその融合タンパク質への候補化合物の結合を測定すること；

(b) 標識された競争物質の存在下において該ポリペプチド（または該ポリペプチドを有する細胞もしくは膜）またはその融合タンパク質への候補化合物の結合を測定すること；

(c) 該ポリペプチドを有する細胞または細胞膜に適した検出系を用いて、該ポリペプチドの活性化または阻害により発生するシグナルを候補化合物が発生させるか否かを調べること；

(d) 請求項1のポリペプチドを含有する溶液と候補化合物とを混合して混合物を得、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定し、該混合物の活性を標準と比較すること；または

(e) 例えばELISAアッセイを用いて、細胞中の該ポリペプチドをコードするmRNAおよび該ポリペプチドの生成に対する候補化合物の影響を検出すること

からなる群から選択される方法を含む方法。

【請求項7】 請求項1記載のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項8】 適合する宿主細胞中に存在する場合に請求項1記載のポリペプチドを生成しうるポリヌクレオチドを含む発現系。

【請求項9】 組換え宿主細胞の生成方法であって、該宿主細胞が適当な培養条件下で配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを生成するように請求項8記載の発現系で細胞を形質転換またはトランスフェクトすることを含む方法。

【請求項10】 請求項9記載の方法により生成された組換え宿主細胞。

【請求項11】 配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現する請求項10記載の組換え宿主細胞の膜。

【請求項12】 ポリペプチドを生成するのに十分な条件下にて請求項10記載の宿主細胞を培養し、該培養物から該ポリペプチドを回収することを含むポリペプチドの生成方法。

【請求項13】 (a) 配列番号5の全長にわたって配列番号5に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、97%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号5のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号5のポリヌクレオチド；または

(d) (a)、(b)または(c)のポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド

からなる群から選択される単離ポリヌクレオチド。

【請求項14】 (a) 配列番号1の全長にわたって配列番号1に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、97%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1のポリヌクレオチド；または

(d) (a)、(b)または(c)のポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド

からなる群から選択される単離ポリヌクレオチド。

【請求項15】 血球減少症の治療方法であって、かかる治療を必要とする患者に有効量のEPRG1阻害物質を投与することを含む方法。

【請求項16】 さらにサイトカインを共投与することを含む請求項16記載の方法。

【請求項17】 サイトカインがG-CSF、EPO、TPO、IL-11、IL-3、PEG-rHuMGDF、FLT-3、NESPまたはNEUPOGEN SDである請求項17記載の方法。

【請求項18】 配列番号6または7の配列を含むASOである請求項16のEPRG1阻害物質。

【請求項19】 ヒト造血前駆細胞/幹細胞をEPRG1の阻害物質で処理することにより造血幹細胞移植の有効性および移植を増強する方法であって、

(a) EPRG1阻害物質と造血前駆細胞および幹細胞を含む溶液とをエキソビボで混合し、次いで、かかる移植を必要とする患者に造血細胞を移植すること；または

(b) エキソビボ幹細胞増殖培養系にてEPRG1阻害物質と造血細胞を含む溶液とを混合し、次いで、該患者に造血細胞を移植すること；または

(c) 造血幹細胞移植のまたは血球減少症の治療の間の補助剤としてインビボでEPRG1阻害物質を投与することを含む方法。

【請求項20】 EPRG1阻害物質が配列番号6または7の配列を含むASOである請求項20記載の方法。

【請求項21】 造血幹細胞への遺伝子療法トランスファーの効力を増強する方法であって、(a) 造血幹細胞または修飾幹細胞系を単離すること；および(b) 遺伝病を治療するのに有用な目的の矯正遺伝子を含むプラスミドベクターでトランスフェクトする前にEPRG1阻害物質と一緒にインキュベートすることを含む方法。

【請求項22】 EPRG1阻害物質が配列番号6または7の配列を含むASOである請求項22記載の方法。

【請求項23】 配列番号6または7の配列を含むASO。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、新たに同定されたポリペプチドおよびかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、治療におけるそれらの使用および潜在的に治療に有用なアゴニスト、アンタゴニストおよび/または阻害物質である化合物の同定におけるそれらの使用、ならびにかかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドの生成に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

創薬プロセスは、現在、根本的な大変革が行われていおり、「機能ゲノム科学」、すなわち、高処理ゲノムベースまたは遺伝子ベース生物学を含むものとなっている。この方法は、急速に、「位置クローニング」に基づく初期の方法に取って代わりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝病を同定し、次いで、これをその遺伝子地図位置に基づいて原因遺伝子まで辿って戻る。

**【0003】**

機能ゲノム科学は、現在利用可能な多くの分子生物学データから目的のものである可能性のある遺伝子配列を同定するために生命情報科学の種々の手段に非常に頼っている。創薬の標的としてのさらなる遺伝子およびそれらの関連ポリペプチド/タンパク質の同定および特徴付けがなおも必要とされて続けている。

**【0004】**

EPRG1 (SOCS-3) は、増殖のためにEPOを必要とするヒト造血細胞系から単離された。EPRG1の発現は、EPOにより誘発され、その発現の維持にはEPOの存在が必要とされる。EPRG1は、EPO依存性細胞の増殖に関与しており、赤血球系列および他の造血系列の増殖および発生において重要である。EPRG1の発現は、G-CSFで処理されたヒト骨髄中で高レベルに誘発され、胎児肝臓、末梢血白血球、肺中で、およびEPOで刺激されたヒト骨髄中でもまた実質的なレベルのEPRG1が発現される。さらにまた、一次遺伝的応答を表すEPRG1の発現は、シクロヘキシミドの存在下、EPOにより、

およびTPOにより誘発される。一次応答遺伝子として、EPRG1の発現は、EPOまたはTPOとそれらの同族受容体との結合後のシグナル伝達経路の活性化の直接的結果である。これらのデータは、EPRG1が、貧血症、好中球減少症および血小板減少症を含む血球減少症（遺伝因子、骨髄抑制性癌化学療法、放射線療法または偶発的照射により引き起こされるものを含む）；赤血球増加症；癌；代謝性または遺伝性の成長不足；肥満症；免疫刺激による感染；ワクチン療法のアジュバント増強による感染症または癌；AIDS；薬剤誘発性貧血症；慢性関節リウマチ、糖尿病、多発性硬化症のような自己免疫疾患；ならびに喘息およびアレルギーのような炎症性疾患を包含するがそれらに限定されない機能障害または疾患を予防、緩解または矯正するのに有用であることを示している。

#### 【0005】

（発明の概要）

本発明は、EPRG1、特に、EPRG1ポリペプチドおよびEPRG1ポリヌクレオチド、組換え体ならびにそれらの生成方法に関する。別の態様において、本発明は、特に、貧血症、好中球減少症および血小板減少症を含む血球減少症（遺伝因子、骨髄抑制性癌化学療法、放射線治療または偶発的照射により引き起こされるものを含む）；赤血球増加症；癌；代謝性または遺伝性の成長不足；肥満症；免疫刺激による感染；ワクチン療法のアジュバント増強による感染症または癌；AIDS；薬物誘発性貧血症；慢性関節リウマチ、糖尿病、多発性硬化症のような自己免疫疾患；ならびに喘息およびアレルギーのような炎症性疾患（以下、「当該疾患」と記す）の治療または予防を含む、かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いる方法に関する。さらなる態様において、本発明は、本発明によって得られる物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニスト/阻害物質を同定し、同定された化合物を用いてEPRG1不均衡に伴う症状を治療する方法に関する。さらなる態様において、本発明は、不適当なEPRG1活性またはレベルに伴う疾患を検出するための診断アッセイに関する。

#### 【0006】

（発明の記載）

第1の態様において、本発明は、EPRG1ポリペプチドに関する。かかるペ

プチドは、配列番号2の全長にわたって配列番号2のものに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、最も好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを包含する。かかるポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含むものを包含する。

【0007】

本発明のさらなるペプチドは、アミノ酸配列が配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、最も好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有する単離ポリペプチドを包含する。かかるポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドを包含する。

【0008】

本発明のさらなるペプチドは、配列番号1に含まれる配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる単離ポリペプチドを包含する。

【0009】

本発明のEPRG1ポリペプチドは、また、配列番号4の全長にわたって配列番号4のものに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、最も好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを包含する。かかるポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸を含むポリペプチドを包含する。

【0010】

本発明のさらなるペプチドは、アミノ酸配列が配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、最も好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有する単離ポリペプチドを包含する。かかるポリペプチドは、配列番号

4のポリペプチドを包含する。

【0011】

本発明のさらなるペプチドは、配列番号3に含まれる配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる単離ポリペプチドを包含する。

【0012】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドのSOCSファミリーのメンバーであると考えられる。したがって、このファミリー中の遺伝子は、細胞増殖および分化因子からのシグナル伝達経路の活性化を調節するので、本発明のポリペプチドは、目的のものである。これらの特性を、以下、「EPRG1活性」または「EPRG1ポリペプチド活性」または「EPRG1の生物活性」と記す。また、これらの活性としては、EPRG1ポリペプチドの抗原性活性および免疫原性活性、特に、配列番号2または4のポリペプチドの抗原性活性および免疫原性活性が挙げられる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの、EPRG1の生物活性を示す。

【0013】

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よく、または、融合タンパク質のような大きいタンパク質の一部であってもよい。分泌もしくはリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製を助ける配列、または組換え体生成の間の安定性のための付加配列を含む付加アミノ酸配列を包含するのが好都合な場合がある。

【0014】

本発明は、また、上記ポリペプチドの変種、すなわち、残基が類似の特徴を有する別の残基によって置換される保存的アミノ酸置換により対照と異なるポリペプチドを包含する。典型的なかかる置換は、Ala、Val、LeuおよびIleの間のもの；SerおよびThrの間のもの；酸性残基AspおよびGluの間のもの；AsnおよびGlnの間のもの；塩基性残基LysおよびArgの間のもの；芳香族残基PheおよびTyrの間のものである。数個、5～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸がいずれかの組合せで置換、欠失、または付加されている変種が特に好ましい。

## 【0015】

本発明のポリペプチドは、いずれもの適当な方法で調製することができる。かかるポリペプチドは、単離された自然発生のポリペプチド、組換えにより生成されたポリペプチド、合成により生成されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより生成されたポリペプチドを包含する。かかるポリペプチドの調製手段は、当該技術分野においてよく理解されている。

## 【0016】

さらなる態様において、本発明は、EPRG1ポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドは、配列番号2の全長にわたって配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを包含する。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリペプチドは非常に好ましく、少なくとも98~99%の同一性を有するものはさらに好ましく、少なくとも99%の同一性を有するものは最も好ましい。かかるポリヌクレオチドは、配列番号2のポリペプチドをコードする配列番号1に含まれるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

## 【0017】

本発明のさらなるポリヌクレオチドは、全コード領域にわたって配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを包含する。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドは非常に好ましく、少なくとも98~99%の同一性を有するものはさらに好ましく、少なくとも99%の同一性を有するものは最も好ましい。

## 【0018】

本発明のさらなるポリヌクレオチドは、配列番号1の全長にわたって配列番号1に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性

、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを包含する。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドは非常に好ましく、少なくとも98~99%の同一性を有するものはさらに好ましく、少なくとも99%の同一性を有するものは最も好ましい。かかるポリヌクレオチドは、配列番号1のポリヌクレオチドだけでなく配列番号1のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも包含する。

【0019】

本発明は、また、上記ポリヌクレオチドの全てに対して相補的なポリヌクレオチドをも提供する。

【0020】

配列番号1のヌクレオチド配列は、cDNA配列であり、配列番号2のポリペプチドである225アミノ酸のポリペプチドをコードするポリペプチドコード配列(ヌクレオチド28から705)を含む。配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に含まれるポリペプチドコード配列と同一であってもよく、または、遺伝暗号の重複性(縮重)の結果として配列番号2のポリペプチドをコードする、配列番号1に含まれる配列以外の配列であってもよい。本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、とりわけ、相同ポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物機能/特性を有すると考えられる。さらにまた、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1つのEPRG1活性を有する。

【0021】

本発明は、また、配列番号1および配列番号2の対応する全長配列の決定前にまず同定された部分または他のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列に関する。

【0022】

したがって、さらなる態様において、本発明は、

(a) 配列番号5の全長にわたって配列番号5に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも9

0%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、さらにまた好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号5の全長にわたって配列番号5に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、さらにまた好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号5のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号5のポリヌクレオチド；または

(e) (a)、(b)、(c)または(d)のポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0023】

さらなる態様において、本発明は、

(a) 配列番号3の全長にわたって配列番号3に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号3のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号3のポリヌクレオチド；または

(e) (a)、(b)、(c)または(d)のポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド

を提供する。

【0024】

本発明は、また、配列番号3に含まれる配列を含むポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに加えて、

(a) 配列番号4の全長にわたって配列番号4のものに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 配列番号4の全長にわたって配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

(d) 配列番号4のポリペプチドであるポリペプチド

を提供する。

【0025】

配列番号5のヌクレオチド配列は、EST(発現遺伝子配列タグ)配列に由来する。必然的に、EST配列においていくつかのヌクレオチド配列誤読があるということは当業者によって認識されている(Adams, M. D. et al., Nature 377 (supp) 3, 1995 を参照のこと)。したがって、配列番号5のヌクレオチド配列は、配列精度において同様の固有の制限を受ける。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドは、発現遺伝子配列タグ(EST)分析を用い、ヒト骨髄細胞および造血細胞のmRNAに由来するcDNAライブラリーから標準的なクローニングおよびスクリーニング技法を用いて得ることができる(Adams, M. D., et al., Science (1991) 252:1651-1656; Adams M. D. et al., Nature, (1992) 355:632-634; Adams, M. D., et al., Nature (1995) 377 Supp:3-174

)。本発明のポリヌクレオチドは、また、ゲノムDNAライブラリーのような天然源から得ることもでき、または、周知および市販の技法を用いて合成することもできる。

#### 【0027】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え体生成に用いる場合、該ポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドのコード配列自体；またはリーダーもしくは分泌配列、プレ-もしくはプロ-もしくはプレプロ-タンパク質配列または他の融合ペプチド部分をコードするコード配列のような他のコード配列を有する読み枠中の成熟ポリペプチドのコード配列を包含することができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のこの態様のある種の好ましい実施態様において、マーカー配列は、pQEベクター（キアジェン，インコーポレイテッド（Qiagen, Inc.））において提供され、かつ、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824 に開示されるような、ヘキサ-ヒスチジンペプチドであるか、または、HAタグである。該ポリヌクレオチドは、また、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNAを安定化する配列などの非コード5'および3'配列をも含む。

#### 【0028】

本発明のさらなる実施態様は、配列番号2または4のアミノ酸配列を含み、数個、例えば、5～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸残基がいずれかの組合せで置換、欠失または付加されているポリペプチド変種をコードするポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0029】

配列番号1、3または5に含有されるヌクレオチド配列に対して同一または十分に同一であるポリヌクレオチドを、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして、または、核酸増幅（PCR）反応に対するプライマーとして用いて、本発明のポリペプチドをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンを単離することができ、配列番号1、3または5に対して高い配列類似性を有する他の遺伝子（ヒト以外の種由来のホモログおよびオルソログ

をコードする遺伝子を包含する)のcDNAおよびゲノムクローンを単離することができる。典型的には、これらのヌクレオチド配列は、対照のものに対して、70%同一であり、好ましくは、80%同一であり、より好ましくは、90%同一であり、最も好ましくは、95%同一である。プローブまたはプライマーは、一般に、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは、少なくとも30ヌクレオチドを含んでおり、少なくとも50ヌクレオチドを有することもある。特に好ましいプローブは、30~50ヌクレオチドを有する。

#### 【0030】

ヒト以外の種由来のホモログおよびオルソログを包含する本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1、3または5の配列またはそのフラグメントを有する標識プローブを用いてストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングする工程；ならびに該ポリヌクレオチド配列を含有する全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する工程を含む方法により得ることができる。かかるハイブリダイゼーション技法は、当業者によく知られている。好ましいストリンジェンハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、および20 $\mu$ g/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて42 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートすること；次いで、約65 $^{\circ}$ Cで0.1xSSCでフィルターを洗浄することを包含する。かくして、本発明は、また、配列番号1、3または5の配列またはそのフラグメントを有する標識プローブを用いてストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができるポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0031】

当業者は、多くの場合、単離cDNA配列は、該ポリペプチドをコードする領域がcDNAの5'末端で中断されるという点で不完全であるということを知っている。これは、第1鎖cDNA合成の間にmRNA鋳型のDNAコピーを完成しない、本質的に低い「プロセシビティ(processivity)」(酵素の、重合反

応の間じゅう鋳型に結合したままである能力の尺度)を有する酵素であるリバー  
ストランスクリプターゼの結果である。

#### 【0032】

全長cDNAを得るのにまたは短いcDNAを伸長させるのに利用可能で当業  
者によく知られているいくつかの方法があり、例えば、cDNA末端の高速増幅  
(RACE)法(例えば、Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1988を参  
照のこと)に基づく方法がある。Marathon™法(クローンテック・ラボ  
ラトリーズ・インコーポレイテッド(Clontech Laboratories Inc.))により例  
示される技法の最近の変法は、例えば、長いcDNAの検索を有意に簡単にした  
。Marathon™法において、cDNAは、選択組織から抽出されたmR  
NAから調製され、各末端に「アダプター」配列が連結される。次いで、遺伝子  
特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用  
いて核酸増幅(PCR)を行ってcDNAの「失われている」5'末端を増幅す  
る。次いで、「ネステッド」プライマー、すなわち、増幅生成物の範囲内にアニ  
ールするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列中のさらな  
る3'にアニールするアダプター特異的プライマーおよび既知の遺伝子配列中の  
さらなる5'にアニールする遺伝子特異的プライマー)を用いてPCR反応を繰  
り返す。次いで、この反応の生成物をDNA配列決定によって分析し、次いで、  
存在しているcDNAに該生成物を直接結合して完全配列を得ること、または5  
'プライマーの設計に関する新しい配列情報を用いて別個の全長PCRを行うこ  
とによって全長cDNAを構築することができる。

#### 【0033】

本発明の組換えポリペプチドは、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から  
当該技術分野でよく知られている方法によって調製することができる。したがっ  
て、さらなる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチド(複数も可)  
を含む発現系、かかる発現系を用いて遺伝子操作される宿主細胞、および組換え  
技法による本発明のポリペプチドの生成に関する。また、無細胞翻訳系を用い、  
本発明のDNA構築物由来のRNAを用いてかかるタンパク質を生成することも  
できる。

## 【0034】

組換え体生成について、宿主細胞を遺伝子操作して、本発明のポリヌクレオチドに対して発現系またはその一部を取込むことができる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) 中のおよび Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) などの多くの標準研究室マニュアルに開示されている方法によって行うことができる。好ましいかかる方法としては、例えば、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、トランスベクション、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、トランスダクション、スクレープ・ローディング、弾道的導入または感染が挙げられる。

## 【0035】

適当な宿主の代表例としては、連鎖球菌 (streptococci)、ブドウ球菌 (staphylococci)、イー・コリ (E. coli)、ストレプトマイセス (Streptomyces) およびバシラス・サチリス (Bacillus subtilis) 細胞；真菌細胞、例えば、酵母細胞およびアスペルギルス (Aspergillus) 細胞；昆虫細胞、例えば、ドロソフィラ (Drosophila) S2 およびスポドプテラ (Spodoptera) Sf9 細胞；動物細胞、例えば、CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293 およびボウエス (Bowes) メラノーマ細胞；ならびに植物細胞が挙げられる。

## 【0036】

例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、バキュロウイルス、パポバウイルス (例えば、SV40)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルス由来のベクター、ならびに、コスミドおよびファージミドのようなプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝因子由来のベクターのようなそれらの組合せに由来するベクター

などの非常に多様な発現系を用いることができる。該発現系は、発現を引き起こすだけでなく調節もする調節領域を含んでいてもよい。一般に、宿主においてポリヌクレオチドを維持、増幅または発現してポリペプチドを生成することができる系またはベクターを用いることができる。適当なヌクレオチド配列は、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (上掲) に示される技法のような種々のよく知られている慣用的な技法のいずれかによって発現系に挿入することができる。適当な分泌シグナルを所望のポリペプチドに取込ませて翻訳タンパク質を小胞体内腔、周辺腔または細胞外環境に分泌させてもよい。これらのシグナルは、該ポリペプチドに内在していてもよく、または、それらは、異種シグナルであってもよい。

#### 【0037】

本発明のポリペプチドがスクリーニングアッセイにおける使用のために発現されるべきである場合、一般に、該ポリペプチドは、細胞の表面で生成されるのが好ましい。この場合には、該細胞を、スクリーニングアッセイでの使用の前に収穫することができる。該ポリペプチドが培地中に分泌される場合、該培地を回収してポリペプチドを回収および精製することができる。細胞内で生成される場合、ポリペプチドを回収する前にまず該細胞を溶解しなければならない。

#### 【0038】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまた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、疎水性相互反応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、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを包含するよく知られた方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーを精製に用いる。該ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性する場合、タンパク質を再生するのによく知られている技法を用いて、再び活性なコンフォメーションとすることができる。

#### 【0039】

本発明は、また、本発明のポリヌクレオチドの診断試薬としての使用に関する

。機能障害に関連する配列番号1、3または5のポリヌクレオチドにより特徴付けられる遺伝子の変異型の検出は、遺伝子の過少発現、過剰発現または変化した発現により引き起こされる疾患または疾患に対する感受性の診断に付加することができるかまたは該診断を定義することができる診断手段を提供する。該遺伝子において変異を有する個体を、種々の技法によりDNAレベルで検出することができる。本発明は、また、配列番号1、3または5のものと比べた個体におけるEPRG1ポリヌクレオチドの変化の存在または不在を検出する方法であって、該個体から得られた試料に含まれるEPRG1ポリヌクレオチド配列を、各々、配列番号1、3または5のものと比較する工程を含む方法を意図する。

#### 【0040】

診断用核酸は、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料などからの対象の細胞から得られる。ゲノムDNAを検出に直接用いてもよく、または、分析前にPCRもしくは他の増幅技法を用いることにより酵素的に増幅することができる。RNAまたはcDNAもまた同様に用いることができる。正常な遺伝子型と比較して増幅生成物のサイズの変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを標識EPRG1ヌクレオチド配列とハイブリダイズすることによって点突然変異を同定することができる。RNase消化によって、または融解温度の差異によって、完全に適合した配列をミスマッチ二重鎖と区別することができる。変性剤を用いるかもしくは用いずにゲル中でのDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、または、直接DNA配列決定によって、DNA配列差異もまた検出することができる(例えば、Myers et al., Science (1985) 230:1242を参照のこと)。また、RNaseおよびS1保護または化学的開裂法などのヌクレアーゼ保護アッセイによって特定位置での配列変化を明らかにすることもできる(Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401を参照のこと)。別の実施態様において、EPRG1ヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば、遺伝的変異の有効なスクリーニングを行うことができる。アレイ技法は、よく知られており、一般的な適応性を有しており、遺伝子発現、遺伝連鎖、および遺伝的可変性を包含する分子遺伝学における種々の問題と取り組むために用いる

ことができる（例えば、M. Chee et al., Science, Vol. 274, pp. 610-613 (1996) を参照のこと）。

#### 【0041】

診断アッセイは、記載した方法によりEPRG1遺伝子における変異の検出により当該疾患を診断するかまたは当該疾患に対する感受性を判定する方法を提供する。さらに、かかる疾患は、対象体由来の試料からポリペプチドまたはmRNAのレベルの異常な減少または増加を判定することを含む方法によって診断することができる。発現の減少または増加は、例えば、核酸増幅、例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザンブロットングおよび他のハイブリダイゼーション法などのポリヌクレオチドの定量化について当該技術分野でよく知られている方法のいずれかを用いてRNAレベルで測定することができる。宿主由来の試料において本発明のポリペプチドのようなタンパク質のレベルを決定するのに用いることができるアッセイ技法は、当業者によく知られている。かかるアッセイ法は、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析法およびELISAアッセイが挙げられる。

#### 【0042】

かくして、別の態様において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号1、3または5のヌクレオチド配列、またはそのフラグメント；

(b) (a)のものに対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号2または4のポリペプチド、またはそのフラグメント；または

(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、好ましくは、配列番号2または4のポリペプチドに対する抗体を含む診断キットに関する。

#### 【0043】

いずれものかかるキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)が実質的な成分を含んでいてもよいことが理解されるであろう。かかるキットは、疾患、特に、とりわけ、貧血症、好中球減少症および血小板減少症を含む血球減少

症（遺伝因子、骨髄抑制性癌化学療法、放射線療法または偶発的照射により引き起こされるものを含む）；赤血球増加症；癌；代謝性または遺伝性の成長不足；肥満症；免疫刺激による感染；ワクチン療法のアジュバント増強による感染症または癌；A I D S；薬剤誘発性貧血症；慢性関節リウマチ、糖尿病、多発性硬化症のような自己免疫疾患；ならびに喘息およびアレルギーのような炎症性疾患、または該疾患に対する感受性を診断するのに有用であろう。

#### 【0044】

本発明のヌクレオチド配列は、また、染色体同定にも役立つ。該配列は、個々のヒト染色体上の特定の部位を特異的に標的とし、該部位とハイブリダイズすることができる。本発明の染色体に関連した配列のマッピングは、これらの配列を遺伝子関連疾患と関連付けるのに重要な第1段階である。いったん配列を正確な染色体位置にマッピングすれば、染色体上の配列の物理的位置を遺伝地図データと関連付けることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick、Mendelian Inheritance in Man（ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ・ウェルチ・メディカル・ライブラリー（Johns Hopkins University Welch Medical Library）によりオンラインにて入手可能）において見出される。次いで、連鎖分析（物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝）により同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関係を同定する。

#### 【0045】

罹患している個体と罹患していない個体との間のcDNAまたはゲノム配列の差異もまた決定することができる。罹患している個体のいくつかまたは全てにおいて変異が観察されるが、正常な個体においては該変異が観察されない場合、該変異は、疾患の原因因子である可能性がある。

#### 【0046】

本発明のポリペプチドまたはそれらのフラグメントまたはそのアナログ、またはそれらを発現する細胞もまた、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を生成するための免疫原として用いることができる。「免疫特異的」なる用語は、抗体が、本発明のポリペプチドに対する方が先行技術における他の関連ポリペプチドに対するよりも実質的に大きい親和性を有することを意味する。

## 【0047】

本発明のポリペプチドに対して生じる抗体は、慣用のプロトコールを用いて、ポリペプチドまたはエピトープ含有フラグメント、アナログまたは細胞を、動物、好ましくは、非ヒト動物に投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の調製のためには、連続的な細胞系培養により生成される抗体を提供する技法を用いることができる。例としては、ハイブリドーマ法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497)、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) および E B V - ハイブリドーマ技法 (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) が挙げられる。

## 【0048】

米国特許第4,946,778号に開示されているような一本鎖抗体を生成するための技法を用いて、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を生成することもできる。また、トランスジェニックマウス、または他の哺乳動物を包含する他の生物を用いてヒト化抗体を発現することもできる。

## 【0049】

上記抗体を用いて、該ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定するか、または、アフィニティークロマトグラフィーにより該ポリペプチドを精製することができる。

## 【0050】

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、とりわけ、当該疾患を治療することもできる。

## 【0051】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、および種々のサブクラスの免疫グロブリン (I g G、I g M、I g A、I g E) の重鎖または軽鎖の定常部の種々の部分を含む遺伝子操作した可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとしては、ヒトI g G、特に、I g G 1の重鎖の定常部が好ましく、この場合、融合はヒンジ部で生じる。特定の実施態様において、血液凝固因子X aを用いて開裂することができる開裂配列を取込むこ

とによりFc部分を簡単に除去することができる。さらにまた、本発明は、遺伝子操作によるこれらの融合タンパク質の生成方法、ならびに薬物スクリーニング、診断および治療のためのその使用に関する。本発明のさらなる態様は、また、かかる融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は、国際特許出願公開W094/29458およびW094/22914にて見出すことができる。

#### 【0052】

本発明の別の態様は、哺乳動物における免疫学的応答の誘発方法であって、該哺乳動物に抗体および/またはT細胞免疫応答を生成するのに適当な本発明のポリペプチドを接種して該動物をとりわけ上記した当該疾患から保護することを含む方法に関する。さらに、本発明の別の態様は、哺乳動物における免疫学的応答の誘発方法であって、ポリヌクレオチドの発現を指向するベクターにより本発明のポリペプチドをデリバリーし、インビボで該ポリペプチドをコードし、抗体を生じさせるような免疫学的応答を誘発して該動物を疾患から保護することを含む方法に関する。

#### 【0053】

本発明のさらなる態様は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、哺乳動物宿主に導入した場合に該哺乳動物において本発明のポリペプチドに対する免疫学的応答を誘発する免疫学的/ワクチン処方物(組成物)に関する。該ワクチン処方物は、さらに、適当な担体を含んでもよい。ポリペプチドは、胃で破壊されうるので、好ましくは、非経口投与される(例えば、皮下注射、筋肉注射、静脈注射、または皮内注射)。非経口投与に適した処方物は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および該処方物をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有してもよい水性および非水性滅菌注射溶液;ならびに懸濁化剤または増粘剤を含有していてもよい水性および非水性滅菌懸濁剤を包含する。該処方物は、単位投与または複数投与用容器、例えば、密封されたアンプルおよびバイアル中にて提供され、使用直前に滅菌液体担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態で貯蔵することができる。該ワクチン処方物は、また、水中油系および当該技術分野で知られている他の系のような該処方物の免疫原性を増強するためのアジュバント系を

含んでもよい。投与量は、ワクチンの比活性に依存し、慣用的な実験法により容易に決定することができる。

#### 【0054】

本発明のポリペプチドは、多くの生物学的機能に関与しており、該機能には多くの病態、詳細には上記した当該疾患が包含される。それゆえ、当該ポリペプチドの機能を刺激する化合物または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング法を工夫することが望ましい。したがって、さらなる態様において、本発明は、当該ポリペプチドの機能を刺激する化合物または阻害する化合物を同定するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。一般的には、アゴニストまたはアンタゴニストを上記した当該疾患の治療目的および予防目的に用いてもよい。種々の源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリーおよび天然産物の混合物から化合物を同定できる。そのようにして同定されたかかるアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害物質は、場合によっては当該ポリペプチドの、天然または修飾基質、リガンド、受容体、酵素などであってもよく、またはそれらの構造上または機能上の模倣物であってもよい (Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991) を参照のこと)。

#### 【0055】

スクリーニング法は、単に、候補化合物の、当該ポリペプチドへの、または当該ポリペプチドを有する細胞もしくは膜またはその融合タンパク質への結合を、該候補化合物に直接的または間接的に結合した標識により測定するものであってもよい。別法として、スクリーニング法は標識競争物質との競争を用いるものであってもよい。さらに、これらのスクリーニング法は、当該ポリペプチド有する細胞に適した検出系を用いて、当該ポリペプチドの活性化または阻害により生じるシグナルを候補化合物が引き起こすかどうかを試験するものであってもよい。一般的には、既知アゴニストの存在下で活性化の阻害物質をアッセイし、次いで、候補化合物の存在による、アゴニストによる活性化に対する効果を観察する。候補化合物が本質的に活性なポリペプチドの活性化の阻害を引き起こすかどうかを試験することにより、本質的に活性なポリペプチドを、アゴニストまたは阻害物質の不在下で反アゴニストまたは反阻害物質を探すスクリーニング法に用いて

もよい。さらに、スクリーニング法は、単に、候補化合物と本発明のポリペプチドを含有する溶液とを混合して混合物を形成し、混合物中のEPRG1活性を測定し、次いで、混合物のEPRG1活性を標準と比較する工程を含むことができる。上記したFc部分およびEPRG1ポリペプチドから調製されるような融合タンパク質を高処理量スクリーニングアッセイのために用いて本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定することもできる(D. Bennett et al., J. Mol. Recognition, 8:52-58 (1995); および K. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270(16):9459-9471 (1995) を参照のこと)。

#### 【0056】

SH2ドメインとホスホチロシンペプチドとの相関関係は、所定のSH2ドメインおよびその特定のペプチド基質に対して非常に特異的である。ELISAまたは会合の検出に適切な他の手段を用いてインビトロ高処理量スクリーンを形成するためにこの複合体の形成を基準として用いることができる。

#### 【0057】

当該ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、細胞中のmRNAおよび/またはポリペプチドの生成に対する添加化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を組み立ててもよい。例えば、当該技術分野において知られている標準的な方法によりモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌または細胞結合レベルを測定するためにELISAアッセイを構築してもよい。これを用いて、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの生成を阻害しうる作用剤または促進しうる作用剤(各々、アンタゴニストまたはアゴニストという)を見いだすことができる。

#### 【0058】

当該技術分野において知られている標準的な受容体結合法によっても、当該ポリペプチドを用いて膜結合または可溶性受容体を同定することができる。これらの方法としては、ポリペプチドを放射性同位体(例えば、<sup>125</sup>I)で標識するか、化学修飾(例えば、ビオチン化)するか、または検出もしくは精製に適したペプチド配列に融合され、推定上の受容体の源(例えば、細胞、細胞膜、細

胞上清、組織抽出物、体液)とともにインキュベートする、リガンド結合および架橋アッセイが挙げられるが、それに限られるものではない。他の方法としては、表面プラズモン共鳴および分光分析法が挙げられる。これらのスクリーニング方法を用いて、ポリペプチドのその受容体への結合と競争するポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストがあったとしてもそれを同定することができる。かかるアッセイを行うための標準的方法は当該技術分野においてよく理解されている。

#### 【0059】

潜在的なポリペプチドアンタゴニストの例としては、抗体、または、ある場合には、場合によっては該ポリペプチドの、リガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関係するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、例えば、該リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント；または、本発明のポリペプチドに結合するが応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性を阻害することとなる小分子が挙げられる。

#### 【0060】

アンタゴニストの定義には、配列番号6および7の配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)が包含される。

(アンチセンス)                    gaCCATGGCGCACGGAGccA    (配列番号6)

(アンチセンス)                    gcTGTGGGTGACCATGGcgC    (配列番号7)

小文字のヌクレオチド塩基は、3'-ホスホロチオエート結合を示している。

#### 【0061】

かくして、別の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など；またはかかるポリペプチドの生成を低下させるかまたは増強する化合物を同定するためのスクリーニングキットであって、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体

を含み、該ポリペプチドが好ましくは配列番号2または4のものであるキットに関する。

いずれものかかるキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)が実質的な成分を含んでいてもよいことが理解されるであろう。

#### 【0062】

また、

(a) まず第1に、該ポリペプチドの三次元構造を決定すること；

(b) アゴニスト、アンタゴニストまたは阻害物質の反応部位または結合部位と考えられる部位について三次元構造を推定すること；

(c) 推定された結合部位または反応部位と結合または反応すると予想される候補化合物を合成すること；および

(d) 候補化合物が、実際に、アゴニスト、アンタゴニストまたは阻害物質であるか否かを試験すること

により、該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害物質の構造に基づく設計のための方法においても本発明のポリペプチドを用いることができることは、当業者に容易に理解されるであろう。さらに、これは、通常、相互に作用するプロセスであることが理解されるであろう。

#### 【0063】

さらなる態様において、本発明は、EPRG1ポリペプチド活性の過剰発現または過少発現のいずれかに関係する、例えば、貧血症、好中球減少症および血小板減少症を含む血球減少症（遺伝因子、骨髄抑制性癌化学療法、放射線療法または偶発的照射により引き起こされるものを含む）；赤血球増加症；癌；代謝性または遺伝性の成長不足；肥満症；免疫刺激による感染；ワクチン療法のアジュバント増強による感染症または癌；AIDS；薬剤誘発性貧血症；慢性関節リウマチ、糖尿病、多発性硬化症のような自己免疫疾患；ならびに喘息およびアレルギーのような炎症性疾患などの異常な状態の治療または予防方法を提供する。

#### 【0064】

ポリペプチドの活性が過剰である場合、いくつかの方法を用いることができる。一の方法は、例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などの結合をブロックす

ることまたは二次的シグナルを阻害することなどによりポリペプチドの機能を阻害するのに有効な量の上記阻害化合物（アンタゴニスト）を、所望により、医薬上許容される担体とともに、処置を必要とする対象体に投与し、そのことにより異常な症状を軽減することを含む。もう1つの方法において、やはり内在性ポリペプチドと競争してリガンド、基質、酵素、受容体などと結合する能力を有する可溶性形態のポリペプチドを投与してもよい。かかる競争物質の典型例としては、EPRG1ポリペプチドのフラグメントが挙げられる。

#### 【0065】

さらにもう1つの方法において、発現ブロッキング法を用いて内在性EPRG1ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害することができる。かかる既知方法の例は、体内で生じるかまたは別個に投与される、配列番号6または7の配列を含むアンチセンス配列のようなアンチセンス配列の使用を包含する（例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) 中の O'Connor, J. Neurochem (1991) 56:560 を参照のこと）。別法として、遺伝子療法に基づく方法を用いて、インビボで、直接、アンチセンスメッセージの生成のために発現カセットをデリバリーすることができる。該アンチセンスメッセージは、大きさおよび位置により有効性を最適化することができ、人工オリゴヌクレオチドに付随する毒性問題を回避することができる。さらに別の方法において、遺伝子とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを提供することができる（例えば、Lee et al., Nucleic Acid Res (1979) 6:3073 ; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Dervan et al., Science (1991) 251:1360 を参照のこと）。これらのオリゴマーをそれ自体投与することができるか、または関連するオリゴマーをインビボで発現させることもできる。

#### 【0066】

EPRG1は、フィードバック阻害物質として作用する負の調節因子である。EPRG1機能の阻害は、造血細胞の増殖および分化を増強する。結果として、幹細胞動員プロトコル後の骨髄、臍帯血または血液由来の造血前駆細胞/幹細胞のエキソビボ処理は、造血回復の有効性を改善すると考えられる。処理は、阻

害物質（例えば、オリゴヌクレオチド）摂取が生じ得る条件下、一定の期間、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）のようなEPRG1に対して特異的な阻害物質を造血細胞と一緒にインキュベートすることからなる。EPRG-1阻害物質処理した造血細胞を、幹細胞移植を必要としている患者に直接移植することができるか、または、移植前に前駆細胞/幹細胞の数を増加させるために1種類またはそれ以上の造血成長因子（例えば、G-CSF、EPO、TPO、IL-11、IL-3、PEG-rHuMGDF（ポリエチレングリコール結合組換えヒト巨核球成長および発達因子）、FLT-3、NESP（新規赤血球形成刺激タンパク質）、NEUPOGEN SDなど）を含有する増殖培地中でエキソピボで培養することができる。上記について、該阻害物質の一の特定の予想される使用は、血球減少症の治療のためのインピボ投与である。該血球減少症症状は、遺伝的であってもよく、または、骨髄抑制性癌化学療法、放射線療法または偶発的照射によるものであってもよい。EPRG-1の阻害物質のインピボ投与は、単独で、または最適にはサイトカイン療法（例えば、G-CSF、PEG-rHuMGDF、EPO、TPO、IL-11、IL-3、FLT-3、NESP、NEUPOGEN SDなど）と併用して有効である。

#### 【0067】

一の好ましい態様において、本発明は、EPRG1アンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。かかるアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、好ましくは、SOCS-3 mRNAと有効にハイブリダイズしてSOCS-3タンパク質生成を阻害するヌクレオチド配列を含む化学的に合成されたホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチド；およびヌクレアーゼ抵抗性を与えるように行われた他の骨格修飾を有するSOCS-3 mRNAとハイブリダイズすることができるいずれもの他のオリゴヌクレオチドが挙げられる。かかる化学的に合成されたホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチドの例は、配列番号6または7の配列を含む配列である。

#### 【0068】

他の好ましい態様において、本発明は、ヒト造血前駆細胞/幹細胞をEPRG1の阻害物質で処理することにより造血幹細胞移植の有効性および移植を増強す

る方法であって、

(a) E P R G 1 阻害物質と造血前駆細胞および幹細胞を含む溶液とをエキソビボで混合し、次いで、移植を必要とする患者に造血細胞を移植すること；または

(b) E P R G 1 阻害物質とエキソビボ幹細胞増殖培養系中に造血細胞を含む溶液とを混合し、次いで、該患者に造血細胞を移植すること；または

(c) 造血幹細胞移植のまたは血球減少症（例えば、化学療法誘発性の好中球減少症、貧血症、血小板減少症）の治療の間の補助剤としてインビボで E P R G 1 阻害物質を投与すること

を含む方法に関する。好ましい E P R G 1 阻害物質は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、配列番号 6 または 7 の配列を含む配列である。

#### 【0069】

別の態様において、本発明は、造血幹細胞への遺伝子療法トランスファーの効力を増強する方法であって、(a) 造血幹細胞または修飾幹細胞系を単離すること、および遺伝病の治療（例えば、ADA 欠損症遺伝子療法）に有用な目的の矯正遺伝子を含むプラスミドベクターでトランスフェクトする前に E P R G 1 阻害物質と一緒にインキュベートすることを含む方法に関する。好ましい E P R G 1 阻害物質は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、配列番号 6 または 7 の配列を含む配列である。

#### 【0070】

E P R G 1 およびその活性の過少発現に関する異常な症状を治療するために、いくつかの方法を用いることができる。一の方法は、治療上有効量の、本発明のポリペプチドを活性化する化合物（すなわち、上記アゴニスト）を、医薬上許容される担体とともに、対象体に投与し、そのことにより異常な症状を軽減することを含む。別法として、遺伝子療法を用いて、対象体において関連する細胞による E P R G 1 の内在生産を行うことができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドを、上記で検討したように、複製欠損レトロウイルスベクターにおける発現のために遺伝子操作することができる。次いで、レトロウイルス発現構築物を単離し、本発明のポリペプチドをコードするレトロウイルスプラスミドベクター含有

RNAで形質導入されたパッケージング細胞に導入し、その結果、パッケージング細胞は、すぐに目的の遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を生成する。これらのプロデューサー細胞は、インビボで細胞を遺伝子操作するために、およびインビボでポリペプチドを発現させるために、対象体に投与できる。遺伝子療法の概観については、Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) 中の Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (そこに引用されている文献)を参照のこと。別の方法は、治療上有効量の本発明のポリペプチドを適当な医薬担体と合わせて投与することである。

#### 【0071】

別の態様において、本発明は、治療上有効量の、ポリペプチド(例えば、本発明の可溶性形態のポリペプチド)、アゴニスト/アンタゴニストペプチドまたは小分子化合物を医薬上許容される担体または賦形剤と合わせて含む医薬組成物を提供する。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明は、また、上記した本発明の組成物の1種類またはそれ以上の成分を充填した1つまたはそれ以上の容器を含む医薬用パック剤およびキットに関する。本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独で用いても、または、治療用化合物のような他の化合物と併用してもよい。

#### 【0072】

当該組成物は、例えば、全身経路または経口経路によるような投与経路に適合させる。好ましい全身投与剤形としては、注射、典型的には、静脈注射による注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることができる。別の全身投与方法としては、胆汁酸塩もしくはフシジン酸のような浸透剤または他の界面活性剤を用いる経粘膜投与および経皮投与が挙げられる。さらに、本発明のポリペプチドまたは他の化合物を腸溶剤またはカプセル剤に処方することができる場合、経口投与もまた可能である。これらの化合物の投与は、また、軟膏剤、パスタ剤、ゲル剤などの形態で、局所的および/または局在的であ

ってもよい。

#### 【0073】

必要な投与範囲は、本発明のペプチドまたは他の化合物の選択、投与経路、処方物の性質、対象体の状態の性質、および主治医の判断に依存する。しかしながら、適当な投与量は、対象体の体重1kg当たり0.1~100μgの範囲である。しかしながら、必要な投与量の広範囲に及ぶ変化量は、入手可能な化合物の多様性および種々の投与経路の異なる効力の点から予想される。例えば、経口投与は、静脈注射による投与よりも高い投与量を必要とすると予想されるであろう。これらの投与量における変化量は、当該技術分野においてよく理解されているように、最適化のための標準的な経験的ルーチンを用いて調節することができる。

#### 【0074】

治療に用いるポリペプチドは、また、しばしば上記した「遺伝子療法」と称される治療様式で、対象体において内在的に得ることができる。かくして、例えば、対象体からの細胞を、ポリペプチドをエキソビボでコードするためにDNAまたはRNAのようなポリヌクレオチドを用いて、および、例えば、レトロウイルスプラスミドベクターの使用により、遺伝子操作することができる。次いで、該細胞を該対象体に導入する。

#### 【0075】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、同様のホモロジーを有するさらなる配列を同定するために役立つ情報源を形成する。これは、コンピューター判読可能な媒体中に該配列を保存し、次いで、保存したデータを用い、GCGのようなよく知られている検索ツールを用いて配列データベースを検索することにより、最も簡単に促進される。したがって、さらなる態様において、本発明は、配列番号1、3または5の配列を含むポリヌクレオチドおよび/またはそれによりコードされるポリペプチド配列を保存しているコンピューター判読可能媒体を提供する。

#### 【0076】

上記でよく用いたある種の用語の理解を容易にするために以下の定義を提供す

る。

【0077】

本明細書で用いる場合、「抗体」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖およびヒト化抗体、ならびにF a bまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を包含するF a bフラグメントを包含する。

【0078】

「単離」とは、「人間の手により」自然の状態から改変されたことを意味する。「単離」された組成物または物質が天然において生じる場合、その最初の環境から変えられているかもしくは取り除かれているか、またはその両方である。例えば、生きている動物中に自然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、その自然の状態の共存する物質から分取された同ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されており、本明細書ではこの用語を用いるものである。

【0079】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいい、それは未修飾RNAもしくはDNA、または修飾RNAもしくはDNAであってよい。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるRNA、一本鎖もしくはより典型的には二本鎖、または一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であってもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を包含するが、これに限定されるものではない。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAとの両方を含む三本鎖領域をいう。「ポリヌクレオチド」なる語はまた、1つまたはそれ以上の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由で修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを包含する。「修飾された」塩基は、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような通常でない塩基を包含する。種々の修飾がDNAおよびRNAに対してなされ得る；かくして、「ポリヌクレオチド」は、典型的には天然において見いだされるようなポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾さ

れた形態、ならびにウイルスおよび細胞の特性を示すDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。また、「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと称される比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

【0080】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合によりお互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドまたはタンパク質、すなわち、ペプチドアイソスターをいう。「ポリペプチド」は、通常、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短鎖と、一般に、タンパク質と称される長鎖との両方をいう。ポリペプチドは、遺伝子によりコードされている20種のアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセッシングのような自然のプロセス、または当該技術分野においてよく知られている化学的修飾技法のいずれかにより修飾されたアミノ酸配列を包含する。かかる修飾は、膨大な研究文献においてのみならず、基本テキストおよびさらに詳細な研究論文にて詳しく記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのどこでも起こり得る。同一の型の修飾が所定のポリペプチドの幾つかの部位で、同一または異なる程度に存在し得ることは理解されよう。また、所定のポリペプチドは多くの種類の修飾を含んでいてもよい。ポリペプチドはユビキチネーションの結果として分岐していてもよく、それらは、分岐しているかまたはしていない、環状であってもよい。環状の、分岐のおよび分岐した環状のポリペプチドは翻訳後の天然プロセスにより生じたものであってもよく、または合成法により調製されたものであってもよい。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル、共有架橋形成、シスチン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、糖鎖形成、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなアミノ酸のタンパク質

へのトランスファー - RNA 媒介付加、ならびにユビキチネーションが挙げられる (例えば、PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983 中の Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol (1990) 182:626-646 および Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62 を参照のこと)

。

#### 【0081】

「変種」なる語は、対照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、本質的な特性を保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを表す。典型的なポリヌクレオチドの変種は、ヌクレオチド配列が別の対照ポリヌクレオチドとは異なる。変種のヌクレオチド配列における変化は、対照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と変わっていてもよく、または変わっていなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下に記載するように、対照配列によりコードされるポリペプチドにおいてアミノ酸置換、付加、欠失、融合および末端切断をもたらす。典型的なポリペプチドの変種はアミノ酸配列が別の対照ポリペプチドとは異なる。一般に、差異は、対照ポリペプチドおよび変種の配列が、全体的に極めて類似しており、多くの領域で同一であるように制限される。変種および対照ポリペプチドは、アミノ酸配列が1またはそれ以上の置換、付加、欠失のいずれかの組み合わせにより異なってもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によりコードされたものであってもよく、またはそうでなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、対立遺伝子変種のような自然発生のものであってもよく、または自然に発生することが知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非自然発生変種は、変異誘発技術により、または直接的合成により調製できる

。

## 【0082】

「同一性」は、当該技術分野にて知られているように、場合によっては2つもしくはそれ以上のポリペプチド配列または2つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列を比較することにより決定される、その配列間の関係である。当該技術分野において、「同一性」はまた、場合によっては一連のかかる配列の鎖間の対合により決定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、以下の文献に記載されている方法を包含するがそれらに限定されない公知方法により容易に計算することができる(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. および Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988))。同一性を決定する方法は、試験される配列間で最大の対合が得られるように設計される。さらにまた、同一性を決定する方法は、公に利用可能なコンピュータープログラムに集成されている。2つの配列間の同一性を判定するためのコンピュータープログラム法としては、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403 - 410 (1990))が挙げられるが、それらに限定されるものではない。BLASTXプログラムは、NCBIおよび他の供給源(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990))から公に利用可能である。周知のスミス・ウォーターマン・アルゴリズム(Smith Waterman algorithm)を用いて同一性を決定してもよい。

## 【0083】

ポリペプチド配列比較のためのパラメーターは以下のものを包含する：

1) アルゴリズム : Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス : Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10915-10919 (1992) からの B L O S S U M 6 2

ギャップペナルティ : 1 2

ギャップ長ペナルティ : 4

これらのパラメーターに関して有用なプログラムは、ウィスコンシン州マディソンのジェネティクス・コンピューター・グループ (Genetics Computer Group) から「ギャップ」プログラムとして公に利用可能である。上記パラメーターは、ペプチド比較のためのデフォルトパラメーターである (エンドギャップについてペナルティを伴わない)。

#### 【0084】

ポリヌクレオチド比較のためのパラメーターは以下のものを包含する :

1) アルゴリズム : Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス : マッチ = + 1 0、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ : 5 0

ギャップ長ペナルティ : 3

ウィスコンシン州マディソンのジェネティクス・コンピューター・グループからの「ギャップ」プログラムが利用可能である。これらは核酸比較のためのデフォルトパラメーターである。

#### 【0085】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドについての「同一性」に関する好ましい意味は、場合によっては、下記(1)および(2)にて示される。

#### 【0086】

(1) さらに、ポリヌクレオチドの具体例は、配列番号1の対照配列に対して少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを包含し、該ポリヌクレオチド配列は、配列番号1の対照配列と同一であってもよく、または

対照配列と比較してある程度の数までのヌクレオチドの変化を有していてもよい。かかる変化は、少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換（トランジションおよびトランスバージョンを包含）または挿入からなる群より選択され、該変化は、対照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の位置、またはこれら末端位置の間の位置において、対照配列中のヌクレオチドにおいて個々に散在して、または対照配列中の1もしくはそれ以上の連続した群として生じてもよい。配列番号1中の全ヌクレオチド数に同一性パーセントを示す整数を100で割った値をかけて、その積を配列番号1中の全ヌクレオチド数から差し引くことによりヌクレオチド変化数を決定する。あるいはこのことは下式により説明される：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

式中、 $n_n$ は、ヌクレオチド変化の数であり、 $x_n$ は、配列番号1中の全ヌクレオチド数であり、 $y$ は、50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97、または100%については1.00であり、 $\cdot$ は、乗法演算についての記号であり、ここで、 $x_n$ と $y$ との整数でない積は切り捨てにより最も近い整数とした後、 $x_n$ から差し引く。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の変化は、このコード配列にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異をもたらす可能性があり、それにより、かかる変化の後のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドも変化する。

#### 【0087】

例えば、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号2の対照配列と同一であってもよく、すなわち、100%同一であってもよく、または対照配列と比較してある程度の数までのアミノ酸の変化を有していてもよい（その場合、同一性パーセントは100%未満の同一性である）。かかる変化は、少なくとも1個の核酸の欠失、置換（トランジションおよびトランスバージョンを包含）または挿入からなる群より選択され、該変化は対照ポリヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の位置またはこれら末端位置の間の位置において、対照配列中のヌクレオチドにおいて個々に散在して、または対照配列中の1またはそれ以上の連続した群

として生じてもよい。配列番号2中の全アミノ酸数に同一性パーセントを示す整数を100で割った値をかけて、その積を配列番号2中の全アミノ酸数から差し引くことにより所定の同一性パーセントについての核酸変化数を決定する。あるいはこのことは下式により説明される：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

式中、 $n_n$ は、アミノ酸変化の数であり、 $x_n$ は、配列番号2中の全アミノ酸数であり、 $y$ は、例えば、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85であり、 $\cdot$ は、乗法演算の記号であり、ここで、 $x_n$ と $y$ との整数でない積は切り捨てにより最も近い整数とした後、 $x_n$ から差し引く。

#### 【0088】

(2)さらに、ポリペプチドの具体例は、配列番号2のポリペプチド対照配列に対して少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリペプチド配列を含む単離ポリペプチドを包含し、該ポリペプチド配列は、配列番号2の対照配列と同一であってもよく、または対照配列と比較してある程度の数までのアミノ酸の変化を有していてもよい。かかる変化は、少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存的置換および非保存的置換を包含）または挿入からなる群より選択され、該変化は、対照ポリペプチド配列のアミノ - もしくはカルボキシ - 末端の位置、またはこれら末端位置の間の位置において、対照配列中のアミノ酸において個々に散在して、または対照配列中の1もしくはそれ以上の連続した群として生じてもよい。配列番号2中の全アミノ酸数に同一性パーセントを示す整数を100で割った値をかけて、その積を配列番号2中の全アミノ酸数から差し引くことによりアミノ酸変化数を決定する。あるいはこのことは下式により説明される：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

式中、 $n_a$ は、アミノ酸変化の数であり、 $x_a$ は、配列番号2中の全アミノ酸数であり、 $y$ は、50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97、または100%については1.00であり、 $\cdot$ は、乗法演算についての記号であり

、ここで、 $x_a$ と $y$ との整数でない積は切り捨てにより最も近い整数とした後、 $x_a$ から差し引く。

【0089】

例えば、本発明のポリペプチド配列は、配列番号2の対照配列と同一であってもよく、すなわち、100%同一であってもよく、または対照配列と比較してある程度の数までのアミノ酸の変化を有していてもよい(その場合、同一性パーセントは100%未満の同一性である)。かかる変化は、少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換(保存的置換および非保存的置換を包含)または挿入からなる群より選択され、該変化は対照ポリペプチド配列のアミノ-もしくはカルボキシ-末端の位置またはこれら末端位置の間の位置において、対照配列中のアミノ酸において個々に散在して、または対照配列中の1またはそれ以上の連続した群として生じてもよい。配列番号2中の全アミノ酸数に同一性パーセントを示す整数を100で割った値をかけて、その積を配列番号2中の全アミノ酸数から差し引くことにより所定の同一性パーセントについてのアミノ酸変化数を決定する。あるいはこのことは下式により説明される：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

式中、 $n_a$ は、アミノ酸変化の数であり、 $x_a$ は、配列番号2中の全アミノ酸数であり、 $y$ は、例えば、70%については0.70、80%については0.80、85%について0.85であり、 $\cdot$ は、乗法演算の記号であり、ここで、 $x_a$ と $y$ との整数でない積は切り捨てにより最も近い整数とした後、 $x_a$ から差し引く。

【0090】

「融合タンパク質」は、2種の、しばしば無関係の融合遺伝子またはそのフラグメントによりコードされたタンパク質をいう。一例において、EP-A-0464には、免疫グロブリン分子の定常部の種々の部分を別のヒトタンパク質またはその一部と一緒に含む融合タンパク質が開示されている。多くの場合、免疫グロブリンFc部分を融合タンパク質の一部として用いることは、治療および診断における使用に有利であり、例えば、改善された薬物動態学的特性が得られる[例えば、EP-A 0232 262を参照のこと]。他方、いくつかの用途には、融合タンパク質が発現、検出および精製された後、Fc部分を欠失できることが望ましいである

う。

【0091】

本明細書にて引用した特許および特許出願を包含するがこれらに限定されない全ての刊行物は、個々の刊行物が十分に開示されているかの如く具体的かつ個別の出典明示により本明細書の一部とすることが明示されているかのように出典明示により本明細書の一部とする。

【0092】

実施例1

UT7-EPO細胞のノーザンブロット上で、EPRG1が単一の2.4kbメッセージとして観察される。10%FBSおよびrh-EPOで補足した培地中で増殖している対数期細胞において低いレベルでEPRG1を検出することができる。一夜、EPOについて飢餓状態にすると、メッセージレベルは、検出可能なレベルに低下する。EPRG1は、EPO刺激により迅速に誘発され、1/2時間で容易に検出可能になり、約1時間で最大レベルに達する。細胞がEPOだけでなくFBSについても飢餓状態にされた場合は、多少高いレベルが得られる。次いで、EPRG1の発現は減少するが、少なくとも6時間は依然として上昇したままである。

【0093】

たとえタンパク質合成阻害物質であるシクロヘキシミドを単独で添加した場合にEPRG1の誘発がなくても、EPRG1は、シクロヘキシミドの存在下でEPOによって誘発される。EPO+シクロヘキシミドでの処理は、EPRG1メッセージレベルをEPO単独で得られるものよりもわずかに多く誘発させる。EPRG1は、また、ヒト巨核芽球性白血病細胞系であるMO7eおよびCMKにおいてTPOによっても誘発され、シクロヘキシミドの存在下で刺激された場合にはさらに誘発される。これらの観察結果は、EPRG1がEPOおよびTPO一次応答遺伝子であり、その発現の誘発が新しいタンパク質合成に依存しないことを示している。したがって、EPRG1発現の誘発は、EPOおよびTPOによるシグナル伝達経路の直接活性化により生じるはずである。

【0094】

ヒト骨髄において、EPRG1は、また、ノーザンブロット上で単一の2.4 kbメッセージとして発現される。それは、EPOでの処理によりインビトロ培養中で誘発されるが、発現は、G-CSFでの刺激により非常により強く誘発される。EPRG1の上昇した発現は、少なくとも7日間、培養中で該細胞により持続され、これは、EPRG1がおそらく種々の造血系列の発生および成熟において重要な機能を果たすことを示している。

#### 【0095】

EPRG1の発現は、他の組織由来のRNAを用いてノーザンブロットをプローブすることにより見出された。骨髄、胎児肝臓、末梢血白血球および肺を包含する造血関連組織において最高レベルが生じる。EPRG1は、また、脾臓および胸腺においてより低い程度に発現される。

#### 【0096】

RNA転写体(配列番号3のヌクレオチド#475-2111)の3'-UTRセグメントは、3'-UTRが遺伝子に固有であり、配列特異的であるので、診断目的に有用である。さらに、3'-UTRは、RNA安定性および代謝回転率を調節する薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイの開発において役立つ。該メッセージの定常状態レベルの低下は、細胞における翻訳タンパク質の量を減少させ、タンパク質の作用をアンタゴナイズする。SOC5ファミリーのメンバーは、増殖因子シグナル伝達の負の調節因子であるので、SOC5アンタゴニストは、増殖因子のアゴニストとして機能する。この結果を達成する一の方法は、EPRG1メッセージを減少または除去するためのアンチセンス技法による。RNA安定性の決定因子はしばしば3'-UTR配列に関連しているので、第二の手段は、EPRG1メッセージの代謝回転を支配する細胞メカニズムを調節することを含む。

#### 【0097】

##### 実施例2

EPRG1アンチセンスオリゴヌクレオチドの利用性を以下の実施例により例示する。無血清培地中でのヒト骨髄細胞と配列番号6および配列番号7のアンチセンス配向オリゴヌクレオチドとの(配列番号8のセンス配向オリゴヌクレオチ

ドと一緒にではない) 数時間のインキュベーションは、コロニー刺激因子の最適および最適下濃度に骨髄前駆細胞/幹細胞の応答性を増強させる。例えば、10 ng/mlのG-CSFの添加は、約40コロニー/ウェル(50,000骨髄細胞/ウェル)を生じる。配列番号8のEPRG1センスオリゴヌクレオチドと一緒にインキュベートした骨髄細胞は、平均約41コロニー/ウェルを生じた。対照的に、配列番号7のEPRG1アンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒にインキュベートした骨髄細胞は、平均約61コロニー/ウェルを生じた。

配列番号6 : gaCCATGGCGCACGGAGccA

配列番号7 : gcTGTGGGTGACCATGGcgC

配列番号8 : ccGTGCGCCATGGTCACccA

小文字のヌクレオチド塩基は、3'-ホスホロチオエート結合を示す。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Corporation

<120> EPO PRIMARY RESPONSE GENE 1 EPRG1

<130> GP70010-1

<140> Not yet Assigned

<141> herewith

<150> 09/422,153

<151> 1999-10-21

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2342

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> Unsure

<222> (2342)

<400> 1

```

cgcagatcca cgctggetcc gtgcgccatg gtcacccaca gcaagtttcc cgccgccggg 60
atgagccgcc ccctggacac cagcctgccc ctcaagacct tcagctccaa gagcgagtac 120
cagctgggtg tgaacgcagt gcgcaagctg caggagagcg gcttctactg gagcgcagtg 180
accggcggcg aggcgaacct gctgctcagt gccgagcccg ccggcacctt tctgatccgc 240
gacagctcgg accagegcca cttcttcacg ctcagcgtca agaccagtc tgggaccaag 300
aacctgcgca tccagtgatg ggggggcagc ttctctctgc agagcgatcc ccggagcacg 360
cagcccggtc cccgcttcga ctgcgtgctc aagctgggtc accactacat gccgccccct 420
ggagccccct ccttccccct gccacctact gaacctcctc ccgaggtgcc cgagcagccg 480
tctgcccagc cactccctgg gactcccccc agaagagcct attacatcta ctccgggggc 540
gagaagatcc ccctgggtgt gagccggccc ctctcctcca acgtggccac tcttcagcat 600
ctctgtcgga agaccgtcaa cggccacctg gactcctatg agaaagtcac ccagctgccc 660
gggcccattc gggagttcct ggaccagtac gatgccccgc ttaaggggt aaagggcgca 720

```

aagggcatgg gtcgggagag gggacgcagg ccctctcct ccgtggcaca tggcacaagc 780  
acaagaagcc aaccaggaga ggtcctgta gctctggggg gaacgagggc ggacaggccc 840  
ctccctctgc cctctccctg cagaatgtgg caggcggacc tggaatgtgt tggaggggaag 900  
ggggagtacc acctgagtct ccagcttctc cggaggagcc agctgtcctg gtgggacgat 960  
agcaaccaca agtggattct ccttcaatc ctcagcttcc cctctgcctc caaacagggg 1020  
acacttcggg aatgctgaac taatgagaac tggcaggaa tcttcaaact ttccaacgga 1080  
actgttttgc tctttgattt ggtttaaacc tgagctgggt gtggagcctg ggaaaggtgg 1140  
aagagagaga ggtcctgagg gccccagggc tgcgggctgg cgaaggaaat ggtcacaccc 1200  
cccgccacc ccaggcgagg atcctggtga catgctctc tccttggtc cggggagaag 1260  
ggcttggggg gacctgaagg gaaccatcct ggtgccccac atcctctcct cggggacagt 1320  
caccgaaaac acaggtcca aagtctacct ggtgcctgag agcccagggc ccttctctcg 1380  
ttttaagggg gaagcaacat ttggagggga tggatgggct ggtcagctgg tctccttttc 1440  
ctactcatac tataccttcc tgtacctggg tggatggggc gggaggatgg aggagacgga 1500  
catctttcac ctcaggctcc tggtagagaa gacaggggat tctactctgt gcctcctgac 1560  
tatgtctggc taagagattc gccttaaatg ctccctgtcc catggagagg gaccagcat 1620  
aggaaagcca catactcagc ctggatgggt ggagaggctg agggactcac tggagggcac 1680  
caagccagcc cacagccagg aagtggggag gggggggcga aacctatgcc tcccagctga 1740  
gcactgggaa tgctagccca gtaagtattg gccagtcagg cgcctcgtgg tcagagcaga 1800  
gccaccaggt cccactgcc cgagccctgc acagccctcc ctctgcctg ggtgggggag 1860  
gctggaagtc attgaaaag ctggactgct gccaccccg gtgctcccgc tctgccatag 1920  
cactgatcag tgacaattta caggaatgta gccagcgatg gaattacctg gaacagtttt 1980  
ttgtttttgt ttttgtttt gtttttggg gggggggcaa ctaaacaac acaaagtatt 2040  
ttgtgtcagg tattgggctg gacagggcac ttgtgtggtg ggggtggttt tttctctatt 2100  
ttttggtttg tttctgttt ttttaataatg tttacaatct gcctcaatca ctctgtcttt 2160  
tataaagatt ccacctcag tctctctcc tccccctac tcaggccctt gaggctatta 2220  
ggagatgctt gaagaactca acaaatccc aatccaagtc aaactttgca catatttata 2280  
tttatattca gaaaagaac atttcagtaa tttataataa agagcactat ttttttaac 2340

an

2342

<210> 2

<211> 225

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Val Thr His Ser Lys Phe Pro Ala Ala Gly Met Ser Arg Pro Leu  
1 5 10 15  
Asp Thr Ser Leu Arg Leu Lys Thr Phe Ser Ser Lys Ser Glu Tyr Gln  
20 25 30  
Leu Val Val Asn Ala Val Arg Lys Leu Gln Glu Ser Gly Phe Tyr Trp

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

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2111

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

```

gaattcgcca acagctcgga ccagcggcac ttctttcage tcagcgtcaa gaccagtcct 60
gggaccaaga acctgcgcat ccaatgtgag gggggcagct tctgtctgca gagcgatccc 120
cggaagacgc agcccgtgcc ccgcgtcgac tgcgtgctga agctgggtgca ccactacatg 180
ccgccccctg gagccccctc ctccccctcg ccacctactg aaccctcctc cgaggtgccc 240
gagcagccgt ctgcccagcc actcccctggg agtcccccca gaagagccta ttacatctac 300
tccggggggc agaagatccc cctgggtgtg agccggcccc tctcctccaa cgtggccact 360
cttcagcacc tctgtcggaa gaccgtcaac ggccacctgg actcctatga gaaagtcacc 420
cagctgccgg ggcccattcg ggagttcctg gaccagtaac atgccccgct ttaaggggta 480
aagggcgcaa agggcatggg tcgggagagg ggacgcaggg ccctctcctc cgtggccatc 540

```

```

ggcacaagca caagaagcca accaggagag agtcctgtag ctctgggggg aacgagggcg 600
gacaggcccc tccctctgcc ctctccctgc agaatgtggc aggcggacct ggaatgtggt 660
ggaggggaagg gggagtacca cctgagtctc cagcttctcc ggaggagcca gctgtcctgg 720
tgggacgata gcaaccacaa gtggattctc cttcaattcc tcagcttccc ctctgcctcc 780
aaacagggga cacttcggga atgctgaact aatgagaact gccaggggat cttcaaacct 840
tccaacggaa ctgtgttgct ctttgatttg gtttaaacct gagctggttg tggagcctgg 900
gaaaggtgga agagagagag gtccctgaggg ccccagggct gcgggctggc gaaggaaatg 960
gtcacacccc ccgccacccc caggcgagga tcctggtgac atgctcctct ccctggctcc 1020
ggggagaagg gcttggggty acctgaaggg aaccatcctg gtgccccaca tcctctctcc 1080
cgggacagtc accgaaaaca caggttccaa agtctacctg gtgcctgaga gcccagggcc 1140
cttctccgt ttaaggggg aagcaacatt tggaggggac ggatgggctg gtcagctggt 1200
ctcctttccc tactcatact ataccttccc gtacctgggt ggatggggcg ggaggatgga 1260
ggagacggga catctttcac ctcaggctcc tggtagagaa gacaggggat tctactctgt 1320
gcctcctgac tatgtctggc taagagattc gccttaaagc ctccctgtcc catggagagg 1380
gaccagcat aggaaagcca catactcagc ctggatgggt ggagaggctg agggactcac 1440
tggagggcac caagccagcc cacagccagg gaagtgggga gggggggcgg aaaccatgc 1500
ctcccagctg agcactggga atgtcagccc agtaagtatt ggccagtcag gcgctcgtg 1560
gtcagagcag agccaccagg tcccactgcc ccgagccctg cacagccctc cctcctgcct 1620
gggtggggga rgctggaagt cattggaaaa gctggactgc tgcacccccg ggtgctcccg 1680
ctctgccata gcaactgatc gtgacaatct acaggaatgt agccagcgt ggaattacct 1740
ggaacagttt tttgtttttg tttttgtttt tgtttttgtg ggggggggca actaaacaaa 1800
cacaaagtat tttgtgtcag gtattgggct ggacagggca cttgtgtgtt ggggtggttt 1860
ttttctctat tttttggtt gtttcttgtt ttttaataat gtttacaatc tgcctcaatc 1920
actctgtctt ttataaagat tccacctcca gtccctctc ccccccccta ctcagccct 1980
tgaggttatt aggagatgct tgaagaactc aacaaaatcc caatccaagt caaactttgc 2040
acataattat atttatattc agaaaagaaa catttcagta atttataata aagagcacta 2100
tttttttaac g 2111

```

<210> 4

<211> 157

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

```

Glu Phe Ala Asn Ser Ser Asp Gln Arg His Phe Phe Gln Leu Ser Val
 1           5           10           15
Lys Thr Gln Ser Gly Thr Lys Asn Leu Arg Ile Gln Cys Glu Gly Gly
           20           25           30
Ser Phe Cys Leu Gln Ser Asp Pro Arg Lys Thr Gln Pro Val Pro Arg
           35           40           45
Val Asp Cys Val Leu Lys Leu Val His Arg Ser Gly Ala Pro Ala Gly

```

50						55										60
Ala	Pro	Ser	Phe	Pro	Ser	Pro	Pro	Thr	Glu	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Pro	
65						70				75					80	
Glu	Gln	Pro	Ser	Ala	Gln	Pro	Leu	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	
				85					90					95		
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gly	Gly	Glu	Lys	Ile	Pro	Leu	Val	Leu	Ser	Arg	
				100				105						110		
Pro	Leu	Ser	Ser	Asn	Val	Ala	Thr	Leu	Gln	His	Leu	Cys	Arg	Lys	Thr	
				115			120						125			
Val	Asn	Gly	His	Leu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Lys	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Gly	
				130			135						140			
Pro	Ile	Arg	Glu	Phe	Leu	Asp	Gln	Tyr	Asp	Ala	Pro	Leu				
145					150						155					

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 711

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

```

gatcctggtg acatgctcct ctccctggct ceggggagaa gggcttgggg tgacctgaag 60
ggaaccatcc tgggtgcccc catcctctcc tccgggacag tcaccgaaaa cacaggttcc 120
aaagtctacc tgggtgctga gagcccagg cccttctctc gttttaaggg ggaagcaaca 180
tttgaggggg acggatgggc tggtcagctg gtctcctttt cctactcata ctataccttc 240
ctgtacctg gtggatgggg cgggaggatg gaggagacgg gacatctttc acctcaggct 300
cctggtagag aagacagggg attctactct gtgcctcctg actatgcctg gctaagagat 360
tcgccttaa tgctccctgt tccatggaga gggaccagc ataggaaagc cacatactca 420
gcctggatgg gtggagagggc tgagggactc actggagggc accaagccag cccacagcca 480
gggaagtggg gagggggggc gaaaccat gcctcccagc tgagcactgg gaatgtcagc 540
ccagtaagta ttggccagtc aggcgcctcg tggtcagagc agagccacca ggtcccactg 600
ccccgagccc tgcacagccc tccctcctgc ctgggtgggg gaggctggag gtcattggag 660
aggctggact gctgccacce cgggtgctcc cgctctgcca tagcactgat c 711

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

gaccatggcg cacggagcca

20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 7  
gctgtgggtg accatggcgc 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 8  
ccgtgcgcca tggtcaccca 20

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/29072
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07K 14/47; C12N 15/12. US CL : 530/350, 300 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 300		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched A_Genseq_36; PIR_65; SWISSPROT_39; SPTREMBL_14; GENEMBL		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: MEDLINE, DGENE, USPAT, WPIDS, JAPIO, HCAPLUS, JICST, FROSTI, FSTA		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/03993 A2 (SCHERING CORPORATION) 28 January 1999 (28/1/99). See entire document.	1
X	WO 99/23220 A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC) 14 May 1999 (14/5/99). See entire document.	1
X	EP 877030 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 11 November 1998 (11/11/98). See entire document.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "B" earlier document 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 "E" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 JANUARY 2001		Date of mailing of the international search report 12 APR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DELLA MAE COLLINS <i>DMC</i> PARALEGAL SPECIALIST TECHNOLOGY CENTER 1600 Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/29072**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
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:
  
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra 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.:
  
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.: 1

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/29072

## BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

Group I, claim(s) 1, drawn to an isolated polypeptide.  
Group II, claim(s) 2, and 8-14, drawn to an isolated polynucleotide, an expression system and a recombinant host cell.  
Group III, claim(s) 3, drawn to an antibody.  
Group IV, claim(s) 4(ia), drawn to a method of treatment by administering an agonist.  
Group V, claim(s) 4(ib) and 21-22, drawn to a method of treatment by gene therapy.  
Group VI, claim(s) 4(ia), 4(iic) and 15-17, drawn to a method of treatment by administering an antagonist.  
Group VII, claim(s) 4(iib), drawn to a method of treatment using antisense polynucleotides.  
Group VIII, claim(s) 5(a), drawn to a method of diagnosis using a polynucleotide.  
Group IX, claim(s) 5(b), drawn to a method of diagnosis using a polypeptide.  
Group X, claim(s) 6, drawn to a method of screening for agonists.  
Group XI, claim(s) 6, drawn to a method of screening for an antagonists.  
Group XII, claim(s) 7, drawn to an agonist.  
Group XIII, claim(s) 7, 18 and 23, drawn to an antagonist.  
Group XIV, claim(s) 19-20, drawn to a method of increasing the effectiveness of hematopoietic stem cell transplantation by administering an EPRG1 inhibitor.

The inventions listed as Groups I-XIV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The products of Groups I-III, XII and XIII are distinct each from the other because they have different structures, function and modes of operation. For example, the nucleic acid of Group II can be used as probe in a hybridization assay, in gene therapy or to make a protein. Further, the protein of Group I can be used for the production of antibodies or in its own right as a diagnostic or therapeutic (i.e. screening).

Note also that Groups IV, V, VI, VII, VIII and XIV are independent and distinct because they have different modes of operation, function and end points. For example, the protein of Group I is neither used nor made in the methods of Groups IV, V, VI, VII, VIII or XIV.

In addition, Groups IX, X and XI are separate and distinct because the polypeptide of Group I can be used to make antibodies which is a materially different process than the processes of diagnosis and screening of Groups IX, X and XI.

Finally, the polypeptide of Group I does not avoid the prior art since Johnson (WO9903993, January 28, 1999) disclose the claimed polypeptide with a high sequence identity. Therefore, the claimed invention lacks unity.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
48/00		3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/04		5/00	4 C 0 8 6
3/10		7/06	4 H 0 4 5
5/00		11/06	
7/06		25/00	
11/06		29/00	
25/00			1 0 1
29/00		31/00	
	1 0 1	31/18	
31/00		35/00	
31/18		37/02	
35/00		37/08	
37/02		43/00	1 0 7
37/08		C 0 7 K 14/47	
43/00	1 0 7	16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		C 1 2 Q 1/02	
5/10		1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 ケネス・エイ・ロード  
 アメリカ合衆国19426ペンシルベニア州カ  
 レッジビル、レジナルド・レイン488番

(72)発明者 アンドリュー・ジー・キング  
 アメリカ合衆国19422ペンシルベニア州ブ  
 ルー・ベル、シルバン・ドライブ1649番

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12  
DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
FB07  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02  
EA04 GA11 HA12  
4B063 QA01 QA12 QA17 QA18 QA19  
QQ20 QQ43 QR55 QR59 QR62  
QR80 QS24 QS25 QS28 QS34  
4B064 AG01 AG27 AG31 CA10 CA19  
CC24 DA01 DA13  
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14  
CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17  
BA01 BA08 BA22 BA23 MA01  
NA14 ZA012 ZA552 ZA592  
ZA702 ZA962 ZB072 ZB112  
ZB132 ZB152 ZB222 ZB262  
ZB322 ZC022 ZC352 ZC552  
4C085 AA13 AA14 CC32 EE01 GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16  
MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA55  
ZA59 ZA70 ZA96 ZB07 ZB11  
ZB13 ZB15 ZB22 ZB26 ZB32  
ZC02 ZC35 ZC55  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40  
DA76 DA86 EA24 EA50 FA71  
FA74

专利名称(译)	EPO初级应答基因1, EPRG 1		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003520577A</a>	公开(公告)日	2003-07-08
申请号	JP2001532164	申请日	2000-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公司		
[标]发明人	スーザンビーディロン ケネスエイロード アンドリュージーキング		
发明人	スーザン・ビー・ディロン ケネス・エイ・ロード アンドリュー・ジー・キング		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P11/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/04 A61P11/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 C07K14/47		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P11/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.107 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ20 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA702 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB222 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC022 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA70 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB22 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4C086/ZC02 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA24 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
优先权	09/422153 1999-10-21 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了EPRG1多肽和多核苷酸, 以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还公开了在治疗和用于治疗的诊断测定中使用EPRG1多肽和多核苷酸的方法。

