

(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2006-502702

(P2006-502702A)

(43) 公表日 平成18年1月26日(2006.1.26)

(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
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-501455 (P2004-501455)	(71) 出願人	504238862
(86) (22) 出願日	平成15年4月30日 (2003. 4. 30)		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16年11月1日 (2004. 11. 1)		スイス ツェーハー 1 1 7 0 オーボンヌ ゾーヌ アンデュストリエル ド ルー リエッタ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/001851	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開番号	W02003/093316		弁理士 熊倉 禎男
(87) 国際公開日	平成15年11月13日 (2003. 11. 13)	(74) 代理人	100084009
(31) 優先権主張番号	0209884. 6		弁理士 小川 信夫
(32) 優先日	平成14年4月30日 (2002. 4. 30)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 稲田 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】 免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子

(57) 【要約】

本発明は、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子として本明細書で同定された新規タンパク質 (INSP052) に関し、また疾患の診断、予防及び治療における、前記タンパク質及びそのコード遺伝子由来の核酸配列の使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の(i)~(iii)のいずれかのポリペプチド：

(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 若しくは図 7 に記載の INSP052 細胞外ドメインで示されるアミノ酸配列を含むか、又は前記アミノ酸配列からなるポリペプチド；

(ii)(i)のポリペプチドの活性を有するか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、(i)のフラグメント；又は

(iii)(i)又は(ii)の機能的等価物。

【請求項 2】

配列番号 16 で示されるアミノ酸配列を含むか、又は前記アミノ酸配列からなる、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 16 で示されるアミノ酸配列からなる、請求項 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】

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 又は配列番号 16 で示されるアミノ酸配列に相通的であって、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子活性を有することを特徴とする、請求項 1 の(iii)記載の機能的等価物であるポリペプチド。

【請求項 5】

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 若しくは配列番号 16 で示されるアミノ酸配列又はそれらの活性なフラグメントに対して 84% 以上の配列同一性、好ましくは 85%、90%、95%、98% 若しくは 99% 以上の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のフラグメント又は機能的等価物であるポリペプチド。

【請求項 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 又は配列番号 16 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して有意な構造的相同性を示す、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の機能的等価物であるポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 の(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有し、配列番号 16 で示されるアミノ酸配列に由来する 7 又はそれ以上（例えば、8、10、12、14、16、20 又はそれ以上）のアミノ酸残基からなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のフラグメントであるポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードしている精製核酸分子。

【請求項 9】

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 若しくは配列番号 15 で示される核酸配列を含むか、又はそれらの余剰的等価物又はフラグメントである、請求項 8 記載の精製核酸分子。

【請求項 10】

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 若しくは配列番号 15 で示される核酸配列からなるか、又はそれらの余剰的等価物又はフラグメントである、請求項 9 記載の精製核酸分子。

【請求項 11】

高ストリンジェンシーの条件下で、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の核酸分子とハイブリダイズする、精製核酸分子。

【請求項 12】

請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含むベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

請求項 12 記載のベクターで形質転換されている、宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに特異的に結合し、好ましくは前記ポリペプチドの活性を阻害する、リガンド。

【請求項 15】

抗体である、請求項 14 記載のリガンド。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの発現レベル又は活性レベルを増加又は減少させる化合物。

10

【請求項 17】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドに、前記ポリペプチドの生物学的作用のいずれをも誘導することなく結合する、請求項 16 記載の化合物。

【請求項 18】

天然であるか又は改変されている、基質、リガンド、酵素、受容体、構造的模倣物又は機能的模倣物である、請求項 17 記載の化合物。

【請求項 19】

疾患の治療又は診断に使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 12 記載のベクター、請求項 13 記載の宿主細胞、請求項 14 若しくは 15 記載のリガンド、又は請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物。

20

【請求項 20】

患者由来の組織において、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする天然遺伝子の発現レベル、又は請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの活性を評価すること；及び
前記発現又は活性のレベルをコントロールレベルと比較すること；
を含み、このとき前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆している、患者の疾患を診断する方法。

【請求項 21】

*in vitro*で実施される、請求項 20 記載の方法。

30

【請求項 22】

(a) 請求項 14 又は 15 記載のリガンドを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適する条件下で、生物学的サンプルと接触させる工程；及び

(b) 前記複合体を検出する工程；

を含む請求項 20 又は 21 記載の方法。

【請求項 23】

(a) 患者由来の組織サンプルと核酸プローブとを、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子と前記プローブとの間で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、工程 (a) で用いられるのと同じ条件下で前記プローブと接触させる工程；及び

(c) 前記サンプルのハイブリッド複合体の存在を検出する工程；を含み、このとき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患者サンプルのハイブリッド複合体レベルの検出が疾患を示唆している、請求項 20 又は 21 記載の方法。

40

【請求項 24】

(a) 患者の組織由来の核酸サンプルと核酸プライマーとを、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に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、工程 (a) で用いられるのと同じ条件下で前記プライマーと接触させる工程；

50

(c) 前記サンプルの核酸を増幅させる工程；及び、

(d) 患者サンプル及びコントロールサンプルの両サンプルから、増幅核酸レベルを検出する工程；

を含み、このときコントロールサンプルの増幅核酸レベルと顕著に異なる患者サンプルの増幅核酸レベルの検出が疾患を示唆している、請求項 20 又は 21 記載の方法。

【請求項 25】

(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、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項記載の核酸分子を単離する工程；及び、

(c) 前記疾患に附随する変異の存在を、前記疾患の指標として前記核酸分子中で検出することによって、前記疾患について患者を診断する工程；

を含む請求項 20 又は 21 記載の方法。

【請求項 26】

核酸分子を増幅させて増幅産物を生成し、前記増幅産物で変異の有無を検出することをさらに含む、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

該核酸分子を、その核酸分子に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て、疾患に附随する変異に対応する任意の部分に前記核酸プローブの非ハイブリダイズ部分を有するハイブリッド二本鎖分子を形成させること；及び

疾患に附随する変異の有無の指標として、前記プローブ鎖の非ハイブリダイズ部分の有無を検出すること；

によって、前記患者における変異の有無を検出する、請求項 25 又は 26 記載の方法。

【請求項 28】

疾患が、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、精神疾患、発育障害、遺伝子疾患、代謝性疾患、感染又は他の病的状態である、請求項 20 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子としての、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 12 記載のベクター、請求項 13 記載の宿主細胞、請求項 14 若しくは 15 記載のリガンド、又は請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又は請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、ワクチン組成物。

【請求項 32】

細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、精神疾患、発育障害、遺伝子疾患、代謝性疾患、感染及び他の病的状態からなる群より選択される疾患の治療用医薬品を製造するために使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 12 記載のベクター、請求項 13 記載の宿主細胞、請求項 14 若しくは 15 記載のリガンド、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 30 記載の医薬組成物。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子、請求項 12 記載のベクター、請求項 13 記載の宿主細胞、請求項 14 若しくは 15 記載のリガンド、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 30 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 34】

10

20

30

40

50

疾患にかかっている患者における天然遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が健常な対象者における発現又は活性のレベルと比較した場合に低い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物又は組成物がアゴニストである、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

疾患にかかっている患者における天然遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が健常な対象者における発現又は活性のレベルと比較した場合に高い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、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 33 記載の方法。

【請求項 36】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの発現若しくは活性のレベル、又は請求項 8～11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の発現レベルを、ある期間にわたって前記患者由来の組織でモニターすることを含む、患者において疾患の治療をモニターする方法であって、前記期間にわたる発現又は活性のレベルがコントロールレベルに対して変化することは、前記疾患の後退の指標である、前記方法。

【請求項 37】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又は請求項 8～11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を、前記ポリペプチド又は核酸分子に対し結合親和性を有すると疑われる 1 つ又は 2 つ以上の化合物と接触させること；及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択すること；を含む、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。

【請求項 38】

請求項 8～11 のいずれか 1 項に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含む第一の容器；前記核酸分子の増幅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を含む、疾患の診断に有用なキット。

【請求項 39】

ハイブリダイズしない RNA を消化するための薬剤を保有する第三の容器をさらに含む、請求項 38 のキット。

【請求項 40】

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 8～11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子である前記キット。

【請求項 41】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと結合する 1 つ又は 2 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のに有用な試薬；を含むキット。

【請求項 42】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを、より高いレベルで又はより低い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されている、非ヒトトランスジェニック動物又は非ヒトノックアウト動物。

【請求項 43】

請求項 42 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ること、及び前記動物の疾患に対する前記化合物の作用を決定することによって、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、本明細書において免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子とし

10

20

30

40

50

て同定された新規なタンパク質 (INSP052及び INSP055と名付けられた) に関し、さらに疾患の診断、予防及び治療におけるこれらの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。

本明細書に引用した全ての刊行物、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ものとする。

【背景技術】

【0002】

薬剤の発見プロセスにおいて、機能ゲノム学の時代の到来にあわせて根幹的な革命が現在進行している。“機能ゲノム学”という用語は、対象のタンパク質配列に機能を帰属させ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用いられる。そのようなツールは、配列データの生成速度が前記タンパク質配列に機能を割り当てる研究室の能力をはるかに超えることから、ますます必要性を増している。

10

バイオインフォマティクスツールの潜在能力及び精度が高まっているために、前記ツールは通常の生化学的特徴付け技術と急速に置き換えられつつある。実際、本発明の同定に用いた高度なバイオインフォマティクスツールは、今や、高い信頼性をもった結果を出力する能力を有する。

配列データが利用可能になるにつれ、種々の研究機関及び企業組織がそれらを調査し、重要な発見が絶え間なく達成され続けている。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を同定し特徴付ける必要性は引き続き存在している。

20

【0003】

近年、本発明の出願人によって、機能が未知な配列を評価するための注目すべきツールが開発された。このツールは、バイオペンジウム (Biopendium) 検索データベースと名付けられたデータベースであり、国際出願公開第01/69507号明細書の主題である。このデータベースシステムは、専有 (proprietary) 技術を用いて作成されており、且つ全ての利用可能なタンパク質又は核酸配列の全体 (all-by-all) 比較によって得られた情報を含む、統合データリソースからなる。

個々のデータリソース由来のタンパク質及び核酸配列データを統合することの背後に存在する目的は、配列自体及び各配列に関連する情報について、可能な限り多くのデータを一つの統合リソースにまとめることである。コード化タンパク質の三次元構造に関するデータを含め、各配列に関する利用可能な全てのデータが、利用可能である場合、各配列についての既知情報を利用するために一緒に統合されることによって、前記配列の比較から最も知識に基づく予測を行うことが可能となる。データベースにおいて得られる、各配列エントリーに伴って生じる注釈付け (アノテーション) は、生物学的に関連性がある状況を配列情報に与える。

30

前記データリソースは、タンパク質機能を配列のみから精密に予測することを可能にしている。そのような予測は、通常の技術を用いるのであれば、同じ機能性ファミリーの他のタンパク質に対して高度な配列同一性 (約20% ~ 30%より高い同一性) を示すタンパク質についてのみ可能である。機能が既知な他の近縁タンパク質に対して非常に低度の配列相同性を示すタンパク質については、精密な予測が不可能である。

40

【0004】

(シグナルペプチド含有タンパク質)

細胞が細胞外タンパク質を作って分泌する能力は、多くの生物学的過程の中心となる。酵素、増殖因子、細胞外基質タンパク質及びシグナル分子は、全て細胞によって分泌されている。このような分泌は、分泌小胞と形質膜との融合を介している。全部ではないが、ほとんどの場合、タンパク質は、シグナルペプチドによって、小胞体に方向付けられて分泌小胞内へと移動させられる。シグナルペプチドは、細胞質から分泌小胞のような膜結合区画へのペプチド鎖輸送に影響を与えるシス作用性配列である。分泌小胞を標的とするポリペプチドは、細胞外基質へと分泌されるか、又は形質膜内に保持される。形質膜内に保持されているポリペプチドは、1又はそれより多くの膜貫通ドメインを有するであろう。

50

細胞の機能において中心的な役割を果たしているシグナルペプチド含有タンパク質の例は、サイトカイン、ホルモン、細胞外基質タンパク質、接着分子、受容体、プロテアーゼ、成長因子及び分化因子である。

【 0 0 0 5 】

(免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子)

免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子は、多様な生理学的機能において役割を果たすことが示されており、そのような分子の大部分は、疾患過程において役割を果たし得る。前記分子の活性の変化は疾患表現型を変える手段であり、多くの疾患、特に炎症性疾患、腫瘍学及び心疾患において役割を果たし得ることから、新規な免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子の同定それ自体が高度に関連している。免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子は生物学的過程の範囲に参与しており、前記生物学的過程としては、次のようなものが挙げられる：胚発生 (Martin-Bermudo, M.D. et al, *Development*. 2000 127(12): 2607-15; Chen, L.M., et al., *J Neurosci*. 2000 20(10): 3776-84; Zweegman, S., et al, *Exp Hematol*. 2000 28(4): 401-10; Darriberre, T., et al., *Biol Cell*. 2000 92(1): 5-25)、組織完全性の維持 (Eckes, B., et al., *J Cell Sci*. 2000 113(Pt 13): 2455-2462; Buckwalter, J.A., et al., *Instr Course Lect*. 2000 49: 481-9; Frenette, P.S., et al., *J Exp Med*. 2000 191(8): 1413-22; Delmas, V., et al, *Dev Biol*. 1999 216(2): 491-506; Humphries, M.J., et al., *Trends Pharmacol Sci*. 2000 21(1): 29-32; Miosge, N., et al, *Lab Invest*. 1999 79(12): 1591-9; Nagaoka T, et al. *Am J Pathol* 2000 Jul 157: 1 237-47; Nwariaku FE, et al. *J Trauma* 1995 39(2): 285-8; Zhu X, et al. *Zhonghua Zheng Xing Sha o Shang Wai Ke Za Zhi* 1999 15(1): 53-5)、白血球血管外遊走/炎症 (Lim, L.H., et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 22(6): 693-701; Johnston, B., et al., *Micro circulation*. 2000 7(2): 109-18; Mertens, A.V., et al., *Clin Exp Allergy*. 1993 23(10): 868-73; Chcialowski, A., et al., *Pol Merkuriusz Lek*. 2000 7(43): 13-7; Rojas, A.I., et al, *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999 10(3): 337-58; Marinova-Mutafchieva, L., et al., *Arthritis Rheum*. 2000 43(3): 638-44; Vijayan, K.V., et al, *J Clin Invest*. 2000 105(6): 793-802; Currie, A.J., et al., *J Immunol*. 2000 164(7): 3878-86; Rowin, M.E., et al., *Inflammation*. 2000 24(2): 157-73; Johnston, B., et al., *J Immunol*. 2000 164(6): 3337-44; Gerst, J.L., et al., *J Neurosci Res*. 2000 59(5): 680-4; Kagawa, T.F., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 97(5): 2235-40; Hillan, K.J., et al., *Liver*. 1999 19(6): 509-18; Panes, J., 1999 22(10): 514-24; Arao, T., et al., *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 85(1): 382-9; Souza, H.S., et al., *Gut*. 1999 45(6): 856-63; Grunstein, M.M., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 278(6): L1154-63; Mertens, A.V., et al., *Clin Exp Allergy*. 1993 23(10): 868-73; Berends, C., et al., *Clin Exp Allergy*. 1993 23(11): 926-33; Fernvik, E., et al., *Inflammation*. 2000 24(1): 73-87; Bocchino, V., et al., *J Allergy Clin Immunol*. 2000 105(1 Pt 1): 65-70; Jones SC, et al, *Gut* 1995 36(5): 724-30; Liu CM, et al, *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998 81(2): 176-80; McMurray RW *Semin Arthritis Rheum* 1996 25(4): 215-33; Takahashi H, et al *Eur J Immunol* 1992 22(11): 2879-85; Carlos T, et al *J Heart Lung Transplant* 1992 11(6): 1103-8; Fabrega E, et al, *Transplantation* 2000 69(4): 569-73; Zohrens G, et al, *Hepatology* 1993 18(4): 798-802; Montefort S, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 149(5): 1149-52)、腫瘍形成 (Orr, F.W., et al., *Cancer*. 2000 88(S12): 2912-2918; Zeller, W., et al., *J Hematother Stem Cell Res*. 1999 8(5): 539-46; Okada, T., et al., *Clin Exp Metastasis*. 1999 17(7): 623-9; Mateo, V., et al., *Nat Med*. 1999 5(11): 1277-84; Yamaguchi, K., et al., *J Exp Clin Cancer Res*. 2000 19(1): 113-20; Maeshima, Y., et al., *J Biol Chem*. 2000 275(28): 21340-8; Van Waes, C., et al., *Int J Oncol*. 2000 16(6): 1189-95; Damiano, J.S., et al., *Leuk Lymphoma*. 2000 38(1-2): 71-81; Seftor, R.E., et al., *Cancer Metasta*

10

20

30

40

50

sis Rev. 1999 18(3) : 359-75 ; Shaw, L.M., J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1999 4 (4) : 367-76 ; Weyant, M.J., et al., Clin Cancer Res. 2000 6(3) : 949-56)、脈管形成 (Koch AE, et al Nature 1995 376 (6540) : 517-9 ; Wagener C & Ergun S. Exp Cell Res 2000 261(1) : 19-24 ; Ergun S, et al. Mol Cell 2000 5(2) : 311-20)、骨吸収 (Hartman GD, & Duggan ME. Expert Opin Investig Drugs 2000 9(6) : 1281-91 ; Tanaka Y, et al. J Bone Miner Res 1995 10(10) : 1462-9 ; Lark MW, et al. J Pharmacol Exp Ther 1999 291(2) : 612-7 ; Raynal C, et al. Endocrinology 1996 137(6) : 23 47-54 ; Ilvesaro JM, et al. Exp Cell Res 1998 242(1) : 75-83)、神経機能不全 (Ossege LM, et al. Int Immunopharmacol 2001 1 : 1085-100 ; Bitsch A, et al, Stroke 1998 29 : 2129-35 ; Iadecola C & Alexander M. Curr Opin Neurol 2001 14 : 89-94 ; Becker K, et al Stroke 2001 32(1) : 206-11 ; Relton JK, et al Stroke 2001 32(1) : 199-205 ; Hamada Y, et al J Neurochem 1996 66 : 1525-31)、血栓形成 (Wang, Y.G., et al., J Physiol (Lond). 2000 526(Pt 1) : 57-68 ; Matsuno, H., et al., Nippon Yakurigaku Zasshi. 2000 115(3) : 143-50 ; Eliceiri, B.P., et al., Cancer J Sci Am. 2000 6(Suppl 3) : S245-9 ; von Beckerath, N., et al., Blood. 2000 95(11) : 3297-301 ; Topol, E.J., et al., Am Heart J. 2000 139(6) : 927-33 ; Kroll, H., et al., Thromb Haemost. 2000 83(3) : 392-6)、及び宿主細胞に対する細菌性病原体の侵入/付着 (Dersch P, et al. EMBO J 1999 18(5) : 1199-1213)。

10

【 0 0 0 6 】

複数の免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子ファミリーの構造及び機能を総括的に特徴付けることは、幾つかの製薬会社により活性プログラムがもたらされ、炎症、腫瘍学、神経学、免疫学及び心血管機能に関係する疾患の治療に使用するためのモジュレーターが開発される。免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子は、胚発生からアポトーシスまで、生物学の全ての側面に事実上関与している。前記分子は、大部分の組織の構造的完全性及び恒常性的機能にとって必要不可欠である。従って、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子の欠陥が疾患を引き起こし、数多くの疾患が免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子機能の調節に関係していることは、意外なことではない。免疫グロブリン含有細胞表面認識分子ファミリーのメンバーは、下の表 1 に記載されている。

20

【 0 0 0 7 】

免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子ファミリーは、実際には、識別可能な複数のファミリーを含んでいる。これらのファミリーの中で、幾つかは、小型分子の取扱い易さの理由で、特に医薬的に興味深い。そのようなファミリーには、次のものが挙げられる：

30

1 . インテグリンに対する対(counter)受容体を代表する免疫グロブリン接着分子であり、細胞内接着分子 (ICAM) 及び脈管細胞接着分子 (VCAM) が含まれる。そのメンバーは、変動し得る数の球状免疫グロブリン様細胞外ドメインで構成されている。このファミリーの幾つかのメンバー、例えばPECAM-1 (CD31) 及びNCAMは、ホモタイプな接着を媒介する。このファミリーの幾つかのメンバー、例えばICAM-1及びVCAM-1は、インテグリンとの相互作用を介する接着を媒介する。

40

2 . 細胞表面増殖因子受容体。増殖因子は、細胞外に存在しており、生物学的効果を示す目的で、標的細胞の形質膜上に位置する特異的な高親和性受容体と相互作用する。種々の異なる増殖因子受容体の分子特徴は、それら受容体が規定されるファミリー (チロシンキナーゼ受容体、Gタンパク質結合 7 回膜貫通受容体、及びセリン/トレオニンキナーゼ受容体) に分類されることを明らかにした。チロシンキナーゼ受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及びチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインによって、特徴付けられている。VEGFR、PDGFR、FGFR、CSF-1R及びc-KITも、細胞外部分に免疫グロブリンドメインを含んでいるチロシンキナーゼ増殖因子受容体の例である。増殖因子機能の調節不全は、数多くの様々な疾患表現型をもたらす。そのような疾患表現型としては、次のものが挙げられるが、これだけに限られない：腫瘍疾患 (Bartucci M et al, (2001) Cancer Re

50

s. Sep 15 ; 61(18) : 6747-54, Dias S et al., (2001) Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 11 ; 98(19) : 10857-62, Djavan B et al., (2001) World J Urol. 19(4) : 225-33)、炎症疾患 (Fiocchi C. (2001) J Clin Invest. Aug ; 108(4) : 523-6, Hodge S et al., (2001) Respiriology. Sep ; 6(3) : 205-211, Fenwick SA et al., (2001) J Anat. Sep ; 199(Pt 3) : 231-40)、神経疾患 (Cooper JD et al., (2001) Proc Natl Acad Sci U S A 98(18) : 10439-44, Fahnestock M et al, (2001) Mol Cell Neurosci 18(2) : 210-20)、及び代謝性疾患 (Vickers MH et al., (2001) Endocrinology. 142(9) : 3964-73)。

【 0 0 0 8 】

【 表 1 】

表 1 : 免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子

受容体	リガンド	分布
ICAM-1 5つのIgドメイン	LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), CD43	広範に分布、内皮細胞、繊維芽細胞、上皮、単球、リンパ球、樹状細胞、軟骨細胞。
ICAM-2 2つのIgドメイン	LFA-1 (CD11b)	内皮細胞 (高度に分布) ; リンパ球、単球、好塩基球、血小板 (低度に分布)。
ICAM-3 5つのIgドメイン	LFA-1 (α d/CD18)	リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球。
VCAM-1 6又は7つのIgドメイン	α 4 β 1, α 4 β 7	内皮細胞、単球、繊維芽細胞、樹状細胞、骨髄ストローマ細胞、筋芽細胞。
LFA-3 6つのIgドメイン	CD2	内皮細胞、白血球、上皮細胞。
PECAM-1 (CD31)	CD31, ヘパリン	内皮細胞 (EC-ECジャンクションにて)、T細胞サブセット、血小板、好中球、好酸球、単球、平滑筋細胞、骨髄幹細胞。
NCAM	NCAM, ヘパリンSO ₄	神経細胞、筋肉。
MAdCAM-1 4つのIgドメイン	α 4 β 7, L-セレクチン	パイエル板、腸間膜リンパ節、粘膜上皮細胞、脾臓。
CD2	CD58, CD59, CD48	Tリンパ球。
VEGFR	VEGF	広範に分布、網膜、臍静脈、副腎、NT2神経前駆細胞。
FGFR	FGF	広範に分布、脳、結腸、卵巣。
KIT	幹細胞因子, MGF	広範に分布、胎児、メラノサイト、胆嚢、小脳、胃上皮 (低度に分布)。
PDGFR	PDGF	広範に分布、乳房、胎盤、繊維芽細胞、肺、卵巣、皮膚、心臓。
CSF-1R	CSF	広範に分布、胎盤、肝臓、多発性硬化症病変部、脾臓、肺、乳房。

【 0 0 0 9 】

このように、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子は、多様な生理学的機能において役割を果たすことが示されており、前記生理学的機能の多くは、疾患過程において役割を果たし得る。前記分子活性の変更は、疾患表現型を変化させる手段であり、前記分子が多くの疾患、特に免疫学、炎症性疾患、腫瘍学、心疾患、中枢神経系疾患及び感染症

10

20

30

40

50

において役割を果たし得ることから、新規な免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子を同定すること自体が高く関連している。

【発明の開示】

【0010】

本発明は、INSP052タンパク質及びINSP055タンパク質が免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子として機能するという発見に基づいている。免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子の例は、表1に列挙されている。

本発明の第一の観点の一態様では、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若しくはINSP052細胞外ドメインで示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、又はそれらのアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(ii) (i)のポリペプチドの活性を有するか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、(i)のフラグメント；又は

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

“(i)のポリペプチドの活性”という表現によって、免疫グロブリンドメイン細胞表面認識分子の活性に言及する。“免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子活性”という表現によって、免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子ファミリーの範囲内の保存的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に言及する。

【0011】

配列番号2で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン1ポリペプチド”と呼ぶ。配列番号4で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン2ポリペプチド”と呼ぶ。配列番号6で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン3ポリペプチド”と呼ぶ。配列番号8で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン4ポリペプチド”と呼ぶ。配列番号10で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン5ポリペプチド”と呼ぶ。配列番号12で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン6ポリペプチド”と呼ぶ。配列番号14で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052エクソン7ポリペプチド”と呼ぶ。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及び配列番号14を組合せて、配列番号16で示される配列が生じる。配列番号16で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降は“INSP052ポリペプチド”と呼ぶ。

本明細書で用いられる“INSP052エクソンポリペプチド”という用語は、INSP052エクソン1ポリペプチド、INSP052エクソン2ポリペプチド、INSP052エクソン3ポリペプチド、INSP052エクソン4ポリペプチド、INSP052エクソン5ポリペプチド、INSP052エクソン6ポリペプチド、INSP052エクソン7ポリペプチド、INSP052ポリペプチド及びINSP052細胞外ドメインを含むポリペプチド、並びにこれらからなるポリペプチドを含む。

ある態様では、該態様のポリペプチドが、配列番号16で示されるアミノ酸配列からなるか、又はそのフラグメント若しくは機能的等価物である。別の態様では、ポリペプチドが、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若しくは配列番号14又はそれらの変異体で示されるアミノ酸配列からなる。

【0012】

本発明の第一の観点の一態様では、以下のポリペプチドが提供される：

(i) INSP052細胞外ドメインのアミノ酸配列を含むか、又は前記アミノ酸配列からなる、ポリペプチド；

(ii) (i)のポリペプチドの活性を有するか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、(i)のフラグメント；又は

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

INSP052細胞外ドメインは、1~240番目のアミノ酸に対応する(実施例を参照)。INSP052細胞外ドメインについては、図7も参照されたい。

本発明の第一の観点の第二態様では、以下のポリペプチドが提供される：

- (i) 配列番号 18 で示されるアミノ酸配列を含むか、又は前記アミノ酸配列からなる、ポリペプチド；
- (ii) (i)のポリペプチドの活性を有するか、又は(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、(i)のフラグメント；又は
- (iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

“(i)のポリペプチドの活性”という表現によって、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子の活性に言及する。

好ましくは、本態様のポリペプチドが、配列番号 18 で示されるアミノ酸配列からなるか、又はそのフラグメント若しくは機能的等価物である。

配列番号 18 で示される配列を有するポリペプチドを、これ以降では“INSP055ポリペプチド”と呼ぶ。

【0013】

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

好ましくは、前記精製核酸分子が、配列番号 1 (INSP052エクソン 1 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 3 (INSP052エクソン 2 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 5 (INSP052エクソン 3 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 7 (INSP052エクソン 4 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 9 (INSP052エクソン 5 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 11 (INSP052エクソン 6 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 13 (INSP052エクソン 7 ポリペプチドをコードしている)、配列番号 15 (INSP052ポリペプチドをコードしている)若しくは配列番号 17 (INSP055ポリペプチドをコードしている)で示される核酸配列を含む若しくはそれらの核酸配列からなるか、又は前記配列のいずれかの余剰的(redundant)等価物若しくはフラグメントである。

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 及び配列番号 13 で示される配列を組合せて、配列番号 15 で示される配列が生じる。

本発明の第二の観点の一態様では、INSP052細胞外ドメインを含む又はそれからなるポリペプチドをコードする核酸分子が提供される。好ましくは、核酸分子が、図 7 に示す核酸配列又は図 7 に示す核酸配列のコード部分を、含む又はそれらからなる。

【0014】

第三の観点では、高ストリンジェンシー条件下で、本発明の第二の観点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。

第四の観点では、本発明は、本発明の第二又は第三の観点の核酸分子を含むベクター、例えば発現ベクターを提供する。

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

第六の観点では、本発明は、本発明の第一の観点のポリペプチドに特異的に結合するリガンド、好ましくは本発明の第一の観点のポリペプチドの活性を阻害するリガンドを提供する。

“本発明のポリペプチドの活性”及び同様な表現によって、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子に特有な活性に言及する。

第七の観点では、本発明は、本発明の第一の観点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、又は本発明の第一の観点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。

本発明の第七の観点の化合物は、前記ポリペプチドの遺伝子発現又は活性のレベルを増加させ得るか(アゴニスト作用)、又は低下させ得るか(アンタゴニスト作用)。

重要なことに、INSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチドの機能を同定することによって、疾患の治療及び/又は診断に有効な化合物を同定し得るスクリーニング方法のデザインが可能となる。本発明の第六及び第七の観点のリガンド及び化合物は、前記方法を用いて同定され得る。これらの方法は、本発明の観点として含まれる。

10

20

30

40

50

【0015】

第八の観点では、本発明は、診断又は治療で使用するために、本発明の第一の観点のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の観点の核酸分子、又は本発明の第四の観点のベクター、又は本発明の第五の観点の宿主細胞、又は本発明の第六の観点のリガンド、又は本発明の第七の観点の化合物を提供する。これらの分子は、疾患の治療用薬物の製造においても用いることができ、前記疾患には、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、精神疾患、発育異常、遺伝子疾患、代謝性疾患、感染及び他の病的状態が挙げられるが、これだけに限られない。好ましくは、これらの疾患には、新生物、癌、脳腫瘍、神経膠腫、骨腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、結腸腫瘍、血管腫、骨髄増殖性疾患、白血病、血液疾患、好中球減少症、血小板減少症、新脈管形成疾患、皮膚疾患、老化、創傷、熱傷、繊維症、心脈管系疾患、再狭窄、心臓病、末梢血管疾患、冠状動脈疾患、浮腫、血栓塞栓症、月経困難症、子宮内膜症、子癩前症、肺疾患、COPD、喘息骨疾患 (asthma bone disease)、腎疾患、糸球体腎炎、肝臓疾患、クローン病、胃炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍、免疫疾患、自己免疫疾患、関節炎、慢性関節リウマチ、乾癬、表皮水疱症、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、ライム病、多発性硬化症、神経変性、脳卒中、脳/脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、運動ニューロン疾患、神経筋疾患、HIV、AIDS、サイトメガロウイルス感染、真菌感染、眼疾患、黄斑変性、緑内障、糖尿病性網膜症、高眼圧症、及び免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子が関与している他の病的状態が含まれる。本発明の第一、第二、第三、第四、第六又は第七の観点の一部は、これらの疾患の治療用医薬品を製造することにも用いられ得る。

10

20

【0016】

第九の観点では、本発明は、本発明の第一の観点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観点のポリペプチドの活性レベルを前記患者由来の組織で評価する工程、及び前記発現又は活性のレベルをコントロールレベルと比較する工程を含む患者の疾患を診断する方法を提供し、この場合前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示している。前記の方法は、好ましくは *in vitro* で実施されるであろう。同様な方法は、患者における疾患の治療的処置のモニタリングに使用され得る。この場合、時間の経過にしたがってポリペプチド又は核酸分子の発現若しくは活性レベルがコントロールレベルに向かって変化することは、疾患の緩解を示している。

本発明の第一の観点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) 本発明の第六の観点のリガンド (例えば抗体) と生物学的サンプルとを、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。

30

本発明の第九の観点によると、例えば短いプローブによる核酸ハイブリダイゼーション法、点変異分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、及び、抗体を用いて異常なタンパク質レベルを検出する方法といった種々の異なる方法が存在することは、当業者には明らかであろう。同様な方法を短期又は長期ベースで用いて、モニターされる疾患の治療を可能にすることができる。本発明はまた、前記疾患診断方法に有用なキットも提供する。

【0017】

好ましくは、本発明の第九の観点の方法によって診断される疾患が、上述するような、免疫グロブリンドメインを含有する細胞表面認識分子が関与する疾患である。

40

第十の観点では、本発明は、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子としての、本発明の第一の観点のポリペプチドの使用を提供する。細胞表面受容体における Igドメインの重要性は、Lokker NAらの論文 “Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies” (J Biol Chem 1997 Dec 26 ; 272(52) : 33037-44) に記載されている。

本発明は、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子活性を有するタンパク質を発現させるための、本発明の第二又は第三の観点の核酸分子の使用も提供する。本発明は、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子活性をもたらす方法も提供し、前記方法は

50

、本発明の第一の観点のポリペプチドを利用している。

第十一の観点では、本発明は、医薬として許容される担体と共に、本発明の第一の観点のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の観点の核酸分子、又は本発明の第四の観点のベクター、又は本発明の第五の観点の宿主細胞、又は本発明の第六の観点のリガンド、又は本発明の第七の観点の化合物を含む医薬組成物を提供する。

【0018】

第十二の観点では、本発明は、治療又は診断において使用するための、本発明の第一の観点のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の観点の核酸分子、又は本発明の第四の観点のベクター、又は本発明の第五の観点の宿主細胞、又は本発明の第六の観点のリガンド、又は本発明の第七の観点の化合物を提供する。これらの分子は、疾患の治療用医薬品の製造に用いられてもよく、前記疾患には、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心臓疾患、神経疾患、精神疾患、発育障害、遺伝子疾患、代謝性疾患、感染及び他の病的状態が挙げられるが、これだけに限られない。これらの疾患は、特に、新生物、癌、脳腫瘍、神経膠腫、骨腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、結腸腫瘍、血管腫、骨髄増殖性疾患、白血病、血液疾患、好中球減少症、血小板減少症、新血管形成疾患、皮膚疾患、老化、創傷、熱傷、繊維症、心臓系疾患、再狭窄、心臓病、末梢血管疾患、冠状動脈疾患、浮腫、血栓塞栓症、月経困難症、子宮内膜症、子癇前症、肺疾患、COPD、喘息骨疾患 (asthma bone disease)、腎疾患、糸球体腎炎、肝臓疾患、クローン病、胃炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍、免疫疾患、自己免疫疾患、関節炎、慢性関節リウマチ、乾癬、表皮水疱症、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、ライム病、多発性硬化症、神経変性、脳卒中、脳/脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、運動ニューロン疾患、神経筋疾患、HIV、AIDS、サイトメガロウイルス感染、真菌感染、眼疾患、黄斑変性、緑内障、糖尿病性網膜症、高眼圧症、及び免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子が関与している他の病的状態が含まれる。

10

20

【0019】

第十三の観点では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の観点のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の観点の核酸分子、又は本発明の第四の観点のベクター、又は本発明の第五の観点の宿主細胞、又は本発明の第六の観点のリガンド、又は本発明の第七の観点の化合物を患者に投与することを含む。

本発明の第一の観点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観点のポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現又は活性レベルと比較したとき罹患対象者で低下する疾患については、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物がアゴニストであるべきである。逆に、前記天然の遺伝子の発現、又は前記ポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現又は活性レベルと比較したとき罹患対象者で上昇する疾患については、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物がアンタゴニストであるべきである。前記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。

30

第十四の観点では、本発明は、本発明の第一の観点のポリペプチドを高レベルで、又は低レベルで発現させるために、又は全く発現させないように形質転換したトランスジェニック又は遺伝子ノックアウト非ヒト動物を提供する。前記トランスジェニック動物は、疾患の研究用モデルとして非常に有用であり、さらに前記疾患の治療又は診断に有効な化合物の同定を目的とするスクリーニング方法で用いることもできる。

40

【0020】

好ましくは、前記疾患が、上述するもののような、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子が関与する疾患である。

本発明のポリペプチド及び核酸について求められる保護範囲は、天然の供給源に存在する核酸又はポリペプチドまで拡張されないことが、理解されるべきである。むしろ、本発明によってクレームされているポリペプチド及び核酸は、“単離されている”か又は“精製されている”ものとして認識され得る。本明細書中で用いられる“単離 (されている)”及び“精製 (されている)”という用語は、核酸又はポリペプチドと一緒に天然の供給

50

源に存在している少なくとも1つの他の成分(例えば、核酸又はポリペプチド)から分離された核酸又はポリペプチドを指す。従って、例えば、組織抽出物に含まれるポリペプチドは、合成的又は組換え的に生成されたポリペプチドのように、“単離”又は“精製”ポリペプチドを構成し得る。ある態様では、核酸又はポリペプチドは、一緒に存在するものが溶媒、緩衝液、イオン又は核酸若しくはポリペプチドの溶液中に通常存在している他の成分といったもののみであることが見出される。

“単離(されている)”及び“精製(されている)”という用語は、ポリペプチド若しくは核酸が得られる方法、又は調製物の純度レベルを示さないことが注記されるべきである。従って、前記単離若しくは精製されている種が、組換え的に生成されてもよく、対象の細胞若しくは組織から直接的に単離されてもよく、又は決定された配列に基づいて合成的に生成されてもよい。

10

【0021】

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要旨は、下記で提供される。本発明は、記載される特定の方法論、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専門用語は単に個々の態様を説明するためのものであり、前記用語によって本発明の範囲を限定しようとするものではないこともまた理解されよう。本発明の範囲は添付の請求の範囲の用語によってのみ限定される。

本明細書では、ヌクレオチド及びアミノ酸についての標準的な略語が用いられる。

本発明の実施では別に指示がなければ、分子生物学、微生物学、リコンビナントDNA技術及び免疫学の通常の技術が用いられるであろう。前記技術は当業者の技術範囲内である。

20

前記のような技術は、文献で完全に説明されている。特に適切な解説書の例には以下が含まれる: Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes 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 volumes 154 & 155; 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, London); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer Verlag, N.Y.); and Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C. C. Blackwell eds. 1986)。

30

【0022】

本明細書において用いる“ポリペプチド”という用語は、ペプチド結合又は改変ペプチド結合によって互いに結合した2つ又は3つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質が含まれる。前記改変ペプチド結合によるものは、すなわちペプチドイソスターである。この用語は、短鎖(ペプチド及びオリゴペプチド)及び長鎖(タンパク質)の両方を指す。

40

本発明のポリペプチドは成熟タンパク質の形態を有するものでもよく、またプレ-、プロ-又はプレプロ-タンパク質であってプレ-、プロ-又はプレプロ-部分の切断によって活性化されて活性化成熟ポリペプチドを生じるタンパク質でもよい。そのようなポリペプチドでは、プレ-、プロ-又はプレプロ-配列がリーダー配列若しくは分泌配列であっても、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あってもよい。

本発明の第一の観点のポリペプチドは、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つ又は2つ以上の付加アミノ酸配列を含むことがしばしば有利である。前記付加アミノ酸配列は、分泌若しくはリーダー配列、プロ-配列、精製に役立つ配列、又は

50

例えばリコンビナント形成の間により高いタンパク質安定性を付与する配列を含んでもよい。あるいは、又は前記に加えて、前記成熟ポリペプチドを別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させるような化合物（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。

【0023】

ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、又は本技術分野で周知の化学的改変技術によって改変された、20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。本発明のポリペプチドに一般的に存在する公知の改変には、グリコシル化、脂質付加、硫化、 α -カルボキシル化（例えばグルタミン酸残基の）、ヒドロキシル化及びADP-リボシル化がある。他の可能な改変には、アセチル化、アシル化、10 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、タンパク質へのトランスファーRNA媒介性アミノ酸付加（例えばアルギニル化）及びユビキチン結合が含まれる。

改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びアミノ末端又はカルボキシ末端を含むポリペプチド内のいずれの場所に存在してもよい。実際、共有結合改変によるポリペプチドのアミノ末端若しくはカルボキシ末端又はその両端の閉塞(blockage)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も存在し得る。 20

【0024】

ポリペプチド内に生じる改変は、多くの場合ポリペプチドが生成される方法の関数であろう。組換えによって生成されるポリペプチドについて、改変の性質及び程度は大部分が、特定の宿主細胞の翻訳後改変能力及び問題のポリペプチドのアミノ酸配列に存在してい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、異なる種類の宿主細胞間で変動する。

本発明のポリペプチドは、任意の適切な様式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、細胞培養物から精製される）、組換え的に生成されたポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成的に生成されたポリペプチド、又は前記方法の組合せによって生成されたポリペプチドが含まれる。 30

本発明の第一の観点の機能的に等価なポリペプチドは、INSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチドと相同なポリペプチドであり得る。本明細書で用いる用語として、2つのポリペプチドは、前記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に対して十分に高い同一性又は類似性を有する場合、“相同である”と称される。“同一性”とは、アラインメントを施した配列のどの特定の場所においても、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”は、アラインメントを施した配列のいずれの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で類似の種類であることを示す。同一性及び類似性の度合いは、容易に計算できる（Computational Molecular Biology, A.M. Lesk ed. 40 , 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）。

【0025】

従って、相同なポリペプチドには、INSP052ポリペプチド及びINSP055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した種における対立形質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。前 50

記変異体は、1つ又は2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を含んでもよく、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝コードでコードされたものでもそうでなくてもよい。典型的な前記の置換は、Ala、Val、Leu及びIle間で；SerとThr間で；酸性残基AspとGlu間で；AsnとGln間で；塩基性残基LysとArg間で；又は芳香族残基PheとTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつ（すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、又は単に1つ）のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失又は付加された変種である。とりわけ好ましいものは、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。また、その際とりわけ好ましいものは、保存的置換である。前記変異体にはまた、1つ又は2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドも含まれる。

10

【0026】

典型的には、2つのポリペプチド間で30%を超える同一性が、機能的等価物の指標であると考えられる。好ましくは、本発明の第一の観点の機能的に等価なポリペプチドは、INSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチド又はそれらの活性なフラグメントと、80%を超える配列同一性の度合いを有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ85%、90%、95%、98%又は99%を超える同一性の度合いを有する。

本発明の第一の観点の機能的に等価なポリペプチドはまた、構造的アラインメントの1つ又は2つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであってもよい。例えば、バイオペンジウム検索データベースの作製に用いられる検索ツールの一角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）（商標）技術を用いて（国際公開第01/69507号パンフレットとして公開されている同時係属PCT特許出願（PCT/GB01/01105）を参照されたい）、INSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチドと比較して低い配列同一性しかもたないが、INSP052及びINSP055ポリペプチド配列と有意な構造的相同性を共有するという理由から免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子であると予測される、現在のところ機能が未知なポリペプチドを同定することができる。そのような方法は、本発明の第一の観点のポリペプチドを利用する。“有意な構造的相同性”とは、インファーマティカ=ゲノムスレッダー（商標）が、2つのタンパク質は少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の確実性を有して構造的相同性を共有すると予測することを意味する。

20

本発明の第一の観点のポリペプチドはまた、INSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチドのフラグメント並びにINSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチドの機能的等価物のフラグメントを含むが、ただし、これらフラグメントが、免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子活性を保持すること又はINSP052ポリペプチド及びINSP055ポリペプチドと共通の抗原決定基を有することを条件とする。

30

【0027】

本明細書において用いる、“フラグメント”という用語は、INSP052及びINSP055ポリペプチド又はその機能的等価物の1つのいずれかのアミノ酸配列の一部（全体ではないが）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記フラグメントは、前記配列に由来する少なくとも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又はそれより大きい（例えば8、10、12、14、16、18、20又はそれより大きい）。小さなフラグメントは、抗原決定基を構成することができる。

40

そのようなフラグメントは、“独立的存在（free-standing）”（すなわち、他のアミノ酸若しくはポリペプチドの一部でもなく、他のアミノ酸若しくはポリペプチドの一部に融合されているのでもない）であってもよく、又はより大きなポリペプチドに含まれて、前記ポリペプチドの一部分又は領域を形成してもよい。より大きなポリペプチドの内部に含まれている場合、本発明のフラグメントは、最も好ましくは連続するただ1つの領域を形成する。例えばある種の好ましい態様は、前記フラグメントのアミノ末端に融合したプレ-及び/又はプロ-ポリペプチド領域を有するフラグメント、及び/又は前記フラグメントのカルボキシ末端に融合した付加的領域を有するフラグメントに関する。しかしながら、いくつかのフラグメントがただ1つのより大きなポリペプチドの内部に含まれていても

50

よい。

本発明のポリペプチド又はその免疫原性フラグメント（少なくとも1つの抗原決定基を含む）を用いて、例えばポリクローナル又はモノクローナル抗体といった、前記ポリペプチドに免疫特異的なリガンドを作製することができる。そのような抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現しているクローンを単離若しくは同定するか、又はアフィニティークロマトグラフィーで本発明のポリペプチドを精製することができる。前記抗体はまた、当業者には明らかなように、他の用途のうち診断的又は治療的補助としても用いることができる。

【0028】

“免疫特異的”という用語は、前記抗体が、従来技術における他の近縁ポリペプチドに対する親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して実質的に強い親和性を有することを意味する。本明細書で用いる“抗体”という用語は、完全な分子だけでなく問題の抗原決定基と結合することができるそのフラグメント、例えばFab、F(ab')₂及びFvも指す。従って、そのような抗体は、本発明の第一の観点のポリペプチドと結合する。

“実質的に強い親和性”という表現によって、本発明のポリペプチドに対する親和性が、既知の免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子に対する親和性と比較して、測定可能に増加することを意味している。

好ましくは、本発明のポリペプチドに対する親和性が、既知の免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子に対する親和性よりも、少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、10³倍、10⁴倍、10⁵倍、10⁶倍強い。

【0029】

ポリクローナル抗体が所望される場合、選択される哺乳類（例えばマウス、ウサギ、ヤギ又はウマ）が、本発明の第一の観点のポリペプチドで免疫され得る。動物を免疫するために用いられるポリペプチドは、リコンビナントDNA技術によって誘導されてもよく、又は化学的に合成されてもよい。所望する場合には、前記ポリペプチドを担体タンパク質と結合させることができる。前記ポリペプチドと化学的に結合させることができる一般的に用いられ得る担体には、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。次に、前記担体結合ポリペプチドが用いられて、動物が免疫される。免疫した動物から血清が採集され、既知の方法（例えばイムノアフィニティークロマトグラフィー）に従って処理される。

本発明の第一の観点のポリペプチドに対するモノクローナル抗体もまた、当業者は容易に生成できる。ハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を作製する一般的な方法論は、周知である（例えば以下を参照されたい：G. Kohler & C. Milstein, *Nature* 256 : 495 - 497(1975) ; Kozbor et al., *Immunology Today* 4 : 72(1983) ; Cole et al., 77 - 96 “*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*”, Alan R. Liss, Inc. (1985)）。

【0030】

本発明の第一の観点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(p anels)を種々の特性、すなわちアイソタイプ、エピトープ、親和性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、それらを作らせた個々のポリペプチドの精製に特に有用である。あるいは、対象のモノクローナル抗体をコードする遺伝子を、例えば当技術分野で知られるPCR技術によってハイブリドーマから単離し、さらにクローニングし適切なベクターで発現させることができる。

また、非ヒト可変領域がヒト定常領域と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*, 84 : 3439(1987)）も有用であり得る。

抗体は、例えばヒト化により、改変して個体での免疫原性を減少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*, 321 : 522(1986) ; Verhoeyen et al., *Science*, 239 : 1534(1988) ; Kabat et al., *J. Immunol.*, 147 : 1709(1991) ; Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 10029(1989) ; Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 34181(1991) ; Hodgson et al., *Bio/Technology* 9 : 421(1991)）

10

20

30

40

50

。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の等価なアミノ酸に代えて置換されている抗体分子を指す。従って、ヒト化抗体はヒトの抗体とよく似ているが、ドナー抗体の結合能力を有する。

【0031】

また別の選択肢では、前記抗体が、2つの異なる抗原結合ドメインを有し、その各ドメインは異なるエピトープに向けられている“二重特異性”抗体であってもよい。

ファージディスプレイ技術を用いて、本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する抗体をコードしている遺伝子を、関連する抗体の保有についてスクリーニングされたヒト由来のリンパ球のPCR増幅V-遺伝子レポトリ、又は未感作ライブラリーのいずれかから選択することができる (J. McCafferty et al., (1990) Nature 348: 552 - 554; J. Marks et al., (1992) Biotechnology 10: 779 - 783)。前記抗体の親和性は、鎖のシャッフルリングによって改善することもできる (T. Clackson et al., (1991) Nature 352: 624 - 628)。

上記の技術によって作製された抗体は、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA) 又は酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で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。これらの用途では、これら抗体を、分析的に検出可能な試薬 (例えば放射性同位元素、蛍光分子又は酵素) で標識することができる。

本発明の第二及び第三の観点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及び/又は配列番号16、又は配列番号18に記載のポリペプチド配列並びに機能的に等価なポリペプチドをコードするものである。これら核酸分子は、本明細書に記載した方法及び用途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で開示される配列に由来する少なくともn個の連続するヌクレオチドを含み、この場合、前記個々の配列に応じてnは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)。

【0032】

本発明の核酸分子は、上記で述べた核酸分子に相補的な配列も含む (例えばアンチセンス又はプローブとしての目的のために)。

本発明の核酸分子は、RNA (例えばmRNA)、又はDNA (例えばcDNA、合成DNA又はゲノムDNAを含む) の形態であってもよい。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学合成によって、又はそれらの組合せによって得ることができる。前記核酸分子は、固相ホスホルアミダイト化学合成のような技術を用いる化学合成によって、ゲノム又はcDNAライブラリーから、又は生物体からの分離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転写によって作製され得る。

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る) でも、非コード鎖 (アンチセンス鎖とも称される) でもよい。

“核酸分子”という用語には、DNA及びRNAのアナログ (例えば改変骨格を含むもの)、並びにペプチド核酸 (PNA) も含まれる。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抗遺伝子作用因子を指し、長さが少なくとも5ヌクレオチドであってアミノ酸残基のペプチド骨格に結合されたオリゴヌクレオチドを含む。前記ペプチド骨格は好ましくはリジンで終わり、前記末端リジンは当該組成物に可溶性を付与する。PNAは、PEG化 (pegylated) されて細胞内での寿命が延長されてもよい {細胞内では、PNAは優先的に相補性一本鎖DNA及びRNAと結合して転写物の伸長を停止させる (P.E. Nielsen et al. (1993) Anticancer Drug Des. 8: 53 - 63) }。

【0033】

これらの分子はまた、遺伝コードの縮退の結果として、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及び/又は配列番号16、又は配列番号18のポリペプチドをコードする配列と異なる配列を有してもよい。そのような分子には、それ自体で成熟なポリペプチドのコード配列; 成熟ポリペプチドのコ

10

20

30

40

50

ード配列及び付加コード配列（例えばリーダー配列又は分泌配列をコードするもの）、例えばプロ-、プレ-又はプレプロ-ポリペプチド配列をコードするもの；前述の付加的コード配列を伴って、又は伴わないで、さらに付加的な非コード配列（非コード5'及び3'配列を含む）を伴う成熟ポリペプチドのコード配列が含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記の非コード5'及び3'配列は、例えば転写される非翻訳配列で、転写（終止シグナルを含む）、リボソーム結合及びmRNA安定性において役割を果たすものである。前記核酸分子は、更なる機能性を提供するアミノ酸のような付加アミノ酸をコードする付加配列を含むこともできる。

【0034】

本発明の第二及び第三の観点の核酸分子は、本発明の第一の観点のポリペプチド及びフラグメントの機能的等価物及びそれらのフラグメントもコードし得る。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形質変種）であっても、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。前記のような天然に存在しない核酸分子の変種は、突然変異誘発技術（核酸分子、細胞又は生物に対して適用される技術が含まれる）によって達成できる。

このような変種の中では、特にヌクレオチドの置換、欠失又は挿入によって前述の核酸分子と異なる変種が挙げられる。置換、欠失又は挿入には、1つ又は2つ以上のヌクレオチドが関与し得る。変種は、コード領域又は非コード領域又はその両方において変化していてもよい。コード領域における変化は、保存的又は非保存的なアミノ酸置換、欠失又は挿入を生成し得る。

本発明の核酸分子はまた、多様な理由で、当技術分野で一般的に知られている方法を用いて操作されてもよく、前記方法としては、遺伝子産物（ポリペプチド）のクローニング、プロセッシング及び/又は発現の改変が挙げられる。ランダムフラグメント化によるDNAシャッフリング並びに遺伝子フラグメント及び合成オリゴヌクレオチドのPCRリアッセンブリーは、ヌクレオチド配列の操作に用いられ得る技術に含まれる。部位特異的突然変異誘発を用いて、新規な制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変化、スプライシング変種の生成、変異の導入などを行うことができる。

【0035】

本発明の第一の観点のポリペプチドをコードする核酸分子は、結合核酸分子が融合タンパク質をコードするように、異種配列に連結されてもよい。前記のような結合核酸分子は本発明の第二又は第三の観点到に包含される。例えば、本発明の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、前記のような結合核酸分子を用いて、市販の抗体により認識され得る融合タンパク質を発現させることは、有用であり得る。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し、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り離して精製することができるようにしてもよい。

本発明の核酸分子には、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あり、従ってその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）アンチセンス分子も含まれる。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）は、当業者にはよく知られるように、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、その標的核酸と特異的に結合してその転写を妨げるようにデザインすることができる（例えば以下の文献を参照されたい：J.S. Cohen, Trends in Pharm. Sci., 10: 435(1989)；J. Okano, Neurochem. 56: 560(1991)；J. O' Connor, Neurochem. 56: 560(1991)；Lee et al., Nucleic Acids Res. 6: 3073(1979)；Cooney et al., Science 241: 456(1988)；Dervan et al., Science 251: 1360(1991)）。

【0036】

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、2つの核酸分子が水素結合によって互いに会合することを指す。典型的には、1つの分子が固相支持体に固定され、他方は溶液中で遊離しているであろう。次に、2つの分子は、水素結合に適した条件下で互いに接触させられ得る。前記結合に影響する因子には以下が含まれる：溶媒の種

10

20

30

40

50

類及び体積；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液相分子の固相支持体への非特異的結合を妨害する薬剤（デンハルト試薬、又はBLOTT0）；分子の濃度；分子の結合速度を増加させる化合物の使用（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に続く洗滌条件のストリンジェンシー（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。

完全に相補的な分子と標的分子とのハイブリダイゼーションの阻害は、当業者に知られる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（例えばSambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。従って、実質的に相同な分子は、文献（G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987, Methods Enzymol. 152: 399 - 407； A.R. Kimmel, 1987, Methods Enzymol. 152: 507 - 511）で教示されるように、完全に相同な分子と標的分子との結合を種々のストリンジェンシー条件下で競合させ阻害するであろう。

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の会合よりも非常に類似した分子の会合に適した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のハイブリダイゼーション条件は、以下を含む溶液（50%のホルムアミド、5倍のSSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5倍のデンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、及び20µg/mLの変性せん断サケ精子DNA）中で42 にて一晩インキュベーションし、続いてフィルターを約65 にて0.1倍のSSC中で洗滌すると定義される。低ストリンジェンシー条件は、35 にて実施されるハイブリダイゼーション反応を含む（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。好ましくは、ハイブリダイゼーションに用いられる条件が高ストリンジェンシー条件である。

10

20

【0037】

本発明のこの観点の好ましい態様は、INSP052ポリペプチド又はINSP055ポリペプチドをコードする核酸分子（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及び/又は配列番号15、又は配列番号17）の全長にわたって少なくとも70%同一である核酸分子、並びに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、本発明のこの観点の核酸分子は、配列番号1によって与えられる配列番号2のコード配列、配列番号3によって与えられる配列番号4のコード配列、配列番号5によって与えられる配列番号6のコード配列、配列番号7によって与えられる配列番号8のコード配列、配列番号9によって与えられる配列番号10のコード配列、配列番号11によって与えられる配列番号12のコード配列、配列番号13によって与えられる配列番号14のコード配列、配列番号15によって与えられる配列番号16のコード配列、配列番号17によって与えられる配列番号18のコード配列の全長にわたって少なくとも80%同一の領域を含むか、又はそれらと相補的な核酸分子である。これに関しては、そのような核酸配列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%又は99%同一の核酸分子が特に好ましい。この観点の好ましい態様は、INSP052及びINSP055ポリペプチドと同じ生物学的機能又は活性を実質的に保持するポリペプチドをコードしている核酸分子である。

30

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）二重鎖を形成するハイブリダイゼーション条件下で、本発明の核酸プローブを生物学的サンプルと接触させる工程；及び（b）形成された前記の二重鎖を全て検出する工程。

40

【0038】

本発明に従って利用し得るアッセイに関連して下記でさらに考察するように、上述の核酸分子をRNA、cDNA又はゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして用いて、INSP052及びINSP055ポリペプチドをコードする完全長cDNA及びゲノムクローンを単離し、さらにINSP052及びINSP055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ーソログ遺伝子のcDNA又はゲノムクローンを単離することができる。

これに関しては、当技術分野で既知の他の技術のうち、特に以下の技術を利用することができる。これらの技術は、例示として下記で考察される。DNAのシーケンシング及び解析の方法は周知であって、当技術分野では一般的に利用可能であり、本明細書で考察される本発明の態様の多くを実施するために実際に用いることができる。そのような方法で

50

は、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、シークエナーゼ (US Biochemical Corp., Cleaveland, OH)、Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、耐熱性T7ポリメラーゼ (Amersham, Chicago, IL)、又はポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼの組合せ (例えば市販 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) のELONGASE増幅システムで見出されるようなもの) のような酵素を利用することができる。好ましくは、シークエンシング過程は、例えばハミルトンマイクロラブ (Hamilton Micro Lab) 2200 (Hamilton, Reno, NV)、ペルティエサーマルサイクラー (Peltier Thermal Cycler) PTC200 (MJ Research, Watertown, MA)、ABIカタリスト並びに373及び377DNAシークエンサー (Perkin Elmer) のような機器を用いて自動化することができる。

【0039】

INSP052及びINSP055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方法の1つは、当技術分野で知られている標準的な手法を用い、天然のプロープ又は人工的に設計したプロープによりゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーを探索することである (例えば以下の文献を参照されたい: "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992)。特に有用なプロープは、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又は配列番号17) に由来する核酸配列に一致するか、又は前記配列と相補的であって、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、さらに好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプロープである。前記のようなプロープは、分析的に検出可能な試薬で標識して、前記プロープの識別を容易にすることができる。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し得る酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプロープを用いて、当業者は、ヒト、哺乳類又は他の動物供給源から対象のタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNA又はRNAポリヌクレオチドの相補的なコピーを単離し、近縁配列、例えば前記のファミリー、タイプ及び/又はサブタイプに属するまた別のメンバーについて、前記の供給源をスクリーニングすることができるであろう。

【0040】

多くの場合、単離されるcDNA配列は不完全で、ポリペプチドをコードする領域は短く (通常は5'末端で) 切断されているであろう。完全長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用い、上流の配列 (例えばプロモーター及び調節エレメント) を検出するための当技術分野で公知の種々の方法を用いて伸長させることができる。例えば、使用され得るある方法は、cDNA末端迅速増幅法 (RACE; 例えば以下を参照されたい: Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988) 85: 8998 - 9002) に基づく。前記技術の最近の改変 (例えばマラソン (Marathon) (商標) 技術 (Clontech Laboratories Inc.) により例示される) は、より長いcDNAの検索を顕著に単純化している。"制限部位" PCRと称されるわずかに異なる技術では、普遍的プライマーを用いて、既知の遺伝子座に近接する未知の核酸配列が検索される (G. Sarkar (1993) PCR Methods Applic. 2: 318 - 322)。逆PCRも、既知の領域に基づく多様なプライマーを用いて、配列を増幅すること又は伸長することに用いられ得る (T. Triglia et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 8186)。使用され得る別の方法は捕捉PCRで、この方法は、ヒト及び酵母の人工染色体DNAにおける既知配列に近接しているDNAフラグメントのPCR増幅を含む (M. Lagerstrom et al. (1991) PCR Methods Applic. 1: 111 - 119)。未知配列を検索するために用いられ得る別の方法は、パーカーの方法である (J.D. Parker et al.(1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055 - 3060)。さらに、ゲノムDNAを少しずつ移動して調べるためにPCR、入れ子 (nested) プライマー及びプロモーターファインダーTM (PromoterFinderTM) ライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA) を用いてもよい。この方法ではライブラリーのスクリーニングが不要で、イントロン/エクソン結合部の発見に有用である。

【0041】

10

20

30

40

50

完全長cDNAをスクリーニングする場合、より大きなcDNAを包含するようにサイズ選択されたライブラリーを用いることが好ましい。さらにまた、遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含むという点で、ランダムプライミングした(random-primed)ライブラリーが好ましい。ランダムプライムライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを生成できない状況で特に好まれ得る。ゲノムライブラリーは、5'非転写調節領域に配列を伸長させるために有用であり得る。

本発明のある態様では、染色体上の位置特定のために、本発明の核酸分子を用いることができる。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に対して特異的に標的化され、個々のヒト染色体上の特定の位置とハイブリダイズさせることができる。本発明の関連配列の染色体上へのマッピングは、遺伝子関連疾患に関する配列の相関性確認において重要な工程である。いったん染色体の正確な位置に配列がマッピングされたら、前記配列の染色体上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、例えば以下で見出すことができる：V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (ジョーンズホプキンス大学、ウェルチ医学図書館を通じてオンラインで利用可能である)。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、次に連鎖解析(物理的に近接する遺伝子の同時遺伝(coinheritance))によって同定する。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を検索する研究者に貴重な情報が提供される。いったん疾患又は症候群の位置が遺伝連鎖によって特定のゲノム領域で大まかに限局されたら、前記領域にマッピングされるいずれの配列も、更なる解析のための関連遺伝子又は調節遺伝子となることができる。前記核酸分子はまた、正常な個体、キャリア個体又は罹患個体間で転座、逆位などによる染色体位置上の相違を検出するために用いることができる。

10

20

【0042】

本発明の核酸分子はまた、組織分布同定(tissue localisation)のために貴重である。そのような技術は、ポリペプチドをコードするmRNAの検出によって、組織中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、生物内での前記ポリペプチドの正常な機能を示唆する。さらに、変異遺伝子によってコードされるmRNAの発現パターンと正常mRNA発現パターンとの比較研究によって、変異ポリペプチドの疾患における役割に対する貴重な洞察が提供される。そのような不適切な発現は時間的、位置的又は量的性質を有する場合もある。

30

遺伝子サイレンシングアプローチを実施して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内在性発現をダウンレギュレートすることもできる。RNA干渉(RNAi)(S.M. Elbashir et al. Nature 2001, 411, 494-498)は、使用可能な配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのための1つの方法である。短いdsRNAオリゴヌクレオチドをin vitroで合成して細胞内に導入する。これらdsRNAの配列特異的結合によって標的mRNAの分解が開始され、標的タンパク質の発現が減少又は阻害される。

上記に述べた遺伝子サイレンシングの有効性は、ポリペプチド発現の測定(例えばウェスタンブロッティングによる)、又はタックマン(TaqMan)に基づく方法を用いるRNAレベルの測定によって評価することができる。

40

【0043】

本発明のベクターは本発明の核酸分子を含み、クローニングベクターでも発現ベクターでもよい。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。

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の前記ポリペプチドをコードする核酸分子の発現によって、リコンビナント形態で調製することができる。前記のような発現方法は当業者によく知られており、多くは以下の文献でより詳細に記述されている：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)。

50

【0044】

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを生成させるために、核酸分子の維持、増殖又は発現に適したいずれの系又はベクターも用いることができる。周知であり日常的である種々の技術のいずれによっても（例えば前掲書（Sambrook et al.）に記載されたようなもの）、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エレメント（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配列を形質転換宿主細胞でRNAに転写させることができる。

適切な発現系の例には、例えば染色体系、エピソーム系及びウイルス由来系、例えば以下に由来するベクターが含まれる：細菌プラスミド、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及びレトロウイルス、又は上記の組合せ、例えばプラスミドとバクテリオファージの遺伝子エレメントに由来するもの（例えばコスミド及びファージミドを含む）。ヒト人工染色体（HAC）もまた、プラスミドに包含させ発現させるよりも大きいDNAフラグメントを搬送するのに用いることができる。

【0045】

特に適切な発現系には、リコンビナント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された微生物（例えば細菌）；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；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）で形質転換した植物細胞系；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。

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マニュアル（例えば、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) 及び上掲書（Sambrook et al.））に記載された方法によって達成できる。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デキストラン仲介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、陽イオン脂質仲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、擦過ローディング（scrape loading）、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、その系の要求に応じて一過性（例えば、エピソーム性）又は永続的（染色体組込み）であり得る。

【0046】

コード核酸分子は、所望であれば、例えば翻訳ポリペプチドの小胞体内腔、細胞膜周辺腔又は細胞外環境への分泌のために、シグナルペプチド又はリーダー配列のような制御配列をコードする配列を含んでいても、又は含んでいなくてもよい。これらのシグナルは前記ポリペプチドにとって内因性であってもよく、又は異種シグナルであってもよい。リーダー配列は、翻訳後プロセッシングで細菌宿主によって取り除くことができる。

コントロール配列の他に、宿主細胞の増殖に関連して前記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望ましい場合がある。調節配列の例は、化学的又は物理的刺激（調節化合物の存在を含む）又は多様な温度若しくは代謝条件に应答して遺伝子の発現を増加させたり低下させたりする配列である。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て、転写及び翻訳を実行する。そのような調節配列は、その強度及び特異性を変化させることができる。利用されるベクター系及び宿主に依存して、多くの適切な転写及び翻訳エレメント（構成性及び誘発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、誘発性プロモーター、例えばBluescriptファージミド（Stratagene, La Jolla, CA）又はpSport1（商標）プラス

10

20

30

40

50

ミド (Gibco BRL) などのハイブリッド lacZ プロモーターを用いることができる。バキュロウイルスポリヘドリン (polyhedrin) プロモーターは、昆虫細胞で用いることができる。植物細胞ゲノムに由来するプロモーター又はエンハンサー (例えば熱ショック、RUBISCO 及び貯蔵タンパク質遺伝子) 又は植物ウイルスに由来するプロモーター又はエンハンサー (例えばウイルスプロモーター又はリーダー配列) は、ベクターヘクローニングすることができる。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子由来又は哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。配列の多数コピーを含む細胞株の作製が必要な場合、SV40 又は EBV をベースとするベクターが、適切な選択マーカーとともに用いられ得る。

【0047】

発現ベクターは、特定の核酸コード配列を適切な調節配列とともにベクター内に配置させることができるように構築される。前記コード配列の調節配列に関する位置及び向きは、前記コード配列が調節配列の“制御”下で転写されるような位置及び向きである (すなわちコントロール配列にて DNA 分子と結合する RNA ポリメラーゼは、前記コード配列を転写する)。いくつかの事例では、前記配列を適切な向きで制御配列に付属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であろう。

10

コントロール配列及び他の調節配列は、ベクターへの挿入の前に核酸コード配列に連結させることができる。あるいは、コントロール配列及び適切な制限部位を既に含む発現ベクターへ、コード配列を直接クローニングすることができる。

リコンビナントポリペプチドの長期的かつ高収量の生成のためには、安定な発現が好ましい。例えば、対象のポリペプチドを安定に発現する細胞株は、ウイルスの複製起点及び/又は内因性発現エレメント並びに選択マーカー遺伝子を同じ又は別個のベクター上に含む発現ベクターを用いて形質転換させることができる。ベクターの導入に続き、選択培地に切り替える前に細胞を栄養 (enriched) 培地で 1 - 2 日間増殖させることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することで、選択マーカーの存在によって、導入された配列をうまく発現する細胞の増殖及び回収が可能になる。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞の種類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

【0048】

発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞株は当技術分野で公知であり、米国菌培養収集所 (American Type Culture Collection, ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。そのような細胞株には、例えばチャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa 細胞、ベイビーハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎 (COS) 細胞、C127 細胞、3T3 細胞、BHK 細胞、HEK293 細胞、ボウズ (Bowes) メラノーマ細胞及びヒト肝細胞癌 (例えば HepG2) 細胞及び他の多数の細胞株が挙げられるが、これだけに限られない。

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は、特にインビトロジェン (Invitrogen, San Diego, CA) からキットの形態で (“MaxBac” キット) 商業的に入手可能である。そのような技術は一般的に当業者に知られており、文献には完全に記載されている (Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555(1987))。この系での使用に特に適切な宿主細胞には、昆虫細胞、例えば

40

ドロソフィラ (*Drosophila*) S2 細胞及びスポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9 細胞が含まれる。当技術分野で公知である多くの植物細胞培養及び植物体 (whole plant) 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、米国特許第 5,693,506 号、5,659,122 号及び 5,608,143 号に記載されるものが含まれる。植物細胞培養における遺伝子発現の更なる例は、文献に記載されている (Zenk (1991) *Phytochemistry* 30: 3861 - 3863)。

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形成することが可能な植物は全て利用することができ、それによって移入遺伝子を含む完全な植物が回収できる。特に、サトウキビ、サトウダイコン、綿花、果実及び他の樹木、マメ類及び野菜の主要な種の全てを含む (ただしこれらに限定されない) 全ての植物は、培養細胞又は培養組織から再生させることができる。

50

【 0 0 4 9 】

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)、ストレプトマイセス及びパチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) 細胞が含まれる。

真菌での発現に特に適切な宿主細胞の例には、酵母細胞 (例えばS.セレピシエ (cerevisiae)) 及びアスペルギルス細胞が含まれる。

形質転換細胞株の回収に用いることができる多くの選択系は、当技術分野で公知である。そのような例としては、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 (I. Lowy et al. (1980) Cell 22: 817 - 23) の遺伝子が挙げられ、これらはそれぞれ tk - 又は aprt ± 細胞で用いることができる。

さらにまた、抗代謝物質耐性、抗生物質耐性又は除草剤耐性を選択基準として用いてもよい。例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) はメトトレキセートに対する耐性を付与し (M. Wigler et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567 - 70)、nptはアミノグリコシド系ネオマイシン及びG - 418に対する耐性を付与し (F. Colbere - Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150: 1 - 14)、さらに als 又は pat はそれぞれクロロスルフロン (chlorsulfuron) 及びホスフィノトリシン (phosphinotricin) アセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する。さらに別の選択可能な遺伝子が報告されており、それらの例は当業者には明白であろう。

【 0 0 5 0 】

マーカー遺伝子の発現の有無は対象の遺伝子も存在することを示唆するが、対象の遺伝子の存在及び発現を確認する必要がある。例えば、関連配列がマーカー遺伝子配列内に挿入されている場合、マーカー遺伝子機能が存在しないことによって、適切な配列を含む形質転換細胞を識別することができる。あるいは、マーカー遺伝子は、ただ1つのプロモーターの制御下に、本発明のポリペプチドをコードする配列とともに直列に配置することができる。通常、誘発又は選択に应答するマーカー遺伝子の発現は、直列遺伝子の発現も示している。

あるいは、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、当業者に知られている多様な手法で同定することができる。前記手法には、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ソーティング (FACS) 又はイムノアッセイ技術 (例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及び放射性イムノアッセイ (RIA)) が含まれ (ただしこれらに限定されない)、核酸又はタンパク質の検出及び/又は定量的のためにメンブレン、溶液又はチップをベースとする技術が含まれる (例えば以下を参照されたい: R. Hampton et al. (1990) Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN; 及び D.E. Maddox et al. (1983) J. Exp. Med. 158: 1211 - 1216)。

【 0 0 5 1 】

多様な標識及び結合技術が当業者に知られており、種々の核酸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近縁な配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプローブの作製手段には、標識したポリヌクレオチドを用いるオリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識又はPCR増幅が含まれる。あるいは、本発明のポリペプチドをコードする配列をベクターにクローニングして mRNA プローブを作製することができる。そのようなベクターは当技術分野で公知であって、商業的に入手可能であり、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り in vitro で RNA プローブを合成することに用いられ得る。これらの手法は、商業的に入手可能な種々のキット (Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, MI); Promega (Madison, WI); U.S. Biochemical Corp., (Cleveland, OH)) を用いて実施することができる。

検出を容易にするために用いられ得る適切なレポーター分子又は標識には、放射性核種、酵素及び蛍光、化学発光又は色素生産性物質、基質、コファクター、阻害剤、磁性粒子などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0052】

本発明の核酸分子は、トランスジェニック動物（特にげっ歯類動物）の作製にも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、本発明の別の観点を構成する。そのような作製は、体細胞の改変によって局部的に、又は遺伝性改変を導入する生殖細胞系列療法によって実施することができる。前記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モジュレーターとして有効な薬剤分子のための動物モデルを作製するために特に有用であり得る。

ポリペプチドは、周知の方法によってリコンビナント細胞培養物から回収し精製することができる。前記周知の方法には、硫酸又はエタノール沈澱、酸性抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸化セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用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及びレクチンクロマトグラフィーが含まれる。高性能液体クロマトグラフィーは、精製に特に有用である。単離及び精製の間ポリペプチドが変性した場合には、タンパク質のリフォールディングのためによく知られている技術を用いて活性化高次構造を再生することができる。

10

【0053】

所望の場合には、可溶性タンパク質の精製を容易に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本発明のポリペプチドをコードする配列を連結させることにより特殊化したベクター構築物も、タンパク質の精製を容易にするために用いることができる。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（例えば固定化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、固定化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/アフィニティー精製システム（Immunex Corp., Seattle, WA）で用いられるドメイン）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（Invitrogen, San Diego, CA）に特異的なもの）を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に包含させて、精製を容易にすることに用いてもよい。そのような発現ベクターの1つは、チオレドキシ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させ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。ヒスチジン残基は、IMAC（固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー；J. Porath et al. (1992) Prot. Exp. Purif. 3: 263-281）により精製を容易にし、一方、チオレドキシ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ついての考察は以下で提供される：D.J. Kroll et al. (1993) DNA Cell Biol. 12: 441-453）。

20

30

【0054】

スクリーニングアッセイで使用するためにポリペプチドを発現させる場合は、前記ポリペプチドを発現する宿主細胞の表面で前記ポリペプチドを生成させることが一般には好ましい。この場合、宿主細胞はスクリーニングアッセイで使用する前に、例えば蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）又はイムノアフィニティー技術のような技術を用いて収穫することができる。ポリペプチドが培養液中に分泌される場合は、前記培養液を回収して発現されたポリペプチドを回収及び精製することができる。ポリペプチドが細胞内で生成される場合、ポリペプチドを回収する前に、先ず初めに細胞を溶解させねばならない。

40

本発明のポリペプチドを用いて、種々の薬剤スクリーニング技術のいずれかで化合物ライブラリーをスクリーニングすることができる。そのような化合物は、本発明のポリペプチドの遺伝子発現レベル又は活性レベルを活性化させる（アゴニスト作用）か、又は阻害する（アンタゴニスト作用）ことができ、本発明のさらなる観点を形成し得る。好ましい化合物は、本発明の第一の観定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ことに有効であるか、又は本発明の第一の観定のポリペプチドの活性を調節することに有効である。

アゴニスト化合物又はアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリー又は天然物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

50

タゴニストは、天然の又は改変された、基質、リガンド、酵素、レセプター、構造的模倣物質若しくは機能的模倣物質であってもよい。前記のようなスクリーニング技術の適切な概論については、以下を参照されたい：Coligan et al.(1991) Current Protocols in Immunology 1(2) : Chapter 5。

【 0 0 5 5 】

良好なアンタゴニストである可能性が高い化合物は、本発明のポリペプチドと結合し、結合しているときに前記ポリペプチドの生物学的作用を誘発しない分子である。強力なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドと結合し、それによって本発明のポリペプチドの活性を阻害又は消滅させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチド及び抗体が含まれる。そのようなやり方で、前記ポリペプチドと正常な細胞の結合分子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阻害され得る。

10

こ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、固相支持体に固定されていても、細胞表面に保持されていても、又は細胞内に位置していてもよい。一般に、このようなスクリーニングの方法は、前記のポリペプチドを発現している適切な細胞又は細胞膜を用いることを含み、前記細胞又は細胞膜をテスト化合物と接触させて、結合又は機能的応答の刺激若しくは阻害を観察する。続いて前記テスト化合物と接触させた細胞の機能的応答を、前記テスト化合物と接触させなかったコントロール細胞と比較する。こ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評価することができる。活性化の阻害剤は、一般的には既知のアゴニストの存在下でアッセイを行われ、テスト化合物の存在下でのアゴニストによる活性化の影響が観察される。

20

【 0 0 5 6 】

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化合物を同定する好ましい方法は、以下の工程を含む：

(a) 本発明の第一の観点のポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に応答して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れており；さらに

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用によって生じるシグナルのレベルを測定することにより、前記化合物が前記ポリペプチドと結合しこれを活性化するか又は阻害するかを決定する工程。

30

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) 前記ポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に応答して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れており；さらに

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用によって生じるシグナルレベルを前記化合物が存在しないときのシグナルレベルと比較することにより、前記化合物が前記ポリペプチドと結合しこれを活性化するか又は抑制するかを決定する工程。

40

さらに好ましい態様では、上述の一般的な方法が、前記ポリペプチドに対する標識又は非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行う工程をさらに含む得る。

【 0 0 5 7 】

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の別の態様は、以下の工程を含む：

本発明のポリペプチドをその表面に有する細胞とリガンドとの結合又は前記のポリペプチドを含む細胞膜とリガンドとの結合の抑制を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で候補化合物を存在させて決定する工程、及び前記ポリペプチドに結合したリガンドの量を決定する工程。リガンドの結合の減少をひき起こし得る化合物は、アゴニスト又は

50

アンタゴニストであると考えられる。好ましくは、前記リガンドが標識されている。

より詳しくは、アンタゴニスト又はアゴニスト化合物をポリペプチド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) 本発明のポリペプチドをその表面に発現している全細胞又は本発明のポリペプチドを含む細胞膜と、標識リガンドとをインキュベートする工程；

(b) 前記全細胞又は細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 工程(a)の標識リガンド及び前記全細胞又は細胞膜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) 前記全細胞又は細胞膜と結合した標識リガンドの量を工程(c)の後で測定する工程；さらに

(e) 工程(b)及び工程(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、それにより工程(d)結合の減少をひき起こす化合物はアゴニスト又はアンタゴニストであると考え前記工程。

【0058】

上述のある態様では、単純な結合アッセイを用いてもよい。この場合、テスト化合物のポリペプチド保持表面への付着が、直接的又は間接的にテスト化合物と結合させた標識手段によって検出されるか、又は標識競合物質との競合を含むアッセイで検出される。別の態様では、競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この場合、ポリペプチドと特異的に結合することができる中和抗体が、結合についてテスト化合物と競合する。このようにして、前記抗体を用いて、前記ポリペプチドに対し特異的な結合親和性を保

有する一切のテスト化合物の存在を検出することができる。
当業者であれば、本発明のポリペプチドのモジュレーターを同定するためのアッセイを工夫し得るであろう。これに関連して、アンタゴニスト(この場合では、中和抗体)を同定するためのアッセイ例を報告している Lokker NAらの文献(J Biol Chem 1997 Dec 26; 272(52): 33037-44)が興味深い。

【0059】

前記ポリペプチドをコードするmRNAの細胞内産生に対する添加テスト化合物の影響を検出するアッセイをデザインすることもできる。例えば、当技術分野で公知の標準的な方法によりモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌レベル又は細胞結合レベルを測定するELISAを構築することができ、前記ELISAを用いて、適切に操作された細胞又は組織からのポリペプチド生成を阻害又は増強し得る化合物について検索することができる。続いて、前記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。

さらにまた本発明の範囲内に含まれるアッセイ方法は、過剰発現アッセイ又は除去(ablation)アッセイで本発明の遺伝子及びポリペプチドの使用を必要とするものである。前記のアッセイは、これら遺伝子/ポリペプチドの細胞内レベルの操作及びこの操作事象による前記被操作細胞の生理機能に対する影響の評価を含む。例えばそのような実験によって、特定の遺伝子/ポリペプチドが関与するシグナル伝達経路及び代謝経路の詳細が明らかにされ、本研究対象のポリペプチドが相互作用するポリペプチドのアイデンティティーに関する情報がもたらされ、さらに関連遺伝子及びタンパク質を調節する方法についての手がかりが提供される。

【0060】

使用され得る別の薬剤スクリーニング技術は、対象のポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物の高速大量処理スクリーニングを提供する(国際特許出願W084/03564を参照されたい)。前記方法では、多数の異なる小型のテスト化合物が固相支持体上で合成され、次に本発明のポリペプチドと反応させられ洗浄され得る。ポリペプチドを固定する方法の1つは、非中和抗体を使用することである。続いて、当技術分野で周知の方法を用いて、結合ポリペプチドを検出することができる。精製ポリペプチドはまた、前述の薬剤スクリーニング技術で使用するために、プレート上に直接被覆させることができる。

当技術分野で公知の標準的なレセプター結合技術により膜結合レセプター又は可溶性レ

10

20

30

40

50

セプターを同定するのに、本発明のポリペプチドが用いられ得る。前記標準的な技術は、例えばリガンド結合アッセイ及び架橋アッセイであり、そのようなアッセイでは、ポリペプチドが放射性同位体で標識されているか、化学的に改変されているか、又はその検出若しくは精製を容易にするペプチド配列と融合されており、推定上のレセプター供給源（例えば細胞の組成物、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。結合の有効性は、生物物理的技術、例えば表面プラズモン共鳴及び分光法を用いて測定することができる。結合アッセイは、レセプターの精製及びクローニングのために用いることができるが、ポリペプチドとそのレセプターとの結合に競合する前記ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストを同定するためにも用いることができる。スクリーニングアッセイを実施する標準的方法は、当技術分野ではよく理解されている。

10

【0061】

本発明はまた、上記で述べるアゴニスト、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に有用なスクリーニングキットを含む。

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

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組合せて含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、下記で詳細に説明するように、治療用若しくは診断用試薬として、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。

20

本明細書で用いられる専門用語にしたがえば、ポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物{X}を含む組成物は、組成物中のX+Yの合計の少なくとも85質量%がXである場合に不純物（本明細書中ではY）を“実質的に含まない”。好ましくは、Xが組成物中のX+Yの合計の少なくとも約90質量%、より好ましくは少なくとも約95質量%、98質量%又は99質量%を構成する。

【0062】

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べきである。本明細書で用いられる“治療的に有効な量”という用語は、標的疾患又は症状を治療、緩和若しくは予防するために、又は検出可能な治療効果若しくは予防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、治療的に有効な投与量は、最初に細胞培養アッセイ（例えば新生物細胞培養アッセイ）又は動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌ又はブタ）のいずれかで見積もることができる。動物モデルは、適切な濃度範囲及び投与経路の決定にも用いることができる。次にそのような情報を用いて、ヒトで有用な投与用量及び投与経路を決定することができる。

30

ヒト対象者に対する正確な有効量は、疾患状態の重篤度、対象者の全身の健康状態、対象者の年齢、体重及び性別、食事、投与時間及び投与回数、併用薬剤、反応感受性及び治療に対する許容性/応答性に依存するであろう。この量は、日常的検査により決定することができ、それは臨床医の判断の範囲内である。一般には、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。本組成物は、患者に個別に投与されてもよく、又は他の薬剤、医薬品又はホルモンと一緒に投与されてもよい。

40

【0063】

医薬組成物はまた、治療薬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、遺伝子並びに他の治療薬剤（例えばリポソーム）が含まれるが、ただし担体がそれ自体で前記組成物を投与される個体に有害な抗体の産生を誘発せず、かつ不都合な毒性をもたらすことなく投与され得ることを条件とする。適切な担体は、大型で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、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマー及び不活性ウイルス粒子であり得る。

医薬組成物に、医薬的に許容できる塩、例えば鉍酸塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような）；及び有機酸の塩（酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安

50

息香酸塩などのような)を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綿密な考察は以下のテキストで入手可能である: 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は、さらに液体、例えば水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールを含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝物質などのような助剤が、前記組成物中に存在していてもよい。そのような担体は、患者が摂取できるように、前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などとして製剤化することを可能にする。

【0064】

いったん製剤化されたら、本発明の組成物を直接対象者に投与することができる。治療される対象者は動物で、特にヒト対象者が治療され得る。 10

本発明で用いられる医薬組成物は、多数の経路(経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜下腔内、心室内、経皮的アプリケーション(例えばW098/20734を参照)、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内又は直腸的手段が挙げられるが、ただしこれらに限定されない)によって投与できる。遺伝子銃又はハイポスプレーもまた、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、本治療用組成物は、注射用物質(液体溶液又は懸濁剤のいずれか)として調製できる。注射に先立ち液体ビヒクルで溶液又は懸濁液とするのに適する固体を調製することもできる。

本組成物の直接的デリバリーは一般に、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、又は組織の間隙腔に送達されるであろう。前記組成物はまた、病巣に投与してもよい。投薬治療は、単回投与スケジュールでも複数回投与スケジュールでもよい。 20

本発明のポリペプチドの活性が特定の疾患状態において過剰である場合には、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、医薬的に許容できる担体とともに上記のような阻害化合物(アンタゴニスト)を、前記ポリペプチドの機能を阻害するのに有効な量で対象者に投与することを含む。前記ポリペプチドの機能の阻害は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を遮断することによって、又は第二のシグナルを阻害することによって成され、それによって異常な症状が緩和される。好ましくは、前記アンタゴニストが抗体である。最も好ましくは、そのような抗体が、先に記載するような免疫原性を最少にするキメラ抗体及び/又はヒト化抗体である。 30

【0065】

別のアプローチでは、リガンド、基質、酵素、レセプターに対する結合親和性を保持する該ポリペプチドの可溶性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、関連部分を保持するフラグメントの形態で投与することができる。

また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、内部で生成される又は別々に投与されるアンチセンス核酸分子(上述のような)の使用といった発現遮断技術を用いて、阻害することができる。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'領域又は調節領域(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)に対して相補的な配列又はアンチセンス分子(DNA、RNA又はPNA)をデザインすることによって達成できる。同様に、阻害は“三重らせん”塩基対方法論を用いて達成することができる。三重らせん対形成は、ポリメラーゼ、転写因子又は調節分子の結合のために二重らせんが充分に開く能力を阻害することから有用である。三重らせんDNAを用いる近年の治療上の進歩は、文献に記載されている(J.E. Gee et al.(1994) In: B.E. Huber & B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY)。相補的配列又はアンチセンス分子をデザインし、リボソームに対する結合を妨げて転写を妨害することによってmRNAの翻訳を遮断することもできる。そのようなオリゴヌクレオチドは投与されてもよいし、またin vivoでの発現によりin situで生成させてもよい。 40

【0066】

さらに、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 50

用いることによって妨げることができる。リボザイムは、天然又は合成であり得る触媒的活性型のRNAである（例えば以下を参照されたい：N. Usman et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*(1996) 6(4) : 527 - 533）。合成リボザイムをデザインして、選択した位置でmRNAを特異的に切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を妨げることができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるような、天然のリボースリン酸骨格及び天然の塩基を用いて合成され得る。或いは、リボザイムは、非天然の骨格（例えば2'-0-メチルRNA）を用いて合成されて、リボヌクレアーゼ分解から保護されてもよく、また改変塩基を含んでいてもよい。

RNA分子は、細胞内安定性及び半減期を増加させるように改変されてもよい。可能な改変には、RNA分子の5'及び/又は3'末端へのフランキング配列の付加、又は分子の骨格内でホスホジエステル結合に代わるホスホロチオエート又は2'-0-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限られない。この概念は、PNAの生成にも受け継がれ、内因性エンドヌクレアーゼによって同様に容易には認識されないイノシン、ケオシン(gueosine)及びブトシン(butosine)のような非慣用塩基、並びにアセチル-、メチル-、チオ-及び同様な改変形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミン及びウリジンの包含によってPNA分子の全てに広げられ得る。

【0067】

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な状態を治療するためには、いくつかのアプローチも利用可能である。あるアプローチは、前記ポリペプチドを活性化する化合物（すなわち上記で述べたアゴニスト）の治療的に有効な量を対象者に投与し、異常な状態を緩和することを含む。あるいは、本ポリペプチドの治療量を適切な医薬担体と組合せて投与し、関連性のあるポリペプチド生理学的バランスを回復させることができる。

遺伝子治療を用い、対象者の関連細胞によって本ポリペプチドの内因性産生を行わせることができる。遺伝子治療は、欠陥のある遺伝子を修正した治療用遺伝子と置き換えることによって、前記ポリペプチドの不適切な生成を永久的に治療することに用いられる。

本発明の遺伝子治療は、*in vivo*又は*ex vivo*で実施することができる。*ex vivo*遺伝子治療は、患者の細胞の単離及び精製、治療用遺伝子の導入、及び遺伝的に改変した細胞を患者に戻して導入することを必要とする。対照的に、*in vivo*遺伝子治療は、患者の細胞の単離及び精製を必要としない。

【0068】

治療用遺伝子は、患者に投与するために、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、リボソームのような非ウイルス性、又は、例えばK.L. Berkner (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158 : 39 - 66に記載されているアデノウイルスのような複製欠損ウイルス若しくはN. Muzyczka (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158 : 97 - 129及び米国特許第5,252,479号に記載されているアデノ付随ウイルス(AAV)ベクターであり得る。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させるために、操作され得る。次に、この発現構築物は単離されて、前記ポリペプチドをコードするRNAを含有する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細胞に導入され得る。その結果、前記パッケージ細胞は、対象の遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生することができるようになる。これらのプロデューサー細胞は、*in vivo*で細胞を操作するため及び*in vivo*でポリペプチドを発現させるために、対象者に投与することができる（以下を参照されたい：Gene Therapy and Other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20（及びその中に引用された文献）, “Human Molecular Genetics” (1996) T. Strachan & A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.）。

【0069】

別のアプローチは“裸のDNA”の投与で、この場合、治療用遺伝子が血流又は筋肉組織に直接注射される。

本発明のポリペプチド又は核酸分子が疾患をひき起こす原因物質である場合には、本発

10

20

30

40

50

明は、前記疾患をひき起こす原因物質に対する抗体を生成するワクチンとして用いることができる前記ポリペプチド又は核酸分子を提供する。

本発明のワクチンは、予防的（すなわち、感染を防ぐ）であっても治療的（すなわち、感染後の疾患を治療する）であってもよい。そのようなワクチンは、免疫性を付与する抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質又は核酸を、通常は上記で述べた医薬的に許容できる担体と組合せて含む。前記担体には、組成物を投与される個体に対して有害な抗体の産生をそれ自体で誘発しない担体のいずれもが含まれる。さらに、これらの担体は免疫刺激剤（“アジュバント”）として機能してもよい。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.ピロリ菌（pyroli）由来の類毒素）及び他の病原体と結合されてもよい。

10

ポリペプチドは胃で分解されるので、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製剤には、水性及び非水性の無菌注射溶液、並びに水性及び非水性の無菌懸濁剤が含まれる。前記無菌注射溶液は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤をレシピエントの血液に対して等張にする溶質を含んでいてもよく、前記無菌懸濁剤は、懸濁剤又は増粘剤を含んでもよい。

【0070】

本発明のワクチン製剤は、単位用量又は複数単位用量の容器で提供されてもよい。例えば、密封されたアンプル及びバイアルでの提供は、使用直前に無菌液状担体を添加すること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比活性に依存し、日常的な検査によって容易に決定することができる。

20

本発明のポリペプチドに結合する抗体の遺伝子デリバリーは、例えば国際特許出願W098/55607に記載されているように行われてもよい。

ジェット式注射（jet injection）と呼ばれている技術（例えば、www.powderject.comを参照）が、ワクチン組成物の処方にも有用であり得る。

ワクチン接種及びワクチンデリバリーシステムに適切な多数の方法が、国際特許出願W000/29428に記載されている。

【0071】

本発明はまた、診断薬としての本発明の核酸分子の使用に関する。本発明の核酸分子により特徴付けられ、機能不全に付随する遺伝子の変異型の検出は、前記遺伝子の過小発現、過剰発現又は位置的若しくは時間的発現の変化から生じる疾患の診断、又はそのような疾患に対する感受性の診断を規定するか又はそれら診断に付け加えることができる診断ツールを提供する。前記遺伝子に変異を保有する個体は、種々の技術によってDNAレベルで検出することができる。

30

診断のための核酸分子は、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を直接検出に用いてもよいし、又はPCR、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）若しくは他の増幅技術を分析に先立って用いることによって、ゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい（以下の文献を参照されたい：Saiki et al., Nature 324: 163 - 166(1986); Bej et al., Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol., 26: 301 - 334(1991); Birkenmeyer et al., J. Virol. Meth., 35: 117 - 126(1991); Van Brunt, J., Bio/Technology, 8: 291 - 294(1990)）。

40

【0072】

ある態様では、本発明のこの観点は、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評価すること、及び前記発現レベルをコントロールのレベルと比較することを含む、患者における疾患を診断する方法を提供する。この場合、前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する。前記方法は、以下の工程を含み得る：

a) 本発明の核酸分子と核酸プローブとの間で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、患者由来の組織サンプルを前記核酸プローブと接触させる工程；

b) 工程 a) で用いた条件と同じ条件下で、コントロールサンプルを前記プローブと接

50

触させる工程；及び、

c) 前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程；

この場合、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は、疾患を示唆する。

本発明のさらなる観点は、以下の工程を含む診断方法を含む：

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；及び、

c) 疾患に付随する前記核酸分子における変異の存在を検出することによって、患者を疾患について診断する工程。

【0073】

上記に記載した方法における核酸分子の検出を補助するために、増幅工程、例えばPCRの使用が含まれ得る。

正常な遺伝子型と比較すると、増幅産物におけるサイズの変化によって、欠失及び挿入が検出される。点変異は、増幅DNAを本発明の標識RNAとハイブリダイズさせるか、あるいは本発明の標識アンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることによって同定することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によって、又は溶融温度における差異を評価することによって、ミスマッチを有する二重鎖と区別することができる。DNAをストリンジентな条件下で前記DNAとハイブリダイズする核酸プローブと接触させてハイブリッド二本鎖分子を形成させること（前記ハイブリッド二本鎖は、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分で前記核酸プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分を有する）、及び、前記プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分の有無を前記DNA鎖の対応部分における疾患付随変異の有無を示すものとして検出することによって、患者における変異の有無を検出することができる。

前記のような診断は特に出生前検査で有用であり、新生児検査でもなお有用である。

【0074】

参照遺伝子と“変異”遺伝子との間の点変異及び他の配列的相違は、他の周知の技術、例えば直接DNAシーケンシング又は一本鎖構造多型性（Orita et al., *Genomics*, 5: 874-879 (1989)）によって同定できる。例えば、シーケンシングプライマーは、二本鎖PCR産物又は改変PCRによって作製された一本鎖テンプレート分子とともに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方法によって、又は蛍光タグを用いる自動シーケンシング法によって実施される。クローン化DNAセグメントを、特異的DNAセグメントを検出するためのプローブとして用いることもできる。この方法の感受性は、PCRと併用したとき極めて増強される。さらに、点変異及び他の配列の変動（例えば多型性）は、例えば対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをただ1つのヌクレオチドが異なる配列のPCR増幅に用いることによって、上記のように検出することができる。

DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下又は非存在下でのゲル内のDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化によって、又は直接DNAシーケンシング（例えば、Myers et al., *Science* (1985) 230: 1242）によっても検出することができる。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によって、又は化学切断法（Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 85: 4397-4401を参照）によっても明らかにすることができる。

【0075】

マイクロ欠失、異数性、転座、逆位のような変異は、通常のゲル電気泳動及びDNAシーケンシングの他に、in situ分析によっても検出できる（例えば以下を参照されたい：Keller et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA (1993)）。すなわち、細胞内のDNA又はRNA配列は、それらを単離及び/又はメンブレン上に固定する必要なしに、変異について分析することができる。蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）は、現在のところ最も一般的に用いられている方法で、FISHに関する多数の概論が存在する（例えば以下を参照されたい：Trachuck et al., *Science*, 250, 559

10

20

30

40

50

-562(1990) ; 及び Trask et al., Trends, Genet., 7, 149-154(1991))。

本発明の別の態様では、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て、遺伝的変種、変異及び多型性の効率的スクリーニングを実施することができる。アレイ技術方法はよく知られていて一般的な応用性を有しており、遺伝子発現、遺伝連鎖及び遺伝的可変性を含む分子遺伝学における種々の疑問に取り組むの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), Vol 274, pp610-613)。

【0076】

ある態様では、前記アレイが、以下の文献に記載されている方法に従って調製され使用される(PCT出願W095/11995(Chee et al.) ; D.J. Lockhart et al.(1996) Nat. Biotech. 14: 1675 - 1680 ; M. Schena et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614 - 10619)。オリゴヌクレオチド対は、2つから100万個を超える範囲にわたり得る。前記オリゴマーは、光誘導化学法を用いて基板上の指定領域で合成される。基板は、紙、ナイロン又は他の種類のメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライド若しくは他の適切な固相支持体のいずれであってもよい。別の観点では、オリゴヌクレオチドは、PCT特許出願(W095/251116, Baldeschweiler et al.)に記載されているように、化学的結合方法及びインクジェット応用装置を用いることによって基板表面上で合成することができる。別の観点では、ドット(又はスロット)プロットに類似する“格子化(gridded)”アレイが、真空系、熱結合方法、UV結合方法、機械的又は化学的結合法を用いて基質表面にcDNAフラグメント又はオリゴヌクレオチドを配置すること及び連結させることに用いられ得る。上述するようなアレイは、手動で、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(適切な固相支持体すべて)及び機械(ロボット機器を含む)を用いて作製することができ、8、24、96、384、1536又は6144個のオリゴヌクレオチド、又は2つから100万個を超える範囲の他のいずれの数をも含むことができる(このことは、アレイ自体を商業的に入手可能な計測器の有効利用に向くものとしている)。

【0077】

上記で考察する方法の他に、対象者に由来するサンプルから、ポリペプチド又はmRNAの異常な増加又は低下のレベルを決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。発現低下又は発現増加は、例えば、核酸増幅、一例を挙げるとPCR、RT-PCR、RNAase保護、ノーザンプロット法及び他のハイブリダイゼーション方法のようなポリヌクレオチドの定量のために当技術分野で周知の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。

宿主に由来するサンプルで本発明のポリペプチドレベルを決定することに用いることができるアッセイ技術は当業者によく知られており、また上記でいくらか詳細に考察されている(ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンプロット分析及びELISAアッセイを含む)。本発明のこの観点では、以下の工程を含む診断方法が提供される:(a)上記のようなリガンドを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適する条件下で、生物学的サンプルと接触させる工程;及び(b)前記複合体を検出する工程。

ELISA、RIA及びFACSのようなポリペプチドレベルを測定するためのプロトコルは、ポリペプチド発現の変化レベル又は異常レベルを診断するための基礎をさらに提供することができる。ポリペプチド発現の正常値又は標準値は、正常な哺乳類対象体(好ましくはヒト)から得られた体液又は細胞抽出物を、複合体形成に適した条件下で、前記ポリペプチドに対する抗体と混合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、例えば分光測定方法によって定量することができる。

【0078】

本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体は、前記ポリペプチドの発現によって特徴付けられる症状又は疾患の診断のために、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を用いて治療されている患者をモニターするアッセイにおいて、用いることができる。診断目的に有用な抗体は、治療薬として上記で述べたのと同じ様式で調製することができる。前記ポリペプチドについての診断アッセイは、前記抗体及び標識を

用いてヒトの体液又は細胞若しくは組織の抽出物中のポリペプチドを検出する方法を含む。前記抗体は改変して、又は改変せずに用いることができ、さらにそれらをレポーター分子と共有結合又は非共有結合によって結合させることによって標識することができる。当技術分野で公知の多様なレポーター分子を用いることができ、それらのいくつかは上記に記載されている。

生検組織由来の、対象者、コントロール及び疾患サンプルで発現されているポリペプチドの量は、標準値と比較される。標準値と対象者の値との間の偏差は疾患診断のためのパラメータを確立する。診断アッセイを用いて、ポリペプチド発現の有無及び過剰を識別し、治療的処置の間のポリペプチドレベルの調節をモニターすることができる。そのようなアッセイはまた、動物実験、臨床試験又は個々の患者の治療モニタリングにおける特定の治療的処置方法の有効性を評価することに用いることができる。

10

【0079】

本発明の診断キットは、以下を含み得る：

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

本発明のある観点では、診断キットが、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の使用についての指示書を含み得る。前記キットは、ハイブリダイズして

20

いないRNAを消化するための薬剤を保持している第三の容器をさらに含んでもよい。

本発明の別の観点では、診断キットが核酸分子のアレイを含んでもよく、前記核酸分子の少なくとも1つが本発明の核酸分子であってもよい。

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つ又は2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；を含み得る。

【0080】

そのようなキットは、疾患又は疾患に対する感受性の診断に役立つであろう。そのような疾患には、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心臓疾患、神経疾患、精神疾患、発育障害、遺伝子疾患、代謝性疾患、感染及び他の病的状態が挙げられるが、これだけに限られない。これらの疾患は、特に、新生物、癌、脳腫瘍、神経膠腫、骨腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、結腸腫瘍、血管腫、骨髄増殖性疾患、白血病、血液疾患、好中球減少症、血小板減少症、新血管形成疾患、皮膚疾患、老化、創傷、熱傷、繊維症、心臓管系疾患、再狭窄、心臓病、末梢血管疾患、冠状動脈疾患、浮腫、血栓塞栓症、月経困難症、子宮内膜症、子癇前症、肺疾患、COPD、喘息骨疾患、腎疾患、糸球体腎炎、肝臓疾患、クローン病、胃炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍、免疫疾患、自己免疫疾患、関節炎、慢性関節リウマチ、乾癬、表皮水疱症、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、ライム病、多発性硬化症、神経変性、脳卒中、脳/脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、運動ニューロン疾患、神経筋疾患、HIV、AIDS、サイトメガロウイルス感染、真菌感染、眼疾患、黄斑変性、緑内障、糖尿病性網膜症、高眼圧症、及び免疫グロブリンドメイン含有細胞表面認識分子が関与している他の病的状態が含まれる。

30

40

本発明の種々の観点及び態様は、特に INSP052ポリペプチド及び INSP055ポリペプチドに関連する実施例を介して、これからより詳細に説明されるであろう。

本発明の範囲を逸脱することなく細部の改変がなされ得ることは、理解されるであろう。

【実施例】

【0081】

(実施例1：INSP052及びINSP055)

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及び配列番号14の組合せによって得られたポリペプチド配列、並びに INSP052に由来する連

50

続する複数のエクソンの翻訳物を表している配列番号16は、ヒトゲノム配列に由来している。INSP055を表しているポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列である配列番号17及び配列番号18は、それぞれ、INSP052のマウスオーソログのポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列である。マウスオーソログの存在が、ヒト配列INSP052の遺伝子モデルを支持している。

配列番号16及び配列番号18によってそれぞれ表されているINSP052ポリペプチド配列及びINSP055ポリペプチド配列は、シグナルペプチド配列及び膜貫通ドメインを含むことが予測される。

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及び配列番号14の組合せによって得られたポリペプチド配列、並びにINSP052に由来する連続する複数のエクソンの翻訳物を表している配列番号16を、NCBI非重複的配列データベースに対するBLASTクエリーとして用いた。マッチングしたものの上位10番目までが図1に示されており、それらの全てが、免疫グロブリンドメイン含有タンパク質である。

図2は、最もマッチングした既知タンパク質である胆汁糖タンパク質H(マウス)の配列に対する、INSP052クエリー配列のアラインメントを示している。

NCBI非重複的配列データベースに対するBLASTクエリーとして、ポリペプチド配列INSP055を用いた。マッチングしたものの上位10番目までが、図3に示されている。図4は、最もマッチングした既知タンパク質である胆汁糖タンパク質B(マウス)の配列に対する、INSP055クエリー配列のアラインメントを示している。

ヒト及びマウスにおけるINSP052及びINSP055転写物を表している発現配列タグ(EST)は、次のcDNAライブラリーが起源である：脳(小脳、皮質、海馬、視床下部、延髄を含む)；内耳；及び乳房。転写物は、乏突起膠腫、グリア芽細胞腫及び多発性硬化症病変部に由来するESTによっても表される。これらのことから、INSP052が上記組織からクローニングし得ること、またINSP052が上記組織の疾患と関連し得ることが示唆される。従って、本明細書に記載するポリペプチド、抗体及び他の部分(other moieties)は、上記組織の一つにおける疾患を治療することに有用性を有し得る。

【0082】

(実施例2：エクソンアッセンブリー(exon assembly)によるINSP052細胞外ドメインのクローニング)

INSP052完全長予測配列は、VEGF/PDGF受容体に関係し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属している、416アミノ酸のI型膜タンパク質をコードしている。開始ATGコドンから始まってポリA鎖までの予測ヌクレオチド配列は、長さが2025ヌクレオチドである(図5)。コード配列(cds)は、7つのエクソンにわたる(図6)。推定上のシグナル配列(1~33番目のアミノ酸をコードしている)は、エクソン1に位置している。予測膜貫通(TM)ドメイン(241~263番目のアミノ酸)をコードしている配列は、エクソン3-4の境界に位置している。

1~240番目のアミノ酸をコードしている細胞外(EC)ドメインを、エクソンアッセンブリーによって、ゲノムDNAからクローニングした。エクソンアッセンブリー法の概要を、以下にまとめる：

- PCRによって、ゲノムDNAから個別にエクソン1、2及び3を増幅した。エクソン3のリバースプライマーは、エクソン4の5'配列とオーバーラップする11塩基も含んでいた。

- ゲル精製したエクソンを混合して、第二のPCR反応を行い、リアッセンブリーされたDNAを増幅した。

- INSP052 ECドメインに対応する完全長PCR産物をゲル精製し、続いて、インビトロジェン・ゲートウェイ(Invitrogen Gateway)(商標)方法論を用いて、pDONR 201(ゲートウェイ・エンターベクター)及びpEAK12d(発現ベクター)にサブクローニングした。

【0083】

[1. INSP052細胞外ドメインをコードしているエクソンの、ゲノムDNAからのPCR増幅] エクソン1、2及び3を個別に増幅するために、PCRプライマーを設計した(表2)。

10

20

30

40

50

エクソン1のフォワードプライマー (INSP052-B1P-エクソン1F) は、ゲートウェイattB1部位の部分配列 (5' GCAGGCTTC) 及びコザック配列 (5' GCCACC) も含んでいる。エクソン1のリバースプライマー (INSP052-エクソン1R) は、エクソン2とオーバーラップする18bpを、5'末端に有する。エクソン2のフォワードプライマー (INSP052-エクソン2F) は、エクソン1とオーバーラップする18bpを、5'末端に有する。エクソン2のリバースプライマー (INSP052-エクソン2R) は、エクソン3とオーバーラップする18bpを5'末端に有する。エクソン3のフォワードプライマー (INSP052-エクソン3F) は、エクソン2とオーバーラップする17bpを、5'末端に有する。エクソン3のリバースプライマー (INSP052-エクソン3R) は、エクソン4とオーバーラップする11bpを5'末端に有する。

INSP052エクソン1の増幅のために、最終容積50 μ LでPCR反応を行った。前記50 μ LのPCR反応液は、1.5 μ LのヒトゲノムDNA (0.1 μ g/ μ L、Novagen cat.no.69237)、2 μ Lの5 mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)、6 μ LのINSP052-B1P-エクソン1F (10 μ M)、6 μ LのINSP052-エクソン1R、5 μ Lの10 \times Pwo緩衝液、及び0.5 μ LのPwoポリメラーゼ (5 U/ μ L) (Roche, cat.no. 1644955) を含んでいた。PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cにて2分間；94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、60 $^{\circ}$ Cにて30秒間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを35回；72 $^{\circ}$ Cにて5分間の付加的な伸張サイクル；4 $^{\circ}$ Cの保持サイクルであった。反応産物を1.5%アガロースゲル (1 \times TAE) 上に装荷し、Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen cat.no.28704) を用いて正しいサイズ (118 bp) のPCR産物をゲル精製し、50 μ Lの溶出緩衝液に溶出した。

エクソン2を、同一の反応条件を用いて、INSP052-エクソン2Fプライマー及びINSP052-エクソン2Rプライマーで増幅した。378 bpのPCR産物を、上述のようにゲル精製した。

エクソン3を、同一の反応条件を用いて、INSP052-エクソン3Fプライマー及びINSP052-エクソン3Rプライマーで増幅した。321 bpのPCR産物を、上述のようにゲル精製した。

【 0 0 8 4 】

[2 . INSP052細胞外ドメインをコードするエクソンのアッセムブリー]

5 μ Lのゲル精製した各エクソン、2 μ Lの5 mM dNTPs、6 μ LのINSP052-B1P-エクソン1F (10 μ M)、6 μ LのINSP052-5HIS-R (10 μ M)、5 μ Lの10 \times Pfu緩衝液、14.5 μ LのH₂O及び0.5 μ LのPfuポリメラーゼ (3 U/ μ L ; Promega cat. no. M774B) を含むPCR反応で、エクソン1、2及び3-4をリアッセムブリーした。反応条件は、次の通りであった：94 $^{\circ}$ Cにて4分間；94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、48 $^{\circ}$ Cにて30秒間、70 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを10回；94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、52 $^{\circ}$ Cにて30秒間、70 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを25回；70 $^{\circ}$ Cにて10分間の付加的な伸張工程；4 $^{\circ}$ Cにて保持サイクル。反応産物を、1.5%アガロースゲル (1 \times TAE) 上で分析した。Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen cat.no.28704) を用いて正しいサイズ (750 bp) のPCR産物をゲル精製し、50 μ Lの溶出緩衝液 (Qiagen) に溶出した。得られた産物 (INSP052 EC ORF) は、5'末端でattB1部位及びコザック配列にフランキングされ、3'末端で5HISタグコード配列にフランキングされている、INSP052 ECドメインのORFを含む。

【 0 0 8 5 】

[3 . INSP052 ECドメインORFのpDONR201へのサブクローニング]

50 μ Lの最終容積中に2 μ Lのゲル精製INSP052 EC ORF、2 μ Lの5 mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)、6 μ LのGCP-フォワード (10 μ M)、6 μ LのGCP-リバース (10 μ M)、5 μ Lの10 \times Vent緩衝液及び0.5 μ LのVent DNAポリメラーゼ (2 U/ μ L) (New England Biolabs, cat.no.M0254S) を含むPCR反応にて、完全長INSP052 ECドメイン配列の5'及び3'末端に、AttB1組換え部位及びattB2組換え部位を付加した。PCR条件は、次の通りであった：94 $^{\circ}$ Cにて2分間；94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを30回；72 $^{\circ}$ Cにて3分間の付加的な伸張工程；4 $^{\circ}$ Cにて保持サイクル。反応産物を1.5%アガロースゲル (1 \times TAE) 上で分析し、Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen cat.no.28704) を用いて正しいサイズ (808 bp) のPCR産物を、50 μ Lの溶出緩衝液 (Qiagen) に溶出した。BPクローナーゼを用いて、精製PCR産物 (ゲートウェイ改変INSP052 ECドメイン) を、次のようにpDONR201に導入した：5 μ Lのゲートウェイ改変INSP052 ECドメインを、1.5 μ LのpDONR201 (0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのBP緩衝液及び1.5 μ LのBPクローナーゼ酵素ミックス (Invitrogen) と共に室温にて1時間インキュベートした。プロテイナーゼK (2 μ g) の添加によって反

応を停止させ、さらに10分間、37℃にてインキュベートした。この反応物のアリコート(1 μL)を、バイオラッド・ジーンパルサー(Biorad Gene Pulser)を用いたエレクトロポレーションによって、20 μLのE.coli DH10B細胞(H₂Oで1/5に希釈したもの)にトランスフォームした。1 mLのSOC培地を添加することによって、エレクトロポレーションした細胞を希釈し、37℃にて1時間インキュベートした。この形質転換体をLB-カナマイシンプレート上に蒔いて、37℃にて一晩インキュベートした。Qiaprep Turbo 9600 robotic system (Qiagen)を用いて、得られた1~10のコロニーからプラスミド・ミニプレップDNAを単離し、製造元の指示に従ってビッグダイターミネーターシステム(BigDye Terminator system)(Applied Biosystems cat.no.4390246)を用いて、pENTR-F1及びpENTR-R1シークエンシングプライマーと一緒にDNAシークエンシングを行った。Dye-EXカラム(Qiagen)又はMontage SEQ 96クリーンアップ・プレート(Millipore cat.no.LSKS09624)を用いてシークエンシング反応物を精製して、Applied Biosystems 3700シークエンサーで解析した。

10

【0086】

[4. 発現ベクターpEAK12dへのINSP052 ECドメインORFのサブクローニング]

次に、INSP052 ECドメインの正しい配列を含むpDONR201クローンに由来するプラスミド溶出液(1.5 μL)(プラスミドID 13497)を、組換え反応に用いた。その反応液には、10 μLの最終容積中に1.5 μLのpEAK12d(0.1 μg/μL)、2 μLのLR緩衝液及び1.5 μLのLRクロナーゼ(Invitrogen)も含む。この反応混合物を室温にて1時間インキュベートし、プロテイナーゼK(2 μg)の添加によって反応を停止させて、さらに10分間、37℃にてインキュベートした。この反応物のアリコート(1 μL)を用いて、上述のようにエレクトロポレーションによって、E.coli DH10B細胞にトランスフォームした。1 mLのSOC培地を添加することによって、エレクトロポレーションした細胞を希釈し、37℃にて1時間インキュベートした。LB-アンピシリンプレート上に形質転換体を蒔いて、37℃にて1時間インキュベートした。Qiaprep Turbo 9600 robotic system (Qiagen)を用いて、4つのコロニーからミニプレップDNAを調製し、50 μLの溶出緩衝液に溶出した。次に、2 μLの各ミニプレップに対し、2 μLの5 mM dNTPs、6 μLの10 μM pEAK12-F、6 μLの10 μM pEAK12-R、5 μLの10×アンプリタック(AmpliTaq)(商標)緩衝液及び0.5 μLのアンプリタック(商標)(Applied Biosystems cat.no. N808-0155)を含む50 μLの合計反応容積にて、PCRを行った。そのサイクリング条件は、次の通りであった：94℃にて2分間；94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、72℃にて1分間のサイクルを30回；72℃にて3分間のサイクルを1回。この

20

30

サンプルを、更なる分析の前に、4℃にて(保持サイクル)維持していた。期待されるPCR産物サイズ(1074 bp)を与えるコロニーから、プラスミド・ミニプレップDNAを単離して、次にpEAK12-F及びpEAK12-Rシークエンシングプライマーと一緒にDNAシークエンシングを行った。

配列照合したクローンの500 μL培養物から、プラスミドpEAK12d-INSP052EC-6HIS(プラスミドID 13495)のCsClグラジエント精製マキシプレップDNAを調製して(Sambrook J. et al., in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、滅菌水に1 μg/μLの濃度で再懸濁して、-20℃にて保存した。

40

【0087】

【表 2】

表 2 : INSP052 ECドメインのクローニング用及びシーケンシング用のプライマー

プライマー	配列 (5' -3')
GCPフォワード	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u>
GCPリバーズ	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT “TCA” [ATG GTG A TG GTG ATG GTG]
INSP052-B1P-エクソン 1 F	GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG AAG AGA GAA AGG GGA GCC CTG TC
INSP052-エクソン 1 R	TCA CCC CCT CCA GGG GGT (CTG TCT GGA TCA GAA GAA)
INSP052-エクソン 2 F	(TTC TTC TGA TCC AGA CAG) ACC CCC TGG AGG GGG TGA
INSP052-エクソン 2 R	GTG GCC TCG AAA TGG GCA (CAT CTA CAG TAA GGT TGA)
INSP052-エクソン 3 F	(CAA CCT TAC TGT AGA TG)T GCC CAT TTC GAG GCC ACA
INSP052-エクソン 3 R	(GGA GCT TCT TC)T GTA TAC GGT GAT CTT GAC AG
INSP052-5HIS-R	[GTG ATG GTG ATG GTG] GGA GCT TCT TCT GTA TAC GG
pEAK12-F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12-R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
pENTR-F1	TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C
pENTR-R1	GTA ACA TCA GAG ATT TTG AGA CAC

10

20

下線付き配列＝コザック配列

“ ” 付き配列＝終止コドン

[] 内配列 =Hisタグ

() 内配列 =隣接するエクソンとオーバーラップする部分

【 0 0 8 8 】

(実施例 3 : クローン化Hisタグ付き INSP052-6His-V1 (プラスミドNo.13495) の哺乳動物細胞における発現)

エプスタイン＝バーウイルスの核抗原を発現しているヒト胚性腎293細胞 (HEK293-EBNA , Invitrogen) を、Ex 細胞VPRO無血清培地 (シードストック、維持培地、JRH) に懸濁状態で維持した。トランスフェクションの16-20時間前 (- 1日目) に、細胞を2つのT225フラスコに播種した (2% FBS播種培地 (JRH) を含むDMEM / F12 (1 : 1) 中に 2×10^5 細胞 / ml の密度でフラスコ当たり50mL) 。次の日 (トランスフェクション 0 日目) 、JetPEI (登録商標) 試薬を用いてトランスフェクションを行った (プラスミドDNA $2 \mu\text{L} / \mu\text{g}$ 、PolyPlus-トランスフェクション) 。各フラスコについて、113 μg のcDNA (プラスミド番号13495) を2.3 μg のGFP (蛍光レポーター遺伝子) とコトランスフェクトした。トランスフェクション混合物を2つの前記T225フラスコに加え、37 (5% CO_2) で6日間インキュベートした。より多くの材料を得る機会を増やすことを目的として、この手順をさらなる2つのフラスコで繰り返して、合計で200 mLを作製した。陽性トランスフェクションの確認は、1日目及び6日目に定量的蛍光試験によって実施した (Axiovert 10 Zeiss) 。

30

40

6日目に (採集日) 4つのフラスコから上清 (200mL) をプールし、遠心分離して (4、400g) 、固有の識別標を付したポットに入れた。

6Hisタグ付加タンパク質のQCのために (内部バイオプロセッシングQC) 、アリコート (500 μL) を保持した。

【 0 0 8 9 】

(精製過程)

50

C末端6Hisタグを有する組換えタンパク質を含む200 mL培地サンプルを、冷緩衝液A (50 mMの NaH_2PO_4 ; 600 mMの NaCl ; 8.7% (w/v) グリセロール; pH 7.5) を用いて、最終容積200 mLに希釈した。このサンプルを、0.22 μm 滅菌フィルター (Milipore、500 mLフィルターユニット) を通して濾過し、250 mL滅菌四角培地瓶 (Nalgene) 中に入れて4にて維持した。

精製は、自動サンプル添加装置 (Labomatic) に連結したVISIONワークステーション (Applied Biosystems) で4にて実施した。精製方法は、以下の2つの連続する工程を含んでいた: Niイオンで荷電されているPoros 20MC (Applied Biosystems) カラム (4.6 x 50 mm, 0.83 mL) での金属アフィニティークロマトグラフィー、続いてセファデックスG-25中型 (Amersham Pharmacia) カラム (1.0 x 10 cm) でのゲルろ過。

最初のクロマトグラフィー工程のために、金属アフィニティークラムを30カラム容積のEDTA溶液 (100 mMのEDTA; 1 Mの NaCl ; pH 8.0) で再生させ、15カラム容積の100 mM NiSO_4 溶液で洗浄してNiイオンを再荷電し、10カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて7カラム容積の緩衝液B (50 mMの NaH_2PO_4 ; 600 mMの NaCl ; 8.7% (w/v) グリセロール; 400 mMのイミダゾール; pH 7.5) で洗浄し、最後に15カラム容積の緩衝液A (15 mMのイミダゾールを含む) で平衡化した。Labomaticサンプル添加装置でサンプルを200 mL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流速10 mL/分で装荷した。その後、前記カラムを12カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて28カラム容積の緩衝液A (20 mMイミダゾールを含む) で洗浄した。20 mMイミダゾール洗浄の間に、ゆるく付着していた混入タンパク質はカラムから溶出した。リコンビナントHisタグ付加タンパク質を、流速2 mL/分、10カラム容積の緩衝液Bで最後に溶出させ、この溶出タンパク質を1.6 mL画分で採集した。

10

20

【0090】

二番目のクロマトグラフィー工程のために、セファデックスG-25ゲルろ過カラムを2 mLの緩衝液D (1.137 Mの NaCl ; 2.7 mMの KCl ; 1.5 mMの KH_2PO_4 ; 8 mMの Na_2HPO_4 ; pH 7.2) で再生し、続いて4カラム容積の緩衝液C (137 mMの NaCl ; 2.7 mMの KCl ; 1.5 mMの KH_2PO_4 ; 8 mMの Na_2HPO_4 ; 20% (w/v) グリセロール; pH 7.4) で平衡化した。Niカラムから溶出したピーク画分は、VISIONに統合されているサンプル添加装置を自動的に通過して、セファデックスG-25カラムに装荷され、2 mL/分の流速の緩衝液Cでタンパク質を溶出した。脱塩サンプルを2.2 mL画分で回収した。前記画分を、0.22 μm の滅菌遠心分離フィルター (Millipore) でろ過し、凍結して-80で保存した。サンプルのアリコートを用い、抗His抗体を用い、クーマシー染色及びウェスタンブロットによってSDS-PAGE (4 - 12% NuPAGEゲル; Novex) で分析した。

30

クーマシー染色: NuPAGEゲルを0.1%のクーマシーブルーR 250染色液 (30% メタノール、10% 酢酸) 中で室温にて1時間染色し、続いてバックグラウンドが除かれてタンパク質のバンドが鮮明に見えるようになるまで、20% メタノール/7.5% 酢酸中で脱染した。

ウェスタンブロット: 電気泳動に続いて、タンパク質を4にて1時間、290 mAでゲルからニトロセルロースメンブレンへ電気的に移した。前記メンブレンを、5% 粉乳を含む緩衝液E (137 mMの NaCl ; 2.7 mMの KCl ; 1.5 mMの KH_2PO_4 ; 8 mMの Na_2HPO_4 ; 0.1% トウイーン20 (pH 7.4)) で室温にて1時間ブロッキングし、続いて2.5% 粉乳を含む緩衝液E中で2つのウサギポリクローナル抗体混合物 (G-18及びH-15、各々0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Santa Cruz) とともに4で一晩インキュベートした。室温でさらに1時間インキュベートした後、前記メンブレンを緩衝液Eで洗滌し (10分、3回)、続いて2.5% 粉乳を含む緩衝液Eで1/3000に希釈したHRP結合抗ウサギ二次抗体 (DAKO、HRP0399) と室温で2時間インキュベートした。緩衝液Eで洗滌 (10分、3回) した後、前記メンブレンをECLキット (Amersham Pharmacia) で1分処理した。続いて前記メンブレンをハイパーフィルム (Amersham Pharmacia) に露光し、前記フィルムを現像してウェスタンブロット画像を視覚的に分析した。

40

タンパク質アッセイ: BCAタンパク質アッセイキット (Pierce) を用い、ウシ血清アルブミンを標準物質として、タンパク質濃度を決定した。200 mLの培地から890 μg の精製タンパク質を回収した。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 9 1 】

【 図 1 】 完全長 INSP052ポリペプチド配列を用いて、NCBI非重複的データベースに対するBLASTから得られた結果を示している。

【 図 2 】 INSP052ポリペプチド配列と、最も近縁な配列である胆汁糖タンパク質 H (マウス)との間における、BLASTによって得られたアラインメントを示している。

【 図 3 】 完全長 INSP055ポリペプチド配列を用いて、NCBI非重複的データベースに対するBLASTから得られた結果を示している。

【 図 4 】 INSP055ポリペプチド配列と最も近縁な配列である胆汁糖タンパク質 B (マウス)との間における、BLASTによって得られたアラインメントを示している。

【 図 5 】 INSP052の予測ヌクレオチド配列を、その翻訳と共に示す。下線が引かれている配列は、予測シグナルペプチドを示している。囲み付きの配列は、予測膜貫通ドメインを示している。

【 図 6 】 ゲノムDNAにおいて、INSP052をコードしているエクソン構成を示している。上段 = INSP052のcDNA(1251bp)、下段 = chr11のゲノムDNA。推定上の細胞外ドメインをコードする配列には、下線が引かれている。開始コドン及び終止コドンは、太字で示されている。

【 図 7 】 クローニングされた INSP052細胞外ドメインのヌクレオチド配列及び翻訳物を示す。

【 図 8 】 pENTR-INSP052-EC-6HISのマップを示す。

【 図 9 】 pEAK12d-INSP052-EC-6HISのマップを示す。

10

20

【 図 1 】

Figure 1

BLASTP 2.2.1 [Jul-12-2001]
Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= genscan2
(416 letters)

Database:.ncbi-nr
897,014 sequences; 280,886,335 total letters

Searching.....done

Table with 3 columns: Hit description, Score (bits), E-value. Top hit: pir|JC1512 胆汁糖タンパク質 H - マウス (81 2e-14)

【 図 2 】

Figure 2

>pir|JC1512 胆汁糖タンパク質 H - マウス
Length = 341

Score = 80.9 bits (198), Expect = 2e-14
Identities = 54/168 (32%), Positives = 88/168 (51%), Gaps = 9/168 (5%)

Query: 73 RDKPVTVVQSIGTEVIGTLR---PDYRDRIRLFENGSLLSLDLQLADEGTYEVEISITD 128
+ PV+ I +V GT+ P+ R ++ NGSLL+ ++ D G Y +E+ TD
Sbjct: 69 KGNPVTNAEIVHQVTGNTKTTTGAHSGRETVYSGNSLLIQRVTVKDGTGVYTIEM-TD 126

Query: 129 DTFTG-EKTIINLTVDPVISRQVLVASTTVLESEAFTLNCSHENGTKPSYTWLKDQKPL 187
+ F E T+ V P+++P + V +TTV EL ++ TL C N + WL ++ L
Sbjct: 127 ENFRRTEATVQFHVHQPVTPQPSLQVTNTTVKEL-DSVTLTCL-SNDIGANIQWLFNSQSL 184

Query: 188 LNSRMLLSPDQKVLITRVLMEDDDLYS CMVENPISQGRSLPVKITV 235
RM LS + +L I + ED Y C + NP+S RS +K+ +
Sbjct: 185 QLTERMTLSQNSILRIDPIKREKAGEYQCEINPVSVKRSNSIKLDI 232

【 図 3 】

Figure 3

有意なアラインメントを生ずる配列:	Score (bits)	E Value
gi 483306 pir JC1506 胆汁糖タンパク質 B - マウス	79	1e-13
gi 111207 pir A39037 carcinoembryonic antigen mmCGM2 precu...	77	3e-13
gi 483312 pir JC1512 biliary glycoprotein H - mouse	77	4e-13
gi 13937381 ref NP_036056.1 (NM_011926) CEA-related cell a...	75	1e-12
gi 228710 prf 1809184A pregnancy-specific glycoprotein [Ra...	70	5e-11
gi 483307 pir JC1507 biliary glycoprotein C - mouse	70	6e-11
gi 1611775 ref NP_291021.1 (NM_033543) hypothetical prote...	69	8e-11
gi 483309 pir JC1509 biliary glycoprotein E - mouse	69	9e-11
gi 312582 emb CAA47695.1 (X67278) biliary glycoprotein [Mu...	69	1e-10
gi 483311 pir JC1511 biliary glycoprotein G - mouse	68	2e-10

【 図 4 】

>gi|483306|pir|JC1506 胆汁糖タンパク質 B - マウス

Length = 278

Score = 78.6 bits (192), Expect = 1e-13

Identities = 54/168 (32%), Positives = 86/168 (51%), Gaps = 9/168 (5%)

Query: 73 RDKPVTVQSIGTEVIGTLR---PDYRDRIRLFENGSLLSLDLQADEGYEVEISITD 128

+ PV+ I +VGT+ P+ R ++NGSLL+ ++DGY+E +TD

Sbjct: 69 KGNPSTNAEIVHQVTGNKTTTGAHSGRETVYNSGSLLIQRVTKDGTGYTIE--MTD 126

Query: 129 DTF-TGEKINLTVDPISRPQVLVASTTVLELSEAFNLNCSHENGTKPSYTWLKDQKPL 187

+ F ET+ V P+++P+V+TTVEL++TLC N + WL++L

Sbjct: 127 ENFRRETEATVQFHVHQPVTPQPSLQVTNTTKEL-DSVTLTCL-SNDIGANIQWLFNSQSL 184

Query: 188 LNSDRMLSPDQKVLITRVLMEDDDLVSCVVENPISQVRSPLVKITV 235

RM Ls + +LI + ED YC+NP+S RS +K+ +

Sbjct: 185 QLTERMTLSQNNILRIDPIKREDAGEYQCEINPVSVKRSNSIKLDI 232

【 図 5 】

FIG. 5

```

1 ATGAAGGAG AAAGGGGACC CCTGTCCAGA GCTCCAGGG CCGTGGGCTT TCGTCTTTT
  m k r e r g a l s r a s r a l r l a p f
61 GTCTACCTTC TTCTGATCCA GACAGACCCC CTGGAGGGG TGAACATCAC CAGCCCGCTG
  v y l l l l i q t d p l e g v n i t s p v
121 CCGCTGATCC ATGGCACCGT GGGGAAGTGG GCTCTGCTTT CTGTGCAGTA CAGCAGTACC
  r l i h g t v g k s a i l s v q y s s t
181 AGCAGGACA GGCCTGTAGT GAAGTGGCAC CTGAAGCGGG ACAAGCCAGT GACCGTGGT
  s s d r p v v k w q l k r d k p v t v v
241 CAGTCCATTC GCACAGAGT CATCGGACCC CTGGGCGCTG ACTATCGAGA CCGTATCCGA
  q s i g t e v i g t l r p d y r d r i r
301 CTCTTTGAAA ATGGCTCCCT GCTTCTCAGC GACCTGCAGC TGGCGGATGA GGGCACCTAT
  l f e n g s l l l s d l q l a d e g t y
361 GAGGTGAGAA TCTCCATCAC CGACGACACC TTCACGGGG AGAGACCAT CAACCTTACT
  e v e i s i t d d t f t g e k t i n l t
421 GTAGATGTGC CCATTTGAGC GCCACAGSTG TTGGTGGCTT CNAACACTGT GCTGGAGTGC
  v d v p i s r p q v l v a s t t v l e l
481 AGGAGGGCTT TCACCTTGAA CTGCTACACT GAGAATGGCA CCAAGCCGAG CTACACCTGG
  s e a f t l n c s h e n g t k p s y t w
541 CTGAAGGATG GCAAGCCCTT CCTCAATGAC TCGAAGTGC TCTGTGCCCC CGACCCAAAG
  l k d g k p l l n d s r m l l s p d q k
601 GTGCTACCCA TCACCCGCGT GCTCAGGAG GATGAAGACC TGTACAGCTG CATGGTGGAG
  v l t i t r v l m e d d d l y s c m v e
661 AACCCCATCA GCGAGCGCG CAGCCTGCTT GTCAGATCA CCGTATACAG AAGAGCTCC
  n p i s q g r s l p v k i t v y r r s s
721 CTTTACATCA TCTTGTCTAC AGGAGGATC TTCCCTCTTG TGACCTTGGT GACAGTCTGT
  l y i i l s t g g i f l l v t l v t v g
781 GCTTCTGGA AACCTTCGAA AAGGAAACAG AAGAAGCTAG AAAGCAAAA CTCCTGGAA
  g c w k p s k r k q k k l e k q n s l e

```

【 図 5 】

```

-----
841 TACATGGATC AGAATGATGA CCGCTGAAA CGAGAGCAGC ACACCTCCCG TCGAAGTGGT
  y m d q n d d r l k p e a d t l p r s g
901 GAGCAGGAAC GGAAGAACC CATGGCACTC TATATCCTGA AGGACAAGGA CTCCCCGGAG
  e q e r k n p m a l y i l k d k d s p e
961 ACCGAGGAGA ACCCGGCCCC GGAGCCTCGA AGCGGAGGG AGCCCGGCCC GCGCGCTTAC
  t e e n p a p e p r s a t e p g p p g y
1021 TCCGTGTCTC CCGCGGTGCC CGCGCGCTCG CCGGCGCTCG CCATCCGCTC TGCCCGCGGC
  s v s p a v p g r s p g l p i r s a r r
1081 TACCCGCGCT CCCCAGCGCG CTCCCCAGCC ACCGGCGGGA CACACTCTCT GCGGCCAAGG
  y p r s p a r s p a t g r t h s s p p r
1141 GCGCCGAGCT CGCCCGCGCG CTGCGGAGC GCTTGGGCA CACTGCGGAG TGCGGGCGTG
  a p s s p g r s r s a s r t l r t a g v
1201 CACATATCC GCGAGCAAGA CGAGGCGGCG CGGTGGAGA TCAGCGCCTG AGCCGCGCTG
  h i i r e q d e a g p v e i s a
1261 GGATCCCGCT AGAGGGGCCG GCGTCTGCG GCAAGTGGCC CGGGGAAAG CTGGGGCTGG
1321 GAAGCCCGGG CCGCGCGGCG TGGGAGAGAG GGAAGTCCC GGGGGGCGC TGGTCTCG
1381 GGTGTGAGC TGTATGAGCA TGGCAGAGCG GAGCGCGGTG CCGGAGGCGC GCACTGTGTA
1441 TATGTGAAA CCGGTGCGCA TTTCCTCCG GTTACTGGC TGTGCTCA CTGGTATAG
1501 GTTGTGCCCT CTAGAGCCA CATAGATTAT TACATTTCTG GCCCATACC CAAAGGGT
1561 TTATGGAAC TAACATCAGT AACCTAACCC CCGTACTAT CCTGTGCTCT TCGTAGGGAG
1621 CTGTGTGTT TCCCACCCAC CACCTTCCC TGTGAACAA TGCTGAGTG CTGGGCGACT
1681 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GCAAGTTCAG ATTAGAGAGG CCACTTTCOC
1741 AGAATCCACA CGTGCACTAA GCTAAGGAGA AGCCAGATGC GGTACTGG GFTGAGAGG
1801 GCTGTCTGA GCTGGGGGGA TCATTGTGAA GSCCTTCTC CTTGGGACC TGGTACCTGG
1861 GGACCTACAA GGTGGTGGAG GAGGGTACG AGTACATPCC TTTTCCCTCT GACCTGGGCG
1921 CTAGCAGGG CAAAGAACC GAGCTGCA GCTTGGCTC CTCCACAGC CTOCCTGGA
1981 GGCATGCCAT GCCAGCACT CTTTCTGTCT CTGTTCAATG ATAA

```

FIG. 5(contd.)

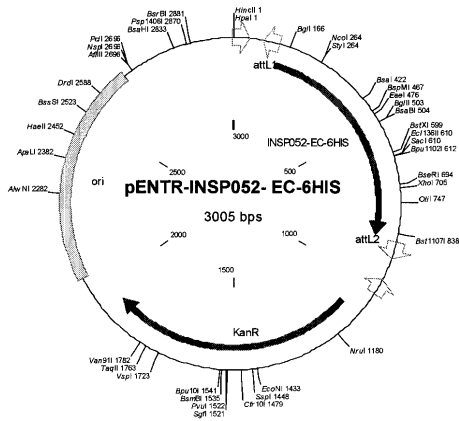
【 図 8 】

分子: pENTR-INSP052- EC-6HIS, 3005 bps DNA 環状
ファイル名: pENTR-INSP052-6HIS.cm5, 日付 21 Feb 2003

説明: Cons-6His.SEQ の pENTR-attL1-attL2 へのライゲーション

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
マーカー	21			pENTR-F1 プライマー
マーカー	110		C attL1	
遺伝子	136	873	INSP052-EC-6HIS	
マーカー	888		attL2	
マーカー	1001		C	pENTR-R1 プライマー
遺伝子	1100	1909	KanR	
領域	2030	2669	ori	



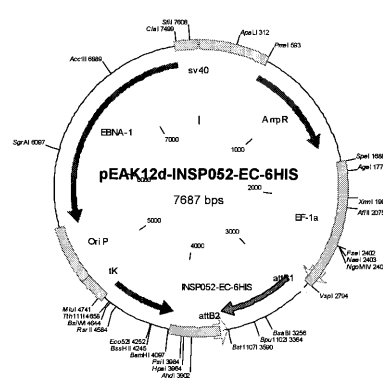
【 図 9 】

分子: pEAK12d-INSP052-EC-6HIS, 7687 bps DNA 環状
ファイル名: pEAK12d-INSP052-6HIS.cm5, 日付 21 Feb 2003

説明: Cons-6His.SEQ の pEAK12d-attB1-attB2 へのライゲーション

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	AmpR	
領域	1690	2795	EF-1a	
マーカー	2703			pEAK12F プライマー
領域	2855	2887	attB1	
遺伝子	2888	3625	INSP052-EC-6HIS (aal-240)	
領域	3629	3654	attB2	
マーカー	3656		C	pEAK12R プライマー
領域	3661	4089		ポリ A/スプライシング
遺伝子	4708	4090	C	ピュロマイシン耐性
領域	4932	4709	C tk	tk プロモーター
領域	5427	4933	C Ori P	
遺伝子	7479	5427	C EBNA-1	
領域	7480	7679	sv40	



【 配列表 】

2006502702000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 03/01851
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12N15/63 A01K67/027 C12N15/12 C12N5/10		
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) IPC 7 C07K		
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) EMBL, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	DATABASE EMBL 'Online! EBI; EDWARDS J.B.D.M: "Sequence Tag and encoded human protein" retrieved from HTTP://WWW.EBI.AC.UK Database accession no. BD511416 XP002259339 the whole document	1
X	& EP 1 033 041 A (GENSET) 6 September 2000 (2000-09-06) the whole document	1
	--- --	
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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		*I* 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 October 2003		05/12/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/01851

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EBI; 12 October 2001 (2001-10-12) TANG ET AL: "Isolated polypeptide for treatment of diseases, diagnostics, raising antibodies and research use." retrieved from HTTP://WWW.EBI.AC.UK Database accession no. AAM24238 XP002259341 abstract</p>	1
X	<p>& WO 01 54477 A (HYSEQ) 2 August 2001 (2001-08-02) the whole document</p>	1
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EBI; SUGANO ET AL: "NEDO human cDNA sequencing project" retrieved from HTTP://WWW.EBI.AC.UK Database accession no. AK098396 XP002259340 abstract</p>	1-3
P,X	<p>WO 02 40671 A (GURURAJAN RAJAGOPAL ;INCYTE GENOMICS INC (US); LO TERENCE P (US);) 23 May 2002 (2002-05-23) claim 59</p>	1
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EBI; 26 September 2002 (2002-09-26) WARREN ET AL: "Transmembrane proteins" retrieved from HTTP://WWW.EBI.AC.UK Database accession no. AX498567 XP002259403 abstract</p>	1
P,X	<p>& WO 02 34783 A (INCYTE GENOMICS) 2 May 2002 (2002-05-02)</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/01851

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

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.:

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/GB 03 01851

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 33-35 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. Although claims 20, 36 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/GB 03/01851

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1033041	A	06-09-2000	GB 2331666 A	26-05-1999
			BR 9814218 A	03-10-2000
			CA 2311536 A1	03-06-1999
			DE 69806633 D1	22-08-2002
			DE 69806633 T2	28-11-2002
			EP 1033041 A1	06-09-2000
			NO 20002087 A	20-07-2000
			PL 340556 A1	12-02-2001
			WO 9927720 A1	03-06-1999
			TR 200001446 T2	21-09-2000
			US 6298246 B1	02-10-2001
			ZA 9810601 A	19-05-1999
WO 0154477	A	02-08-2001	AU 2593601 A	31-07-2001
			AU 3117701 A	07-08-2001
			AU 3117801 A	07-08-2001
			AU 3296701 A	07-08-2001
			AU 3296901 A	07-08-2001
			AU 3297101 A	07-08-2001
			AU 3298901 A	07-08-2001
			AU 3300301 A	07-08-2001
			AU 3301701 A	07-08-2001
			AU 3304101 A	07-08-2001
			AU 3304701 A	07-08-2001
			AU 3458201 A	14-08-2001
			AU 3655301 A	07-08-2001
			CA 2395749 A1	26-07-2001
			CA 2398215 A1	09-08-2001
			CA 2398251 A1	02-08-2001
			CA 2398396 A1	02-08-2001
			CA 2398546 A1	02-08-2001
			CA 2398548 A1	02-08-2001
			CA 2398554 A1	02-08-2001
			EP 1240178 A2	18-09-2002
			EP 1252333 A2	30-10-2002
			EP 1254246 A1	06-11-2002
			EP 1261735 A2	04-12-2002
			EP 1285084 A1	26-02-2003
			EP 1261736 A2	04-12-2002
			EP 1276902 A2	22-01-2003
			JP 2003521903 T	22-07-2003
			JP 2003521928 T	22-07-2003
			WO 0153456 A2	26-07-2001
			WO 0155332 A2	02-08-2001
			WO 0155333 A2	02-08-2001
			WO 0155334 A2	02-08-2001
			WO 0155442 A2	02-08-2001
			WO 0155335 A2	02-08-2001
			WO 0157233 A2	09-08-2001
WO 0155435 A2	02-08-2001			
WO 0155336 A2	02-08-2001			
WO 0155337 A2	02-08-2001			
WO 0155437 A2	02-08-2001			
WO 0154477 A2	02-08-2001			
WO 0155339 A2	02-08-2001			
US 2003124573 A1	03-07-2003			
US 6635742 B1	21-10-2003			
AU 5362001 A	30-10-2001			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/GB 03/01851

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0154477	A	CA 2406039 A1	25-10-2001	
		EP 1276754 A2	22-01-2003	
		WO 0179446 A2	25-10-2001	
		US 2002142953 A1	03-10-2002	
WO 0240671	A	23-05-2002	AU 1997402 A	27-05-2002
		CA 2429195 A1	23-05-2002	
		WO 0240671 A2	23-05-2002	
WO 0234783	A	02-05-2002	AU 3270702 A	06-05-2002
		CA 2427085 A1	02-05-2002	
		WO 0234783 A2	02-05-2002	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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 デイヴィッツ アンドリュウ ロバート

イギリス ロンドン ダブリュー1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ

(72) 発明者 ファガン リチャード ジョセフ

イギリス ロンドン ダブリュー1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ

(72) 発明者 フェルプス クリストファー ベンジャミン

イギリス ロンドン ダブリュー1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ

(72) 発明者 パワー クリスティン

フランス エフ-01710 スワリー リュー デ ジョンキーユ 10

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA11 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14

DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11 GA14 HA14

HA17

4B063 QA01 QA12 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ03 QQ43 QR32 QR40

QR55 QR62 QS25 QS34 QS36 QX02 QX07

4B065 AA26X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA03 BB32 BC03 BC07
BD14 CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 BA01 BA08 BA19 BA20 BA21 CA18 CA53 MA17
MA23 MA35 MA37 MA52 MA55 MA57 MA60 MA66 NA14 ZA022
ZA072 ZA182 ZA362 ZB112 ZB212 ZB322 ZC212 ZC542
4C085 AA03 BB11 EE01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74 GA22 GA26

专利名称(译)	细胞表面识别分子含有免疫球蛋白结构域		
公开(公告)号	JP2006502702A	公开(公告)日	2006-01-26
申请号	JP2004501455	申请日	2003-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	战神托盘资金兴业ANONYME		
[标]发明人	デイヴィッツアンドリユーロバート ファガンリチャードジョセフ フェルプスクリストファーベンジャミン パワークリスティン		
发明人	デイヴィッツ アンドリユー ロバート ファガン リチャード ジョセフ フェルプス クリストファー ベンジャミン パワー クリスティン		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 C12N5/10 A61K38/00 C07K14/705 C12N15/12		
CPC分类号	A61P3/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 C07K14/70503		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA26X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BB32 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA57 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA072 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB322 4C084/ZC212 4C084/ZC542 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	2002009884 2002-04-30 GB		
其他公开文献	JP2006502702A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种新型蛋白质 (INSP052) , 在本文中被鉴定为含免疫球蛋白结构域的细胞表面识别分子, 并且涉及该蛋白质和来自编码基因的核酸序列在疾病的诊断, 预防和治疗中的用途。 本发明还涉及INSP052的胞外域的鉴定。

