

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
39/395		45/00	4 B 0 6 3
45/00		48/00	4 B 0 6 4
48/00		A 6 1 P 11/06	4 B 0 6 5
審査請求 有 予備審査請求 (全110数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 578645(P2001 - 578645)	(71)出願人	バイエル アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン(番 地なし)
(86)(22)出願日	平成13年4月25日(2001.4.25)	(72)発明者	ジェフリー・エンシナス
(85)翻訳文提出日	平成14年10月24日(2002.10.24)		京都府京都市中京区西洞院通錦小路下る蟠
(86)国際出願番号	PCT/EP01/04635		▲ろう▼山町464 - 1 - 1401
(87)国際公開番号	W001/081574	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外 3 名)
(87)国際公開日	平成13年11月1日(2001.11.1)		
(31)優先権主張番号	60/199,356		
(32)優先日	平成12年4月25日(2000.4.25)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 N F - A T相互作用タンパク質N I P 4 5 変異体の調節

(57)【要約】

新規N F - A T相互作用タンパク質N I P 4 5 変異体の
核酸配列およびアミノ酸配列を開示する。N I P 4 5 変
異体に結合する試薬は、例えばアレルギー、喘息、自己
免疫疾患、および他の慢性炎症性疾患などの、免疫系活
性の過剰活性化または延長化により組織への障害を引き
起こす炎症過程を含む状態を処置するのに用いることが
できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列；

配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列；

配列番号9に示すアミノ酸配列；

配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列；

配列番号10に示すアミノ酸配列；

配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列；および、

配列番号11に示すアミノ酸配列、
より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むN I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

b) 配列番号1、2、3、4または5で示される配列を含むポリヌクレオチド；

c) 遺伝コードの縮重のため、その配列が(a)および(b)に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱している配列のポリヌクレオチド；および、

d) (a)から(c)に明記したポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、
より成る群から選ばれるポリヌクレオチド。

【請求項2】 請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項3】 請求項2に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項4】 請求項1に記載のポリヌクレオチドによりコードされている、実質上精製されたN I P 4 5 Vポリペプチド。

【請求項5】 a) 請求項3に記載の宿主細胞を、N I P 4 5 Vポリペプチ

ドの発現に好適な条件下で培養し；そして、

b) N I P 4 5 Vポリペプチドを宿主細胞培養から回収する工程、
を含む、N I P 4 5 Vポリペプチドを調製する方法。

【請求項6】 a) 請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドを生体試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；そして、

b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、
を含む、生体試料中のN I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを検出するための方法。

【請求項7】 ハイブリダイゼーションの前に、生体試料の核酸材料を増幅させる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 生体試料を、請求項1に記載のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載のN I P 4 5 Vポリペプチドと特異的に相互作用する試薬と接触させる工程を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載のN I P 4 5 Vポリペプチドを検出するための方法。

【請求項9】 請求項6～8のいずれかに記載の方法を実施するための診断キット。

【請求項10】 被験化合物を、請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされる任意のN I P 4 5 Vポリペプチドと接触させ；

N I P 4 5 Vポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、
を含む、N I P 4 5 Vの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物を、N I P 4 5 Vの活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項11】 被験化合物を、請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされるN I P 4 5 Vポリペプチドと接触させ；そして、

該ポリペプチドのN I P 4 5 V活性を検出する工程、
を含む、N I P 4 5 Vの活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、N I P 4 5 V活性を増大させる被験化合物を、N I P 4 5 Vの活性を増大させる可能性のある治療物質として同定し、かつ該ポリペプチドのN I P 4 5 V活性

を低下させる被験化合物を、N I P 4 5 Vの活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 2】 被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ；そして、

該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、N I P 4 5 Vの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を、N I P 4 5 Vの活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 3】 細胞を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の任意のN I P 4 5 Vポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させ、それによりN I P 4 5 Vの活性を低下させる工程、を含むN I P 4 5 Vの活性を低下させる方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法によって同定される、N I P 4 5 Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調整する試薬。

【請求項 1 5】 請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 1 6】 疾患においてN I P 4 5 Vの活性を調整するための、請求項 1 5 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 1 7】 該疾患が自己免疫疾患、アレルギー性疾患、感染症または慢性炎症性疾患である、請求項 1 6 に記載の使用。

【請求項 1 8】 該疾患が喘息である、請求項 1 6 に記載の使用。

【請求項 1 9】 配列番号 8、9、1 0 または 1 1 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている c D N A。

【請求項 2 0】 配列番号 1、2、3、4 または 5 を含む請求項 1 9 に記載の c D N A。

【請求項 2 1】 配列番号 8、9、1 0 または 1 1 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 2】 該ポリヌクレオチドが配列番号 1、2、3、4 または 5 よ

り成る、請求項21に記載の発現ベクター。

【請求項23】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項24】 該ポリヌクレオチドが配列番号1、2、3、4または5より成る、請求項23に記載の宿主細胞。

【請求項25】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド。

【請求項26】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列より成る、請求項25に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項27】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項28】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている発現ベクターを含む宿主細胞を、該ポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして、該ポリペプチドを単離する工程、を含む該ポリペプチドを調製する方法。

【請求項29】 発現ベクターが配列番号1、2、3、4または5を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 配列番号1、2、3、4または5に記載の11個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを生体試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；そして、該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、を含む配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出する方法。

【請求項31】 ハイブリダイズする工程の前に、核酸材料を増幅する工程をさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 配列番号1、2、3、4または5に記載の11個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；および、請求項30に記載の方法のための使用説明書を含む、配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出するためのキット。

【請求項33】 生体試料を該ポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触

させて試薬 - ポリペプチド複合体を形成させ；そして、その試薬 - ポリペプチド複合体を検出する工程、を含む配列番号 8、9、10 または 11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する方法。

【請求項 34】 該試薬が抗体である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】 配列番号 8、9、10 または 11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体；および、請求項 33 に記載の方法のための使用説明書、を含む該ポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項 36】 被験化合物を、(1) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 85% 一致するアミノ酸配列、配列番号 9 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 99% 一致するアミノ酸配列、配列番号 10 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 96% 一致するアミノ酸配列または配列番号 11 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 95% 一致するアミノ酸配列、および(2) 配列番号 8、9、10 または 11 に示すアミノ酸配列、より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させ；そして、

該ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、NIP45Vタンパク質の活性を調節できる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物をNIP45Vタンパク質の活性を調節する可能性のある物質と同定する方法。

【請求項 37】 接触させる工程が細胞においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】 インビトロにおける細胞である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】 接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】 該ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】 被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】 被験化合物が該ポリペプチドに結合している標識リガンド

に取って代わる、請求項36に記載の方法。

【請求項43】 該ポリペプチドが固体支持体に結合している、請求項36に記載の方法。

【請求項44】 被験化合物が固体支持体に結合している、請求項36に記載の方法。

【請求項45】 被験化合物を、(1)配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列、配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列、配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列または配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列、および(2)配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列、より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させ；そして、

該ポリペプチドの活性を検出する工程、
を含む、ヒトNIP45Vタンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドの活性を増大させる被験化合物を、ヒトNIP45Vタンパク質の活性を増大させる可能性のある物質として同定し、そして該ポリペプチドの活性を低下させる被験化合物を、ヒトNIP45Vタンパク質の活性を低下させる可能性のある物質として同定する方法。

【請求項46】 接触させる工程が細胞においてである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 インビトロにおける細胞である、請求項45に記載の方法。

【請求項48】 接触させる工程が無細胞系においてである、請求項45に記載の方法。

【請求項49】 該活性がサイクリックAMP形成である、請求項45に記載の方法。

【請求項50】 該活性が細胞内カルシウム流動である、請求項45に記載の方法。

【請求項51】 該活性がホスホイノシチド代謝である、請求項45に記載

の方法。

【請求項52】 被験化合物を、配列番号1、2、3、4または5に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされている産物と接触させ；そして、

該産物に対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、ヒトNIP45Vタンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、該産物に結合する被験化合物をヒトNIP45Vタンパク質の活性を調節する可能性のある物質として同定する方法。

【請求項53】 該産物がポリペプチドである、請求項52に記載の方法。

【請求項54】 該産物がRNAである、請求項52に記載の方法。

【請求項55】 細胞を、配列番号1、2、3、4または5に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされている産物に特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒトNIP45Vタンパク質の活性を低下させる工程、を含むヒトNIP45Vタンパク質の活性を低下させる方法。

【請求項56】 該産物がポリペプチドである、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 該試薬が抗体である、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 該産物がRNAである、請求項55に記載の方法。

【請求項59】 該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 該試薬がリボザイムである、請求項58に記載の方法。

【請求項61】 インビトロにおける細胞である、請求項55に記載の方法。

【請求項62】 インビボにおける細胞である、請求項55に記載の方法。

【請求項63】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する試薬；および、製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項64】 該試薬が抗体である、請求項63に記載の医薬組成物。

【請求項65】 配列番号1、2、3、4または5に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド産物に特異的に結合する試薬；および、製薬的に許容し

得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項66】 該試薬がリボザイムである、請求項65に記載の医薬組成物。

【請求項67】 該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項65に記載の医薬組成物。

【請求項68】 該試薬が抗体である、請求項65に記載の医薬組成物。

【請求項69】 配列番号8、9、10または11に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしている発現ベクター；および、製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項70】 発現ベクターが配列番号1、2、3、4または5を含む、請求項69に記載の医薬組成物。

【請求項71】 ヒトNIP45Vタンパク質の機能を阻害する試薬の治療的有効量をそれを必要とする患者に投与し、それによりNIP45Vの症状を改善する工程、を含む喘息を処置する方法。

【請求項72】 試薬が請求項36に記載の方法によって同定される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】 試薬が請求項45に記載の方法によって同定される、請求項71に記載の方法。

【請求項74】 試薬が請求項52に記載の方法によって同定される、請求項71に記載の方法。

【請求項75】 ヒトNIP45Vタンパク質の機能を阻害する試薬の治療的有効量をそれを必要とする患者に投与し、それによりNIP45V疾患の症状を改善する工程、を含むNIP45V疾患を処置する方法。

【請求項76】 試薬が請求項36に記載の方法によって同定される、請求項75に記載の方法。

【請求項77】 試薬が請求項45に記載の方法によって同定される、請求項75に記載の方法。

【請求項78】 試薬が請求項52に記載の方法によって同定される、請求項75に記載の方法。

【請求項79】 N I P 4 5 V疾患が自己免疫疾患、アレルギー性疾患、感染症または慢性炎症性疾患である、請求項75に記載の方法。

【請求項80】 N I P 4 5 V疾患が喘息である、請求項75に記載の方法
。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は新規NF - AT相互作用タンパク質NIP45変異体の核酸配列およびアミノ酸配列、並びにヒト疾患の診断および治療における使用に関する。

【0002】**(背景技術)**

自己免疫疾患、アレルギー性疾患および感染症を含む免疫媒介性(immunologically-mediated)臨床疾患の多くは、CD4 + Tヘルパー細胞型2 (Th2) に対するCD4 + Tヘルパー細胞型1 (Th1) の割合が非常に関連していることが報告された(Heinzel, F.Pら、(1989) J. Exp. Med. 169:59-72; Pearce, E.Jら、(1991) J. Exp. Med. 173:159-166; Shearer, G.M. およびClerici, M. (1992) Prog. Chem. Immunol. 54:21-43)。Th1細胞とTh2細胞の割合を改変または調節することで、免疫媒介性疾患を処置または予防する糸口を得ることができる。

【0003】

Th1とTh2の割合を決定する機構には、Th1効果細胞となるか、Th2効果細胞となるかのCD4ヘルパー前駆細胞(Thp)の分化が関与している。この分化は、発現が転写因子によって誘導されることあるIL - 2、IL - 4およびIL - 12などのサイトカインによってある程度調節されており、かかる転写因子の中で最も重要なものに、NFAT(活性化T細胞核因子)ファミリーのタンパク質がある。NFATタンパク質はほとんどの免疫細胞型で発現され、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 13、GM - CSF、IFN - γ およびTNF - α などの多くのサイトカイン、並びに免疫細胞の応答に関する他の幾つかの遺伝子の転写に重要な役割を果たす。選択したサイトカインのレベルを増加または低下させることが、Th2に対するTh1の割合を調節する方法の1つである。

【0004】

近年、NFATファミリーのタンパク質のメンバーと相互作用する45 kDaのマウス組織由来のタンパク質が単離され、NIP45と命名された(Hodge MR

, Chun HJ, Rengarajan J, Alt A, Lieberson R, Glimcher LH. N I P 4 5 により増強される N F - A T 誘導性インターロイキン - 4 転写。Science, 1996 Dec 13; 274(5294): 1903 - 5; Hodge MRら、WO 97/39721, USP5,858,711およびUSP5,958,671)。さらにWO 99/21993には、ヒトN I P 4 5 ポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列が開示されている。

【0005】

N I P 4 5 は N F A T p と相互作用すること、そして I L - 4 遺伝子プロモーターに N F A T p が結合することによって誘導される I L - 4 遺伝子の転写を増強すること、が示された。この相互作用の本質は不明であるが、N I P 4 5 は N F A T p を細胞質から I L - 4 遺伝子プロモーターと結合できる核内に輸送することに関与するアクセサリータンパク質(accessory protein)である可能性がある。このアクセサリータンパク質が欠如した状態では、N F A T p は自身で核膜を通過する能力がないため不活性であろう。N F A T p ノックアウトマウスを用いた実験では、活性化後(preactivated)表現型の末梢 T 細胞の蓄積、インビトロにおける第 2 次刺激後の T 細胞の免疫応答の増進、および適切な抗原応答の停止における重大な欠損が、N F A T p の欠乏により引き起こされることが明らかとされた (Schuh, Kら、(1998) Eur. J. Immunol. 28(8): 24566-66)。一部のノックアウトマウスには、大きな胚中心が脾臓およびリンパ節に生じ、明らかな胸腺退縮の遅延が起こる。

【0006】

この分野には、活性を調節できる N F A T 相互作用タンパク質のメンバーをさらに同定し、特に免疫媒介性応答に関連する疾患および異常に対する治療効果を提供する必要がある。

【0007】

(発明の概要)

N F - A T 相互作用タンパク質を調節する試薬および方法を提供することが、本発明の目的の 1 つである。本発明のこの目的およびその他の目的は、以下に記載する 1 またはそれ以上の態様によって提供する。

【0008】

本発明の一つの態様は、
配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列；
配列番号8に示すアミノ酸配列；
配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列；
配列番号9に示すアミノ酸配列；
配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列
；
配列番号10に示すアミノ酸配列；
配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列
；および、
配列番号11に示すアミノ酸配列、
より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むNIP45Vポリペプチドである。

【0009】

本発明のさらに別の態様は、NIP45V活性を低下させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、
配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列；
配列番号8に示すアミノ酸配列；
配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列；
配列番号9に示すアミノ酸配列；
配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列
；
配列番号10に示すアミノ酸配列；
配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列
；および、
配列番号11に示すアミノ酸配列、
より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むNIP45Vポリペプチドと接触させる。

被験化合物とNIP45Vポリペプチドとの結合を検出する。それにより、NIP45Vポリペプチドに結合する被験化合物を、NIP45Vの活性を低下さ

せる可能性のある物質として同定する。

【0010】

本発明の別の態様は、NIP45V活性を低下させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、NIP45Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド〔ここでこのポリヌクレオチドは、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%一致するヌクレオチド配列；

配列番号1に示すヌクレオチド配列；

配列番号2に示すヌクレオチド配列と少なくとも約85%一致するヌクレオチド配列；

配列番号2に示すヌクレオチド配列；

配列番号3に示すヌクレオチド配列と少なくとも約99%一致するヌクレオチド配列；

配列番号3に示すヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列と少なくとも約96%一致するヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約95%一致するヌクレオチド配列；および、

配列番号5に示すヌクレオチド配列、
より成る群から選ばれるヌクレオチド配列を含む〕と接触させる。

【0011】

被験化合物と当該ポリヌクレオチドとの結合を検出する。当該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を、NIP45Vの活性を低下させる可能性のある物質として同定する。この物質は、NIP45VmRNAと相互作用することを介してNIP45Vの量を減少させることにより作用できる。

【0012】

本発明の別の態様は、NIP45V活性を調節する物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列；
配列番号8に示すアミノ酸配列；
配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列；
配列番号9に示すアミノ酸配列；
配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列
；
配列番号10に示すアミノ酸配列；
配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列
；および、
配列番号11に示すアミノ酸配列、
より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むNIP45Vポリペプチドと接触させる。

【0013】

このポリペプチドのNIP45V活性を検出する。それにより、被験化合物不在時のNIP45V活性に比べて、該ポリペプチドのNIP45V活性を増大させる被験化合物を、NIP45Vの活性を増大させる可能性のある物質として同定する。被験化合物不在時のNIP45V活性に比べて、該ポリペプチドのNIP45Vの活性を低下させる被験化合物を、NIP45V活性を低下させる可能性のある物質として同定する。

【0014】

本発明のさらに別の態様は、NIP45Vの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法である。被験化合物を、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%一致するヌクレオチド配列；

配列番号1に示すヌクレオチド配列；

配列番号2に示すヌクレオチド配列と少なくとも約85%一致するヌクレオチド配列；

配列番号2に示すヌクレオチド配列；

配列番号3に示すヌクレオチド配列と少なくとも約99%一致するヌクレオチ

ド配列；

配列番号3に示すヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列と少なくとも約96%一致するヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約95%一致するヌクレオチド配列；および、

配列番号5に示すヌクレオチド配列、

より成る群から選ばれるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの、NIP45V産物と接触させる。

【0015】

NIP45V産物に対する被験化合物の結合を検出する。それにより、NIP45V産物に結合する被験化合物を、NIP45V活性を低下させる可能性のある物質として同定する。

【0016】

本発明のさらに別の態様は、NIP45V活性を低下させる方法である。細胞を、NIP45Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドまたは当該ポリヌクレオチドによりコードされている産物〔ここで当該ポリヌクレオチドは、

配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50%一致するヌクレオチド配列；

配列番号1に示すヌクレオチド配列；

配列番号2に示すヌクレオチド配列と少なくとも約85%一致するヌクレオチド配列；

配列番号2に示すヌクレオチド配列；

配列番号3に示すヌクレオチド配列と少なくとも約99%一致するヌクレオチド配列；

配列番号3に示すヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列と少なくとも約96%一致するヌクレオチド配列；

配列番号4に示すヌクレオチド配列；

配列番号5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約95%一致するヌクレオチド配列；および、

配列番号5に示すヌクレオチド配列、
より成る群から選ばれるヌクレオチド配列を含む]と特異的に結合する試薬と接触させる。それにより細胞のNIP45V活性は低下する。

【0017】

(発明の詳細な説明)

本発明はNIP45Vポリペプチドをコードしている単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列；

配列番号8に示すアミノ酸配列；

配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列；

配列番号9に示すアミノ酸配列；

配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列；

配列番号10に示すアミノ酸配列；

配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列；および、

配列番号11に示すアミノ酸配列、
より成る群から選ばれるアミノ酸配列を含むNIP45Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

b) 配列番号1、2、3、4または5で示される配列を含むポリヌクレオチド；

c) 遺伝コードの縮重のため、その配列が(a)および(b)に明記したポリヌクレオチド配列から逸脱しているポリヌクレオチド配列；および、

d) (a)から(c)に明記したポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、

より成る群から選ばれるポリヌクレオチドに関する。

【0018】

さらに、NIP45Vスプライス変異体活性、特にヒトNIP45スプライス変異体活性により自己免疫疾患、アレルギー性疾患および感染症、およびその他の慢性炎症性疾患を制御し調節できることが、本出願人により発見された。そのような疾患には喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、結膜炎、春季カタル、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、重症筋無力症、乾癬、潰瘍性大腸炎、全身性炎症反応症候群(SIRS)、リンパ濾胞性胸腺炎、敗血症、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎(polyartits nodosa)、混合性結合組織病(MCTD)、シューグレン症候群、痛風などが挙げられる。

【0019】

NIP45はNFATpと相互作用すること、そしてIL-4遺伝子プロモーターにNFATpが結合することで誘導されるIL-4遺伝子の転写を増強することが知られている。この相互作用の本質は不明であるが、NIP45はNFATpを細胞質からIL-4遺伝子プロモーターと結合できる核内に輸送することに関与するアクセサリタンパク質である可能性がある。このアクセサリタンパク質が欠如した状態では、NFATpは自身で核膜を通過する能力がないため不活性であろう。NFATpノックアウトマウスを用いた実験では、活性化後表現型の末梢T細胞の蓄積、インビトロにおける第2次刺激後のT細胞の免疫応答の増進、および適切な抗原応答の停止における重大な欠陥が、NFATpの欠乏により引き起こされることが明らかとされた。一部のノックアウトマウスには、大きな胚中心が脾臓およびリンパ節に生じ、明らかな胸腺退縮の遅延が起こる。

【0020】

胸腺、脾臓およびリンパ節において、NIP45のスプライス変異体NIP45v1の発現はリンパ系の臓器での胚中心の正常な形成に重要な役割を果たし得る。NIP45v1スプライス変異体は完全長NIP45タンパク質の大部分を欠き、その中でも最も重要な部分であるユビキチン分子およびセントリン(Sentrin)分子と相同な領域を欠いている。ユビキチンは、細胞周期の進行を制御するのに必要とされるタンパク質の代謝回転を調節するのに関与している。セントリ

ンはユビキチン様の小タンパク質であり、他のタンパク質と共有結合し、核内への輸送のために標識化すると考えられている。ユビキチン相同ドメインおよびセントリン相同ドメインの欠如は、NIP45v1のNFATpの核内への輸送を無効にすることがある (Kamitani, Tら、(1997)J. Biol. Chem. 272(22):1400-4; Okura, Tら、(1996)J. Immunol. 157(10):4277-81)。同様に、NIP45v1における欠失は、NFATpとの相互作用を変える場合があり、NIP45v1とNFATpの同時発現ではもはやIL-4プロモーターによる転写に相乗効果を示さないことがある。従って、細胞におけるNIP45v1の効果は、NFATpを無能にするか、またはNIP45とNFATpとの相互作用をブロックし、それにより胚中心の形成を促進し、T細胞を前活性化(preactivate)し、2次免疫応答を増進させ、そして抗原応答の停止を遅らせる場合がある。

【0021】

一方、NIP45v1における欠失があっても、NIP45分子の当該部位を2つあわせ持ち、NIP45v1のNFATpとの相互作用により、IL-4転写効果を完全長NIP45の場合よりも大きく増進させる様式で、NIP45v1の機能を増進させることがある。

【0022】

胸腺における胚中心の形成の増大は、リンパ濾胞性胸腺炎を患っているヒト患者の特徴であり、重症筋無力症などの自己免疫疾患の発症としばしば関連している (Muller-Hermelink, H.K., Marx, A. Kirchner, T. Thymusおよびmediastinum. In Damjanov, I, Linder, J(eds.), Mosby Year Book. Mosby, St. Louis 1996, pp.1218-43)。さらに、NFATp欠乏マウスはTh2型の免疫応答発生の傾向を示し、逆に言うなればIL-4、IL-5およびIL-13を含む様々なTh2型遺伝子の転写をより促進する傾向を示す。このTh2型免疫応答の優先的な発生は、過敏性のアレルギー応答を引き起こし、Th2依存性自己免疫疾患およびその他の障害を引き起こすことがある。

【0023】

NIP45v2は、ユビキチン相同ドメインとセントリン相同ドメインの両方がその分子からほぼ完全に取り除かれる形で欠失している。セントリン相同ドメ

インを完全に欠失しているために、N I P v 2 は任意のセントリン様機能を欠き、それ故N F A T pの核内への輸送をより効果的にブロックできる場合があることを除けば、N I P 4 5 v 2 機能はN I P 4 5 v 1 機能と同様であることが期待される。

【0024】

N I P 4 5 v 3 は、完全長N I P 4 5 とN末端配列のみ異なる。この分子の欠失領域はN F A T pに対するN I P 4 5 の特異的な結合に重要であり、それ故、N I P 4 5 v 3 はN F A T pに対してほぼ親和性なく結合するか、またはその他のN F A Tファミリーのメンバーと代わりに結合する可能性がある。

【0025】

N I P 4 5 v 4 はN I P 4 5 のセントリン相同ドメインのみからなり、N I P 4 5 v 3 と同様に、セントリン様の機能は保持しているが、N F A T pに対する特異性は低下するであろう。

【0026】

この4つの異なるN I P 4 5 スプライス変異体は、それぞれの変異体に対する選択的阻害剤または活性化剤を開発するのに標的として用いることができる。

【0027】

N I P 4 5 Vポリペプチド

本発明に係るN I P 4 5 Vポリペプチドは配列番号8 (N I P 4 5 v 1)、配列番号9 (N I P 4 5 v 2)、配列番号10 (N I P 4 5 v 3)または配列番号11 (N I P 4 5 v 4)に示すアミノ酸配列、その配列の一部、または下記定義によるそのアミノ酸配列の生物学的に活性な変異体を含む。故に本発明に係るN I P 4 5 Vポリペプチドは、N I P 4 5 Vの一部、完全長N I P 4 5 V、またはN I P 4 5 Vの全てまたは一部を含む融合タンパク質であり得る。

【0028】

生物学的に活性な変異体

好ましくは、天然または非天然に存在する本発明のN I P 4 5 V変異体は、配列番号8から11のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも約85、好ましくは約95、96または99%一致するアミノ酸配列を有する。推定されるN I P

45V変異体と配列番号8から11のアミノ酸配列との一致パーセントはBlast 2 整列 (アラインメント) プログラムを用いて決定する。

【0029】

一致パーセントの変異は、例えばアミノ酸置換、挿入または欠失に起因し得る。アミノ酸置換は1対1のアミノ酸の置き換えとして定義される。置換されたアミノ酸が類似の構造的および/または化学的性質を有する場合、置換は保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタメートによるアスパルテートの置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

【0030】

アミノ酸挿入または欠失はアミノ酸配列への、またはその内部での変化である。これらは典型的には約1から5アミノ酸の範囲で起こる。NIP45Vポリペプチドの生物学的または免疫学的活性を破壊することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失できるかを決定する際の指針は、当分野で周知のコンピュータープログラム、例えばDNASTARソフトウェアを用いて見出すことができる。あるアミノ酸変化が生物学的に活性なNIP45V変異体ポリペプチドを生成するか否かは、例えば以下の具体的実施例に記載のように、NIP45Vポリペプチド活性を検定することにより容易に決定できる。

【0031】

融合タンパク質

融合タンパク質は、配列番号8から11のいずれかに示すアミノ酸配列の少なくとも5、6、8、10、25、もしくは50、またはそれ以上の連続アミノ酸を含むことができる。融合タンパク質は、NIP45Vポリペプチドアミノ酸配列に対する抗体の作製に、そして様々な検定系での使用に有用である。例えば、融合タンパク質は、NIP45Vポリペプチドの一部と相互作用するタンパク質の同定に使用できる。タンパク質親和クロマトグラフィーまたはタンパク質-タンパク質相互作用のためのライブラリーに基づく検定、例えば酵母2-ハイブリッドまたはファージディスプレイ系をこの目的のために使用できる。このような方法は当分野で周知であり、薬物スクリーニングとしても使用できる。

【0032】

N I P 4 5 Vポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合により融合した二つのポリペプチドセグメントを含んでいる。第一のポリペプチドセグメントは配列番号8から11のいずれか、または上記のようなそれらの配列の生物学的に活性な変異体の少なくとも5、6、8、10、25、もしくは50、またはそれ以上の連続アミノ酸を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長N I P 4 5 V変異体を含むことができる。

【0033】

第二のポリペプチドセグメントは完全長タンパク質またはタンパク質断片であってよい。融合タンパク質の構築に一般的に使用するタンパク質は、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、自己蛍光タンパク質(青色蛍光タンパク質(BFP)を包含する)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を包含する。さらに、融合タンパク質の構築には、ヒスチジン(His)標識、FLAG標識、インフルエンザヘマグルチニン(HA)標識、Myc標識、VSV-G標識、およびチオレドキシン(Trx)標識を包含するエピトープ標識を使用する。その他の融合構築は、マルトース結合タンパク質(MBP)、S-標識、Lexa DNA結合ドメイン(DBD)融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス(HSV)BP16タンパク質融合物を包含する。融合タンパク質はさらに、N I P 4 5 Vポリペプチドコード配列と非相同タンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むよう組み立てることができ、その結果、このN I P 4 5 Vポリペプチドは、開裂させ、非相同部分を無くすように精製できる。

【0034】

融合タンパク質は当分野で周知のように化学合成できる。好ましくは、融合タンパク質は二つのポリペプチドセグメントを共有結合で連結することにより、または分子生物学分野で標準的な方法により調製する。例えば、当分野で知られているように、第二のポリペプチドセグメントをコードしているヌクレオチドを有

する適切なリーディングフレームに配列番号1から5から成る群より選ばれるコード配列を含むDNA構築物を作製し、このDNA構築物を宿主細胞で発現させることによる組換えDNA法を用いて、融合タンパク質を調製できる。融合タンパク質構築用の多くのキットが、Promega Corporation(Madison, WI)、Stratagene(La Jolla, CA)、CLONTECH(Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)、MBL international Corporation(MIC; Watertown, MA)、およびQuantum Biotechnologies(Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS)といった企業から入手できる。

【0035】

種相同体の同定

NIP45Vポリペプチドのポリヌクレオチド(下記)を使用して他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングするために好適なプローブまたはプライマーを作製し、NIP45Vポリペプチドの相同体をコードしているcDNAを同定し、そして当分野で周知のようにこのcDNAを発現させて、NIP45Vポリペプチドの種相同体を得ることができる。

【0036】

NIP45Vポリヌクレオチド

NIP45様ポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であってよく、NIP45Vポリペプチドのコード配列またはこのコード配列の相補体を含んでいる。ヒトNIP45Vポリペプチドのコード配列を配列番号1、2、3、4または5に示す。

【0037】

ヒトNIP45Vポリペプチドをコードしている縮重ヌクレオチド配列、および、配列番号1、2、3、4または5に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50、好ましくは約75、85、90、95、96、98または99%一致するホモロガスなヌクレオチド配列またはこれらの相補物もまた、NIP45Vポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチド配列間の配列一致パーセントは、ALIGNのようなコンピュータプログラムを用いて決定するが、これは、ギャッ

ブオープンペナルティー - 12 およびギャップエクステンションペナルティー - 2 によるアフィンギャップ検索を用いるFASTAアルゴリズムを使用するものである。相補的DNA (cDNA) 分子、種相同体および生物学的に活性なNIP45VポリペプチドをコードしているNIP45Vポリヌクレオチドの変異体もやはりNIP45Vポリヌクレオチドである。

【0038】

NIP45Vポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記のNIP45Vポリヌクレオチド変異体および相同体もまたNIP45Vポリヌクレオチドである。典型的には、NIP45Vポリヌクレオチド配列は、当分野で周知のように、ストリンジェントな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知のNIP45Vポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより同定できる。例えば、以下の洗浄条件 -- 2X SSC (0.3M NaCl、0.03Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.1% SDS、室温 2回、各々30分間；次いで 2× SSC、0.1% SDS、50℃ 1回、30分間；次いで2× SSC、室温 2回、各々10分間 -- を使用して、最大約25 - 30%の塩基対ミスマッチを含む相同配列を同定できる。より好ましくは、相同核酸鎖は15 - 25%の塩基対ミスマッチを、さらに好ましくは5 - 15%の塩基対ミスマッチを含む。

【0039】

本明細書に開示するNIP45Vポリヌクレオチドの種相同体はさらに、適当なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。NIP45Vポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。二本鎖DNAの T_m は相同性が1%低下する毎に1 - 1.5℃ 低下することがよく知られている (Bonnerら、J.Mol.Biol. 81,123(1973))。故にヒトNIP45Vポリヌクレオチドの変異体または他の種のNIP45Vポリヌクレオチドは、推定の相同NIP45Vポリヌクレオチドを、配列番号1から5のいずれかのヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズさせて被験ハイブリッドを作製することによって同定できる。被験ハイブリッドの融解温度を完全に相補

的なヌクレオチド配列を有するトランスホルミラーゼポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較し、被験ハイブリッドの中の塩基対ミスマッチのパーセント数を算出する。

【0040】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件に従いトランスホルミラーゼポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列もまたNIP45Vポリヌクレオチドである。ストリンジェントな洗浄条件は当分野で周知且つ理解されており、例えばSambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, 9.50-9.51頁に開示されている。

【0041】

典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のためには、温度と塩濃度の組み合わせを、検討中のハイブリッドの理論的 T_m よりおよそ12 - 20 低くなるよう選択すべきである。配列番号1から5のいずれかに示すヌクレオチド配列を有するNIP45Vポリヌクレオチドまたはその相同体と、それらのヌクレオチド配列のいずれか1つと少なくとも約50、好ましくは約75、90、96、または98%一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの T_m は、例えばBoltonおよびMcCarthy, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 48,1390(1962)の式:

$$T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%ホルムアミド) - 600/l)$$

[式中、 l = 塩基対で表したハイブリッドの長さ]

を用いて算出できる。

【0042】

ストリンジェントな洗浄条件としては例えば、 $4 \times SSC(65^\circ)$ 、または50%ホルムアミド、 $4 \times SSC(42^\circ)$ 、または $0.5 \times SSC$ 、0.1%SDS(65)が挙げられる。高度ストリンジェントな洗浄条件は、例えば $0.2 \times SSC(65^\circ)$ などである。

【0043】

N I P 4 5 Vポリヌクレオチドの調製

天然に存在するN I P 4 5 Vポリヌクレオチドは、膜構成成分、タンパク質および脂質といった他の細胞成分を含まないよう単離できる。ポリヌクレオチドは細胞から調製でき、標準的核酸精製技術を用いて単離、またはポリメラーゼ連鎖反応（P C R）のような増幅技術を用いて合成、もしくは自動合成機を用いることによって調製できる。ポリヌクレオチドを単離する方法は機械的であり、当分野で知られている。ポリヌクレオチドを取得するためこのような任意の技術を用いて、単離されたN I P 4 5 Vポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、制限酵素およびプローブを用いてN I P 4 5 Vヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離できる。単離したポリヌクレオチドは含まないか、あるいは他の分子を少なくとも70、80、または90%含まない調製物である。

【0044】

N I P 4 5 V c D N A分子は、N I P 4 5 V m R N Aを鋳型に用いて標準的分子生物学技術にて調製できる。その後N I P 4 5 V c D N A分子は、当分野で周知でありSambrookら.(1989)のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いて複製できる。ヒトゲノムD N Aまたはc D N Aを鋳型に使用して本発明に係るポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るため、P C Rのような増幅技術を用いることができる。

【0045】

別法として、合成化学技術を用いてN I P 4 5 Vポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝コードの縮重は、例えば配列番号8から11のいずれかに示すアミノ酸配列を有するN I P 4 5 Vポリペプチドまたはその生物学的に活性な変異体をコードしている別のヌクレオチド配列の合成を可能にする。

【0046】

N I P 4 5 Vポリヌクレオチドの伸長

P C Rに基づく様々な方法を用いて開示されたヒトN I P 4 5 Vポリペプチドの一部をコードする核酸配列を伸長させ、プロモーターおよび調節要素といった上流配列を検出することができる。例えば制限部位P C Rは、既知の座に隣接する未知配列を検索するため、ユニバーサルプライマーを使用する（Sarkar, PCR

Methods Applic. 2,318-322,1993)。まず、ゲノムDNAを、リンカー配列に対するプライマーと既知領域に特異的なプライマーの存在下で増幅する。次に、増幅させた配列を、同じリンカープライマーと最初のもの内部にある別の特異的なプライマーを用いて、第二回目のPCRを行なう。各回のPCR産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し、逆転写を行ない配列決定する。

【0047】

既知領域に基づく異なるプライマーを用いて配列を増幅または伸長するために、逆PCRを使用することもできる(Trigliaら、Nucleic Acids Res. 16,8186, 1988)。OLIGO 4.06 Primer Analysisソフトウェア(National Biosciences Inc., Plymouth, Minn)のような市販ソフトウェアを用いて、長さ22 - 30ヌクレオチド長、50%またはそれ以上のGC含有量を持ち、約68 - 72の温度で標的配列とアニーリングするプライマーを設計できる。この方法は、幾つかの制限酵素を用いて、遺伝子の既知領域に適当な断片を作り出せる。次いでこの断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鋳型として使用する。

【0048】

使用できるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む、捕捉PCRである(Lagerstromら、PCR Methods Applic. 1,111-119,1991)。この方法では、作製した二本鎖配列を、PCRの実施前に当該DNA分子の未知断片中に入れるため、さらに複数の制限酵素消化とライゲーションを行うことができる。

【0049】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はParkerら、Nucleic Acids Res. 19,3055-3060,1991の方法である。さらに、PCR、ネスティド(nested)プライマー、およびPROMOTERFINDERライブラリー(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)を用いてゲノムDNA歩行を行なうことができる(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、イントロン/エクソン接合点の発見に有用である。

【0050】

スクリーニングで完全長cDNAを求める場合、より大きなcDNAを含むよ

うサイズ選択したライブラリーを使用するのが望ましい。遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含んでいるという点で、無作為プライミングしたライブラリーが好ましい。無作為プライミングした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を産生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、配列を5'非転写調節領域へと伸長させるのに有用な場合がある。

【0051】

市販品が入手可能な毛細管電気泳動系を用いて、PCRまたは配列決定産物のサイズを分析、またはヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、毛細管配列決定は、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザー励起する4種の異なる蛍光色素（各ヌクレオチドにつき1種ずつ）、および電荷結合素子カメラによる放射された波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア（例えばGENOTYPERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer）を用いて電気信号に変換でき、試料のロードからコンピューター分析および電子的データ表示に至る全プロセスをコンピューター管理することができる。毛細管電気泳動は、特定の試料中に限られた量で存在するかも知れないDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

【0052】

NIP45Vポリペプチドの取得

NIP45Vポリペプチドは、例えばヒト細胞からの精製によって、NIP45Vポリヌクレオチドの発現によって、または直接的化学合成によって取得できる。

【0053】

タンパク質精製

NIP45Vポリペプチド（NIP45v1-4ポリペプチド）は、NIP45Vポリヌクレオチドでトランスフェクト宿主細胞を包含する、タンパク質を発現する任意のヒト細胞から精製できる。胸腺、脾臓、リンパ節および他の免疫関連組織がNIP45Vポリペプチドの特に有用な原料である。精製NIP45Vポリペプチドは、細胞内のNIP45Vポリペプチドに通常付随するその他の化

合物、例えばある種のタンパク質、炭水化物または脂質から、当分野で周知の方法を用いて分離する。このような方法は、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、および調製用ゲル電気泳動を包含するが、これらに限定されない。

【0054】

精製NIP45Vポリペプチドの調製物は少なくとも80%純粋であり、好ましくは該調製物は90%、95%、または99%純粋である。調製物の純度はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような当分野で既知の任意の手段によって評価できる。

【0055】

NIP45Vポリヌクレオチドの発現

NIP45Vポリペプチドを発現させるため、挿入されたコード配列の転写と発現に必要な要素を含む発現ベクター中にNIP45Vポリヌクレオチドを挿入することができる。当業者に周知の方法を利用して、NIP45Vポリペプチドをコードしている配列および適当な転写および翻訳調節要素を含む発現ベクターを構築できる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えがある。このような技術は、例えばSambrookら、(1989)およびAusubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York., 1989に記載されている。

【0056】

NIP45Vポリペプチドをコードしている配列を含み、そして発現する様々な発現ベクター/宿主系が利用できる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌；酵母発現ベクターにより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）により感染を受けた昆虫細胞系、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）、もしくは細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）により形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が包含されるがこれらに限定される訳ではない。

【0057】

調節要素または調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写と翻訳を実行するベクターの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域 - である。かかる要素はその強さと特異性において異なっている。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導的プロモーターを包含する、多数の好適な転写および翻訳要素を使用できる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、BLUESCRIPTファージミド (Stratagene, LaJolla, Calif.) またはpSPORT1プラスミド (Life Technologies) 等のハイブリッドlacZプロモーターのような誘導的プロモーターを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用できる。植物細胞のゲノムから誘導したプロモーターまたはエンハンサー (例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子)、または植物ウイルスから誘導したプロモーターまたはエンハンサー (例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列) を該ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来の、または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。NIP45Vポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列を複数コピー含む細胞系を作製する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

【0058】

細菌および酵母発現系

細菌系では、NIP45Vポリペプチドに対して意図する用途に応じて幾つかの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体の誘導のため大量のNIP45Vポリペプチドが必要である場合は、容易に精製できる融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターが使用できる。このようなベクターは、BLUESCRIPT(Stratagene)のような多機能E.coliクローニングおよび発現ベクターを包含するが、これに限定される訳ではない。BLUESCRIPTベクターにおいては、NIP45Vポリペプチドをコードしている配列を、 β -ガラクトシダーゼのアミノ末端Metとこれに続く7残基の配列と共にフレーム内で該ベクター中にライゲーションすることができ、その結果ハイブリッドタンパク質が産生される。pINベクター (

Van Heeke & Schuster, J.Biol.Chem. 264,5503-5509,1989) または p G E X ベクター (Promega, Madison, Wis.) もまた、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) を伴う融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるのに使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン - アガロースビーズに吸着させ、その後遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより、溶菌させた細胞から容易に精製できる。このような系で調製したタンパク質は、ヘパリン、トロンピン、または第 X a 因子プロテアーゼ開裂部位を含むよう設計でき、その結果、目的とするクローンポリペプチドを G S T 部分から随意に解放することができる。

【 0 0 5 9 】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、 α 因子、アルコールオキシダーゼ、および P G H のような構成的または誘導的プロモーターを含む幾つかのベクターが使用できる。総説として Ausubel ら、(1989) および Grant ら、Methods Enzymol. 153,516-544,1987 を参照されたい。

【 0 0 6 0 】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合、N I P 4 5 V ポリペプチドをコードしている配列の発現は、幾つかのプロモーターのうち任意のものにより駆動できる。例えば、C a M V の 3 5 S および 1 9 S プロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、または T M V 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる (Takamatsu, EMBO J. 6,307-311,1987)。別法として、RUBISCO の小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用することもできる (Coruzzi ら、EMBO J. 3,1671-1680,1984 ; Broglie ら、Science 224,838-843,1984 ; Winter ら、Results Probl.Cell Differ. 17,85-105,1991)。これらの組み立て物は、直接 D N A 形質転換または病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞中に導入できる。このような技術は幾つかの一般に入手可能な総説に記載されている (例えば、Hobbs または Murray、MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp191-196,1992)。

【 0 0 6 1 】

昆虫系もまたNIP45Vポリペプチドの発現に使用できる。例えば、かかる系の1つAutographa californica核多角体病ウイルス (AcNPV) は、Spodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusiaの幼虫で外来遺伝子を発現させるベクターとして使用する。NIP45様ポリペプチドをコードしている配列を、ポリヘドリン遺伝子のような該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置くことができる。NIP45Vポリペプチドをうまく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが生成する。次いでこの組換えウイルスをS. frugiperda細胞またはTrichoplusiaの幼虫への感染に使用し、そこでNIP45Vポリペプチドを発現させることができる (Engelhardら、Proc.Nat.Acad.Sci. 91,3224-3227,1994)。

【0062】

哺乳動物発現系

ウイルスに基づく多くの発現系を用いて哺乳動物宿主細胞でNIP45Vポリペプチドを発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、NIP45Vポリペプチドをコードしている配列は、後期プロモーターおよび3部に分かれたリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体中にライゲーションできる。該ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域における挿入を用いて、感染宿主細胞においてNIP45Vポリペプチドを発現できる生存ウイルスを取得できる (Logan & Shenk, Proc.Natl.Acad.Sci. 81,3655-3659,1984)。所望によりラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて哺乳動物宿主細胞での発現を増大させることができる。

【0063】

ヒト人工染色体 (HAC) もまた、プラスミドが内包し発現するDNA断片よりも大きなDNA断片の運搬に使用できる。6Mから10MのHACを組み立て、常套的送達法により細胞に到達させる (例えば、リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、または小胞)。

【0064】

さらに、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列のより効率的な翻訳を達成するために、特異的開始シグナルを使用できる。かかるシグナルはA T G開始コドンおよび連続配列を包含する。N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入した場合、さらなる転写または翻訳調節シグナルは必要ないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入した場合は、外因性の翻訳調節シグナル（A T G開始コドンを包含する）を供給すべきである。開始コドンは挿入物全体を確実に翻訳させるために、正しいリーディングフレームになければならない。外因性翻訳要素および開始コドンは天然および合成両者の様々な起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に対し適切なエンハンサーを存在させることにより増強できる（Scharfら、Results Probl.Cell Differ. 20,125-162, 1994）。

【0065】

宿主細胞

宿主細胞菌株は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現されたN I P 4 5 Vポリペプチドを所望の方法で処理できる能力を目的として選択できる。該ポリペプチドのこのような修飾には、アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、燐酸化、脂質化、およびアシル化が包含されるがこれらに限定されない。該ポリペプチドの「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進するために使用できる。翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的メカニズムを持つ異なる宿主細胞（例えばC H O、H e L a、M D C K、H E K 2 9 3、B - リンパ腫細胞およびW I 3 8）が、American Type Culture Collection（A T C C ; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209）から入手でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択できる。

【0066】

組換えタンパク質の、長期高収量産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、N I P 4 5 Vポリペプチドを安定に発現する細胞系を、ウイルス複製起点および/または内因性発現要素、および同じまたは別のベクター上にある選択マー

カー遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換することができる。該ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1 - 2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在が、導入されたN I P 4 5 V配列をうまく発現する細胞の生育と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型にとって適当な組織培養技術を用いて増殖させることができる。例えば、ANIMAL CELL CULTURE, R.I.Freshney, ed., 1986を参照されたい。

【0067】

幾つかの選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収できる。これらには、それぞれtk⁻またはaprt⁻細胞で利用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell 11,223-32,1977)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell 22,817-23,1980)遺伝子が包含されるがこれらに限定される訳ではない。さらに、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤耐性を選択の基準に用いることができる。例えば、dhfrはメソトレキサートに対する耐性を付与し(Wiglerら、Proc.Natl.Acad.Sci. 77,3567-70,1980)nptはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG - 4 1 8に対する耐性を付与し(Colbere-Garapinら、J.Mol. Biol. 150,1014,1981)、そしてalsおよびpatはそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する(Murray, 1992, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するようにさせ、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するようにさせる(Hartman & Mulligan, Proc.Natl.Acad.Sci. 85,8047-51,1988)。アントシアニンのような可視マーカー、β - グルクロニダーゼとその基質G U S、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定し、特異的ベクター系に帰すことのできる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用できる(Rhodesら、Methods Mol.Biol. 55,121-131,1995)。

【0068】

N I P 4 5 Vポリペプチドの発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在はN I P 4 5 Vポリヌクレオチドが存在することも

示唆しているが、N I P 4 5 Vポリヌクレオチドの存在と発現は確認する必要がある。例えば、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列がマーカー遺伝子配列内部に挿入されている場合、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の不在によって同定できる。これとは別に、単一のプロモーターの調節下にN I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列と、マーカー遺伝子が直列（タンデム）に位置する場合がある。誘導または選択に応答してこのマーカー遺伝子は発現し、通常、N I P 4 5 Vポリヌクレオチドの発現を示す。

【0069】

これとは別に、N I P 4 5 Vポリヌクレオチドを含み、N I P 4 5 Vポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者に知られる様々な方法によって同定できる。これらの方法には、DNA - DNAまたはDNA - RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質生検またはイムノアッセイ技術（核酸またはタンパク質の検出および/または定量的のための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含む）が含まれるがこれらに限定されない。例えば、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片またはN I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの断片を使用するDNA - DNAまたはDNA - RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、N I P 4 5 Vポリヌクレオチドを含む形質転換体を検出するための、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列から選択されるオリゴヌクレオチドの使用を含む。

【0070】

N I P 4 5 Vポリペプチドに対し特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用して該ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコルが当分野で知られている。例として、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、および蛍光活性化セルソーティング（F A C S）がある。N I P 4 5 Vポリペプチド上の2個の非干渉性エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイが使用でき、または、競合的結合検定を使用することができ

る。これらのおよびその他の検定はHamptomら、SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St.Paul, Minn., 1990およびMaddoxら、J.Exp.Med. 158,1211-1216,1983に記載されている。

【0071】

多岐にわたる標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、様々な核酸およびアミノ酸検定に使用できる。N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識化ハイブリダイゼーションまたはP C Rプローブを調製する手段は、標識したヌクレオチドを使用する、オリゴ標識化、ニック翻訳、末端標識化、またはP C R増幅を包含する。これとは別に、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列を、mRNAプローブの産生のためのベクター中にクローニングすることもできる。このようなベクターは当分野で既知であり、市販品が入手でき、標識化ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT 7、T 3、またはS P 6を添加することによりインビトロでのRNAプローブの合成に使用することができる。これらの方法は、市販の様々なキットを用いて実施できる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なりポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、および蛍光、化学ルミネセント、または色素生成物質、ならびに基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが包含される。

【0072】

N I P 4 5 Vポリペプチドの発現および精製

N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列で形質転換させた宿主細胞は、発現と、細胞培養からのタンパク質の回収に適した条件下で培養できる。形質転換細胞により産生されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに応じて分泌されまたは細胞内に貯留され得る。当業者には理解できるであろうが、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通った可溶性N I P 4 5 Vポリペプチドの分泌を指令する、または膜結合N I P 4 5 Vポリペプチドの、膜挿入を指令する、シグナル配列を含むよう設計できる。

【0073】

上に論じたように、他の組み立て物を用いて、N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードしているヌクレオチド配列と結合させることができる。このような精製促進ドメインは、金属キレート化ペプチド、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タンパク質Aドメイン、およびFLAGS伸長 / 親和精製系で利用するドメインが包含されるが、これらに限定されない (Immunex Corp., Seattle, Wash.)。精製ドメインとN I P 4 5 Vポリペプチドとの間に開裂可能リンカー配列、例えば第X a因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列を入れること (Invitrogen, San Diego, CA) もまた、精製を促進するために利用できる。このような発現ベクターの1つは、N I P 4 5 Vポリペプチドと、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質の発現を提供する。このヒスチジン残基はI M A C (Porathら、Prot.Exp.Purif. 3,263-281,1992に記載の固定化金属イオン親和クロマトグラフィー) による精製を促進し、一方エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からのN I P 4 5 Vポリペプチドの精製手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターはKrollら、DNA Cell Biol. 12,441-453,1993に開示されている。

【0074】

化学合成

N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしている配列は、その全体または一部を、当分野で周知の化学的方法を用いて合成できる (Caruthersら、Nucl.Acids Res. Symp.Ser. 215-223,1980 ; Hornら、Nucl.Acids Res.Symp.Ser. 225-232,1980)。これとは別に、N I P 4 5 Vポリペプチド自身を、そのアミノ酸配列を合成するための化学的方法、例えば固相技術を用いる直接ペプチド合成を用いて調製できる (Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 85,2149-2154,1963 ; Robergeら、Science 269,202-204,1995)。タンパク質合成は手動技術またはオートメーションを用いて実施できる。自動化合成は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチド合成機 (Perkin Elmer) を用いて達成できる。所望により、N I P 4 5 Vポリペプチド

の断片を別々に合成し、化学的方法を用いて合して完全長の分子を調製することもできる。

【0075】

新たに合成したペプチドは、調製用高速液体クロマトグラフィー（例えばCreighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983）により実質的に精製できる。合成NIP45Vポリペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定により確認できる（例えばエドマン分解法；Creighton、上記を参照されたい）。さらに、直接合成中にNIP45Vポリペプチドのアミノ酸配列の任意の部分を改変させ、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質由来の配列と合して、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を調製することができる。

【0076】

改変NIP45Vポリペプチドの調製

当業者には理解できるであろうが、天然に存在しないコドンを含むNIP45Vポリペプチドコード化ヌクレオチドを調製することは有利であり得る。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させ、または所望の性質、例えば天然に存在する配列から産み出される転写物の半減期より長い半減期を持つRNA転写物を調製することができる。

【0077】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当分野で一般的に知られる方法を用いて、該ポリペプチドまたはmRNA産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する改変を包含する（但しこれらに限定される訳ではない）様々な理由で、NIP45Vポリペプチドコード配列を改変させるように設計できる。無作為断片化によるDNAシャフリングと遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再集合を用いてヌクレオチド配列を設計できる。例えば、位置指定突然変異誘発を用いて、新たな制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調製し、突然変異を導入する等を実施できる。

【0078】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、N I P 4 5 Vポリペプチドのエピトープに特異的に結合するよう作製できる。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の免疫グロブリン分子、およびその断片、例えばF a b、F (a b')₂、およびF vを包含し、これらはN I P 4 5 Vポリペプチドのエピトープに結合できる。典型的には、エピトープを形成するためには少なくとも6、8、10、または12の連続するアミノ酸が必要である。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープはより多くの、例えば少なくとも15、25、または50のアミノ酸を必要とするかも知れない。

【0079】

N I P 4 5 Vポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体は治療に使用でき、そして免疫化学検定、例えばウェスタンブロット、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学検定、免疫沈降、またはその他の当分野で既知の免疫化学的検定に使用できる。所望の特異性を有する抗体の同定のため、様々なイムノアッセイが使用できる。競合的結合または免疫放射検定のための多数のプロトコルが当分野でよく知られている。このようなイムノアッセイは典型的には、免疫原と、その免疫原に特異結合する抗体との間の複合体形成の測定を含んでいる。

【0080】

典型的には、N I P 4 5 Vポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学検定に使用する時、他のタンパク質が提供する検出シグナルより少なくとも5、10、または20倍高い検出シグナルを提供する。好ましくは、N I P 4 5 Vポリペプチドに特異結合する抗体は、免疫化学検定で他のタンパク質を検出せず、N I P 4 5 Vポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

【0081】

N I P 4 5 Vポリペプチドは、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトを免疫してポリクローナル抗体を産生させるのに使用できる。所望により、N I P 4 5 Vポリペプチドは、担体タンパク質、例えば牛血清アルブミン、チログロブリン、およびスカシガイヘモシアニンとコンジュ

ゲートさせることができる。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増大させるために種々のアジュバントを使用できる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、鉍物性ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性物質（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール）を包含するがこれらに限定されない。ヒトに使用するアジュバントの中ではBCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) および *Corynebacterium parvum* が特に有用である。

【0082】

NIP45Vポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養中の連続的細胞系により抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製できる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術があるがこれらに限定されない (Kohlerら、*Nature* 256,495-497,1985; Kozborら、*J. Immunol. Methods* 81,31-42,1985; Coteら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80,2026-2030,1983; Coleら、*Mol. Cell Biol.* 62,109-120,1984)。

【0083】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして適当な抗原特異性と生物活性を持つ分子を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が利用できる (Morrisonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81,6851-6855,1984; Neubergerら、*Nature* 312,604-608,1984; Takedaら、*Nature* 314,452-454,1985)。モノクローナルおよびその他の抗体はまた、これを治療に使用した場合に患者が該抗体に対する免疫反応を起こすのを防ぐため、「ヒト化」することができる。このような抗体は、治療に直接使用できるほど配列が充分ヒトに類似しているかも知れず、または幾つかの重要残基の変更を必要とするかも知れない。齧歯類の抗体とヒト配列の間の配列相違は、個々の残基の位置指定突然変異誘発により、または相補性決定領域全体の格子により、ヒト配列内の残基と相違する残基を置き換えることによって最小化することができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載のように組換え法を用いて調製できる。NIP45Vポリペプチドに特異的に結合する抗体は、U.S.5565332に開示のように、部分的または完全に

ヒト化した抗原結合部位を含むことができる。

【0084】

これに代わり、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の調製のために記載した技術を適合させ、N I P 4 5 Vポリペプチドに特異結合する一本鎖抗体を調製することができる。関連する特異性を持つが別個のイディオタイプ組成を有する抗体を、無作為組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから鎖シャフリングによって調製することができる (Burton, Proc.Natl.Acad.Sci. 88,11120-23,1991)。

【0085】

一本鎖抗体はまた、ハイブリドーマ c D N A を鋳型に用いて、P C R のような D N A 増幅法を用いて組み立てることができる (Thirionら、1996, Eur.J.Cancer Prev. 5,507-11)。一本鎖抗体は単一または二重特異性であり得、また、二価または四価であり得る。四価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては例えば Coloma & Morrison, 1997, Nat.Biotechnol. 15,159-63 に教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては Mallender & Voss, 1994, J.Biol.Chem. 269,199-206 に教示されている。

【0086】

下記のように、一本鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列を手動または自動ヌクレオチド合成を用いて組み立て、標準的組換え D N A 法を用いて発現組み立て物中にクローニングし、そして細胞中に導入してコード配列を発現させることができる。別法として、一本鎖抗体を、例えば糸状ファージ技術を用いて直接調製することもできる (Verhaarら、1995, Int.J.Cancer 61,497-501; Nichollaら、1993, J.Immunol.Meth. 165,81-91)。

【0087】

N I P 4 5 V ポリペプチドに特異結合する抗体はまた、リンパ球集団においてインビボ産生を誘導することによって、または、文献に開示されている極めて特異的な結合試薬のパネルまたは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって調製することもできる (Orlandiら、Proc.Natl.Acad.Sci. 86,3833-3837,1989; Winterら、Nature 349,293-299,1991)。

【0088】

その他の型の抗体を、本発明方法において組み立て、治療に使用することができる。例えば、W093/03151に開示のように、キメラ抗体を組み立てることができる。免疫グロブリンから誘導され多価且つ多重特異的である結合タンパク質、例えばW094/13804に記載の「diabodies」もまた調製できる。

【0089】

本発明に係る抗体は当分野で周知の方法により精製できる。例えば、抗体は、N I P 4 5 Vポリペプチドが結合しているカラムを通過させることにより親和精製できる。次いで、結合した抗体を、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出することができる。

【0090】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対し相補的なヌクレオチド配列である。いったん細胞中に導入されるとこの相補的ヌクレオチドは、該細胞が産生した天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよい。より長い配列もまた使用できる。アンチセンスオリゴヌクレオチド分子をDNA組み立て物に提供し、上記のように細胞中に導入して、その細胞におけるN I P 4 5 V遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

【0091】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこの両者の組み合わせであってよい。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、磷酸エステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カルボネート、および磷酸トリエステルといった非ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する別のヌクレオチドの3'末端と共有結合

させることにより、手動で、または自動合成機によって合成できる。Brown, Meth.Mol. Biol. 20,1-8,1994; Sonveaux, Meth.Mol.Biol. 26,1-72,1994; Uhlmannら、Chem.Rev. 90,543-583,1990を参照されたい。

【0092】

NIP45V遺伝子の制御、5'、または調節領域と二本鎖を形成するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することにより、NIP45V遺伝子発現の修飾が得られる。転写開始部位、例えば開始部位から-10および+10位の間から誘導されるオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対合法を用いて阻害を達成できる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子またはシャペロンの結合に足るほど開く能力の阻害を惹起するため、有用である。三本鎖DNAを用いる治療上の進歩が文献に記載されている(例えばGeeら、Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt.Kisco, N.Y., 1994)。転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによりmRNAの翻訳を遮断するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた設計できる。

【0093】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとNIP45Vポリヌクレオチドの相補配列との間に好結果の複合体を形成させるためには、正確な相補性は必要ない。例えばNIP45Vポリヌクレオチドに対し正確に相補的である2、3、4、もしくは5またはそれ以上の長さの連続するヌクレオチドであって、その各々が、隣接するNIP45Vヌクレオチドとは相補的ではない連続するある長さのヌクレオチドによって隔てられているものを含有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、NIP45VmRNAに対する十分な標的化特異性を提供できる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの長さはそれぞれ少なくとも4、5、6、7もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド長である。非相補的な介在配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス-センスの対の算出融点を容易に使用して、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定のNIP45Vポリヌクレオチド配列間で寛容されるミスマッチの程度を決定できるであろう。

【0094】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、NIP45Vポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力に影響を及ぼすことなく修飾できる。これらの修飾は該アンチセンス分子の内部、または一端もしくは両端である。例えば、ヌクレオシド間の磷酸結合は、アミノ基と末端リボースの間にいろいろな数の炭素残基を有するコレステリルまたはジアミン部分を加えることによって修飾できる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースの代わりにアラビノース、または3'ヒドロキシ基または5'磷酸基が置換されている3',5'-置換オリゴヌクレオチドもまた修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用できる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法により調製できる。例えば、Agrawalら、Trends Biotechnol. 10,152-158,1992; Uhlmannら、Chem.Rev. 90,543-584,1990; Uhlmannら、Tetrahedron.Lett. 215,3539-3542,1987を参照されたい。

【0095】

リボザイム

リボザイムは触媒活性を有するRNA分子である。例えば、Cech, Science 236,1532-1539; 1987; Cech, Ann.Rev.Biochem. 59,543-568; 1990, Cech, Curr.Opin.Struct.Biol. 2,605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12,510-515, 1996を参照されたい。当分野で知られるように、リボザイムは、RNA配列を開裂することにより遺伝子機能を阻害するのに使用できる(例えば、Haseloffら、米国特許5641673)。リボザイムの作用機構は、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後のendonucleolyticな開裂を含む。例には、特異的ヌクレオチド配列のendonucleolyticな開裂を特異的且つ効果的に触媒できる、設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子がある。

【0096】

NIP45Vポリヌクレオチドのコード配列、例えば配列番号2、3、4または5に示したヌクレオチド配列を用いて、NIP45Vポリヌクレオチドから転写されたmRNAに特異結合するリボザイムを作製できる。他のトランスのRNA分子を極めて配列特異的に開裂できるリボザイムを設計し組み立てる方法が開

発され、当分野で記載されている (Haseloffら、Nature 334,585-591,1988)。
例えば、リボザイムの開裂活性は、別個の「ハイブリダイゼーション」領域を該リボザイム中に組み入れることによって、特定のRNAを標的とさせることができる。このハイブリダイゼーション領域は標的RNAに対し相補的な配列を含んでおり、したがってその標的と特異的にハイブリダイズする (例えばGerlachら、EP321201を参照されたい)。

【0097】

NIP45VRNA標的内部の特異的リボザイム開裂部位は、この標的分子を、以下の配列：GUA、GUU、およびGUCを包含するリボザイム開裂部位についてスキャンすることにより同定できる。同定できたならば、該開裂部位を含む標的RNAの領域に対応する、15および20の間のリボヌクレオチドを有する短いRNA配列を、標的を非機能的にし得る二次構造の特徴について評価できる。さらに、候補のNIP45VRNA標的の適合性を、リボヌクレアーゼ防護検定を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する利用可能性を試験することによって評価できる。配列番号2、3、4または5に示すヌクレオチド配列およびこれらの相補物は、適当なハイブリダイゼーション領域配列の供給源を提供する。より長い相補配列を用いて、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増大させることができる。リボザイムのハイブリダイズおよび開裂する領域は、相補領域を介して標的RNAにハイブリダイズする時、リボザイムの触媒領域が標的を開裂し得るといったように、完全に相関している。

【0098】

リボザイムはDNA組み立て物の一部として細胞内に導入できる。マイクロ注入、リポソーム媒介トランスフェクション、電気穿孔、または磷酸カルシウム沈殿といった機械的方法を用いて、NIP45V発現の低下が望まれる細胞中にリボザイム含有DNA組み立て物を導入することができる。これとは別に、細胞がDNA組み立て物を安定的に保持することが望まれる場合は、該組み立て物をプラスミド上で供給し、当分野で知られるように、別個の要素として維持するか、または細胞のゲノム中に組み込むことができる。リボザイムコード化DNA組み

立て物は、細胞中のリボザイムの転写を調節するために、プロモーター要素、エンハンサーまたはUAS要素、および転写ターミネーターシグナルといった転写調節要素を含み得る。

【0099】

Haseloffら、米国特許5641673に教示のように、リボザイムは、標的遺伝子の発現を誘導する因子に応答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。リボザイムはまた、追加レベルの調節を提供するよう設計でき、その結果、mRNAの破壊はリボザイムと標的遺伝子の両者が細胞に誘導された時にのみ起こる。

【0100】

スクリーニング方法

本発明は、NIP45VポリペプチドまたはNIP45Vポリヌクレオチドに結合する、またはその活性を調節する、被験化合物をスクリーニングするための検定を提供する。好ましくは、被験化合物はNIP45Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、ヒトNIP45Vを介して媒介されるNIP45またはNIP45アナログの効果を、被験化合物の不在時に比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下または増大させる。

【0101】

被験化合物

被験化合物は当分野で既知の薬理学的物質であってよく、または薬理活性を持っていることが前もって分かっていない化合物であってよい。この化合物は天然に存在する、または実験室で設計されたものであってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス特定可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを要する合成ライブラリー法、「一ビーズ化合物」ライブラリー法、および親和クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する（但しこれらに限定される訳ではない）当分野

で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用できる。Lam, *Anticancer Drug Des.* 12,145,1997を参照されたい。

【0102】

分子ライブラリーの合成法は当分野でよく知られている（例えば、DeWittら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90,6909,1993; Erbら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91,11422,1994; Zuckermannら、*J.Med.Chem.* 37,2678,1994; Choら、*Science* 261,1303,1993; Carellら、*Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 33,2059,1994; Carellら、*Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 33,2061; Gallopら、*J.Med.Chem.* 37,1233,1994を参照されたい）。化合物のライブラリーは溶液で（例えば、Houghten, *Biotechniques* 13,412-421,1992）、またはビーズ(Lam, *Nature* 354,82-84,1991)、チップ（Fodor, *Nature* 364,555-556,1993）、細菌または孢子（Ladner、米国特許5223409）プラスミド（Cullら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89,1865-1869,1992）、またはファージ（Scott & Smith, *Science* 249,386-390, 1990; Devlin, *Science* 249,404-406,1990）;Cwirlaら、*Proc.Natl.Acad.Sci.*97,6378-6382,1990; Felici, *J.Mol.Biol.* 222,301-310,1991; およびLadner、米国特許5223409）上に提供できる。

【0103】

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、高（ハイ）スループットスクリーニングを用いて、N I P 4 5 Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する能力、またはN I P 4 5 V活性もしくはN I P 4 5 V遺伝子発現に影響を及ぼす能力についてスクリーニングできる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの個別的化合物を並行して試験でき、その結果多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできる。最も広範に確立されている技術は96ウェル微量定量プレートを利用するものである。この微量定量プレートのウェルは、典型的には50から500 μ lの範囲の検定容量を必要とする。このプレートに加えて、96ウェルフォーマットに適合

させた多くの機器、材料、ピペット、ロボット、プレート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。

【0104】

別法として、「自由フォーマット検定」、または試料間に物理的障壁を持たない検定が使用できる。例えば、組み合わせペプチドライブラリーのための、単純な均質検定で色素細胞（メラノサイト）を用いる検定が、Jayawickremeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19,1614-18(1994)に記載されている。ペトリ皿中のアガロースの下にこの細胞を入れ、次いで組み合わせ化合物を伴っているビーズをアガロースの表面に載せる。組み合わせ化合物はこのビーズから化合物を部分的に放出する。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化化合物が細胞の色の変化を惹起するため、活性化化合物を暗色色素領域として視覚化することができる。

【0105】

自由フォーマット検定のもう一つの例は、生体分子スクリーニング学会第1回年次総会（Philadelphia, Pa., 1995年11月7-10日）で報告されたChelsky、「組み合わせライブラリーのスクリーニングのための戦略：新規な、そして伝統的なアプローチ」により記載されている。Chelskyは、カルボニックアンヒドラーゼのための単純な均質酵素検定をアガロースゲルの内部に入れ、その結果ゲル中の酵素がゲル全体に色の変化を惹起するようにさせた。その後、光リンカーを介して組み合わせ化合物を持つビーズをゲル内部に入れ、すると該化合物はUV光により部分的に放出された。酵素を阻害する化合物は、色の変化がより少ない局所阻害領域として観察された。

【0106】

さらに別の例がSalmonら、Molecular Diversity 2,57-63(1996)に記載されている。この例では、組み合わせライブラリーを、寒天中で生育する癌細胞への細胞毒性効果を有する化合物についてスクリーニングした。

【0107】

もう一つのハイスループットスクリーニング法がBeutelら、米国特許5976813に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次

に1またはそれ以上の検定成分を、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、またはその他の形の容易に操作できる固体担体の内部、上、または底に入れる。試料がこの多孔性マトリックスに導入されるとこれらは充分ゆっくりと拡散し、その結果、被験試料が混ざらずに検定が遂行できる。

【0108】

結合検定

結合検定について、被験化合物は好ましくは、NIP45Vポリペプチドの活性部位に結合してこれを占有し、それにより基質（例えば、NFATp）が活性部位に接近できなくさせるか、または接近できる結果、正常な生物活性が妨げられるような小分子である。このような小分子の例は小ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが、これらに限定される訳ではない。

【0109】

結合検定では、被験化合物またはNIP45Vポリペプチドのいずれかが検出可能な標識、例えば蛍光、放射性同位元素、化学ルミネセント、または酵素標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）を含むことができる。そこで、NIP45Vポリペプチドに結合している被験化合物の検出は、例えば放射能の放出を直接計数することにより、またはシンチレーション計数により、または検出可能産物への適当な基質の変換を測定することにより、達成できる。

【0110】

別法として、NIP45Vポリペプチドへの被験化合物の結合を、反応体のいずれをも標識せずに測定することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、被験化合物とNIP45Vポリペプチドとの結合を検出できる。マイクロフィジオメーター（例えばサイトセンサー™）とは、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレス可能電位差センサー（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、被験化合物とNIP45Vポリペプチドの相互作用の指標として使用できる（McConnellら、Science 257,1906-1912,1992）。

【0111】

被験化合物がN I P 4 5 Vポリペプチドに結合する能力の測定はまた、実時間 Bimolecular Interaction Analysis (B I A) のような技術を用いて達成できる (Sjolander & Urbaniczky, Anal.Chem. 63,2338-2345,1991、およびSzaboら、Curr.Opin.Struct.Biol. 5,699-705,1995)。 B I A は、いかなる反応体をも標識せずに、生体特異的相互作用を実時間で研究するための技術である (例えばBI Acore(登録商標))。光学的現象表面プラズモン共鳴 (S P R) の変化を、生体分子間の実時間反応の指標に使用できる。

【 0 1 1 2 】

本発明のさらに別の態様では、 N I P 4 5 Vポリペプチドを二ハイブリッド検定または三ハイブリッド検定 (例えば、米国特許5283317; Zervosら、Cell 72,223-232,1993; Maduraら、J.Biol.Chem. 268,12046-12054,1993; Bartelら、Biotechniques 14,920-924,1993; Iwabuchiら、Oncogene 8,1693-1696,1993; およびBrent W094/10300) における「おとりタンパク質」として使用し、 N I P 4 5 Vポリペプチドに結合またはこれと相互作用してその活性を調節する他のタンパク質を同定することができる。

【 0 1 1 3 】

二ハイブリッド系は殆どの転写因子のモジュール的性格に基づくものであり、それは、分離可能なDNA結合および活性化ドメインから成っている。簡潔に述べると、この検定は二種の異なるDNA組み立て物を利用する。例えば、一方の組み立て物においては、 N I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、既知の転写因子のDNA結合ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる (例えばG A L - 4)。別の組み立て物においては、未同定タンパク質 (「餌」または「試料」) をコードしているDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる。もし「おとり」および「餌」タンパク質がインビボで相互作用してタンパク質依存複合体を形成できたならば、該転写因子のDNA結合および活性化ドメインは極めて近位に招来される。この近位性が、転写因子に応答する転写調節部位と機能的に結合しているリポーター遺伝子 (例えばL a c Z) の転写を可能にする。リポーター遺伝子の発現が検出でき、機能的転写因子を含む細胞コロニーを単離し、N

NI P 4 5 Vポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードしているDNA配列取得に使用することができる。

【0114】

反応体の一方または両方の非結合型からの結合型の分離を促進するため、そして検定の自動化の便宜を図るため、NI P 4 5 Vポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固定化することが望ましいかも知れない。したがって、NI P 4 5 Vポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体は、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、微量定量ウェル、管、シリコンチップ、またはビーズ（ラテックス、ポリスチレン、またはガラスビーズを包含するがこれらに限定されない）のような粒子を包含するがこれらに限定されない。共有および非共有結合、受動吸収、またはそれぞれポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物に付着させた結合部分と固体支持体の対、の使用を包含する、当分野で既知の任意の方法を用いてNI P 4 5 Vポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物を固体支持体に付着させることができる。被験化合物は好ましくは整列して固体支持体に結合させ、その結果個々の被験化合物の位置を追跡することができる。NI P 4 5 Vポリペプチド（またはポリヌクレオチド）への被験化合物の結合は、反応体を入れるのに適した任意の容器で達成できる。かかる容器の例には微量定量プレート、試験管、および微量遠沈管がある。

【0115】

一つの態様において、NI P 4 5 Vポリペプチドは、NI P 4 5 Vポリペプチドを固体支持体に結合させるドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St.Louis, Mo.）上またはグルタチオン誘導体化微量定量プレート上に吸着させ、次いでこれを被験化合物または被験化合物および非吸着NI P 4 5 Vポリペプチドに合し；次にこの混合物を複合体形成が行われる条件下でインキュベートする（例えば、塩およびpHに関して生理的条件）。インキュベーションの後、ビーズまたは微量定量プレートのウェルを洗浄して未結

合成分を除去する。反応体の結合は上記のように直接的または間接的に測定できる。別法として、複合体を固体支持体から解離させた後に結合を測定することもできる。

【0116】

本発明に係るスクリーニング検定には、タンパク質またはポリヌクレオチドを固体支持体上に固定化するためのその他の技術を使用することもできる。例えば、NIP45Vポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを、ビオチンとストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して固定化できる。当分野で周知の技術（例えばビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）を用いて、ビオチニル化したNIP45Vポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物をビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製し、ストレプトアビジン被覆した96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化できる。別法として、NIP45Vポリペプチド、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望の結合部位、例えばNIP45Vポリペプチドの活性部位に干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができる。未結合の標的またはタンパク質が抗体コンジュゲーションによりウェル中に捕捉できる。

【0117】

GST-固定化複合体について上に記載した方法に加え、このような複合体を検出する方法には、NIP45Vポリペプチドまたは被験化合物に特異結合する抗体を用いる、複合体の免疫検出、NIP45Vポリペプチドの活性検出へと引き継がれる酵素結合検定、および非還元条件下でのSDSゲル電気泳動がある。

【0118】

NIP45Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する被験化合物を求めるスクリーニングは、無傷の細胞で実施することもできる。NIP45Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の細胞が、細胞に基づく検定系で使用できる。NIP45Vポリヌクレオチドは細胞中に天然に存在し、または上記のような技術を用いて導入できる。NIP45Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように測定する。

【0119】

機能検定

N I P 4 5 Vポリペプチドの生物学的効果を増大または低下させる能力について被験化合物を試験できる。かかる生物学的効果は、下記の具体的実施例に記載の機能検定を用いて測定できる。機能検定は、精製したN I P 4 5 Vポリペプチド、細胞膜調製物、または無傷の細胞を被験化合物と接触させた後に実施できる。N I P 4 5 Vの機能的活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる被験化合物を、N I P 4 5 V活性を低下させる可能性のある物質として同定する。N I P 4 5 Vの活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%増大させる被験化合物を、N I P 4 5 V活性を増大させる可能性のある物質として同定する。

【0120】

そのようなスクリーニング方法の1つは、N I P 4 5 Vポリペプチドを発現するようトランスフェクトB - リンパ腫細胞の使用を含む。例えば、因的に相互作用するタンパク質または基質の両方を有する、N I P 4 5 Vポリペプチドを含むトランスフェクトB - リンパ腫細胞を、スクリーニングされる被験化合物に接触させる検定を用いて、ポリペプチドの活性化を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。N I P 4 5 Vポリペプチドの活性を阻害することは、試験化合物がこの化合物に対する潜在的なアンタゴニストであること、すなわちタンパク質の機能を阻害することを示している。このスクリーニングは、前記細胞をスクリーニングされる化合物に曝すことにより、タンパク質を活性化する被験化合物を同定し、各被験化合物がタンパク質を活性化するかどうかを決定するのに用いることができる。

【0121】

その他のスクリーニング技術には、ポリペプチド活性化により生じる分泌型タンパク質量を測定する系において、ヒトN I P 4 5 Vポリペプチドを発現する細胞（例えば、トランスフェクトされたT細胞）の使用を包含する。例えば、被験化合物をヒトN I P 4 5 Vポリペプチドを発現する細胞に加えることで、特定の

プロモーター配列を有するレポーター遺伝子の発現を測定し、被験化合物がタンパク質を活性化するか、または阻害するかを決定できる。

【0122】

上に記載のような機能検定の詳細は、下記の具体的実施例に提供する。

【0123】

NIP45V遺伝子発現

別の態様では、NIP45V遺伝子の発現を増大または減少させる被験化合物を同定する。NIP45Vポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、RNAまたはNIP45Vポリヌクレオチドのポリペプチド産物の発現を測定する。被験化合物存在下での適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、該被験化合物不在下でのmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。すると被験化合物が、この比較に基づく発現のモジュレーターとして同定できる。例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により大きい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質または増強物質と同定する。そうではなく、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により小さい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現のインヒビターと同定する。

【0124】

細胞におけるNIP45VmRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、mRNAまたはポリペプチドを検出するための当分野で周知の方法により決定できる。定性または定量的方法のいずれかが使用できる。NIP45Vポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えばラジオイムノアッセイのような免疫化学的方法、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学を包含する、当分野で周知の様々な技術を用いて決定できる。別法として、ポリペプチド合成は、NIP45Vポリペプチド内への標識アミノ酸の取り込みを検出することにより、インビボで、細胞培養で、またはインビトロ翻訳系で決定できる。

【0125】

このようなスクリーニングは、無細胞検定系または無傷の細胞のいずれかで実施できる。NIP45Vポリヌクレオチドを発現するいかなる細胞も細胞に基づ

く検定系で利用できる。NIP45Vポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在するか、または上記のような技術を用いて導入することができる。一次培養または確立された細胞系、例えばCHOまたはヒト胚性腎293細胞のいずれかを使用できる。

【0126】

医薬組成物

本発明はさらに、治療効果を達成するために患者に投与できる医薬組成物を提供する。本発明に係る医薬組成物は、例えばNIP45Vポリペプチド、NIP45Vポリヌクレオチド、NIP45Vポリペプチドに特異的に結合する抗体、または類似体、エンハンサーおよびインヒビター、またはNIP45Vポリペプチド活性のインヒビターを含み得る。この組成物は単独で、または少なくとも1種類の他の物質、例えば安定化化合物と組み合わせて投与でき、これは、食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース、および水を包含する（但しこれらに限定されない）任意の無菌で生物学的適合性のある製薬的担体中で投与できる。この組成物は単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと組み合わせて患者に投与できる。

【0127】

活性成分に加えてこれらの医薬組成物は、賦形剤および補助物質を含む適当な製薬的に許容し得る担体を含有でき、これらは、製薬的に使用できる調製物への活性化化合物の処理を促進する。本発明に係る医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段を包含する（但しこれらに限定されない）多くの経路により投与できる。経口投与用医薬組成物は、当分野で既知の製薬的に許容し得る担体を用いて経口投与に適した用量に調合できる。このような担体により、該医薬組成物を、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに調合できる。

【0128】

経口使用のための医薬製剤は、活性化化合物を、固体賦形剤と合し、得られた混合物を所望により粉碎し、そしてこの顆粒混合物を、所望ならば適当な補助物質

を加えた後に処理して錠剤または糖衣剤核を得る。好適な賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤、例えば乳糖、シュクロース、マンニトール、またはソルビトールを包含する糖；トウモロコシ、小麦、米、馬鈴薯、またはその他の植物由来の澱粉；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガcantゴムを包含するゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。所望により崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加できる。

【0129】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適当な被覆剤と共に使用でき、これはさらに、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、carbopolゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むことができる。製品の同定のためまたは活性化化合物の量、即ち用量をあらわすために染料または色素を錠剤または糖衣被覆剤に添加できる。

【0130】

経口的に使用できる医薬調合物は、ゼラチン製の押してはめ込むカプセル剤、ならびに、ゼラチンおよび被覆剤、例えばグリセロールまたはソルビトールでできた軟封入カプセル剤を包含する。押してはめ込むカプセル剤は、活性成分を、乳糖または澱粉のような増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定剤と混合して含有できる。軟カプセル剤では、活性化化合物を、安定剤を加えたまたは加えない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁できる。

【0131】

非経口投与に好適な医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的適合性の緩衝液、例えばハंकス溶液、リンゲル溶液、または生理学的に緩衝化した食塩水中で調合できる。水性注射用懸濁剤は、該懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含

有できる。さらに、活性化合物の懸濁剤は適当な油性注射用懸濁剤として調製できる。好適な親油性溶媒または媒質は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを包含する。非脂質ポリカチオンアミノポリマーもまた送達に使用できる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増し高濃縮溶液の調製を可能にするような適当な安定剤または物質を含むことができる。局所または鼻腔投与のためには、透過すべき特定の障壁に対し適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当分野で一般に知られている。

【0132】

本発明に係る医薬組成物は当分野で既知の方法で、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。この医薬組成物は塩として提供でき、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、琥珀酸などを包含する（但しこれらに限定されない）多くの酸を用いて調製できる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基型よりもより可溶性の傾向がある。別の場合には、好ましい調製物は、pH範囲4.5から5.5において以下のもの：1 - 50 mMヒスチジン、0.1% - 2%シュクロース、および2 - 7%マンニトール、の全てまたは任意のものを含有できる凍結乾燥粉末であってよく、これを使用前に緩衝液と合する。

【0133】

調合と投与のための技術のさらなる詳細は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa) の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、これらを適当な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルを貼る。このようなラベル表示は、投与の量、頻度、および投与方法を包含する。

【0134】

治療上の適応および方法

本発明のNIP45変異体は、多くの病理を包含するたくさんの生体機能を担っている。したがって、一方ではNIP45変異体を刺激し、他方ではNIP4

5 変異体の機能を阻害する化合物および薬物を発見することが望ましい。N I P 4 5 変異体の機能または発現を調整できる化合物は、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、結膜炎、春季カタル、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、重症筋無力症、乾癬、潰瘍性大腸炎、全身性炎症反応症候群（S I R S）、リンパ濾胞性胸腺炎、敗血症、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、混合性結合組織病（M C T D）、シューグレン症候群、痛風などを含む、種々のアレルギー性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患および感染症を処置するのに有用である。

【0135】

本発明はさらに、上記のスクリーニング検定により同定する新規物質の使用に関するものである。したがって、本明細書に記載のように定義する被験化合物を適当な動物モデルに使用することが、本発明の範囲内にある。例えば、本明細書記載のように特定する物質（例えば、調節物質、アンチセンス核酸分子、特異抗体、リボザイム、またはN I P 4 5 Vポリペプチド結合分子）を動物モデルに使用して、かかる物質による治療の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。これとは別に、本明細書に記載のように定義する物質は、かかる物質の作用機構を決定するための動物モデルに使用できる。さらに、本発明は、本明細書記載の治療のための上記スクリーニング検定により同定する新規物質の用途・使用に関するものである。

【0136】

N I P 4 5 V変異体活性に影響を及ぼす試薬をインビトロまたはインビボでヒト細胞に投与し、N I P 4 5 V様活性を低下させることができる。この試薬は好ましくはヒトN I P 4 5 V変異体遺伝子の発現産物に結合する。発現産物がタンパク質である場合、この試薬は好ましくは抗体である。ヒト細胞をex vivoで治療するために、身体から取り出した幹細胞の調製物に抗体を添加できる。次いでこの細胞を、当分野で既知のクローン増幅を行ってまたは行わずに、同じまたは別のヒトの身体に戻すことができる。

【0137】

一つの態様では、この試薬はリポソームを用いて送達する。好ましくはリポソ

ームは、投与される動物中で少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらに好ましくは少なくとも約24時間安定である。リポソームは、試薬、とりわけポリヌクレオチドを動物、例えば人間の特定部位に標的化できる脂質組成物を含んでいる。好ましくはリポソームのこの脂質組成物は、動物の特定の臓器、例えば肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節、および皮膚を標的とすることができる。

【0138】

本発明において有用なリポソームは、標的細胞の細胞質膜と融合してその内容を細胞へと運搬できる脂質組成物を含んでいる。好ましくは、リポソームのトランスフェクション効率は、約 10^6 細胞に送達されるリポソーム16nmoleあたりDNA約0.5 μ g、より好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム16nmoleあたりDNA約1.0 μ g、さらに好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム16nmoleあたりDNA約2.0 μ gである。好ましくは、リポソームは直径が約100および500nmの間、より好ましくは約150および450nmの間、そしてさらに好ましくは約200および400nmの間である。

【0139】

本発明での使用にとって好適なリポソームは例えば当業者に知られる遺伝子送達法で標準的に用いるリポソームを包含する。より好ましいリポソームは、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールとコンジュゲートしたコレステロールバックボーンを有するリポソームを包含する。所望により、リポソームはこのリポソームを腫瘍細胞、例えばリポソームの外表面に暴露している腫瘍細胞リガンドへと標的化できる化合物を含む。

【0140】

リポソームと、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムのような試薬との複合体形成が、当分野において標準的な方法を用いて達成できる（例えば米国特許5705151）。好ましくは約0.1 μ gから約10 μ gのポリヌクレオチドを約8nmolのリポソームと、より好ましくは約0.5 μ gから約5 μ gのポリヌクレオチドを約8nmolのリポソームと、そしてさらに好ましくは約1.0 μ gのポリヌクレオチドを約8nmolのリポソームと合する。

【0141】

別の態様では、タンパク質媒介性標的化送達を用いて抗体を特異的組織にインビボで送達できる。タンパク質媒介性DNA送達技術は、例えばFindeisら、Trends in Biotechnol. 11,202-05(1993); Chiouら、GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A.Wolff編) (1994); Wu & Wu, J.Biol.Chem. 263,621-24(1988); Wuら、J.Biol.Chem. 269,542-46(1994); Zenkeら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 87,3655-59(1990); Wuら、J.Biol.Chem. 266,338-42(1991)に教示されている。

【0142】

治療的有效量の決定

治療的有效量の決定は、充分当業者の能力の範囲内にある。治療的有效量とは、治療的有效量の不在下で起こるNI P 4 5 V活性に比較してNI P 4 5 V活性を増大させまたは低下させる活性成分の量を指す。

【0143】

いかなる化合物に関しても、治療的有效量は最初に細胞培養検定で、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌ、またはブタで見積もることができる。動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次にこのような情報を用いて人間での有用な用量と投与経路を決定できる。

【0144】

治療的有效性および毒性、例えばED₅₀（集団の50%で治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%で致死的な用量）は、細胞培養または実験動物における標準的薬学的方法により決定できる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指数であり、比LD₅₀ / ED₅₀で表すことができる。

【0145】

大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養検定および動物研究から得られるデータを、人間への使用のための用量範囲を処方する際に使用する。かかる組成物に含まれる用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を持たないED₅₀を包含する循環濃度の範囲内である。この用量は、使用する用量型、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

【0146】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、十分なレベルの活性成分を提供するよう、または所望の効果を維持するよう、調節する。考慮できる因子は、疾病状態の重篤度、対象の全身健康状態、年齢、体重、および対象の性別、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応の感受性、および療法に対する寛容/応答を包含する。長時間作用性医薬組成物は、その製剤の半減期およびクリアランス率に応じて3から4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

【0147】

標準的な用量は投与経路に応じて0.1から100000マイクログラムまで変えることができ、約1gまでの総用量とすることができる。特定の用量および送達方法についての指針は文献に提供されており、一般に当分野の医師が入手できる。当業者は、ヌクレオチド用にはタンパク質またはそれらのインヒビター用のものとは異なる製剤を使用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、場所などに特異的である。

【0148】

この試薬が一本鎖抗体である場合、この抗体をコードしているポリヌクレオチドを組み立て、トランスフェリン - ポリカチオン - 媒介DNA転移、裸のまたはカプセル内核酸を用いるトランスフェクション、リポソームの媒介する細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、「遺伝子銃」、およびDEAE - またはリン酸カルシウム - 媒介トランスフェクションを包含する（但しこれらに限定される訳ではない）充分確立した技術を用いて、ex vivoまたはインビボで細胞内に導入できる。

【0149】

抗体の有効なインビボ用量は、約5 μ gから約50 μ g/kg、約50 μ gから約5 mg/kg、約100 μ gから約500 μ g/kg（患者の体重）、および約200から約250 μ g/kg（患者の体重）の範囲である。一本鎖抗体をコードしているポリヌクレオチドの投与のためには、有効なインビボ用量は、約100 ngから約200 ng、500 ngから約50 mg、約1 μ gから約2 mg、約5 μ gから約500 μ g、お

よび約20 µgから約100 µgのDNAの範囲である。

【0150】

発現産物がmRNAである場合、試薬は好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現するポリヌクレオチドは、上記のように多岐にわたる方法によって細胞中に導入できる。

【0151】

好ましくは、試薬は、NIP45V遺伝子の発現またはNIP45Vポリペプチドの活性を、該試薬の不在時と比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる。NIP45V遺伝子の発現レベルまたはNIP45Vポリペプチドの活性を低下させるよう選択した機構の有効性は、当分野で周知の方法、例えばNIP45V特異的mRNAへのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、NIP45Vポリペプチドの免疫学的検出、またはNIP45V活性の測定を用いて評価できる。

【0152】

上記のいずれの態様においても、本発明に係る任意の医薬組成物は他の適当な治療薬と組み合わせて投与できる。併用療法に使用するための適当な物質の選択は、常套的製薬原理に従い、当業者により実施することができる。治療薬の組み合わせは、相乗的に働いて、上記の様々な疾患の治療または予防を奏効させる。このアプローチを用いて、より低い各物質の用量で治療効果を達成することができ、したがって有害な副作用の可能性を低減することができる。

【0153】

上記の治療方法のいずれも、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトといった哺乳動物を包含する、このような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

【0154】

診断方法

NIP45変異体はさらに、NIP45変異体をコードしている核酸配列にお

ける突然変異の存在に関連する疾病および異常または疾病および異常に対する感受性を検出する診断検定に使用できる。このような疾患は、実例として、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、結膜炎、春季カタル、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、重症筋無力症、乾癬、潰瘍性大腸炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、リンパ濾胞性胸腺炎、敗血症、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、混合性結合組織病（MCTD）、シューグレン症候群、痛風などを含む、種々のアレルギー性疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患および感染症に関連している。

【0155】

疾病に罹患している個体と正常な個体とにおけるNIP45変異体をコードしているcDNAまたはゲノム配列の間の相違を決定できる。もし罹患している個体の幾つかまたは全てに突然変異が観察され、正常な個体には観察されないならば、この突然変異がその疾病の原因であると思われる。

【0156】

レファレンス遺伝子および突然変異を有する遺伝子の間の配列相違は、直接DNA配列決定法によって明らかにできる。加えて、クローニングしたDNAセグメントを、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用できる。この方法の感受性はPCRと組み合わせる時極めて増強される。例えば、二本鎖PCR産物または修飾PCRにより調製された一本鎖テンプレート分子と共に、配列決定プライマーを使用することができる。配列決定は、放射標識したヌクレオチドを用いる常套的方法によって、または蛍光標識を使用する自動配列決定法によって実施する。

【0157】

DNA配列相違に基づく遺伝子試験は、変性させる物質を含むまたは含まないゲル中のDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより実施できる。小配列の欠失および挿入は、例えば高分解能ゲル電気泳動によって視覚化できる。異なる配列のDNA断片は変性させるホルムアミド勾配ゲル上で識別でき、ここでは、異なるDNA断片の移動度が、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って、ゲル中の異なる位置で遅延する（例えば、Myersら、Science 2

30,1242,1985を参照されたい)。特定の位置での配列改変もまたヌクレアーゼ保護検定、例えばRNアーゼおよびS1保護または化学的開裂法によって明らかにすることができる(例えば、Cottonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,4397-4401, 1985)。即ち特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護、化学的開裂、直接DNA配列決定といった方法によって、または制限酵素とゲノムDNAのサザンブロッティングを使用することによって実施できる。ゲル電気泳動およびDNA配列決定のような直接法に加えて、突然変異はin situ 分析により検出することもできる。

【0158】

NIP45変異体レベルの変化もまた種々の組織で検出できる。血液または組織生検のように、宿主から誘導した身体試料中のタンパク質ポリペプチドのレベルを検出するために用いる検定は、当業者に周知であり、ラジオイムノアッセイ、競合的結合検定、ウェスタンブロット分析、およびELISA検定を包含する。

【0159】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用により特に本明細書の一部とする。上記の内容は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は以下の具体的実施例を参照することによって得られ、それらの実施例は例示のみの目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定する意図は無い。

【0160】

実施例1

マウスNIP45 mRNA配列(ジーンバンク アクセッション番号U76759)を用いて、相同配列について日本DNAデータバンク(DDBJ)ESTサブセットをコンピュータプログラムBLAST 2.0(National Center for Biotechnology Information)を使用して調べた。マウスNIP45 mRNA配列とヌクレオチド配列が75%を越えて一致する配列を5つ見つけ出し、それらを潜在的なヒトNIP45 mRNA配列断片として選んだ。この5つの配列のジーンバンクアクセッション番号はAI954626、AA919081、AA063239、AA351060およびAA352196である。さらに潜在的なヒトNIP45 mRNA配列の配列情報を集めるために、この5つの配列

自体を用いて、相同配列についてDDBJを検索した。この2回目の検索の結果、EST、すなわちジーンバンク アクセッション番号 T56384をさらに同定した。次いで、このT56384 ESTを用いて3回目の検索を行い、さらにもう1つのEST、すなわちジーンバンク アクセッション番号 W31117を同定した。

【0161】

配列をさらに評価するために、4つのESTを含有するクローンをゲノム システムズ (Genome Systems) (St.Louis,Mo,USA) から購入した。それぞれのベクター挿入物の近傍にあるT3プローターおよびT7プロモーター領域に相補的なプライマーを用い、製造者の標準的なシーケンシングプロトコルに基づいてABI Prism 377 DNA配列 (PE Biosystems) により、ESTクローンの完全な挿入物、AA919081、AA063239、T56384およびW31117のシーケンシングを行なった。全配列を得た後、7つ全てのEST配列をコンピュータプログラムのシーケンサー (Sequencher) (GeneCodes Cororation,Ann Arbor,MI,USA) を用いて、DNAの連続配列を形成させ、アライメントを行なった。このコンティグ (整列群) のコンセンサス (共通) 配列を考慮し、ヒトNIP45 mRNA配列を表した。ヒトNIP45ヌクレオチド配列を配列番号6に示す。天然ヒトNIP45相同体のオープンリーディングフレームは1260ヌクレオチド (配列番号7) から成る。

【0162】

実施例2

NIP45の他のスプライス変異体の同定

種々の組織型におけるNIP45の発現を試験するために、オリゴヌクレオチド プライマーNIP-11 (cccgactcttcccactcaaaatcc、配列番号6に示す配列の797-820部位に相当する) およびNIP12 (cagtcccatggcctcctcat agtg、配列番号6に示す配列の1141-1164部位に相当する) およびヒト免疫系多重組織(Human Immune System Multiple Tissue) cDNAパネル (Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA) をテンプレートとして用いて、ヒトNIP45 cDNAの368塩基対領域をPCR増幅した。増幅はAmpliAq G

old DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer) を用いて、以下のPCRサイクル条件下にて行なった：

テンプレートDNAを9分間、96℃にて変性させた後、
96℃を15秒と66℃を30秒とのサイクルを55回行う。

図13に示すように、骨髓、胎児肝臓および末梢血白血球由来のNIP45 cDNAのPCR増幅物を行ない、予想通り368塩基対産物が得られたが、リンパ節および胸腺由来のNIP45 cDNAのPCR増幅物はより短い産物として得られ、脾臓由来のNIP45 cDNAのPCR増幅物は368塩基対産物とより短い産物の両方が得られた。

【0163】

プライマーをNIP-11とNIP-12を用いたことを除いて実施例1に記載のようにABI Prism 377 DNAシーケンサー (PE Biosystems) により、短いPCR産物を直接シーケンシングした。NIP45 DNA配列と比較して、225塩基対長を欠いていたためにこの産物の長さは短かった。NIP45 DNA配列およびNIP45 遺伝子から得たゲノム配列断片を用いたこの短いPCR産物のアライメントにより、欠失している255bpの配列の境界域と、ゲノム配列断片内に含まれる2つのエクソンの境界域とが正確に一致することが示された。このスプライス変異体をNIP45 v1と命名した。ヒトNIP45 V1のmRNAから調製し、そのcDNAのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。

【0164】

続いて、上記パネル由来の脾臓cDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーNIP-L4 (aaagtgtgccatggcggagcctgt、配列番号6に示した配列の3-26部位に相当する) とNIP-R4 (gggtgtcagccccagacctcaat、配列番号6の1255-1277部位に相当する) を用いて、NIP45の完全コード領域のPCR増幅を行ない、様々な異なる大きさのアンプライマーを調製した。このアンプライマーをクローニングベクターpCRII-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) 中にクローニングし、ABI Prism 377 DNAシーケンサー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にてシーケンシングし

た。得られた配列を分析することで、さらに別のスプライス変異体3つが明らかとなり、それぞれNIP45v2、NIP45v3およびNIP45v4と命名した。

【0165】

NIP45v1 cDNAヌクレオチド配列（配列番号1および2）の特徴

1. 完全NIP45転写物のコード配列の847～1101塩基に相当する255塩基対が欠失している。
2. NIP45遺伝子のゲノム配列（クローンRPCI-11-449D23、ゲノム調査配列、アクセッション番号AQ584348）の一部と比較した場合、欠失した領域は2つのエクソンと正確に一致しており、このことはこの欠失が別のスプライシング過程によることを示している。

【0166】

NIP45v1 アミノ酸配列（配列番号8）の特徴

1. 理論的に翻訳物は334アミノ酸長のタンパク質であり、419アミノ酸の完全長NIP45タンパク質よりも85アミノ酸短い。
2. NIP45v1の理論的翻訳物において失われているアミノ酸残基は完全長NIP45タンパク質の283～367アミノ酸残基に相当する。

【0167】

NIP45v2 cDNAヌクレオチド配列（配列番号3）の特徴

1. 完全NIP45転写物のコード配列の847～991塩基に相当する145塩基対が欠失している。
2. NIP45遺伝子のゲノム配列（クローンRPCI-11-449D23、ゲノム調査配列、アクセッション番号AQ584348）の一部と比較した場合、欠失した領域は1つのエクソンと正確に一致しており、このことはこの欠失が別のスプライシング過程によることを示している。

【0168】

NIP45v2 アミノ酸配列（配列番号9）の特徴

1. 理論的に翻訳物は287アミノ酸長のタンパク質であり、419アミノ酸の完全長NIP45タンパク質よりも132アミノ酸短いのは、容易に終止コード

ンを生じさせる欠失とそれに伴うフレームシフトによるものである。

2. N I P 4 5 v 2 の理論的翻訳物において失われているアミノ酸残基は完全長N I P 4 5 タンパク質の283～末端のアミノ酸残基に相当する。

【0169】

N I P 4 5 v 3 cDNAヌクレオチド配列（配列番号4）の特徴

1. 完全N I P 4 5 転写物のコード配列の41～387塩基に相当する347塩基対が欠失している。これにより元のN I P 4 5 転写と異なる開始コドンの使用を必要とするフレームシフトが導入される。

2. N I P 4 5 遺伝子のゲノム配列（ゲノム調査配列、アクセッション番号A Q 3 2 1 0 0 5 ; ゲノム調査配列、アクセッション番号A Q 7 0 9 9 9 4）の一部と比較した場合、3'末端の欠失した領域はイントロン - エクソンの境界域と正確に一致しており、このことはこの欠失が別のスプライシング過程によることを示している。

【0170】

N I P 4 5 v 3 アミノ酸配列（配列番号10）の特徴

1. 理論的に翻訳物は304アミノ酸長のタンパク質であり、419アミノ酸の完全長N I P 4 5 タンパク質よりも115アミノ酸短い、開始コドンはまだ確認されておらず、元のN I P 4 5 の開始コドから5'塩基対の未知数部位に存在する。従って、この転写によって産生されるタンパク質は304アミノ酸残基長よりも長いであろう。

2. N I P 4 5 v 3 の理論的翻訳物において失われているアミノ酸残基は完全長N I P 4 5 タンパク質の初めから129のアミノ酸残基に相当する。

【0171】

N I P 4 5 v 4 cDNAヌクレオチド配列（配列番号5）の特徴

1. 完全N I P 4 5 転写物のコード配列の41～387塩基と461～1101塩基に相当する988塩基対が欠失している。開始コドンを完全N I P 4 5 転写物のコード配列の452部位に位置する開始コドンに変えるフレームシフトが、この欠失により導入されている。

2. N I P 4 5 遺伝子のゲノム配列（ゲノム調査配列、アクセッション番号A

Q321005 ; ゲノム調査配列、アクセッション番号AQ709994)の一部と比較した場合、3'末端の最初の欠失した領域と5'末端の2番目の欠失した領域はイントロン - エクソンの境界域と正確に一致しており、このことはこの欠失が別のスプライシング過程によることを示している。

【0172】

NIP45 v4 アミノ酸配列 (破裂番号11) の特徴

1. 理論的に翻訳物は55アミノ酸長のタンパク質であり、419アミノ酸の完全長NIP45タンパク質よりも364アミノ酸短い。

2. NIP45 v4の理論的翻訳物において失われているアミノ酸残基は完全長NIP45タンパク質の1～367アミノ酸残基に相当する。

【0173】

スプライシング除去される領域の特徴

NIP45タンパク質配列は、セントリンおよびセントリン2としても知られているユビキチン様タンパク質であるUBL1およびSMT3H2に対して相同性が非常に高い。このセントリン相同ドメインは342アミノ酸残基から418アミノ酸残基にかけて広がっており、BLAST配列類似度探索(sequence similarity searching)ソフトウェア (National Center for Biotechnology Information) によって確認されるように、77残基中44残基(56%)がSMT3H2配列と類似し、77残基中28残基(36%)がSMT3H2配列と同一である。またNIP45もユビキチンと相同性のある領域、274～334残基を有しており、バイオテクノロジーインフォメーションショナルセンターの保存ドメイン データベースにおいてユビキチン相同体の部位特異的スコアリングマトリックスに対して84.7%のアライメントを示す。セントリン相同ドメインはNIP45 v1およびNIP45 v4において部分的に欠失しており、NIP45 v2においては完全に欠失している。ユビキチン相同ドメインはNIP45 v1およびNIP45 v2において85%欠失しており、NIP45 v4においては完全に欠失している。

【0174】

NIP45 v1の組織分布

N I P 4 5 のスプライス変異体 N I P 4 5 v 1 は胸腺、脾臓およびリンパ節において発現が確認されるのみであるのに対して、N I P 4 5 の発現はこれまで試験した全ての免疫関連組織（骨髄、胎児肝臓、リンパ節、末梢血白血球、脾臓、胸腺および扁桃腺を含む）にて確認された。

【0175】

実施例3

機能的特徴

哺乳動物細胞中の N F - A T p と特異的に相互作用する能力によって、N I P 4 5 変異体の機能を評価する。実施例2において得た各 N I P 4 5 V c D N A 挿入物（V 1 - V 4）をインフルエンザ血球凝集素（H A）ペプチド由来のエピトープタグに対してコード領域が融合している哺乳動物発現ベクター、すなわちベクター p C E P 4 - H A（Herrscher, R. F. (1995) Genes Dev. 9:3067-3082）にサブクローニングし、発現ベクターを作製する。

【0176】

次いで、このベクターを N F - A T p 発現プラスミドと共に、N F - A T p の発現レベルの低い H e p G 2 細胞に同時トランスフェクトする。またコントロールとして、N F - A T p を挿入していない発現ベクターと共に N I P 4 5 - H A を H e p G 2 細胞に同時トランスフェクトするか、前記エピトープタグと N I P 4 5 とがフレームアウトして融合したベクターと共に N F - A T p 発現ベクターを H e p G 2 細胞に同時トランスフェクトする。トランスフェクト細胞から可溶化液を調製し、抗 - N F - A T p 抗体を用いて免疫沈降させる。次いで、抗 - N F - A T p または抗 - H A 抗体のいずれかを用いて免疫沈降材料についてウェスタンブロット分析を行ない、N F - A T と N I P 4 5 変異体は、インビボで哺乳動物細胞にて物理的に会合すると見られる。

【0177】

実施例4

N I P 4 5 V 2 - V 4 m R N A の組織発現

N I P 4 5 V 2 - V 4 m R N A の組織発現を調べるために、種々のヒト組織由来の R N A の定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）分析を行なう

。種々の組織由来の全RNA (Human Total RNA Panel I-V, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) 100 µg を鋳型として用い、RT-PCR用のSUPERSCRIPT™ First-Strand Synthesis Systemを用いて最初のストランドcDNAを合成する。その後、最初のストランドcDNA 10 ng をポリメラーゼ連鎖反応の鋳型として用い、NIP45 mRNA転写物の存在について試験する。ポリメラーゼ連鎖反応において2本鎖DNAがうまく合成された場合にのみ形成されるDNA二重らせんの小さい溝に結合し、その結合の際にLight Cycler 機器 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) によって定量的に測定できる光を放射するDNA結合蛍光染色SYBR Green Iの存在下、Light Cycler 中にてポリメラーゼ連鎖反応を行なう。欠失領域に隣接するスプライシングされるエクソンの連結部にまたがるように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を行ない、この反応サイクル中、86 °C の温度に達する反応ごとに放射される光の強度を測定する。同時に反応させた既知濃度ストランドと比較することで、放射される光の強度を鋳型cDNA ng 当たりの遺伝子転写物のコピー数に変換する。

【0178】

種々の組織型における細胞当たりのmRNA転写レベルの差異を補正するために、種々の組織において異なる5つのハウスキーピング遺伝子 (グリセルアルデヒド-3-ホスファターゼ (G3PDH)、ヒポキサンチン グアニン ホスホリボシル (phosphoribosyl) トランスフェラーゼ (HPR T)、β-アクチン、ポルフィリノーゲン デアミナーゼ (PBGD) およびβ-2-ミクログロブリン) の算定された発現レベルを用いて、規格手順を行なう。わずかに異なるハウスキーピング遺伝子の組みを用いることを除いて、規格手順はRNAマスタープロット ユーザーマニュアル、Appendix C (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) に記載の手順と本質的に同じである。

【0179】

実施例5

遺伝子発現調節におけるNIP45変異体の機能的活性

NF-AT誘導型転写におけるNIP45の機能的役割を試験するために、H

He p G 2 細胞にて各々のN I P 4 5 Vを高レベルで発現させる。He p G 2 細胞は内因性のN F - A Tを低レベルで発現し、外因性の刺激のない状態ではN F - A Tファミリーメンバーのタンパク質の異所性発現により、この細胞系にN F - A T誘導型転写がトランス活性化されるのが見られる (Hoey,Tら、(1995)Immunity 2:461 - 472)。3 X N F - A T - C A Tレポーター遺伝子 (Venkataraman,Lら、(1994)Immunity 1:189 - 196) および、コントロールまたはN I P 4 5 変異体とN F - A Tファミリーメンバー (N F - A T p、N F - A T c、N F - A T 3、N F - A T 4) の発現プラスミドのいずれかを用いて、He p G 2 細胞をトランスフェクトする。このレポーター遺伝子はI L - 2 遺伝子由来のN F - A T結合部位からなる3つの直列 (タンデム) コピーを含む。別法として、I L - 4 - C A Tレポーター構築物 (I L - 4 プロモーターの - 7 3 2 b pにまで伸張し、天然のN F - A T依存プロモーターを含む) およびN I P 4 5 変異体、N F - A T pおよびc - m a f についての発現ベクターまたはコントロールを用いて、H E p G 2 細胞をトランスフェクトする。Hoey,Tら(1995)(上記)に記載のD E A E D e x t r a n法によりHe p G 2 細胞をトランスフェクトし、C A T検定を標準的な方法論に従って行なう。

【0180】

実施例6

内因性I L - 4産物

通常はI L - 4を産生しない細胞の内因性I L - 4の発現を、N I P 4 5 変異体、N F - A T pおよびc - M a fのいずれの組み合わせが、その発現を誘導するのに十分か否かを調べるために試験する。N I P 4 5 またはp C Iベクターコントロールと共に、N F - A T pおよびc - M a fの発現プラスミドを一過性同時トランスフェクトする。上記のようにM 1 2 細胞をエレクトロポレーションにより一過性トランスフェクトする (Ho,I.Cら、(1996)Cell 85:973 - 983)。7 2 時間後に回収した上清中のI L - 4レベルを、商業的に入手できるI L - 4 E L I S A (Pharmingen) を用いて上述のように改変 (Ho,I.Cら(1996)(上記)) することを除き、製造業者の指示に従って測定する。

【0181】

実施例7

NIP45変異体に結合する被験化合物の同定

96穴マイクロタイタープレートのグルタチオン由来のウェルにて吸光されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質を含む精製した各NIP45Vポリペプチドを、pH7.0の生物学的緩衝溶液中の小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触させる。NIP45Vポリペプチドは配列番号8から11に示すアミノ酸のいずれかからなる。被験化合物は蛍光タグを含む。試料を5分～1時間インキュベートする。コントロール試料を被験化合物の非存在下にてインキュベートする。

【0182】

被験化合物を含む緩衝溶液をウェルから洗い出す。NIP45Vポリペプチドに対する被験化合物の結合を、ウェル内容物を蛍光測定することによって検出する。被験化合物をインキュベートなしのウェルの蛍光に比べて、蛍光を少なくとも15%まで増加させるウェル中の被験化合物をNIP45Vポリペプチドに結合する化合物として同定する。

【0183】

実施例8

NIP45V遺伝子発現を調整（増大または減少）する被験化合物の同定

被験化合物をヒトリンパ節細胞の培養物中に投入し、37℃にて10～45分間インキュベートする。被験化合物を与えずに同じ時間インキュベートした同じ細胞型の培養物をネガティブコントロールとする。

【0184】

RNAをこの2つの培養物からChirgwinら、Biochem.18,5294-99,1979に記載のように単離する。RNA総量20～30μgを用い、³²P-標識化NIP45V特異的プローブを用いて65℃でExpress-hyb (CLONTECH)によりハイブリダイズさせ、ノーザンブロットを行なう。該プローブには、配列番号1、2、3、4または5の相補鎖から選ばれる少なくとも11の隣接するヌクレオチドが含まれる。被験化合物の不存在下にて得られるシグナルに関連するNIP45Vに特異的なシグナルを調整する被験化合物を、NIP45V遺伝子発現のモ

ジュレーターとして同定する。

【0185】

実施例9

NIP45変異体とNF-ATとの相互作用を調整する化合物のスクリーニングは、酵母二重ハイブリッド系(群)を用いて行なうことができる。

【0186】

実施例10

ヒトNIP45変異体の機能を調整することによる免疫学的に関連のある疾病の処置

ヒトNIP45変異体を発現するポリヌクレオチドまたはNIP45変異体の機能を調整する化合物を患者に投与する。患者の炎症の重症度を減少させる。

【0187】

均等

本明細書に記載の本発明の具体的な態様に対して、機械的な実験、多くの等価物に過ぎないものを用いることは、当業者であれば認識できるであろうし、または明らかにすることができるであろう。そのような等価物は本明細書中の特許請求の範囲に包含されるものと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 NIP45V1ポリペプチドをコードするDNA配列。

【図2】 NIP45V1ポリペプチドをコードするDNA配列(ORF)

。

【図3】 NIP45V2ポリペプチドをコードするDNA配列。

【図4】 NIP45V3ポリペプチドをコードするDNA配列。

【図5】 NIP45V4ポリペプチドをコードするDNA配列。

【図6】 NIP45をコードするDNA配列。

【図7】 NIP45をコードするDNA配列(ORF)。

【図8】 図1に記載のDNA配列から推測されるアミノ酸配列。

【図9】 図3に記載のDNA配列から推測されるアミノ酸配列。

【図10】 図4に記載のDNA配列から推測されるアミノ酸配列。

【図11】 図5に記載のDNA配列から推測されるアミノ酸配列。

【図12】 図6に記載のDNA配列から推測されるアミノ酸配列。

【図13】 種々の免疫関連組織におけるNIP45およびNIP45VのPCR増幅バンド。

【図14】 NIP45V(v1、2、3および4タンパク質)とNIP45のアライメント。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF NF-AT INTERACTING PROTEIN NIP 45 VARIANT

<130> RCK-2 Foreign Countries

<140>

<141>

<150> US 60/199,356

<151> 2000-04-25

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2232

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ggaaagtgtg ccatggcggg gcctgtgggg aagcggggcc gctggtccgg aggtagcggg 60
gccggccgag ggggtcgggg cggctggggc ggtcggggcc gggctcctcg ggcccagcgg 120
tctccatccc ggggcacgct ggacgtagt tctgtggaat tggtaaccga cagcgatgag 180
gaaattcttg aggtcgccac cgctcgcggt gccgcggacg aggttgaggt ggagcccccg 240
gagcccccg ggccggtcgc gtcccgggat aacagcaaca gtgacagcga aggggaggac 300
aggcgcccg caggaccccc gcgggagccg gtcaggcggc ggcggcggct ggtgctggat 360
ccgggggagg cgcgcgtggt tccggtgtac tcggggaagg ttaaaagcag ccttcgcctt 420
atccagatg atctatccct cctgaaactc taccctccag gggatgagga agaggcagag 480
ctggcagatt cgagtgggtc ctaccatgag ggctcccat caccaggctc tccctggaag 540
acaaagctga ggactaagga taaagaagag aagaaaaaga cagagtttct ggatctggac 600
aactctctc tgtcccacc ttacccaagg accaaaagca gaacgcatac tcgggcactc 660
aagaagttaa gtgaggtgaa caagcgctc caggatctcc gttcctgtct gagcccaag 720
ccactccag gtcaagagca acagggccaa gaggatgaag tggctctggt ggaagggcc 780
accctccag agacccccc actcttccca ctcaaatcc gttgcccggc tgacctggtc 840
agattgcccc tcaggatgga ttccctcta aagacctca tgtccacta tgaggaggcc 900
atgggactgt cgggacggaa gctctccttc ttctttgatg ggacaaagct ttcaggcagg 960
gagctgccag ctgacctggg catggaatct ggggacctca ttgaggtctg ggctgacacc 1020
ccactccctg tttagcgcc cagcctggac ttggggagaa tgactttccc ttttttgccc 1080
cataagggct agcataagct gaggtagaac ttatctttaa gctgcagcaa aatcaaggag 1140
tgacttttgt cccctctcct gttgaccctg gtttagagcc gtttaaccact tggtaggtta 1200
tgtgggtgtt gttgccctgg gtggcctgtg gctccgtcca caagtcatgc tgagttttgc 1260
agcctctgtg acttgagat gtcccttcac cctccctt tcaccaccat cctcttttcc 1320
tcatggaaat gtctgcttta tgaaactatg cacatattga aagtgagttg aaacaaatga 1380
gggttgggta ggagcttcca ggcctgggat ttacaccacg cctagcccag cagaggcctt 1440
```

```

agtcccatTT ggggcttggg agtgacattt gcttgagggt tatacactgg tgtggttggc 1500
tggcttgccag gaaatgacca agctcacaca tgcctggctga agcgtaagca gacaactgag 1560
gtactctttt gaaggatgaa ggtggtggat tctcagccct gggggtcttc ctcacctgag 1620
gaccttcag agccaccctt tctagtttgc atttcctggg gcacacattt aaggcataac 1680
agcacattca tcccttttggg ttgggatctc aggaatacag tcccatgcaa agattctctg 1740
gttttatggc ttttttcctt ttctttacac catcctctcc cataagcacc catgtctttg 1800
aatatgaatg tatttgtaaa ataccacgtt tcatgtgtga atatgtgctt ttactgtaca 1860
tagtgctatt gtgcaatagg tcttatgctg ttttcaactca atgtgtgcta agatctagcc 1920
ccattgactc ttctagaaat gcagtattgc tttgacctgc catgtggcac tccacaatgt 1980
caattgcagt ttacacacat tgcctaaagt gggggacacc tgggtgcccc tgacctcttg 2040
gcaccggata caggccacga taaacatcct ttcgtgtgtt cccttctgtg cttgtgtggc 2100
atgtgtaccc aggatggggc tataggtcac agaggtcagt ttctctttgg ttttccagat 2160
tttctttaga acggtgactg accctcctac ttgaggccgc ccttttctcc ttatccttgc 2220
cagcacttgt at 2232

```

<210> 2

<211> 1005

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1005)

<223> NIP45V1-ORF

<400> 2

```

atggcggagc ctgtggggaa gcggggccgc tggtcgggag gtagcgggtgc cggccgaggg 60
ggtcggggcg gctggggcgg tcggggccgg gctcctcggg ccagcgggtc tccatcccg 120
ggcacgctgg acgtagtgtc tgtggacttg gtcaccgaca gcgatgagga aattctggag 180
gtcgccaccg ctcgcggtgc cgcggacgag gttgaggttg agccccgga gcccccgggg 240
ccggtcgcgt cccgggataa cagcaacagt gacagcgaag gggaggacag gcggcccgc 300
ggacccccgc gggagccggt caggcggcgg cggcggctgg tgcctggatcc gggggaggcg 360
ccgctggttc cgggtgtactc ggggaaggtt aaaaagcagc ttgccttat cccagatgat 420
ctatccctcc tgaaactcta cctccaggg gatgaggaag aggcagagct ggcagattcg 480
agtgtctct accatgaggg ctcccatca ccaggctctc cctggaagac aaagctgagg 540
actaaggata aagaagagaa gaaaaagaca gaggttcttg atctggacaa ctctcctctg 600
tcccacctt caccaaggac caaaagcaga acgcatactc gggcactcaa gaagttaagt 660
gaggtgaaca agcgctcca ggatctcgt tctgtctga gcccaagcc acctcagggt 720
caagagcaac agggccaaga ggatgaagtg gtcttggttg aagggccac cctccagag 780
acccccgac tcttccact caaaatccgt tgccgggctg acctggtcag attgcccctc 840
aggatggatt cccctctaaa gacctcatg tccactatg aggaggccat gggactgtcg 900
ggacggaagc tctccttctt ctttgatggg acaaagcttt caggcaggga gctgccagct 960
gacctgggca tggaatctgg ggacctcatt gaggtctggg gctga 1005

```

<210> 3

<211> 1115

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1115)

<223> NIP45V2-ORF

<400> 3

```

atggcggagc ctgtggggaa gcggggccgc tggtcgggag gtagcgggtgc cggccgaggg 60
ggtcggggcg gctggggcgg tcggggccgg gctcctcggg ccagcgggtc tccatcccg 120
ggcacgctgg acgtagtgtc tgtggacttg gtcaccgaca gcgatgagga aattctggag 180
gtcggccaccg ctgcggtgac cgcggacgag gttgaggtgg agccccgga gccccgggg 240
ccggtcgcgt cccgggataa cagcaacagt gacagcgaag gggaggacag gcggcccgca 300
ggacccccgc gggagccggt caggcggcgg cggcggctgg tgctggatcc gggggaggg 360
ccgctgggtc cgggtgtact ggggaagggt aaaagcagcc ttgccttat ccagatgat 420
ctatcccttc tgaactcta ccctccagg gatgaggaag aggcagagct ggcagattcg 480
agtgtctctc accatgaggg ctccccatca ccaggctctc cctggaagac aaagctgagg 540
actaaggata aagaagagaa gaaaaagaca gattttctgg atctggacaa ctctcctctg 600
tccccacctt caccaaggac caaaagcaga acgcatactc gggcactcaa gaagttaagt 660
gagggtgaaca agcgcctcca ggatctccgt tcctgtctga gccccaagcc acctcagggt 720
caagagcaac agggccaaga ggatgaagtg gtcttggtgg aaggggccac cctcccagag 780
acccccgac tcttccact caaaatccgt tgccgggctg acctggtcag attgcccctc 840
aggatgactg tgtggtacta acaagttctc cagaggccac agagacgtcc caacagctcc 900
agctccgggt gcagggaag gagaaacacc agacactgga agtctcactg tctcgagatt 960
cccctctaaa gaccctcatg tccactatg aggaggccat gggactgtcg ggacggaagc 1020
tctccttctt ctttgatggg acaaagctt caggcaggga gctgccagct gacctgggca 1080
tggaatctgg ggacctcatt gaggtctggg gctga 1115

```

<210> 4

<211> 913

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (1)..(913)

<223> NIP45V3-ORF

<400> 4

```

atggcggagc ctgtggggaa gcggggccgc tggtcgggag gttaaaagca gccttcgcct 60
tatccagat gatctatccc tcctgaaact ctaccctcca ggggatgagg aagaggcaga 120
gctggcagat tcgagtgtc tctaccatga gggtcccca tcaccaggct ctccctggaa 180
gacaaaagctg aggactaagg ataaagaaga gaagaaaaag acagagtttc tggatctgga 240
caactctcct ctgtccccc acctcaccag gacaaaaagc agaacgcata ctcgggcact 300
caagaagtta agtgaggtga acaagcgct ccaggatctc cgttcctgtc tgagcccaa 360
gccacctcag ggtcaagagc aacagggcc aagaggatgaa gtggtcttgg tggaagggcc 420

```

```

caccctccca gagacccccc gactcttccc actcaaaatc cgttgccggg ctgacctggt 480
cagattgccc ctgaggatgt cggagccctt gcagagtgtg gtggaccaca tggccacca 540
ccttgggggtg tccccaagca ggatcctttt gctttttgga gagacagagc tatcacctac 600
tgccactccc aggaccctaa agctcggagt ggctgacatc attgactgtg tggactaac 660
aagtcttcca gaggccacag agacgtccca acagctccag ctccgggtgc agggaaagga 720
gaaacaccag aacttggaag tctcactgtc tcgagattcc cctctaaaga cctcatgtc 780
ccactatgag gaggccatgg gactgtcggg acggaagctc tccttcttct ttgatgggac 840
aaagctttca ggcaggagc tgccagctga cctgggcatg gaatctgggg acctcattga 900
ggtctggggc tga                                     913

```

```

<210> 5
<211> 272
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> gene
<222> (1)..(272)
<223> NIP45V4-ORF

```

```

<400> 5
atggcggagc ctgtggggaa gcggggccgc tggtcggag gttaaaagca gccttcgcct 60
tatcccagat gatctatccc tcctgaaact ctaccctcca ggggatgagg aaggattccc 120
ctctaaagac cctcatgtcc cactatgagg aggcacatgg actgtcggga cggaagctct 180
ccttcttctt tgatgggaca aagctttcag gcaggagct gccagctgac ctgggcatgg 240
aatctgggga cctcattgag gtctggggct ga                                     272

```

```

<210> 6
<211> 2576
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> gene
<222> (1)..(2576)
<223> NIP45 cDNA

```

```

<300>
<310> WO 99/21993
<311> 1998-10-21
<312> 1999-05-06

```

```

<400> 6
ggaaagtgtg ccatggcgga gcctgtgggg aagcggggcc gctggtccgg aggtagcggg 60
gccggccgag ggggtcgggg cggtcggggc ggtcggggcc gggctcctcg ggcccagcgg 120
tctccatccc ggggcacgct ggacgtagtg tctgtggaat tggtcaccga cagcgatgag 180

```

```

gaaattcttg aggtcgccac cgctcggcgt gccgcggacg aggttgaggt ggagcccccg 240
gagcccccg ggccggtcgc gtcccgggat aacagcaaca gtgacagcga aggggaggac 300
agggcgcccg caggaccccc gcgggagcgc gtcaggcggc ggccggcggt ggtgctggat 360
ccgggggagg cgccgctggt tccggtgtac tcggggaagg ttaaaagcag ccttcgcctt 420
atcccagatg atctatccct cctgaaactc taccctccag gggatgagga agaggcagag 480
ctggcagatt cgagtgggtc ctaccatgag ggctcccat caccaggctc tccctggaag 540
acaaagctga ggactaagga taaagaagag aagaaaaaga cagagtttct ggatctggac 600
aactctctc tgccccacc ttaccaagg accaaaagca gaacgcatac tcgggcactc 660
aagaagttaa gtgaggtgaa caagcgctc caggatctcc gttcctgtct gagccccaa 720
ccacctcagg gtcaagagca acagggccaa gaggatgaag tggctcttgg ggaagggccc 780
acctcccg agacccccg actcttccca ctcaaatcc gttgccgggc tgacctggtc 840
agattgcccc tcaggatgtc ggagccctg cagagtgtgg tggaccacat ggccaccac 900
cttggggtgt cccaagcag gatcctttt ctttttgagg agacagagct atcacctact 960
gccactccca ggacctaaa gctcggagt gctgacatca ttgactgtgt ggtactaaca 1020
agttctccag agggcacaga gactcccaa cagctccagc tccgggtgca gggaaaggag 1080
aaacaccaga cactggaagt ctactgtct cgagattccc ctctaaagac cctcatgtcc 1140
cactatgagg agggcatggg actgtcggga cggaagctct ccttcttctt tgatgggaca 1200
aagctttcag gcaggagct gccagctgac ctgggcatgg aatctgggga cctcattgag 1260
gtctggggct gacacccac tccctgtttg acggcccagc ctggacttgg ggagaatgac 1320
tttccctttt ttgcccata agggctagca taagctgagg tagaacttat ctttaagctg 1380
cagcaaaatc aaggagtga ctttgtcccc tctcctgttg accctggtt agagccgtta 1440
accacttggg gagtattgtg ggtgtgttg ccctgggtgg cctgtggctc cgtccacaag 1500
tcagtctgag ttttgacgac tctgtgactt ggagatgtcc ctccacctt cccctttcac 1560
caccatctc ttttctcat ggaaatgtct gctttatgaa actatgcaca tattgaaagt 1620
gagttgaaac aaatgagggg tgggtaggag cttccaggcc tgggatttac accacgcta 1680
ggccagcaga ggcttagtc ccatttggg cttgggagtg acatttgctt gaggttata 1740
cactggtgtg gttgcctggc ttgcaggaaa tgaccaagct cacacatgct ggctgaagcg 1800
taagcagaca actgaggtac tcttttgaag gatgaagggt gtggattctc agccctggg 1860
gtcttctca cctgaggacc cttcagagcc accctttcta gtttgattt cctggtgcac 1920
acatttaagg cataacagca cattcatccc tttggtttg gatctcagga atacagtccc 1980
atgcaaagat tctctggtt tatggctttt ttcccttct ttacaccatc ctctccata 2040
agcaccatg tctttgaata tgaatgtatt tgtaaaatac cacgtttcat gtgtgaatat 2100
gtgcttttac tgtaacatgt gctattgtgc aataggtctt atgctgttt cactcaatgt 2160
gtgctaagat ctagcccat tgactcttct agaatgcag tattgcttg acctgccatg 2220
tggcactcca caatgtcaat tgcagtttac acacattgoc taaagtggg gacacctggg 2280
tgccctgac ccctggcac cggatacagg ccacgataaa catcctttcg tgtgttccc 2340
tctgtgcttg tgtggcatgt gtaccagga tgggctata ggtcacagag gtcagtttct 2400
ctttggttt ccagattttc tttagaacgg tgactgaccc tcctaactga ggcgcacct 2460
ttctccttat ccttgccagc acttgattg ccagactacc taatttttgc cagtctcatg 2520
ggtagatagt ggtgcagtgc ttttaacatac attcatctga tcagcattaa tttggg 2576

```

<210> 7

<211> 1260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1260)

<223> NIP45-ORF

<400> 7

```

atggcgaggc ctgtggggaa gcggggccgc tggtcggag gtagcgggac cggccgaggg 60
ggtcggggcg gctggggcgg tcggggccgg gctcctcggg cccagcgggc tccatccggg 120
ggcacgctgg acgtagtgtc tgtggacttg gtcaccgaca gcgatgagga aattctggag 180
gtcgccaccg ctgcgggtgc cgcggacgag gttgaggtgg agcccccgga gcccccgggg 240
ccggtcgcgt cccgggataa cagcaacagt gacagcgaag gggaggacag gcggcccgca 300
ggacccccgc gggagccggt caggcggcgg cggcgggctg tgctggatcc gggggaggcg 360
ccgctggttc cgggtgtactc ggggaagggt aaaagcagcc ttccgcttat cccagatgat 420
ctatccctcc tgaaactcta cctccaggg gatgaggaag aggcagagct ggcagattcg 480
agtgtgtctc accatgaggg ctcccatca ccaggctctc cctggaagac aaagctgagg 540
actaaggata aagaagagaa gaaaaagaca gattttctgg atctggacaa ctctcctctg 600
tccccacctt caccaaggac caaaagcaga acgcatactc gggcactcaa gaagttaagt 660
gaggtgaaca agcgcctcca ggatctccgt tctgtctga gccccaaagg acctcagggt 720
caagagcaac agggccaaga ggatgaagtg gtcttggtgg aagggccac cctccagag 780
acccccgac tcttccact caaatccgt tgccgggctg acctggtcag attgcccctc 840
aggtatgtcg agccctgca gactgtgtg gaccacatgg ccaccacct tggggtgtcc 900
ccaagcagga tctttttgct ttttgagag acagagctat cacctactgc cactccagg 960
acctaaagc tcggagtggc tgacatcatt gactgtgtg tactaacaag ttctccagag 1020
gccacagaga cgtcccaaca gctccagctc cgggtgcagg gaaaggagaa acaccagaca 1080
ctggaagtct cactgtctcg agattccct ctaaagacc tcattgtcca ctatgaggag 1140
gccatgggac tgcgggacg gaagctctcc ttctctttg atgggacaaa gctttcaggc 1200
agggagctgc cagctgacct gggcatggaa tctggggacc tcattgaggt ctggggctga 1260

```

<210> 8

<211> 334

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(334)

<223> NIP45V1

<400> 8

```

Met Ala Glu Pro Val Gly Lys Arg Gly Arg Trp Ser Gly Gly Ser Gly
  1             5             10             15

Ala Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly Trp Gly Gly Arg Gly Arg Ala Pro
      20             25             30

Arg Ala Gln Arg Ser Pro Ser Arg Gly Thr Leu Asp Val Val Ser Val
      35             40             45

```

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

Ser Phe Phe Phe Asp Gly Thr Lys Leu Ser Gly Arg Glu Leu Pro Ala
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Met Glu Ser Gly Asp Leu Ile Glu Val Trp Gly
 325 330

<210> 9

<211> 286

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(286)

<223> NIP45V2

<400> 9

Met Ala Glu Pro Val Gly Lys Arg Gly Arg Trp Ser Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly Trp Gly Gly Arg Gly Arg Ala Pro
 20 25 30

Arg Ala Gln Arg Ser Pro Ser Arg Gly Thr Leu Asp Val Val Ser Val
 35 40 45

Asp Leu Val Thr Asp Ser Asp Glu Glu Ile Leu Glu Val Ala Thr Ala
 50 55 60

Arg Gly Ala Ala Asp Glu Val Glu Val Glu Pro Pro Glu Pro Pro Gly
 65 70 75 80

Pro Val Ala Ser Arg Asp Asn Ser Asn Ser Asp Ser Glu Gly Glu Asp
 85 90 95

Arg Arg Pro Ala Gly Pro Pro Arg Glu Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
 100 105 110

Leu Val Leu Asp Pro Gly Glu Ala Pro Leu Val Pro Val Tyr Ser Gly
 115 120 125

Lys Val Lys Ser Ser Leu Arg Leu Ile Pro Asp Asp Leu Ser Leu Leu
 130 135 140

Lys Leu Tyr Pro Pro Gly Asp Glu Glu Glu Ala Glu Leu Ala Asp Ser
 145 150 155 160

Ser Gly Leu Tyr His Glu Gly Ser Pro Ser Pro Gly Ser Pro Trp Lys
 165 170 175
 Thr Lys Leu Arg Thr Lys Asp Lys Glu Glu Lys Lys Lys Thr Glu Phe
 180 185 190
 Leu Asp Leu Asp Asn Ser Pro Leu Ser Pro Pro Ser Pro Arg Thr Lys
 195 200 205
 Ser Arg Thr His Thr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Ser Glu Val Asn Lys
 210 215 220
 Arg Leu Gln Asp Leu Arg Ser Cys Leu Ser Pro Lys Pro Pro Gln Gly
 225 230 235 240
 Gln Glu Gln Gln Gly Gln Glu Asp Glu Val Val Leu Val Glu Gly Pro
 245 250 255
 Thr Leu Pro Glu Thr Pro Arg Leu Phe Pro Leu Lys Ile Arg Cys Arg
 260 265 270
 Ala Asp Leu Val Arg Leu Pro Leu Arg Met Thr Val Trp Tyr
 275 280 285

<210> 10
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(303)
 <223> NIP45V3

<400> 10
 Trp Arg Ser Leu Trp Gly Ser Gly Ala Ala Gly Pro Glu Val Lys Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ile Pro Asp Asp Leu Ser Leu Leu Lys Leu Tyr Pro
 20 25 30
 Pro Gly Asp Glu Glu Glu Ala Glu Leu Ala Asp Ser Ser Gly Leu Tyr
 35 40 45
 His Glu Gly Ser Pro Ser Pro Gly Ser Pro Trp Lys Thr Lys Leu Arg
 50 55 60

Thr Lys Asp Lys Glu Glu Lys Lys Lys Thr Glu Phe Leu Asp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asn Ser Pro Leu Ser Pro Pro Ser Pro Arg Thr Lys Ser Arg Thr His
 85 90 95
 Thr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Leu Gln Asp
 100 105 110
 Leu Arg Ser Cys Leu Ser Pro Lys Pro Pro Gln Gly Gln Glu Gln Gln
 115 120 125
 Gly Gln Glu Asp Glu Val Val Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu Pro Glu
 130 135 140
 Thr Pro Arg Leu Phe Pro Leu Lys Ile Arg Cys Arg Ala Asp Leu Val
 145 150 155 160
 Arg Leu Pro Leu Arg Met Ser Glu Pro Leu Gln Ser Val Val Asp His
 165 170 175
 Met Ala Thr His Leu Gly Val Ser Pro Ser Arg Ile Leu Leu Leu Phe
 180 185 190
 Gly Glu Thr Glu Leu Ser Pro Thr Ala Thr Pro Arg Thr Leu Lys Leu
 195 200 205
 Gly Val Ala Asp Ile Ile Asp Cys Val Val Leu Thr Ser Ser Pro Glu
 210 215 220
 Ala Thr Glu Thr Ser Gln Gln Leu Gln Leu Arg Val Gln Gly Lys Glu
 225 230 235 240
 Lys His Gln Thr Leu Glu Val Ser Leu Ser Arg Asp Ser Pro Leu Lys
 245 250 255
 Thr Leu Met Ser His Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu Ser Gly Arg Lys
 260 265 270
 Leu Ser Phe Phe Phe Asp Gly Thr Lys Leu Ser Gly Arg Glu Leu Pro
 275 280 285
 Ala Asp Leu Gly Met Glu Ser Gly Asp Leu Ile Glu Val Trp Gly
 290 295 300

<210> 11

<211> 55

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(55)
 <223> NIP45V4

 <400> 11
 Met Arg Lys Asp Ser Pro Leu Lys Thr Leu Met Ser His Tyr Glu Glu
 1 5 10 15

 Ala Met Gly Leu Ser Gly Arg Lys Leu Ser Phe Phe Phe Asp Gly Thr
 20 25 30

 Lys Leu Ser Gly Arg Glu Leu Pro Ala Asp Leu Gly Met Glu Ser Gly
 35 40 45

 Asp Leu Ile Glu Val Trp Gly
 50 55

 <210> 12
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(419)
 <223> NIP45

 <400> 12
 Met Ala Glu Pro Val Gly Lys Arg Gly Arg Trp Ser Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

 Ala Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly Trp Gly Gly Arg Gly Arg Ala Pro
 20 25 30

 Arg Ala Gln Arg Ser Pro Ser Arg Gly Thr Leu Asp Val Val Ser Val
 35 40 45

 Asp Leu Val Thr Asp Ser Asp Glu Glu Ile Leu Glu Val Ala Thr Ala
 50 55 60

 Arg Gly Ala Ala Asp Glu Val Glu Val Glu Pro Pro Glu Pro Pro Gly
 65 70 75 80

Pro Val Ala Ser Arg Asp Asn Ser Asn Ser Asp Ser Glu Gly Glu Asp	85	90	95
Arg Arg Pro Ala Gly Pro Pro Arg Glu Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg	100	105	110
Leu Val Leu Asp Pro Gly Glu Ala Pro Leu Val Pro Val Tyr Ser Gly	115	120	125
Lys Val Lys Ser Ser Leu Arg Leu Ile Pro Asp Asp Leu Ser Leu Leu	130	135	140
Lys Leu Tyr Pro Pro Gly Asp Glu Glu Glu Ala Glu Leu Ala Asp Ser	145	150	155
Ser Gly Leu Tyr His Glu Gly Ser Pro Ser Pro Gly Ser Pro Trp Lys	165	170	175
Thr Lys Leu Arg Thr Lys Asp Lys Glu Glu Lys Lys Lys Thr Glu Phe	180	185	190
Leu Asp Leu Asp Asn Ser Pro Leu Ser Pro Pro Ser Pro Arg Thr Lys	195	200	205
Ser Arg Thr His Thr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Ser Glu Val Asn Lys	210	215	220
Arg Leu Gln Asp Leu Arg Ser Cys Leu Ser Pro Lys Pro Pro Gln Gly	225	230	235
Gln Glu Gln Gln Gly Gln Glu Asp Glu Val Val Leu Val Glu Gly Pro	245	250	255
Thr Leu Pro Glu Thr Pro Arg Leu Phe Pro Leu Lys Ile Arg Cys Arg	260	265	270
Ala Asp Leu Val Arg Leu Pro Leu Arg Met Ser Glu Pro Leu Gln Ser	275	280	285
Val Val Asp His Met Ala Thr His Leu Gly Val Ser Pro Ser Arg Ile	290	295	300
Leu Leu Leu Phe Gly Glu Thr Glu Leu Ser Pro Thr Ala Thr Pro Arg	305	310	315
Thr Leu Lys Leu Gly Val Ala Asp Ile Ile Asp Cys Val Val Leu Thr	325	330	335

Ser Ser Pro Glu Ala Thr Glu Thr Ser Gln Gln Leu Gln Leu Arg Val
 340 345 350

Gln Gly Lys Glu Lys His Gln Thr Leu Glu Val Ser Leu Ser Arg Asp
 355 360 365

Ser Pro Leu Lys Thr Leu Met Ser His Tyr Glu Glu Ala Met Gly Leu
 370 375 380

Ser Gly Arg Lys Leu Ser Phe Phe Phe Asp Gly Thr Lys Leu Ser Gly
 385 390 395 400

Arg Glu Leu Pro Ala Asp Leu Gly Met Glu Ser Gly Asp Leu Ile Glu
 405 410 415

Val Trp Gly

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13

cccgaactctt cccactcaaa atcc

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14

cagtcccatg gcctcctcat agtg

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15

aaagtgtgcc atggcggagc ctgt

24

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16

gggtgtcagc cccagacctc aat

23

【図1】

FIG. 1

```

ggaaagtgtg ccatggcgga gcctgtgggg aagcggggcc gctggtccgg aggtagcggg 60
gccggccgag ggggtcgggg cggctggggc ggtcggggcc gggctcctcg ggccagcgg 120
tctccatccc ggggcacgct ggacgtagt tctgtggact tggtcaccga cagcgatgag 180
gaaattctgg aggtcgccac cgtcgcgggt gccgcggacg aggttgagggt ggagcccccg 240
gagcccccg ggccggtcgc gtcccgggat aacagcaaca gtgacagcga aggggaggac 300
aggcggcccc caggaccccc gcgggagccg gtcaggcggc gccggcggct ggtgctggat 360
ccgggggagg cgccgctggt tccggtgtac tcggggaagg ttaaagcag ccttcgcctt 420
atcccagatg atctatccct cctgaaactc taccctccag gggatgagga agaggcagag 480
ctggcagatt cgagtgggtc ctaccatgag ggctcccat caccaggctc tccctggaag 540
acaaagctga ggactaagga taaagaagag aagaaaaaga cagagtctct ggatctggac 600
aactctctc tgtccccacc ttcaccaagg accaaaagca gaacgcatac tcgggcactc 660
aagaagttaa gtgaggtgaa caagcgctc caggatctcc gttcctgtct gagcccaag 720
ccacctcagg gtcaagagca acaggccaa gaggatgaag tggctctggt ggaaggggcc 780
acctccag agacccccg actcttcca ctcaaatcc gttgcgggc tgacctggtc 840
agattgcccc tcaggatgga tccccctc aagacctca tgtccacta tgaggaggcc 900
atgggactgt cgggacggaa gctctcctt tctttgatg ggacaaagct ttcaggcagg 960
gagctgccag ctgacctggg catggaatct ggggacctca ttgaggtctg ggctgacacc 1020
ccactccctg tttagcggc cagcctggac ttggggagaa tgactttccc tttttgccc 1080
cataagggct agcataagct gaggtagaac ttatcttta gctgcagca aatcaaggag 1140
tgactttgt cccctctcct gttgacctg gtttagagcc gttaccact tggtagtta 1200
tgtgggtgtt gttgccctgg gtggcctgt gctccgtcca caagtcatgc tgagttttgc 1260
agcctctgtg acttgagat gtcccttcac cctccccct tcaccacct cctcttttc 1320
tcatggaaat gtctgcttta tgaaactatg cacatattga aagtgagttg aaacaaatga 1380
gggttgggta ggagcttoca ggcctgggat ttacaccacg cctagcccag cagaggcctt 1440
agtccattt gggccttggg agtgacattt gcttgaggct tatacactgg tgtggttgc 1500
tggcttgac gaaatgacca agctcacaca tgcctgctga agcgtgaagca gacaactgag 1560
gtactctttt gaaggatgaa ggtggtggat tctcagccct gggggtcttc ctccctgag 1620
gaccttcag agccacctt tctagtttgc atttctggt gcacacattt aaggcataac 1680
agcacattca tcccttgggt ttgggatctc aggaatacag tcccatgcaa agattctctg 1740

```

【図1】

```

gttttatggc ttttttcctt ttctttacac catcctctcc cataagcacc catgtctttg 1800
aatatgaatg tattttgtaa ataccacgtt tcatgtgtga atatgtgctt ttactgtaca 1860
tagtgctatt gtgcaatagg tcttatgctg ttttctacta atgtgtgcta agatctagcc 1920
ccattgactc ttctagaaat gcagtattgc tttgacctgc catgtggcac tccacaatgt 1980
caattgcagt ttacacacat tgcctaaagt gggggacacc tgggtgcccc tgaccccttg 2040
gcaccggata caggccacga taaacatcct ttcgtgtgtt cccttctgtg ottgtgtggc 2100
atgtgtaccc aggatggggc tataggtcac agaggtcagt ttctctttgg ttttccagat 2160
tttctttaga acggtgactg accctctac ttgaggcgc ccttttctcc ttatccttgc 2220
cagcacttgt at 2232

```

【図2】

>NIP45v1_ヌクレオチド 255 bp 欠失; 1005 bp

```

ATGGCGGAGCCTGTGGGGAAGCGGGGCCGCTGGTCCGGAGGTAGCGGTGCCGGCCGAGGGGGTGGGGCGGGTGGGGCGGTCCG
GGCCGGGCTCCTCGGGCCAGCGGTCTCCATCCCGGGGCACGCTGGACGTAGTGTCTGTGGAAGTGGTACCGACAGCGATGAG
GAAATTCCTGGAGGTCCGACCGCTCGCGGTGCCGGGACGAGGTGAGGTGGAGCCCCCGGAGCCCCCGGGGCCGCTCGCGTCC
CGGGATAACAGCAACAGTGACAGCGAAGGGGAGGACAGGCGGCCCGCAGGACCCCCGCGGAGCCCGGTGAGGCGCGCGCGCGG
CTGGTGTGGATCCGGGGGAGGCGCGCTGGTTCGGGTGTAAGTAAAGAGAGGTTAAAGAGAGGTTAAAGAGAGGTTAAAGAGAGG
CTATCCCTCCTGAAACTCTACCTCCAGGGGATGAGGAAGAGGACAGAGCTGGCAGATTGAGTGGTCTCTACCATGAGGGCTCC
CCATCACCAGGCTCTCCCTGGAAGACAAAGCTGAGGACTAAGGATAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AACTCTCCTCTGTCCCGACCTTCAAGAGGACCAAGAGCAGAACGCATACTCGGGCACTCAAGAAGTTAAGTGGGTGAACAAG
CGCTCCAGGATCTCCGTTCTGTCTGAGCCCCAAGCCACCTCAGGGTCAAGAGCAACAGGGCCAAAGAGGATGAAGTGGTCTTG
GTGGAAGGGCCACCTCCAGAGACCCCCGACTCTTCCCACTCAAAATCCGTTGCCGGGCTGACCTGGTCAAGATTGCCCTC
AGGATGGATTCCCTCTAAAGACCTCATGTCCCACTATGAGGAGGCCATGGGACTGTGCGGACGGAGGCTCTCTTCTTT
GATGGGACAAAGCTTTCAGGCAGGGAGCTGCCAGCTGACCTGGGCATGGAATCTGGGGACCTCATTGAGGTCTGGGGCTGA

```

【図3】

>NIP45v2_ヌクレオチド 145 bp 欠失; 1115 bp

```

ATGGCGGAGCCTGTGGGGAAGCGGGGCCGCTGGTCCGGAGGTAGCGGTGCCGGCCGAGGGGGTGGGGCGGGTGGGGCGGTCCG
GGCCGGGCTCCTCGGGCCAGCGGTCTCCATCCCGGGGCACGCTGGACGTAGTGTCTGTGGAAGTGGTACCGACAGCGATGAG
GAAATTCCTGGAGGTCCGACCGCTCGCGGTGCCGGGACGAGGTGAGGTGGAGCCCCCGGAGCCCCCGGGGCCGCTCGCGTCC
CGGGATAACAGCAACAGTGACAGCGAAGGGGAGGACAGGCGGCCCGCAGGACCCCCGCGGAGCCCGGTGAGGCGCGCGCGCGG
CTGGTGTGGATCCGGGGGAGGCGCGCTGGTTCGGGTGTAAGTAAAGAGAGGTTAAAGAGAGGTTAAAGAGAGGTTAAAGAGAGG
CTATCCCTCCTGAAACTCTACCTCCAGGGGATGAGGAAGAGGACAGAGCTGGCAGATTGAGTGGTCTCTACCATGAGGGCTCC
CCATCACCAGGCTCTCCCTGGAAGACAAAGCTGAGGACTAAGGATAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AACTCTCCTCTGTCCCGACCTTCAAGAGGACCAAGAGCAGAACGCATACTCGGGCACTCAAGAAGTTAAGTGGGTGAACAAG
CGCTCCAGGATCTCCGTTCTGTCTGAGCCCCAAGCCACCTCAGGGTCAAGAGCAACAGGGCCAAAGAGGATGAAGTGGTCTTG
GTGGAAGGGCCACCTCCAGAGACCCCCGACTCTTCCCACTCAAAATCCGTTGCCGGGCTGACCTGGTCAAGATTGCCCTC
AGGATGACTGTGTGGTACTAACAAGTTCTCCAGAGGCCACAGAGACGTTCCCAACAGCTCCAGCTCCGGGTGACGGGAAAGGAGA
AACACCAGACACTGGAAGTCTCACTGTCTCGAGATTCCCTCTAAAGACCTCATGTCCCACTATGAGGAGGCCATGGGACTGT
CGGACCGGAAGCTCTCTTCTTTGATGGGACAAAGCTTTCAGGCAGGGAGCTGCCAGCTGACCTGGGCATGGAATCTGGGG
ACCTCATTGAGGTCTGGGGCTGA

```

【図4】

>NIP45v3_ヌクレオチド 347 bp 欠失; 913 bp

```

ATGGCGGAGCCTGTGGGGAAGCGGGGCCGCTGGTCCGGAGGTAAAGAGAGGCTTCCGCTTATCCAGATGATCTATCCCTCCT
GAAACTCTACCTCCAGGGGATGAGGAAGAGGACAGAGCTGGCAGATTGAGTGGTCTCTACCATGAGGGCTCCCATCACCAGG
CTCTCCCTGGAAGACAAAGCTGAGGACTAAGGATAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
GTCCCCACCTTCAAGAGGACCAAGAGCAGAACGCATACTCGGGCACTCAAGAAGTTAAGTGGGTGAACAAGCGCTCCAGGA
TCTCCGTTCTGTCTGAGCCCCAAGCCACCTCAGGGTCAAGAGCAACAGGGCCAAAGAGGATGAAGTGGTCTTGGTGAAGGGCC
CACCTCCAGAGACCCCCGACTCTTCCCACTCAAAATCCGTTGCCGGGCTGACCTGGTCAAGATTGCCCTCAGGATGTCGGA
GCCCCGAGAGTGTGGTGGACCATGGCCACCCACCTTGGGGTGTCCCCAAGCAGGATCCTTTTGTCTTTTGGAGAGACAGA
GCTATCACTACTGCCACTCCAGGACCTAAAGCTCGGAGTGGCTGACATCATGACTGTGTGGTACTAACAAGTCTCCAGA
GGCCACAGAGAGCTGCCAACAGCTCCAGCTCCGGGTGACAGGAAAGGAGAAACACAGACACTGGAAGTCTCACTGTCTCGAGA
TTCCCTCTAAAGACCTCATGTCCCACTATGAGGAGGCCATGGGACTGTGCGGACGGAGGCTCTCTTCTTTGATGGGAC
AAAGCTTTCAGGCAGGGAGCTGCCAGCTGACCTGGGCATGGAATCTGGGGACCTCATTGAGGTCTGGGGCTGA

```

【図5】

>NIP45v4_ヌクレオチド 988 bp 欠失 ; 272 bp

ATGGCGGAGCCTGTGGGGAAGCGGGGCGCTGGTCCGGAGGTTAAAAGCAGCCTTCGCCCTATCCCAGATGATCTATCCCTCCT
GAAACTCTACCTCCAGGGGATGAGGAAGGATTCCCTCTAAAGACCCTCATGTCCCACTATGAGGAGGCCATGGGACTGTCCG
GACGGAAGCTCTCCTTCTTCTTGATGGGACAAAGCTTTCAGGCAGGAGCTGCCAGCTGACCTGGGCATGGAATCTGGGGACC
TCATTGAGGTCTGGGGCTGA

【図6】

Fig. 6

```

ggaaagtgtg ccatggcgga gcctgtgggg aagcggggcc gctgggtccgg aggtagcggg 60
gccggccgag ggggtcgggg cggctggggc ggtcggggcc gggctcctcg ggcccagcgg 120
tctccatccc ggggcacgct ggacgtagtgt tctgtggact tggtcaccga cagcgatgag 180
gaaattcttg aggtcgccac cgctcgcggt gccgcggacg aggttgaggt ggagcccccg 240
gagcccccg ggccgggtcg gtcccgggat aacagcaaca gtgacagcga aggggaggac 300
aggcggcccg caggaccccc gcgggagccg gtcaggcggc ggccggcggt ggtgctggat 360
cggggggagg cgccgctggt tcgggtgtac toggggaagg ttaaaagcag ccttcgcctt 420
atcccagatg atctatccct cctgaaactc taccctccag gggatgagga agaggcagag 480
ctggcagatt cgagtgggtc ctacatgag ggctccccat caccaggctc tccttggaag 540
acaaagctga ggactaagga taaagaagag aagaaaaaga cagagtttct ggatctggac 600
aactctcctc tgtccccacc ttcaccaagg accaaaagca gaacgcatac tcgggcactc 660
aagaagttaa gtgaggtgaa caagcgctc caggatctcc gttcctgtct gagccccaag 720
ccacctcagg gtcaagagca acagggccaa gaggatgaag tggctcttgg ggaaggggcc 780

```

【図6】

```

accctcccag agaccccccg actcttccca ctcaaaatcc gttgccgggc tgacctggtc 840
agattgcccc tcaggatgtc ggagcccctg cagagtgtgg tggaccacat ggccaccac 900
cttgggggtg cccaagcag gatccttttg ctttttggag agacagagct atcacctact 960
gccactccca ggaccctaaa gctcggagtg gctgacatca ttgactgtgt ggtactaaca 1020
agttctccag aggccacaga gacgtcccaa cagctccagc tccgggtgca gggaaaggag 1080
aaacaccaga cactggaagt ctcaactgtct cgagattccc ctctaaagac cctcatgtcc 1140
cactatgagg aggccatggg actgtcggga cggaagctct ccttcttctt tgatgggaca 1200
aagctttcag gcagggagct gccagctgac ctgggcatgg aatctgggga cctcattgag 1260
gtctggggct gacaccccac tccctgtttg acggcccagc ctggacttgg ggagaatgac 1320
tttccctttt ttgcccata agggctagca taagctgagg tagaacttat ctttaagctg 1380
cagcaaaatc aaggagtgc ttttgcctcc tctcctgttg accctggttt agagccgtta 1440
accacttggg gagttatgtg ggtgttgttg cctgggtggg cctgtggctc cgtccacaag 1500
tcatgtgag ttttgcagcc tctgtgactt ggagatgtcc cttcaccocct cccctttcac 1560
caccatctc ttttcccat ggaaatgtct gctttatgaa actatgcaca tattgaaagt 1620
gagttgaaac aaatgagggt tgggtaggag cttccaggcc tgggatttac accacgccta 1680
gcccagcaga ggccttagtc ccatttgggg cttgggagtg acatttgctt gaggettata 1740
cactgggtgt gttgcctggc ttgcaggaaa tgaccaagct cacacatgct ggctgaagcg 1800
taagcagaca actgaggtag tcttttgaag gatgaagggt gtggattctc agccctgggg 1860
gtcttccctc cctgaggacc cttcagagcc accctttcta gtttgcatth cctgggtgcac 1920
acatttaagg cataacagca cattcatccc tttggtttgg gatctcagga atacagtccc 1980
atgcaaagat tctctgggtt tatggctttt ttccctttct ttacaccatc ctctcccata 2040
agcaccocat tctttgaata tgaatgtatt tgtaaaatac cacgtttcat gtgtgaatat 2100
gtgcttttac tgtacatagt gctattgtgc aataggctct atgctgtttt cactcaatgt 2160
gtgctaagat ctagccocat tgactcttct agaaatgcag tattgctttg acctgccatg 2220
tggcactcca caatgtcaat tgcagtttac acacattgcc taaagtgggg gacacctggg 2280
tgcccctgac cccttggcac cggatacagg ccacgataaa catcctttcg tgtgttccct 2340
tctgtgcttg tgtggcatgt gtaccagga tgggcctata ggtcacagag gtcagtttct 2400
ctttgggttt ccagatthtc tttagaacgg tgactgacc cctacttga ggccgccctt 2460
ttctccttat ccttgccagc acttgatttg ccagactacc taatthttgc cagtctcatg 2520
ggtagatagt ggtgcagtgc tttaacatac attcatctga tcagcattaa tttggg 2576

```

【図7】

>NIP45_ヌクレオチド 全長; 1260 bp
 ATGGCGGAGCCTGTGGGGAAGCGGGGCGCTGGTCCGGAGGTAGCGGTGCCGGCCGAGGGGGTTCGGGGCGGCTGGGGCGGTCCGG
 GGCCGGGCTCTCGGGCCCGCGGTCTCCATCCCGGGGCACGCTGGACGCTAGTGTCTGTGGACTTGGTCACCGACAGCGATGAG
 GAAATCTGGAGGTGCGCCACCGCTCGCGGTGCCGCGGACGAGGTTGAGGTGGAGCCCCCGGAGCCCCGGGGCGGCTCGCGTCC
 CGGGATAACAGCAACAGTGACAGCGAAGGGGAGGACAGGCGGCCCCGAGGACCCCCCGGGAGCCCGGTTCAGGCGGCGGCGGGCGG
 CTGGTGCTGGATCCGGGGGAGGCGCGCTGGTTCCGGTGTACTCGGGGAAGGTTAAAGCAGCCCTTCGCCCTTATCCAGATGAT
 CTATCCCTCTGAAACTCTACCTCCAGGGGATGAGGAAGAGGCGAGCTGGCAGATTCCAGTGGTCTCTACCATGAGGGCTCC
 CCATCACCAGGCTCTCCCTGGAAGACAAGCTGAGGACTAAGGATAAAGAAGAGAAGAAAAAGACAGAGTTTCTGGATCTGGAC
 AACTCTCCTGTGCCACCTTCACCAAGGACCAAGAGCAGACGCTACTCGGGCACTCAAGAAGTTAAGTGAGGTGAACAAG
 CGCTCCAGGATCTCGGTTCTGTCTGAGCCCCAAGCCACCTCAGGGTCAAGAGCAACAGGGCCAAGAGGATGAAGTGGTCTTG
 GTGAAGGGCCACCTCCCAGAGACCCCGACTCTTCCCACTCAAATCCGTTCGGGGCTGACCTGGTCAGATTGCCCTC
 AGGATGTCGGAGCCCTGCAGAGTGTGGTGGACCACATGGCCACCCACCTTGGGGTGTCCCAAGCAGGATCCTTTTGCTTTT
 GGAGAGACAGAGCTATCACCTACTGCCACTCCAGGACCTAAAGCTCGGAGTGGCTGACATCATTGACTGTGTGGTACTAACA
 AGTTCTCCAGAGGCCACAGAGAGCTCCCAACAGCTCCAGCTCCGGGTGCAGGGAAGGAGAAACACCAGACACTGGAAGTCTCA
 CTGTCTCGAGATTCCCTCTAAAGACCTCATGTCCCACTATGAGGAGGCCATGGGACTGTTCGGACCGGAAGCTCTCCTTCTTC
 TTTGATGGGACAAAGCTTTCAGGCAGGGAGCTGCCAGCTGACCTGGGCATGGAATCTGGGGACCTCATTGAGGTCTGGGGCTGA

【図8】

>NIP45v1_アミノ酸 335アミノ酸 (3文字コード)
 METAlaGluProValGlyLysArgGlyArgTrpSerGlyGlySerGlyAlaGlyArgGlyGlyArgGlyGlyTrpGlyGlyArg
 GlyArgAlaProArgAlaGlnArgSerProSerArgGlyThrLeuAspValValSerValAspLeuValThrAspSerAspGlu
 GluIleLeuGluValAlaThrAlaArgGlyAlaAlaAspGluValGluValGluProProGluProProGlyProValAlaSer
 ArgAspAsnSerAsnSerAspSerGluGlyGluAspArgArgProAlaGlyProProArgGluProValArgArgArgArg
 LeuValLeuAspProGlyGluAlaProLeuValProValTyrSerGlyLysValLysSerSerLeuArgLeuIleProAspAsp
 LeuSerLeuLeuLysLeuTyrProProGlyAspGluGluGluAlaGluLeuAlaAspSerSerGlyLeuTyrHisGluGlySer
 ProSerProGlySerProTrpLysThrLysLeuArgThrLysAspLysGluGluLysLysLysThrGluPheLeuAspLeuAsp
 AsnSerProLeuSerProProSerProArgThrLysSerArgThrHisThrArgAlaLeuLysLysLeuSerGluValAsnLys
 ArgLeuGlnAspLeuArgSerCysLeuSerProLysProProGlnGlyGlnGluGlnGlnGlyGlnGluAspGluValValLeu
 ValGluGlyProThrLeuProGluThrProArgLeuPheProLeuLysIleArgCysArgAlaAspLeuValArgLeuProLeu
 ArgMETAspSerProLeuLysThrLeuMETSerHisTyrGluGluAlaMETGlyLeuSerGlyArgLysLeuSerPhePhePhe
 AspGlyThrLysLeuSerGlyArgGluLeuProAlaAspLeuGlyMETGluSerGlyAspLeuIleGluValTrpGlySTP

【図9】

>NIP45v2_アミノ酸 287アミノ酸 (3文字コード)
 METAlaGluProValGlyLysArgGlyArgTrpSerGlyGlySerGlyAlaGlyArgGlyGlyArgGlyGlyTrpGlyGlyArg
 GlyArgAlaProArgAlaGlnArgSerProSerArgGlyThrLeuAspValValSerValAspLeuValThrAspSerAspGlu
 GluIleLeuGluValAlaThrAlaArgGlyAlaAlaAspGluValGluValGluProProGluProProGlyProValAlaSer
 ArgAspAsnSerAsnSerAspSerGluGlyGluAspArgArgProAlaGlyProProArgGluProValArgArgArgArg
 LeuValLeuAspProGlyGluAlaProLeuValProValTyrSerGlyLysValLysSerSerLeuArgLeuIleProAspAsp
 LeuSerLeuLeuLysLeuTyrProProGlyAspGluGluGluAlaGluLeuAlaAspSerSerGlyLeuTyrHisGluGlySer
 ProSerProGlySerProTrpLysThrLysLeuArgThrLysAspLysGluGluLysLysLysThrGluPheLeuAspLeuAsp
 AsnSerProLeuSerProProSerProArgThrLysSerArgThrHisThrArgAlaLeuLysLysLeuSerGluValAsnLys
 ArgLeuGlnAspLeuArgSerCysLeuSerProLysProProGlnGlyGlnGluGlnGlnGlyGlnGluAspGluValValLeu
 ValGluGlyProThrLeuProGluThrProArgLeuPheProLeuLysIleArgCysArgAlaAspLeuValArgLeuProLeu
 ArgMETThrValTrpTyrSTP

【図10】

>NIP45v3_アミノ酸 304アミノ酸 (3文字コード)
 TrpArgSerLeuTrpGlySerGlyAlaAlaGlyProGluValLysSerSerLeuArgLeuIleProAspAspLeuSerLeuLeu
 LysLeuTyrProProGlyAspGluGluGluAlaGluLeuAlaAspSerSerGlyLeuTyrHisGluGlySerProSerProGly
 SerProTrpLysThrLysLeuArgThrLysAspLysGluGluLysLysLysThrGluPheLeuAspLeuAspAsnSerProLeu
 SerProProSerProArgThrLysSerArgThrHisThrArgAlaLeuLysLysLeuSerGluValAsnLysArgLeuGlnAsp
 LeuArgSerCysLeuSerProLysProProGlnGlyGlnGluGlnGlnGlyGlnGluAspGluValValLeuValGluGlyPro
 ThrLeuProGluThrProArgLeuPheProLeuLysIleArgCysArgAlaAspLeuValArgLeuProLeuArgMETSerGlu
 ProLeuGlnSerValValAspHisMETAlaThrHisLeuGlyValSerProSerArgIleLeuLeuLeuPheGlyGluThrGlu
 LeuSerProThrAlaThrProArgThrLeuLysLeuGlyValAlaAspIleIleAspCysValValLeuThrSerSerProGlu
 AlaThrGluThrSerGlnGlnLeuGlnLeuArgValGlnGlyLysGluLysHisGlnThrLeuGluValSerLeuSerArgAsp
 SerProLeuLysThrLeuMETSerHisTyrGluGluAlaMETGlyLeuSerGlyArgLysLeuSerPhePhePheAspGlyThr
 LysLeuSerGlyArgGluLeuProAlaAspLeuGlyMETGluSerGlyAspLeuIleGluValTrpGlySTP

【図11】

>NIP45v4_アミノ酸 55アミノ酸 (3文字コード)
 METArgLysAspSerProLeuLysThrLeuMETSerHisTyrGluGluAlaMETGlyLeuSerGlyArgLysLeuSerPhePhe
 PheAspGlyThrLysLeuSerGlyArgGluLeuProAlaAspLeuGlyMETGluSerGlyAspLeuIleGluValTrpGlySTP

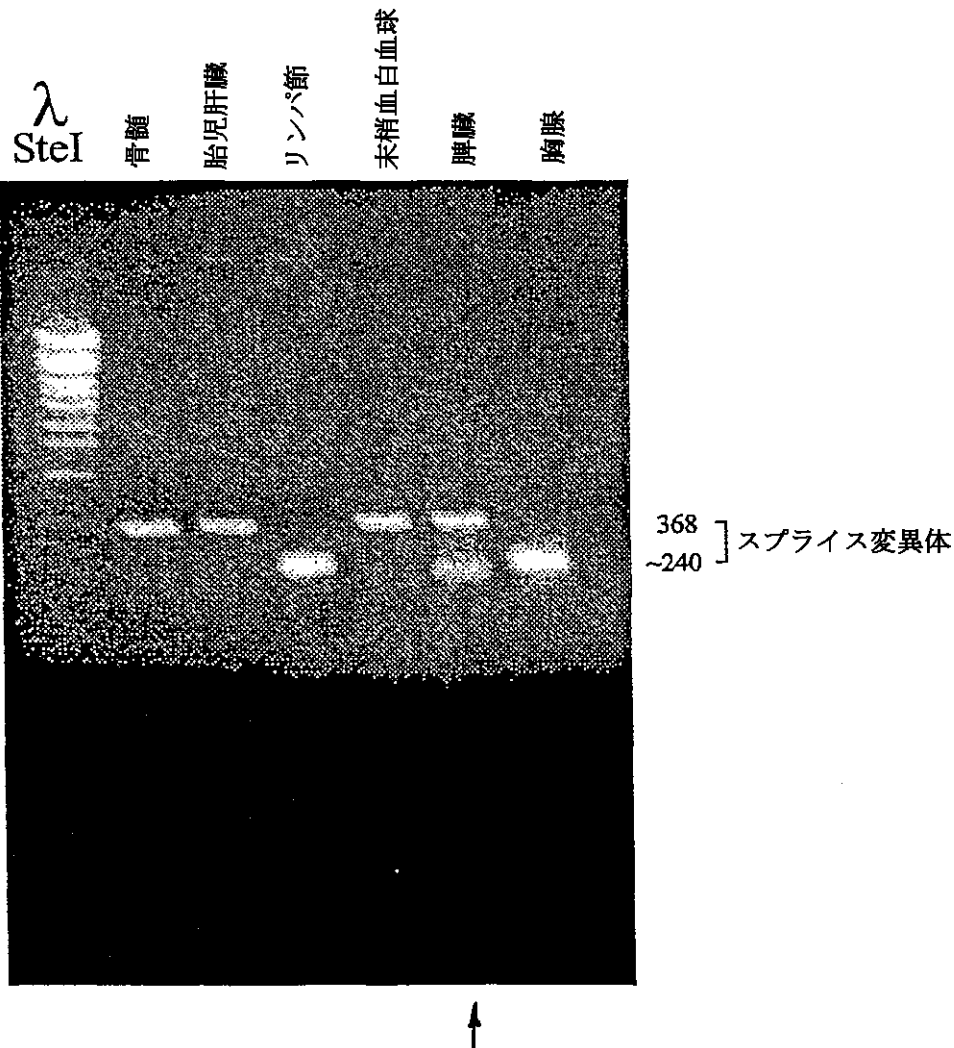
【図12】

>NIP45_アミノ酸 全長:420アミノ酸(3文字コード)

METAlaGluProValGlyLysArgGlyArgTrpSerGlyGlySerGlyAlaGlyArgGlyGlyArgGlyGlyTrpGlyGlyArg
 GlyArgAlaProArgAlaGlnArgSerProSerArgGlyThrLeuAspValValSerValAspLeuValThrAspSerAspGlu
 GluIleLeuGluValAlaThrAlaArgGlyAlaAlaAspGluValGluValGluProProGluProProGlyProValAlaSer
 ArgAspAsnSerAsnSerAspSerGluGlyGluAspArgArgProAlaGlyProProArgGluProValArgArgArgArg
 LeuValLeuAspProGlyGluAlaProLeuValProValTyrSerGlyLysValLysSerSerLeuArgLeuIleProAspAsp
 LeuSerLeuLeuLysLeuTyrProProGlyAspGluGluGluAlaGluLeuAlaAspSerSerGlyLeuTyrHisGluGlySer
 ProSerProGlySerProTrpLysThrLysLeuArgThrLysAspLysGluGluLysLysLysThrGluPheLeuAspLeuAsp
 AsnSerProLeuSerProProSerProArgThrLysSerArgThrHisThrArgAlaLeuLysLysLeuSerGluValAsnLys
 ArgLeuGlnAspLeuArgSerCysLeuSerProLysProProGlnGlyGlnGluGlnGlnGlyGlnGluAspGluValValLeu
 ValGluGlyProThrLeuProGluThrProArgLeuPheProLeuLysIleArgCysArgAlaAspLeuValArgLeuProLeu
 ArgMETSerGluProLeuGlnSerValValAspHisMETAlaThrHisLeuGlyValSerProSerArgIleLeuLeuLeuPhe
 GlyGluThrGluLeuSerProThrAlaThrProArgThrLeuLysLeuGlyValAlaAspIleIleAspCysValValLeuThr
 SerSerProGluAlaThrGluThrSerGlnGlnLeuGlnLeuArgValGlnGlyLysGluLysHisGlnThrLeuGluValSer
 LeuSerArgAspSerProLeuLysThrLeuMETSerHisTyrGluGluAlaMETGlyLeuSerGlyArgLysLeuSerPhePhe
 PheAspGlyThrLysLeuSerGlyArgGluLeuProAlaAspLeuGlyMETGluSerGlyAspLeuIleGluValTrpGlySTP

【図13】

ヒト NIP45 の PCR 増幅



【図14-1】

----- セクション1					
(1)1	10	20	30	40	51
NIP45_アミノ酸 (1)MAEPVGKRGRWSGGSGAGRGGRGGWGGRGRAPRAQRSPSRGTLDVVSVDLV					
NIP45v1_アミノ酸(1)MAEPVGKRGRWSGGSGAGRGGRGGWGGRGRAPRAQRSPSRGTLDVVSVDLV					
NIP45v2_アミノ酸(1)MAEPVGKRGRWSGGSGAGRGGRGGWGGRGRAPRAQRSPSRGTLDVVSVDLV					
NIP45v3_アミノ酸(1)-----					
NIP45v4_アミノ酸(1)-----					
コンセンサス (1)MAEPVGKRGRWSGGSGAGRGGRGGWGGRGRAPRAQRSPSRGTLDVVSVDLV					
----- セクション2					
(52)52	60	70	80	90	102
NIP45_アミノ酸 (52)TDSDEEILEVATARGAADEVVEPEPPPGPVASRDNSNSDSEGEDRRPAGP					
NIP45v1_アミノ酸(52)TDSDEEILEVATARGAADEVVEPEPPPGPVASRDNSNSDSEGEDRRPAGP					
NIP45v2_アミノ酸(52)TDSDEEILEVATARGAADEVVEPEPPPGPVASRDNSNSDSEGEDRRPAGP					
NIP45v3_アミノ酸(1) -----					
NIP45v4_アミノ酸(1) -----					
コンセンサス (52)TDSDEEILEVATARGAADEVVEPEPPPGPVASRDNSNSDSEGEDRRPAGP					

【図14-2】

----- セクション3

	(103)103	110	120	130	140	153	
NIP45_アミノ酸	(103)PREPVR	RRRRRLVLD	PGGEAPL	VPVYSGK	VKSSLRL	IPDDL	SLLKLYPPGDEE
NIP45v1_アミノ酸	(103)PREPVR	RRRRRLVLD	PGGEAPL	VPVYSGK	VKSSLRL	IPDDL	SLLKLYPPGDEE
NIP45v2_アミノ酸	(103)PREPVR	RRRRRLVLD	PGGEAPL	VPVYSGK	VKSSLRL	IPDDL	SLLKLYPPGDEE
NIP45v3_アミノ酸(1)	-----	WRSLW	SGAAGPE	VKSSLRL	IPDDL	SLLKLYPPGDEE	
NIP45v4_アミノ酸(1)	-----						
コンセンサス	(103)PREPVR	RRRRRLVLD	PGGEAPL	VPVYSGK	VKSSLRL	IPDDL	SLLKLYPPGDEE

----- セクション4

	(154)154	160	170	180	190	204	
NIP45_アミノ酸	(154)EAELAD	SSGLYHEG	SPSPGSP	WKTKLR	TKDKEE	KKKTEFLD	LDNSPLSPPS
NIP45v1_アミノ酸	(154)EAELAD	SSGLYHEG	SPSPGSP	WKTKLR	TKDKEE	KKKTEFLD	LDNSPLSPPS
NIP45v2_アミノ酸	(154)EAELAD	SSGLYHEG	SPSPGSP	WKTKLR	TKDKEE	KKKTEFLD	LDNSPLSPPS
NIP45v3_アミノ酸(38)	EAELAD	SSGLYHEG	SPSPGSP	WKTKLR	TKDKEE	KKKTEFLD	LDNSPLSPPS
NIP45v4_アミノ酸(1)	-----						
コンセンサス	(154)EAELAD	SSGLYHEG	SPSPGSP	WKTKLR	TKDKEE	KKKTEFLD	LDNSPLSPPS

【図14-3】

— セクション5

	(205)205	210	220	230	240	255	
NIP45_アミノ酸	(205)	PRTKS	RTHTR	ALKKL	SEVNK	RLQDL	RSCLSPKPPQGQEQGQEQDEVVLVEG
NIP45v1_アミノ酸	(205)	PRTKS	RTHTR	ALKKL	SEVNK	RLQDL	RSCLSPKPPQGQEQGQEQDEVVLVEG
NIP45v2_アミノ酸	(205)	PRTKS	RTHTR	ALKKL	SEVNK	RLQDL	RSCLSPKPPQGQEQGQEQDEVVLVEG
NIP45v3_アミノ酸	(89)	PRTKS	RTHTR	ALKKL	SEVNK	RLQDL	RSCLSPKPPQGQEQGQEQDEVVLVEG
NIP45v4_アミノ酸	(1)	-----					
コンセンサス	(205)	PRTKS	RTHTR	ALKKL	SEVNK	RLQDL	RSCLSPKPPQGQEQGQEQDEVVLVEG

— セクション6

	(256)256	260	270	280	290	306	
NIP45_アミノ酸	(256)	PTLPET	PRLFPL	KIRCR	ADLVRL	PLRMSE	PLQSVVDHMAHLGVSPSRILL
NIP45v1_アミノ酸	(256)	PTLPET	PRLFPL	KIRCR	ADLVRL	PLRM	-----
NIP45v2_アミノ酸	(256)	PTLPET	PRLFPL	KIRCR	ADLVRL	PLRMTV	WY-----
NIP45v3_アミノ酸	(140)	PTLPET	PRLFPL	KIRCR	ADLVRL	PLRMSE	PLQSVVDHMAHLGVSPSRILL
NIP45v4_アミノ酸	(1)	-----					
コンセンサス	(256)	PTLPET	PRLFPL	KIRCR	ADLVRL	PLRMS	

【図14-4】

----- セクション7

	(307)307	320	330	340	357
NIP45_アミノ酸 (307)	LFGETELSP	TATPRTLK	LGVADIID	CVVLTSS	PEATETSQQ
NIP45v1_アミノ酸(283)	-----				
NIP45v2_アミノ酸(287)	-----				
NIP45v3_アミノ酸(191)	LFGETELSP	TATPRTLK	LGVADIID	CVVLTSS	PEATETSQQ
NIP45v4_アミノ酸(1)	-----				
コンセンサス (307)					

----- セクション8

	(358)358	370	380	390	408
NIP45_アミノ酸 (358)	HQTLEVSL	SRDSPLK	TLMSHYEE	AMGLSGRK	LSFFFDG
NIP45v1_アミノ酸(283)	-----DSPLKTLMSHYEEAMGLSGRKLSFFFDG				
NIP45v2_アミノ酸(287)	-----				
NIP45v3_アミノ酸(242)	HQTLEVSL	SRDSPLK	TLMSHYEE	AMGLSGRK	LSFFFDG
NIP45v4_アミノ酸(1)	-----MRKDSPLKTLMSHYEEAMGLSGRKLSFFFDG				
コンセンサス (358)	L	RD	SPLK	TLMSHYEE	AMGLSGRKLSFFFDG

【図14-5】

セクション9

(409)409 419

NIP45_アミノ酸 (409)MESGDLIEVWG

NIP45v1_アミノ酸(324)MESGDLIEVWG

NIP45v2_アミノ酸(287)-----

NIP45v3_アミノ酸(293)MESGDLIEVWG

NIP45v4_アミノ酸(45) MESGDLIEVWG

コンセンサス (409)MESGDLIEVWG

【手続補正書】

【提出日】平成15年3月14日(2003.3.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリヌクレオチドであって、

a. i. 配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも約85%一致するアミノ酸配列；

ii. 配列番号8に示すアミノ酸配列；

iii. 配列番号9に示すアミノ酸配列と少なくとも約99%一致するアミノ酸配列；

iv. 配列番号9に示すアミノ酸配列；

v. 配列番号10に示すアミノ酸配列と少なくとも約96%一致するアミノ酸配列；

vi. 配列番号10に示すアミノ酸配列；

vii. 配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも約95%一致するアミノ酸配列；および、

viii. 配列番号11に示すアミノ酸配列、
から成る群より選ばれるアミノ酸配列を含むNIP45Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

b. 配列番号1、2、3、4または5に記載の配列を含むポリヌクレオチド；

c. ストリンジェントな条件下で(a)および(b)に明記するポリヌクレオチドとハイブリダイズし、かつNIP45Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

d. 遺伝コードの縮重のため、その配列が(a)～(c)に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱しており、かつNIP45Vポリペプチドをコードしてい

るポリヌクレオチド；および、

e . (a) ~ (d) に明記したポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表し、かつN I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、

から成る群より選ばれるポリヌクレオチド。

【請求項2】 請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項3】 請求項2に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項4】 請求項1に記載のポリヌクレオチドによりコードされている、実質上精製されたN I P 4 5 Vポリペプチド。

【請求項5】 a . 請求項3に記載の宿主細胞を、N I P 4 5 Vポリペプチドの発現に好適な条件下で培養し；そして、

b . N I P 4 5 Vポリペプチドを宿主細胞培養から回収する工程、を含む、N I P 4 5 Vポリペプチドを調製する方法。

【請求項6】 a . 請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドを生体試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；そして、

b . 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、を含む、生体試料中のN I P 4 5 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを検出するための方法。

【請求項7】 ハイブリダイゼーションの前に、生体試料の核酸材料を増幅させる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 a . 生体試料を、請求項1に記載のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載のN I P 4 5 Vポリペプチドと特異的に相互作用する試薬と接触させ、そして、

b . 該相互作用を検出する工程、を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載のN I P 4 5 Vポリペプチドを検出するための方法。

【請求項9】 請求項6 ~ 8のいずれかに記載の方法を実施するための診断

キット。

【請求項10】 a. 被験化合物を、請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされる任意のNIP45Vポリペプチドと接触させ；

b. NIP45Vポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、NIP45Vポリペプチドの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物を、NIP45Vポリペプチドの活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項11】 a. 被験化合物を、請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドによりコードされるNIP45Vポリペプチドと接触させ；そして、

b. 該ポリペプチドのNIP45V活性を検出する工程、を含む、NIP45Vポリペプチドの活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、NIP45V活性を増大させる被験化合物を、NIP45Vポリペプチドの活性を増大させる可能性のある治療物質として同定し、かつ該ポリペプチドのNIP45V活性を低下させる被験化合物を、NIP45Vポリペプチドの活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項12】 a. 被験化合物を、請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ；そして、

b. 該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、を含む、NIP45Vポリペプチドの活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を、NIP45Vポリペプチドの活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項13】 細胞を、請求項1に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載の任意のNIP45Vポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させ、それによりNIP45Vポリペプチドの活性を低下させる工程、を含むNIP45Vポリペプチドの活性を低下させる方法。

【請求項14】 請求項10～12のいずれかに記載の方法によって同定される、NIP45Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調整する試薬。

【請求項15】 請求項2に記載の発現ベクターまたは請求項14に記載の

試薬および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 16】 疾患において N I P 4 5 V ポリペプチドの活性を調整するための医薬の製造における、請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 14 に記載の試薬の使用。

【請求項 17】 該疾患が喘息である、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】 該疾患が自己免疫疾患、アレルギー性疾患、感染症または慢性炎症性疾患である、請求項 16 に記載の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 01/04635	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N5/10 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/68 A61K38/17 A61K31/7105 A61K31/713 A61P11/06 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 C12N C07K C12Q G01N A61K A61P 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) WPI Data, PAJ, CAB Data, BIOSIS, EPO-Internal	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
A	WO 99 21993 A (ZENECA LTD) 6 May 1999 (1999-05-06) cited in the application the whole document ---
A	WO 97 39721 A (GLIMCHER LAURIE H ; HARVARD COLLEGE (US); HO I CHENG (US); HODGE MA) 30 October 1997 (1997-10-30) cited in the application the whole document --- -/--
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art '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
7 November 2001	14/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 1 / EP 01/04635

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HODGE M R ET AL: "NF-AT-DRIVEN INTERLEUKIN-4 TRANSCRIPTION POTENTIATED BY NIP45" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 274, no. 5294, 13 December 1996 (1996-12-13), page 1903 XP002045448 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims (13,16-18,55,56,58,61,62)-partially (as far as in vivo methods are concerned) and (71-80)-partially and 57,59,60 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.

Continuation of Box I.2

Present claims (13-18,55,56,58,61,62 and 71-80)-partially relate to a method of modulating the activity of the NIP45V polypeptide, respectively a method of treating asthma or a NIP45V disorder by using an agent, and/or a reagent and pharmaceutical comprising it without giving a true technical characterization. Moreover no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies, antisense molecules, ribozymes, polypeptides and nucleic acids, the structure of which can be directly derived from SEQ ID Nos. 1-5 and 8-11.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PC 1/EP 01/04635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9921993	A	06-05-1999	AU 9549398 A 17-05-1999
		EP 1025224 A1 09-08-2000	
		WO 9921993 A1 06-05-1999	
WO 9739721	A	30-10-1997	US 5958671 A 28-09-1999
		US 5858711 A 12-01-1999	
		AU 720455 B2 01-06-2000	
		AU 3115597 A 12-11-1997	
		CN 1225682 A 11-08-1999	
		EP 0891425 A2 20-01-1999	
		JP 2000510333 T 15-08-2000	
		WO 9739721 A2 30-10-1997	
		US 6090561 A 18-07-2000	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)
A 6 1 P 11/06		A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
29/00		31/00	4 C 0 8 5
31/00		37/02	4 C 0 8 6
37/02		37/08	4 H 0 4 5
37/08		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02		1/68	
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
1/68		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50			M
33/53		33/566	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C O , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB20 BB24 BB50
CB01 DA13 DA36 FB02 FB12
GC15
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07
CA09 CA12 CA20 DA01 DA02
DA05 DA11 DA12 GA11 HA11
HA13 HA14 HA17
4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ41 QQ43
QQ53 QQ61 QQ79 QQ89 QR08
QR32 QR35 QR40 QR42 QR48
QR55 QR56 QR62 QR77 QR80
QR84 QS16 QS25 QS32 QS34
QS36 QX01 QX02 QX05 QX10
4B064 AG01 CA01 CA19 CC01 CC24
DA01 DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X
AA93Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 NA14 ZA592
ZB072 ZB112 ZB132 ZB322
ZC022
4C085 AA13 BB23 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA04 NA14 ZA59 ZB07 ZB11
ZB13 ZB32 ZC02
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	调节NF-AT相互作用蛋白NIP45突变体		
公开(公告)号	JP2003530883A	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001578645	申请日	2001-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳股份公司		
[标]发明人	ジェフリー・エンシナス		
发明人	ジェフリー・エンシナス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 C07K14/4702 C07K2319/00		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX05 4B063/QX10 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB322 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085/BB23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB32 4C086/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	60/199356 2000-04-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了新型NF-AT相互作用蛋白NIP45变体的核酸和氨基酸序列。与NIP45变体结合的试剂是涉及炎症过程的疾病，例如过敏，哮喘，自身免疫性疾病和其他慢性炎症性疾病，这些疾病会通过过度激活或延长免疫系统活性而对组织造成损害。可以用来治疗

