

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532034

(P2005-532034A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-556442 (P2003-556442)	(71) 出願人	502334043
(86) (22) 出願日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		インファーマティカ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月18日 (2004.8.18)		イギリス ロンドン ダブリュー1ティー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005890		2 エヌユー チャーロット ストリート
(87) 国際公開番号	W02003/055912		6 0
(87) 国際公開日	平成15年7月10日 (2003.7.10)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	0130720.6		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分泌タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、本明細書で4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーとして同定した新規なタンパク質 (INSP032、INSP033、INSP034、INSP036、INSP038)、並びに前記タンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の疾患診断、予防および治療における使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (i) から (iii) のいずれかのポリペプチド：

(i) 配列番号：8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号：8に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(ii) 分泌タンパク質機能、特に 4 - ヘリックスバンドルサイトカイン機能を有する (i) のポリペプチドのフラグメント、または (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する (i) のポリペプチドのフラグメントである；または

(iii) (i) もしくは (ii) の機能的等価物である。

【請求項 2】

4 - ヘリックスバンドルサイトカイン機能、特に顆粒球コロニー刺激因子活性を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 (iii) に記載のポリペプチドの機能的等価物であり、配列番号：8に記載のアミノ酸配列と相同であり、さらに 4 - ヘリックスバンドルサイトカイン活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号：8に記載のアミノ酸配列もしくはその活性なフラグメントと 80% を超える配列同一性、好ましくは 90%、95%、98% または 99% を越える配列同一性を有する請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のフラグメントまたは機能的等価物。

【請求項 5】

配列番号：8に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと顕著な構造的相同性を示す請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の機能的等価物。

【請求項 6】

請求項 1 (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有し、配列番号：8の配列に由来する 7 つまたはそれより多い (例えば 8、10、12、14、16、18、20 またはそれより多い) アミノ酸残基から成る請求項 1、2 または 4 のいずれか 1 項記載のフラグメント。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコードする精製核酸分子。

【請求項 8】

配列番号：7に記載の核酸配列を有するか、または余剰部分を含むその等価物もしくはそのフラグメントである請求項 7 に記載の精製核酸分子。

【請求項 9】

高いストリンジェンシーの条件下で請求項 7 または 8 記載の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸分子。

【請求項 10】

請求項 7 から 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと特異的に結合し、さらに好ましくは請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの分泌タンパク質活性、特に 4 - ヘリックスバンドルサイトカイン活性を阻害するリガンド。

【請求項 13】

抗体である請求項 12 記載のリガンド。

【請求項 14】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの発現レベルもしくは活性を増加または低下させる化合物。

【請求項 15】

前記ポリペプチドの生物学的作用のいずれをも誘発することなく、請求項 1 から 6 のい

10

20

30

40

50

ずれか 1 項記載のポリペプチドと結合する請求項 14 記載の化合物。

【請求項 16】

前記が天然もしくは改変基質、リガンド、酵素、レセプターまたは構造的もしくは機能的模倣物である請求項 14 または 15 記載の化合物。

【請求項 17】

疾患の治療または診断に使用するための、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 10 記載のベクター、請求項 11 記載の宿主細胞、請求項 12 または 13 記載のリガンド、または請求項 14 から 16 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 18】

患者に由来する組織で、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを判定するか、または請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの活性を判定し、さらに前記発現レベルまたは活性レベルをコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する、患者の疾患を診断する方法。

10

【請求項 19】

in vitro で実施される請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

(a) 請求項 11 記載の宿主細胞を生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；および (b) 前記複合体を検出する工程を含む、請求項 18 または 19 記載の方法。

20

【請求項 21】

(a) 患者由来の組織サンプルを核酸プローブと、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を許容するストリンジェントな条件下で接触させる工程；

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

(c) 前記サンプルにおけるハイブリッド複合体の存在を検出する工程を含み、コントロールサンプルのハイブリッド複合体のレベルと異なる患者サンプルのハイブリッド複合体レベルの検出が疾患を示唆する、請求項 18 または 19 記載の方法。

30

【請求項 22】

(a) 患者の組織由来の核酸サンプルを核酸プライマーと、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子と前記プライマーとの間でハイブリッド複合体の形成を許容するストリンジェントな条件下で接触させる工程；

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

(c) 前記サンプルの核酸を増幅させる工程；および、

(d) 患者サンプルおよびコントロールサンプルの両サンプルの増幅核酸レベルを検出する工程、を含み、

コントロールサンプルの増幅核酸レベルと顕著に異なる患者サンプルの増幅核酸レベルの検出は疾患を示唆する、請求項 18 または 19 記載の方法。

40

【請求項 23】

以下の (a) - (c) の工程を含む請求項 18 または 19 に記載の方法：

(a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから請求項 7 から 9 のいずれか 1 項記載の核酸分子を単離する工程；および、

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

【請求項 24】

さらに核酸分子を増幅させて増幅生成物を形成し、前記増幅生成物で変異の有無を検出

50

することを含む請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記核酸分子を前記分子とハイブリダイズする核酸プローブとストリンジェントな条件下で接触させて、疾患に附随する変異に対応する任意の部分に前記核酸プローブの非ハイブリダイズ部分を含むハイブリッド二本鎖分子を形成させること、および、

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

によって、前記患者における変異の有無を検出する請求項23または24記載の方法。

【請求項26】

前記疾患が、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態、好ましくは免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染(マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス(サイトメガロウイルス)感染を含む)、さらには特に血液病、白血球疾患(白血球減少症、薬物性白血球減少症及び白血病を含む)、骨髄移植、骨髄疾患、創傷治癒、免疫病、例えば移植片対宿主病及びクローン病、新生物疾患、黒色腫、固形癌、高脂質血症、高ホスファターゼ血症、貧血症、虚血、卒中、血管疾患、血栓症、血栓塞栓症、梗塞及び感染、特に真菌感染症及び細菌感染から選択される請求項18から25のいずれか1項記載の方法。

10

20

【請求項27】

分泌タンパク質としての請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチドの使用。

【請求項28】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子、請求項10記載のベクター、請求項12または13記載のリガンド、または請求項14から16のいずれか1項記載の化合物を含む医薬組成物。

30

【請求項29】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチドまたは請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子を含むワクチン組成物。

【請求項30】

以下の疾患の治療用医薬の製造で使用される、請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子、請求項10記載のベクター、請求項11記載の宿主細胞、請求項12または13に記載のリガンド、請求項14から16のいずれか1項記載の化合物、または請求項28に記載の医薬組成物：細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態、好ましくは免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加

40

50

齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）、さらには特に血液病、白血球疾患（白血球減少症、薬物性白血球減少症及び白血病を含む）、骨髄移植、骨髄疾患、創傷治癒、免疫病、例えば移植片対宿主病及びクローン病、新生物疾患、黒色腫、固形癌、高脂質血症、高ホスファターゼ血症、貧血症、虚血、卒中、血管疾患、血栓症、血栓塞栓症、梗塞及び感染、特に真菌感染症及び細菌感染。

【請求項31】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子、請求項10記載のベクター、請求項11記載の宿主細胞、請求項12または13記載のリガンド、または請求項14から16のいずれか1項記載の化合物、または請求項28に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、患者の疾患を治療する方法。 10

【請求項32】

天然の遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較したとき疾患を有する患者で低い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物または組成物がアゴニストである請求項31に記載の方法。

【請求項33】

天然の遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較したとき疾患を有する患者で高い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物または組成物がアンタゴニストである請求項31に記載の方法。 20

【請求項34】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチドの発現もしくは活性レベル、または請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子の発現レベルを前記患者由来の組織においてある期間モニターすることを含む、患者で疾患の治療をモニターする方法であって、コントロールのレベルに対して前記期間の間の発現または活性のレベルの変化が前記疾患の退縮の指標である前記疾患の治療をモニターする方法。

【請求項35】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチドまたは請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子を、前記ポリペプチドまたは核酸分子に対し結合親和性を有すると思われる1つまたは2つ以上の化合物と接触させ、さらに前記核酸分子またはポリペプチドと特異的に結合する化合物を選別することを含む、疾患の治療および/または診断で有効な化合物の同定方法。 30

【請求項36】

請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；前記核酸分子の増幅に有用なプライマーを含む第二の容器；および疾患の診断を促進するために前記プローブおよびプライマーを使用するための指示を含む疾患の診断に有用なキット。

【請求項37】

さらにハイブリダイズしないRNAを消化するための物質を収納する第三の容器を含む請求項36のキット。 40

【請求項38】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも1つが請求項7から9のいずれか1項記載の核酸分子である、前記キット。

【請求項39】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチドと結合する1つまたは2つ以上の抗体、および前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応を検出するために有用な試薬を含むキット。

【請求項40】

請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチドをより高いレベルで又はより低いレ 50

ベルで発現する、または発現しない、形質転換された非ヒトトランスジェニック動物またはノックアウト動物。

【請求項41】

請求項40記載の非ヒトトランスジェニック動物を候補化合物と接触させ、さらに前記動物の疾患に対する前記化合物の作用を決定することによって、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、本明細書において分泌タンパク質として（特に4-ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーとして）同定された新規タンパク質（INSP032、INSP033、INSP034、INSP036、INSP038）に関し、さらに疾患の診断、予防および治療におけるこれらタンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許および特許出願は、引用により完全に本明細書に含まれるものとする。

【0002】

（背景）

薬剤の発見プロセスにおいて、機能ゲノム学の時代の到来にあわせて根幹的な革命が現在進行している。“機能ゲノム学”という用語は、対象のタンパク質配列に機能を帰属させるためにバイオインフォマティクスツールを利用するアプローチに適用される。そのようなツールは、配列データの生成速度が、これらタンパク質配列に機能を割り当てる研究室の能力をはるかに越えるのでますます必要性を増している。

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

配列データが利用可能になるにつれ、種々の研究機関および企業の組織がそれらを調査し、重要な発見が絶え間なく達成され続けている。しかしながら、研究および薬剤の発見のための標的として更に新たな遺伝子およびそれらがコードするポリペプチドを同定し特徴付ける必要性は引き続き存在している。

【0003】

（分泌タンパク質の背景）

細胞外タンパク質を産生及び分泌する細胞の能力は、多くの生物学的プロセスの中心である。酵素、増殖因子、細胞外マトリックスタンパク質及びシグナル伝達分子は、すべて細胞によって分泌される。このことは、分泌小胞と原形質膜との融合による。すべてとは限らないが、たいていの場合、タンパク質はシグナルペプチドによって小胞体及び分泌小胞に向けられる。シグナルペプチドは、細胞質から分泌小胞のような膜結合型コンパートメントへのポリペプチド鎖の移動に影響を及ぼすシス作動性配列である。分泌小胞を標的にするポリペプチドは、細胞外マトリックスに分泌されるか、又は原形質膜において保持される。原形質膜において保持されるポリペプチドは、1つ以上の膜貫通型領域を有する。細胞の機能性において中心的な役割を果たす分泌タンパク質の例は、サイトカイン、ホルモン、細胞外マトリックスタンパク質（付着分子）、プロテアーゼ、並びに増殖及び分化因子である。これらタンパク質のいくつかの特性の説明は以下の通りである。

【0004】

（サイトカインに関する導入部）

サイトカインは、主として白血球から分泌される増殖因子ファミリーであり、ナノモル以下の濃度で細胞内の一連の反応を実行することができる強力な調節物質として機能するメッセンジャータンパク質である。インターロイキン、ニューロトロフィン、増殖因子、インターフェロンおよびケモカインは全て、細胞性レセプターと一緒に作用して細胞の増殖および分化を調節するサイトカインファミリーと定義される。それらのサイズはサイト

10

20

30

40

50

カインが迅速に体内で輸送され必要なときには分解されることを可能にする。広範囲の細胞機能、特に免疫反応および細胞増殖制御におけるそれらの役割は、これまで20年を超える多くの研究によって明らかにされた (S.B. Boppana (1996) *Indian. J. Pediatr.* 63(4):447-52)。他の増殖因子のように、サイトカインは、特定の1つの組織または腺ではなく多数の異なる細胞タイプによって産生され、さらに標的細胞上に存在する固有の高い親和性を有するレセプターとの相互作用を介して広範囲の細胞に効果を示すという事実によって古典的ホルモンとは区別される。

全てのサイトカインのコミュニケーション系は多面作用性 (1つのメッセンジャーが多種の作用を生じる) および冗長性 (各作用は2つ以上のメッセンジャーによって生じる) の両作用を示す (G. Tringali et al. (2000) *Therapie.* 55(1):171-5; L. Tessarollo (1998) *Cytokine Growth Factor Rev.* 9(2):125-137)。1個の細胞に対する個々のサイトカインの作用はまた、前記サイトカインの濃度、他のサイトカインの濃度、サイトカインの時間的順番および細胞内の状態 (細胞周期、近隣細胞の有無、癌性か否か) に左右されるであろう。

【0005】

サイトカインは典型的には小さなタンパク質 (200アミノ酸未満) であるが、それらはしばしば翻訳後にスプライスされるより大きな前駆体から生成される。前記によって、また別のmRNAスプライシング経路に加えて、各サイトカインの変種の広範囲のスペクトル (その各々は生物学的作用において実質的に異なるであろう) が提供される。多くのサイトカインの膜および細胞外マトリックス結合型もまた単離された (M. Okada-Ban et al. (2000) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32(3):263-267; S.P. Atamas (1997) *Life Sci.* 61(12):1105-1112)。

サイトカインは複数のファミリーに分類されるが、ただし大半は互いに関連をもたない。配列類似性はしばしば非常に低いので、分類は通常は二次構造組成を基にしている。前記ファミリーはその原型に因んで命名される (例えばIFN様、IL2様、IL1様およびTNF様) (A. Zlotnik et al. (2000) *Immunity* 12(2):121-127)。

サイトカインは、多細胞の多くの重要な反応、例えば免疫反応調節 (J. Nishihara (1998) *Int. J. Mol. Med.* 2(1):17-28)、炎症 (P.K. Kim et al. (2000) *Surg. Clin. North Am.* 80(3):885-894)、創傷治癒 (R.A. Clark (1991) *J. Cell Biochem.* 46(1):1-2)、胚発生および発育、並びにアポトーシス (H.D. Flad et al. (1999) *Pathobiology* 67(5-6):291-293) に必要であることが実験によって示された。

病原性生物 (ウイルスおよび細菌)、例えばHIVおよびカポジ肉腫附随ウイルスは抗サイトカイン因子をサイトカインファミリー類似体と同様にコードし、これによって前記がサイトカインレセプターと相互作用して体の免疫反応を制御することを可能にする (S. Sozzani et al. (2000) *Pharm. Acta. Helv.* 74(2-3):305-312; Y. Aoki et al. (2000) *J. Hematother. Stem. Cell Res.* 9(2):137-145)。ウイルスによってコードされるサイトカイン (ヴィロカイン) は、ホストの免疫系に似せて、これを破壊するというウイルスの能力によるウイルスの病原性発揮のために必要であることが示された。

【0006】

サイトカインは以下を含む症状および疾患の治療、予防および/または診断に有用であろう: 免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染 (マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス

ス（サイトメガロウイルス）感染を含む）。

ウイルスによってコードされるサイトカインであるマクロファージ抑制タンパク質IIは、Th2型細胞の選択的補充および細胞毒性免疫反応からの回避を仲介することができる（K.S. Weber et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31(8):2458-66）。これらのデータは、Th1型反応からTh2型反応へと炎症性細胞の補充を誘導し、それによって細胞毒性反応からの回避を容易にする際のvMIP-IIの免疫調節的役割を示す証拠を提供している。したがって、このタンパク質を用いて、Th1型免疫反応の過剰刺激が示唆される疾患（例えば炎症性腸症候群）を調節することができよう。別の研究でKawamotoら（S. Kawamoto et al. (2001) Int. Immunol. 13(5):685-94）は、vIL-10が自己免疫性糖尿病の治療で細胞性IL-10よりも優れている可能性があることを示唆する結果を示した。これらの結果は、ウイルスコードサイトカインは単なるウイルス排除よりも治療において潜在的有用性を有することを示している。

10

【0007】

サイトカインの臨床的利用は、例えば甲状腺癌に対する反応の促進（C. Schmutzler et al. (2000) 143(1):15-24）で免疫系の調節物質としての役割に焦点が当てられた（F.H. Rodriguez et al. (2000) Curr. Pharm. Des. 6(6):665-680）。サイトカインの細胞増殖および細胞分化の制御によってサイトカインはまた抗癌標的ともなった（E. Lazar-Molnar et al. (2000) Cytokain. 12(6):547-554; K. Gado (2000) 24(4):195-209）。サイトカインおよびサイトカインレセプターの新規な変異がいくつかの事例で疾患に対する抵抗性を付与することが示された（S.J. van Deventer et al. (2000) Intensive Care Med. 26(Suppl1):S98-S102）。活性を調節し潜在的副作用を除去するために合成サイトカイン（ミューテイン）を作製することもまた重要な研究方法であった（A.B. Shanafelt et al. (1998) 95(16):9454-9458）。

20

サイトカインサブセットは4-ヘリックスバンドルサイトカインであり、前記は、それらのヘリックスがそれぞれ約15または25残基を含むとき短鎖および長鎖サイトカインにさらに分類される。長鎖の4-ヘリックスバンドルサイトカインであるLIF、IL-6、CNTF、G H、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）およびレプチンについては結晶構造が決定された。それらの一次構造では低い相同性しか示されていない、前記サイトカインはそれらの三次構造および機能をもつレセプターエピトープにおいては高い相同性を示す。

上記で述べたように、サイトカイン分子は多様な生理学的機能において役割を果たすことが示された（その多くは疾患の進行に役割を示すことができる）。それらの活性を変更することは疾患の表現型を変えるための手段であり、さらに新規なサイトカイン分子を同定することは、それらが上記で特定した疾患および他の症状の治療でも役割をもち、また前記治療の開発においても有用であるので極めて適切であろう。

30

【0008】

（本発明）

本発明は、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036、INSP038タンパク質は分泌タンパク質分子として、さらに4-ヘリックスバンドルサイトカインクラスの分泌タンパク質として機能するという発見を基にしている。

本発明の第一の特徴の一態様ではポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

40

(i) 配列番号：2および/または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含む；

(ii) それらのフラグメントであって、分泌タンパク質機能、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン機能を有するか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、前記フラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的同等物である。

好ましくは、この態様のポリペプチドは配列番号：6に記載のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記ポリペプチドは配列番号：6に記載のアミノ酸配列から成る。

配列番号：2に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP032エクソン1ポリペプチド”と称される。配列番号：4に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP032エクソン2ポリペプチド”と称される。配列番号：2および配列番号：4の組み合わせに

50

よって、配列番号：6に記載の配列が生成される。配列番号：6は以下では“INSP032ポリペプチド”と称される。

【0009】

本発明の第一の特徴の第二の態様ではポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：8に記載のアミノ酸配列を含む；

(ii) それらのフラグメントであって、分泌タンパク質機能、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン機能、さらには特に顆粒球コロニー刺激因子活性を有するか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、前記フラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的同等物である。

配列番号：8に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP033エクソン1ポリペプチド”又は“INSP033ポリペプチド”と称される。INSP033はまたIPAA24020と称される。NCBIデータベースの配列アクセション番号AC021857と開示される“作用ドラフト配列”によって定義されるポリペプチドは、本発明の範囲から特異的に排除される。

好ましくは、本発明のこの特徴の第二の態様のポリペプチドは、分泌タンパク質機能、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン機能、さらには特に顆粒球コロニー刺激因子活性を有する。

【0010】

本発明の第一の特徴の第三の態様ではポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：10、配列番号：12および/または配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含む；

(ii) それらのフラグメントであって、分泌タンパク質機能、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン機能を有するか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、前記フラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的同等物である。

好ましくは、この態様のポリペプチドは配列番号：16に記載のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記ポリペプチドは配列番号：16に記載のアミノ酸配列から成る。

配列番号：10に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP034エクソン1ポリペプチド”と称される。配列番号：12に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP034エクソン2ポリペプチド”と称される。配列番号：14に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP034エクソン3ポリペプチド”と称される。配列番号：10、配列番号：12および配列番号：14の組み合わせによって、配列番号：16に記載の配列が生成される。配列番号：16は以下では“INSP034ポリペプチド”と称される。

【0011】

本発明の第一の特徴の第四の態様ではポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32および/または配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む；

(ii) それらのフラグメントであって、分泌タンパク質機能、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン機能を有するか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、前記フラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的同等物である。

好ましくは、この態様のポリペプチドは配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記ポリペプチドは配列番号：34に記載のアミノ酸配列から成る。

配列番号：24に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP036エクソン1ポリペプチド”と称される。配列番号：26に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP036エクソン2ポリペプチド”と称される。配列番号：28に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP036エクソン3ポリペプチド”と称される。配列番号：30に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP036エクソン4ポリペプチド”と称される。配列番号：32に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP036エクソン5ポリペプチド”と称される。配列番号：24、配列番号：26および配列番号：28、配列番号：30および配列番号：32の組み合わせによって、配列番号：34に記載の配列が生成される。配列番号：

34は以下では“ INSP036ポリペプチド ”と称される。

【 0 0 1 2 】

本発明の第一の特徴の第五の態様ではポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、
 (i) 配列番号 : 38、配列番号 : 40、配列番号 : 42、配列番号 : 44、配列番号 : 46および
 または配列番号 : 48に記載のアミノ酸配列を含む ;

(ii) それらのフラグメントであって、分泌タンパク質機能、特に 4 - ヘリックスバンドル
 サイトカイン機能を有するか、または (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、
 前記フラグメントである ; または

(iii) (i) または (ii) の機能的同等物である。

好ましくは、この態様のポリペプチドは配列番号 : 48に記載のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、
 前記ポリペプチドは配列番号 : 48に記載のアミノ酸配列から成る。 10

配列番号 : 38に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ INSP038エクソン 1 ポリペプチド ”
 と称される。配列番号 : 40に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ INSP038エクソン 2
 ポリペプチド ”と称される。配列番号 : 42に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ INSP038
 エクソン 3ポリペプチド ”と称される。配列番号 : 44に記載の配列を有するポリペプチドは以下では
 “ INSP038エクソン 4ポリペプチド ”と称される。配列番号 : 46に記載の配列を有するポリペプチド
 は以下では“ INSP038エクソン 5ポリペプチド ”と称される。配列番号 : 38、配列番号 : 40および
 配列番号 : 42、配列番号 : 44および配列番号 : 46の組み合わせによって、配列番号 : 48に記載の
 配列が生成される。配列番号 : 48は以下では“ INSP038ポリペプチド ”と称される。 20

【 0 0 1 3 】

第二の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする精製核酸分子を
 提供する。好ましくは、前記精製核酸分子は、配列番号 : 1 (INSP032エクソン 1ポリペプチドを
 コードする)、配列番号 : 3 (INSP032エクソン 2ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 7 (INSP033
 エクソン 1ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 9 (INSP034エクソン 1ポリペプチドをコードする)、
 配列番号 : 11 (INSP034エクソン 2ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 13 (INSP034エクソン 3
 ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 23 (INSP036エクソン 1ポリペプチドをコードする)、
 配列番号 : 25 (INSP034エクソン 2ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 27 (INSP036エクソン 3
 ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 29 (INSP036エクソン 4ポリペプチドをコードする)、
 配列番号 : 31 (INSP036エクソン 5ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 37 (INSP038エクソン 1
 ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 39 (INSP038エクソン 2ポリペプチドをコードする)、
 配列番号 : 41 (INSP038エクソン 3ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 43 (INSP038
 エクソン 4ポリペプチドをコードする)、配列番号 : 45 (INSP038エクソン 5ポリペプチドを
 コードする) に記載の核酸配列を有するか、またはこれら配列のいずれかの重複性 (redundant)
 等価物またはフラグメントである。配列番号 : 1および配列番号 : 3の組み合わせによって、
 配列番号 : 5に記載の配列が生成される。配列番号 : 9、配列番号 : 11および配列番号 : 13の
 組み合わせによって、配列番号 : 15に記載の配列が生成される。配列番号 : 23、配列番号 : 25、
 配列番号 : 27、配列番号 : 29および配列番号 : 31の組み合わせによって、配列番号 : 33に
 記載の配列が生成される。配列番号 : 37、配列番号 : 39、配列番号 : 41、配列番号 : 43
 および配列番号 : 45の組み合わせによって、配列番号 : 47に記載の配列が生成される。好ましくは、
 精製核酸分子は、配列番号 : 5に記載の核酸配列 (INSP032ポリペプチドをコードする) 又は
 配列番号 : 7に記載の核酸配列 (INSP033ポリペプチドをコードする) 又は配列番号 : 15に
 記載の核酸配列 (INSP034ポリペプチドをコードする) 又は配列番号 : 33に記載の核酸配列
 (INSP036ポリペプチドをコードする) 又は配列番号 : 47に記載の核酸配列 (INSP038ポリペプチド
 をコードする) を有するか、またはこれら配列のいずれかの重複性 (redundant) 等価物
 またはフラグメントである。 30 40

第三の特徴では、高ストリンジェンシー条件下で本発明の第2の特徴の核酸分子とハイブリダイズする
 精製核酸分子を提供する。

第四の特徴では、本発明は、本発明の第二または第三の特徴の核酸分子を含むベクター 50

、例えば発現ベクターを提供する。好ましいベクターとしては、PCR11-TOP0-IPAAA24020及びpEAK12D-IPAAA24020-6HISベクター（図13及び14参照）が挙げられる。

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

第六の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、さらに好ましくは前記ポリペプチドの分泌タンパク質活性、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン活性を抑制するリガンドを提供する。さらには特に、本発明は、本発明の第一の特徴のINSP033ポリペプチドと特異的に結合し、さらに好ましくは、前記ポリペプチドの顆粒球コロニー刺激因子活性を抑制するリガンドを提供する。

第七の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させるか、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節するために有効な化合物を提供する。 10

本発明の第七の特徴の化合物は、前記ポリペプチドの遺伝子の発現レベルまたは活性レベルを増加させるか（アゴニスト作用）、または低下させる（アンタゴニスト作用）。重要なことには、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038エクソンポリペプチド並びにINSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドの機能を同定することによって、疾患の治療および/または診断に有効な化合物を同定することができるスクリーニング方法のデザインが可能になる。

【0014】

第八の特徴では、本発明は、診断または治療で使用するために本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を提供する。これらの分子はまた、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心臓系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態を治療する医薬の製造においても用いることができる。好ましくは前記疾患には以下が含まれるが、ただしこれらに限定されない：免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心臓系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）、さらには特に血液病、白血球疾患（白血球減少症、薬物性白血球減少症及び白血病を含む）、骨髄移植、骨髄疾患、創傷治癒、免疫病、例えば移植片対宿主病及びクローン病、新生物疾患、黒色腫、固形癌、高脂質血症、高ホスファターゼ血症、貧血症、虚血、卒中、血管疾患、血栓症、血栓塞栓症、梗塞及び感染、特に真菌感染症及び細菌感染。 30 40

【0015】

第九番目の特徴では、本発明は患者で疾患を診断する以下の工程を含む方法を提供する：本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベル、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性レベルを前記患者由来の組織で評価し、さらに前記発現または活性レベルをコントロールレベルと比較する工程であって、この場合前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する。前記の方法は好ましくはin vitroで実施されるであろう。同様な方法は患者での疾患治療のモニタリングに使用することができる。この場合、時間の経過にしたがってポリペプチドまたは核酸分子の発現もしくは活性レベルがコントロールレベルに向かって変化するのは疾患の緩解の指標となる。

本発明の第一の特徴のポリペプチドを検出する好ましい方法は以下の工程を含む：（a 50

）本発明の第六の特徴のリガンド（例えば抗体）を生物学的サンプルとリガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；および、（b）前記複合体を検出する工程。

本発明の第九番目の特徴に記載の方法には、例えば短いプローブによる核酸ハイブリダイゼーション法、点変異分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、および異常なタンパク質レベルを検出する抗体を用いる方法といった種々の異なる方法が存在することは、当業者には明らかであろう。同様な方法を短期または長期ベースで用いて、モニターされる疾患の治療を可能にすることができる。本発明はまた前記疾患診断方法で有用なキットも提供する。

【0016】

第十番目の特徴では、本発明は、分泌タンパク質としての本発明の第一の特徴のポリペプチドの使用を提供する。INSP033ポリペプチドについて、本発明のこの特徴は、分泌タンパク質分子、好ましくは4-ヘリックスバンドルサイトカイン、さらには特に顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチドとしての前記ポリペプチドの使用を提供する。

第十一番目の特徴では本発明は医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を医薬的に許容できる担体と組合わせて含有する。

第十二番目の特徴では、本発明は、疾患（例えば細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態）の診断または治療を目的とする医薬品の製造で使用するために、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を提供する。特に、前記疾患には以下が含まれるが、ただしこれらに限定されない：免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）、さらには特に血液病、白血球疾患（白血球減少症、薬物性白血球減少症及び白血病を含む）、骨髄移植、骨髄疾患、創傷治癒、免疫病、例えば移植片対宿主病及びクローン病、新生物疾患、黒色腫、固形癌、高脂質血症、高ホスファターゼ血症、貧血症、虚血、卒中、血管疾患、血栓症、血栓塞栓症、梗塞及び感染、特に真菌感染症及び細菌感染。

【0017】

第十三番目の特徴では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を患者に投与することを含む。

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現または活性レベルと比較したとき罹患対象者で低下する疾患の場合、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物はアゴニストでなければならない。逆に、前記天然の遺伝子の発現、または前記ポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現または活性レベルと比較したとき罹患対象者で上昇する疾患の場合、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分

10

20

30

40

50

子、リガンドまたは化合物はアンタゴニストでなければならない。前記アンタゴニストの例にはアンチセンス核酸分子、リボザイムおよびリガンド（例えば抗体）が含まれる。

第十四番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドを高レベルで、または低レベルで発現させるために、または全く発現させないために形質転換したトランスジェニックまたは遺伝子ノックアウト非ヒト動物を提供する。前記トランスジェニック動物は、疾患の研究用モデルとして非常に有用であり、さらに前記疾患の治療または診断に有効な化合物の同定を目的とするスクリーニング方法で用いることができる。

【0018】

本発明を利用するために用いることができる標準的な技術および方法の要旨は下記で提供される。本発明は、記載した同定の方法論、プロトコル、細胞株、ベクターおよび試薬に限定されないことは理解されよう。本明細書で用いられる専門用語は単に個々の態様を説明するためのものであり、前記用語によって本発明の範囲を限定しようとするものではないこともまた理解されよう。本発明の範囲は添付の請求の範囲の用語によってのみ限定される。

10

本明細書では、ヌクレオチドおよびアミノ酸についての標準的な略語が用いられる。

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

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

20

30

【0019】

本明細書において用いる“ポリペプチド”という用語は、ペプチド結合または改変ペプチド結合によって互いに結合した2つまたは3つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質（すなわちペプチドイソスター）が含まれる。この用語は、短鎖（ペプチドおよびオリゴペプチド）および長鎖（タンパク質）の両方を指す。

本発明のポリペプチドは成熟タンパク質の形態を有するものでもよく、またプレ-、プロ-またはプレプロ-タンパク質であってプレ-、プロ-またはプレプロ-部分の切断によって活性化され、活性成熟ポリペプチドを生じるタンパク質でもよい。そのようなポリペプチドでは、プレ-、プロ-またはプレプロ-配列はリーダー配列もしくは分泌配列であっても、または成熟ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列であってもよい。

40

本発明の第一の特徴のポリペプチドは融合タンパク質の一部を形成することができる。例えば、1つまたは2つ以上の付加アミノ酸配列を含むことがしばしば有利である。前記付加アミノ酸配列は、例えばリコンビナント形成時に、分泌もしくはリーダー配列、プロ-配列、精製を促進する配列、またはより高いタンパク質安定性を付与する配列を含んでもよい。あるいは、または前記に加えて、前記成熟ポリペプチドを別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させるような化合物（例えばポリエチレングリコール）を融合させることができる。

【0020】

50

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

改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含むポリペプチド内のいずれの場所に生じててもよい。実際、共有結合改変によるポリペプチドのアミノまたはカルボキシ末端またはその両端の妨害(blockage)は、天然に存在するポリペプチドおよび合成ポリペプチドで一般的であり、そのような改変は本発明のポリペプチドにも存在し得る。

【0021】

ポリペプチド内に生じる改変は多くの場合ポリペプチドが生成される方法によって変動するであろう。組換えによって生成されるポリペプチドの場合、大部分の改変の性質および程度は、個々の宿主細胞の改変能力および問題のポリペプチドのアミノ酸配列に存在する改変シグナルによって決定されるであろう。例えば、グリコシル化パターンは異なる種類の宿主細胞間で変動するであろう。

本発明のポリペプチドは任意の適切な様式で調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド（例えば細胞培養から精製）、組換えにより生成されたポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成により生成されたポリペプチド、または前記方法を併用して生成されたポリペプチドが含まれる。

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036、又はINSP038エクソンポリペプチドおよび/またはINSP032、INSP033、INSP034、INSP036、又はINSP038ポリペプチドと相同なポリペプチドであろう。本明細書で用いる用語として、2つのポリペプチドは、前記ポリペプチドの一方の配列が他方のポリペプチドの配列に対して充分な同一性または類似性を有する場合、“相同である”と称する。“同一性”とは、アラインメントを施した配列のどの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で同一であることを示す。“類似性”は、アラインメントを施した配列のいずれの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で類似の種類であることを示す。同一性および類似性の度合いは容易に計算できる（Computational Molecular Biology, A.M. Lesk ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, D.W. Smith ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, G. von Heinje, Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, M. Gribskov and J. Devereux eds., M. Stockton Press, New York, 1991）。

【0022】

したがって、相同なポリペプチドには、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038エクソンポリペプチドおよびINSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドの天然の生物学的変種（例えば前記ポリペプチドが由来した種における対立形質変種または地理的変種）および変異体（例えばアミノ酸置換、挿入または欠失を含む変異体）が含まれる。前記変異体は、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されているポリペプチドを含んでもよく、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝コードでコードされたものでもそうで

なくてもよい。典型的な前記の置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間で；SerとThr間で；酸性残基AspとGlu間で；AsnとGln間で、塩基性残基LysとArg間で；または芳香族残基PheとTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつか（すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、または単に1つ）のアミノ酸が任意の組合せで置換されたまたは欠失または付加された変種である。特に好ましいものは、タンパク質の特性および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。さらにこれに関して特に好ましいものは保存的置換である。

前記変異体にはまた、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドが含まれる。

【0023】

典型的には、2つのポリペプチド間で80%を越える同一性は機能的等価物の指標であると考えられる。好ましくは、本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038エクソンポリペプチドまたはINSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドと、またはその活性なフラグメントと80%を越える配列同一性を有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ90%、95%、98%または99%を越える同一性を有する。

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドはまた、構造についてのアラインメントの1つまたは2つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであろう。例えば、バイオペンジウム（Biopendium）検索データベースの作製に用いられる検索ツールの一角を構成するインファーマティカ=ゲノムスレッダー（Inpharmatica Genome Threader）技術を用いて（同時係属PCT特許出願（PCT/GB01/01105）を参照されたい）、現在のところ機能は未知であるが、INSP032、INSP034、INSP036、又はINSP038エクソンポリペプチドまたはINSP032、INSP034、INSP036、又はINSP038ポリペプチド配列との顕著な構造的相同性を共有するために、分泌タンパク質活性を有すると予測される（一方INSP032、INSP034、INSP036、又はINSP038エクソンポリペプチドまたはINSP032、INSP034、INSP036、又はINSP038ポリペプチドと比較して低い配列同一性しかもたないが）ポリペプチドを同定することができる。別の例として、バイオペンジウム（Biopendium）検索データベースの作製に用いられる検索ツールの一角を構成するインファーマティカ=ゲノムスレッダー（Inpharmatica Genome Threader）技術を用いて（同時係属PCT特許出願（PCT/GB01/01105）を参照されたい）、現在のところ機能は未知であるが、INSP033エクソンポリペプチドまたはINSP033ポリペプチド配列との顕著な構造的相同性を共有するために、顆粒球コロニー刺激因子を有すると予測される（一方INSP033エクソンポリペプチドまたはINSP033ポリペプチドと比較して低い配列同一性しかもたないが）ポリペプチドを同定することができる。“顕著な構造的相同性”とは、インファーマティカ=ゲノムスレッダーが2つのタンパク質が10%以上の確度で構造的相同性を共有すると予測することを意味する。

本発明の第一の特徴のポリペプチドはまた、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036、及びINSP038エクソンポリペプチドおよびINSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドのフラグメント並びにこれらポリペプチドの機能的等価物のフラグメントを含むが、ただしこれらフラグメントが分泌タンパク質活性、特に4-ヘリックスバンドルサイトカイン活性、さらには特に顆粒球コロニー刺激因子活性を保持するか、またはこれらポリペプチドと共通の抗原決定基を有することを条件とする。

【0024】

本明細書において用いる、“フラグメント”という用語は、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036、又はINSP038エクソンポリペプチド又はINSP032、INSP033、INSP034、INSP036、又はINSP038ポリペプチドまたはその機能的等価物の1つのアミノ酸配列の部分（全体ではないが）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記フラグメントは、前記配列に由来する少なくともn個の連続したアミノ酸を含むべきであり、さらに個々の配列に応じてnは好ましくは7またはそれより大きい（例えば8、10、12、14、16、18、20またはそれより大きい）。小さなフラグメントは抗原決定基を構成することができる。

そのようなフラグメントは、“独立的存在（free-standing）”（すなわち、他のアミノ

10

20

30

40

50

酸もしくはポリペプチドの部分ではなく、また他のアミノ酸もしくはポリペプチドに融合されていない)であってもよく、またはより大きなポリペプチドに含まれて、前記ポリペプチドの部分または領域を形成してもよい。より大きなポリペプチドの内部に含まれている場合は、本発明のフラグメントは最も好ましくは連続するただ1つの領域を形成する。例えばある種の好ましい態様は、前記フラグメントのアミノ末端に融合したプレ-および/またはプロ-ポリペプチド領域を有するフラグメント、および/または前記フラグメントのカルボキシ末端に融合した付加的領域を有するフラグメントに関する。しかしながら、いくつかのフラグメントがただ1つのより大きなポリペプチドの内部に含まれていてもよい。

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

【0025】

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

ポリクローナル抗体が所望される場合は、選択される哺乳類(例えばマウス、ウサギ、ヤギまたはウマ)は、本発明の第一の特徴のポリペプチドで免疫することができる。動物を免疫するために用いられるポリペプチドは、リコンビナントDNA技術によって誘導するか、または化学的に合成することができる。所望する場合には、前記ポリペプチドは担体タンパク質と結合させることができる。前記ポリペプチドと化学的に結合させることができる一般的に用いられる担体には、ウシ血清アルブミン、サイログロブリンおよびキーホールリンペットヘモシアニンが含まれる。続いて前記担体結合ポリペプチドを用いて動物を免疫することができる。血清は免疫した動物から採集され、既知の方法(例えばイムノアフィニティークロマトグラフィー)にしたがって処理される。

【0026】

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

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

非ヒト可変領域がヒト定常領域と結合または融合されているキメラ抗体(例えば以下を参照されたい: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439(1987))もまた有用であろう。

【0027】

抗体は、例えばヒト化によって改変して各個体での免疫原性を減少させることができる(例えば以下を参照されたい: Jones et al., *Nature*, 321: 522(1986); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534(1988); Kabat et al., *J. Immunol.*, 147: 1709(1991); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029(1989); Gorman et al., Proc. Nat

10

20

30

40

50

l. Acad. Sci. USA, 88: 34181(1991); Hodgson et al., Bio/Technology 9: 421(1991))。本明細書で用いられる“ヒト化抗体”という用語は、非ヒトドナー抗体の重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン中のCDRアミノ酸および選択した他のアミノ酸がヒト抗体の等価なアミノ酸に代替されている抗体分子を指す。したがって、ヒト化抗体はヒトの抗体と密接に類似するがドナー抗体の結合能力を有する。

また別の選択肢では、前記抗体は、2つの異なる抗原結合ドメインを有し、各ドメインは異なるエピトープに誘導される“二重特異性”抗体であってもよい。

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

10

上記の技術によって作製された抗体は (ポリクローナルであれモノクローナルであれ)、免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で試薬として用いることができるというさらに別の有用性を有する。前記の利用では、これら抗体は分析的に検出可能な試薬 (例えば放射性同位元素、蛍光分子または酵素) で標識することができる。

【0028】

20

本発明の第二および第三の特徴の好ましい核酸分子は、配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10、配列番号: 12、配列番号: 14、配列番号: 16、配列番号: 24、配列番号: 26、配列番号: 28、配列番号: 30、配列番号: 32、配列番号: 34、配列番号: 38、配列番号: 40、配列番号: 42、配列番号: 44、配列番号: 46および配列番号: 48に記載のポリペプチド配列及び機能的に等価なポリペプチドをコードするものである。これら核酸分子を本明細書に記載した方法および用例で用いることができる。本発明の核酸分子は、好ましくは本明細書に開示した配列に由来する少なくともn個の連続するヌクレオチドを含み、この場合、前記個々の配列に応じてnは10またはそれより大きい (例えば12、14、15、18、20、25、30、35、40またはそれより大きい)。

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

30

本発明の核酸分子は、RNA (例えばmRNA)、またはDNA (例えばcDNA、合成DNAまたはゲノムDNAを含む) の形態をとることができる。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学合成によって、またはそれらを併用して得ることができる。前記核酸分子は、固相ホスホルアミダイト化学合成のような技術を用いるゲノムまたはcDNAライブラリーからの化学合成によって、または生物体から分離することによって調製することができる。RNA分子は一般的にはDNA配列のin vitroまたはin vivo転写によって作製することができる。

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

40

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

【0029】

配列番号: 2のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号: 1に示した核酸分子の

50

コード配列と同一であろう。配列番号：4のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：3に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：6のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：5に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：8のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：7に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：10のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：9に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：12のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：11に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：14のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：13に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：16のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：15に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：24のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：23に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：26のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：25に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：28のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：27に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：30のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：29に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：32のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：31に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：34のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：33に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：38のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：37に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：40のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：39に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：42のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：41に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：44のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：43に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：46のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：45に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：48のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：47に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。これらの分子はまた、遺伝コードの縮退の結果として、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46および配列番号：48のポリペプチドをコードする配列と異なる配列を有することもできる。そのような核酸分子には、それだけで成熟なポリペプチドのためのコード配列；成熟ポリペプチドのためのコード配列および付加コード配列（例えばリーダー配列または分泌配列をコードするもの）、例えばプロ-、プレ-またはプレプロ-ポリペプチド配列をコードするもの；前述の付加的コード配列を伴う、または伴わないが、さらに付加的な非コード配列（非コード5'および3'配列を含む）を伴う成熟ポリペプチドのコード配列が含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記の非コード5'および3'配列は、例えば転写される非翻訳配列で、転写（終止シグナルを含む）、リボソーム結合およびmRNA安定性において役割を果たすものである。前記核酸分子は、更なる官能性を提供するアミノ酸のような付加アミノ酸をコードする付加配列を含むこともできる。

【0030】

本発明の第二および第三の特徴の核酸分子は、本発明の第一の特徴のポリペプチドのフラグメントまたは機能的等価物およびそのフラグメントもコードし得る。そのような核酸分子は、天然に存在する変種（例えば天然に存在する対立形質変種）であっても、または前記分子は天然に存在することが知られていない変種であってもよい。前記のような天然に存在しない核酸分子の変種は、突然変異誘発技術（核酸分子、細胞または生物に対して適用される技術が含まれる）によって達成できる。

このような変種の中では、特にヌクレオチドの置換、欠失または挿入によって前述の核酸分子と異なる変種が挙げられる。置換、欠失または挿入は1つまたは2つ以上のヌクレオチドを含むことができる。変種はコード領域または非コード領域またはその両方が変化

していてもよい。コード領域における変化は、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失または挿入をもたらす得る。

本発明の核酸分子はまた、多様な理由で、遺伝子生成物（ポリペプチド）のクローニング、プロセッシングおよび/または発現の改変を含む当技術分野で一般的に知られている方法を用いて操作され得る。ランダムフラグメント化によるDNAシャッフリングおよび遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドのPCRリアッセムブリーは、ヌクレオチド配列の操作に用いられ得る技術に含まれる。位置特異的突然変異誘発を用いて、新規な制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変化、スプライシング変種の生成、変異の導入など、その他を行うことができる。

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする核酸分子は異種配列に連結され、それによって結合核酸分子が融合タンパク質をコードすることができるようにしてもよい。前記のような結合核酸分子は本発明の第二または第三の特徴に包含される。例えば、本発明のポリペプチドの阻害物質のためのペプチドライブラリーをスクリーニングするために、前記のような結合核酸分子を用いて、市販の抗体によって認識される融合タンパク質を発現させることは有用であろう。融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチド配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作し、それによって前記ポリペプチドを異種タンパク質から切り離して精製することができるようにしてもよい。

本発明の核酸分子にはまた本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と部分的に相補的であり、したがってコード核酸分子とハイブリダイズする（ハイブリダイゼーション）アンチセンス分子が含まれる。そのようなアンチセンス分子（例えばオリゴヌクレオチド）は、当業者にはよく知られるように、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、その標的核酸と特異的に結合してその転写を妨げるようにデザインすることができる（例えば以下の文献を参照されたい：J.S. Cohen, Trends in Pharm. Sci., 10: 435(1989); J. Okano, Neurochem. 56: 560(1991); J. O' Connor, Neurochem. 56: 560(1991); Lee et al., Nucleic Acids Res. 6: 3073(1979); Cooney et al., Science 241: 456(1988); Dervan et al., Science 251: 1360(1991)）。

【0031】

本明細書で用いられる“ハイブリダイゼーション”という用語は、2つの核酸分子が水素結合によって互いに結合することを指す。典型的には、1つの分子が固相支持体に固定され、他方は溶液中で遊離しているであろう。続いて2つの分子を水素結合に適した条件下で互いに接触させる。前記結合に影響する因子には以下が含まれる：溶媒の種類および体積；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液相分子の固相支持体への非特異的結合を妨害する薬剤（デンハルト試薬、またはBLOTTO）；分子の濃度；分子の結合速度を増加させる化合物の使用（硫酸デキストランまたはポリエチレングリコール）；およびハイブリダイゼーションに続く洗浄条件のストリンジェンシー（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。

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

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の結合よりも非常に類似した分子の結合に適したハイブリダイゼーション反応の条件を指す。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、以下を含む溶液（50%のホルムアミド、5倍のSSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5倍のデンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/mLの変性せん断サケ精子DNA）中で42℃で一晩インキュベーションし、続いてフィルターを0.1倍のSSCで約65℃で洗浄すると定義される。低ストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーション反応が35℃で実施されることを含む（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。好ましくは、ハイブリダイゼーションに用

10

20

30

40

50

いられる条件は高ストリンジェンシーを構成するものである。

【0032】

本発明のこの特徴の好ましい態様は、INSP032ポリペプチド（配列番号：2および配列番号：4の組み合わせ、配列番号：6と等価）、INSP033ポリペプチド（配列番号：8）、INSP034ポリペプチド（配列番号：10、配列番号：12および配列番号：14の組み合わせ、配列番号：16と等価）、INSP036ポリペプチド（配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30および配列番号：32の組み合わせ、配列番号：34と等価）、及びINSP038ポリペプチド（配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44および配列番号：46の組み合わせ、配列番号：48と等価）をコードする核酸分子およびそのような核酸分子と実質的に相補的な核酸分子とその全長にわたって少なくとも70%同一である核酸分子である。好ましくは、本発明のこの特徴の核酸分子は、配列番号：1および配列番号：3を組み合わせることによって生じる配列を有する核酸分子（配列番号：5と等価）又は配列番号：7又は配列番号：9、配列番号：11および配列番号：13を組み合わせることによって生じる配列を有する核酸分子（配列番号：15と等価）又は配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29および配列番号：31を組み合わせることによって生じる配列を有する核酸分子（配列番号：33と等価）又は配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43および配列番号：45を組み合わせることによって生じる配列を有する核酸分子（配列番号：47と等価）またはそれらと相補的な核酸分子とその全長にわたって少なくとも80%同一の領域を含む。これに関しては、前記とその全長にわたって少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%または99%同一の核酸分子が好ましい。この特徴の好ましい態様は、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を実質的に保持するポリペプチドをコードする核酸分子である。

10

20

【0033】

本発明はまた、以下の工程を含む、本発明の核酸分子を検出する方法を提供する：（a）二重鎖を形成するハイブリダイゼーション条件下で本発明の核酸プローブを生物学的サンプルと接触させる工程；および（b）形成された前記の全ての二重鎖を検出する工程。

本発明にしたがって利用することができるアッセイに関連して下記でさらに考察するように、上記で述べた核酸分子をRNA、cDNAまたはゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして用い、INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドをコードする完全長のcDNAおよびゲノムクローンを単離し、さらに前記ポリペプチドをコードする遺伝子と高い配列類似性を有する相同遺伝子またはオーソログ遺伝子のcDNAまたはゲノムクローンを単離することができる。

30

これに関しては、当技術分野で公知の他の技術の中で特に以下の技術を利用することができる。これらの技術は例示として下記で考察される。DNAのシーケンシングおよび解析のための方法は周知で、当技術分野では一般的に利用可能であり、本明細書で考察される本発明の態様の多くを実施するために実際に用いることができる。そのような方法では、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント、シークエナーゼ（US Biochemical Corp., Cleveland, OH）、Taqポリメラーゼ（Perkin Elmer）、耐熱性T7ポリメラーゼ（Amersham, Chicago, IL）、またはポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼの組合せ（例えば市販（Gibco/BRL, Gaithersburg, MD）のELONGASE増幅キットで見出されるようなもの）のよう

40

【0034】

INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及びINSP038ポリペプチドの機能と等価な機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法の1つは、当技術分野で知られている標準的な方法を用いる、天然のプローブまたは人工的にデザインしたプローブによ

50

るゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーの探索である(例えば以下の文献を参照されたい: "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992)。特に有用なプローブは、適切なコード遺伝子(配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45及び配列番号:47)に由来する核酸配列に一致するか、または前記配列と相補的である、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、さらに好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプローブである。前記のようなプローブは分析的検出が可能な試薬で標識して前記プローブの識別を容易にすることができ、有用な試薬には、放射性同位元素、蛍光色素、および検出可能な生成物の形成を触媒し得る酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプローブを用いて、当業者は、ヒト、哺乳類または他の動物供給源から対象のタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNAまたはRNAポリヌクレオチドの相補的なコピーを単離し、近縁配列、例えば前記のファミリー、タイプおよび/またはサブタイプに属するまた別のメンバーについて、前記の供給源をスクリーニングすることができるであろう。

10

【0035】

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

20

30

【0036】

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

40

本発明のある態様では、染色体上の位置特定のために本発明の核酸分子を用いることができる。この技術では、核酸分子は個々のヒト染色体上の特定の位置に対して特異的に標的化され、個々のヒト染色体上の特定の位置にハイブリダイズさせることができる。本発明の関連配列の染色体上へのマッピングは、遺伝子関連疾患に関する配列の相関性確認において重要な工程である。いったん染色体の正確な位置に配列がマッピングされたら、前

50

記配列の染色体上の物理的な位置を遺伝子地図データと相関させることができる。そのようなデータは、例えば以下で見出すことができる：V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (ジョーンズホプキンス大学、ウェルチ医学図書館を通じてオンラインで入手可能である)。同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関係を、次に連鎖解析(物理的に近接する遺伝子の同時遺伝(coinheritance))によって同定する。これにより、ポジショナルクローニングまたは他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を検索する研究者に貴重な情報が提供される。いったん疾患または症候群の位置が遺伝連鎖によって特定のゲノム領域で大まかに限局されたら、前記領域にマッピングされるいずれの配列も、更なる解析のための関連または調節遺伝子となることができる。前記核酸分子はまた、正常な個体、キャリア個体または罹患個体間で転座、逆位などによる染色体位置上の相違を検出するために用いることができる。

10

【0037】

本発明の核酸分子はまた組織分布同定(tissue localisation)のために貴重である。そのような技術は、ポリペプチドをコードするmRNAの検出によって組織中の前記ポリペプチドの発現パターンの決定を可能にする。これらの技術にはin situハイブリダイゼーション技術およびヌクレオチド増幅技術(例えばPCR)が含まれる。これらの研究から得られる結果は、生物内での前記ポリペプチドの正常な機能を示唆する。さらに、変異遺伝子によってコードされるmRNAの発現パターンと正常mRNA発現パターンとの比較研究によって、変異ポリペプチドの疾患における役割に対する貴重な洞察が提供される。そのような不適切な発現は時間的、位置的または量的性質を有する場合もある。

20

【0038】

本発明のベクターは本発明の核酸分子を含み、クローニングベクターでも発現ベクターでもよい。本発明のベクターで形質転換、トランスフェクトまたは形質導入され得る本発明の宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。

本発明のポリペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中の前記ポリペプチドをコードする核酸分子の発現によってリコンビナント形態で調製することができる。前記のような発現方法は当業者によく知られており、以下の文献により詳細に記述され得る：Sambrook et al. (上掲書) および Fernandez & Hoeffler (1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression", Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto)。

30

【0039】

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを生成させるために核酸分子の維持、増殖または発現に適したいずれの系またはベクターも用いることができる。周知であり日常的である種々の技術のいずれによっても(例えば前掲書(Sambrook et al.)に記載されたようなもの)、適切なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。一般的には、コード遺伝子は制御エレメント(例えばプロモーター、リボソーム結合部位(細菌での発現の場合)、および場合によってオペレーター)の制御下に置かれ、それによって所望のポリペプチドをコードするDNA配列を形質転換宿主細胞でRNAに転写させることができる。

適切な発現系の例には、例えば染色体系、エピソーム系およびウイルス由来系、例えば以下に由来するベクターが含まれる：細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポパウイルス(例えばSV40)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス、または上記の組合せ、例えばプラスミドとバクテリオファージの遺伝子エレメントに由来するもの(例えばコスミドおよびファージミドを含む)。ヒト人工染色体(HAC)もまた、プラスミドに包含させ発現させるよりも大きいDNAフラグメントを搬送するために用いることができる。

40

【0040】

特に適切な発現系には、リコンビナントバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された微生物(例えば細菌)；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞

50

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）または細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が含まれる。無細胞翻訳系もまた本発明のポリペプチドの生成に用いることができる。

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の宿主細胞への導入は、多くの標準的な実験室マニュアル（例えば、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および上掲書（Sambrook et al.））に記載された方法によって達成できる。特に適切な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン仲介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、陽イオン脂質仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、擦過ローディング（scrape loading）、弾道導入または感染が含まれる（以下を参照されたい：Sambrook et al. (1989) 上掲書；Ausbel et al. (1991) 上掲書；Spector, Goldman & Leinward, (1998)）。真核細胞では、発現系は、その系の要求に応じて一過性（例えば、エピソード性）又は永続的（染色体組込み）であり得る。

10

20

30

40

50

【0041】

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

コントロール配列の他に、宿主細胞の増殖に関連して前記ポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが望ましい場合がある。調節配列の例は、化学的または物理的刺激（調節化合物の存在を含む）または多様な温度もしくは代謝条件に应答して遺伝子の発現を増加させたり低下させたりする配列である。調節配列は、ベクターの非翻訳領域、例えばエンハンサー、プロモーター並びに5'および3'非翻訳領域である。これらは、宿主細胞タンパク質と相互作用して、転写および翻訳を実行する。そのような調節配列は、その強さおよび特異性を変化させることができる。用いられるベクター系および宿主に依存して、多くの適切な転写および翻訳エレメント（構成性および誘発性プロモーターを含む）を用いることができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、誘発性プロモーター、例えばBluescriptファージミド（Stratagene, La Jolla, CA）またはpSport 1（商標）プラスミド（Gibco BRL）などのハイブリッドlacZプロモーターを用いることができる。バキュロウイルスポリヘドリン(polyhedrin)プロモーターは昆虫細胞で用いることができる。植物細胞ゲノムに由来するプロモーター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に由来する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）は、ベクターへクローニングすることができる。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子由来または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。配列の多数コピーを含む細胞株の作製が必要な場合、SV40またはEBVをベースにしたベクターを適切な選択マーカーとともに用いることができる。

【0042】

発現ベクターは、特定の核酸コード配列を適切な調節配列とともにベクター内に配置させることができるように構築される。前記コード配列の調節配列に関する位置および向きは、前記コード配列が調節配列の“制御下”で転写されるような位置および向きである（すなわちコントロール配列にてDNA分子と結合するRNAポリメラーゼは前記コード配列を転写する）。いくつかの事例では、前記配列を適切な向きで制御配列に付属させることができるように（すなわちリーディングフレームを維持するために）、前記配列を改変する必要があるであろう。

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

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

【0043】

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

バキュロウイルス系では、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料は、特にインビトロジェン(Invitrogen, San Diego, CA)からキットの形態で(“MaxBac”キット)商業的に入手可能である。前記の技術は一般的に当業者に知られており、文献には完全に記載されている(Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555(1987))。この系での使用に特に適切な宿主細胞には昆虫細胞、例えばドロソフィラ(Drosophila)S2およびスポドプテラ(Spodoptera)Sf9細胞が含まれる。

当技術分野で公知である多くの植物細胞培養および植物体(whole plant)遺伝子発現系が存在する。適切な植物細胞遺伝子発現系の例には米国特許第5,693,506号、5,659,122号および5,608,143号に記載されたものが含まれる。植物細胞培養における遺伝子発現の別の例は、文献に記載されている(Zenk (1991) Phytochemistry 30: 3861 - 3863)。

特に、プロトプラストを単離し、これを培養して完全な再生植物を形成することが可能な植物は全て利用することができ、それによって移入遺伝子を含む完全な植物が回収される。特に、サトウキビ、サトウダイコン、綿花、果実および他の樹木、マメ類および野菜の主要な種の全てを含む(ただしこれらに限定されない)全ての植物は、培養細胞または組織から再生させることができる。

【0044】

特に好ましい細菌宿主細胞の例には連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌(E. coli)、ストレプトマイセスおよびバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)細胞が含まれる。

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

形質転換細胞株の回収に用いることができる多くの選択系は、当技術分野で公知である。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(M. Wigler et al.(1977) Cell 11: 223 - 32)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(I. Lowy et al.(1980) Cell 22: 817 - 23)の遺伝子が含まれ、前記はそれぞれtk-またはaprt±細胞で用いることができる。

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

【0045】

10

20

30

40

50

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

あるいは、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、前記ポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者に知られている多様な方法で同定することができる。前記方法には、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バイオアッセイ、例えば蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) またはイムノアッセイ技術 (例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) および放射性イムノアッセイ (RIA)) が含まれ (ただしこれらに限定されない)、核酸またはタンパク質の検出および/または定量的のためのメンブレン、溶液またはチップをベースとする技術が含まれる (例えば以下を参照されたい: R. Hampton et al. (1990) *Serological Methods, A Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN; および D.E. Maddox et al. (1983) *J. Exp. Med.* 158: 1211 - 1216)。

【0046】

多様な標識および結合技術が当業者に知られており、種々の核酸およびアミノ酸アッセイで用いることができる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関連する配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブの作製手段には、標識したポリヌクレオチドを用いるオリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識またはPCR増幅が含まれる。あるいは、本発明のポリペプチドをコードする配列をベクターにクローニングしてmRNAプローブを作製することができる。そのようなベクターは当技術分野で公知で、商業的に入手可能であり、適切なRNAポリメラーゼ (例えばT7、T3またはSP6) および標識ヌクレオチドを添加することにより *in vitro* でRNAプローブを合成することに用いることができる。これらの方法は、種々の市販キット (Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, MI); Promega (Madison, WI); U.S. Biochemical Corp., (Cleveland, OH)) を用いて実施することができる。

適切なレポーター分子または標識 (前記は検出を容易にするために用いることができる) には、放射性核種、酵素および蛍光、化学発光または色素生産性物質の他に基質、コファクター、阻害剤、磁性粒子などが含まれる。

【0047】

本発明の核酸分子はまたトランスジェニック動物 (特にげっ歯類動物) の作製に用いることができる。そのようなトランスジェニック動物は本発明の別の特徴を構成する。これは、体細胞の改変によって局部的に、または遺伝性改変を導入する生殖細胞系列療法によって実施することができる。前記のようなトランスジェニック動物は、本発明のポリペプチドのモジュレーターとして有効な薬剤分子のための動物モデルを作製するために特に有用であろう。

ポリペプチドは、周知の方法によってリコンビナント細胞培養物から回収し精製することができる。前記周知の方法には、硫酸またはエタノール沈澱、酸性抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸化セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーが含まれる。高性能液体クロマトグラフィーは、精製に特に有用である。単離および精製の間ポリペプチドが変性した場合には、タンパク質のリフォールディングのためによく知られている技術を用いて活性化コンフォメーションを再生することができる。

【0048】

所望の場合には、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に本発明のポリペプチドをコードする配列を連結させることにより特殊化したベクター構築物も、タンパク質の精製を容易にするために用いることができる

10

20

30

40

50

。そのような精製促進ドメインの例には、金属キレートペプチド（例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製システム（Immunex Corp., Seattle, WA）で用いられるドメイン）が含まれる。切断可能なリンカー配列（例えばXA因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego, CA）に特異的なもの）を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に包含させて、精製を容易にすることに用いてもよい。そのような発現ベクターの1つは、チオレドキシシンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行するいくつかのヒスチジン残基と融合させた本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。ヒスチジン残基は、IMAC（固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー；J. Porath et al.(1992) Prot. Exp. Purif. 3: 263 - 281）により精製を容易にし、一方、チオレドキシシンまたはエンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質からポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターについての考察は以下で提供される：D.J. Kroll et al.(1993) DNA Cell Biol. 12: 441 - 453）。

10

【0049】

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

20

本発明のポリペプチドを用いて、種々の薬剤スクリーニング技術のいずれかで化合物ライブラリーをスクリーニングすることができる。そのような化合物は、本発明のポリペプチドの遺伝子発現レベルまたは活性レベルを活性化させ（アゴニスト作用）、または阻害する（アンタゴニスト作用）ことができる。それらは本発明のさらなる特徴を形成する。好ましい化合物は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させることに有効であるか、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節することに有効である。

アゴニスト化合物またはアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーまたは天然生成物の混合物から単離することができる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは天然または改変された基質、リガンド、酵素、レセプターまたは構造的もしくは機能的模倣物質であってよい。前記のスクリーニング技術の適切な概論のためには以下を参照されたい：Coligan et al.(1991) Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5。

30

【0050】

おそらく良好なアンタゴニストと考えられる化合物は、本発明のポリペプチドと結合し、結合したときに前記ポリペプチドの生物学的作用を誘発しない分子である。潜在的なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドと結合し、それによって本発明のポリペプチドの活性を阻害または消滅させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。そのようなやり方で、前記ポリペプチドと正常な細胞の結合分子との結合が阻害され、その結果前記ポリペプチドの正常な生物学的活性が阻害され得る。

40

このようなスクリーニング技術で用いられる本発明のポリペプチドは溶液中で遊離していても、固相支持体に固定されていても、細胞表面に保持されていても、または細胞内に位置していてもよい。一般に、このようなスクリーニングの方法は、前記のポリペプチドを発現している適切な細胞または細胞膜を用いることを含み、前記細胞または細胞膜をテスト化合物と接触させて、結合または機能的な応答の刺激もしくは阻害を観察する。続いて前記テスト化合物と接触させた細胞の機能的応答を、前記テスト化合物と接触させなかったコントロール細胞と比較する。前記のようなアッセイによって、テスト化合物が前記ポリペプチドの活性化によって発生するシグナルをもたらすか否かを、適切な検出系を用

50

いて評価する。活性化の阻害剤は、一般的には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、テスト化合物の存在下でアゴニストによる活性化の影響が観察される。

【0051】

本発明のポリペプチドは、種々の生理学的及び病理学的方法を調整してもよい。従って、これらのポリペプチドの生物学的活性は、種々の適したアッセイを用いて、そのような調節性の活性の研究を可能にするシステムにおいて調べることができる。

例えば、そのようなアッセイとしては、これに限定されないが、Nagata S & Fukunaga, R Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor, Prog Growth Factor Res. 1991;3(2):131-41に記載されるアッセイが挙げられる。4 - ヘリックスバンドルサイトカイン機能、従ってINSP033の機能を決定するための以下の文献も参照されたい; Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex, Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1):1-6. Review; Hudson KR et al., Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. J Biol Chem. 1996 May 17;271(20):11971-8; Park H et al., Identification of functionally important residues of human thrombopoietin. J Biol Chem. 1998 Jan 2;273(1):256-61; Panayotatos N, et al., Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines. J Biol Chem. 1995 Jun 9;270(23):14007-14; Lu CM, et al., Increasing bioactivity of flt3 ligand by fusing two identical soluble domains, Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2002 Nov;34(6):697-702; Vigano P, et al., Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium J Clin Endocrinol Metab. 2002 Dec; 87(12):5730-6。さらに、顆粒球コロニー刺激因子は、骨髄前駆細胞集団の増殖及び分化を調節する造血成長因子の1つである。従って、活性は、骨髄前駆細胞増殖を測定することによって評価できる。

10

20

【0052】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト化合物を同定する好ましい方法は以下の工程を含む:

(a) 本発明の第一の特徴のポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合にตอบสนองして検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されており; さらに

30

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

【0053】

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

(a) 前記ポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合にตอบสนองして検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されており; さらに

40

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

さらに好ましい態様では、上記に述べた一般的な方法はさらに、前記ポリペプチドに対する標識または非標識リガンドの存在下でアゴニストまたはアンタゴニストの同定を実施する工程を含むことができる。

【0054】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法のまた別の態

50

様は以下の工程を含む：

本発明のポリペプチドをその表面に有する細胞とリガンドとの結合または前記のポリペプチドを含む細胞膜とリガンドとの結合の抑制を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で候補化合物の存在下で決定し、さらに前記ポリペプチドに結合したリガンドの量を決定する。リガンドの結合の減少をひき起こすことができる化合物はアゴニストまたはアンタゴニストであると考えられる。好ましくは前記リガンドは標識される。

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

(a) 本発明のポリペプチドをその表面に発現している全細胞または本発明のポリペプチドを含む細胞膜と標識リガンドをインキュベートする工程；

10

(b) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 工程(a)の標識リガンドおよび前記全細胞または細胞膜の混合物に候補化合物を添加し、前記混合物を平衡化させる工程；

(d) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を工程(c)の後で測定する工程；さらに

(e) 工程(b)および工程(d)で結合した標識リガンドの相違を比較する工程であって、それにより工程(d)結合の減少をひき起こす化合物はアゴニストまたはアンタゴニストであるとする前記工程。

【0055】

前記ポリペプチドは、上記のアッセイにおいて用量依存態様で多様な生理学および病理学的プロセスを調節することが判明するであろう。したがって、本発明の“機能的等価物”には、上記アッセイにおいて用量依存態様で同じ調節性活性のいずれかを示すポリペプチドが含まれる。用量依活性の程度は本発明のポリペプチドのそれと同一である必要はないが、好ましくは前記“機能的等価物”は、与えられた活性のアッセイにおいて本発明のポリペプチドと比較して実質的に類似の用量依存性を示すであろう。

20

上記に述べた態様のある場合には単純な結合アッセイを用いてもよい。この場合、テスト化合物のポリペプチド保持表面への付着が直接または間接的にテスト化合物と結合させた標識手段によって検出されるか、または標識競合物質との競合を含むアッセイで検出される。別の態様では、競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この場合、ポリペプチドと特異的に結合することができる中和抗体がテスト化合物と結合について競合する。このようにして、前記抗体を用いて前記ポリペプチドに対して特異的な結合親和性を保有する一切のテスト化合物の存在を検出することができる。

30

【0056】

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

40

さらにまた本発明の条項内に含まれるアッセイ方法は、過剰発現アッセイまたは除去アッセイで本発明の遺伝子およびポリペプチドの使用を必要とするものである。前記のアッセイは、これら遺伝子/ポリペプチドの細胞内レベルの操作およびこの操作による前記被操作細胞の生理に対する影響の評価を含む。例えばそのような実験によって、個々の遺伝子/ポリペプチドが関与するシグナリング経路および代謝経路の詳細が明らかにされ、本研究対象のポリペプチドが相互作用するポリペプチドの正体に関する情報が作製され、さらに関連遺伝子およびタンパク質を調節する方法についての手がかりが提供される。

【0057】

使用され得る薬剤スクリーニングのための別の技術は、対象のポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物の高速大量処理スクリーニングを提供する(国際特許出願

50

W084/03564を参照されたい)。前記方法では、多数の異なる小型のテスト化合物が固相基質上で合成され、次に本発明のポリペプチドと反応させられ洗浄され得る。ポリペプチドを固定する方法の1つは非中和抗体を使用することである。続いて、当技術分野で周知の方法を用いて結合ポリペプチドを検出することができる。精製ポリペプチドはまた、前述の薬剤スクリーニング技術で使用するためにプレートに直接被覆させることができる。

本発明のポリペプチドを用いて、膜結合レセプターまたは可溶性レセプターを当技術分野で公知の標準的なレセプター結合技術により同定することができる。前記標準的な技術は、例えばリガンド結合アッセイおよび架橋アッセイであり、そのようなアッセイでは、ポリペプチドは放射性同位体で標識されているか、化学的に改変されているか、またはその検出もしくは精製を容易にするペプチド配列と融合されており、推定上のレセプター供給源（例えば細胞の組成物、細胞膜、細胞上清、組織抽出物または体液）とインキュベートされる。結合有効性は、生物物理的技術、例えば表面プラズモン共鳴および分光法を用いて測定することができる。結合アッセイは、レセプターの精製およびクローニングのために用いることができるが、ポリペプチドとそのレセプターとの結合に競合する前記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためにも用いることができる。スクリーニングアッセイを実施する標準的方法は当技術分野ではよく理解されている。

10

【0058】

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

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

20

本発明はまた、本発明のポリペプチド、核酸、リガンドまたは化合物とともに適切な医薬担体を含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、下記で詳細に説明するように、治療用もしくは診断用試薬として、ワクチンとして、または他の免疫原性組成物として適切であり得る。

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

30

【0059】

本医薬組成物は、好ましくは治療的に有効な量の本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物を含むべきである。本明細書で用いられる“治療的に有効な量”という用語は、標的疾患または症状を治療、緩和もしくは予防するために、または検出可能な治療効果もしくは予防効果を示すために必要な治療薬剤の量を指す。いずれの化合物についても、治療的に有効な投与量は、最初に細胞培養アッセイ（例えば新生物細胞培養アッセイ）または動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌまたはブタ）のいずれかで見積もることができる。動物モデルは、適切な濃度範囲および投与経路の決定にも用いることができる。次にそのような情報を用いて、ヒトで有用な投与量および投与経路を決定することができる。

40

ヒト対象者に対する正確な有効量は、疾患状態の重篤度、対象者の全身の健康状態、対象者の年齢、体重および性別、食事、投与時間および投与回数、併用薬剤、反応感受性および治療に対する許容性/応答性に依存するであろう。前記の量は日常的検査により決定でき、それは臨床医の判断の範囲内であろう。一般には有効用量は0.01mg/kgから50mg/kg、好ましくは0.05mg/kgから10mg/kgであろう。本組成物は個別にまたは他の薬剤、医薬品またはホルモンと一緒に患者に投与することができる。

【0060】

医薬組成物はまた、治療薬の投与のために医薬的に許容できる担体を含むことができる。そのような担体には、抗体および他のポリペプチド、遺伝子並びに他の治療薬剤（例え

50

バリポソーム)が含まれるが、ただし担体はそれ自体で前記組成物を投与される個体に有害な抗体の産生を誘発せず、さらに不都合な毒性をもたらすことなく投与されることを条件とする。適切な担体は大型でゆっくりと代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子であり得る。

それらの中には医薬的に許容できる塩、例えば鉍酸塩(塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような);および有機酸の塩(酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などのような)を用いることができる。医薬的に許容できる担体についての綿密な考察は以下のテキストで入手可能である: Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)。

治療用組成物中の医薬的に許容できる担体は、さらに液体、例えば水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールを含むことができる。さらに、助剤(例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質など)が前記組成物中に存在してもよい。そのような担体は、患者が摂取できるように前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などとして製剤化することを可能にする。

【0061】

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

本発明で用いられる医薬組成物は、多数の経路(経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜下腔内、心室内、経皮適用(例えばW098/20734を参照)、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内または直腸的手段が含まれるが、ただしこれらに限定されない)によって投与できる。遺伝子銃またはハイポスプレーもまた、本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。典型的には、本治療用組成物は、注射用物質(液体溶液または懸濁剤のいずれか)として調製できる。注射前に液体賦形剤中で溶液または懸濁剤とするために適した固体を調製することもできる。

本組成物の直接的デリバリーは一般に、皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内に注射によって達成されるか、または組織の間隙腔に搬送されるであろう。前記組成物はまた、病巣に投与してもよい。投薬治療は単回投与スケジュールでも複数回投与スケジュールでもよい。

本発明のポリペプチドの活性が特定の疾患状態で過剰である場合には、いくつかのアプローチが利用可能である。あるアプローチは、医薬的に許容できる担体とともに上記のような阻害化合物(アンタゴニスト)を、前記ポリペプチドの機能阻害に有効な量で対象者に投与することを含む(前記化合物による前記機能阻害は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を遮断するか、または第二のシグナルを阻害し、それによって異常な症状を緩和することによって達成される)。好ましくは、前記アンタゴニストは抗体である。最も好ましくは、そのような抗体は、先に記載したようなその免疫原性を最少にするキメラ抗体および/またはヒト化抗体である。

【0062】

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

また別のアプローチでは、前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、発現遮断技術を用いて、例えば内部で生成されるかまたは別々に投与されるアンチセンス核酸分子を使用して(上記で述べたように)阻害することができる。遺伝子発現の改変は、ポリペプチドをコードする遺伝子の制御領域、5'領域または調節領域(シグナル配列、プロモーター、エンハンサーおよびイントロン)に対して相補的な配列またはアンチセンス分子(DNA、RNAまたはPNA)をデザインすることによって達成できる。同様に、阻害は“三重らせん”塩基対方法論を用いて達成することができる。三重らせん対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために二重らせんが充分に開く能力を阻害することから有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている(J.E. Ge

10

20

30

40

50

e et al.(1994) In: B.E. Huber & B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY)。相補的配列またはアンチセンス分子をデザインし、リボソームに対する結合を妨げて転写を妨害することによってmRNAの翻訳を遮断することもできる。そのようなオリゴヌクレオチドは投与されてもよいし、またin vivoでの発現によりin situで生成させてもよい。

【0063】

さらに、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げることができる。リボザイムは、天然または合成であり得る触媒的活性型のRNAである(例えば以下を参照されたい: N. Usman et al., Curr. Opin. Struct. Biol.(1996) 6(4): 527 - 533)。合成リボザイムをデザインして、選択した位置でmRNAを特異的に切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を妨げることができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるような天然のリン酸リボース骨格および天然の塩基から合成することができる。或いは、リボザイムは、非天然の骨格(例えば2'-O-メチルRNA)を用いて合成して、リボヌクレアーゼ分解から保護することができる。これらは改変塩基を含んでいてもよい。

RNA分子は細胞内安定性および半減期を増加させるために改変することができる。可能な改変には、RNA分子の5'および/または3'末端へのフランキング配列の付加、または分子の骨格内でホスホジエステル結合に代わるホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限定されない。この概念はPNAの生成にも受け継がれ、さらに非慣用塩基(例えばイノシン、ケオシン(gueosine)およびブトシン(butosine)(アセチル-, メチル-, チオ-も同様に)、および同様に改変された形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンで、これらは内因性エンドヌクレアーゼによって容易に認識されないようなものである)の包含によってPNA分子の全てに前記概念を広げることができる。

【0064】

本発明のポリペプチドおよびその活性の過小発現に関連する異常な状態を治療するためには、いくつかのアプローチも利用可能である。あるアプローチは、前記ポリペプチドを活性化する化合物(すなわち上記で述べたアゴニスト)の治療的に有効な量を対象者に投与し、異常な状態を緩和することを含む。あるいは、本ポリペプチドの治療量を適切な医薬担体と組合せて投与し、ポリペプチドの相対的な生理学的バランスを回復させてもよい。

遺伝子治療を用い、対象者の関連する細胞による本ポリペプチドの内因性生成を行わせることができる。遺伝子治療は、不完全な遺伝子を修正した治療用遺伝子と置き換えることによって、前記ポリペプチドの不適切な生成を永久的に治療するために用いられる。

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

治療用遺伝子は患者に投与するために典型的には“パッケージング”されている。遺伝子デリバリー賦形剤はリボソームのような非ウイルス、または、例えばK.L. Berkner (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 39 - 66に記載されたアデノウイルスのような複製欠損ウイルスまたはN. Muzyczka (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 97 - 129および米国特許第5,252,479号に記載されたアデノ付随ウイルス(AAV)ベクターであり得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、複製欠損レトロウイルスベクターで発現させるために操作を施すことができる。次にこの発現構築物を単離し、前記ポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージ細胞に導入することができる。その結果、前記パッケージ細胞は対象の遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生することができるようになる。これらのプロデューサー細胞はin vivoで細胞を操作するために、さらにin vivoでポリペプチドを発現させるために対象者に投与することができる(以下を参照されたい: Gene Therapy

and Other Molecular Genetic - based Therapeutic Approaches, Chapter 20 (およびその中に引用された文献), “ Human Molecular Genetics ” (1996) T. Strachan & A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.) 。

【 0 0 6 5 】

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

本発明のポリペプチドまたは核酸分子が疾患をひき起こす原因物質である場合には、本発明は、前記疾患をひき起こす原因物質に対する抗体を生成するワクチンとして用いることができる。

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

ポリペプチドは胃で分解されるので、ポリペプチドを含むワクチンは好ましくは非経口的に (例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射) 投与される。非経口投与に適した製剤には、水性および非水性滅菌注射溶液 (前記は抗酸化剤、緩衝剤、抗菌剤および製剤を受容者の血液に対し等張にする溶質を含むことができる) 、並びに水性および非水性滅菌懸濁剤 (前記は分散剤または粘稠剤を含むことができる) が含まれる。

【 0 0 6 6 】

本発明のワクチン製剤は単位用量または複数単位用量容器で提供されてもよい。例えば封入したアンプルおよびバイアルは、使用直前に滅菌された液状担体を添加することだけを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。投与量はワクチンの比活性に依存し、日常的な検査で容易に決定することができる。

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

診断のための核酸分子は対象者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から入手できる。ゲノムDNAを直接検出に用いてもよいし、PCR、リガーゼ連鎖反応 (LC R) 、鎖置換増幅 (SDA) または他の増幅技術を分析前に用いることによって、ゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい (以下の文献を参照されたい : Saiki et al., Nature 324 : 163 - 166(1986) ; Bej et al., Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol., 26 : 301 - 334(1991) ; Birkenmeyer et al., J. Virol. Meth., 35 : 117 - 126(1991) ; Van Brunt, J., Bio/Technology, 8 : 291 - 294(1990)) 。

【 0 0 6 7 】

ある態様では、本発明のこの特徴は、本発明のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価し、さらに前記発現レベルをコントロールのレベルと比較することを含む、患者における疾患を診断する方法を提供する (ここで前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する) 。前記方法は以下の工程を含む :

a) 本発明の核酸分子と核酸プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で、患者由来の組織サンプルを前記核酸プローブと接触させる工程 ;

b) コントロールサンプルを工程 a) で用いた条件と同じ条件下で前記プローブと接触させる工程 ; および、

10

20

30

40

50

c) 前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程；
この場合、コントロールサンプル中のハイブリッド複合体レベルと異なるハイブリッド複合体レベルが患者サンプルで検出されることは、疾患を示唆する。

本発明のさらなる特徴は、以下の工程を含む診断方法を含む：

- a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；
- b) 前記組織サンプルから本発明の核酸分子を単離する工程；および、
- c) 前記核酸分子内の疾患に付随する変異の存在を検出することによって患者を疾患について診断する工程。

【0068】

上記に記載した方法における核酸分子の検出を補助するために、増幅工程、例えばPCRの使用を含むことができる。 10

正常な遺伝子型と比較すると、増幅生成物におけるサイズの変化によって、欠失および挿入が検出される。点変異は、増幅DNAを本発明の標識RNAとハイブリダイズさせるか、あるいは本発明の標識アンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることによって同定することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によって、または溶融温度における差異を評価することによって、ミスマッチを有する二重鎖と区別することができる。DNAをストリンジェントな条件下で前記DNAとハイブリダイズする核酸プローブと接触させてハイブリッド二重鎖分子を形成させ（前記ハイブリッド二重鎖は、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分で前記核酸プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分を有する）、DNA鎖の対応する部分における疾患付随変異の有無を示すものとして、前記プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分の有無を検出することによって、患者における変異の有無を検出することができる。 20

前記のような診断は特に出生前検査で有用であり、新生児検査においてすら有用である。

【0069】

点変異、および参照遺伝子と“変異”遺伝子間で異なる他の配列は、他の周知の技術、例えば直接DNAシーケンシングまたは一本鎖構造多型性(Orita et al., Genomics, 5: 874 - 879(1989))によって同定できる。例えば、シーケンシングプライマーは、二本鎖PCR生成物または改変PCRによって作製された一本鎖テンプレート分子とともに用いることができる。配列決定は、放射能標識ヌクレオチドを用いる通常の方法によって、または蛍光タグを用いる自動シーケンシング法によって実施される。クローン化DNAセグメントを、特異的DNAセグメントを検出するためのプローブとして用いることもできる。この方法の感受性は、PCRと併用したとき極めて増強される。さらに、点変異および他の配列の変動（例えば多型性）は、例えば対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをただ1つのヌクレオチドが異なる配列のPCR増幅に用いることによって、上記のように検出することができる。 30

DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下でのゲル内のDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化によって、または直接DNAシーケンシング（例えば、Myers et al., Science (1985) 230: 1242）によって検出することができる。特定の位置における配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えばRNaseおよびS1保護）または化学切断法（Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401を参照）によって明らかにすることができる。 40

【0070】

通常ゲル電気泳動およびDNAシーケンシングの他に、ミクロ欠損、異数性、転座、逆位のような変異は、in situ分析によっても検出できる（例えば以下を参照されたい：Keller et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA(1993)）。すなわち、細胞内のDNAまたはRNA配列は、それらを単離および/またはメンブレン上に固定する必要なしに変異について分析することができる。蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)は、現在のところ最も一般的に用いられている方法で、FISHに関する多数の概論が存在する（例えば以下を参照されたい：Trachuck et al., Science, 250, 50

559-562(1990) ; および Trask et al., Trends Genet., 7, 149-154(1991)) 。

本発明の別の態様では、本発明の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築し、遺伝的変種、変異および多型性の効率的スクリーニングを実施することができる。アレイ技術方法はよく知られており汎用的に応用することができ、遺伝子発現、遺伝連鎖および遺伝的多様性を含む分子遺伝学における種々の疑問に取り組むために用いることができる(例えば以下を参照されたい: M. Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp610-613) 。

【0071】

ある態様では、前記アレイは以下の文献に記載された方法にしたがって調製され使用される(PCT出願W095/11995(Chee et al.) ; D.J. Lockhart et al.(1996) Nat. Biotech. 14: 1675 - 1680 ; M. Schena et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614 - 10619) 。

オリゴヌクレオチド対は2つから100万個を越える範囲で変動し得る。前記オリゴマーは、光誘導化学方法を用いて基板上の指定領域で合成される。基板は紙、ナイロンまたは他のタイプのメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライドもしくは他の適切な任意の固相支持体でよい。別の特徴では、オリゴヌクレオチドは、PCT特許出願(W095/251116, Baldeschweiler et al.)に記載されたように化学的結合方法およびインクジェット適用装置を用いて基板表面で合成することができる。別の特徴では、ドット(またはスロット)プロットに類似する“格子化(gridded)”アレイを用い、真空系、熱結合方法、UV結合方法、機械的または化学的結合方法を用いて基質表面にcDNAフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを配置し、連結させることができる。アレイ(例えば上記で述べたようなもの)は手動で、または利用可能な装置(スロットプロットまたはドットプロット装置)、材料(適切な固相支持体すべて)および機械(ロボット機器を含む)を用いて作製することができ、8、24、96、384、1536または6144個のオリゴヌクレオチド、または2つから100万個を越える範囲の他のいずれの数をも含むことができる(このことはアレイ自体を商業的に入手可能な計測器の有効利用に向くものとしている)。

【0072】

上記で考察した方法の他に、対象者に由来するサンプルから、ポリペプチドまたはmRNAの異常な増加または低下レベルを決定することを含む方法によって、疾患を診断することができる。発現低下または発現増加は、ポリヌクレオチドの定量のために当技術分野で周知の方法のいずれか、例えば核酸増幅(例を挙げるとPCR、RT-PCR、RNase保護、ノザンブロット法)および他のハイブリダイゼーション方法を用いてRNAレベルで測定することができる。

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

例えばELISA、RIAおよびFACSのようなポリペプチドレベルを測定するためのプロトコルは、さらにポリペプチド発現の変化レベルまたは異常レベルを診断するための基礎を提供することができる。ポリペプチド発現の正常値または標準値は、正常な哺乳類対象体(好ましくはヒト)から得られた体液または細胞抽出物を、複合体形成に適した条件下で前記ポリペプチドに対する抗体と混合することによって確立される。標準的な複合体形成量は種々の方法、例えば分光測定方法によって定量することができる。

【0073】

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

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

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

10

【0074】

本発明の診断キットは以下を含むことができる：

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

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

20

本発明の別の別の特徴では、診断キットは核酸分子のアレイを含み、前記核酸分子の1つが本発明の核酸分子であってもよい。

本発明のポリペプチドを検出するために、診断キットは以下を含むことができる：本発明のポリペプチドと結合する1つまたは2つ以上の抗体；および前記抗体とポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬。

【0075】

そのようなキットは、以下のような疾患または疾患に対する感受性を診断する場合に有用であろう：特に免疫異常、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡および多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化器系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪疫質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後消耗症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性塞栓性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、腫瘍性疾患、例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管系疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、発作、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経障害、男性不妊症、加齢および感染（マラリア原虫感染、細菌感染およびウイルス感染、特に5型ヒトヘルペスウイルス（サイトメガロウイルス）感染を含む）。、さらには特に血液病、白血球疾患（白血球減少症、薬物性白血球減少症及び白血病を含む）、骨髄移植、骨髄疾患、創傷治癒、免疫病、例えば移植片対宿主病及びクローン病、新生物疾患、黒色腫、固形癌、高脂質血症、高ホスファターゼ血症、貧血症、虚血、卒中、血管疾患、血栓症、血栓塞栓症、梗塞及び感染、特に真菌感染症及び細菌感染。

30

40

本発明の種々の特徴および態様は、特に INSP032、INSP033、INSP034、INSP036及び INSP038ポリペプチドへの言及を有する実施例を介してこれからより詳細に説明されるであろう。

細部の改変は本発明の範囲を逸脱することなく実施できることは理解されよう。

【0076】

実施例

50

実施例 1 : INSP032

配列番号 : 2および配列番号 : 4を結合させることにより得られるポリペプチド配列 (配列番号 : 6と等価) (INSP032の連続エクソンの翻訳を示す) をPDBデータベースに存在するタンパク質構造についての検索物 (query) としてインファーマティカ=ゲノムスレッダーツールで用いた。最高適合物には4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造が含まれ、その上位5つは、前記検索照会配列とのアラインメントで80%よりも大きいゲノムスレッダー信頼性を示した (図1)。図2は、INSP032検索配列と幹細胞因子 (PDB-1exz) の配列 (4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー ; Zhang et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 5;97(14):7732-7) とのアラインメントを示している。INSP032ポリペプチド配列は図2では“chrX:149”と称されることに注目されたい。分泌タンパク質の4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーは治療において重要である。

10

【0077】

実施例 2 : INSP033

配列番号 : 8aから得られるポリペプチド配列 (INSP033のエクソンの翻訳を示す) をPDBデータベースに存在するタンパク質構造についての検索物 (query) としてインファーマティカ=ゲノムスレッダーツールで用いた。最高適合物は4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造である。前記最高適合物は、前記検索照会配列とのアラインメントで50%のゲノムスレッダー信頼性を示した (図3)。図4は、INSP033検索配列と顆粒球コロニー刺激因子 (PDB-1bgc) の配列 (4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー ; Lovejoy et al, J Mol Biol. 1993 Dec 5;234(3):640-53) とのアラインメントを示している。タンパク質の4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー、特に顆粒球コロニー刺激因子ファミリーのメンバーは治療において重要である。

20

INSP033に関するさらなる実験の結果を以下に示す。INSP033は、“IPAAA24020”とも称される。

1. cDNAライブラリーのIPAAA24020のクローニング

1.1 cDNAライブラリー

ヒトcDNAライブラリー (バクテリオファージラムダ () ベクターの状態) は、StratageneもしくはClontechから購入するか、またはSerono Pharmaceutical Research Instituteで製造元 (Stratagene) のプロトコルにしたがって ZAPもしくは GT10ベクターの状態に調製した。バクテリオファージ DNAは、感染させた大腸菌宿主株の小規模培養から製造元 (Promega, Corporation, Madison WI.) の指示にしたがいWizard Lambda Preps DNA精製系を用いて調製した。使用ライブラリーおよび宿主株のリストは表Iに示されている。

30

【0078】

1.2 ファージライブラリーDNAに由来する実質上cDNAのPCR

IPAAA24020 (図5) をコードする全長仮想cDNAは、遺伝子特異的クローニングプライマー (CP1およびCP2、図5および図7) を用いて538bpのPCR増幅生成物として得られた (図6)。PCRは、以下を含む最終容積50 μ Lで以下のようにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて実施した (1XのAmpliTaq (登録商標) 緩衝液、200 μ MのdNTP、各々50ピコモルのクローニングプライマー、2.5単位のAmpliTaq (登録商標) (Perkin Elmer) および各々100ngのファージライブラリーDNA ; 94 1分 ; 94 1分、x y分および72 の40サイクル (ここでxは最低T_m - 5 で、yは生成物1kbにつき1分である) ; 続いて72 で1分の1サイクル、さらに4 のホールディングサイクル。

40

増幅生成物は、1xのTAE緩衝液 (Life Technologies) の0.8%のアガロースゲルで可視化し、予想分子量で移動したPCR生成物をWizard PCR Preps DNA精製系 (Promega) を用いてゲルから精製した。50 μ Lの滅菌水に溶出させたPCR生成物を直接サブクローニングするか、または-20 で保存した。

1.3 PCRのための遺伝子特異的クローニングプライマー

50

実質上 cDNA の完全長配列を増幅するために、プライマーデザイナーソフトウェア (Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA) を用いて 18 から 25 塩基の長さを有する PCR プライマー対をデザインした。PCR プライマーは、 55 ± 10 に近い T_m および 40 - 60% の GC 含量をもつように最適化した。標的配列 IPAAA24020 に対して高い選択性を有するプライマーを選別した (他の鋳型に対して、ほとんどまたは全く非特異的プライミングを示さない)。

【0079】

1.4 PCR 生成物のサブクローニング

PCR 生成物をトポイソメラーゼ I 改変クローニングベクター (pCR II TOP0) で、インビトロゲン社 (Invitrogen Corporation) から購入した TOP0 TA クローニングキット (それぞれ、cat. No. K4600-01 及び K4575-01) を用い製造元の特定する条件を用いてサブクローニングした。簡単に記せば、ヒト胎児腎臓ライブラリー (ライブラリーナンバー 12) 増幅に由来する $4 \mu\text{L}$ のゲル精製 PCR 生成物を、 $1 \mu\text{L}$ の TOP0 ベクターおよび $1 \mu\text{L}$ の塩溶液とともに室温で 15 分インキュベートした。続いて前記反応混合物で大腸菌株 TOP10 (Invitrogen) を以下のように形質転換した: ワンショット TOP10 細胞の $50 \mu\text{L}$ アリコート氷上で融解し、 $2 \mu\text{L}$ の TOP0 反応物を添加した。前記混合物を氷上で 15 分インキュベートし、続いて正確に 30 秒 42°C でインキュベートしてヒートショック処理した。サンプルを氷上に戻し、 $250 \mu\text{L}$ の温 SOC 媒体 (室温) を添加した。振盪しながら (220rpm) サンプルを 1 時間 37°C でインキュベートした。続いて形質転換混合物をアンピシリン ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) 含有 L-ブロス (LB) 平板に播種し、 37°C で一晩インキュベートした。cDNA 挿入物を含むアンピシリン耐性コロニーをコロニー PCR で同定した。

1.5 コロニー PCR

滅菌つま楊枝を用いてコロニーを $50 \mu\text{L}$ の滅菌水に接種した。続いて $10 \mu\text{L}$ の接種物を上記で述べたように (ただし使用したプライマー対は SP6 および T7 であった) $20 \mu\text{L}$ の全反応容積で PCR に付した。サイクリング条件は以下のとおりであった: 94°C で 2 分; 94°C 、30 秒、 47°C 、30 秒および 72°C 1 分の 30 サイクル; 72°C 、7 分の 1 サイクル。続いて更なる分析の前にサンプルを 4°C で維持した (ホールディングサイクル)。

PCR 反応生成物を $1 \times$ の TAE 緩衝液中で 1% アガロースゲルで分析した。予想される PCR 生成物サイズ (538bp の cDNA + 187bp (マルチクローニングサイトまたは MCS のため)) を示すコロニーを、アンピシリン ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 含有 L-ブロス (LB) の 5mL で振盪しながら (220rpm) 一晩 37°C で増殖させた。

1.6 プラスミド DNA の調製およびシーケンシング

Miniprep プラスミド DNA を Qiaprep Turbo9600 自動システム (Qiagen) または Wizard Plus SV Miniprep キット (Promega Cat.# 1460) を用い製造元の指示にしたがって 5mL の培養物から調製した。プラスミド DNA を $100 \mu\text{L}$ の滅菌水に溶出させた。DNA 濃度はエッペンドルフ B0 分光計を用いて測定した。BigDye Terminator システム (Applied Biosystems Cat.# 4390246) を用い製造元の指示にしたがいがながら、プラスミド DNA ($200 - 500\text{ng}$) を T7 および SP6 プライマーを用い DNA シークエンシングに付した。シーケンシング反応物を Dye-E x カラム (Qiagen) または Montage SEQ 96 クリーンアッププレート (Millipore cat.# LSKS 09624) を用いて精製し、続いて Applied Biosystems 3700 シークエンサーで分析した。

【0080】

2. HEK293/EBNA 細胞における IPAAA24020 発現用プラスミドの構築

続いて、DNA シークエンシングによって同定した IPAAA24020 の完全なコード配列 (ORF) を含むクローンを用いて、前記挿入物をゲートウェー (Gateway) (登録商標) クローニング法 (Invitrogen) により哺乳類細胞発現ベクター pEAK12d でサブクローニングした。IPAAA24020 のクローニング配列は、推定配列 (図 7) と比較して位置 50 で単一のヌクレオチド G の挿入を含む (図 6)。クローニング配列のヌクレオチド 33 で始まる停止コドンの上流にあるため、この挿入により、翻訳開始部位である可能性が高いクローニング配列の位置 48 で新しい開始コドンを生じる。新しい ORF は、最初の 6 個のアミノ酸を欠き、仮想配列のアミノ酸 7 (Asn) がクローニング配列の開始メチオニンをコードすることを除いて、IPAA

10

20

30

40

50

A24020の推定アミノ酸配列と同一の配列を有する(図8)。

【0081】

2.1 インフレーム6HISタグ配列に融合させたゲートウェー適合IPAAA24020ORFの作製

ゲートウェークローニングプロセスの第1段階は二工程PCR反応を必要とし、これによってその5'末端にattB1組換え部位およびKozak配列がフランキングし、3'末端にインフレーム6ヒスチジン(6HIS)タグをコードする配列、終止コドンおよびattB2組換え部位がフランキングするIPAAA24020のORF(ゲートウェー適合cDNA)が生成される。IPAAA26841-ロング型を作製するためには、第一のPCR反応(最終容積50 μ L)は以下を含む: 25ngのpC RII TOP0-IPAAA24022(プラスミド13122及び図9)、2 μ LのdNTP(5mM)、5 μ Lの10xのPfxポリメラーゼ緩衝液、各々0.5 μ Lの遺伝子特異的プライマー(100 μ M)(EX1(前進方向)およびEX1(逆方向))および0.5 μ LのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)。PCR反応は、95 $^{\circ}$ Cで2分の最初の变性工程、続いて94 $^{\circ}$ Cで15秒および68 $^{\circ}$ Cで30秒の12サイクルを用いて実施した。Wizard PCR prepDNA精製システム(Promega)を用いて製造元の指示にしたがって反応混合物から直接PCR生成物を精製した。第二のPCR反応(最終容積50 μ L)は以下を含んでいた: 10 μ Lの精製PCR生成物、2 μ LのdNTP(5mM)、5 μ Lの10xのPfxポリメラーゼ緩衝液、各々0.5 μ Lのゲートウェー変換プライマー(100 μ M)(GCP前進方向およびGCP逆方向)およびPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ5 μ L。第二のPCR反応の条件は以下のとおりであった: 95 $^{\circ}$ C 1分; 94 $^{\circ}$ Cで15秒、45 $^{\circ}$ Cで30秒および68 $^{\circ}$ Cで3.5分の4サイクル; および94 $^{\circ}$ C 15秒、55 $^{\circ}$ C 30秒および68 $^{\circ}$ C 3.5分の25サイクル。PCR生成物は上記のように精製した。

10

20

【0082】

2.2 ゲートウェー適合IPAAA24020のORFのゲートウェーエントリーベクターpDONR201および発現ベクターpEAK12dでのサブクローニング

ゲートウェークローニング方法の第二の工程は、以下のようなゲートウェー改変PCR生成物のゲートウェーエントリーベクターpDONR201(Invitrogen, 図10)へのサブクローニングを含む: 5 μ Lの精製PCR生成物を、1.5 μ LのpDONR201ベクター(0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのBP緩衝液および1.5 μ LのBPクロナーゼ酵素ミックス(Invitrogen)とともに室温で1時間インキュベートする。反応をプロテイナーゼK(2 μ g)の添加で停止させ、さらに10分37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。この反応の部分標本(2 μ L)で大腸菌DH10B細胞をバイオラド=ジーンパルサー(Biorad Gene Pulser)を用いて電圧ポレーションにより形質転換した。形質転換体をLB-カナマイシンプレートに播種した。得られたコロニーの1-4からプラスミドミニ-プレップDNAをPromega Wizard Mini-Prepキットから調製し、続いて1.5 μ Lのプラスミド溶出物を組換え反応に用いた。前記反応は、最終容積10 μ L中に1.5 μ LのpEAK12dベクター(図11)(0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのLR緩衝液および1.5 μ LのLRクロナーゼ(Invitrogen)を含んでいた。前記混合物を室温で1時間インキュベートし、プロテイナーゼK(2 μ g)の添加で反応を停止させ、さらに10分37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。この反応の部分標本(1 μ L)を用いて大腸菌DH10B細胞を電圧ポレーションにより形質転換した。

30

40

正確な挿入物を含むクローンを上記の記載のように(ただしpEAK12dプライマー(pEAK12d FおよびpEAK12d R)をPCRに用いた)コロニーPCRを実施して同定した。Qiaprep Turbo 9600自動化システム(Qiagen)を用いるか、またはWizard SV DNA miniprepsキット(Promega)により手動で正確な挿入物を含むクローンからプラスミドmini prep DNAを単離し、pEAK12d FおよびpEAK12d Rプライマーを用いて配列を確認した。

配列を確認した各クローンの500mL培養から、プラスミドpEAK12d-IPAAA24020-6HIS(プラスミド番号12156、図8)のCsCl勾配精製maxi-prepDNAを調製し(Sambrook J. et al., in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、滅菌水に1 μ g/ μ Lの濃度で再懸濁して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0083】

50

2.3 発現ベクターpEAK12dの構築

ベクターpEAK12dは、哺乳類細胞発現ベクターpEAK12 (Edge Biosystemsから購入) のゲートウェークローニング系適合型である。pEAK12では、問題のcDNAはヒトEF1 プロモーターの制御下で発現される。pEAK12dは下記のように作製した。

pEAK12を酵素HindIIIおよびNotIで消化し、クレノー (New England Biolabs) により平滑端にし、仔牛の腸アルカリホスファターゼ (Roche) を用いて脱リン酸化した。脱リン酸化後に、ベクターを平滑端をもつゲートウェー読み枠カセットC (ゲートウェーベクター変換系、Invitrogen cat#11828-019) に連結し (前記カセットはccdB遺伝子に側面を接するAttR組換え部位およびクロラムフェニコール耐性を含む)、大腸菌DB3.1細胞 (ccdB遺伝子を含むベクターの増殖を許容する) を形質転換させた。Wizard SV mini prepキット (Promega) を用いていくつかの耐性コロニーからMini prep DNAを単離し、AseI/EcoRIで消化してコロニーを同定し、670bpのフラグメントを得た (これによってカセットは正しい方向性で挿入されたことが示唆される)。得られたプラスミドをpEAK12d (図11) と名付けた。

10

2.4 IPAAA24020を含むcDNAライブラリーの同定

CP1およびCP2を用いて得られた正確なサイズ (538bp) で泳動するPCR生成物を胎児腎臓及び大脳皮質ライブラリー (それぞれ、ライブラリー12及び8) で同定した。

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

表 I : ヒト cDNAライブラリー

ライブラリー	組織／細胞源	ベクター	ホスト株	供給元	カタログ番号
1	ヒト胎児脳	Zap II	XL1-BlueMRF'	St*	936206
2	ヒト卵巣	GT10	LE392	Cl**	HL1098a
3	ヒト下垂体	GT10	LE392	Cl	HL1097a
4	ヒト胎盤	GT11	LE392	Cl	HL1075b
5	ヒト精巣	GT11	LE392	Cl	HL1010b
6	ヒト黒質	GT10	LE392	本施設内	
7	ヒト胎児脳	GT10	LE392	本施設内	
8	ヒト脳皮質	GT10	LE392	本施設内	
9	ヒト結腸	GT10	LE392	Cl	HL1034a
10	ヒト胎児脳	GT10	LE392	Cl	HL1065a
11	ヒト胎児肺	GT10	LE392	Cl	HL1072a
12	ヒト胎児腎	GT10	LE392	Cl	HL1071a
13	ヒト胎児肝	GT10	LE392	Cl	HL1064a
14	ヒト骨髄	GT10	LE392	Cl	HL1058a
15	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	Cl	HL1050a
16	ヒト胎盤	GT10	LE392	本施設内	
17	ヒトSHSYSY	GT10	LE392	本施設内	
18	ヒトU373細胞株	GT10	LE392	本施設内	
19	ヒトCFPoc-1細胞株	Uni Zap	XL1-BlueMRF'	St	936206
20	ヒト網膜	GT10	LE392	Cl	HL1132a
21	ヒト膀胱	GT10	LE392	本施設内	
22	ヒト血小板	Uni Zap	XL1-BlueMRF'	本施設内	
23	ヒト神経芽腫Kan+Ts	GT10	LE392	本施設内	
24	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
25	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
26	ヒト胸腺	GT10	LE392	Cl	HL1127a
27	ヒト脾臓5'ストレッチ	GT11	LE392	Cl	HL1134b
28	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	Cl	HL1050a
29	ヒト精巣	GT10	LE392	Cl	HL1065a
30	ヒト胎児脳	GT10	LE392	Cl	HL1065a
31	ヒト黒質	GT10	LE392	Cl	HL1093a
32	ヒト胎盤#11	GT11	LE392	Cl	HL1075b
33	ヒト胎児脳	GT10	LE392	Cl	カスタム
34	ヒト胎盤#59	GT10	LE392	Cl	HL5014a
35	ヒト下垂体	GT10	LE392	Cl	HL1097a
36	ヒト睪#63	UniZapXR	XL1-BlueMRF'	St	937208
37	ヒト胎盤#19	GT11	LE392	Cl	HL1008
38	ヒト肝臓5'ストレッチ	GT11	LE392	Cl	HL1115b
39	ヒト子宮	Zap-CMVXR	XL1-BlueMRF'	St	980207
40	ヒト腎ラージインサー トcDNAライブラリー	TriplEx2	XL1-Blue	Cl	HL5507u

10

20

30

40

* : ストラタジーン (Stratagene)

** : クローンテック (Clontech)

【 0 0 8 5 】

表II : IPAAA24020クローニングプライマー

50

プライマー	名称	配列 (5'-3')	位置	T _m °C	%GC
CP1	3A7フォワードプライマー	GCTGCTTCTCCACACCAAGT	42	64	55
CP2	3A8リバースプライマー	CACGGAGCCAGTAAGCTGAT	579C	64	55

【 0 0 8 6 】

【 表 1 】

表Ⅲ

10

IPAAA24020 サブクローニング及び配列決定用プライマー

Primer	Name	Sequence (5'-3')
GCP Forward	I-C1 attB1-K	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u>
GCP Reverse	22A3 attB2-stop-His6-R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG
EX1 Forward	II-A1 24020_B1p	GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG CTT TCC CCG GAC CTC CA
EX2 Reverse	I-18 24020_6HISp	GTG ATG GTG ATG GTG GGA TCG GAG GAA GGG GCT GCT G
pEAK12-F	32D1	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12-R	32D2	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
SP6		ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7		TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

20

30

下線付き配列 = Kozak配列

ボールド = 終止コドン

イタリック配列 = Hisタグ

シェード配列 = シャイン ダルガルノ配列 (リボソーム結合部位)

40

【 0 0 8 7 】

3. 哺乳類細胞での IPAAA24020-6HIS (プラスミド番号12156) の発現

3.1 細胞培養

エプスタイン=バーウイルスの核抗原を発現しているヒト胚性腎293細胞 (HEK293-EBNA, Invitrogen) は、Ex細胞VPRO血清非含有培養液 (シードストック、維持培養液、JRH) 中で浮遊状態で維持した。トランスフェクションの16から20時間前 (-1日目) に、細胞を2つのT225フラスコに播種した (2% FBSシード培養液 (JRH) を含むDMEM/F12 (1:1) 中に 2×10^5 細胞/mlの密度でフラスコ当たり50mL)。次の日 (トランスフェクション0日目)、JetPEI (登録商標) 高分子試薬 (PolyPlus-トランスフェクション) (プラスミ

50

ドDNA $2\mu\text{L}/\mu\text{g}$)を用いてトランスフェクションを実施した。各フラスコについて、 $113\mu\text{g}$ のプラスミド番号12148を $2.3\mu\text{g}$ のGFP(レポーター遺伝子)と一緒にトランスフェクトした。続いて、トランスフェクション混合物を2つのT225フラスコに加え、 $37\text{ } (5\% \text{の} \text{CO}_2)$ で6日間インキュベートした。陽性トランスフェクションの確認は、1日目および6日目に蛍光試験によって実施した。

6日目に(採集日)、2つのフラスコの上清(100mL)を一緒にし、遠心し(4、400g)、固有の識別標を付したポットに入れた。

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

【0088】

3.2 精製方法

C-末端6Hisタグを有するリコンビナントタンパク質を含む100mLの培養液サンプルを冷緩衝液A(50mMの NaH_2PO_4 ; 600mMの NaCl ; 8.7%(w/v)グルセロール(pH7.5))を用いて最終容積200mLに希釈した。0.22 μm の滅菌フィルター(Millipore, 500mLフィルターユニット)で前記サンプルをろ過し、250mLの滅菌培養角ビン(Nagene)で4で維持した。

精製は、自動サンプル添加装置(Labomatic)に連結したVISIONワークステーション(Applied Biosystems)で4で実施した。精製方法は以下の2つの連続工程を含んでいた: NiイオンをチャージしたPoros 20MC(Applied Biosystems)カラム(4.6 \times 50mm, 0.83mL)での金属アフィニティークロマトグラフィー、続いてセファデックスG-25medium(Amersham Pharmacia)カラム(1.0 \times 10cm)でのゲルろ過。

最初のクロマトグラフィー工程のために、金属アフィニティークラムを40カラム容積のEDTA溶液(100mMのEDTA; 1Mの NaCl ; pH8.0)で再生させ、15カラム容積の NiSO_4 溶液(100mM)で洗浄してNiイオンを再チャージし、10カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて7カラム容積の緩衝液B(50mMの NaH_2PO_4 ; 600mMの NaCl ; 8.7%(w/v)グリセロール; 400mMのイミダゾール; pH7.5)で洗浄し、最後に15カラム容積の緩衝液A(15mMのイミダゾールを含む)で平衡化させた。Labomaticサンプル添加装置でサンプルを200mLのサンプルループに移し、続いてNi金属アフィニティークラムに流速10mL/分で装荷した。前記カラムを12カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて28カラム容積の緩衝液A(20mMのイミダゾールを含む)で洗浄した。20mMのイミダゾール洗浄の間に、ゆるく付着していた夾雑タンパク質はカラムから溶出した。リコンビナントHisタグ付加タンパク質は、流速2mL/分で10カラム容積の緩衝液Bにより最後に溶出させ、この溶出タンパク質を1.6mL分画で採集した。

二番目のクロマトグラフィーのためには、セファデックスG-25ゲルろ過カラムを2mLの緩衝液D(1.137Mの NaCl ; 2.7mMの KCl ; 1.5mMの KH_2PO_4 ; 8mMの Na_2HPO_4 ; pH7.2)で再生し、続いて4カラム容積の緩衝液C(137mMの NaCl ; 2.7mMの KCl ; 1.5mMの KH_2PO_4 ; 8mMの Na_2HPO_4 ; 20%(w/v)グリセロール; pH7.4)で平衡化した。Niカラムから溶出したピーク分画は、VISION上の一体化されたサンプル添加装置を自動的に通過し、セファデックスG-25カラムにロードされ、タンパク質は2mL/分の流速の緩衝液Cで溶出した。脱塩サンプルを2.2mLの分画に回収した。前記分画を0.22 μm の滅菌遠心フィルター(Millipore)に通し、凍結して-80で保存した。サンプルの部分標本をSDS-PAGE(4-12% NuPAGEゲル; Novex)でクーマシー染色及びウェスタンブロットで抗His抗体を用いて分析した。

ウェスタンブロット分析用ゲルを290mAで1時間4で電氣的にニトロセルロース膜に移した。前記の膜を室温で1時間、緩衝液(137mMの NaCl ; 2.7mMの KCl ; 1.5mMの KH_2PO_4 ; 8mMの Na_2HPO_4 ; 0.1% トゥイーン20(pH7.4))中の5%粉乳で封鎖し、続いて、2.5%の粉乳を含む緩衝液E中の2つのウサギポリクローナル抗体混合物(G-18およびH-15、各々0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Santa Cruz)とともに4で一晩インキュベートした。室温でさらに1時間インキュベートした後、前記膜を緩衝液Eで洗浄し(10分、3回)、続いて、2.5%の粉乳を含む緩衝液Eで1/3000に希釈したHRP結合抗ウサギ二次抗体(DAKO、HRP0399)と室温で2時間インキュベートした。緩衝液Eで洗浄(10分、3回)した後、膜をECLキット(Amersham Pharmacia)で1分処理した。続いて膜をHyperfilm(Amersham Pharmacia)に暴露し、前記フィルムを現像してウェスタンブロット画像をクーマシー染色ゲルと比較した。

10

20

30

40

50

クーマシー染色によって検出可能なタンパク質バンドを示すサンプルにおいて標準としてウシ血清アルブミンを有するBCAタンパク質アッセイキット (Pierce) を用いて、タンパク質濃度を決定した。

【0089】

実施例3 : INSP034

配列番号 : 10、配列番号 : 12および配列番号 : 14を結合させることにより得られるポリペプチド配列 (配列番号 : 16と等価) (INSP034の連続エクソンの翻訳を示す) をPDBデータベースに存在するタンパク質構造についての検索物 (query) としてインファーマティカ=ゲノムスレッダーツールで用いた。最高適合物は4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造である。前記最高適合物は、前記検索照会配列とのアラインメントで13%のゲノムスレッダー信頼性を示した (図18)。図19は、INSP034検索配列とヒト肥満タンパク質 (レプチン) (PDB-1ax8) の配列 (4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー ; Zhang et al, Nature. 1997 May 8;387(6629):206-9) とのアラインメントを示している。分泌タンパク質の4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーは治療において重要である。

10

【0090】

実施例4 : INSP036

配列番号 : 24、配列番号 : 26、配列番号 : 28、配列番号 : 30および配列番号 : 32を結合させることにより得られるポリペプチド配列 (配列番号 : 34と等価) (INSP036の連続エクソンの翻訳を示す) をPDBデータベースに存在するタンパク質構造についての検索物 (query) としてインファーマティカ=ゲノムスレッダーツールで用いた。最高適合物は4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造である。前記最高適合物は、前記検索照会配列とのアラインメントで82%のゲノムスレッダー信頼性を示した (図20)。図21は、INSP036検索配列とインターロイキン-4 (PDB-1hij) の配列 (4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー ; Demchuk et al, Protein Sci. 1994 Jun;3(6):920-35) とのアラインメントを示している。INSP036ポリペプチド配列は図21では“chr15_58”と称されることに注目されたい。分泌タンパク質の4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーは治療において重要である。

20

【0091】

実施例5 : INSP038

配列番号 : 38、配列番号 : 40、配列番号 : 42、配列番号 : 44および配列番号 : 46を結合させることにより得られるポリペプチド配列 (配列番号 : 48と等価) (INSP038の連続エクソンの翻訳を示す) をPDBデータベースに存在するタンパク質構造についての検索物 (query) としてインファーマティカ=ゲノムスレッダーツールで用いた。最高適合物には4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造が含まれる。最高適合物は4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーの構造である。前記最高適合物は、前記検索照会配列とのアラインメントで85%のゲノムスレッダー信頼性を示した (図22)。図23は、INSP038検索配列とヒトインターフェロン (PDB-1fyh) の配列 (4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバー ; Randal et al, Protein Sci 1998 Apr;7(4):1057-60) とのアラインメントを示している。INSP038ポリペプチド配列は図23では“IPAAA845”と称されることに注目されたい。分泌タンパク質の4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーは治療において重要である。

30

40

【0092】

配列表

配列番号 : 1 (INSP032のヌクレオチド配列エクソン1)

```

1 ATGCTCATGG CTTACTGTAA CCACTCCCTG GCTACTGCCT ATATTCTGTC
51 AAGGCCCCGA GGCTCTAAAT CAGCAGGTGG CAAAGTCCGC CAGGCCTGTG
101 TTCTTCCCTT CAGGGTGGTG AGGTCCTCCA GGTCTGTGT GGGTCCTAAG

```

配列番号 : 2 (INSP032のタンパク質配列エクソン1)

50

1 MLMAYCNHSL ATAYILSRPR GSKSAGGKVR QACVLPFRVV RSSRSCVGP

配列番号：3 (INSP032のヌクレオチド配列エクソン2)

1 GTTAAAGCTG TTTGTCATCT CAACCACGGC CTTGTCAATT GTTACAACCT
51 CCTCATCCTT GACAAATTAT TTGAAGTCAT TAATGAGCTT CTTGAGTGTC
101 TTCGTCCAGA TGCCATTTCT ACATTCCTTG CTGACATCTC TTCAATTCCA
151 AGCAAGGTTT TTGATACATC TTGGATGTTA TAA

配列番号：4 (INSP032のタンパク質配列エクソン2)

1 VKAVCHLNHG LVNLYNLLIL DKLFEVINEL LECLRPDAIS TFLADISSIP
51 SKVFDTSWML

10

配列番号：5 (INSP032のヌクレオチド配列)

1 ATGTCATGG CTTACTGTAA CCACTCCCTG GCTACTGCCT ATATTCTGTC
51 AAGGCCCCGA GGCTCTAAAT CAGCAGGTGG CAAAGTCCGC CAGGCCTGTG
101 TTCTTCCCTT CAGGGTGGTG AGGTCCTCCA GGTCTGTGT GGGTCCTAAG
151 GTTAAAGCTG TTTGTCATCT CAACCACGGC CTTGTCAATT GTTACAACCT
201 CCTCATCCTT GACAAATTAT TTGAAGTCAT TAATGAGCTT CTTGAGTGTC
251 TTCGTCCAGA TGCCATTTCT ACATTCCTTG CTGACATCTC TTCAATTCCA
301 AGCAAGGTTT TTGATACATC TTGGATGTTA TAA

20

配列番号：6 (INSP032ポリペプチドのタンパク質配列)

1 MLMAYCNHSL ATAYILSRPR GSKSAGGKVR QACVLPFRVV RSSRSCVGP
51 VKAVCHLNHG LVNLYNLLIL DKLFEVINEL LECLRPDAIS TFLADISSIP
101 SKVFDTSWML

配列番号：7 (INSP033のクローン化ヌクレオチド配列エクソン1)

1 ATGCTTTCCC CGGACCTCCA CGAAGATGCC GGAAACTTTT CTGCTCAACT
51 TTGCAAGGGG CCATCTAAGT GCCACTTAGA GACGGAAGCT CTGACCCAAC
101 CCCACAGGGA TGTTTTTTCC TTTTATTCTT TTGCTCTGAA CACTTGGCCG
151 TATGCTGTGT GCAGCAGAGA CAGGACTCAG GGAAGAGACA GGTGCCTGCC
201 ACCACTGTTG GTCTTCGTCT TCCGGCGTCT GAAAGTGGCG ATCATGGGTA
251 TATCGGCCAG CACTTTGAAA AACAGGTCTC TCCAACAAAA GCAACTGAGA
301 CATAAAACAT CTGTCCAGAA ACCTGGGGGC ATTGCTGGTG TCATGAGGTG
351 GGGTCACCAG GCGTCTGGAG CTTTCGACCT CAGCCGCAGC AGCAGCAGCA
401 AAAGAAGCCC CACAAAATCG TCGCCGTCCG AATCTGCGAC CAGCAGCCCC
451 TTCCTCCGAT CCTGA

30

配列番号：7a (INSP033の推定ヌクレオチド配列エクソン1)

1 ATGGTGAGTC AAGAAGCGAA TCTTTCCCCG GACCTCCACG AAGATGCCGG
51 AAACTTTTCT GCTCAACTTT GCAAGGGGCC ATCTAAGTGC CACTTAGAGA
101 CGGAAGCTCT GACCCAACCC CACAGGGATG TTTTTTCTT TCATTCTTTT
151 GCTCTGAACA CTTGGCCGTA TGCTGTGTGC AGCAGAGACA GGAAGTGGG
201 AAGAGACAGG TGCCTGCCAC CACTGTTGGT CTTCTGCTTC CGGCGTCTGA
251 AAGTGGCGAT CATGGGTATA TCGCCAGCA CTTTGA AAAA CAGGTCTCTC
301 CAACAAAAGC AACTGAGACA TAAAACATCT GTCCAGAAAC CTGGGGGCAT
351 TGCTGGTGTC ATGAGGTGGG GTCACCAGGC GTCTGGAGCC TTCGACCTCA
401 GCCGCAGCAG CAGCAGCAA AGAAGCCCCA CAAAATCGTC GCCGTCCGAA
451 TCTGCGACCA GCAGCCCCTT CCTCCGATCC TGA

40

50

配列番号：8 (INSP033のクローン化タンパク質配列エクソン1)

1 MLSPDLHEDA GNFSACLCKG PSKCHLETEA LTQPHRDVFS FHSFALNTWP
51 YAVCSRDRTO GRDRCLPPLL VVFRRLKVA IMGISASTLK NRSLQKQLR
101 HKTSVQKPGG IAGVMRWGHQ ASGAFDLSRS SSSKRSPTKS SPSESATSSP
151 FLRS

配列番号：8a (INSP033の推定タンパク質配列エクソン1)

1 MVSQEANLSP DLHEDAGNFS AQLCKGPSKC HLETEALTQP HRDVFSFHSF
51 ALNTWPYAVC SRDRTQGRDR CLPPLLVFVF RRLKVAIMG I SASTLKNRSL
101 QKQLRHKTS VQKPGGIAGV MRWGHQASGA FDLRSSSSSK RSPTKSSPSE
151 SATSSPFLRS

10

配列番号：9 (INSP034のヌクレオチド配列エクソン1)

1 ATGCCCACTG ATGTAACCTG GACTGTATTG GAAATTGATG TGCTCCAAGG
51 AAGGAGAACG CCTAGGGTGC TCCTTGGACA AGAGCCTCAG TGTATTACTG
101 TATTGCTAAA TCAAGTGAAT GGAATGCGAG

配列番号：10 (INSP034のタンパク質配列エクソン1)

1 MPTDVTWTVL EIDVLQGRRT PRVLLGQEPQ CITVLLNQVN GMRE

20

配列番号：11 (INSP034のヌクレオチド配列エクソン2)

1 AAAGGAGCTA CCCACTTCAG GTCTCCAGAG AGCTGTACTA CAGCTCAATA
51 AAGCACCTCT TTGCCTTGCT CACCCTCCAG TTGTCCATAT ACCTCACTCT
101 TCCTGAATGC GGGACAAGAA CTCGGGACCT GCTGAATGGT GGGACTGAAA
151 GAGCTGTAAC ACAAACAG

配列番号：12 (INSP034のタンパク質配列エクソン2)

1 RSYPLQVSRE LYYSSIKHLF ALLTLQLSIY LTLPECGTRT RDLLNGGTER
51 AVTQTD

30

配列番号：13 (INSP034のヌクレオチド配列エクソン3)

1 ATATTTGCAA CAGCAAAAGG CCACGAGGCA GCATTGAGAG TCCAGACCAG
51 CATCTACTAT CACAGCTTAG CGTGGCCACT GAAGATGACA ATTTAAATCG
101 TGTGAAGGAC TAA

配列番号：14 (INSP034のタンパク質配列エクソン3)

1 ICNSKRPRGS IQSPDQHLLS QLSVATEDDN LNRVKD

配列番号：15 (INSP034のヌクレオチド配列)

1 ATGCCCACTG ATGTAACCTG GACTGTATTG GAAATTGATG TGCTCCAAGG
51 AAGGAGAACG CCTAGGGTGC TCCTTGGACA AGAGCCTCAG TGTATTACTG
101 TATTGCTAAA TCAAGTGAAT GGAATGCGAG AAAGGAGCTA CCCACTTCAG
151 GTCTCCAGAG AGCTGTACTA CAGCTCAATA AAGCACCTCT TTGCCTTGCT
201 CACCCTCCAG TTGTCCATAT ACCTCACTCT TCCTGAATGC GGGACAAGAA
251 CTCGGGACCT GCTGAATGGT GGGACTGAAA GAGCTGTAAC ACAAACAGAT
301 ATTTGCAACA GCAAAAGGCC ACGAGGCAGC ATTCAGAGTC CAGACCAGCA
351 TCTACTATCA CAGCTTAGCG TGGCCACTGA AGATGACAAT TAAATCGTG
401 TGAAGGACTA A

40

配列番号：16 (INSP034のタンパク質配列)

50

1 MPTDVTWTVL EIDVLQGRRT PRVLLGQEPQ CITVLLNQVN GMRERSYPLQ
 51 VSRELYYSSI KHLFALLTLQ LSIYLTLPED GTRTRDLLNG GTERAVTQTD
 101 ICNSKRPRGS IQSPDQHLLS QLSVATEDDN LNRVKD

配列番号：23 (INSP036のヌクレオチド配列エクソン1)

1 ATGACACACG

配列番号：24 (INSP036のタンパク質配列エクソン1)

1 MTHG

10

配列番号：25 (INSP036のヌクレオチド配列エクソン2)

1 GGCTTTGTTT ACACAGCCCC TTGAAGCCAG CTGTCAAGGG TGCAAACCTG
 51 GTCTGCCATC CTTTGAAGAA GGTTCAGGTT ACACATG

配列番号：26 (INSP036のタンパク質配列エクソン2)

1 LCLHSPLKPA VKGANLVCHP LKKVQVTHE

配列番号：27 (INSP036のヌクレオチド配列エクソン3)

1 AACTGCACAA TCATAAATCC AGCTGCCTTC ATTCCTCCCT CTTCCTCATC
 51 CACCCCACTC AATTCTTGAC CAACTTGATA CTCTCAAGAT ACAGTAGAAA
 101 G

20

配列番号：28 (INSP036のタンパク質配列エクソン3)

1 LHNHKSSCLH SSLFLIHPTQ FLTNLILSRV SRK

配列番号：29 (INSP036のヌクレオチド配列エクソン4)

1 GCCTCAAAGA TGGCGAAAGA GTGCCTGGTT TCAGAGAGCA ATACGAAAAA
 51 TGCAGCTTTG GAAGTCTG

配列番号：30 (INSP036のタンパク質配列エクソン4)

1 ASKMAKECLV SESNTKNAAL EVC

30

配列番号：31 (INSP036のヌクレオチド配列エクソン5)

1 TCCTCCTCTT TTTCTGGTG CTCTTACTCT TGCAGATTTG GAGATTTGTT
 51 TTCTTGCTGA AAATTAG

配列番号：32 (INSP036のタンパク質配列エクソン6)

1 PPLFPGALTL ADLEICFLAE N

配列番号：33 (INSP036のヌクレオチド配列)

1 ATGACACACG GGCTTTGTTT ACACAGCCCC TTGAAGCCAG CTGTCAAGGG
 51 TGCAAACCTG GTCTGCCATC CTTTGAAGAA GGTTCAGGTT ACACATGAAC
 101 TGCACAATCA TAAATCCAGC TGCCTTCATT CCTCCCTCTT CCTCATCCAC
 151 CCCACTCAAT TCTTGACCAA CTTGATACTC TCAAGATACA GTAGAAAGGC
 201 CTCAAAGATG GCGAAAGAGT GCCTGGTTTC AGAGAGCAAT ACGAAAAATG
 251 CAGCTTTGGA AGTCTGTCCT CCTCTTTTTT CTGGTGCTCT TACTCTTGCA
 301 GATTTGGAGA TTTGTTTTCT TGCTGAAAAT TAG

40

配列番号：34 (INSP036のタンパク質配列)

1 MTHGLCLHSP LKPAVKGANL VCHPLKKVQV THELHNHKSS CLHSSLFLIH
 51 PTQFLTNLIL SRYSRKASKM AKECLVSESN TKNAALEVCP PLFPGALTLA
 101 DLEICFLAEN

50

配列番号：37 (INSP038のヌクレオチド配列エクソン1)

1 AAAAATCAG AAAAGAACAC TCTCCATCGT CAGAAAGCAT GACATTGTTGC
51 CATATATGG AACAATTTAA AGTTATATCT CATCTGGAAG AAATATGACGG
101 AAAAATTTAA TAAAGGAGGA CCAG

配列番号：38 (INSP038のタンパク質配列エクソン1)

1 KNQKRTLSIV RKHDIVAIYG TIKSYISSGR NMTEKLIKED Q

配列番号：39 (INSP038のヌクレオチド配列エクソン2)

1 AGAACTGTGG ATTGTGGGA TTTAGAAGAA G

10

配列番号：40 (INSP038のタンパク質配列エクソン2)

1 RTVDCGDLEE G

配列番号：41 (INSP038のヌクレオチド配列エクソン3)

1 GTGCTACAGC AGTTCTGGAA ACAACTTGG AAGGCTGTTG

配列番号：42 (INSP038のタンパク質配列エクソン3)

1 ATAVLENNLE GCW

20

配列番号：43 (INSP038のヌクレオチド配列エクソン4)

1 GCCTTGATT TTGACAGCA ATTCTGGACC TGTCCTGGGC CGGAAGGGAT
51 ATCACTACCT GAAAG

配列番号：44 (INSP038のタンパク質配列エクソン4)

1 PWILDSNSGP VLGRKGYHYL KG

配列番号：45 (INSP038のヌクレオチド配列エクソン5)

1 GTCTTATCCA ACATCACCAA CATGGTACCT CCACATGTCT GCACAATCAT
51 GGAATTACTT ATATTACATT CCTGATGATG CAGATACAAC TTGTATCACA
101 AACTCAAGT TCTTTTAAAT ACCTGGAAAA CTTCTCAAG GAGGATGAGT
151 ACAAACAAGC CCAGGCTGTG AAGACTGCAA TAAATACCAA ATTCTTCAAT
201 GCCCAGACAC AGACAAACAT ACCAAGTATC AAGACCATCC AGGAAAGCAT
251 GACCTCACCA AATGAACCGG ATGAAGCACC AGGGACCATT CCTGGAGAAA
301 CAGAGATAGG TGAATTTTCA GACACAGAAT TCATAATAGC TGTTTTGGGG
351 AACTCACAC AAATTCAAGA TAACACAGAG AAGGAATTCA GAATTCTAAC
401 AGACAAATTT AATAAAGAGG TTGAGATGAT TAA

30

配列番号：46 (INSP038のタンパク質配列エクソン5)

1 LIQHHQHGTG TCLHNHGITY ITFLMMQIQL VSQHSSSFY LENLLKEDEY
51 KQAQAVKTAI NTKFFNAQTQ TNIPSIKTIQ ESMTSPNEPD EAPGTIPGET
101 EIGEFSDTEF IIAVLGKLTQ IQDNTEKEFR ILTDKFNKEV EMI

40

配列番号：47 (INSP038のヌクレオチド配列)

1 GAAAAATCAG AAAAGAACAC TCTCCATCGT CAGAAAGCAT GACATTGTTG
51 CCATATATGG AACAATTTAA AGTTATATCT CATCTGGAAG AAATATGACG
101 GAAAAATTTAA TAAAGGAGGA CCAGAGAACT GTGGATTGTG GGGATTTAGA
151 AGAAGGTGCT ACAGCAGTTC TGGAAAACAA CTTGGAAGGC TGTTGGCCTT
201 GGATTTTGA CAGCAATTCT GGACCTGTCC TGGGCCGGAA GGGATATCAC

50

251 TACCTGAAAG GTCTTATCCA ACATCACCAA CATGGTACCT CCACATGTCT
 301 GCACAATCAT GGAATTACTT ATATTACATT CCTGATGATG CAGATACAAC
 351 TTGTATCACA ACACTCAAGT TCTTTTAAAT ACCTGGAAAA CCTTCTCAAG
 401 GAGGATGAGT ACAAACAAGC CCAGGCTGTG AAGACTGCAA TAAATACCAA
 451 ATTCTTCAAT GCCCAGACAC AGACAAACAT ACCAAGTATC AAGACCATCC
 501 AGGAAAGCAT GACCTCACCA AATGAACCGG ATGAAGCACC AGGGACCATT
 551 CCTGGAGAAA CAGAGATAGG TGAATTTTCA GACACAGAAT TCATAATAGC
 601 TGTTTTGGGG AAACCTCACAC AAATTCAAGA TAACACAGAG AAGGAATTCA
 651 GAATTCTAAC AGACAAATTT AATAAAGAGG TTGAGATGAT TAA

10

配列番号：48 (INSP038のタンパク質配列)

1 KNQKRTLSIV RKHDIVAIYG TIKSYISSGR NMTEKLIKED QRTVDCGDLE
 51 EGATAVLENN LEGCWPWILD SNSGPVLRK GYHYLKGLIQ HHQHGTSTCL
 101 HNHGITYITF LMMQIQLVSQ HSSSFKYLEN LLKEDEYKQA QAVKTAINTK
 151 FFNAQTQNI PSIKTIQESM TSPNEPDEAP GTIPGETEIG EFSDFEFIIA
 201 VLGKLTQIQD NTEKEFRILT DKFNKEVEMI

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】配列番号：2および4を結合させたポリペプチド配列（配列番号：6と等価）を用いたインフォーマティカゲノムスレッダー検索の結果を示す。

20

【図2】配列番号：2および4を結合させたポリペプチド配列（配列番号：6と等価）と最近縁構造との間でインフォーマティカゲノムスレッダーにより得られたアラインメントを示す。

【図3】インフォーマティカゲノムスレッダー検索物（配列番号：8a）の結果を示す。

【図4】配列番号：8aと最近縁構造との間でインフォーマティカゲノムスレッダーにより得られたアラインメントを示す。

【図5】INSP033の推定ヌクレオチド配列（配列番号：7a）をその翻訳（配列番号：8a）とともに示す。

【図6】INSP033クローン化ヌクレオチド配列（配列番号：7）をその翻訳（配列番号：8）とともに示す。

30

【図7】推定配列（配列番号：7a）に対するクローン化INSP033ヌクレオチド配列（配列番号：7）の対のアラインメントを示す。

【図8】推定配列（配列番号：8a）と比較したクローン化INSP033のアミノ酸配列（配列番号：8）の対のアラインメントを示す。

【図9】PCR11-TOPO-IPAAA24020のマップを示す。

【図10】プラスミドpDONR201のマップを示す。

【図11】発現ベクターpEAK12dのマップを示す。

【図12】pEAK12d-IPAAA24020のプラスミドマップを示す。

【図13】PCR11-TOPO-IPAAA24020のヌクレオチド配列を示す。

【図14】pEAK12D-IPAAA24020-6HISのヌクレオチド配列を示す。

40

【図15】INSP033ポリペプチド（配列番号：8）のNCBI-NRの結果で、100%のマッチングを示さず、従ってINSP033が新規であることを立証する。

【図16】INSP033ポリペプチド（配列番号：8）のNCBI-month-aaの結果で、100%のマッチングを示さず、従ってINSP033が新規であることを立証する。

【図17】INSP033ヌクレオチド（配列番号：7）のNCBI-month-ntの結果で、100%のマッチングを示さず、従ってINSP033が新規であることを立証する。ここで使用されるデータベースは翻訳されたヌクレオチドデータベースであり、従ってその結果はヌクレオチドよりもアミノ酸において説明される。

【図18】配列番号：10、配列番号：12および配列番号：14を結合させたポリペプチド配列（配列番号：16と等価）を用いたインフォーマティカゲノムスレッダー検索の結果を示

50

【 図 5 】

Figure 5

INSP033 の推定配列 (翻訳付き)

```

1 TTGCTTGGGA AGAACAGCTT CTGAGCCGAC CTGGAACAGC GCTGCTTCT CCGAGGAGAG
61 TTACTGCAAA TSGTGAGTCA AGAAGCGAAT CTTCCCGCGG ACCTCCACGA AGATGCCGGA
   m v s q e a n l s p d l h e d a g

122 AACTTTTCTG CTCIACTTTG CAGGGGCGCA TCTAAGTGCC ACTTAGAGAC GGAAGCTGTG
   n f s a q l c k e p s k c h l e t e a l

181 ACCCAACCCC ACAGGAGTGT TTTTTCCTTT CATTCCCTTG CTCTGAACAC TTGGCCGTAT
   t q p h r d v f s f h s f a l n l w p y

241 GCTGTGTGCA GCAGAGACAG GACTCAGGGA AGAGACAGGT GCCTGCCACC ACTGTGTGTC
   a v c s r d r t q g r d r c l p p l l v

301 TTCGCTTCC GCGCTCTGAA AGTGGCGATC ATGGGTATAT CGGCCAGCAC TTGAAAAAAC
   f v f r r l k v a i m g l s a s t l k n

361 AGGTCTCTCC NACAAAAGA ACTGAGACAT AAAACATCTG TCCAGAAACC TGGGGGCATT
   z s l q q k q l z h k t s v q k p g g i

421 GCTGTGTGCA TGAGGTGGGG TCACAGGGCC TCTGGAGCCT TCGACCTCAG CCGCAGCAGC
   a g v m r w g h q a s g a f d l s r s s

481 AGCAGCAAAA GAAGCCCCAC AAAATCTGCG CGGTCCGAAT CTGCGACCCG CAGCCCTTTC
   s s k r s p t k s s p s e s a t s s p f

541 CTCGGATCCT GACTCATTGA TCACTTACT GCTCCCGTGA GCGCGACAAA CGCCCTAATG
   l r s

601 C

```

プライマーの位置はシェードボックスによって示される。

【 図 6 】

Figure 6

INSP033 クローン化配列 (配列番号: 7) (翻訳付き (配列番号: 8))

```

1 GCTGCTTCTC CACACCAAGT ITACTGCAAT GGTGAATCAA GAAGCGAATG
   m

51 CTTTCCCGGG ACCTCCACGA AGATGCCGGA AACTTTTCTG CTCACTTTG
   i s p d l h e d a g n f s a q l

101 CAAGGGGCGCA TCTAAGTGCC ACTTAGAGAC GGAAGCTGTG ACCCAACCCC
   c k g p s k c h l e t e a l t q p

151 ACAGGAGTGT TTTTTCCTTT CATTCCCTTG CTCTGAACAC TTGGCCGTAT
   h r d v f s f h s f a i n l w p y

201 GCTGTGTGCA GCAGAGACAG GACTCAGGGA AGAGACAGGT GCCTGCCACC
   a v c s r d r t q g r d r c l p

251 ACTGTGTGTC TTGCTTCC GGCCTCTGAA AGTGGCGATC ATGGGTATAT
   p i l v f v f r r l k v a i m g i

301 CCGCCAGCAC TTGAAAAAAC AGGTCTCTCC AACAAAAGA ACTGAGACAT
   s a s t l k n r s l q q k q l r h

351 AAAACATCTG TCCAGAAACC TGGGGGCATT GCTGTGTGCA TGAGGTGGGG
   k t s v q k p g g i a g v m r w

401 TCCAGAGGGC TCTGGAGCCT TCGACCTCAG CCGCAGCAGC AGCAGCAAAA
   g h q a s g a f d l s r s s s s k

451 GAAGCCCCAC AAAATCTGCG CGGTCCGAAT CTGCGACCCG CAGCCCTTTC
   z s p t k s s p s e s a t s s p f

501 CTCGGATCCT GACTCATTGA TCAGCTTACT GGTCCCGTG
   l r s

```

【 図 7 】

Figure 7

推定配列 (配列番号: 7a) に対するクローン化 INSP033 (配列番号: 7) の対のアラインメント

```

Cloned+240 1 GCTGCTTCTCCACACCAAGTITACTGCAATGGTGAATCAA GAAGCGAATCTTTCCCGGG
Inpharmati 42 GCTGCTTCTCCACACCAAGTITACTGCAATGGTGAATCAA GAAGCGAATCTTTCCCGGG
*****

Cloned+240 61 AACTTTTCTGCTCIACTTTGCAGGGGCGCATCTAAGTGCC
Inpharmati 101 AACTTTTCTGCTCIACTTTGCAGGGGCGCATCTAAGTGCC
*****

Cloned+240 121 ACTTAGAGACAGGAGCTCTGACCAACCCACAGGAGTGT TTTTTCCTTTCACTTCTG
Inpharmati 161 ACTTAGAGACAGGAGCTCTGACCAACCCACAGGAGTGT TTTTTCCTTTCACTTCTG
*****

Cloned+240 181 CTCTGAACACTTGGCCGTATGCTGTGTGAGAGAGACAGGACTCAGGAAAGAGACAGGT
Inpharmati 221 CTCTGAACACTTGGCCGTATGCTGTGTGAGAGAGACAGGACTCAGGAAAGAGACAGGT
*****

Cloned+240 241 GCTTCCAGCAGCTGTGGCTTCTGCTTCCCGCGCTGAAAAGTGGCATCATGGGTATAT
Inpharmati 281 GCTTCCAGCAGCTGTGGCTTCTGCTTCCCGCGCTGAAAAGTGGCATCATGGGTATAT
*****

Cloned+240 301 CCGCCAGCACCTTTGAAAAAACAGGTCTCCCAAAAAGCAACTGAGACATAAAACATCTG
Inpharmati 341 CCGCCAGCACCTTTGAAAAAACAGGTCTCCCAAAAAGCAACTGAGACATAAAACATCTG
*****

Cloned+240 361 TCCAGAAATCTGGGCGCATCTGCTGGCTATGAGGTGGGTCACAGGGCCTTGGAGCCT
Inpharmati 401 TCCAGAAATCTGGGCGCATCTGCTGGCTATGAGGTGGGTCACAGGGCCTTGGAGCCT
*****

Cloned+240 421 TCGACCTCAGCCGACGACGACGACAAAAGAGCCCAAAAATCTGTGCGCGTCCGAAT
Inpharmati 461 TCGACCTCAGCCGACGACGACGACAAAAGAGCCCAAAAATCTGTGCGCGTCCGAAT
*****

Cloned+240 481 CTGCGACCCGCGCCCTTCTCCGATCTGACCTTATGATCAGCTTACTGGCTCTG
Inpharmati 521 CTGCGACCCGCGCCCTTCTCCGATCTGACCTTATGATCAGCTTACTGGCTCTG
*****

```

2 つの配列は 539 残基全体で 99.8% の同一性を示す。
ヌーブ: 531.8; ギャップ頻度: 0.2%

クローン化配列 (アラインメントの上位) は、推定配列と比較してヌーブ位置 50 で追加の G を含む。

【 図 8 】

Figure 8

推定配列 (配列番号: 8a) と比較したクローン化 INSP033 のアミノ酸配列 (配列番号: 8) の対のアラインメント

```

INPHARMATI MYSQEANLSPDHEBAGNFSAQKCGPSKCHLEBALQPHRDVFSFHSFALNTWPEYAVC
CLONED_240 -----MISFDLHEDAGNFSAQKCGPSKCHLEBALQPHRDVFSFHSFALNTWPEYAVC
*****

INPHARMATI SRDRTQGRDRCLPPLLVFVFRRLKVAIMGISASTLKNRSLQQQLRHKTSVQKGGIAGV
CLONED_240 SRDRTQGRDRCLPPLLVFVFRRLKVAIMGISASTLKNRSLQQQLRHKTSVQKGGIAGV
*****

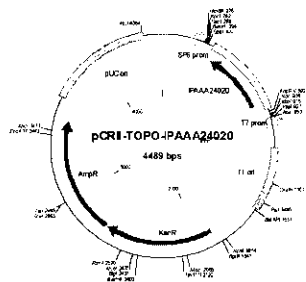
INPHARMATI MRWGHQASGAFDLSRSSSKRSPTKSSPSESATSSFFLRS
CLONED_240 MRWGHQASGAFDLSRSSSKRSPTKSSPSESATSSFFLRS
*****

```

【 図 9 】

Figure 9

PCRII-TOPO-IPAAA24020 のマップ



分子: pCRII-TOPO-IPAAA24020, 4489 bps DNA 環状
 ファイル名: 13122.cm5, dated 08 Oct 2002

説明: プラスミド ID 13122

分子の特徴:

型	開始	終点	名称	説明
マーカ	239		SP6 prom	
領域	337	875		IPAAA24020 PCR 産物
遺伝子	828	366 C	IPAAA24020	ORF
マーカ	964		C T7 prom	
領域	1129	1543	f1 ori	
遺伝子	1877	2671	KanR	
遺伝子	2689	3549	AmpR	
領域	3694	4367	pUC ori	

【 図 10 】

Figure 10

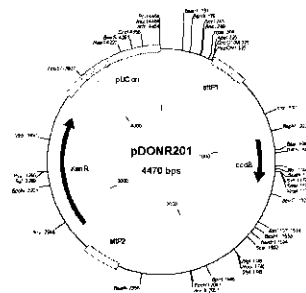
プラスミド pDONR201 のマップ

分子: pDONR201, 4470 bps DNA 環状
 ファイル名: pDONR201.cm5, dated 17 Oct 2002

説明: Gateway エントリ-ベクター (Invitrogen) プラスミド ID# 13309

分子の特徴:

型	開始	終点	名称
領域	332	563	attP1
遺伝子	959	1264	ccdB
領域	2513	2744	attP2
遺伝子	2868	3677	KanR
領域	3794	4467	pUC ori



【 図 11 】

Figure 11

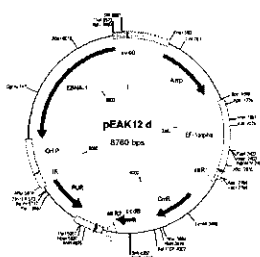
発現ベクター-pEAK12d のマップ

分子: pEAK12 d, 8760 bps DNA 環状
 ファイル名: pEAK12DEST.cm5, dated 15 Oct 2002

説明: Mammalian cell expression vector (プラスミド ID 11345)

分子の特徴:

型	開始	終点	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	Amp	
領域	1690	2795	EF-1alpha	
領域	2703	2722		pEAK12d プライマーの位置
領域	2796	2845		MCS
マーカ	2855		attR1	
遺伝子	3256	3915	CmR	
遺伝子	4257	4562	ccdB	
マーカ	4603		C attR2	
領域	4733	4733		MCS
領域	4734	5162		ポリ A/スプライシング
領域	4819	4848 C		pEAK12R プライマーの位置
遺伝子	5781	5163 C	PUR	ビュ-ロマイシン
領域	6005	5782 C	tK	tK プロモーター
領域	6500	6006 C	Ori P	
遺伝子	8552	6500 C	EBNA-1	
領域	8553	8752	sv40	



【 図 12 】

Figure 12

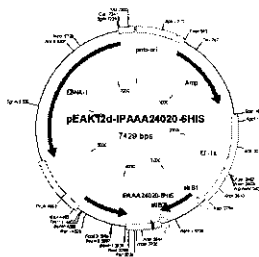
pEAK12d-IPAAA24020-6HIS のプラスミドマップ

分子: pEAK12d-IPAAA24020-6HIS, 7429 bps DNA 環状

ファイル名: 12156.cm5,
 説明: プラスミド ID 12156

分子の特徴:

型	開始	終点	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	Amp	
領域	1690	2795	EF-1a	promoter
マーカ	2855		attB1	
遺伝子	2888	3367	IPAAA24020-6HIS	ORF
マーカ	3383		attB2	
領域	3403	3831		ポリ A/スプライシング
領域	3517	3498 C		pEAK12d R プライマー
遺伝子	4450	3832 C		ビュ-ロマイシン
領域	4674	4451 C		tK プロモーター
領域	5169	4675 C		Ori P
遺伝子	7221	5169 C	EBNA-1	
領域	7222	7421		sv40



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internatic Application No PCT/GB 02/05890
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/53 C07K16/24 A61K38/19 C12Q1/68 C12Q1/25		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 20 April 2000 (2000-04-20) Database accession no. AP001852 XP002256340 nt 102626-103092	7-11
X	DATABASE EMBL 'Online! 20 November 2001 (2001-11-20) Database accession no. AC099689 XP002256341 nt 8312-8776	7-11
X	DATABASE EMBL 'Online! 29 March 2001 (2001-03-29) Database accession no. AC091027 XP002256342 nt 89426-89890	7-11
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 1 October 2003	Date of mailing of the international search report 23/10/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-9016	Authorized officer Chavanne, F .	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/GB 02/05890

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! 21 January 2000 (2000-01-21) Database accession no. AC021857 XP002256343 nt 94171-94632</p>	7-11
X	<p>WO 01 51510 A (MAXYGEN APS) 19 July 2001 (2001-07-19)</p> <p>abstract page 25, line 25-30 page 4, line 20-30 page 35, line 13 -page 51, line 33</p>	1-5,7,8, 10,11, 13,17-41
X	<p>WO 00 73459 A (ZYMOGENETICS INC) 7 December 2000 (2000-12-07)</p> <p>abstract page 5, line 34 -page 6, line 2 page 13, line 18 -page 15, line 2 page 41, line 18 -page 42, line 25 page 48, line 23-29</p>	1,3-5,7, 8,10,11, 13,17-41
X	<p>HOLLY R ET AL: "Cloning of interleukin 21 and IL-21R: A novel cytokine-receptor pair involved in NK cells and B-lymphocyte function", BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, VOL. 96, NR. 11, PART 1, PAGE(S) 487A, ABSTRACT2093 XP002956367 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1,3-5,7, 8,10,11, 13,27

International Application No. PCT/GB 02 05890

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 18, 26, 34 and 41 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 31-33 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

Claims Nos.: 12, 14-16, 17(part), 28(part), 30(part)

Present claims 12, 14-16, 17(part), 28(part) and 30(part) relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not to be found. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible.

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

International application No. PCT/GB 02/05890
--

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. Claims Nos.: 12, 14-16, 17(part), 28(part), 30(part)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	pplication No
PCT/GB	02/05890

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0151510	A	19-07-2001	AU 2353301 A 24-07-2001
			BR 0107561 A 19-11-2002
			CA 2395713 A1 19-07-2001
			CN 1404401 T 19-03-2003
			CZ 20022727 A3 13-11-2002
			WO 0151510 A2 19-07-2001
			EP 1250154 A2 23-10-2002
			HU 0203751 A2 28-07-2003
			JP 2003519478 T 24-06-2003
			NO 20023315 A 05-09-2002
			SK 11672002 A3 03-12-2002
			US 2003118612 A1 26-06-2003
			US 2003158375 A1 21-08-2003
			US 2002004483 A1 10-01-2002
			US 2003064922 A1 03-04-2003
			ZA 200204625 A 11-12-2002
WO 0073459	A	07-12-2000	AU 5724700 A 18-12-2000
			CA 2414214 A1 07-12-2000
			EP 1181369 A1 27-02-2002
			JP 2003501034 T 14-01-2003
			WO 0073459 A1 07-12-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 33/06	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 39/02	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/52	A 6 1 P 39/02	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/52	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	

C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/566	G 0 1 N	33/53	M
		G 0 1 N	33/566	
		C 1 2 N	5/00	A
		A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ, GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE, ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ファガン リチャード ジョセフ
イギリス ロンドン ダブリュ1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 インフ
ァーマティカ

(72)発明者 フェルプス クリストファー ベンジャミン
イギリス ロンドン ダブリュ1ティー 2エヌユー チャーロット ストリート 60 インフ
ァーマティカ

(72)発明者 ガッターリッジ アレックス
イギリス ケンブリッジシャー シービー3 7ジェイエフ ハスリングフィールド ブロード
レーン 23

(72)発明者 パワー クリスチン
フランス エフ-01710 トワリ リュ デ ジョンキーユ 10

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA21 BA43 CA01 GA11 HA12 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ79 QQ91 QQ96 QR32 QR48
QR55 QS32 QS33 QS34 QX01
4B065 AA93Y AB01 AC15 BA02 CA24 CA25 CA44 CA45 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA01 BA02 DA01 NA14 ZA022
ZA332 ZA342 ZA362 ZA452 ZA512 ZA542 ZA552 ZA662 ZA682 ZA702
ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972 ZB072 ZB082 ZB112 ZB132
ZB152 ZB262 ZB332 ZB352 ZB382 ZC212 ZC332 ZC352 ZC372 ZC552
4C085 AA03 CC21 DD62
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA02 ZA33 ZA34 ZA36 ZA45
ZA51 ZA54 ZA55 ZA66 ZA68 ZA70 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94
ZA96 ZA97 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB33
ZB35 ZB38 ZC33 ZC35 ZC37 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA01 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005532034A5	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2003556442	申请日	2002-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	Inpharmatica公司有限公司		
申请(专利权)人(译)	Inpharmatica公司有限公司		
[标]发明人	ファガンリチャードジョセフ フェルプスクリストファーベンジャミン ガッターリッジアレックス パワークリスチン		
发明人	ファガン リチャード ジョセフ フェルプス クリストファー ベンジャミン ガッターリッジ アレックス パワー クリスチン		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K35/76 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9 /10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31 /00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/02 C07K14/52 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	A01K2217/075 A61K38/00 A61K39/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11 /06 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P27 /16 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/00 A61P39/02 A61P43/00 C07K14 /52 C07K14/5759 Y02A50/412 A61K38/19 C12Q1/6813		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K35/76 A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P9 /04 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P27 /16 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/02 C07K14/52 C07K16/18 C12N1 /15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33 /566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC15 4B065 /BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084 /ZA022 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA542 4C084 /ZA552 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084 /ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084 /ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB382 4C084/ZC212 4C084/ZC332 4C084		

/ZC352 4C084/ZC372 4C084/ZC552 4C085/AA03 4C085/CC21 4C085/DD62 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA33 4C087/ZA34 4C087/ZA36 4C087/ZA45 4C087/ZA51 4C087/ZA54 4C087/ZA55 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA70 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZB38 4C087/ZC33 4C087/ZC35 4C087/ZC37 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

代理人(译)

小川伸男

优先权

2001030720 2001-12-21 GB

其他公开文献

JP2005532034A

摘要(译)

本发明涉及确定为四螺旋束细胞因子家族的一个成员在本文 (INSP032 , INSP033 , INSP034 , INSP036 , INSP038) 新蛋白 , 以及从所述蛋白及其编码基因的核酸序列的疾病的诊断 , 预防和治疗。