

(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2005-508614

(P2005-508614A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 2 9
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-510767 (P2003-510767)	(71) 出願人	301005050 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) (22) 出願日	平成14年7月5日(2002.7.5)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月25日(2003.12.25)	(72) 発明者	グリフィン、ジェニファー・エイ アメリカ合衆国カリフォルニア州94555・フレモント・メローウェイ 33691
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/021105		
(87) 国際公開番号	W02003/004608		
(87) 国際公開日	平成15年1月16日(2003.1.16)		
(31) 優先権主張番号	60/303, 745		
(32) 優先日	平成13年7月6日(2001.7.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/305, 402		
(32) 優先日	平成13年7月13日(2001.7.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/308, 158		
(32) 優先日	平成13年7月27日(2001.7.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物代謝酵素

## (57) 【要約】

本発明の種々の実施態様は、ヒト薬物代謝酵素(DME)群および、DMEを同定しコードするポリヌクレオチド群を提供する。本発明の実施例はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。別の幾つかの実施態様は、DMEの異常発現に関連する疾患を、診断、治療または予防する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO:1-13 (配列番号 1 乃至 13) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO:1-5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10-11 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) SEQ ID NO:6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(d) SEQ ID NO:8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 98% が同一であるような天然アミノ酸配列を持つポリペプチド

(e) SEQ ID NO:13 のアミノ酸配列に対して少なくとも 99% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(f) SEQ ID NO:1-13 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および

(g) SEQ ID NO:1-13 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片

10

## 【請求項 2】

SEQ ID NO:1-13 からなる群から選択したアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

20

## 【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

SEQ ID NO:14-26 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドへ機能的に連結したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを有する遺伝形質転換生物。

## 【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換される細胞を培養する過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とからなる方法。

40

## 【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-13 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

## 【請求項 12】

以下からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

(a) SEQ ID NO:14-26 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:14-26 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90

50

%が同一であるような天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(c) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(d) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (a) ~ (d)のRNA等価物

【請求項13】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドを持つ、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項14】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を持つ少なくとも20の連続したヌクレオチドを持つプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程とを含む方法。

【請求項15】

前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、

(b) 前記の増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の有無を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を含む請求項17の組成物。

【請求項19】

機能的DME(新規の薬物代謝酵素)の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項17の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項20】

請求項1のポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項21】

請求項20に記載の方法で同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項22】

機能的DMEの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項21の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項23】

請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスク

10

20

30

40

50

リーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項24】

請求項23の方法で同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを有する組成物。

【請求項25】

機能的DMEの過剰発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項24の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

10

【請求項26】

請求項1のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、

(b) 請求項1のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程を含む方法。

【請求項27】

請求項1のポリペプチドの活性をモジュレート(調節)する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドの活性が許容される条件下で、請求項1のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、

(c) 試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性と比較する過程を含み、試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

20

【請求項28】

請求項5の配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変するのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現改変を検出する過程と、

(c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

30

【請求項29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生物学的サンプルの核酸と、請求項12のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続するヌクレオチドを持つプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項12のポリヌクレオチドまたはその断片のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである、前記過程と、

40

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生物学的サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示するような方法。

【請求項30】

生体サンプル中のDMEの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

50

( a ) 前記生物学的サンプルと請求項11の抗体との混合を、前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体を形成するのに適した条件下で行う過程と、

( b ) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

【請求項31】

請求項11の抗体であって、

( a ) キメラ抗体

( b ) 単鎖抗体

( c ) Fab断片

( d ) F(ab')<sub>2</sub>断片

( e ) ヒト化抗体のいずれかである抗体。

10

【請求項32】

請求項11に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを有する組成物。

【請求項33】

被験者中のDMEの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項32に記載の組成物の有効量を前記被験者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項34】

前記抗体が標識されることを特徴とする、請求項32に記載の組成物。

【請求項35】

被験者中のDMEの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項34に記載の組成物の有効量を前記被験者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項36】

請求項11の抗体の特異性を持つポリクローナル抗体を調製する方法であって、

( a ) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

( b ) 前記動物から抗体を単離する過程と、

( c ) 前記単離された抗体を前記ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するポリクローナル抗体を同定する過程とを含むような方法。

【請求項37】

請求項36の方法で産生したポリクローナル抗体。

30

【請求項38】

請求項37のポリクローナル抗体と好適なキャリアとを有する組成物。

【請求項39】

請求項11に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を作製する方法であって、

( a ) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

( b ) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

( c ) 前記抗体産出細胞と不死化した細胞とを融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

40

( d ) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

( e ) SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項40】

請求項39に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項41】

請求項40に記載のモノクローナル抗体と適切なキャリアとを有する組成物。

【請求項42】

Fab発現ライブラリのスクリーニングによって前記抗体を産出することを特徴とする、請

50

求項11に記載の抗体。

【請求項43】

組換え免疫グロブリンライブラリをスクリーニングすることにより産出される、請求項11に記載の抗体。

【請求項44】

SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドをサンプル中に検出する方法であって、

(a) 請求項11に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と1サンプルとをインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する或るポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。 10

【請求項45】

SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 請求項11に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と1サンプルとをインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。 20

【請求項46】

マイクロアレイの少なくとも1つのエレメントが請求項13に記載のポリヌクレオチドであるマイクロアレイ。 20

【請求項47】

ポリヌクレオチド群を有する或るサンプルの発現プロファイルを作製する方法であって、

(a) サンプル中のポリヌクレオチドを標識化する過程と、

(b) ハイブリダイゼーション複合体が形成されるのに適した条件下で請求項46のマイクロアレイのエレメントとサンプル中の標識化ポリヌクレオチドとを接触させる過程と、

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量する過程を含む方法。

【請求項48】

固体基板上の固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を有するアレイであって、少なくとも1つの前記ヌクレオチド分子が、或る標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチド群と特異的にハイブリダイズ可能な最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を含み、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項12に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。 30

【請求項49】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項50】

請求項48に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。 40

【請求項51】

請求項48に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項52】

請求項48に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項53】

請求項48に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列を有するヌクレオチド分子にハイブリダイズした前記の標的ポリヌクレオチドを有す 50

ることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 4】

請求項48に記載のアレイで、或るリンカーが少なくとも1つの前記のヌクレオチド分子と前記の固体基板とを連結していることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 5】

請求項48に記載のアレイで、該基板上的固有の物理的位置の各々が複数のヌクレオチド分子を含み、任意の単一の固有の物理的位置でのその複数のヌクレオチド分子は同一の配列を有し、該基板上的固有の物理的位置の各々は、該基板上的別の固有の物理的位置でのヌクレオチド分子群の配列とは異なる或る配列を有するヌクレオチド分子群を含むことを特徴とするアレイ。

10

【請求項 5 6】

SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

20

【請求項 6 1】

SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 2】

SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 3】

SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 4】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 5】

SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

30

【請求項 6 6】

SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 7】

SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 8】

SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 9】

SEQ ID NO:14のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 0】

SEQ ID NO:15のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 7 1】

SEQ ID NO:16のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 2】

SEQ ID NO:17のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 3】

SEQ ID NO:18のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 4】

SEQ ID NO:19のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7 5】

SEQ ID NO:20のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

50

## 【請求項 7 6】

SEQ ID NO:21のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 7 7】

SEQ ID NO:22のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 7 8】

SEQ ID NO:23のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 7 9】

SEQ ID NO:24のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 8 0】

SEQ ID NO:25のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

10

## 【請求項 8 1】

SEQ ID NO:26のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規の核酸群、それら核酸がコードする薬物代謝酵素群ならびに、これらの核酸とタンパク質とを利用した、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、内分泌障害、眼の障害、代謝障害、および肝障害を含む胃腸障害の、診断、治療、および予防に関する。本発明はまた、該核酸と薬物代謝酵素との発現への、外因性化合物の効果のアセスメントに関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

薬物の代謝および薬物の体内の移動(薬物動態学)は、その効果、毒性、および他の薬物との相互作用を判定する上で重要である。薬物の吸収、様々な組織への分布、および薬物代謝産物の排除の、3つのプロセスが薬物動態を支配する。これらのプロセスは薬物代謝に密接に関係するが、それは様々な代謝修飾が、溶解性、受容体への結合、および排泄速度を含む、薬物の物理化学的特性および薬理学的特性の大部分を変容させるためである。薬物を修飾する代謝経路はまた、ステロイド、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、およびビタミン等、様々な天然基質を受容する。従って、これらの経路における酵素は、天然化合物、薬物、発癌物質、変異誘発物質、および生体異物の間の生化学的および薬理学的相互作用の重要な部位となる。

30

## 【0003】

薬物代謝における遺伝的な差異が、個体間で薬物効果および毒性のレベルの著しい違いを生むことが以前から認識されている。治療指数が狭い薬物または、コデイン等、生理活性を必要とする薬物の場合、このような遺伝子多型は極めて重要たり得る。更に、有望な新薬が、患者群の一部のみを害し得る毒性のため臨床試験でしばしば排除される。薬物代謝酵素が重要な一部を占める薬理ゲノミクス研究が進歩すれば、薬物の効果および毒性の疑問に取り組むツールが発展し、そのような情報が拡大されうるのであろう(Evans, W. E.およびR. V. Relling (1999) Science 286:487-491を参照)。

## 【0004】

薬物代謝反応は、薬物分子を機能化して更なる代謝のために準備するフェーズIと抱合性のフェーズIIに分類される。一般に、フェーズIの反応生成物は部分的或いは完全に不活性であり、フェーズIIの反応生成物は主要な排泄種である。しかしながら、フェーズI反応生成物は、投与された元の薬物よりも活性が高い場合があり、この代謝活性化原理がプロドラッグとして利用される(例えば、L-ドパ)。加えて、数種の非毒性化合物(例えば、アフラトキシン、ベンゾ- -ピレン)は、これらの経路を経て毒性中間体へ代謝される。フェーズI反応は通常、薬物代謝における律速段階である。しかし、その化合物または他の化合物類への事前曝露によって、フェーズI酵素群の発現を誘発させることができ、それによって、代謝経路を経る基質フラックスを増し得る(Klaassen, C.D.他(1996) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill, New Yo

40

50

rk, NY, 113-186ページ; Katzung, B.G. (1995) Basic and Clinical Pharmacology, AppletonおよびLange, Norwalk, CT, 48-59ページ; Gibson, G.G.およびP. Skett (1994) Introduction to Drug Metabolism, Blackie Academic and Professional, London参照)。

#### 【0005】

薬物代謝酵素 (DME) は幅広い基質特異性を有する。これは、多種多様な抗体がそれらの抗原に対して高い特異性を有する免疫系とは対照的である。多様な分子を代謝するDMEの能力によって、代謝のレベルにおいて薬物相互作用の可能性が生まれる。例えば、1化合物による、或るDMEの誘導は、その酵素による他の化合物の代謝に影響し得る。

#### 【0006】

DME類は、それらが触媒する反応の種類、および関係する補因子に従って分類されている。フェーズI酵素の主なクラスには、限定するものではないがチトクロームP450およびフラビン含有モノオキシゲナーゼが含まれる。フェーズI型触媒サイクルおよび反応に関与するその他の酵素クラスには、限定するものではないが、NADPHチトクロームP450還元酵素 (CPR)、ミクロソームチトクロームb5/NADHチトクロームb5レダクターゼ系、フェレドキシソ/フェレドキシソレダクターゼレドックス対、アルド/ケト還元酵素、およびアルコールデヒドロゲナーゼが含まれる。フェーズII酵素の主なクラスには、限定するものではないが、UDPグルクロニルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Nアシルトランスフェラーゼ、およびNアセチルトランスフェラーゼが含まれる。

10

#### 【0007】

##### チトクロームP450およびP450触媒サイクル関連酵素

チトクロームP450スーパーファミリー酵素のメンバーは、様々な基質の酸化代謝を触媒する。そのような基質としては、ステロイド、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、およびビタミン等の天然化合物や、薬物、発癌物質、変異誘発物質、および生体異物が含まれる。P450ヘム-チオレートタンパク質としても知られるチトクロームP450は通常、P450含有モノオキシゲナーゼ系と呼ばれる多成分電子伝達鎖における末端酸化酵素として作用する。触媒される特異的反応には、ヒドロキシル化、エポキシ化、N-酸化、スルホキシド化、N-脱アルキル、S-脱アルキル、およびO-脱アルキル、脱硫酸化、脱アミノ化、並びにアゾ、ニトロ、およびN-オキシド基の還元が含まれる。これらの反応は、動物における糖質コルチコイド、コルチゾール、エストロゲン、およびアンドロゲンのステロイド産生や、昆虫における殺虫剤耐性や、植物における除草剤耐性および花の発色や、微生物による環境浄化バイオレメディエーションに関係する。薬物、発癌物質、変異誘発物質、および生体異物にチトクロームP450が作用して、解毒あるいは、その物質の、より毒性の強い生成物への変換を引き起こし得る。チトクロームP450は肝臓に豊富に存在するが、その他の組織にも出現し、これらの酵素はミクロソームに位置する (ExPASy ENZYME EC 1.14.14.1; Prosite PDOC00081 Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature; PRINTS EP450I E-Class P450 Group I signature; Graham-Lorence, S.およびPeterson, J. A. (1996) FASEB J. 10:206-214を参照)。

20

30

#### 【0008】

400種類のチトクロームP450が、細菌、真菌、植物、および動物を含む様々な生物において同定されている (Graham-Lorence, 前出)。Bクラスは原核生物および真菌に見られ、Eクラスは細菌、植物、昆虫、脊椎動物、および哺乳動物に見られる。5つのサブクラス即ちグループが、EクラスチトクロームP450の大きなファミリーの中に含まれる (PRINTS EP450I E-Class P450 Group I signature)。

40

#### 【0009】

全てのチトクロームP450はヘム補因子を用いており、構造的特性を共有する。ほとんどのチトクロームP450は、400~530アミノ酸の長さである。この酵素の二次構造は、約70%のヘリックスと約22%のシートである。このタンパク質のC末端部におけるヘム結合部位の周りの領域は、全てのチトクロームP450で保存されている。このヘム-鉄リガンド領域におけるアミノ酸10個のシグネチャ配列が同定され、この配列には、第

50

5の配位部位にある、ヘム鉄の結合に關与する保存されたシステインが含まれる。真核生物チトクロームP450では、通常は膜貫通領域がこのタンパク質の初めの15~20のアミノ酸において見られ、一般に、約15の疎水性残基およびそれに続く正に帯電した1つの残基からなる(Prosites PDOC00081前出; Graham-Lorence前出を参照)。

#### 【0010】

チトクロームP450酵素は、細胞増殖および発達に關係する。この酵素は、化学物質を代謝して、DNAとの付加体を形成する反応性中間体にすることで起こる化学的な変異誘発および発癌において役割を持つ(Nebert, D. W.およびGonzalez, F. J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:945-993)。これらの付加体は、発癌に導く、ヌクレオチド変化およびDNA再編成を引き起こし得る。肝臓およびその他の組織におけるチトクロームP450の発現は、多環式芳香族炭化水素、ペルオキシソーム増殖因子、フェノバルビタールおよび、糖質コルチコイドであるデキサメタゾン等、生体異物によって誘発される(Dogra, S. C.他(1998) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25:1-9)。或るチトクロームP450タンパク質は、P450遺伝子CYP1B1における突然変異が原発性先天性緑内障を引き起こすように、眼の発達に關与する可能性がある(Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) \*601771 Cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1; CYP1B1)。

10

#### 【0011】

チトクロームP450は炎症および感染に關係する。肝チトクロームP450活性は、様々な感染および炎症性の刺激によって大いに影響され、抑制される活性と誘発される活性がある(Morgan, E. T. (1997) *Drug Metab. Rev.* 29:1129-1188)。in vivoで觀察される効果は、炎症誘発性のサイトカインおよびインターフェロンによって模倣され得る。2つのチトクロームP450タンパク質に対する自己抗体は、自己免疫性多腺性内分泌不全症I型(APECED、1種の多腺性自己免疫症候群)の患者に見られた(OMIM \*240300 Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy)。

20

#### 【0012】

チトクロームP450類における突然変異は、乳幼児期の副腎障害で最も多い先天性副腎過形成や、偽ビタミンD欠乏くる病、脳腱黄色腫症(進行性神経機能障害、早発性アテローム性動脈硬化症、および白内障によって特徴付けられる、1種の脂質貯蔵病)、抗凝血薬であるクマリンおよびワルファリンに対する遺伝性の耐性を含む、種々の代謝障害に結び付けられる(Isselbacher, K.J.他(1994) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, Inc. New York, NY, 1968-1970ページ; Takeyama, K.他(1997) *Science* 277:1827-1830; Kitanaka, S.他(1998) *N. Engl. J. Med.* 338:653-661; OMIM \*213700 Cerebrotendinous xanthomatosis;およびOMIM #122700 Coumarin resistance)。チトクロームP450タンパク質アロマトラーゼの、極度に高レベルの発現が、重度の女性化乳房(gynecomastia, feminization)を有する1少年の層状線維化肝細胞癌(fibrolamellar hepatocellular carcinoma)に見られた(Agarwal, V.R. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:1797-1800)。

30

#### 【0013】

チトクロームP450触媒サイクルは、NADPHチトクロームP450レダクターゼ(CPR)によるチトクロームP450の還元によって完了する。チトクロームb5とNADPHチトクロームb5レダクターゼとからなる別のミクロソーム電子伝達系は、チトクロームP450触媒サイクルへの電子の主要な供与体ではないと一般に思われている。しかし、Lamb, D.C.他(1999; *FEBS Lett.* 462:283-288)による近年の研究報告は、ミクロソームチトクロームb5/NADPHチトクロームb5レダクターゼ系によって効果的に還元およびサポートされ得る或る鷲口瘡カンジダ(*Candida albicans*)チトクロームP450(CYP51)を同定する。従って、この代替電子供与系によってサポートされる多くのチトクロームP450が存在すると思われる。

40

#### 【0014】

チトクロームb5レダクターゼはまた、赤血球において、酸化ヘモグロビン(酸素を輸送できない、メトヘモグロビンすなわちferrihemoglobin)を、活性型ヘモグロビン(ferrohemin)へ還元する。酸化剤または、十分に還元されていない異常ヘモグロビン(ヘ

50

モグロビンM)が高いレベルで存在すると、メトヘモグロビン血症が引き起こされる。メトヘモグロビン血症はまた、赤血球チトクロームb5レダクターゼの遺伝的な欠損症からも起こり得る(概説はMansour, A.およびLurie, A.A. (1993) Am. J. Hematol. 42:7-12を参照)。

#### 【0015】

チトクロームP450ファミリーのメンバーはまた、ビタミンDの合成および異化に密接に関係している。ビタミンDは、植物組織で生成されるエルゴカルシフェロール(ビタミンD<sub>2</sub>)および動物組織で生成されるコレカルシフェロール(ビタミンD<sub>3</sub>)の、2種の生物学的に等価なプロホルモンとして存在する。後者のコレカルシフェロールは、7-デヒドロコレステロールが近紫外線(すなわち290~310 nm)に曝露されると形成される。通常は、皮膚が短時間日光に曝されれば生成される(概説はMiller, W.L.およびPortale, A.A. (2000) Trends Endocrinol. Metab. 11:315-319を参照)。

10

#### 【0016】

両方のプロホルモン型は更に、肝臓において酵素25-ヒドロキシラーゼによって25-ヒドロキシビタミンD(25(OH)D)へ更に代謝される。25(OH)DはビタミンDの最も豊富に存在する前駆型であって、腎臓において酵素25-ヒドロキシビタミンD<sub>1</sub>-ヒドロキシラーゼ(1-ヒドロキシラーゼ)によって、活性型である1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25(OH)<sub>2</sub>D)へ更に代謝される。1,25(OH)<sub>2</sub>D生成の調節は主に、合成経路の、この最終ステップで行われる。1-ヒドロキシラーゼ活性は、酵素産物(1,25(OH)<sub>2</sub>D)の循環レベル、並びに副甲状腺ホルモン(PTH)、カルシトニン、インスリン、カルシウム、リン、成長ホルモン、およびプロラクチンのレベルなど、幾つかの生理学的因子に左右される。更に、腎臓外の1-ヒドロキシラーゼ活性が報告され、組織特異的かつ局所的な、1,25(OH)<sub>2</sub>D生成の調節も生物学的に重要であり得ることを示唆している。1,25(OH)<sub>2</sub>Dの24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)<sub>2</sub>D)への触媒作用は酵素25-ヒドロキシビタミンD 24-ヒドロキシラーゼ(24-ヒドロキシラーゼ)が関与し、これも腎臓で起こる。24-ヒドロキシラーゼはまた、基質として25(OH)Dを利用できる(Shinki, T.他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12920-12925; Miller, W.L.およびPortale, A.A. 前出、並びにその参考文献)。

20

#### 【0017】

ビタミンD25-ヒドロキシラーゼ、1-ヒドロキシラーゼ、および24-ヒドロキシラーゼは全て、NADPH依存性I型(ミトコンドリア)チトクロームP450酵素であって、そのファミリーの他のメンバーとの高い相同性を示す。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼはまた、幅広い基質特異性を示し、胆汁酸中間体の26-ヒドロキシル化および、コレステロールの25-ヒドロキシル化、26-ヒドロキシル化、および27-ヒドロキシル化をも行う可能性がある(Dilworth, F.J.他(1995) J. Biol. Chem. 270:16766-16774; Miller, W.L.およびPortale, A.A. 前出、並びにその参考文献)。

30

#### 【0018】

ビタミンDの活性型(1,25(OH)<sub>2</sub>D)は、カルシウムおよびリン酸の恒常性に関与し、骨髄性細胞および皮膚細胞の分化を促進する。ビタミンDの代謝に関する酵素(例えば、1-ヒドロキシラーゼ)の欠乏によって生じるビタミンD欠乏は、低カルシウム血症、低リン酸血症および、ビタミンD依存性(感受性)くる病(骨密度の低下並びに、あひる歩行を伴う内反膝すなわちO脚という特徴的症候を示す疾患)を生じる。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼの欠損は、脳腱黄色腫症(アキレス腱、脳、肺、およびその他の多くの組織におけるコレステロールおよびコレスタノールの沈着という特徴をもつ脂質貯蔵病)を引き起こす。この疾患は、進行性神経機能障害(思春期後の小脳性運動失調症を含む)、アテローム性動脈硬化症、および白内障を示す。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼの欠乏によってくる病が起きないことから、25(OH)D合成の別の経路が存在することが推定される(Griffin, J. E.およびZerwekh, J. E. (1983) J. Clin. Invest. 72: 1190-1199; Gamblin, G. T.他(1985) J. Clin. Invest. 75: 954-960; およびMiller, W. L.およびPortale, A. A. 前出)。

40

50

## 【 0 0 1 9 】

フェレドキシンおよびフェレドキシンレダクターゼは電子伝達アクセサリタンパク質であって、少なくとも1つのヒトチトクロームP450種 (CYP27遺伝子によってコードされるチトクロームP450c27)をサポートする(Dilworth, F. J.他(1996) Biochem. J. 320:267-71)。ストレプトマイセス グリセウス (Streptomyces griseus) のチトクロームP450であるCYP104D1は、大腸菌において非相同的に (heterologously) 発現され、内因性フェレドキシンおよびフェレドキシンレダクターゼ酵素によって還元されることが発見された (Taylor, M.他(1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 263:838-42)。このことから、多くのチトクロームP450種が、フェレドキシン/フェレドキシンレダクターゼ対によってサポートされることが示唆される。フェレドキシンレダクターゼはまた、或るモデル薬物代謝系で、抗腫瘍抗生物質であるアクチノマイシンDを反応性フリーラジカル種に還元した (Flitter, W.D.およびMason, R.P. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 267:632-639)。

10

## 【 0 0 2 0 】

フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FM0)

フラビン含有モノオキシゲナーゼは、異例な範囲の基質群の、求核性の窒素、硫黄、およびリンのヘテロ原子を酸化する。チトクロームP450と同様、FM0はミクロソーム酵素であってNADPHおよびO<sub>2</sub>を用い、その基質はチトクロームP450の基質と広範に重なる。FM0は、肝臓、腎臓、および肺などの組織に分布している。

## 【 0 0 2 1 】

組織特異的に発現される、5つの異なった既知のFM0アイソフォーム (FM01、FM02、FM03、FM04、およびFM05) が哺乳動物に見られる。これらのアイソフォームは基質特異性が異なり、更に様々な化合物による阻害および、反応の立体特異性等、他の特性も異なる。FM0は、アミノ酸13個のシグネチャ配列を有し、その成分はN末端の3分の2の配列にまたがる。それら成分には、また、多くのNヒドロキシル化酵素に見られるFATGYモチーフ、およびFAD結合領域を含む (Stehr, M.他(1998) Trends Biochem. Sci. 23:56-57; PRINTS FMOXYGENASE Flavin-containing monooxygenase signature)。

20

## 【 0 0 2 2 】

特異的な反応には、求核性三級アミンのNオキシドへの酸化、二級アミンのヒドロキシルアミンおよびニトロソへの酸化、一級アミンのヒドロキシルアミンおよびオキシムへの酸化、および硫黄含有化合物およびホスフィンのS-オキシドおよびP-オキシドへの酸化が含まれる。ヒドラジン、ヨウ化物、セレン化物、および硼素含有化合物も基質である。FM0は化学的にチトクロームP450に類似しているが、FM0は例えばその高い熱不安定性およびチトクロームP450の非イオン界面活性剤感受性に基づいて *in vitro* でチトクロームP450から通常は区別できる。しかしながら、FM0のアイソフォーム間で熱安定性および界面活性剤感受性が異なるため、これらの特性を同定に用いるのは困難である。

30

## 【 0 0 2 3 】

FM0は、幾つかの薬物および生体異物の代謝に重要な役割を果たす。FM0 (肝臓FM03) は、(S)ニコチンの(S)ニコチンN-1'-オキシド (尿中に排泄) への代謝を主に担う。FM0はまた、胃潰瘍の治療に広く用いられるH<sub>2</sub>-アンタゴニストであるシメチジンのS-酸素化に関与する。FM0の肝臓発現型は、チトクロームP450と同じ調節制御下でない。例えば、ラットにおいて、フェノバルビタール処理によりチトクロームP450が誘導されるが、FM01は抑制される。

40

## 【 0 0 2 4 】

FM0の内因性基質としては、システアミン (二硫化物であるシスタミンへ酸化される) および、トリメチルアミンN-オキシドへ代謝されるトリメチルアミン (TMA) が含まれる。TMAは腐った魚のような臭いがし、FM03アイソフォームの突然変異によって、悪臭がする遊離アミンが大量に汗、尿、および呼気から排出されるようになる。これらの症状が、魚臭症候群の名を生んだ (OMIM 602079 Trimethylaminuria)。

## 【 0 0 2 5 】

リジルオキシダーゼ

50

リジルオキシダーゼ (リジン 6 - オキシダーゼ、L0) は、コラーゲンとエラスチンとの架橋結合による結合組織マトリクスの形成に關与する銅依存性アミノキシダーゼである。L0は、約 50 kDaのNグリコシル化された前駆体タンパク質として分泌され、或るメタロプロテアーゼによって切断され成熟型の酵素と成るが、この前駆型も活性である。L0内の銅原子は、酸素へ、また酸素からの電子の伝達に關与し、これらの細胞外マトリクスタンパク質においてリジン残基の酸化的脱アミノ反応を促進する。銅の配位がL0活性に必須であるが、食事による銅の摂取が不十分でも、このアポ酵素の発現はその影響を受けない。しかし、機能的L0の不在は、食餌性銅欠乏に伴う、骨格組織および血管組織の障害に結び付けられる。L0はまた、様々なセミカルバジド、ヒドラジン、およびアミノ亜硝酸 (amino nitrites)、並びにヘパリンによって阻害される。 - アミノプロピオニトリルは、一般に用いられるインヒビターの1つである。L0の活性は、オゾンやカドミウムに応答して増大し、また、局所組織外傷に応答して放出されるホルモンのレベルの上昇に応答して増大する。このようなホルモンの例には、トランスフォーミング成長因子 - 、血小板由来成長因子、アンジオテンシンII、および線維芽成長因子等が含まれる。L0活性における異常は、メンケス症候群および後角症候群 (occipital horn syndrome) に結び付けられる。サイトゾル型のL0酵素は、異常な細胞増殖に關係すると思われる (概説はRucker, R. B.他(1998) Am. J. Clin. Nutr. 67:996S-1002S並びにSmith-Mungo, L. I.およびKagan, H. M. (1998) Matrix Biol. 16:387-398を参照)。

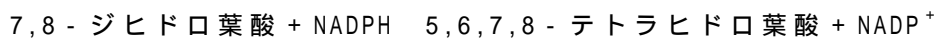
10

【 0 0 2 6 】

#### ジヒドロ葉酸レダクターゼ

20

ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) は遍在性の酵素であって、ジヒドロ葉酸の、テトラヒドロ葉酸へのNADPH依存性の還元を触媒するが、この反応はグリシンとプリン類とのde novo合成、並びにデオキシウリジン-リン酸 (dUMP) のデオキシチミジン-リン酸 (dTMP) への変換における、必須過程である。この基本的な反応は、



である。

【 0 0 2 7 】

DHFR酵素は、トリメトプリム (trimethoprim) およびメトトレキセートなど、様々なジヒドロ葉酸類似体によって阻害され得る。豊富なdTMPがDNA合成に必要であるため、迅速な細胞分裂にはDHFR活性が必要である。DNAウイルス (例えば、ヘルペスウイルス) の複製にも、高いレベルのDHFR活性を必要とする。そのため、DHFRを標的とする薬物が、癌の化学療法や、DNAウイルス複製の抑制に用いられている (同様の理由で、チミジル酸合成酵素も標的酵素である)。DHFRを抑制する薬物は、急激に分裂する細胞 (すなわちDNAウイルス感染細胞) に対して優先的な細胞毒性を持つが、特異性を持たず、分裂する細胞を無差別に破壊する。更に癌細胞は、獲得性の輸送欠陥、または1つ以上のDHFR遺伝子の重複 (duplication) の結果、メトトレキセート等の薬物に対し耐性になり得る (Stryer, L. (1988) Biochemistry. W.H Freeman and Co., Inc. New York. 511-5619ページ)。

30

【 0 0 2 8 】

#### アルド/ケト還元酵素

アルド/ケト還元酵素は単量体NADPH依存性オキシレダクターゼであり、幅広い基質特異性を有する (Bohren, K.M. 他(1989) J. Biol. Chem. 264:9547-9551)。これらの酵素は、カルボニル含有糖および芳香族化合物など、カルボニル含有化合物の、対応するアルコールへの還元を触媒する。従って、様々なカルボニル含有薬物および生体異物はこのクラスの酵素によって代謝されると思われる。

40

【 0 0 2 9 】

ファミリーメンバーであるアルドースレダクターゼによって触媒される既知の或る反応は、グルコースがソルビトールへ還元され、更にソルビトールデヒドロゲナーゼによってフルクトースに代謝される。標準状態では、グルコースのソルビトールへの還元は主な経路ではない。しかしながら、高血糖状態では、ソルビトールの蓄積は糖尿病合併症の発症に關係すると思われる (OMIM \*103880 Aldo-keto reductase family 1, member B1)。こ

50

の酵素ファミリーのメンバーはまた、数種の肝臓で高発現される (Cao, D.他(1998) J. Biol. Chem. 273:11429-11435)。

【0030】

アルコールデヒドロゲナーゼ

アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) は、単純アルコール類を対応するアルデヒド類へ酸化する。ADHはサイトゾル酵素であって、補因子NAD<sup>+</sup>を好み、また亜鉛イオンに結合する。ADHのレベルは肝臓において最も高く、腎臓、肺、および胃粘膜においては低い。

【0031】

既知のADHアイソフォームは、40 kDaのサブユニットからなる二量体タンパク質である。これらのサブユニットをコードする5つの既知の遺伝子座 (a、b、g、p、c) が存在し、その内の幾つかは特徴的な対立遺伝子変異体 (b1、b2、b3、g1、g2) を有する。サブユニットはホモ二量体およびヘテロ二量体を形成することができ、サブユニットの構成によって活性な酵素の特異的特性が決定される。従って、ホロ酵素がクラスI (サブユニット構成、aa、ab、ag、bg、gg)、クラスII (pp)、およびクラスIII (cc) として分類されている。クラスIのADHイソ酵素はエタノールその他の小さい脂肪族アルコールを酸化し、ピラゾールによって阻害される。クラスIIイソ酵素は長鎖の脂肪族アルコールおよび芳香族アルコールを好み、メタノールを酸化できない。また、ピラゾールによって阻害されない。クラスIIIイソ酵素は、更に長い長鎖脂肪族アルコール (5炭素以上) および芳香族アルコールを好み、ピラゾールによって阻害されない。

10

【0032】

短鎖アルコールデヒドロゲナーゼには、様々な基質特異性を有する多数の近縁酵素が含まれる。このグループに含まれるものは哺乳動物酵素であるD- - ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、(R) - 3 - ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、15 - ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ、NADPH - 依存性カルボニルレダクターゼ、コルチコステロイド11- - デヒドロゲナーゼ、エストラジオール - 17 - - デヒドロゲナーゼと、細菌酵素であるアセトアセチル - CoAレダクターゼ、グルコース1 - デヒドロゲナーゼ、3 - - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、20 - - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、リピトールデヒドロゲナーゼ、3 - オキソアシルレダクターゼ、2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase、ソルビトール - 6 - リン酸2 - デヒドロゲナーゼ、7 - - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、cis-1,2-dihydroxy-3,4-cyclohexadiene-1-carboxylate dehydrogenase、シス - トルエンジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ、シス - ベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、ピフェニル - 2,3 - ジヒドロ - 2,3 - ジオールデヒドロゲナーゼ、N-アシルマンノサミン1-デヒドロゲナーゼ (N-acylmannosamine 1-dehydrogenase)、および2 - デオキシ - D - グルコン酸3 - デヒドロゲナーゼがある (Krozowski, Z. (1994) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 51:125-130; Krozowski, Z. (1992) Mol. Cell Endocrinol. 84:C2531; 並びにMarks, A.R.他(1992) J. Biol. Chem. 267:15459-15463)。

20

30

【0033】

UDPグルクロニルトランスフェラーゼ

UDPグルクロニルトランスフェラーゼファミリー (UGT) のメンバーは、補因子ウリジン二リン酸 - グルクロン酸 (UDP - グルクロン酸) から基質へのグルクロン酸基の転移を触媒する。この転移は、通常は求核性ヘテロ原子 (O、N、またはS) に対して行われる。基質の例には、フェーズI反応によって機能的になった生体異物並びに、ビリルビン、ステロイドホルモン、および甲状腺ホルモン等、内因性化合物が含まれる。グルクロン酸抱合の生成物は、基質の分子量が約250g/mol未満であれば尿中に排泄されるが、グルクロン酸抱合された基質がそれより大きい場合は胆汁に排泄される。

40

【0034】

UGTは肝臓、腎臓、腸、皮膚、脳、脾臓、および鼻粘膜のミクロソームに存在する。これらの位置でUGTは、チトクロームP450酵素およびフラビン含有モノオキシゲナーゼとは小胞体膜の同じ側にあるため、フェーズI薬物代謝の生成物への到達に理想的な位置にあ

50

る。UGTは、そのUGTを小胞体膜に固着するC末端膜貫通ドメイン並びに、そのC末端部分における約50のアミノ酸残基の保存されたシグネチャドメインを有する(Prosites PD0C00359 UDP-glycosyltransferase signature)。

#### 【0035】

薬物代謝に関係するUGTは、UGT1およびUGT2の2つの遺伝子ファミリーによってコードされる。UGT1ファミリーのメンバーは、補助因子結合および膜挿入に関係する定常領域、および可変基質結合ドメインを有する、単一の遺伝子座の選択的スプライシングによって生じる。UGT2ファミリーのメンバーは異なる複数の遺伝子座によってコードされ、UGT2AおよびUGT2Bの2つのファミリーに分類される。2Aサブファミリーは嗅上皮で発現し、2Bサブファミリーは肝臓ミクロソームで発現する。UGT遺伝子における突然変異は、高ビリルビン血症(OMIM#143500 Hyperbilirubinemia I)、出生時からの著しい高ビリルビン血症によって特徴付けられるクリグラー-ナジャー症候群(OMIM#218800 Crigler-Najjar syndrome)、ジルベール病と呼ばれる軽度の高ビリルビン血症(OMIM \*191740 UGT1)に関係する。

10

#### 【0036】

##### スルホトランスフェラーゼ

硫酸抱合はO-グルクロン酸抱合を受ける基質と同じ基質の多くに生じ、高水溶性の硫酸エステルが生成される。スルホトランスフェラーゼ(ST)は、補助因子3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸(PAPS)から基質へSO<sub>3</sub><sup>-</sup>を転移することにより、この反応を触媒する。STの基質は主にフェノールおよび脂肪族アルコールであるが、抱合して対応するスルファミン酸を生成する芳香族アミンおよび脂肪族アミンも含まれる。これらの反応による生成物は主に尿中に排泄される。

20

#### 【0037】

STは、肝臓、腎臓、腸管、肺、血小板、および脳を含む様々な組織に見られる。ST酵素は、一般にサイトゾル酵素であって、多数の型が同時に発現される場合が多い。例えば、12種類を越えるSTの型がラットの肝サイトゾルに存在する。これらの生化学的に特徴付けられたSTは、それらの基質選択性に基づいて、アリアルスルホトランスフェラーゼ、アルコールスルホトランスフェラーゼ、エストロゲンスルホトランスフェラーゼ、チロシンエステルスルホトランスフェラーゼ、および胆汁酸塩スルホトランスフェラーゼの5つのクラスに分類される。

30

#### 【0038】

ST酵素活性は、ラットでは性別および年齢によって著しく異なる。発生の合図(developmental cues)と性関連ホルモン類との効果があいまって、ST発現プロファイルにおけるこれらの差異並びに、チトクロームP450等の他のDMEのプロファイルにおけるこれらの差異を生じさせると考えられている。注目すべきは、ネコにおけるSTの高発現が、UDPグルクロニルトランスフェラーゼ活性のレベルの低下を部分的に補償する。

#### 【0039】

STの幾つかの型は、ヒト肝サイトゾルから精製されクローニングされている。熱安定性および基質選択性が異なった2つのフェノールスルホトランスフェラーゼが存在する。熱安定酵素は、パラニトロフェノール、ミノキシジル、およびアセトアミノフェン等のフェノールの硫酸化を触媒し、熱不安定酵素は、ドーパミン、エピネフリンおよびlevadopa等、モノアミン基質を好む。その他のクローニングされたSTには、エストロゲンスルホトランスフェラーゼおよびN-アセチルグルコサミン-6-O-スルホトランスフェラーゼが含まれる。この最後の酵素は、細胞生化学におけるSTの別の主要な役割を例示する。即ち、細胞分化およびプロテオグリカンの成熟に重要となり得る、糖構造の修飾である。実際、或るスルホトランスフェラーゼの遺伝性の欠損は、成熟したケラタン硫酸プロテオグリカンの合成不良という特徴をもつ障害である、斑状角膜変性症に関係すると思われる(Nakazawa, K.他(1984) J. Biol. Chem. 259:13751-13757; OMIM \*217800 Macular dystrophy, corneal)。

40

#### 【0040】

50

### ガラクトシルトランスフェラーゼ

ガラクトシルトランスフェラーゼ類は、溶液に遊離している糖脂質または糖タンパク質の一部である、末端のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)オリゴ糖鎖にガラクトース(Gal)を転移する、グリコシルトランスフェラーゼ(糖転移酵素)のサブセットである(Kolbinger, F.他(1998) J. Biol. Chem. 273:433-440; Amado, M.他(1999) Biochim. Biophys. Acta 1473: 35-53)。ガラクトシルトランスフェラーゼは細胞表面で検出される可溶性細胞外タンパク質であり、ゴルジ体にも存在する。1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、Gal(1-3)GlcNAc結合を有するI型糖鎖を形成する。既知のヒトおよびマウス1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、短いサイトゾルドメイン、1つの膜貫通ドメイン、および8つの保存された領域を持つ1つの触媒ドメインを有すると考えられる(Kolbinger, 前出およびHenet, T.他(1998) J. Biol. Chem. 273:58-65)。マウスUDP-ガラクトース: -N-アセチルグルコサミン 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ-Iでは、領域1がアミノ酸残基の78-83、領域2がアミノ酸残基の93-102、領域3がアミノ酸残基116-119、領域4がアミノ酸残基147-158、領域5がアミノ酸残基の172-183、領域6がアミノ酸残基の203-206、領域7がアミノ酸残基の236-246、領域8がアミノ酸残基の264-275に位置する。マウスUDP-ガラクトース: -N-アセチルグルコサミン 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ-Iの領域8内に見られる1配列の1変異体が細菌ガラクトシルトランスフェラーゼ類にも見られることから、この配列が、或るガラクトシルトランスフェラーゼ配列モチーフを規定すると示唆される(Henet, T. 前出)。近年の研究は、brainiacタンパク質は1種の1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼであることを示唆している(Yuan, Y.他(1997) Cell 88:9-11; およびHenet, T. 前出)。

#### 【0041】

UDP-Gal:GlcNAc-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(-1,4-GalT)(Sato, T.他(1997) EMBO J. 16:1850-1857)は、Gal(1-4)GlcNAc結合を有するII型糖鎖の形成を触媒する。1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの場合と同様に、この酵素の可溶型は、膜結合型の切断によって形成される。1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼに保存されているアミノ酸としては、触媒ドメイン内の、ジスルフィド結合で連結した2つのシステイン残基および、推定上の1つのUDP-ガラクトース結合部位が含まれる(Yadav, S.およびBrew, K.(1990) J. Biol. Chem. 265:14163-14169; Yadav, S. P.およびBrew, K.(1991) J. Biol. Chem. 266:698-703;並びにShaper, N. L.他(1997) J. Biol. Chem. 272:31389-31399)。1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、糖タンパク質または糖脂質上に糖鎖を合成するのに加えて、いくつかの特化した役割を有する。哺乳類では、ラクトアルブミンとのヘテロ二量体の一部として、或る1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼが、泌乳時の乳腺ラクトース生成において機能する。精子の表面上の1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、卵を特異的に認識する受容体として働く。細胞表面1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ類はまた、細胞接着、細胞/基底膜相互作用、正常な細胞遊走、および転移性細胞遊走で作用する(Shur, B.(1993) Curr. Opin. Cell Biol. 5:854-863; およびShaper, J.(1995) Adv. Exp. Med. Biol. 376:95-104)。

#### 【0042】

### グルタチオンSトランスフェラーゼ

グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)によって触媒される基本的な反応は、還元型グルタチオン(GSH)での求電子体の抱合である。GSTはホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質であって、主にサイトゾルに局在するが、ある程度の活性がミクロソームにも見られる。主なイソ酵素は、共通の構造および触媒特性を有し、ヒトにおいてそれらは、 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$ 、および $\sigma$ の4つの大クラスに分類される。2つの最も大きなクラスである $\alpha$ および $\mu$ は、それぞれのタンパク質等電点( $\alpha$ はpIが約7.5~9.0、 $\mu$ はpIが約6.6)によって同定される。それぞれのGSTは、GSHに対する共通の結合部位および可変性疎水性結合部位を有する。それぞれのイソ酵素における疎水性結合部位は、特定の求電子性基質に対して特異的である。GST内の特定のアミノ酸残基が、これらの結合部位および触媒活性に重要で

あるとして同定されている。残基Q67、T68、D101、E104、およびR131は、GSHの結合に重要である (Lee, H-C他(1995) J. Biol. Chem. 270:99-109)。残基R13、R20、およびR69はGSTの触媒活性に重要である (Stenberg G他(1991) Biochem. J. 274:549-555)。

#### 【0043】

殆どの場合、GSTは、潜在的な変異誘発性および発癌性の化学物質を不活性化し解毒するなど有用な機能を果たす。しかしながら、場合によってはそれらの作用が有害となり、化学物質を活性化させて変異誘発性および発癌性にし得る。ラットおよびヒトGSTの幾つかの型は、発癌の検出を助ける、信頼性の高い新生物発生前マーカーである。変異誘発性を調べるための良く知られたエイムス試験に用いられるサルモネラチフィウムなどの細菌株におけるヒトGSTの発現は、変異誘発におけるこれらの酵素の役割を決定するのに役立つ。マウスにおいて肝腫瘍を引き起こすジハロメタン (dihalomethanes) は、GSTによって活性化されると考えられている。この考えは、ジハロメタンはヒトGSTを発現する細菌細胞において非形質導入細胞よりも突然変異誘発性が高いということから支持される (Thier, R.他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8567-8580)。二臭化エチレンおよび二塩化エチレンの変異誘発性が、ヒト GST, A1-1を発現する細菌細胞において上昇し、アフラトキシンB1の変異誘発がGSTの発現が促進されることで実質的に減少する (Simul a, T. P.他(1993) Carcinogenesis 14:1371-1376)。従って、GST活性の制御は、変異誘発および発癌の制御において有用であろう。

10

#### 【0044】

GSTは、多剤耐性 (MDR) として知られている現象である、多くの癌の、薬物治療に対する獲得耐性に関係すると思われる。MDRは、シクロホスファミドなどの細胞毒で治療を受けた癌患者に起こり、その薬物に対する耐性を有するようになった後、更にその他の様々な細胞毒に対しても耐性を有するようになる。GSTレベルの上昇は、これらの薬物耐性癌の幾つかに関係する。また、薬剤に应答してGSTレベルが上昇した後、GSTによって触媒されたGSH抱合反応によりその薬剤が不活化されると考えられる。次に、上昇したGSTレベルにより癌細胞がその他の、GSTに結合する細胞毒から保護される。腫瘍におけるA1-1のレベルの上昇は、シクロホスファミド治療によって生じた薬剤耐性に関係する (Dirven H. A.他(1994) Cancer Res.54: 6215-6220)。従って、癌組織におけるGST活性の調節は、癌患者のMDR治療に有用であろう。

20

#### 【0045】

##### - グルタミルトランスぺプチダーゼ

- グルタミルトランスぺプチダーゼは広範に発現する酵素であって、- グルタミルアミド結合を切断して細胞外のグルタチオン (GSH) の分解を開始させる。GSHの分解は、生合成経路のためにシステインが集まった領域を細胞に提供する。- グルタミルトランスぺプチダーゼはまた、細胞の酸化防止に寄与し、その発現は酸化ストレスによって引き起こされる。この細胞表面局在糖タンパク質は、癌細胞において高いレベルで発現される。幾つかの研究の示唆するところでは、癌細胞の表面における- グルタミルトランスぺプチダーゼの高レベルの活性を前駆薬の活性化に利用し、抗癌治療薬を局所的に高い濃度に行うことができる (Hanigan, M. H. (1998) Chem. Biol. Interact. 111-112:333-42; Taniguchi, N.およびIkeda, Y. (1998) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 72:239-78; Chikh i, N.他(1999) Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 122:367-380)。

30

40

#### 【0046】

##### アシルトランスフェラーゼ

N-アシルトランスフェラーゼ酵素は、アミノ酸抱合体の、活性化したカルボキシル基への転移を触媒する。内因性化合物および生体異物は、サイトゾル、ミクロソームおよびミトコンドリアにおいて、アシル-CoAシンセターゼによって活性化される。次に、アシル-CoA中間体は、サイトゾルまたはミトコンドリアにおけるN-アシルトランスフェラーゼによってアミノ酸 (通常はグリシン、グルタミン、またはタウリンであるが、オルニチン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、アスパラギン酸、およびいくつかのジペプチドを含む) と抱合し、アミド結合を有する代謝産物を形成する。この反応はO-グルクロン酸

50

抱合に相補的であるが、アミノ酸抱合は、グルクロン酸抱合によって生じる場合が多い、反応性および毒性の代謝産物を生成しない。

【0047】

胆汁酸 - CoA: アミノ酸N - アシルトランスフェラーゼ (BAT) は、このクラスの良く特徴づけられた酵素の1つである。BATは、胃腸管において界面活性剤として作用する、胆汁酸抱合体の生成を担う (Falany, C. N.他 (1994) J. Biol. Chem. 269:19375-19379; Johnson, M. R.他 (1991) J. Biol. Chem. 266:10227-10233)。BATはまた、部分肝切除の後の肝臓癌患者の予後の予測インジケータとして有用である (Furutani, M.他 (1996) Hepatology 24:1441-1445)。

【0048】

アセチルトランスフェラーゼ

アセチルトランスフェラーゼは、ヒストンのアセチル化における役割について広く研究されている。ヒストンのアセチル化により、真核細胞におけるクロマチン構造が弛緩し、それによって転写因子が、ゲノムの、影響を受けた領域 (またはゲノム全体) におけるDNAの鑄型のプロモータエレメントに到達できるようになる。これとは対照的に、ヒストンの脱アセチル化により、クロマチン構造が閉じ転写因子の到達が制限されて転写が減少する。このため、ヒストンの脱アセチル化を阻害する化学薬品 (例えば酪酸ナトリウム) を細胞転写の刺激の一般的な手段として用いると、人為的結果であるが遺伝子発現が全体的に上昇する。アセチル化による遺伝子発現の調節 (modulation) はまた、限定するものではないが、p53、GATA - 1、MyoD、ACTR、TFII E、TFII F、および高移動度群タンパク質 (HMG) など、他のタンパク質のアセチル化によっても生じ得る。p53の場合、アセチル化によりDNAへの結合が増大し、p53によって調節される遺伝子の転写が刺激される。プロトタイプのヒストンアセチラーゼ (HAT) は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来するGcn5である。Gcn5は、テトラヒメナp55、ヒトGcn5、およびヒトp300/CBPを含む、アセチラーゼの1ファミリーのメンバーである。ヒストンのアセチル化については概説 (Cheung, W. L.他 (2000) Curr. Opin. Cell Biol. 12:326-333およびBerger, S. L (1999) Curr. Opin. Cell Biol. 11:336-341) を参照されたい。数種のアセチルトランスフェラーゼ酵素は、限定するものではないがアセチルコリンエステラーゼおよびカルボキシルエステラーゼなど幾つかの他の酵素の主なクラスに一般的である、 / ヒドロラーゼフォールド (alpha/beta hydrolase fold) (Center of Applied Molecular Engineering Inst. of Chemistry and Biochemistry - University of Salzburg, <http://predict.sanger.ac.uk/irbm-course97/Docs/ms/>) を有する (Structural Classification of Proteins, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>)。 10 20 30

【0049】

N アセチルトランスフェラーゼ

芳香族アミンおよびヒドラジン含有化合物は、肝臓その他の組織のN - アセチルトランスフェラーゼ酵素によってN アセチル化される。数種の生体異物は、同じ酵素によってある程度、0 アセチル化され得る。N - アセチルトランスフェラーゼは、補助因子アセチル - 補酵素A (アセチル - CoA) を用いて2つの過程でアセチル基を転移するサイトゾル酵素である。第1の過程では、アセチル基がアセチル - CoAから活性部位システイン残基に転移され、第2の過程でアセチル基が基質アミノ基に転移され酵素が再生される。 40

【0050】

他のほとんどのDMEクラスとは対照的に、既知のN - アセチルトランスフェラーゼの数は少ない。ヒトの場合、2つの高度に類似した酵素であるNAT1およびNAT2が存在し、マウスには第3型酵素であるNAT3が存在するようである。N - アセチルトランスフェラーゼのヒト型は、独立した調節 (NAT1は広範に発現されるが、NAT2は肝臓および腸のみに発現される) および、重複した基質選択性を有する。両方の酵素はある程度まで多くの基質を受容するようであるが、NAT1は数種の基質 (パラアミノ安息香酸、パラアミノサリチル酸、スルファメトキサゾール、およびスルファニルアミド) を好み、一方NAT2は他の基質 (イソニアジド、ヒドララジン、プロカインアミド、ダブソン、アミノグルテチミド、およびス 50

ルファメタジン)を好む。

【0051】

1950年代の、抗結核薬であるイソニアジドを服用した患者らの臨床観察は、この化合物のアセチル化が速い人(fast acetylator)および遅い人(slow acetylator)の記述を生んだ。これらの表現型は後に、酵素の活性または安定性に影響を与える、NAT2遺伝子における突然変異によることが示された。イソニアジドのアセチル化が遅い表現型は中東の集団に非常に優勢(約70%)で、白人でやや劣り(約50%)、アジア集団では25%未満である。近年になって、NAT1における機能的な多型が検出され、検査を受けた集団の約8%が、アセチル化が遅い表現型を示す(Butcher, N. J.他(1998) Pharmacogenetics 8:67-72)。NAT1は数種の既知の芳香族アミン発癌物質を活性化し得るため、広範に発現されるNAT1酵素における多型は、癌のリスクの判定に重要であると考えられる(OMIM \*108345 N-acetyltransferase 1)。

10

【0052】

アミノトランスフェラーゼ

アミノトランスフェラーゼ類は、ピリドキサル5'-リン酸(PLP)依存性酵素の1ファミリーを構成する。PLP依存性酵素は、アミノ酸の成分置換を触媒する。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AspAT)は、最も広く研究されたPLP含有酵素である。AspATは、ジカルボキシルL-アミノ酸(アスパラギン酸およびグルタミン酸)、および対応する2-オキソ酸(オキサロ酢酸、および2-オキソグルタル酸)の、可逆的なアミノ基転移反応を触媒する。このファミリーの他のメンバーには、ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、チロシンアミノトランスフェラーゼ、芳香族アミノトランスフェラーゼ、アラニン:グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(AGT)およびキヌレニンアミノトランスフェラーゼが含まれる(Vacca, R. A.他(1997) J. Biol. Chem. 272:21932-21937)。

20

【0053】

原発性高シュウ酸尿症I型は、常染色体性劣性疾患であって、肝特異的ペルオキシソーム酵素であるアラニン:グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ-1の欠損が起こる。この疾患の表現型は、グリオキシル酸代謝の欠損である。AGTが存在しない場合、グリオキシル酸はグリシンへアミノ基転移されず、シュウ酸へ酸化される。その結果、不溶性シュウ酸カルシウムが腎臓と尿路に沈着し、最終的に腎不全を起こす(Lumb, M. J. 他(1999) J. Biol. Chem. 274:20587-20596)。

30

【0054】

キヌレニンアミノトランスフェラーゼは、L-トリプトファン代謝産物L-キヌレニンの不可逆アミノ転移を触媒しキヌレン酸を形成する。この酵素はまた、L-2-アミノアジピン酸から2-オキソグルタル酸およびその逆への可逆的なアミノ基転移反応を触媒して2-オキソアジピン酸(oxoadipate)およびL-グルタミン酸を生成し得る。キヌレン酸はグルタミン酸作動性神経伝達の推定上のモジュレーターであるため、キヌレニンアミノトランスフェラーゼの欠損は多面発現的(pleiotrophic)効果に関係すると思われる(Buchli, R. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:29330-29335)。

【0055】

カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ

カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)は、カテコール基質(例えば、レボドパ、ドーパミン、またはDBA)の1つのヒドロキシル基への、S-アデノシル-L-メチオニン(AdoMet; SAM)供与体のメチル基の転移を触媒する。3'-水酸基のメチル化は4'-水酸基のメチル化より優先され、COMTの膜結合アイソフォームは可溶性よりも位置特異的である。この酵素の可溶性の翻訳は、完全長mRNA(1.5kb)の内部開始コドンの利用によるか、或いは内部プロモータから転写された短いmRNA(1.3kb)の翻訳による。提案されたS<sub>N</sub>2様メチル化反応には、Mg<sup>2+</sup>が必要であり、Ca<sup>2+</sup>によって抑制される。供与体および基質の、COMTへの結合は逐次的に起こる。まず、AdoMetがMg<sup>2+</sup>非依存的にCOMTに結合し、Mg<sup>2+</sup>の結合およびカテコール基質の結合がそれに続く。

40

50

## 【0056】

組織内のCOMTの量は通常必要とされる活性の量より多いため、障害が困難である。しかしながら、インヒビター群は、*in vitro*での使用（例えば、没食子酸、トロポロン、U-0521、および3', 4'-ジヒドロキシ-2-メチル-プロピオフェトロポロン：propiofetropolon）および臨床での使用（例えば、ニトロカテコール系化合物およびトルカポン（tolcapone））のために開発されている。これらのインヒビターを投与するとレボドパの半減期が長くなり、続いてドーパミンの形成が起こる。また、COMTの障害により、限定するものではないがエピネフリン/ノルエピネフリン、イソプレナリン、リミテロール、ドブタミン、フェノルドパム（fenoldopam）、アポモルフィン、および -メチルドパなど、他の様々なカテコール構造化合物の半減期が長くなると思われる。ノルエピネフリンの欠損は臨床的抑鬱症に繋がるため、COMTインヒビターの使用は抑鬱症の治療に有用であると思われる。COMTインヒビターは通常、耐容性が良く副作用が最少で最終的に肝臓で代謝され、体内にはわずかな代謝物が蓄積するのみである（Mannisto, P.T.およびKaakkola, S. (1999) *Pharmacol. Rev.* 51:593-628）。

10

## 【0057】

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼはコンパクトなホモ二量体金属酵素であって、酸化損傷に対する細胞防御に関係する。この酵素は1つの亜鉛原子および1つの銅原子を各サブユニットに有し、スーパーオキシドアニオンの、 $O_2$ および $H_2O_2$ への不均化反応を触媒する。この不均化反応の速度は、拡散律速されるので、基質と酵素活性部位との間の好ましい静電的相互作用の存在によって増大する。このクラスの酵素の数例が、全て真核細胞の細胞質において同定され、幾つかの細菌種のペリプラズムでも同定された。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ類は強健な酵素であって、蛋白分解的消化や、尿素およびSDSによる変性に対し、高い耐性を持つ。これらの酵素のコンパクトな構造に加えて、金属イオンおよびサブユニット内ジスルフィド結合が酵素の安定性に寄与していると考えられている。これらの酵素は70 もの高温でも可逆的に変性する（Battistoni, A.他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:5655-5661）。

20

## 【0058】

スーパーオキシドジスムターゼの過剰な発現は、遺伝子組み換えアルファルファの耐凍性を高めるのに関与し、ジフェニルエーテル除草剤であるアシフルオルフェン（acifluorfen）などの環境毒素に対する耐性をも与えると思われる（McKersie, B. D.他(1993) *Plant Physiol.* 103:1155-1163）。加えて、酵母細胞は、過酸化水素への曝露の後に凍結融解損傷に対する耐性が高まる。これは、曝露によるスーパーオキシドジスムターゼの発現のアップレギュレートにより、酵母細胞が更なる過酸化ストレスに適応するようになるためである。この研究では、酵母スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子群の突然変異は、冷凍保存過程を経て生物が生存するか否かを決定するのに重要であると長い間考えられていたグルタチオン代謝の調節に影響を及ぼす突然変異よりも、凍結融解抵抗性に悪影響を与えた（Jong-In Park, J.-I.他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:22921-22928）。

30

## 【0059】

スーパーオキシドジスムターゼの発現はまた、結核を引き起こす生物である結核菌に関連する。スーパーオキシドジスムターゼは結核菌によって分泌される10種の主なタンパク質の内の1つであり、その発現は酸化ストレスに応じて約5倍アップレギュレートされる。結核菌は非病原性ミコプラズマの恥垢菌（*M. smegmatis*）よりスーパーオキシドジスムターゼをほぼ2桁多く発現し、極めてより高い比率で、発現された酵素を分泌する。この結果、結核菌は恥垢菌よりも最大350倍多い酵素を分泌し、酸化ストレスに対する実質的な耐性を与える（Harth, G.およびHorwitz, M. A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:4281-4292）。

40

## 【0060】

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼの発現の低下、並びに抗酸化能力を有するその他の酵素の発現の低下は初期の癌に関係すると思われる。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジ

50

ムターゼの発現レベルは、正常な前立腺組織と比べ、前立腺の上皮内新形成および前立腺癌において低い (Bostwick, D. G. (2000) *Cancer* 89:123-134)。

【0061】

ホスホジエステラーゼ

ホスホジエステラーゼは、ホスホジエステル化合物の2つのエステル結合の一方の加水分解を触媒する酵素の1クラスを構成する。従って、ホスホジエステラーゼは様々な細胞プロセスにとって重要である。ホスホジエステラーゼには、細胞増殖および複製に必須であるDNAおよびRNAのエンドヌクレアーゼおよびエクソヌクレアーゼや、DNAのトポロジ再編成中の核酸鎖の分解および再形成をするトポイソメラーゼが含まれる。或るチロシンDNAホスホジエステラーゼは、トポイソメラーゼIとDNAとの間に形成されるデッドエンド共有結合中間体を加水分解することでDNA修復に機能する (Pouliot, J. J.他(1999) *Science* 286:552-555; Yang, S.-W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11534-11539)。

10

【0062】

酸性スフィンゴミエリナーゼは、膜リン脂質であるスフィンゴミエリンを加水分解してセラミドおよびホスホリルコリンを生成するホスホジエステラーゼである。ホスホリルコリンは様々な細胞内シグナル伝達経路に関与するホスホファチジルコリンの合成に用いられ、一方のセラミドは神経組織に高濃度で見られる膜脂質であるガングリオシドの生成のための必須前駆体である。酸性スフィンゴミエリナーゼが欠損するとリソソームにおいてスフィンゴミエリン分子が蓄積され、それによってニーマン-ピック病が引き起こされる (Schuchman, E. H.およびS. R. Miranda (1997) *Genet. Test.* 1:13-19)。

20

【0063】

グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼ (glycerophosphoryl diester phosphodiesterase) (グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼとも呼ばれる) は、脱アセチル化リン脂質グリセロホスホジエステル (deacetylated phospholipid glycerophosphodiester) を加水分解してsn-グリセロール-3-リン酸およびアルコールを生成するホスホジエステラーゼである。グリセロホスホコリン、グリセロホスホエタノールアミン (glycerophosphoethanolamine)、グリセロホスホグリセロール (glycerophosphoglycerol)、およびグリセロホスホイノシトール (glycerophosphoinositol) は、グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼの基質の例である。大腸菌由来の或るグリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼは、グリセロホスホジエステル (glycerophosphodiester) 基質に対し広範な特異性を有する (Larson, T. J.他(1983) *J. Biol. Chem.* 248:5428-5432)。

30

【0064】

サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) は、サイクリックヌクレオチドであるcAMPおよびcGMPの調節に極めて重要な酵素である。cAMPおよびcGMPは、ホルモン、光および神経伝達物質など、様々な細胞外シグナルを伝達する細胞内セカンドメッセンジャーとして機能する。PDEはサイクリックヌクレオチドをそれらの対応するリン酸に分解し、それによってサイクリックヌクレオチドの細胞内濃度およびシグナル伝達におけるそれらの効果を調節する。それらの役割がシグナル伝達の制御因子であることから、PDEは化学療法の標的として大規模に研究された (Perry, M. J.およびG. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481; Torphy, J. T. (1998) *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 157:351-370)。

40

【0065】

哺乳動物PDEのファミリーは、それらの基質特異性および親和性、補助因子に対する感受性、および抑制剤に対する感受性に基いて分類される (Beavo, J. A. (1995) *Physiol. Rev.* 75:725-748; Conti, M.他(1995) *Endocrine Rev.* 16:370-389)。これらのファミリーのいくつかは固有の遺伝子群を持ち、その多くは様々な組織でスプライス変異体として発現される。PDEファミリーの中には、多数のイソ酵素およびこれらのイソ酵素の多数のスプライス変異体が存在する (Conti, M.およびS.-L. C. Jin (1999) *Prog.Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63:1-38)。多数のPDEファミリー、イソ酵素、およびスプライス変異

50

体の存在は、サイクリックヌクレオチドが関する調節経路の多様性および複雑性を示すものである (Houslay, M. D.およびG. Milligan (1997) Trends Biochem. Sci. 22:217-224)。

#### 【0066】

PDE1型 (PDE1) はCa<sup>2+</sup> / カルモジュリン依存性であって、それぞれが少なくとも2つの異なったスプライス変異体を有する少なくとも3つの異なった遺伝子によってコードされると思われる (Kakkar, R. 他 (1999) Cell Mol. Life Sci. 55:1164-1186)。PDE1は、肺、心臓、および脳で見られる。数種のPDE1イソ酵素は、in vitroでリン酸化 / 脱リン酸化によって調節される。これらのPDE1イソ酵素をリン酸化するとカルモジュリンに対するこの酵素の親和性が低下してPDE活性が低下し、cAMPの定常状態レベルが増大する (Kakkar, 前出)。PDE1はサイクリックヌクレオチドおよびカルシウムのシグナル伝達の両方に関与するので、中枢神経系および心血管、免疫系の障害のための有用な治療標的を提供し得る (Perry, M. J.およびG. A. Higgs (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2:472-481)。

10

#### 【0067】

PDE2はcGMPに刺激されるPDEであり、小脳、新皮質、心臓、腎臓、肺、肺動脈、骨格筋に見られる (Sadhu, K.他 (1999) J. Histochem. Cytochem. 47:895-906)。PDE2はcAMPがカテコールアミン分泌に与える効果を媒介し、アルドステロンの制御に関与すると思われる (Beavo, 前出)、嗅覚シグナル伝達で役割を果たすと思われる (Juifls, D.M.他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3388-3395)。

#### 【0068】

PDE3はcGMPおよびcAMPの両方に対し高い親和性を有するため、これらのサイクリックヌクレオチドは、PDE3の競合的基質として作用する。PDE3は、心筋収縮能の刺激、血小板凝集の抑制、血管および気道の平滑筋の弛緩、Tリンパ球および血管平滑筋培養細胞の増殖抑制、脂肪組織からのカテコールアミン誘導性遊離脂肪酸放出の調節に作用する。ホスホジエステラーゼのPDE3ファミリーは、cilostamide、enoximone、およびlixazinoneなど、特異的インヒビターに対する感受性を有する。PDE3のイソ酵素は、cAMP依存性プロテインキナーゼまたはインスリン依存性キナーゼによって抑制され得る (Degerman, E.他 (1997) J. Biol. Chem. 272:6823-6826)。

20

#### 【0069】

PDE4はcAMPに特異的であり、気道平滑筋、血管内皮、および全ての炎症細胞に局在し、cAMP依存性リン酸化によって活性化され得る。cAMPレベルの上昇によって炎症細胞の活性化が抑制され気管支平滑筋が弛緩し得るため、PDE4は喘息治療の発見に重点をおいて新規の抗炎症剤の可能性のある標的として広範に研究された。PDE4インヒビターは現在、喘息、慢性閉塞性肺疾患およびアトピー性湿疹の治療薬として臨床試験が行われている。PDE4の既知の4つ全てのイソ酵素は、マウスの行動記憶を向上させることが示された化合物であるインヒビター、ロリプラムに対して感受性を持つ (Barad, M.他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15020-15025)。PDE4インヒビターはまた、急性肺傷害、内毒素血症、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、および様々な神経や胃腸の疾患に対する可能性のある治療薬として研究された (Doherty, A. M. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3:466-473)。

30

40

#### 【0070】

PDE5は基質としてのcGMPに対し高い選択性を有し (Turko, I. V.他 (1998) Biochemistry 37:4200-4205)、2つのアロステリックcGMP特異的結合部位を有する (McAllister-Lucas, L. M. 他 (1995) J. Biol. Chem. 270:30671-30679)。cGMPのこれらのアロステリック結合部位への結合は、触媒活性の直接的な調節よりもcGMP依存性プロテインキナーゼによるPDE5のリン酸化にとって重要であると思われる。高いレベルのPDE5は、血管平滑筋、血小板、肺および腎臓に見られる。インヒビターであるザプリナストはPDE5およびPDE1に対して効果がある。PDE5に対する特異性を得るためにザプリナストを改良してsildenafilを生成した (VIAGRA; Pfizer, Inc., New York NY)。sildenafilは男性勃起不全の治療薬である (Terrett, N. 他 (1996) Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:1819-1824)。PDE5のインヒ

50

ピターは、心血管治療薬として現在研究されている (Perry, M. J. および G. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481)。

#### 【0071】

光受容体サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼであるPDE6類は、光伝達カスケードの重要な要素である。PDE6はGタンパク質トランスデュースンと結合し、cGMPを加水分解して光受容体膜におけるcGMP作動性陽イオンチャネルを調節する。cGMP結合活性部位に加えてPDE6はまた、PDE6の機能における調節的な役割を果たすと考えられる2つの高親和性cGMP結合部位を有する (Artemyev, N. O. 他(1998) *Methods* 14:93-104)。PDE6の欠損は網膜の疾患に関係する。rdマウスの網膜変性症 (Yan, W. 他(1998) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:2529-2536)、ヒトの常染色体劣性網膜色素変性症 (色素性網膜炎) (Danciger, M. 他(1995) *Genomics* 30:1-7) およびアイリッシュセッター犬の杆体/錐体異形成1型 (Suber, M. L. 他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3968-3972) は、PDE6B遺伝子における突然変異が原因である。

#### 【0072】

PDEのPDE7ファミリーは、複数のスプライス変異体を有する唯一つの既知のメンバーから成る (Bloom, T. J. および J. A. Beavo (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14188-14192)。PDE7はcAMP特異的であるが、その他の生理機能については殆ど知られていない。PDE7をコードするmRNAは骨格筋、心臓、脳、肺、腎臓および膵臓で見られるが、PDE7タンパク質の発現は特定の組織型に限定される (Han, P. 他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:16152-16157; Perry, M. J. および G. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481)。

PDE7はPDE4ファミリーに密接に関連するが、PDE4の特異的なインヒビターであるロリプラムによって阻害されない (Beavo, 前出)。

#### 【0073】

PDE8類はcAMP特異的であり、PDE4ファミリーに密接に関連する。PDE8は、甲状腺、精巢、眼、肝臓、骨格筋、心臓、腎臓、卵巣および脳において発現される。PDE8のcAMP加水分解活性はPDEのインヒビターであるロリプラム、ビンポセチン、ミルリノン、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン) またはザプリナストによって抑制されないが、PDE8はジピリダモールによって抑制される (Fisher, D. A. 他(1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:570-577; Hayashi, M. 他(1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:751-756; Soderling, S.H. 他(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8991-8996)。

#### 【0074】

PDE9類はcGMP特異的であって、PDEのPDE8ファミリーに最も類似している。PDE9は、腎臓、肝臓、肺、脳、膵臓および小腸において発現される。PDE9はsildenafil (VIAGRA; Pfizer, Inc., New York NY)、ロリプラム、ビンポセチン、ジピリダモールまたはIBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン) によって抑制されないが、PDE5インヒビターであるザプリナストに対して感受性を有する (Fisher, D. A. 他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:15559-15564; Soderling, S.H. 他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:15553-15558)。

#### 【0075】

PDE10類は二重基質PDEであって、cAMPおよびcGMPの両方を加水分解する。PDE10は、脳、甲状腺、及び精巢に発現する (Soderling, S.H. 他(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7071-7076; Fujishige, K. 他(1999) *J. Biol. Chem.* 274:18438-18445; Loughney, K. 他(1999) *Gene* 234:109-117)。

#### 【0076】

PDE類は、約270~300アミノ酸の触媒ドメイン、および補助因子の結合に働くN末端調節ドメインを持ち、場合によっては、機能が未知の親水性C末端ドメインを持つ (Conti, M. および S.-L.C. Jin (1999) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63:1-38)。全てのPDEの触媒ドメイン中に保存されている或る推定亜鉛結合モチーフが同定された。N末端調節ドメインとしては、PDE2、PDE5およびPDE6における非触媒cGMP結合ドメイン、PDE1におけるカルモジュリン結合ドメイン、並びにPDE3およびPDE4におけるリン酸化部位を持つドメインを含む。PDE5中でN末端cGMP結合ドメインは約380アミノ酸残基にまたがり、或る保存

配列モチーフのタンデムリピートを含んでいる (McAllister-Lucas, L.M.他 (1993) J. Biol. Chem. 268:22863-22873)。このNKXnDモチーフは、変異誘発によってcGMP結合に重要であると示された (Turko, I. V.他 (1996) J. Biol. Chem. 271:22240-22244)。PDEファミリーは触媒ドメイン内において約30%のアミノ酸同一性を有するが、同じファミリー内のイソ酵素は通常約85から95%のこの領域における同一性を示す (例えばPDE4AとPDE4B)。更に、或るファミリー内の触媒ドメイン外の類似性は高いが (60%を超える)、ファミリー間のこのドメイン外の配列類似性は殆ど存在しない。

#### 【0077】

免疫応答および炎症応答を構成する機能の多くは、細胞内のcAMPのレベルを上昇させる薬剤によって阻害される (Verghese, M. W.他 (1995) Mol. Pharmacol. 47:1164-1171)。様々な疾患がPDE活性の上昇によって起こり、サイクリックヌクレオチドのレベル低下を伴う。例えばマウスにおける尿崩症の或る型はPDE4活性の上昇に関係し、低 $K_m$  cAMP PDE活性の上昇がアトピー患者の白血球に見られ、PDE3が心疾患に関連する。

10

#### 【0078】

PDE類の多くのインヒビターが同定され、臨床試験が行われている (Perry, M. J.およびG. A. Higgs (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2:472-481; Torphy, T. J. (1998) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:351-370)。PDE3インヒビター類は、抗血栓剤、血圧降下薬および、鬱血性心不全の治療に有用な強心薬として開発中である。PDE4インヒビターであるロリプラムは抑鬱症の治療に用いられ、PDE4のその他のインヒビターは抗炎症薬として評価が行われている。ロリプラムはまた、*in vitro*でHIV-1の複製を増強することが示された、リポ多糖(LPS)誘導性TNF- $\alpha$ を阻害することが分かった。従って、ロリプラムはHIV-1の複製を阻害すると考えられる (Angel, J. B.他 (1995) AIDS 9:1137-1144)。更にロリプラムは、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  およびインターフェロン  $\gamma$  など、サイトカインの生成を抑制する能力に基づいて、脳脊髄炎の治療に有効であることが示された。ロリプラムはまた遅発性ジスキネジアに有効であると考えられ、実験動物モデルにおける多発性硬化症の治療に効果があった (Sommer, N.他 (1995) Nat. Med. 1:244-248; Sasaki, H. 他 (1995) Eur. J. Pharmacol. 282:71-76)。

20

#### 【0079】

テオフィリンは、気管支喘息その他の呼吸器疾患の治療に用いられる非特異的PDEインヒビターである。テオフィリンは気道平滑筋の機能に作用し、呼吸器疾患の治療における抗炎症能力または免疫調節能力があると考えられる (Banner, K. H.およびC. P. Page (1995) Eur. Respir. J. 8:996-1000)。ペントキシフィリンは、間欠性跛行および糖尿病性末梢血管疾患の治療に用いられる別の非特異的PDEインヒビターである。ペントキシフィリンはまたTNF- $\alpha$ の生成を阻止することが知られ、また、HIV-1の複製を阻害し得る (Angel他, 前出)。

30

#### 【0080】

PDE類は、様々な細胞型の細胞増殖に影響を与えると報告があり (Conti他 (1995) Endocrine Rev. 16:370-389)、また様々な癌に関係すると思われる。前立腺癌細胞株DU145およびLNCaPの成長は、cAMP誘導体およびPDEインヒビターの送達によって抑制された (Bang, Y. J.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5330-5334)。これらの細胞はまた、上皮からニューロン形態への、表現型における永久的な変換を示した。また、PDEインヒビターがメサンギウム細胞の増殖を調節する可能性があり (Matousovich, K.他 (1995) J. Clin. Invest. 96:401-410)、またリンパ球の増殖を調節する可能性もある (Joulain, C. 他 (1995) J. Lipid Mediat. Cell Signal. 11:63-79) ことが示唆された。或る癌治療は、PDEを腫瘍の特定の細胞区画に送達し細胞死を導く過程を伴うと記述されている (Deonara in, M. P.およびA. A. Epenetos (1994) Br. J. Cancer 70:786-794)。

40

#### 【0081】

##### ホスホトリエステラーゼ

ホスホトリエステラーゼ (PTE、パラオキソナーゼ (paraoxonase)) 類の酵素は有毒の有機リン化合物を加水分解し、PTEは種々の組織から単離されている。PTE酵素は哺乳動物

50

には豊富に存在するが鳥や昆虫では存在しないと思われ、鳥や昆虫の、有機リン化合物に対する耐性の低さを説明する (Vilanova, E. および Sogorb, M. A. (1999) Crit. Rev. Toxicol. 29:21-57)。ホスホトリエステラーゼは、哺乳動物による殺虫剤の解毒において中心的な役割を果たす。ホスホトリエステラーゼ活性は個人によって差があり、大人より幼児の方が低い。PTEノックアウトマウスは、有機リン系の毒素である diazoxon および chlorpyrifos oxon に対して顕著な感受性を有する (Furlong, C.E., 他 (2000) Neurotoxicology 21:91-100)。PTEは、有機リン含有化学廃棄物および化学兵器 (例えばパラチオン) 並びに農薬や殺虫剤の解毒能力を有する酵素として注目されている。幾つかの研究により、ホスホトリエステラーゼがアテローム性動脈硬化症および、リポ蛋白代謝に関する複数の疾患に関与することが示された。

10

## 【0082】

チオエステラーゼ

脂肪酸生合成に関する2つの可溶性チオエステラーゼが、哺乳動物組織から単離された。一方は長鎖脂肪アシルチオエステルに対してのみ活性で、他方は広範な長さの脂肪アシル鎖を有するチオエステルに対して活性である。これらのチオエステラーゼは、脂肪酸の新規生合成における連鎖停止 (chain termination) 段階を触媒する。連鎖停止は、脂肪アシル鎖を脂肪酸シンターゼのアシルキャリアタンパク質 (ACP) サブユニットの4' - ホスホパンテテイン補欠分子族と結合させるチオエステル結合の加水分解を伴う (Smith, S. (1981a) Methods Enzymol. 71:181-188; Smith, S. (1981b) Methods Enzymol. 71:188-200)。

20

## 【0083】

大腸菌は、長鎖アシルチオエステルに対してのみ活性なチオエステラーゼI型および、様々な長さの鎖に対して特異性を有するチオエステラーゼII型 (TEII) の、2つの可溶性チオエステラーゼを持つ (Naggert, J. 他 (1991) J. Biol. Chem. 266:11044-11050)。大腸菌TEIIは、新規の脂肪酸生合成における連鎖停止酵素 (chain-terminating enzyme) として機能する哺乳動物チオエステラーゼの2つの型のいずれとも配列類似性を示さない。哺乳動物チオエステラーゼとは異なり、大腸菌TEIIは特徴的なセリン活性部位 gly - X - ser - X - gly 配列モチーフを欠く上に、セリン変性剤であるジソプロピルフルオロリン酸によって不活化されない。しかし、ヨードアセトアミドおよびジエチルピロカルボネートによるヒスチジン58の修飾によってTEII活性が失われる。TEIIの過剰発現が大腸菌内の脂肪酸含量を変化させないことは、脂肪酸生合成において連鎖停止酵素として機能しないことを示す (Naggert 他, 前出)。この理由から、Naggert 他 (前出) の提起では、大腸菌TEIIの生理学的基質はACP - ホスホパンテテイン脂肪酸エステルではなく補酵素A (CoA) 脂肪酸エステルである。

30

## 【0084】

カルボキシルエステラーゼ

哺乳動物カルボキシルエステラーゼ類は、様々な組織および細胞型で発現される多重遺伝子族を構成する。アイソザイム群は顕著な配列相同性を持ち、主にアミノ酸配列に基づいて分類される。アセチルコリンエステラーゼ、ブチリルコリンエステラーゼおよびカルボキシルエステラーゼは、エステラーゼのセリンスーパーファミリー (B-エステラーゼ) にグループ化される。他のカルボキシルエステラーゼとしては、サイログロブリン、トロンピン、第IX因子、グリオタクチン (gliotactin) およびプラスミノゲンがある。カルボキシルエステラーゼは分子のエステル基およびアミド基の加水分解を触媒し、薬物、環境毒および発癌物質の解毒に関与する。カルボキシルエステラーゼの基質としては、短鎖および長鎖アシルグリセロール、アシルカルニチン、炭酸、塩酸ジピペフリン (dipivefrin hydrochloride)、コカイン、サリチル酸、カプサイシン、パルミトイル - CoA、イミダプリル、ハロペリドール、ピロリジジンアルカロイド、ステロイド、p - ニトロフェニル酢酸、マラチオン、ブタニリカイン (butanilicaine)、およびイソカルボキサジドが含まれる。これらの酵素は、しばしば低い基質特異性を示す。カルボキシルエステラーゼはまた、プロドラッグを対応する遊離酸に変換するために重要である。対応する遊離酸は

40

50

、例えば血中コレステロールを低下させるために用いられるロバスタチンなど、そのプロドラッグの活性型であり得る（概説はSato, T.およびHosokawa, M. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:257-288を参照）。

#### 【0085】

ニューロリギン (neuroigin)類は、(i)N末端シグナル配列を有し、(ii)細胞表面受容体群に類似し、(iii)カルボキシルエステラーゼドメインを持ち、(iv)脳で高度に発現され、(v)カルシウム依存的にニューレキシン類と結合する、分子の1クラスである。カルボキシルエステラーゼ類との相同性を持つものの、ニューロリギン類は活性部位セリン残基を欠き、これらは触媒作用ではなく基質結合において役割を果たすと考えられる (Ichtchenko, K.他 (1996) *J. Biol. Chem.* 271:2676-2682)。

10

#### 【0086】

##### スクアレンエポキシダーゼ

スクアレンエポキシダーゼ (スクアレンモノオキシゲナーゼ、SE) はミクロソーム膜結合FAD依存性オキシドレドクターゼであり、真核細胞のステロール生合成経路における初めの酸素添加ステップを触媒する。コレステロールは、LDL受容体仲介経路、若しくは生合成経路によって獲得される、細胞質膜の必須の構成成分である。生合成では、コレステロール分子における27全ての炭素原子がアセチル-CoAに由来する (Stryer, L., 前出)。SEはスクアレンを2,3(S)-オキシドスクアレンに変換するが、これは次にラノステロールに変換され、更にコレステロールに変換される。コレステロール生合成に関するステップを以下に要約する (Stryer, L (1988) *Biochemistry*. W.H Freeman and Co., Inc. New York. 554-560ページ、およびSakakibara, J.他 (1995) 270:17-20):アセチル-CoA由来) 3ヒドロキシ-3-メチル-グルタリルCoA メバロン酸 5-ホスホメバロン酸 5-ピロホスホメバロン酸 イソペンテニルピロリン酸 ジメチルアリルピロリン酸 ゲラニルピロリン酸 ファルネシルピロリン酸 スクアレン スクアレンエポキシド ラノステロール コレステロール。

20

#### 【0087】

コレステロールは真核細胞の生存能力に必須であるが、血清コレステロールのレベルが過度に上昇すると高等生物の動脈ではアテローム斑が形成される。例えば冠状動脈など必須血管の壁部に、この高度に不溶性の脂質の沈着があると、血流が減少して十分な血液が組織に流れなくなり組織壊死が起こり得る。HMG-CoAレダクターゼは、3-ヒドロキシ-3-メチル-グルタリルCoA (HMG-CoA) のメバロン酸への変換を担い、この変換がコレステロール生合成の第1のステップである。HMG-CoAは、血漿コレステロールレベルを低下させるようにデザインされた様々な医薬化合物の標的である。しかしHMG-CoAの阻害はまた、他の生化学経路に必要な非ステロール中間体 (例えばメバロン酸) の合成をも減少させる。SEはステロール合成経路の後期に起こる律速反応を触媒し、コレステロールはSEによる触媒ステップに続くこの経路の唯一の最終産物である。従ってSEは、他の必要な中間体を減少させない抗高脂血症薬をデザインするための理想的な標的である (Nakamura, Y. 他 (1996) 271:8053-8056)。

30

#### 【0088】

##### エポキシドヒドロラーゼ

エポキシドヒドロラーゼはエポキシド含有化合物への水の添加を触媒し、それがエポキシドを対応する1,2-ジオールに加水分解する。これらは細菌ハロアルカンデハロゲナーゼ (haloalkane dehalogenase) に近縁で、酵素の / ヒドロラーゼフォールド ( / hydrolyase fold) ファミリーの他のメンバーとの配列類似性を有する (例えば、*Streptomyces aureofaciens*由来プロモベルオキシダーゼA2 (bromoperoxidase A2)、シュードモナス プチダ由来のヒドロキシムコン酸セミアルデヒドヒドロラーゼ (hydroxyumuconic semialdehyde hydrolases)、および*Xanthobacter autotrophicus*由来ハロアルカンデハロゲナーゼ)。エポキシドヒドロラーゼは遍在性で、哺乳動物、無脊椎動物、植物、真菌、細菌に見られる。この酵素ファミリーは、生物内に導入されると求電子性が高く破壊性になる場合が多い生体異物エポキシド化合物の解毒に重要である。エポキシドヒドロラーゼ反

40

50

応の例には、cis-9,10-epoxyoctadec-9(Z)-enoic acid (ロイコトキシンの)、その対応するジオールである threo-9,10-dihydroxyoctadec-12(Z)-enoic acid (ロイコトキシンジオール)を形成する加水分解、およびcis-12,13-epoxyoctadec-9(Z)-enoic acid (イソロイコトキシンの)からその対応するジオールである threo-12,13-dihydroxyoctadec-9(Z)-enoic acid (イソロイコトキシンジオール)への加水分解が含まれる。ロイコトキシンは膜の透過性とイオン輸送を改変し、炎症応答を引き起こす。加えてエポキシド発癌物質は、薬物および環境毒素の解毒における中間体としてチトクロームP450によって生成されることが知られている。

#### 【0089】

これらの酵素は、Asp(求核性)、Asp(ヒスチジンをサポートする酸)およびHis(水活性化ヒスチジン)からなる、触媒トライアドを有する。エポキシドヒドロラーゼの反応機序は或る共有結合エステル中間体を経て進み、標的分子のエポキシド環の第1炭素原子に対する、Asp残基群の1つの求核攻撃によって開始され、共有結合エステル中間体が形成される(Arand, M.他(1996) J. Biol. Chem. 271:4223-4229; Rink, R. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:14650-14657; Argiriadi, M.A. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:15265-15270)。

10

#### 【0090】

##### チロシン触媒作用に関する酵素

コハク酸とピルビン酸か又はフマル酸とアセト酢酸へのアミノ酸チロシンの分解には多数の酵素が必要であり、多数の中間化合物が生成される。加えて多くの生体異物化合物は、チロシン異化経路の一部である1つ以上の反応を用いて代謝され得る。この経路は主に細菌で研究されているが、チロシン分解は様々な生物において起こることが知られ、多数の同様の生物学的反応が関係すると思われる。

20

#### 【0091】

コハク酸とピルビン酸へのチロシンの分解に関係する酵素には(例えばアルスロバクター属: *Arthrobacter* speciesで)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸オキシダーゼ、4-ヒドロキシフェニル酢酸3-ヒドロキシラーゼ(4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase)、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸2,3-ジオキシゲナーゼ(3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase)、5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase)、トランス,シス-5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸イソメラーゼ(trans,cis-5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase)、ホモプロトカテチュ酸イソメラーゼ/デカルボキシラーゼ(homoprotocatechuate isomerase/decarboxylase)、cis-2-oxohept-3-ene-1,7-dioate hydratase、2,4-dihydroxyhept-trans-2-ene-1,7-dioate aldolase、およびコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(succinic semialdehyde dehydrogenase)が含まれる。

30

#### 【0092】

チロシンのフマル酸とアセト酢酸への分解に関係する酵素には(例えばシュードモナス属で)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ、ホモゲンチシン酸-1,2-ジオキシゲナーゼ、マレイルアセト酢酸イソメラーゼ、およびフマリルアセトアセターゼが含まれる。コハク酸/ピルビン酸経路からの中間体が受容される場合は、4-ヒドロキシフェニル酢酸1-ヒドロキシラーゼ(4-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase)が関係し得る。

40

#### 【0093】

様々な生物においてチロシン代謝に関係する更なる酵素の例として、4-クロロフェニル酢酸-3,4-ジオキシゲナーゼ(4-chlorophenylacetate-3,4-dioxygenase)、芳香族アミノトランスフェラーゼ、5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase、2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate hydrataseおよび5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸イソメラーゼ(5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase)が挙げられる(Ellis, L. B. M.他(1999) Nucleic Acids Res. 27:373-376; Wackett, L.P.およびEllis, L.B.

50

M. (1996) *J. Microbiol. Meth.* 25:91-93; 並びに Schmidt, M. (1996) *Amer. Soc. Microbiol. News* 62:102)。

【0094】

ヒトでは、チロシン分解経路の酵素における後天性或いは先天性の遺伝的欠陥は、遺伝性チロシン血症を引き起こし得る。この疾患の1つの型である遺伝性チロシン血症I型 (HT1) は、チロシンをフマル酸とアセト酢酸に代謝する生物における経路の最終酵素であるフマリルアセト酢酸ヒドロラーゼの欠損によって生じる。HT1は幼児期に始まる進行性の肝損傷で特徴づけられ、肝癌のリスクが高い (Endo, F.他 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:24426-24432)。

【0095】

シトシンデアミナーゼ

細菌のシトシンデアミナーゼは、シチジンからウリジンとアンモニアとへの加水分解を触媒する。これはまた、抗真菌剤である5-フルオロシトシン (5FC) を、抗癌剤である5-フルオロウラシル (5FU) に変換しうる (Senter, P.D.他 (1991) *Bioconjug. Chem.* 2:447-451)。この能力は最近、癌治療研究に使われており、これが自殺遺伝子として作用することを示している。自殺遺伝子がコードする酵素は、非毒性化合物またはプロドラッグ例えば5FCを毒性産物、例えば5FUに変換する。シトシンデアミナーゼはまた細胞をバスタンダー効果で殺し、ここでは非隣接腫瘍細胞が5FUの放出によって死ぬ (Gnant, M.F.他 (1999) *Cancer Res.* 59:3396-3403)。多くの自殺遺伝子治療アプローチが癌の動物モデルで成功しており、現在、治験で試験されている。30以上の自殺遺伝子が記述された中で最も強力に広く使用されるのがHSV1tkとシトシンデアミナーゼの遺伝子である (Singhal S.および Kaiser L.R. (1998) *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 7:505-536; (Sandalon, Z.他 (2001) *Gene Ther.* 8:232-238)。

【0096】

アセチルCoAカルボキシラーゼ

アセチルCoAカルボキシラーゼは1種のビオチン依存酵素であり、全ての動物、植物、細菌に見られる。アセチルCoAカルボキシラーゼはATP加水分解のエネルギーを使い、CO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>OからのアセチルCoAのカルボキシル化を触媒する。アセチルCoAカルボキシル化は長鎖脂肪酸の生合成における律速段階である。アセチルCoAカルボキシラーゼの2つのアイソフォーム、タイプIとタイプIIはヒトで組織特異的に発現される (Ha 他 (1994) *Eur. J. Biochem.* 219:297-306)。アセチルCoAカルボキシラーゼは多成分酵素であり、カルバモイル燐酸シンターゼ活性、ビオチンカルボキシルキャリア蛋白、およびカルボキシル基転移酵素機能ユニットを持つ。カルバモイル燐酸シンターゼは、グルタミンまたはアンモニアからのカルバモイル燐酸のATP依存性合成を触媒する。これは、尿素サイクルと、アルギニンおよびピリミジンの生合成との双方を開始する。カルボキシルトランスフェラーゼドメインは、ビオチンから受容体分子へのカルボキシル基転移で機能する。カルボキシル基転移酵素には、認識された2つの型がある。一方はアシルCoA、他方は2-オキソ酸を、二酸化炭素の受容体分子として用いる。このファミリーの全てのメンバーは、アシルCoAを受容体分子として用いる。

【0097】

トリプトファンデカルボキシラーゼ

トリプトファンデカルボキシラーゼ (Tdc)、別名ドーパデカルボキシラーゼはピリドキサル燐酸蛋白であり、3種の基質に作用する。L-トリプトファン、5-ヒドロキシ-L-トリプトファン、ジヒドロキシ-L-フェニルアラニンである。Tdcは、クローン元である *Catharanthus roseus* (ニチニチソウ) でのテルペノイドインドールアルカロイド類の生合成に重要な酵素である。そのアミノ酸配列は、強い類似性をキイロショウジョウバエの -メチルドパ過敏蛋白に対して示す。Tdcはまた有意な類似性を、ネコのグルタミン酸デカルボキシラーゼおよびネズミのオルニチンデカルボキシラーゼに対して示す。Tdcはチロシンヒドロキシラーゼと共に、脳のドーパミン合成を制御する (Ouwerkerk, P. B.他 (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:491-503; De Luca, V.他 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:258

10

20

30

40

50

2-2586参照)。

【0098】

エノイル-CoAヒドラーゼ：3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ

エノイル-CoAヒドラーゼ：3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ二頭酵素はペルオキシソーム酸化経路の4種の酵素の1つである。完全長のヒトcDNAが配列決定され、染色体3q26.3-3q28にマップされた。この酵素は主に肝臓と腎臓に見られてトリペプチドSKLをカルボキシ末端に持ち、これはペルオキシソームの標的化シグナルとして働く。ヒトとラットとのこの二頭酵素のcDNAは、80%相同である(Hoefler, G.他(1994) Genomics 19:60-67)。エノイル-CoAヒドラーゼ：3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼの欠損は、ツェルヴェーガー症候群に似た臨床発現と、超長鎖脂肪酸の蓄積をもたらす(Fukuda, S. 他(1998) J. Inherit. Metab. Dis. 21:23-28)。

10

【0099】

C7は新規な核小体蛋白で、ショウジョウバエのlate puff産物であるL82のマウス相同体であり、ヒトOXR1(耐酸化性)のアイソフォームである。種々の細胞タイプの核小体に局在する組換えC7蛋白への抗体は、核小体の形成または機能へのC7の関与を示唆する(Fischer, H.他(2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 281:795-803)。

【0100】

哺乳類グルコサミン-6-燐酸デアミナーゼ(GNPDA)は初め、ハムスターの精子で検出された。ヒトの精巣相同体はShevchenko, V. 他(1998; Gene 216:31-38)に記載され、染色体5q31にマップされた。マウスの精細胞ではGNPDAは発生中の先体胞(acrosome vesicle)の近くに、マウスの精子では先体領域の近くに局在していた。先体反応の誘導後、精子内のGNPDA蛍光は低下したか不在であり、これはGNPDAが先体反応で役割を果たすことを示唆する(Montag, M.他(1999) FEBS Lett. 458:141-144)。

20

【0101】

発現プロファイル作成

マイクロアレイは、生物分析に用いる分析ツールである。マイクロアレイには複数の分子を有し、それらは或る固体支持体の表面で空間的に分布し、その表面と安定して結合している。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および/または抗体のマイクロアレイが開発され、その種々の用途には例えば遺伝子配列決定、遺伝子発現モニタリング、遺伝子マッピング、細菌同定、創薬、コンビナトリアルケミストリがある。

30

【0102】

特にマイクロアレイを用いる領域は遺伝子発現分析である。アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子または無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときは、アレイを用いて或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを試験するときは、アレイは次のような遺伝子を同定するプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、毒性アッセイにおいてテストされる物質に影響されるか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、ハウスキーピング機能を実行するか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの同定である。

【0103】

肺癌は米国男性の癌死の主因であり、女性の癌死の第2の主因である。肺癌症例の大部分は喫煙に起因すると考えられており、第三世界諸国でタバコ消費の増加から肺癌の蔓延が予想されている。気管支上皮をタバコの煙に曝露すると組織形態が変化するようであり、それが癌の前兆であると考えられている。

40

【0104】

肺癌は、4つの組織病理的に異なる群に分けられる。3群(扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌)は、非小細胞肺癌(NSCLC)に分類される。第4群の癌は、小細胞肺癌(SCLC)という。NSCLCを合わせると全症例の約70%になり、SCLCは約18%である。肺癌の発生と進行に関する分子生物学および細胞生物学的理解は不完全である。3番染色体での欠失は肺癌に一般的であり、この領域に腫瘍抑制遺伝子の存在を示すと思われる。K-rasの活性化突然変異は

50

肺癌で一般的に見られ、この疾患の1つのマウスモデルの基礎である。

【0105】

当分野には、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、内分泌障害、眼の障害、代謝障害、および肝障害を含む胃腸障害の診断、予防、および治療のための、核酸とタンパク質とを含む新規組成の要望がある。

【発明の開示】

【発明の効果】

【0106】

本発明の種々の実施態様は、総称して「DME」、個別にはそれぞれ「DME-1」、「DME-2」、「DME-3」、「DME-4」、「DME-5」、「DME-6」、「DME-7」、「DME-8」、「DME-9」、「DME-10」、「DME-11」、「DME-12」、「DME-13」と呼ぶ薬物代謝酵素である精製されたポリペプチドと、これらのタンパク質とそれらをコードするポリヌクレオチドとを用いた、疾患と病状との検出、診断、および治療の方法とを提供する。幾つかの実施態様はまた、精製した薬物代謝酵素、並びに/またはそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて創薬過程を促進する方法、例えば効力、用量、毒性、および薬理の決定の方法を提供する。関連する幾つかの実施態様は、精製した薬物代謝酵素、並びに/またはそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて疾患と病状との病原を調査する方法を提供する。

10

【0107】

或る実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した単離されたポリペプチドを提供する。別の実施態様は、SEQ ID NO:1-13のアミノ酸配列を持つ単離されたポリペプチドを提供する。

20

【0108】

また別の実施態様は(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ或る天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリヌクレオチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:14-26からなる群から選択される。

30

【0109】

また別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を持つ組換えポリヌクレオチドを提供する。別の実施態様は、この組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。更に別の実施態様は、この組換えポリヌクレオチドを持つ遺伝形質転換生物を提供する。

40

【0110】

別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドと、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%以上の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチドと、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活

50

性断片と、(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、とからなる群から選択したポリペプチドを製造する一方法を提供する。製造方法は、(a)或る細胞を該ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、この細胞を組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換する過程と、(b)そのように発現したポリペプチドを回収する過程からなる。この組換えポリヌクレオチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対し機能的に連結したプロモーター配列を持つ。

【0111】

更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドに特異結合する、単離された抗体を提供する。

10

【0112】

また更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択した、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施態様で該ポリヌクレオチドは、少なくとも約20、30、40、60、80、または100の連続したヌクレオチド群からなる場合がある。

20

【0113】

また別の実施態様は、サンプル中に標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって該標的ポリヌクレオチドが(a)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される方法を提供する。検出方法は、(a)サンプル中の上記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなる或るプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b)該ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出する過程からなる。該プローブと該標的ポリヌクレオチドあるいはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは、該標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする。或る関連した実施態様で本法は、該ハイブリダイゼーション複合体の量の検出を含みうる。また別の実施態様で該プローブは、少なくとも約20、30、40、60、80、または100の連続したヌクレオチド群からなる場合がある。

30

【0114】

また更に別の実施態様は、サンプル中に標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって該標的ポリヌクレオチドが(a)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される方法を提供する。検出方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b)該増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の有無を検出する過程からなる。或る関連した実施態様で本法は、該増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の量の検出を含みうる。

40

【0115】

別の実施態様は、或る有効量のポリペプチドと薬物として許容し得る或る賦形剤とから

50

なる、或る組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択される。一実施態様では、この組成物はSEQ ID NO:1-13からなる一群から選択されたアミノ酸配列を有し得る。別の実施態様は、機能的DMEの発現の低下や異常に関連した疾患や症状の治療方法や、そのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することを含む方法を提供する。

10

**【0116】**

また別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドを有するサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程からなる。別の実施態様は、この方法で同定したアゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤とを有する、或る組成物を提供する。更に他の実施例は、機能的DMEの発現の低下に関連した疾患や症状の治療方法を提供し、また、そのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することが含まれる。

20

**【0117】**

また更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドを有するサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。別の実施態様は、この方法で同定したアンタゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤とを有する、或る組成物を提供する。また別の実施態様は、機能的DMEの過剰発現を伴う疾患や症状の治療を要する患者への、この組成物の投与方法を提供する。

30

**【0118】**

別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と適切な条件下で混合する過程と、(b)該ポリペプチドと該試験化合物との結合を検出し、該ポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程からなる。

40

**【0119】**

また別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択したアミノ酸配列との少なくとも90%または少なくとも約90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリ

50

ペプチド、(c)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-13からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドの活性をモジュレートする或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドの活性にとり許容し得る条件下で、該ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、(b)該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の存在下で算定する過程と、(c)この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の不存在下での該ポリペプチドの活性と比較する過程からなり、この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性の変化は、該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物を標示する。

10

#### 【0120】

また更に別の実施態様は、SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変する効果に関し、或る化合物をスクリーニングする一方法を提供する。この方法は、(a)この標的ポリヌクレオチドを有するサンプルを或る化合物に曝露する過程と、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の改変を検出する過程と、(c)可変量のこの化合物の存在下でのこの標的ポリヌクレオチドの発現と、この化合物の不在下での発現とを比較する過程とからなる。

#### 【0121】

別の実施態様は、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。この方法には、以下の過程がある。(a)核酸群を有する生体サンプルを試験化合物で処理する過程。(b)処理済み生体サンプルの核酸群をハイブリダイズする過程。この過程には、次のようなプローブを用いる。(i)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)に相補的な配列を持つポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択した或るポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなるプローブである。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生体サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間に特異的ハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で生じる。上記標的ポリヌクレオチドは、(i)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:14-26からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%または少なくとも約90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択する。あるいは標的ポリヌクレオチドは、上記(i)~(v)からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片を持つ場合がある。毒性の算定方法には更に、以下の過程がある。(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程である。処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量の差異が、試験化合物の毒性を示す。

20

30

40

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0122】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質、核酸、および方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料および方法に本発明の実施態様が限定されるものではなく、修正され得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施態様を説明する目的で用いたものに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

#### 【0123】

請求の範囲および明細書中で用いる単数形の「或る」および「その(この)」の表記は、

50

文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もある。したがって、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には1個以上の抗体、および、当業者に公知の抗体の等価物などについても言及している。

【0124】

本明細書中で用いる全ての技術用語および科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料および方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明の種々の実施態様に関係して用い得る、細胞株、プロトコル、試薬およびベクターについて説明および開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

10

【0125】

(定義)

「DME」は、天然、合成、半合成或いは組換え体などの、全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、ネズミ、ウマ及びヒトを含む哺乳動物)から得られる実質的に精製されたDMEのアミノ酸配列を指す。

【0126】

用語「アゴニスト」は、DMEの生物学的活性を強める、或いは模倣する分子を指す。アゴニストとしては、DMEと直接相互作用して、或いはDMEが関与する生物学的経路の各成分に作用してDMEの活性を調節する、タンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

20

【0127】

用語「対立遺伝子変異体」は、DMEをコードする別の形の遺伝子を指す。対立遺伝子変異体群は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から生じ得る。また、変容したmRNA群を生じ得る。また、この変異体が生じ得るポリペプチドの構造または機能は、変容することもしないこともある。或る遺伝子は、その天然型の対立遺伝子変異体を全く持たない場合もあり、1個以上持つこともある。対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加または置換による。これら各種の変化は、単独であるいは他の変化と共に、或る配列内で1回以上、生じ得る。

30

【0128】

DMEをコードする「変容した/改変された」核酸配列としては、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換がありながら、DMEと同じポリペプチド、或いはDMEの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドをもたらす配列もある。この定義には、DMEをコードするポリヌクレオチドにとり正常な染色体の遺伝子座ではない位置での、対立遺伝子変異体群への不適當或いは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、DMEをコードするポリヌクレオチドの或る特定オリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多型性を含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じて機能的には等価なDMEとなるような、アミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にDMEの活性が保持される範囲で、残基の、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性、についての1つ以上の類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジンおよびアルギニンがある。親水性値が近似した非荷電極性側鎖を持つアミノ酸としては、アスパラギンとグルタミン、およびセリンとトレオニンを含みうる。親水性値が近似した非荷電側鎖を持つアミノ酸としては、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、およびフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

40

【0129】

用語「アミノ酸」および「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチ

50

ド、タンパク質配列、あるいはそれらのいずれかの断片を指し、天然分子または合成分子を指す。「アミノ酸配列」が或る天然タンパク質分子の配列を指す場合、「アミノ酸配列」および類似の用語は、記載したそのタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0130】

「増幅」は、或る核酸の付加的複製物を作製する行為に関する。増幅には、当業者に公知の、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術または他の核酸増幅技術を用いる。

【0131】

用語「アンタゴニスト」は、DMEの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子を指す。アンタゴニストとしては、DMEと直接相互作用すること、あるいはDMEが関与する生物学的経路の各成分に作用することによってDMEの活性をモジュレートする、抗体などタンパク質、*anticalin*、核酸、糖質、小分子、または任意の他の化合物や組成物があり得る。

10

【0132】

用語「抗体」は、エピトープの決定基と結合できる、無傷の免疫グロブリン分子やそれらの断片例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片を指す。DMEポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、無傷ポリペプチド群を用い、または当該の小ペプチド群を持つ断片群を用いて作製可能である。マウス、ラット、ウサギなどの動物を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドの由来は、RNAの翻訳の場合や、または化学合成があり得る。また、それらは所望により、キャリアタンパク質に抱合し得る。通常用いられるキャリアであってペプチドと化学結合するキャリアの例は、ウシ血清アルブミン、サイロ

20

【0133】

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する、分子の領域(すなわちエピトープ)を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基(タンパク質の特定の領域または3次元構造)に特異結合する抗体の産生を誘発し得る。或る抗原決定基は、或る抗体への結合について、無傷抗原(すなわち免疫応答を引き出すために用いられる免疫原)と競合し得る。

【0134】

用語「アプタマー(apptamer)」は、核酸またはオリゴヌクレオチド分子であって、特定の分子ターゲットに結合する分子を指す。アプタマーは*in vitro*での進化プロセスに由来する(例えば、SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの略、試験管内選択法)、米国特許第5,270,163号に記述)。これは、大規模な組合せライブラリ群から標的特異的アプタマー配列を選択するプロセスである。アプタマー組成は二本鎖または一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーの各ヌクレオチド成分は修飾された糖基を持つことがあり(例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基は2'-Fまたは2'-NH<sub>2</sub>によって置換され得る)、これは、ヌクレアーゼへの抵抗性または血中でのより長い寿命など、所望の特性を向上し得る。アプタマーを他の分子(例えば高分子量キャリア)と抱合させることにより、循環系からのこのアプタマーのクリアランスを遅らせ得る。アプ

30

40

【0135】

用語「イントラマー(intramer)」は、*in vivo*で発現されるアプタマーを指す。例えば、ワクシニアウイルスに基づく或るRNA発現系を用いて、白血球の細胞質内で特定のRNAアプタマー類が高レベルに発現されている(Blind, M.他(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 96:3606-3610)。

【0136】

用語「スピーゲルマー(spiegelmer)」は、アプタマーの内、L-DNA、L-RNAなど左旋性ヌクレオチド誘導体または左旋性ヌクレオチド様分子などを指す。左旋性ヌクレオチド群を

50

持つアプタマー類は、右旋性ヌクレオチド群を持つ基質に通常は作用する、天然酵素類による分解に耐性がある。

【0137】

用語「アンチセンス」は、或る特定核酸配列を持つ或るポリヌクレオチドの「センス」(コーディング)鎖との塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス組成物としては、DNAや、RNAや、ペプチド核酸(PNA)や、修飾されたバックボーン連結た例えばホスホチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸などを有するオリゴヌクレオチドや、修飾された糖基たとえば2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などを有するオリゴヌクレオチドや、あるいは修飾された塩基たとえば5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシンなどを有するオリゴヌクレオチドがあり得る。アンチセンス分子は、化学合成または転写など、任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、細胞に導入されると、細胞が産生した天然核酸配列との塩基対を形成し二重鎖を形成して転写または翻訳を妨害する。「負」または「マイナス」という表現は或る参考DNA分子のアンチセンス鎖を指すことがあり、「正」または「プラス」という表現は或る参考DNA分子のセンス鎖を意味し得る。

10

【0138】

用語「生物学的に活性」は、或る天然分子の構造的、調節的、あるいは生化学的な機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のDME、合成のDMEまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

20

【0139】

「相補」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、「5'-AGT-3'」は、その相補配列「3'-TCA-5'」との対を形成する。

【0140】

「~のポリヌクレオチドを含む(持つ)組成物」または「~のポリペプチドを含む(持つ)組成物」は、指定のポリヌクレオチド若しくはポリペプチドを持つ、任意の組成物を指す。この組成物には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。DMEをコード、若しくはDMEの断片群をコードするポリヌクレオチド群を有する組成物類は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。これらプローブは、凍結乾燥形態で貯蔵でき、また、糖質などの安定化剤と結合させ得る。ハイブリダイゼーションにおいては、塩(例えばNaCl)、界面活性剤(例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS)および他の成分(例えばデンハート液、粉乳、サケ精子DNAなど)を有する水溶液中に、プローブを分散させ得る。

30

【0141】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を除くためにDNA配列解析を繰り返し行い、XL-PCRキット(Applied Biosystems, Foster City CA)を用いて5'および/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGELVIEWフラグメント結合システム(GCG, Madison, WI)またはPhrap(University of Washington, Seattle WA)などのフラグメント結合用コンピュータプログラムを用い1つ以上のオーバーラップするcDNAやESTまたはゲノムDNA断片からアセンブリされた核酸配列を指す。伸長とアセンブリの両方によりコンセンサス配列を産生する配列もある。

40

【0142】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないと予測されるような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換可能で、保存的なアミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

元の残基	保存的な置換	
Ala	Gly, Ser	
Arg	His, Lys	
Asn	Asp, Gln, His	
Asp	Asn, Glu	
Cys	Ala, Ser	
Gln	Asn, Glu, His	
Glu	Asp, Gln, His	
Gly	Ala	
His	Asn, Arg, Gln, Glu	10
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	
Tyr	His, Phe, Trp	
Val	Ile, Leu, Thr	20

## 【0143】

保存的なアミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば シートや 螺旋構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、および/または(c)側鎖の大部分、を保持する。

## 【0144】

「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列内の变化、あるいは1個以上のヌクレオチドが欠如するヌクレオチド配列内の变化を指す。

## 【0145】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチドの化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、次のようなプロセスによって修飾されたポリペプチドである。すなわち、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、あるいは任意の同様なプロセスであって、誘導元のポリペプチドの少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持するプロセスである。

## 【0146】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を発生し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合あるいは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

## 【0147】

「差次的発現」は、少なくとも2例のサンプルを比較して判定する、増加(上方制御)、あるいは減少(下方制御)、または欠損した、遺伝子またはタンパク質の発現を指す。このような比較は例えば、処理済サンプルと不処理サンプル、または病態サンプルと健常サンプルとの間で行われ得る。

## 【0148】

「エキソンシャッフリング」は、異なるコード領域(エキソン)群の組換えを意味する。或るエキソンは、コードするタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャー群の新たな組合せによって新規のタンパク質群を

30

40

50

アセンブリすることが可能であり、新たなタンパク質機能の進化を促進できる。

【0149】

用語「断片」は、DMEまたはDMEをコードするポリヌクレオチドの、固有の部分であって、その親配列 (parent sequence) と配列は同一でありうるが親配列より長さが短いものを指す。或る断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、約5～約1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の、連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さであり得る。断片は、或る分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、或るポリペプチド断片は、定義された或る配列内に見られるような或るポリペプチドの最初の250または500アミノ酸 (または最初の25%または50%) から選択した、或る長さの連続したアミノ酸を持ち得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施態様では、配列表、表および図面を含む本明細書が支持する任意の長さであり得る。

10

【0150】

SEQ ID NO:14-26の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:14-26を特異的に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を持ちうる。SEQ ID NO:14-26の或る断片を本発明の方法の1つ以上の実施態様、例えばハイブリダイゼーションおよび増幅技術に、またはSEQ ID NO:14-26を関連ポリヌクレオチドから区別する類似の方法に用い得る。SEQ ID NO:14-26の或る断片の正確な長さは、また、その断片が対応するSEQ ID NO:14-26の領域は、その断片に意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定し得る。

20

【0151】

SEQ ID NO:1-13の或る断片は、SEQ ID NO:14-26の或る断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-13の或る断片は、SEQ ID NO:1-13を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を持ち得る。例えばSEQ ID NO:1-13の或る断片を、SEQ ID NO:1-13を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして用い得る。SEQ ID NO:1-13の或る断片の正確な長さは、また、この断片に対応するSEQ ID NO:1-13の領域は、その断片に意図する目的に基づき、本明細書に記載する、または当分野で既知の1つ以上の分析法で判定し得る。

30

【0152】

「完全長」ポリヌクレオチドとは、少なくとも1つの翻訳開始コドン (例えばメチオニン) と、それに続く1オープンリーディングフレームおよび翻訳終止コドンを有する配列である。或る「完全長」ポリヌクレオチド配列は、或る「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0153】

「相同性」の語は、2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の、配列類似性、互換性、または配列同一性を意味する。

【0154】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」および「～%同一」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた、2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。標準化アルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するため、標準化された再現性のある方法で比較対象の2配列内にギャップ群を挿入し得るので、2つの配列をより有意に比較できる。

40

【0155】

ポリヌクレオチド配列間の一致率 (同一性) を判定するには、当分野で既知の、または本明細書に記載の、1つ以上のコンピュータアルゴリズムまたはプログラムを用い得る。例えば一致率を判定するには、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムの、デフォルトのパラメータ群を用い得る。このプログラムは、LASERGENEソフトウェアパッケージ (一組の分子生物学的分析プログラ

50

ム)(DNASTAR, Madison WI)の一部である。CLUSTAL Vは、Higgins, D.G.およびP.M. Sharp (1989; CABIOS 5:151-153)、並びにHiggins, D.G. 他(1992; CABIOS 8:189-191)に記載がある。ポリヌクレオチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定される。「weighted」残基重み付け表がデフォルトで選択される。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「percent similarity(類似率)」として一致率を報告する。

#### 【 0 1 5 6 】

あるいは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)が、一般的に用いられ、且つ、無料で利用可能な用い得る配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F. 他(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。BLASTアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBIおよびインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールも入手可能であり、これは2つのヌクレオチド配列を直接のペアワイズで比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして、対話形式で利用できる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn および blastp (以下に記載)の両方に用い得る。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ(gap)などのパラメータをデフォルト設定にセットして用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行し得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

#### 【 0 1 5 7 】

```
Matrix: BLOSUM62
Reward for match: 1
Penalty for mismatch: -2
Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 11
Filter: on
```

#### 【 0 1 5 8 】

一致率は、ある定義された配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)について測定し得る。あるいは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得た断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または少なくとも200の連続したヌクレオチドの断片)の長さの一致率も測定し得る。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

#### 【 0 1 5 9 】

高度の同一性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で、類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

#### 【 0 1 6 0 】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」または「~%同一」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的

アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の電荷および疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を(したがって機能も)保存する。

#### 【0161】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータ群を用いて判定できる(参照先と共に上述)。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドのアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の一致率は、CLUSTAL Vによって「percent similarity(類似性パーセント)」として報告される。

10

#### 【0162】

あるいは、NCBI BLASTソフトウェア式を用い得る。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較する場合、「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)のblastpをデフォルトパラメータに設定して用い得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

#### 【0163】

Matrix: BLOSUM62  
Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties  
Gap x drop-off: 50  
Expect: 10  
Word Size: 3  
Filter: on

20

#### 【0164】

一致率は、ある定義されたポリペプチド配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)について測定し得る。あるいは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きなポリペプチド配列から得た断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、または少なくとも150の連続した残基の断片)の長さの一致率も測定し得る。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

30

#### 【0165】

「ヒト人工染色体(HAC)」は直鎖状の微小染色体であり、約6 kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を持ち得る。また、染色体の複製、分離および維持に必要な、全てのエレメントを持つ。

#### 【0166】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつ、よりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列を改変した抗体分子を指す。

#### 【0167】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、或る一本鎖ポリヌクレオチドが或る相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を共有することの指標である。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、1回以上の「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異結合(すなわち完全には一致しない核酸鎖対間の結合)が減少する。核酸配列のアニーリングに関する許容条件は、当業者が慣例的に決定できる。アニール条件はどのハイブリダイゼーション実験でも一定であり得るが、洗浄条件は、所望のストリンジェンシー、したがってハイブリダイゼーション特異性を

40

50

得るように、実験ごとに変更し得る。許容的アニーリング条件は、例えば、温度が68、約6×SSC、約1% (w/v) SDS、並びに約100 μg/mlの、せん断して変性したサケ精子DNAの存在下である。

【0168】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度およびpHにおける特定配列の融点(T<sub>m</sub>)より約5~20低くなるように選択する。このT<sub>m</sub>は、所定のイオン強度およびpHの条件下で、完全一致プローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。T<sub>m</sub>を計算する式および核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook, J. 他(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

10

【0169】

本発明のポリヌクレオチド間の高ストリンジェンシー条件のハイブリダイゼーションには、約0.2×SSCおよび約0.1%のSDSの存在下、68で1時間の洗浄条件を含む。あるいは、温度は約65、60、55、または42を用い得る。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約0.1~2×SSCの範囲で変更し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約100~200 μg/mlの、せん断した変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションでは、有機溶剤、例えば約35~50% v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。進化的類似性は、ヌクレオチド群、およびヌクレオチドがコードするポリペプチド群について、或る同様の役割を強く示唆する。

20

【0170】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合の形成によって形成された、2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る(C<sub>0</sub>tまたはR<sub>0</sub>t解析など)。あるいは、一方の核酸が溶解状態で存在し、もう一方の核酸が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、あるいは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板)に固定されているような2つの核酸間に形成され得る。

30

【0171】

用語「挿入」あるいは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基あるいはヌクレオチドがそれぞれ追加される、アミノ酸配列あるいはポリヌクレオチド配列における変化を指す。

【0172】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患などに関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞および全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけ得る。

【0173】

「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物など生物に導入すると免疫応答を引き起こす、DMEのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で既知のあらゆる抗体生産方法に有用な、DMEのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

40

【0174】

用語「マイクロアレイ」は、或る基板上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、または他の化合物の構成を指す。

【0175】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、または他の化合物を指す。

50

## 【0176】

用語「モジュレート」または「活性を調節」は、DMEの活性を変化させることを指す。例えば、モジュレートによって、DMEのタンパク質活性の増減、或いは結合特性またはその他の、生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

## 【0177】

「核酸」および「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」および「核酸配列」の語はまた、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるかあるいはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド核酸(PNA)や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

10

## 【0178】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、或るプロモーターが或るコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に連結している。機能的に連結したDNA配列群は非常に近接するか連続的に隣接することがあり、また、2つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合は同一リーディングフレーム内にあり得る。

## 【0179】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリジンで終わるアミノ酸残基のペプチドのバックボーンに結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを持つ、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。末端のリジンは、この組成に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の伸長を停止させる。ポリエチレングリコール化することにより、細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

20

## 【0180】

DMEの「翻訳後修飾」としては、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク質分解切断およびその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、DMEの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

## 【0181】

「プローブ」とは、同一核酸、対立遺伝子核酸、または関連核酸の検出に用いる、DMEやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸を指す。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に接着した配列である。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬および酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素により、標的DNA鎖に沿って伸長され得る。プライマー対を、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、核酸の増幅(および同定)に用い得る。

30

## 【0182】

本発明に用いるプローブおよびプライマーは通常、既知の配列の、少なくとも15の連続したヌクレオチド群からなる。特異性を高めるため、長めのプローブおよびプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または少なくとも150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブおよびプライマーも用い得る。これよりもかなり長いプローブおよびプライマーもある。表、図面および配列リストを含む本明細書が支持する、任意の長さのヌクレオチドを用い得るものと理解されたい。

40

## 【0183】

プローブおよびプライマーの調製および使用方法については、Sambrook, J. 他(1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)、Ausubel, F.M. 他(1999) Short Protocols in Molecular Biology, 第4版, John Wiley & Sons, New York NY)、および Innis, M. 他(1990; PCR Protocols, A Gu

50

ide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA) などの参照文献に記載がある。PCRプライマー対を既知の配列から得るには、例えば、そのためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用い得る。

#### 【0184】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野で既知のソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチドおよび、最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロボースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得た配列を分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、したがってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手可能)を用いれば、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように修正し得る)。PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域のいずれかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。したがって、このプログラムは、独自のものであれ保存されたものであれ、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド断片との同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、あるいは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

10

20

30

#### 【0185】

「組換え核酸」は、天然核酸ではなく、配列の、2つ以上の離れたセグメントを人工的に組合せた配列を持つ核酸である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばSambrookの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部が付加、置換または欠失により改変された核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に連結した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、例えばある細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部と成し得る。

#### 【0186】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部と成すことができ、ベクターは例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなベクターは哺乳類に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳類内で防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

40

#### 【0187】

「調節エレメント」は或る遺伝子の非翻訳領域に通常は由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロンおよび5'および3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはRNA安定性を制御する宿主蛋白質またはウイルス蛋白質と相互作用する。

#### 【0188】

50

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いる、化学的または生化学的な成分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子およびその他の当分野で既知の成分がある。

【0189】

或るDNA分子に対する「RNA等価物」は、基準となるDNA分子と同じ直鎖のヌクレオチド配列からなるが、生じる全ての窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0190】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。DME、DMEをコードする核酸群、またはその断片群を含むと推定されるサンプルとしては、体液と、細胞や細胞から単離した染色体や細胞内小器官（オルガネラ）や膜からの抽出物と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリントなどがあり得る。

【0191】

用語「特異結合」および「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドの、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基すなわちエピトープ）であって結合分子が認識する構造の有無に依存する。例えば、或る抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」と抗体とを含む或る反応の中に、エピトープAを持つポリペプチドが、あるいは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

【0192】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離あるいは分離された核酸配列あるいはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上除去、最も好ましくは約90%以上除去されたものを指す。

【0193】

「置換」とは、1つ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドを、それぞれ別のアミノ酸残基またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0194】

「基板」は、任意の好適な固体あるいは半固体の支持物を指し、膜およびフィルタ、チップ、スライド、ウェハ、ファイバー、磁気または非磁気ビーズ、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。基板は、ウェル、溝、ピン、チャンネル、孔など、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0195】

「転写イメージ(transcript image)」または「発現プロファイル」は、所定条件下での所定時間における、或る特定の細胞タイプまたは組織による、遺伝子発現の集合的パターンを指す。

【0196】

「形質転換(transformation)」とは、外因性DNAが、或る受容細胞に導入されるプロセスを言う。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核宿主細胞または真核宿主細胞に挿入する、任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、バクテリオファージあるいはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクションおよび微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された細胞」には、導入されたDNAが、自律的に複製するプラスミドとしてあるいは宿主染色体の一部として複製可能である、安定的に形質転換された細胞が含まれる。更に、限られた期間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0197】

ここで用いる「遺伝形質転換生物(transgenic organism)」とは任意の生物体であって限定するものではないが動植物を含み、生物体の1個以上の細胞が、ヒトの介入によって、例えば本技術分野で公知のトランスジェニック技術によって導入された異種核酸を有するものである。細胞への核酸の導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって行う。これは、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によってあるいは組換えウイルスの導入によって行う。別の実施態様で核酸の導入は、組換えウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターを感染させて成し得る(Lois, C. 他(2002) Science 295:868-872)。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種あるいはin vitro受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指す。本発明に基づいて予期される遺伝形質

10

## 【0198】

特定の核酸配列の「変異体」とは、核酸配列1本の或る長さ全体について、該特定核酸配列に対し少なくとも40%の配列同一性を有する核酸配列として決定された配列である。決定には、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して

20

30

## 【0199】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、ポリペプチド配列1本の或る長さ全体について、該特定ポリペプチド配列に対し少なくとも40%の配列同一性を有するポリペプチド配列として決定された配列である。決定には、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、そのポリペプチドの一方の所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95

40

## 【0200】

(発明)

本発明の種々の実施態様には、新規のヒト薬物代謝酵素(DME)群および、DMEをコードするポリヌクレオチド群を含み、また、これらの組成物を利用した、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖障害、発生または発達障害、内分泌障害、眼の障害、代謝障害、および肝障害を含む胃腸障害の、診断、治療、または予防を含む。

## 【0201】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド実施態様およびポリペプチド実施態様の命名の概略である。各ポリヌクレオチドおよびその対応するポリペプチドは、1つのIncyteP

50

プロジェクト識別番号 (IncyteプロジェクトID)に 相関する。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号 (ポリペプチドSEQ ID NO:)と Incyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID)によって表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号 (ポリヌクレオチドSEQ ID NO:)と Incyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (IncyteポリヌクレオチドID)によって表示した。

#### 【0202】

表2は、GenBankタンパク質 (genpept) データベースに対するBLAST分析で同定した、本発明のポリペプチド群に 相 同 な 配 列 群 を 示 す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (ポリペプチドSEQ ID NO:)と、それに対応する Incyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID)を示す。列3は、最も近いGenBank相同体のGenBank識別番号 (GenBank ID NO:)を示す。列4は、各ポリペプチドとその相同体1つ以上との間の一致に関する確率スコアを示す。列5は、GenBank相同体 (群)の注釈を示す。

10

#### 【0203】

表3は、本発明のポリペプチドの多様な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (SEQ ID NO:)と、それに対応する Incyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID)を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4および列5はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム (Genetics Computer Group, Madison WI)によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7はタンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所には更に、分析方法に用いた検索可能なデータベースを示す。

20

#### 【0204】

表2および表3は共に本発明のポリペプチド群の特性を要約し、これらの特性は請求の範囲にあるポリヌクレオチド群が薬物代謝酵素であることを立証する。例えばSEQ ID NO:2は、残基M1から残基S2457までが、ラットのアセチルCoAカルボキシラーゼ (GenBank ID g3080546)に対し84%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された (表2参照)。BLAST確率スコアは0.0であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:2はまた、1つのカルボキシル基転移酵素ドメインと1つのビオチン要求酵素ドメインを有し、これは、隠れマルコフモデル (HMM)を基にした、保存されたタンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して判定された (表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、PROFILESCAN、および別のBLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:2がアセチルCoAカルボキシラーゼである、更なる確証を提供する。

30

#### 【0205】

別の例でSEQ ID NO:5は、残基M1から残基D274までが、ヒトのグルコサミン-6-リン酸デアミナーゼ (GenBank ID g2632113)に87%同一であるとBLASTで判定された (表2参照)。BLAST確率スコアは $8.2e^{-133}$ である。SEQ ID NO:5はまた、1つのグルコサミン-6-リン酸イソメラーゼ/6-phosphogluconolactonases (ホスホグルコノラクトナーゼ)ドメインを持ち、これはHMMを基にした保存タンパク質ファミリードメイン群のPFAMデータベースにおいて統計的に有意な一致を検索して決定された (表3参照)。BLIMPS、MOTIFSおよび別のBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:5がグルコサミン-6-リン酸デアミナーゼである更なる確証を提供する。

40

#### 【0206】

別の例においてSEQ ID NO:8は、残基M1から残基L723までが、ヒトのエノイルCoA:ヒドラーターゼ/3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ (GenBank ID g452045)に対して97%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された (表2参照)。BLAST確率スコアは0.0である。SEQ ID NO:8はまた、1つの3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼC末端ドメイン、1つの3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼNAD結合ドメイン

50

、および1つのエノイルCoAヒドラーゼ/3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ/異性化酵素ファミリーシグネチャを有するが、これは、HMMを基にした保存されたタンパク質ファミリドメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、PROFILESCAN、および別のBLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:8がエノイルCoA:3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ二頭酵素である、更なる確証を提供する。

【0207】

別の例においてSEQ ID NO:13は、残基M1から残基L614までが、ラットのアセチルコリンエステラーゼTサブユニット(GenBank ID g262093)に対して97%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは0.0である。SEQ ID NO:13はまた、1つのカルボキシルエステラーゼドメインを有するが、これは、HMMを基にした保存されたタンパク質ファミリドメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析からのデータは、SEQ ID NO:13がアセチルコリンエステラーゼである、更なる確証を提供する。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3-4、SEQ ID NO:6-7、およびSEQ ID NO:9-12については、同様の方法で分析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-13の解析用のアルゴリズム及びパラメータを表7に記載した。

【0208】

表4に示すように、完全長ポリヌクレオチド実施態様は、cDNA配列またはゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列を用いて、あるいはこれら2種類の配列を任意に組合せてアセンブリした。列1は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)および対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、および塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、完全長ポリヌクレオチド実施態様のアセンブリに用いたcDNA配列および/またはゲノム配列の、また、例えばSEQ ID NO:14-26を同定するため、或いはSEQ ID NO:14-26と、関連するポリヌクレオチド群とを区別するためのハイブリダイゼーション技術または増幅技術に有用なポリヌクレオチドの断片の、開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示す。

【0209】

表4の列2に記載したポリヌクレオチド断片は、特に例えば組織特異的cDNAライブラリ群やプールしたcDNAライブラリ群に由来するIncyte cDNA群を指す場合もある。或いは列2に記載のポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチドのアセンブリに寄与したGenBank cDNAまたはESTを指す場合もある。更に、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL(The Sanger Centre、英国ケンブリッジ)データベースに由来する配列を同定する場合もある(すなわち「ENST」の命名を含む配列)。あるいは、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Recordsデータベースに由来する場合もあり(すなわち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsに由来する場合もある(すなわち「NP」の命名を含む配列)。または列2に記したポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティッチング(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNAおよびGenscan予測エキソン群の両方からなるアセンブリ体を指す場合がある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FL\_XXXXXX\_N<sub>1</sub>\_N<sub>2</sub>\_YYYYY\_N<sub>3</sub>\_N<sub>4</sub>として同定される配列は「スティッチされた」配列で、その内、XXXXXXは該アルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号であり、YYYYYは該アルゴリズムが作成する予測の数であり、N<sub>1,2,3...</sub>がある場合には、解析中に手動で編集された特定のエキソン群を表す(実施例5参照)。または、列2のポリヌクレオチド断片は「エキソストレッチ(exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンのアセンブリ体を指す場合もある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FLXXXXXX\_gAAAAA\_gBBBBB\_1\_Nとして同定される配列は「ストレッチ」配列の識別番号である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソストレッチ」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank

10

20

30

40

50

識別番号、またはNCBI RefSeq識別番号、N は特定のエキソンを指す（実施例 5を参照）。或るRefSeq配列が「エキソストレッチング」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合は、「NM」、「NP」、または「NT」によって表されるRefSeq識別子が、GenBank識別子（すなわち、gBBBBB）の代わりに使用され得る。

【0210】

あるいは、接頭コードは、手動で編集された構成配列、ゲノムDNA配列から予測された構成配列、または組み合わされた配列解析方法に由来する構成配列を同定する。次の表は、構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する配列分析方法の例を列記する（実施例 4と5を参照）。

接頭コード	解析タイプやプログラムの例
GNN, GFG, ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK) を用いた、ゲノム配列群からのエキソン予測
GBI	手動で編集された、ゲノム配列群の解析
FL	スティッチまたはストレッチゲノム配列（ <u>実施例 5</u> 参照）
INCY	ゲノムへの EST 配列群のマッピングからの、完全長転写物とエキソンとの予測。エキソン群と生じる転写物とを予測するために、ゲノム位置と EST 構成とのデータが組み合わされる。

10

20

【0211】

場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するために、表 4 に示すような配列カバレッジと重複する Incyte cDNAカバレッジが得られたが、該当する Incyte cDNA識別番号は示さなかった。

30

【0212】

表 5 は、Incyte cDNA配列を用いてアセンブリされた完全長ポリヌクレオチドのための代表的なcDNAライブラリを示している。代表的なcDNAライブラリとはIncyte cDNAライブラリであり、これは、最も頻繁にはIncyte cDNA配列群によって代表されるが、これら配列は、上記ポリヌクレオチドをアセンブリおよび確認するために用いられた。cDNAライブラリを作製するために用いた組織およびベクターを表 5 に示し、表 6 で説明している。

【0213】

本発明には、またDMEの変異体をも含む。好適なDME変異体は、DMEの機能的或いは構造的特徴を少なくとも1つ有し、かつ、DMEアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する変異体である。

40

【0214】

種々の実施態様はまた、DMEをコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施態様において、本発明は、DMEをコードする、SEQ ID NO:14-26からなる一群から選択された1配列を持つポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO:14-26のポリヌクレオチド配列は配列表に示されるように等価RNA配列をも含むが、そこでは窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくリボースから構成されている。

50

## 【0215】

本発明はまた、DMEをコードするポリヌクレオチドの変異体群を含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチドは、DMEをコードする或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の或る態様では、SEQ ID NO:14-26からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%もの一致率を有するようなSEQ ID NO:14-26からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチドの変異体を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、DMEの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドをコードし得る。

10

## 【0216】

更に或いは別法では、本発明の或るポリヌクレオチド変異体は、DMEをコードするポリヌクレオチドのスプライス変異体である。或るスプライス変異体はDMEをコードするポリヌクレオチドとの顕著な配列同一性を持つ部分複数を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって生ずる、配列の数ブロックの付加または欠失により、通常、より多数またはより少数のポリヌクレオチドを有することになる。或るスプライス変異配列には、約70%未満、または約60%未満、あるいは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、DMEをコードするポリヌクレオチドとの間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異配列のいくつかの部分には、DMEをコードするポリヌクレオチドの各部との、少なくとも約70%、あるいは少なくとも約85%、または少なくとも約95%、なおまたは100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。例えばSEQ ID NO:24の配列を持つポリヌクレオチドとSEQ ID NO:25の配列を持つポリヌクレオチドとは互いのスプライス変異体である。上記したスプライス変異体は何れも、DMEの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るポリペプチドをコードし得る。

20

## 【0217】

遺伝暗号の縮重により、DMEをコードする種々のポリヌクレオチド配列が作り出され、中には、既知のいかなる天然遺伝子のポリヌクレオチド配列群とも最小の類似性しか有しない配列もあることは、当業者には理解されよう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るあらゆる可能なポリヌクレオチド配列のバリエーションを網羅し得る。これらの組み合わせは、天然DMEのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られる。また、このような全ての変異が明確に開示されていると考慮されたい。

30

## 【0218】

DMEとその変異体とをコードするポリヌクレオチドは一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然DMEのポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能であるが、非天然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有するDME或いはその誘導体をコードするポリヌクレオチドを作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定コドンを利用する頻度に基づき、特定の真核宿主または原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択し得る。コードされるアミノ酸配列を改変せずに、DME及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に改変する別の理由には、天然配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることもある。

40

## 【0219】

本発明にはまた、DMEとその誘導体とをコードする、ポリヌクレオチド群またはそれらの断片の、完全に合成化学による作製も含む。作製後、当分野で周知の試薬を用いて、この合成ポリヌクレオチドを任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてDMEまたはその任意の断片をコードする或るポリヌクレオチドに突然変異を誘導し得る。

## 【0220】

本発明の実施態様には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載のポリヌク

50

レオチド、特に、SEQ ID NO:14-26に示す配列を持つポリヌクレオチド、及びそれらの断片群にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド群が含まれる(Wahl, G.M.およびS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.*152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511)。アニーリングおよび洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載した。

#### 【0221】

DNAシーケンシングの方法は当分野では周知であり、本発明のいずれの実施態様にも、DNAシーケンシング方法を用い得る。DNAシーケンシング方法には酵素を用い得る。例えばDNAポリメラーゼ1のクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) を用い得る。あるいは、例えばELONGASE増幅システム (Invitrogen, Carlsbad CA) において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼとを併用し得る。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) およびABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373或いは377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 100 DNAシーケンシングシステム (Amersham Biosciences) または当分野で既知の他のシステムを用いてシーケンシングを行う。結果として得た配列を、当分野で周知の種々のアルゴリズムを用いて分析する (Ausubel他、前出、7章; Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, 856-853ページ)。

10

20

#### 【0222】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、DMEをコードする核酸を伸長し、プロモーターや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。例えば、使用し得る方法の一つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマーおよびネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAからの未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.*2:318-322)。別の方法にインバースPCR法があり、これは多岐の方向に伸長するプライマー群を用いて、環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、或る既知のゲノム遺伝子座およびその周辺の配列群からなる制限酵素断片群から得る (Triglia, T.他 (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これにはヒトおよび酵母人工染色体DNAの既知の配列群に隣接するDNA断片群をPCR増幅する方法を含む (Lagerstrom, M.他 (1991) *PCR Methods Applic.*1:111-119)。この方法では、PCRを行う前に、複数の制限酵素の消化およびライゲーション反応を用い、未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入し得る。未知の配列群を検索するために用い得る、他の複数の方法も当分野で既知である (例えばParker, J.D.他 (1991) *Nucleic Acids Res.*19:3055-3060)。更に、PCR、ネステッドプライマー類、およびPROMOTERFINDERライブラリ類 (Clontech, Palo Alto CA) を用いて、ゲノムDNAをウォーキングし得る。この手順は、ライブラリ類をスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部の発見に有用である。全てのPCRベースの方法では、市販ソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上で、温度約68 ~ 72 で鋳型に対してアニーリングするように、プライマー群を設計し得る。

30

40

#### 【0223】

完全長cDNA群をスクリーニングする際は、より大きなcDNA群を含むようにサイズ選択されたライブラリ群を用いるのが好ましい。更に、ランダムプライマーのライブラリ群は、しばしば遺伝子群の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリ群は、5'非転写調節領域への、配列の伸長に有用であろう。

#### 【0224】

市販のキャピラリー電気泳動システム群を用いて、シーケンシングまたはPCR産物の

50

サイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認し得る。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化される蛍光色素と、発光された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア (Applied Biosystems社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等) を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

#### 【0225】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を、DME  
10、その断片または機能的等価物を適切な宿主細胞内に発現させる組換えDNA分子にクローニングし得る。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のポリペプチドをコードする別のポリヌクレオチドを産生し、これらの配列をDMEの発現に利用し得る。

#### 【0226】

種々の目的で、DMEをコードする配列群を改変するために、当分野で一般的に既知の複数の方法を用いて、本発明のポリヌクレオチド群を組換えることができる。この組換えの多様な目的には、遺伝子産物のクローン化の、あるいはプロセッシングおよび/または発現のモディフィケーションが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドとの、ランダムなフラグメンテーションおよびPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組換え得る。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異誘導を利用して、新規な制限部位の作製、グリコシル化パターンの改変、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成などを起こす突然変異を導入し得る。  
20

#### 【0227】

本発明のヌクレオチドは、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; 米国特許第5,837,458号; Chang, C.-C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; 並びにCramer, A. 他(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャッフリング技術の対象となり得るもので、例えば生物活性、酵素活性あるいは、他の分子や化合物と結合する能力など、DMEの生物学的特性  
30を改変あるいは改良できる。DNAシャッフリングは、PCRを介する遺伝子断片組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、所望の特性を持つ遺伝子変異体群を同定する、選択またはスクリーニングの手順を経る。続いて、これら好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリングおよび選択/スクリーニングを行い得る。かくして、「人工的な」育種および急速な分子の進化によって、多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムポイント突然変異を持つ単一の遺伝子の断片を組換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングし得る。あるいは、所定の遺伝子の断片群を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子の断片と組換えて、自然に生じる複数遺伝子の遺伝多様性を、定方向の、制御可能な方法で最大化できる。  
40

#### 【0228】

別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチドは、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部を合成可能である(例えば、Caruthers, M.H. 他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; Horn, T. 他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232)。或いはDME自体またはその断片の合成に、当分野で既知の化学的方法を用い得る。例えば種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行い得る(Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ; Roberge, J.Y. 他(1995) Science 269:202-204)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて達成し得る。更に、DMEのアミノ酸配列、または任意のその一部を、直接合成の際に改変することにより、及び/または他のタンパク質が  
50

らの配列群または任意のその一部と組み合わせることにより、変異体ポリペプチドを作製、または、或る天然ポリペプチドの1配列を有するポリペプチドを作製し得る。

【0229】

このペプチドは分取用高速液体クロマトグラフィーで実質的に精製し得る(Chiez, R.M. およびF.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421)。この合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングで確認できる(Creighton, 前出 28-53ページ)。

【0230】

生物学的に活性なDMEを発現させるために、DMEをコードするポリヌクレオチドまたはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入し得る。好適な発現ベクターとは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写および翻訳の制御に必要なエレメント群を持つベクターである。必要なエレメントとしては、該ベクターと、DMEをコードするポリヌクレオチド群における調節配列群(エンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域など)が含まれる。必要なエレメント群は、強度および特異性が様々である。特異的な開始シグナル類を用いて、DMEをコードするポリヌクレオチド群の、より効率的な翻訳を達成することもできる。開始シグナルの例には、ATG開始コドンと、コザック配列など近傍の配列とが含まれる。DMEをコードするポリヌクレオチド配列、およびその開始コドンや、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写制御シグナルや翻訳制御シグナルは必要ないこともある。しかしながら、コード配列あるいはその断片のみが挿入された場合は、インフレームATG開始コドンなど外来性の翻訳制御シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外因性の翻訳エレメント群および開始コドン群は、様々な天然物および合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である(Scharf, D.他(1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162)。

【0231】

当業者に周知の方法を用いて、DMEをコードするポリヌクレオチドと、好適な転写および翻訳制御エレメントとを持つ発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法としては、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換え技術がある(Sambrook, J.他(1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4, 8, および 16-17章; Ausubel他、前出、1, 3および15章)。

【0232】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、DMEをコードするポリヌクレオチドの保持および発現が可能である。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌など微生物や、ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、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または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プラスミドまたはpBR322プラスミド)で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある(Sambrook, 前出; Ausubel他、前出; Van Heeke, G.およびS.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509; Engelhard, E.K.他(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227; Sandig, V.他(1996) *Hum. Gene Ther.* 7:1937-1945; Takamatsu, N.(1987) *EMBO J.* 6:307-311; 『マグローヒル科学技術年鑑』(*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*) (1992) McGraw Hill, New York NY, 191-196ページ; Logan, J. および T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659; Harrington, J.J. 他(1997) *Nat. Genet.* 15:345-355)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチドを標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる(Di Nicola, M.他(1998) *Cancer Gen. Ther.* 5:350-356; Yu, M.他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6340-6344; Buller, R.M.他(1985) *Nature* 317:813-815; McGregor, D.P.他(1994) *Mol. Immunol.* 31:219-226; Verma, I.M.およびN. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)。本発明は使用する宿主細胞によって限定され

ない。

【0233】

細菌系では、DMEをコードするポリヌクレオチドの使用目的に応じて多数のクローニングベクターおよび発現ベクターを選択し得る。例えばDMEをコードするポリヌクレオチドの慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはPSPORT1プラスミド(Invitrogen)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。DMEをコードするポリヌクレオチドをベクターのマルチクローニング部位にライゲーションするとlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列におけるin vitro転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖のレスキュー、入れ子欠失の生成にも有用であろう(Van Heeke, G.およびS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509)。例えば抗体類の産生などに多量のDMEが必要な場合は、DMEの発現をハイレベルで指示するベクター類が使用できる。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを持つベクターが使用できる。

10

【0234】

DMEの産生には、酵母発現系の使用が可能である。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーターなど、構成型あるいは誘導型のプロモーターを持つ多数のベクターが、出芽酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)またはピキア酵母(Pichia pastoris)内で使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の、分泌か細胞内での保持かのどちらかを指示するものであり、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来ポリヌクレオチド配列群を組み込むことを可能にする(Ausubel他、前出; Bitter, G.A.他(1987) Methods Enzymol. 153:516-544; Scorer, C.A.他(1994) Bio/Technology 12:181-184)。

20

【0235】

植物系もDMEの発現に使用可能である。DMEをコードするポリヌクレオチドの転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独であるいはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせるようなCaMV由来の35Sおよび19Sプロモーターによって促進し得る(Takamatsu, N. (1987) EMBO J 6:307-311)。あるいは、RuBisCOの小サブユニットなどの植物プロモーター、または熱ショックプロモーターを用い得る(Coruzzi, G.他(1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R.他(1984) Science 224:838-843; Winter, J.他(1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105)。これらの作成物を、植物細胞に、直接DNA形質転換または病原体媒介した形質移入で導入できる(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology)(1992) McGraw Hill, New York NY, 191-196ページ)。

30

【0236】

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後期プロモーターと3連リーダー配列とからなるアデノウイルス転写/翻訳複合体に、DMEをコードするポリヌクレオチド群をライゲーションし得る。アデノウイルスゲノムの可欠E1またはE3領域への挿入を用いれば、宿主細胞内でDMEを発現する感染ウイルスを得ることができる(Logan, J.およびT. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659)。更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳類宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

40

【0237】

また、ヒト人工染色体(HAC)類を用いて、或るプラスミドに含まれ得る断片やプラスミドから発現し得る断片より大きなDNAの断片群を送達し得る。治療のために約6 kb~10 MbのHACsが作製され、従来を送達方法(リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル)で送達されている(Harrington, J.J.他(1997) Nat. Genet. 15:345-355)

50

## 【0238】

哺乳類系での、組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、細胞株における、DMEの安定した発現が望ましい。例えば、DMEをコードするポリヌクレオチドを細胞株に形質転換するために、発現ベクター類と、同じベクター上の或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用い得る。用いる発現ベクターは、ウイルス起源の複製要素、および/または内因性の発現要素を持ち得る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1~2日間、細胞を増殖させ得る。選択可能マーカーの目的は選択剤への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーの存在により、導入した配列の発現に成功するような細胞の成長および回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖できる。

10

## 【0239】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、 $tk^-$ 細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子と、 $apr^-$ 細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある(Wigler, M.他(1977) Cell 11:223-232; Lowy, I.他(1980) Cell 22:817-823)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質あるいは除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシドであるネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M.他(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F.他(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14)。更なる選択可能な遺伝子、例えばtrpBとhisDとが記載され、これらは代謝物についての細胞要求を変容させる(Hartman, S.C.およびR.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051)。可視マーカー類、例えばアントシアニンや、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼおよびその基質であるグルクロニド、またはルシフェラーゼおよびその基質であるルシフェリンを用い得る。これらのマーカーを用いて、形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することも可能である(Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131)。

20

## 【0240】

マーカー遺伝子発現の有無によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在および発現の確認が必要な場合もある。例えば、DMEをコードする配列が或るマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、DMEをコードするポリヌクレオチド群を有する形質転換された細胞群は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定できる。または、単一プロモーターの制御下で、或るマーカー遺伝子を、DMEをコードする1配列とタンデムに配置することもできる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

30

## 【0241】

一般に、DMEをコードするポリヌクレオチドを持ち、DMEを発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて特定できる。これらの方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出及び/または数量化のための膜系、溶液ベース、或いはチップベースの技術を含むタンパク質生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

## 【0242】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いる、DMEの発現の検出及び計測のための免疫学的な方法は、当分野で既知である。このような技法には、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光活性化細胞選別(FACS)などがある。DME上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体群を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合結合試験も用い得る。これらのアッセイ

50

および他のアッセイは、当分野で周知である (Hampton, R.他(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN, Sect.IV; Coligan, J.E.他(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience, New York NY; Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

#### 【0243】

多岐にわたる標識方法および抱合方法が当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。DMEをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、エンドラベリング(末端標識化)、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。或いはDMEをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングしうる。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドを加えて、*in vitro*でRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えばAmersham Biosciences、Promega(Madison WI)、U.S. Biochemicalなどの種々の市販キットを用いて実行できる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子あるいは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤などがある。

10

#### 【0244】

DMEをコードするポリヌクレオチドで形質転換した宿主細胞を、細胞培地での該タンパク質の発現と回収とに好適な条件下で培養しうる。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、あるいはその両者に依存する。DMEをコードするポリヌクレオチド群を持つ発現ベクター類は、原核細胞膜または真核細胞膜を透過してのDMEの分泌を指示するシグナル配列群を持つように設計できることは、当業者には理解されよう。

20

#### 【0245】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入したポリヌクレオチドの発現をモジュレートする能力、または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断する翻訳後のプロセッシングを利用して、タンパク質の標的への誘導、折りたたみ、および/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための、特定の細胞装置および特徴的な機序を持つ、種々の宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、W138など)は、American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択し得る。

30

#### 【0246】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードする天然ポリヌクレオチド、修飾ポリヌクレオチド、または組換えポリヌクレオチドを或る異種配列に結合させ、上記した任意の宿主系内で、或る融合タンパク質の翻訳を生じ得る。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラDMEタンパク質が、DME活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分および異種ペプチド部分も、市販されている親和性マトリックスを用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシシン(Trx)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素(HA)がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-mycおよび赤血球凝集素(HA)は、これらのエピトープ標識を特異的に

40

50

認識する市販のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、DMEをコードする配列と異種タンパク質配列との間に、タンパク質分解切断部位を融合タンパク質が持つように遺伝子操作すると、DMEが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現および精製方法は、前出の Ausubel 他 (前出、10 および 16 章) に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現および精製を促進することもできる。

#### 【0247】

別の実施態様では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて *in vitro* で、放射標識 DME を合成しうる。これらの系は、T7、T3 または SP6 プロモーターに機能的に連結したタンパク質コード配列群の、転写と翻訳とを共役させる。翻訳は、例えば<sup>35</sup>Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

10

#### 【0248】

DME 或いはその断片または変異体を用いて、DME に特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。1つ以上の試験化合物を用いて、DME への特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。種々の実施態様で、1、2、3、4、5、10、20、50、100、または 200 個の試験化合物を DME への特異結合に関しスクリーニングできる。試験化合物の例として、抗体、アンティカリン (anticalins)、オリゴヌクレオチド、タンパク質 (例えばリガンドや受容体)、または小分子が挙げられる。

#### 【0249】

関連の実施態様で、DME 変異体を用いて試験化合物たとえば抗体の、DME への結合や、DME 変異体へ、または組み合わせた DME および / または 1つ以上の DME 変異体への結合をスクリーニングできる。或る実施態様で或る DME 変異体を用いて、DME 変異体に結合するが SEQ ID NO:1-13 の正確な配列を持つ DME には結合しない化合物をスクリーニングできる。こうしたスクリーニングの実施に用いる DME 変異体は、約 50% ~ 約 99% の DME への配列同一性の範囲を持つ場合があり、種々の実施態様は 60%、70%、75%、80%、85%、90%、および 95% の配列同一性をもち得る。

20

#### 【0250】

或る実施態様で DME への特異結合スクリーニングで同定された化合物は、DME の天然リガンドに密接に関連する場合があり、例えばリガンドやその断片であり、または天然基質や、構造的または機能的な擬態物質 (mimetic)、あるいは自然結合パートナーである (Coligan, J.E. 他 (1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2):5 章)。別の実施態様では、こうして同定した化合物は、受容体 DME の天然リガンドでありうる (Howard, A.D. 他 (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 22:132-140; Wise, A. 他 (2002) *Drug Discovery Today* 7:235-246)。

30

#### 【0251】

別の実施態様で DME への特異結合スクリーニングで同定した化合物は、DME が結合する天然受容体に、或いは少なくとも該受容体の或る断片に、または例えばリガンド結合部位や結合ポケットの全体または一部を含む該受容体の或る断片に、密接に関連し得る。例えば該化合物は、シグナルを伝播可能な DME 受容体の場合や、シグナルを伝播できない DME おとり受容体の場合がある (Ashkenazi, A. および V.M. Divit (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:255-260; Mantovani, A. 他 (2001) *Trends Immunol.* 22:328-336)。該化合物は既知の技術を用いて合理的に設計できる。こうした技術の例としては、化合物エタネルセプト (etanercept) (ENBREL; Immunex Corp., Seattle WA) 作製に用いた技術を含む。エタネルセプトは、ヒトのリウマチ様関節炎の治療に有効である。エタネルセプトは遺伝子操作された p75 腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ダイマーであり、ヒト IgG<sub>1</sub> の Fc 部分に連結されている (Taylor, P.C. 他 (2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13:611-616)。

40

#### 【0252】

1つの実施態様で、2種以上の、同様のまたは或いは異なる特異性を持つ抗体を、DME またはその断片あるいは変異体への特異結合に関しスクリーニングできる。こうしてスクリーニングした抗体の結合特異性を選択し、DME の特定の断片または変異体を同定できる。

50

1つの実施態様で、DMEの特定の断片または変異体を優先的に同定できる結合特異性を持つ抗体を選択できる。別の実施態様で、DME産生の増加、低下、或いは異常を有する特定の疾患または病状を優先的に診断できる結合特異性を持つ抗体を選択できる。

#### 【0253】

1つの実施態様で、アンティカリン(anticalin)を、DMEまたはその断片あるいは変異体への特異結合に関しスクリーニングできる。アンティカリンはリポカリン足場(scaffold)に基づいて作成されたりガンド結合タンパク質である(Weiss, G.A. 及び H.B. Lowman (2000) Chem. Biol. 7:R177-R184; Skerra, A. (2001) J. Biotechnol. 74:257-275)。リポカリン類のタンパク構造には8本鎖逆平行 ストランドを持つ或る バレルを含むことがあり、このバレルはその開放端で4つのループを支持する。これらのループはリポカリンの天然リガンド結合部位を形成し、この部位はin vitroでアミノ酸置換によって再度人工操作して、新規な結合特異性を与えることができる。このアミノ酸置換は当分野で既知の方法または本明細書に記載の方法を用いて行うことができる。また、保存的置換(例えば、結合特異性を変えないような置換)、あるいは、結合特異性を少し、中等度、または大きく変えるような置換を行うこともできる。

10

#### 【0254】

一実施態様では、DMEに特異的に結合、もしくは刺激または阻害する化合物のスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてDMEを発現する適切な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳類、酵母、ショウジョウバエ、または大腸菌からの細胞が含まれる。次に、DMEを発現する細胞、またはDMEを含む細胞膜分画を試験化合物と接触させて、結合、刺激、或いはDMEまたは試験化合物の何れかの活性の阻害を分析する。

20

#### 【0255】

或るアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、フルオロフォア、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたDMEと混合するステップと、DMEとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出および測定を行うことができる。更にこのアッセイは、無細胞再構成標本、化学ライブラリ、または、天然産物の混合物を用いて実施でき、試験化合物(群)は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定する。

30

#### 【0256】

アッセイを用いて、或る化合物が、その天然リガンドに結合する能力、および/または、その天然リガンドの、その天然受容体への結合を阻害する能力を評価しうる。こうしたアッセイの例としては、米国特許第5,914,236号および第6,372,724号に記載されたような放射ラベルアッセイを含む。関連した実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換が或るポリペプチド化合物(受容体など)に導入され、その天然リガンドに結合する能力を向上または改変しうる(Matthews, D.J. および J.A. Wells. (1994) Chem. Biol. 1:25-30)。別の関連した実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換が或るポリペプチド化合物(リガンドなど)に導入され、その天然受容体に結合する能力を向上または改変しうる(Cunningham, B.C. および J.A. Wells (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3407-3411; Lowman, H.B.他(1991) J. Biol. Chem. 266:10982-10988)。

40

#### 【0257】

DME或いはその断片または変異体を用いて、DMEの活性をモジュレートする化合物をスクリーニングしうる。このような化合物としては、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニストまたは逆アゴニストなどが含まれ得る。一実施態様では、DMEが少なくとも1つの試験化合物と混合される、DME活性が許容される諸条件下で或るアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのDMEの活性を試験化合物不在下でのDMEの活性と比較する。試験化合物の存在下でのDMEの活性の変化は、DMEの活性をモジュレートする化合物の存在を標示する。別法では、試験化合物を、DMEの活性に適した条件下で、DMEを有するin vitro系すな

50

わち無細胞系と混合してアッセイを実施する。これらアッセイの何れにおいても、DMEの活性をモジュレートする試験化合物は間接的にモジュレートする場合があります、その際は試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つ、または複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

#### 【0258】

別の実施態様では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、DMEまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ノックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（例えば米国特許第5,175,383号および第5,767,337号を参照）。例えば129/SvJ細胞系などのマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo: Capecchi, M.R.(1989) Science 244:1288-1292)などのマーカー遺伝子で破壊した、目的の遺伝子を持つベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより、宿主ゲノムの対応する領域に組込まれる。或いは、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をノックアウトする（Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U.他(1997) Nucleic Acids Res.25:4323-4330）。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス株などから採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。これらの胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を特定し、これらを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬物で検査されうる。

10

20

#### 【0259】

DMEをコードするポリヌクレオチドをin vitroでヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉および外胚葉の細胞タイプを含む、少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統および心筋細胞に分化する（Thomson, J.A.他(1998) Science 282:1145-1147）。

#### 【0260】

DMEをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物（ブタ）または遺伝子組換え動物（マウスまたはラット）を作製できる。ノックイン技術を用いて、DMEをコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について試験し、潜在的医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばDMEを乳汁内に分泌するなどDMEを過剰発現する哺乳動物近交系は、この蛋白の簡便な源泉ともなり得る（Janne, J. 他 (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74）。

30

#### 【0261】

（治療）

DMEの複数の領域と薬物代謝酵素類との間には、例えば配列及びモチーフに関する、化学的及び構造的類似性が存在する。DMEの発現は、腎臓組織、肝臓組織、脳組織、副腎腫瘍組織、膀胱腫瘍組織、肺腫瘍組織に、密接に関連する。またDMEを発現する組織の数例は、表6と実施例1.1とを見られたい。このようにDMEは、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝疾患を含む胃腸疾患において或る役割を果たすと考えられる。DMEの発現若しくは活性の亢進に関連する疾患の治療においては、DMEの発現または活性を低下させることが望ましい。また、DMEの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、DMEの発現または活性を亢進させることが望ましい。

40

#### 【0262】

従って、一実施態様では、DMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にDMEまたはその断片や誘導体が投与され得る。限定するものではないが、このような疾患には自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内

50

分泌障害、眼の疾患、代謝障害および、肝疾患を含む胃腸疾患を含み、自己免疫/炎症疾患には、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィー（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患（胎児赤芽球症）、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、ウェルナー症候群、癌・血液透析・体外循環の合併症、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、細胞増殖異常には日光角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳腺、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。発生・発達障害には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞）、スミス マジェニス症候群（Smith-Magenis syndrome）、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、遺伝性神経病（シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症など）、甲状腺機能低下症、水頭症、Syndenham舞踏病（Syndenham's chorea）及び脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴を含む。内分泌障害には、例えば原発脳腫瘍、腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、例えば性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラー クリスチャン病、レテラー-ジーヴェ病（Letterer-Siwe disease）、サルコイドーシス、トルコ鞍空虚（empty sella）症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、例えば先端巨大症、巨人症や、良性腺腫によって発生しやすい抗利尿ホルモン（ADH）不適合分泌症候群（SIADH）を含む下垂体亢進に関連した障害と、例えば甲状腺腫、粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、例えば甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プラマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病（慢性低カリウム症、原文 chronic hypercalcemiaは誤りか）を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、例えば副腎皮質の癌腫、過形成や腺腫、アルカローシス関連高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病などの副腎関連障害と、例えば女性の異常プロラクチン産生、不妊症、子宮内膜症、月経周期摂動、多嚢胞卵巣疾患、高プロラクチン血症、ゴナドトロピン単独欠損（isolated gonadotropin deficiency）、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞不全、男性更年期、胚芽細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 $\alpha$ -還元酵素症候群、女性化乳房などの性腺ステロイドホルモン関連疾患を含む。眼の疾患には、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、中毒性視神経症、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、網膜色素変性（色素性網膜炎）、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、視交叉腫瘍（chiasmatal tumor）がある。代謝障害には、アジソン病、脳髄黄色腫症、先天

10

20

30

40

50

性副腎過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、アドレナリン過剰症、低アドレナリン症、副甲状腺亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂質血症、高脂血症、脂質ミオパシー (lipid myopathies)、脂肪異栄養症、リソソーム蓄積症、メンケス症候群、後角症候群 (occipital horn syndrome)、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠乏くる病、低カルシウム血症、低リン酸血症、思春期後小脳性運動失調症、チロシン血症がある。胃腸疾患には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、遺伝性高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動的うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性結腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、脂肪肝、血色素症、ウィルソン病、-1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性脂肪肝、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性過形成・腺腫・癌腫を含む肝腫瘍がある。

10

## 【0263】

20

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、DMEまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを被験者に投与し得る。

## 【0264】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたDMEを有する組成物を、好適な医薬用キャリアと共に被験者に投与し得る。

## 【0265】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、DMEの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

30

## 【0266】

更なる実施態様では、DMEの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、被験者にDMEのアンタゴニストを投与し得る。限定するものではないが、こうした疾患の例には、上記の自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、および肝疾患を含む胃腸疾患が含まれる。一実施態様では、DMEに特異結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはDMEを発現する細胞または組織に薬物を運ぶターゲティング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

## 【0267】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、DMEをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを被験者に投与し得る。

40

## 【0268】

別の実施態様では、任意のタンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、相補配列、またはベクター実施態様を、別の適切な治療薬と組合せて投与できる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従って選択し得る。治療薬と組合せることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法により、少量の各薬物で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

## 【0269】

50

DMEのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造できる。詳しくは、精製されたDMEを用いて抗体を産生または、治療薬のライブラリ群をスクリーニングし、DMEと特異結合する薬物を同定できる。DMEの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造できる。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Fabフラグメント、及びFab発現ライブラリによって作られたフラグメントが含まれる。但し、これらに限定されるものではない。中和抗体（すなわち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。一本鎖抗体（例えばラクダまたはラマ由来）は強力な酵素阻害剤である可能性があり、ペプチド擬態物質の設計において、また免疫吸着剤とバイオセンサーとの開発において利点を持つようである(Muyldermans, S. (2001) J. Bio technol. 74:277-302)。

10

## 【0270】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、DMEまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ジニトロフェノールなどの界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG(カルメット グラン杆菌)およびコリネバクテリウム パルバム(*Corynebacterium parvum*)が特に好ましい。

20

## 【0271】

DMEに対する抗体を誘導するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を持つものが好ましく、一般的には、約10個以上のアミノ酸からなる配列となる。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片はまた、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。DMEアミノ酸類の短いストレッチ群は、KLHなど他のタンパク質の配列と融合され、このキメラ分子に対する抗体群が産生され得る。

## 【0272】

DMEに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって抗体分子群を産生する、任意の技術を用いて作製できる。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術がある(Kohler, G.他(1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D.他(1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J.他(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole, S.P.他(1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120)。

30

## 【0273】

更に、ヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの「キメラ抗体」作製のために開発した技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(Morrison, S.L.他(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M.S. 他(1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.他(1985) Nature 314:452-454)。別法では、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、DME特異的一本鎖抗体を生成し得る。関連した特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる(Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137)。

40

## 【0274】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは文献に開示されているように非常に特異的な結合試薬の免疫グロブリンのライブラリ類またはパネル類のスクリーニングによっても行い得る(Orlandi, R.他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G.他(1991) Nature 349:293-299)。

## 【0275】

50

DMEに対する特異結合部位を持つ抗体断片をも産生し得る。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')<sub>2</sub>断片と、F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFab断片とがある。あるいは、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片を迅速且つ容易に同定することが可能となる(Huse, W.D.他(1989) Science 246:1275-1281)。

【0276】

種々の免疫学的検定(イムノアッセイ)を用いてスクリーニングすることにより、所望の特異性を有する抗体を同定し得る。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合結合試験、または免疫放射定量測定法のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、DMEとその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。2つの非干渉性DMEエピトープに対して反応性を持つモノクローナル抗体群を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合試験も利用できる(Pound、前出)。

【0277】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、DMEに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数Kaで表すが、このKaは、平衡状態の下でDME抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除して得られる値である。ポリクローナル抗体類は多数のDMEエピトープに対して親和性が不均一であり、或るポリクローナル抗体製剤に関して判定したKaは、DMEに対する抗体群の平均の親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は或る特定のDMEエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体の或る製剤について判定したKaは、親和性の真の測定値を表す。Ka値が $10^9 \sim 10^{12}$  L/molの高親和性抗体製剤は、DME抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。DMEが抗体から最終的に(好ましくは活性化状態で)解離する必要がある免疫精製(immunopurification)および類似の処理には、Ka値が $10^6 \sim 10^7$  liter/molの低親和性抗体製剤を用いるのが好ましい(Catty, D.(1988)Antibodies, Volume I: A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. および Cryer, A.(1991)A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0278】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価および結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような製剤の品質および適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$  mg/mlの特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$  mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体製剤は一般に、DME抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である(Catty, 前出; Coligan他、前出)。

【0279】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用される。ある実施態様では、DMEをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子(DNA、RNA、PNA、または修飾したオリゴヌクレオチド)を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはより大きな断片が、DMEをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である(Agrawal, S., 編集(1996) Antisense Therapeutics, Humana Press, Totawa NJ)。

【0280】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を適切な標的細胞に導入するのに好適な、任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を作製する発現プラスミドの形で、細胞内に送達し得る(Slater, J.E.他(1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102:469-475; Sca

10

20

30

40

50

nlon, K.J.他(1995) 9:1288-1296)。アンチセンス配列はまた、細胞内に、ウイルスベクター例えばレトロウイルスおよびアデノ随伴ウイルスのベクターを用いて導入しうる(Miller, A.D. (1990) Blood 76:271; Ausubel他、前出; Uckert, W.およびW. Walther (1994) Pharmacol. Ther. 63:323-347)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープおよび当分野で公知のその他のシステムが含まれる(Rossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51:217-225; Boado, R.J.他(1998) J. Pharm. Sci. 87:1308-1315; Morris, M.C.他(1997) Nucleic Acids Res. 25:2730-2736)。

#### 【0281】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療により、(i) 遺伝子欠損症を治療し(例えばX染色体連鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M.他(2000) Science 288:669-672)により特徴付けられる重症複合型免疫不全(SCID)-X1病の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に関連する重症複合型免疫不全症候群(Blaese, R.M. 他(1995) Science 270:475-480; Bordignon, C.他(1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J.他(1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G.他(1995) Hum.Gene Therapy 6:643-666; Crystal, R.G.他(1995) Hum.Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア(thalassaemia)、家族性高コレステロール血症や、第8因子若しくは第9因子欠損に起因する血友病(Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I.M. および N. Somia (1997) Nature 389:239-242)、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生体、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschla, E.他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)などヒトレトロウイルス、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、Candida albicansおよびParacoccidioides brasiliensis等の寄生真菌、並びに熱帯熱マラリア原虫およびクルーズトリパノソーマ等の寄生原虫に対する防御機能を有するタンパク質を発現できる。DMEの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からDMEを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

#### 【0282】

本発明の更なる実施例では、DMEの欠損による疾患や異常症を、DMEをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってDME欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii) 遺伝子銃、(iii) リポソームを介した形質移入、(iv) 受容体を介した遺伝子導入、および(v) DNAトランスポゾンの使用がある(Morgan, R.A. および W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J.-L. および H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)。

#### 【0283】

DMEの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。DMEを発現させるために、(i) 構成的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、若しくは - アクチンの遺伝子など)、(ii) 誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. および H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他(1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. および H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVGRXRおよびPINDに含まれている: Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター(Rossi, F.M.V. および H.M. Bla

u, 前出)、または (iii) 正常な個体に由来する、DMEをコードする内因性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

【0284】

市販のリポソーム形質転換キット(例えばInvitrogen社のPerFect Lipid Transfection Kit)を用いれば、当業者は実験の各パラメータを最適化する努力をさほど要さず、ポリヌクレオチド群を、培養中の標的細胞群に送達し得る。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. および A.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neumann, E. 他(1982) *EMBO J.* 1:841-845)。初代培養細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳類の形質移入プロトコルの修正が必要である。

【0285】

本発明の別の実施態様では、DMEの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や障害は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーター若しくは独立したプロモーターの調節の下でDMEをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコード配列を伴うRev応答性エレメント(RRE)と、からなるレトロウイルスベクターを作製して治療できる。レトロウイルスベクター(例えばPFBおよびPFBNE0)はStratagene社から市販されており、刊行データ(Riviere, I. 他(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6733-6737)に基づく。上記データを引用することを以て本明細書の一部とする。このベクターは、好適なベクター産生細胞株(VPCL)において増殖される。VPCLは、各標的細胞上の受容体への親和性を持つエンベロープ遺伝子を、またはVSVgなど汎親和性エンベロープタンパク質を発現する(Armentano, D. 他(1987) *J. Virol.* 61:1647-1650; Bender, M.A. 他(1987) *J. Virol.* 61:1639-1646; Adam, M.A. および A.D. Miller (1988) *J. Virol.* 62:3802-3806; Dull, T. 他(1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zufferey, R. 他(1998) *J. Virol.* 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号(「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」)にレトロウイルスパッケージング細胞株を得る方法が開示されており、言及をもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクター類の繁殖や、細胞集団(例えばCD4<sup>+</sup>T細胞群)の形質導入、および形質導入した細胞群の患者への戻しは、遺伝子治療分野では当業者に周知の手法であり、多数の文献に記載がある(Ranga, U. 他(1997) *J. Virol.* 71:7020-7029; Bauer, G. 他(1997) *Blood* 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) *J. Virol.* 71:4707-4716; Ranga, U. 他(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1201-1206; Su, L. (1997) *Blood* 89:2283-2290)。

【0286】

或る実施態様では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、DMEの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にDMEをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクター類の作製およびパッケージングについては、当業者に周知である。複製欠損型アデノウイルスベクター類は、種々の免疫調節タンパク質をコードする遺伝子群を、無損傷の臍島内に導入する目的で多様に利用し得ることが証明された(Csete, M.E. 他(1995) *Transplantation* 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号(「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクター類については、Antinozzi, P.A. 他(1999; *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544)並びにVerma, I.M. および N. Somia (1997; *Nature* 18:389:239-242)を参照されたい。

【0287】

別の実施態様では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、DMEの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する標的細胞に、DMEをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターの利用は、HSVが向性を持つ中枢神経細胞にDMEを導入する際に特に有用たり得る。ヘルペス系ベクター類の作製およびパッケージングは、当業者に公知である。或る複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV)1型系のベクター

10

20

30

40

50

が、或るレポーター遺伝子の、霊長類の眼への送達に用いられている (Liu, X. 他 (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 (「Herpes simplex virus swains for gene transfer」) に開示されており、該特許は言及をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的に好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外因性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22を欠失した組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクター類については、Goins, W.F. 他 (1999; *J. Virol.* 73:519-532) および Xu, H. 他 (1994; *Dev. Biol.* 163:152-161)。クローン化したヘルペスウイルス配列群の操作、大ヘルペスウイルスゲノム (large herpesvirus genomes) の様々なセグメントを持つ複数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長および増殖、並びに細胞群へのヘルペスウイルスの感染は、当業者に公知の技術である。

10

**【0288】**

別の実施態様では、ウイルス (正の一本鎖RNAウイルス) ベクターを用いてDMEをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス (Semliki Forest Virus, SFV) の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクター類はSFVゲノムに基づく (Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、ウイルスのカプシドタンパク質群を通常はコードする、サブゲノムRNAが産生される。このサブゲノムRNAは、完全長ゲノムRNAよりも高レベルに複製するので、酵素活性 (例えばプロテアーゼおよびポリメラーゼ) を持つウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質群が過剰産生される。同様に、DMEをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のDMEをコードするRNAが産生され、高いレベルでDMEが合成される。通常、ウイルスの感染は、数日以内の細胞溶解を伴う。一方、シンドビスウイルス (SIN) の或る変異体を有するハムスター正常腎臓細胞 (BHK-21) 群が持続的な感染を確立する能力は、ウイルス類の溶解複製を、遺伝子治療に応用し得るように好適に改変可能であることを示唆する (Dryga, S.A. 他 (1997) *Virology* 228:74-83)。  
ウイルスの宿主域は広いので、様々なタイプの細胞にDMEを導入できる。或る集団における或るサブセットの細胞群の特異的形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、ウイルスのcDNAおよびRNAの形質移入方法およびウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

20

30

**【0289】**

転写開始部位 (transcription initiation site) 由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。この位置は、例えばスタート部位 (start site) から数えて約 - 10 と約 + 10 の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子と結合できるように十分に開こうとする、二重らせんの能力を阻害するので有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある (Gee, J.E. 他 (1994) *in Huber, B.E. および B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, 163-177ページ)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するように設計することができる。

40

**【0290】**

リボザイムは酵素的RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いる。リボザイム作用の機序は、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、人為操作されたハンマーヘッド型リボザイム分子は、DMEをコードするRNA分子のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する可能性がある。

**【0291】**

50

任意のRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、切断部位を持つ標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列が、そのオリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴をもっていないかを評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチド群とのハイブリダイゼーションへのアクセス可能性をテストすることによって行い得る。

#### 【0292】

相補リボ核酸分子およびリボザイムは、核酸分子合成のための当分野で既知の任意の方法を用いて作製し得る。作製方法には、固相ホスホラミダイト化学合成など、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、DMEをコードするDNA分子の*in vitro*および*in vivo*転写によってRNA分子を作成し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6などの好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。あるいは、相補的RNAを構成的あるいは誘導的に合成するこれらのcDNA作成物を、細胞株、細胞または組織内に導入できる。

#### 【0293】

細胞内の安定性を高め半減期を延ばすためRNA分子を修飾し得る。限定するものではないが可能な修飾としては、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方において隣接配列群を追加することや、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホリチオエートまたは2'-O-メチルを使用することが含まれる。この概念は、本来はPNA群の産出におけるものであるが、これら全ての分子に拡大することができる。そのためには、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンにアセチル-、メチル-、チオ-および同様の修飾をしたものや、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン(queosine)、ワイプトシン(wybutosine)を加える。

#### 【0294】

本発明の更なる実施態様には、DMEをコードするポリヌクレオチドの発現を改変する上で有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの発現改変を起こすのに有効であり得る化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチドや、転写因子などのポリペプチド転写制御因子、および、特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を改変し得る。従って、DMEの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、DMEをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、DMEの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、DMEをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有用であり得る。

#### 【0295】

或る特定ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性について、少なくとも1個、または複数の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物を得るには、当分野で公知の任意の方法を用い得る。取得方法としては、以下の場合に有効な既知化合物の化学修飾がある。ポリヌクレオチドの発現を改変する場合と、既存の、市販のまたは私的な、天然または非天然の化合物のライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的および/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合とである。DMEをコードするポリヌクレオチドを持つサンプルを、このようにして得た試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルは例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、あるいは*in vitro*無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。DMEをコードするポリヌクレオチドの発現における変容は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、DMEをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼー

10

20

30

40

50

ションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量することにより、1つ以上の試験化合物に曝露される、または曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較のための基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を改変する際に試験化合物が有効であることを示す。或る特定ポリヌクレオチドの改変発現に有効な化合物のためのスクリーニングを実行でき、例えば分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他(1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他(2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clarke, M.L. 他(2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いて行い得る。本発明の或る特定の実施態様は、或る特定ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性について、オリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾したオリゴヌクレオチド) の組合せライブラリをスクリーニングする過程に関する (Bruice, T.W. 他(1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. 他(2000) 米国特許第6,022,691号)。

10

**【0296】**

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro* および *ex vivo* の使用に対して同程度に適している。*ex vivo* 治療の場合、ベクターを、患者から採取した幹細胞内に導入し、クローニング増殖して同患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクションによる、またはリポソーム注入やポリカチオンアミノポリマーによる送達は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる (Goldman, C.K. 他(1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466)。

20

**【0297】**

上記の治療方法はどれも例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルなどの哺乳類を含めて治療が必要な全ての被験体に適用できる。

**【0298】**

本発明の更なる実施態様は、薬物として許容できる或る賦形剤と共に製剤される或る活性成分を一般に有する、或る組成物の投与に関する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴムおよびタンパク質がある。様々な剤型が広く知られており、詳細は *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような組成物は、DME、DMEの抗体、擬態物質、アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターなどからなる。

30

**【0299】**

本発明に用いられる組成物は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

**【0300】**

肺から投与する組成物は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子 (例えば伝統的な低分子量有機薬) の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。高分子 (例えばより大きなペプチドおよびタンパク質) の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺送達を最近向上したことにより、インスリンなどの薬物を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした (Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号などを参照)。肺送達は、針注射なしに投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

40

**【0301】**

本発明での使用に適した組成物には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する組成物が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

**【0302】**

DMEを有する、またはその断片群を有する高分子群を直接、細胞内に送達すべく、特殊な種々の形状の組成物群が調製され得る。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム

50

製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、DMEまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の短い陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質類は、或るマウスモデル系の、脳を含む全ての組織の細胞群に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. 他(1999) Science 285:1569-1572)。

#### 【0303】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において先ず治療有効投与量を推定できる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲および投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量および投与経路を決定することができる。

10

#### 【0304】

治療有効量は、症状や容態を回復させる活性成分の量、たとえばDMEまたはその断片、DMEの抗体、DMEのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの量を指す。治療有効性及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED<sub>50</sub> (集団の50%の治療有効量) またはLD<sub>50</sub> (集団の50%の致死量) を測定するなどして決定することができる。毒性効果の、治療効果に対する用量比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。細胞培養アッセイと動物実験とから得られたデータは、ヒトに用いる投与量の範囲の策定に用いられる。このような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆どあるいは全く持たず、ED<sub>50</sub>を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。投与量は、用いられる投与形態、患者の感受性および投与の経路によってこの範囲内で変動する。

20

#### 【0305】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。十分なレベルの活性成分を与え、あるいは所望の効果を維持すべく、用法および用量を調整する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の全身の健康状態、患者の年齢、体重及び性別(ジェンダー)、投与の時間及び頻度、併用薬、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮しうる。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3~4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

30

#### 【0306】

通常投与量は、投与経路にもよるが約0.1~100,000 µgで、合計で約1gまでとする。特定の投与量および送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用できる。当業者は、ヌクレオチドの処方では、タンパク質またはそれらのインヒビター類とは異なる処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、症状、部位などに特異的なものとなる。

#### (診断)

別の実施態様では、DMEに特異結合する抗体類が、DMEの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはDMEやDMEのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイ類に用いられる。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で作成される。DMEの診断アッセイには、ヒトの体液から、あるいは細胞や組織の抽出物から、抗体および標識を用いてDMEを検出する方法が含まれる。この抗体は、修飾して、または修飾せずに使用される。また、レポーター分子との共有結合または非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広く様々な種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

40

#### 【0307】

DMEを測定するための、ELISA, RIA, 及びFACSなど、種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変容した或いは異常なレベルのDME発現を診断するための基盤を提供する。正常或いは標準的なDMEの発現の値は、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採

50

取した体液または細胞とDMEに対する抗体とを複合体の形成に適した条件下で結合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験体、対照および生検組織からの疾患サンプルで発現するDMEの量を標準値と比較する。標準値と被験体との偏差が、疾患を診断するパラメータを確定する。

#### 【0308】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチド群を、診断のために用い得る。用い得るポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド、相補的RNAおよびDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用いて、DMEの発現が疾患と関連し得る生検組織群における、遺伝子発現を検出し定量し得る。この診断アッセイを用いて、DMEの有無や過剰発現を調べ、治療時のDME値の調節を監視し得る。

10

#### 【0309】

一実施形態では、例えばDMEをコードまたは近縁の分子群をコードするゲノム配列群など、ポリヌクレオチド群を検出できるPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを用いて、DMEをコードする核酸配列群を同定できる。プローブが高度に特異的な領域（例えば5'調節領域）から作られている、或いはやや特異性の低い領域（例えば保存されたモチーフ）から作られているという、プローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーとによって、そのプローブがDMEをコードする天然配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子変異配列や関連配列を同定するかどうかが決まることとなる。

#### 【0310】

プローブ類はまた、関連する配列群の検出に利用され得る他、DMEをコードする任意の配列との少なくとも50%の配列同一性を持ち得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:14-26の配列、或いはDME遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

20

#### 【0311】

DMEをコードするポリヌクレオチド群に対して特異的なハイブリダイゼーションプローブ群の作製手段としては、DMEまたはDME誘導體群をコードするポリヌクレオチド群を、mRNAプローブ群の作製のためのベクター類にクローニングする方法を含む。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプ

30

#### 【0312】

DMEをコードするポリヌクレオチドを用いて、DMEの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生または発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害および、肝疾患を含む胃腸疾患を含み、自己免疫/炎症疾患には、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィー（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患（胎児赤芽球症）、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、ウェルナー症候群、癌・血液透析・体外循環の合併症、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染

40

50

症、外傷が含まれ、細胞増殖異常には日光角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳腺、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。発生・発達障害には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌノベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、遺伝性神経病(シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症など)、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham舞蹈病(Sydenham's chorea)及び脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴を含む。内分泌障害には、例えば原発脳腫瘍、腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、例えば性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラー クリスチャン病、レテラー-ジーヴェ病(Letterer-Siwe disease)、サルコイドーシス、トルコ鞍空虚(empty sella)症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、例えば先端巨大症、巨人症や、良性腺腫によって発生しやすい抗利尿ホルモン(ADH)不適合分泌症候群(SIADH)を含む下垂体亢進に関連した障害と、例えば甲状腺腫、粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、例えば甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プラマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病(慢性低カリウム症、原文chronic hypercalcemiaは誤りか)を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、例えば副腎皮質の癌腫、過形成や腺腫、アルカローシス関連高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病などの副腎関連障害と、例えば女性の異常プロラクチン産生、不妊症、子宮内膜症、月経周期摂動、多嚢胞卵巣疾患、高プロラクチン血症、ゴナドトロピン単独欠損(isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞不全、男性更年期、胚芽細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5-還元酵素症候群、女性化乳房などの性腺ステロイドホルモン関連疾患を含む。眼の疾患には、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、中毒性視神経症、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、網膜色素変性(色素性網膜炎)、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、視交叉腫瘍(chiasmal tumor)がある。代謝障害には、アジソン病、脳腱黄色腫症、先天性副腎過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、アドレナリン過剰症、低アドレナリン症、副甲状腺亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂質血症、高脂血症、脂質ミオパシー(lipid myopathies)、脂肪異栄養症、リソソーム蓄積症、メンケス症候群、後角症候群(occipital horn syndrome)、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、ブソイドビタミンD欠乏くる病、低カルシウム血症、低リン酸血症、思春期後小脳性運動失調症、チロシン血症がある。胃腸疾患には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、遺伝性高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動的うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍

10

20

30

40

50

性結腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群（AIDS）腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、脂肪肝、血色素症、ウィルソン病、-1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性脂肪肝、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性過形成・腺腫・癌腫を含む肝腫瘍がある。DMEをコードするポリヌクレオチドは、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック（dipstick）、ピン（pin）、およびマルチフォーマットのELISA式アッセイ、および、変容したDME発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用可能である。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。 10

#### 【0313】

或る特定の態様では、DMEをコードするヌクレオチド群を、関連する障害、特に上記した障害を検出するアッセイ類に用い得る。DMEをコードする配列に相補的なポリヌクレオチドを、標準的な方法で標識化し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が対照サンプルと比較して著しく変化している場合は、そのサンプル内のDMEをコードするポリヌクレオチド群のレベル変化の存在により、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を評価するため、あるいは個々の患者の治療をモニターするために用いることもできる。 20

#### 【0314】

DMEの発現に関連する障害の診断の基礎を提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から採取された体液或いは細胞抽出物と、DMEをコードする配列或いはその断片とを混合することにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量で用いて行った実験から得た値を正常な被験者から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。 30

#### 【0315】

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを定期的に繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

#### 【0316】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供し得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。 40

#### 【0317】

DMEをコードする配列群から設計されたオリゴヌクレオチド群の、更なる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、あるいはin vitroで産出し得る。オリゴマーは、好ましくはDMEをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはDMEをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適化した条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェンシー条件下で、近縁のDNAあるいはRNA配列の検出、定量、あるいはその両方のため用いることが可能である。 50

## 【0318】

或る特定態様で、DMEをコードするポリヌクレオチド群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用い塩基多型(SNP)を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入および欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP(single-stranded conformation polymorphism)及び蛍光SSCP(fSSCP)がある。SSCPでは、DMEをコードするポリヌクレオチド群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類とポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を用いDNAを増幅する。このDNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液などに由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー(amplimer)の検出が可能になる。更に、インシリコSNP(in silico SNP, isSNP)と呼ばれる配列データベース分析法は、共通のコンセンサス配列へアセンブリされるような個々のオーバーラップするDNA断片群の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調製に、または統計モデルとDNA配列クロマトグラムの自動分析とを用いたシーケンシングのエラーに起因する配列変異を、フィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理MASSARRAYシステム(Sequenom, Inc., San Diego CA)を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

10

## 【0319】

SNPを利用して、ヒト疾患の遺伝的基礎を研究しうる。例えば少なくとも16種の一般的SNPが、インスリン非依存型糖尿病と関連している。SNPはまた、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、慢性肉芽腫症等の単一遺伝子病の転帰の違いを研究するために有用である。例えばマンノース結合レクチンであるMBL2における変異体群は、嚢胞性線維症における有害な肺の転帰との相関が示されている。SNPはまた、薬理ゲノム学においても有用性を持つ。薬理ゲノム学は、患者の薬物への応答(例えば命を脅かす毒性)に影響する遺伝的変異体の同定を行う。例えばNアセチル転移酵素における或る変異は、抗結核薬であるイソニアジドに反応しての末梢ニューロパシーの高い発症率と関連する。一方、ALOX5遺伝子のコアプロモータにおける或る変異の結果、5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする或る抗喘息薬での治療に対する臨床応答が低下する。異なる集団群におけるSNPの分布の分析は、遺伝的浮動、突然変異、遺伝子組換え、遺伝子選択の調査に有用であり、集団の起源とその移動との追跡にも有用である(Taylor, J.G.他(2001) Trends Mol. Med. 7:507-512; Kwok, P.-Y. および Z. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543; Nowotny, P. 他(2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641)。

20

30

## 【0320】

DMEの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅(coamplification)、及び、標準曲線から得た結果の補間もある(Melby, P.C.他(1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplaa, C.他(1993) Anal. Biochem. 212:229-236)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

40

## 【0321】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチドに由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、或るマイクロアレイにおけるエレメント群として用いることができる。多数の遺伝子の相対発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異および多型性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬物の活性を開発およびモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効な

50

治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に効果的で副作用の最も少ない治療薬を選択することができる。

#### 【0322】

別の実施態様では、DME、DMEの断片群または、DMEに特異的な抗体類を、或るマイクロアレイ上のエレメント群として用い得る。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質間相互作用、薬物-標的相互作用および遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定できる。

#### 【0323】

或る実施態様は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを作製する、本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプによる、遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数および相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilhamer 他 米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」;言及を以て特に本明細書の一部とする)。従って、特定の組織または細胞タイプの転写物または逆転写物全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその相補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施態様では、本発明のポリヌクレオチドまたはそれらの相補体が1マイクロアレイ上に複数エレメントの1サブセットを持つような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルを提供し得る。

10

20

#### 【0324】

転写イメージは、組織、細胞株、生検またはその生体サンプルから単離した転写物を用いて作製し得る。転写イメージはしたがって、組織または生検サンプルの場合にはin vivo、細胞株の場合にはin vitroでの遺伝子発現を反映する。

#### 【0325】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、in vitroモデル系および薬物の前臨床評価に、あるいは工業的または天然の環境化合物の毒性試験に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用および毒性のメカニズムを標示し、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性シグネチャ (toxicant signatures) と称される、特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 2 4:153-159; Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471)。試験化合物が、既知毒性を有する化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子および遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合に、最も有用且つ正確である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が、最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データをノーマライズすることに使用できるため、それらの遺伝子は重要である。ノーマライズ手順は、種々の化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。或る毒性シグネチャのエレメント群に遺伝子機能を割り当てることは毒性機序の解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要でない (例えば National Institute of Environmental Health Sciences の Press Release 00-02, 2000年2月29日, <http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm> 参照)。したがって、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、全ての発現した遺伝子配列を含めることは、重要且つ望ましい。

30

40

#### 【0326】

或る実施態様では、核酸を有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより、この試験化合物の毒性を算定しうる。処理した生体サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1つ以上のプローブでハイブリダイズし、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量し得る。処理した生体サンプル中の転写レベルを、未処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写物レベルの差

50

は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

【0327】

別の実施態様は、本発明で開示するポリペプチド群を用いた、或る組織または細胞タイプのプロテオームの分析に関する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更なる分析にかけることができる。プロテオーム発現パターンすなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数および相対存在量を定量することにより分析し得る。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離および分析することにより作成し得る。或る実施態様では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により、分離が達成される（前出SteinerおよびAnderson）。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、あるいは銀染色液または蛍光染色液などの物質を用いてゲルを染色することにより、分散した、独自の位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常、サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または未処理のいずれかの生体サンプルからの、同等に位置したタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシークエンシングする。或るスポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、目的のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列データが得られる。

10

20

【0328】

プロテオームのプロファイルは、DMEに特異的な抗体類を用いてDME発現レベルを定量することによっても作成できる。或る実施態様では、マイクロアレイ上のエレメントとしてこれら抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することにより、タンパク質発現レベルを定量する（Lueking, A. 他(1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Mendozze, L.G.他(1999) Biotechniques 27:778-788）。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物とサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

30

【0329】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写物レベルでの毒性シグネチャと並行に分析するべきである。いくつかの組織のいくつかのタンパク質については、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関が乏しいので（Anderson, N.L. および J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537）、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロファイルを改変するような化合物の分析において、プロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中の転写物の分析はmRNAの急速な分解のために困難なので、プロテオームのプロファイル作成はこのような場合により信頼でき、情報価値があり得る。

40

【0330】

別の実施態様では、タンパク質を含有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシークエンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

【0331】

別の実施態様では、タンパク質を含有する生体サンプルを試験化合物で処理することに

50

より試験化合物の毒性を算定する。生体サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。

#### 【0332】

マイクロアレイは、本技術分野で既知の方法で調製、使用し、分析する (Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D. 他 (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155; Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号)。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、詳細はSchena, M., 編集 (1999; DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, London) に記載がある。

10

#### 【0333】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードする核酸配列群を用いて、天然ゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブ群を作製できる。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多重遺伝子族のメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154)。一度マッピングすると、核酸配列群を用いて、例えば或る病状の遺伝を特定染色体領域の遺伝とまたは制限酵素断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を開発し得る (Lander, E.S. および D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357)。

20

#### 【0334】

蛍光原位置ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的および遺伝的地図データと関連し得る (Heinz-Ulrich 他 (1995) in Meyers, 前出、965-968 ページ)。遺伝的地図データの例は、種々の科学雑誌あるいは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見られる。物理的染色体地図上の、DMEをコードする遺伝子の位置と、特定の疾患との相関性、あるいは特定の疾患に対する素因との相関性は、この疾患と関連するDNAの領域の決定に役立ち得るため、位置を決定するクローニングの作業を促進し得る。

30

#### 【0335】

確定した染色体マーカー類を用いた連鎖分析などの物理的マッピング技術、および染色体標本の原位置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝的地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、ポジショナルクローニングなどの遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探る研究者にとって価値がある。いったん疾患または症候群に關与する遺伝子 (群) が、血管拡張性失調症の11q22-23領域など、特定のゲノム領域への遺伝的連鎖によって、大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子あるいは調節遺伝子を提示している可能性がある (Gatti, R.A. 他 (1988) Nature 336:577-580)。転座、反転などに起因する、健常者、保有者、罹病者の三者間における染色体位置の相違を検出する場合にも、本発明のヌクレオチド配列を用い得る。

40

#### 【0336】

本発明の別の実施態様では、DME、その触媒作用断片群、或いは免疫原断片群、またはそのオリゴペプチド群を、種々の任意の薬物スクリーニング技術における、化合物群のライブラリ類のスクリーニングに用い得る。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に

50

遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置しうる。DMEと、試験する薬物との結合による複合体の形成を測定し得る。

【0337】

別の薬物スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる(Geysen他(1984) PCT出願W084/03564)。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、DME、或いはその断片と反応してから洗浄する。次に、結合したDMEが、当分野で周知の種々の方法で検出される。精製されたDMEはまた、前記した薬物スクリーニング技術に用いるプレート上に直接、被覆し得る。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

10

【0338】

別の実施態様では、DMEと特異結合可能な中和抗体がDMEとの結合について試験化合物と競合する、競合的薬物スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体が、DMEと1つ以上の抗原決定基を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【0339】

別の実施態様では、DMEをコードするヌクレオチド配列群を、将来に開発される分子生物学技術であり、現在知られているヌクレオチド配列群の特性(限定はされないが、トリプレット遺伝暗号及び特異的な塩基対相互作用など)に依存する新技術に用い得る。

【0340】

更に詳細説明をしなくとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。したがって、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

20

【0341】

前述した、および以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、米国特許出願第60/303,745号、同第60/305,402号、同第60/308,158号、および同第60/322,127号も含めて、言及することをもって本明細書の一部とする。

【実施例】

【0342】

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFSEQ GOLDデータベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールにまたは変性剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL(Invitrogen)は、フェノールとグアニジンイソチオシアネートとの単相溶液である。結果として得た溶解物は、塩化セシウムのクッション液の上に重層して遠心分離するか、クロロフォルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、あるいは別の慣例的方法で、溶解物からRNAを沈殿させた。

30

【0343】

RNAの純度を高めるため、フェノールによるRNAの抽出および沈殿を、必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子(Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子(QIAGEN, Chatsworth CA)またはOLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いて、ポリ(A)+RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A) PURE mRNA精製キット(Ambion, Austin TX)を用いて、組織溶解物からRNAを直接単離した。

40

【0344】

場合によってはStratagene社にRNAを提供し、同社が、対応するcDNAライブラリ群を作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERSCRIPトプラスミドシステム(Invitrogen)を用いて本技術分野で既知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した(前出Ausubel他、5章)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプタ

50

ーを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素群でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対しcDNAのサイズ選択(300~1000bp)には、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ(Amersham Biosciences)、あるいは分取用アガロースゲル電気泳動法を用いた。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの、適合する制限酵素部位にライゲーションした。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)、PSPORT1プラスミド(Invitrogen)PCDNA2.1プラスミド(Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMVプラスミド(Stratagene)、PCR2-TOPOTAプラスミド(Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド(Stratagene)、pIGEN(Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE(Incyte Genomics)、またはpINCY(Incyte Genomics)、またはこれらの誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOL R、あるいはInvitrogen社のDH5、DH10BまたはElectroMAX DH10Bなど適格な大腸菌細胞に形質転換した。

10

#### 【0345】

##### 2 cDNAクローンの単離

実施例1のようにして得たプラスミドの、宿主細胞からの回収は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)を用いた*in vivo*切除によって、あるいは細胞溶解によって行った。プラスミドを精製する方法は、MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、AGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus PlasmidおよびQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットの中から少なくとも1つを用いた。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4で保管した。

20

#### 【0346】

別法では高処理フォーマットで直接結合PCRを用い、宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した(Rao, V.B.(1994)Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解および熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルをプロセスして384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)およびFLUOROSKAN II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

30

#### 【0347】

##### 3 シークエンシングおよび分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法あるいは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー(Applied Biosystems)またはPTC-200 サーマルサイクラー(MJ Research)を、HYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)またはMICROLAB 2200(Hamilton)液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Biosciences社が提供する試薬、またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit(Applied Biosystems)の試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離と、標識したポリヌクレオチドの検出とは、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Amersham Biosciences)か、標準ABIプロトコルと塩基呼び出しソフトウェアとを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(Applied Biosystems)か、あるいはその他の本技術分野で既知の配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法(前出Ausubel他、7章)を用いて同定した。いくつかのcDNA配列を選択し、実施例8に開示する技術で配列を伸長させた。

40

#### 【0348】

Incyte cDNAに由来のポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカーおよびポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基をマスクして有効性を確認した。その際、BLASTと、動的プログラミングと、隣接ジヌクレオチド頻度分析とに基づく、アルゴリズムとプログラムとを用いた。次に、Incyte cDNA配列またはそれらの翻訳の問い合わせを、以下のデータベー

50

ス群に対して行った。すなわち、選抜した公共のデータベース群(例えばGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM)と、ヒト、ラット、マウス、線虫(*Caenorhabditis elegans*)、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)および*Candida albicans*からの配列群を持つPROTEOMEデータベース群(Incyte Genomics, Palo Alto CA)、および、隠れマルコフモデル(HMM)ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、例えばPFAM、INCY、およびTIGRFAM (Haft, D.H. 他(2001) *Nucleic Acids Res.* 29:41-43); 並びにHMMベースのタンパク質ドメインデータベース例えばSMART (Schultz, J.他(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857-5864; Letunic, I. 他(2002) *Nucleic Acids Res.* 30:242-244) (HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである; 例えばEddy, S.R.(1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365参照)。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列をアセンブリし、完全長のポリヌクレオチド配列を産出した。あるいは、GenBank cDNA群、GenBank EST群、スティッチされた配列群、ストレッチされた配列群、またはGenscan予測コード配列群(実施例4および5を参照)を用い、Incyte cDNAのアセンブリ体群を完全長まで伸長させた。PhredとPhrapとConsedとに基づくプログラムを用いてアセンブリし、GenMarkとBLASTとFASTAとに基づくプログラムを用いて、cDNAのアセンブリ体を、オープンリーディングフレームについてスクリーニングした。完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、対応する完全長ポリペプチド配列を得た。或いはポリペプチドは、完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。完全長ポリペプチド配列群の続いての分析としての問い合わせを、GenBankタンパク質データベース群(genpept)、SwissProt、PROTEOMEデータベース群、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびProsites等のデータベースや、PFAM、INCY、およびTIGRFAM等の隠れマルコフモデル(HMM)ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、並びにSMART等のHMMベースのタンパク質ドメインデータベース群に対し行った。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA)およびLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて分析する。ポリヌクレオチドとポリペプチドとの配列アライメントは、MEGALIGNマルチシーケンシングアライメントプログラム(DNASTAR)に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムが指定する、デフォルトパラメータを用いて作製する。これは、アライメントした配列間の一致率も計算する。

#### 【0349】

表7は、Incyte cDNAと完全長配列との分析とアセンブリとに用いたツールとプログラムとアルゴリズムとの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを示す。用いたツール、プログラムおよびアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な参照文献であり、全ての文献は引用を以って全文を本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は、2つの配列が一致する強さを評価するために用いた、スコア、確率値などのパラメータを示す(スコアが高いほど、または確率値が低いほど、2配列間の同一性が高い)。

#### 【0350】

完全長ポリヌクレオチド配列群とポリペプチド配列群とのアセンブリと分析とに用いた上記プログラム群は、SEQ ID NO:14-26のポリヌクレオチド配列断片群の同定にも用いた。ハイブリダイゼーション技術と増幅技術とに有用な約20~約4000ヌクレオチドの断片群を、表4の列2に示した。

#### 【0351】

##### 4 ゲノムDNAからのコード配列の同定および編集

推定上の薬物代謝酵素類は、先ず、公共ゲノム配列データベース(例えば、gbpriやgbhgt)に対してGenscan遺伝子同定プログラムを実行して同定された。Genscanは汎用遺伝子同定プログラムであり、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する(Burge, C. および S. Karlin(1997) *J. Mol. Biol.* 268:78-94、Burge, C. および S. Karlin(1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:346-354)。このプログラムは予測されたエキソン群を連結し

、メチオニンから終止コドンに及び、アセンブリされたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30 kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が薬物代謝酵素をコードするかを判定するために、コードされるポリペプチド群を、PFAMモデル群に対して薬物代謝酵素について問合せて分析した。潜在的な薬物代謝酵素は、既に薬物代謝酵素としてアノテーションが付けられたIncyte cDNA配列群に対する相同性によっても同定した。これら選択したGenscan予測配列を、次にBLAST分析により、公共データベースgenpeptおよびgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは省略されたエキソンなど、Genscanが予測した配列におけるエラーを補正した。BLAST分析はまた、Genscan予測配列の、いかなるIncyte cDNAまたは公共cDNAカバレッジ (coverage) の発見にも用いられ、したがって転写の証拠を提供した。Incyte cDNAカバレッジが利用できた場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を補正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例 3に記載のアセンブリプロセスを用い、Incyte cDNA配列および/または公共cDNA配列でGenscan予測コード配列をアセンブリして得た。あるいは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集後または非編集のGenscan予測コード配列に、完全に由来する。

10

### 【0352】

#### 5 ゲノム配列データのcDNA配列データとのアセンブリ スティッチ配列 (Stitched Sequence)

20

部分cDNA配列群を伸長させるため、実施例 4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムが予測したエキソン群を用いた。実施例 3に記載したようにアセンブリした部分cDNA群を、ゲノムDNAにマッピングし、また、関連するcDNA群と、1つ以上のゲノム配列からGenscan予測されたエキソン群とを有するクラスター群に分解した。cDNAとゲノムとの情報を統合すべく、グラフ理論および動的プログラミングに基づく或るアルゴリズムを用いて各クラスターを分析し、潜在的スプライス変異体群を生成した。配列群を続いて確認、編集または伸長し、完全長配列を創出した。区間の全長が、2つ以上の配列に在るような配列区間群をクラスター内で同定し、そのように同定された区間群は、推移性により、等しいと考えた。例えば、或る区間が、1つのcDNAと2つのゲノム配列とに在る場合、3つの区間は全て等しいと考えた。このプロセスにより、無関係だが連続したゲノム配列群を、cDNA配列で結び合わせて架橋し得る。このようにして同定した区間を、それらの親配列 (parent sequences) に沿って現われる順にスティッチアルゴリズムで「縫い合わせ」、可能な限り最長の配列と配列変異体群とを生成した。1種類の親配列に沿って続く区間間の連鎖 (cDNA - cDNAまたはゲノム配列 - ゲノム配列) は、親の種類を変える連鎖 (cDNA - ゲノム配列) より優先した。結果として得たスティッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベースgenpeptおよびgbpriと比較した。Genscanが予測した不正確なエキソン群は、genpeptからのトップBLASTヒットとの比較により補正した。必要な場合、追加cDNA配列群を用いるかゲノムDNAの検査により、配列群を更に伸長させた。

30

### 【0353】

#### ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

40

部分DNA配列群を、BLAST分析に基づく1アルゴリズムで完全長まで伸長した。まず、BLASTプログラムを用い、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物および真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例 3に記載のようにアセンブリした部分cDNAを問い合わせた。次に、最も近いGenBankタンパク質相同体を、BLAST分析により、Incyte cDNA配列または実施例 4に記載のGenScanエキソン予測配列のいずれかと比較した。得られた高スコアリングセグメント対 (HSP) を用いてキメラ蛋白質を産出し、翻訳した配列をGenBank蛋白質相同体上にマッピングした。元のGenBankタンパク質相同体に対し、キメラタンパク質内では挿入または欠失が起こり得る。GenBank蛋白質相同体、キメラ蛋白質または双方をプローブとして用い、公共ヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、部分的なDNA配列を、相同ゲノム配列の付加によりスト

50

ストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を含むか否かを判定した。

【0354】

#### 6 DMEをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:14-26をアセンブリするために用いた配列群を、BLAST他のSmith-Watermanアルゴリズムの実装群を用いて、Incyte LIFESEQデータベースおよび公共ドメインデータベース群の配列と比較した。SEQ ID NO:14-26と一致するこれらのデータベースの配列を、P hrapなどのアセンブリアルゴリズム(表7)を使用して、連続しオーバーラップする配列のクラスタ群にアセンブリした。スタンフォード・ヒトゲノムセンター(SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所(WIGR)、Genethonなどの公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッドおよび遺伝地図データを用いて、いずれかのクラスタ化された配列が既にマッピングされているかを判定した。マッピングされた配列が或るクラスタに含まれている場合、そのクラスタの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

10

【0355】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体の短腕(p-arm)の末端に対して測定する(センチモルガン(cM)は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cMは、ヒトDNAの1メガベース(Mb)にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポットおよびコールドスポットに起因して広範囲に変化する)。cM距離は、各クラスタ内に配列が含まれる放射線ハイブリッドマーカー類に対して境界を提供するGenethonによってマッピングされた遺伝マーカー群に基づく。NCBI「GeneMap'99」(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>)など公共で入手可能なヒトゲノム地図などの資源を用いて、既に同定された疾患遺伝子類が、上記の区間内若しくは近傍にマップされているかを判定できる。

20

【0356】

#### 7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験技術であり、特定の細胞種または組織からのRNAが結合している膜への、標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションに關与する(Sambrook前出、7章; Ausubel他、前出、4章)。

30

【0357】

類似の、BLASTを応用したコンピュータ技術を用いて、GenBankやLIFESEQ(Incyte Genomics)などのcDNAデータベースにおいて、同一または関連分子を検索した。ノーザン分析は、幾つかの膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、任意の特定の一致を厳密なあるいは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を修正できる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義する。

【0358】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

$5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)}) \text{の最小値}$

40

【0359】

積スコアは、2つの配列間の類似度と、配列が一致する長さとの両方を考慮している。積スコアは0~100のノーマライズされた値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。BLASTスコアを計算するには、或る高スコアリングセグメント対(HSP)内の一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不一致塩基に-4を割り当てる。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより隔離される)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアのセグメント対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的オーバーラ

50

ップとBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合のみ得られる。積スコア70は、一端が100%一致し、70%オーバーラップしているか、他端が88%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%オーバーラップしているか、79%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

#### 【0360】

或いは、DMEをコードするポリヌクレオチドを、由来する組織源について分析する。例えば幾つかの完全長配列は、少なくとも一部は、オーバーラップするIncyte cDNA配列群を用いてアセンブリする(実施例3を参照)。各cDNA配列は、ヒト組織から作製のcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、以下の臓器/組織カテゴリーの1つに分類される。すなわち心血管系、結合組織、消化器系、胎芽構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肝、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性/混合性または尿路である。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/条件カテゴリー、すなわち癌、細胞株、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、DMEをコードするcDNAの組織特異的発現および疾患特異的発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LI FESEQ GOLD データベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)から得ることができる。

10

20

#### 【0361】

##### 8 DMEをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長ポリヌクレオチドを、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマー群を用いて該断片を伸長させ産生する。或るプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、別のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマー群の設計にはOLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは別の適切なプログラムを用い、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となつて約68~約72の温度で標的配列にアニーリングするようにした。ヘアピン構造およびプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチド群の伸長は、全て回避した。

30

#### 【0362】

選択したヒトcDNAライブラリ群を用い、配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマーあるいはプライマーのネステッドセットを設計した。

#### 【0363】

高忠実度の増幅を当業者に周知の方法でのPCRで得た。PCRはPTC-200サーマルサイクラー(MJ Research, Inc.)での96穴プレートで行った。反応混液は鋳型DNAを有し、また200 nmolの各プライマーを有する。また $Mg^{2+}$ と $(NH_4)_2SO_4$ と2-メルカプトエタノールとを含有する反応バッファと、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)と、ELONGASE酵素(Invitrogen)と、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)とを含有する。プライマー対であるPCI AとPCI Bとに対し、以下のパラメータで増幅した。ステップ1: 94 で3分間。ステップ2: 94 で15秒間。ステップ3: 57 で1分間。ステップ4: 68 で2分間。ステップ5: ステップ2、3および4を20回繰り返す。ステップ6: 68 で5分間。ステップ7: 4 で保存。

40

#### 【0364】

各ウェルのDNA濃度は、 $1 \times TE$ および $0.5 \mu l$ の希釈していないPCR産物に溶解した $100 \mu l$ のPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート(Corning Costar, Acton MA)の各ウェルに分配し、DNAが試薬と結合できるようにして判定した。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量すべく、プレートをFluoroskan II(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合

50

物のアリコット5 ~ 10  $\mu$ lを1%アガロースゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを判定した。

#### 【0365】

伸長したヌクレオチドは、脱塩および濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI) を用いて消化して音波処理またはせん断し、pUC 18ベクター (Amersham Biosciences) への再連結を行った。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度 (0.6~0.8%) のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長したクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (Amersham Biosciences) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位のオーバーハング部分を満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞群の選択を、抗生物質を含む培地で行い、それぞれのコロニーを採取し、LB/2Xカルベニシリン培養液中の384ウェルプレート群に37 °Cで一晩培養した。

10

#### 【0366】

細胞を溶解し、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Biosciences) およびPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いて以下のパラメータでDNAをPCR増幅した。ステップ1: 94 °Cで3分間。ステップ2: 94 °Cで15秒間。ステップ3: 60 °Cで1分間。ステップ4: 72 °Cで2分間。ステップ5: ステップ2、3および4を29回繰り返す。ステップ6: 72 °Cで5分間。ステップ7: 4 °Cで保存。DNAの定量化には、上記したようにPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) を用いた。DNA回収率が低いサンプルは、上記同一条件で再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMICエネルギー移動シーケンシングプライマー、およびDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Biosciences) またはABI PRISM BIGDY Eターミネーターサイクルシーケンシングレディ反応キット (Terminator cycle sequencing ready reaction kit) (Applied Biosystems) を用いてシーケンスした。

20

#### 【0367】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリヌクレオチドを検証した。あるいは、完全長ポリヌクレオチドを用い、上記手順で、そのような伸長のために設計したオリゴヌクレオチド類と、或る適切なゲノムライブラリとを用いて5'調節配列を得た。

#### 【0368】

##### 9 DMEをコードするポリヌクレオチドにおける1塩基多型の同定

30

1塩基多型 (SNP) として知られる一般的なDNA配列変異体が、SEQ ID NO:14-26において、LIFSEQデータベース (Incyte Genomics) を用いて同定された。同じ遺伝子からの配列群は共にクラスター化され、実施例3に述べたようにアセンブリされて、その遺伝子における全ての配列変異体の同定を可能にした。一連のフィルタからなるアルゴリズムを使って、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルタは、最小限Phredクオリティスコア15を要求することにより大多数のベースコールのエラーを除去し、また、配列アライメントエラーや、ベクター配列、キメラおよびプライス変異体の不適当なトリミングにより生じるエラーを取り除いた。染色体の高度解析の自動化手順により、推定SNPの近傍におけるオリジナルのクロマトグラムファイルが解析された。クローンエラーフィルタは統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、逆転写酵素、ポリメラーゼ、または体細胞突然変異によって引き起こされるエラーのような、実験処理時に導入されるエラーを識別した。クラスターエラーフィルタは、統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体または偽遺伝子のクラスター化に起因するエラー、または非ヒト配列によるコンタミネーションにより生じたエラーを同定した。最後のフィルタ群によって、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に存在する重複 (duplicates) とSNPが除去された。

40

#### 【0369】

幾つかのSNPは、更なる特徴付けの為に選択された。選択は高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc.) を用いた質量分析によって行い、4群の異なるヒト集団におけるSNP部位での対立遺伝子頻度を分析した。白人集団は92個体 (46名の男子、46名の女子) からなり、83名はユタ出身、4名はフランス人、3名はベネズエラ人、2名はアーミッシュの人々

50

である。アフリカ集団は194個体(97名の男子、97名の女子)からなり、全員がアフリカ系アメリカ人である。ヒスパニック集団は324個体(162名の男子、162名の女子)からなり、全員がメキシコのヒスパニックである。アジア集団は126個体(64名の男子、62名の女子)からなり、報告された親の内訳は43%が中国人、31%が日本人、13%がコリアン、5%がベトナム人、8%が他のアジア人である。対立遺伝子頻度の分析は先ず白人集団においてなされ、幾つかの場合、SNPの内、対立遺伝子変異をこの集団において示さなかったSNPは、更に他の3集団においてテストされることは無かった。

#### 【0370】

##### 10 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化および使用

SEQ ID NO:14-26由来のハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても本質的に同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、 $[-^{32}\text{P}]$ アデノシン3リン酸(Amersham Biosciences)250  $\mu\text{Ci}$ と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston MA)とを化合させることにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビーズカラム(Amersham Biosciences)を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba IまたはPvu II(DuPont NEN)のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの、典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 $10^7$ カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

10

20

#### 【0371】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に移す。ハイブリダイゼーションは、40°Cで16時間行う。非特異的シグナル群を除去するため、最大で例えば0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水および0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件下で、プロット群を室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

#### 【0372】

##### 11 マイクロアレイ

或るマイクロアレイ上でのアレイエレメント群の接続または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾ式印刷(インクジェット印刷、前出のBaldeschweiler他などを参照)、機械的マイクロスポッティング技術およびこれらから派生した技術を用いて達成し得る。上記各技術において基板は、均一な、無孔の表面を持つ固体とすべきである(Schena, M., 編集(1999) *DNA Microarrays: A Practical Approach*, Oxford University Press, London)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップおよびシリコンウェハがある。あるいは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似した手順を利用し、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置および結合させてもよい。通常のアレイは、利用可能な、当業者に公知の方法と機械とを用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る(Schena, M.他(1995) *Science* 270:467-470; Shalon, D.他(1996) *Genome Res.* 6:639-645; Marshall, A. および J. H. Odgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31)。

30

40

#### 【0373】

完全長cDNA、発現配列タグ(EST)、またはそれらの断片またはオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントと成り得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア(DNASTAR)など本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメント群を、生体サンプル中のポリヌクレオチド群とハイブリダイズする。生体サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識などの分子タグに抱合させる。ハイブリダイゼーション後、生体サンプルからのハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエ

50

メントでのハイブリダイゼーションを検出する。あるいは、レーザー脱離および質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上の或るエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの、相補性の度合と相対存在度とを算定し得る。一実施態様におけるマイクロアレイの調製および使用について、以下に詳述する。

#### 【0374】

##### 組織または細胞サンプルの調製

全RNAを組織サンプルから単離するためグアニジニウムチオシアネート法を用い、ポリ(A)<sup>+</sup>RNA精製にオリゴ(dT)セルソース法を用いる。各ポリ(A)<sup>+</sup>RNAサンプルを逆転写するため、MMLV逆転写酵素を用い、また、0.05pg/ $\mu$ lのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1 $\times$ 第一鎖バッファ、0.03unit/ $\mu$ lのRNアーゼ阻害因子、500 $\mu$ MのdATP、500 $\mu$ MのdGTP、500 $\mu$ MのdTTP、40 $\mu$ MのdCTP、40 $\mu$ MのdCTP-Cy3(BDS)またはdCTP-Cy5(Amersham Biosciences)を用いる。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット(Incyte)を用い、200ngのポリ(A)<sup>+</sup>RNAを含有する体積25mlで行う。特異的対照ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、非コード酵母ゲノムDNAからin vitro転写により合成する。37 $^{\circ}$ で2時間インキュベートした後、各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5mlの0.5M水酸化ナトリウムで処理、85 $^{\circ}$ で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプル群の精製には、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム(CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いる。混合後、2つの反応サンプルのエタノール沈殿を、1mlのグリコーゲン(1mg/ml)、60mlの酢酸ナトリウム、および300mlの100%エタノールで行う。サンプルは次にSpeedVAC(Savant Instruments Inc., Holbrook NY)で完全に乾燥させ、14 $\mu$ lの5 $\times$ SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

10

20

#### 【0375】

##### マイクロアレイの調製

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クロン化したcDNAインサート群と、ベクター群とを含有する細菌細胞群から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートに隣接するベクター配列群に相補的なプライマー類を用いる。30サイクルのPCRによって、1~2ngの初期量から5 $\mu$ gを超える最終量まで、アレイエレメントを増幅する。増幅したアレイエレメントは、SEPHACRYL-400(Amersham Biosciences)を用いて精製する。

30

#### 【0376】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス(Corning)は、0.1%のSDSおよびアセトン中で超音波洗浄し、処理の間および処理後に十分に蒸留水で洗浄する。スライドガラスは、4%フッ化水素酸(VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA)中でエッチングし、十分に蒸留水中で洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン(Sigma)を用いてコーティングする。コーティングしたスライドは、110 $^{\circ}$ のオーブンで硬化させる。

#### 【0377】

米国特許第5,807,522号に記載の手順で、コーティングしたガラス基板にアレイエレメント群を付加する。この特許は、引用を以って本明細書の一部とする。平均濃度100ng/ $\mu$ lのアレイエレメントDNA 1 $\mu$ lを、高速ロボット装置(robotic apparatus)により、開放型キャピラリープリンティングエレメント(open capillary printing element)に充填する。装置はここで、スライド毎に約5nlのアレイエレメントサンプルを置く。

40

#### 【0378】

マイクロアレイに、STRATALINKER UV架橋剤(Stratagene)を用いてUV架橋する。マイクロアレイの洗浄を、室温において、0.2% SDSで1回、蒸留水で3回行う。非特異結合部位をブロックするため、マイクロアレイのインキュベートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Tropix, Inc., Bedford MA)中の0.2%カゼイン中において60 $^{\circ}$ で30分間行った後、前に行ったように0.2% SDSおよび蒸留水で洗浄する。

#### 【0379】

50

### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応に用いる 9  $\mu$ l のサンプル混合体には、Cy3またはCy5で標識したcDNA合成産物群の各0.2  $\mu$ gを、5  $\times$  SSC, 0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液中に含む。サンプル混合体は、65  $^{\circ}$ Cまで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上へ等分して1.8  $\text{cm}^2$ のカバーガラスで覆う。アレイを、顕微鏡用スライドよりわずかに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバー内を湿度100%に保つため、140  $\mu$ lの5  $\times$  SSCをチェンバーの1コーナーに加える。アレイを入れたチェンバーは、60  $^{\circ}$ Cで約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中(1  $\times$  SSC, 0.1% SDS)において45  $^{\circ}$ Cで10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中(0.1  $\times$  SSC)において45  $^{\circ}$ Cで10分間ずつ3回洗浄して乾燥させる。

10

#### 【0380】

##### 検出

レポーター標識したハイブリダイゼーション複合体を検出するには、Cy3の励起のために488 nm、Cy5の励起のために632 nmでスペクトル線が発生し得るInnova70混合ガス10Wレーザー(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡を用いる。励起レーザー光の焦点をアレイ上に置くため、20  $\times$ 顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いる。アレイを含むスライドを、顕微鏡の、コンピュータ制御のX-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタースキャンする。本実施例で用いる1.8  $\text{cm} \times 1.8 \text{ cm}$ のアレイは、解像度20  $\mu\text{m}$ でスキャンする。

#### 【0381】

異なる2回のスキャンで、混合ガスマルチラインレーザーは2つのフルオロフォアを連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、2つのフルオロフォアに対応する2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に送られる。好適なフィルタ群をアレイと光電子増倍管との間に設置して、シグナルをフィルタする。用いるフルオロフォアの最大発光の波長は、Cy3では565 nm、Cy5では650 nmである。装置は両方のフルオロフォアからのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザー源において好適なフィルタを用いて、フルオロフォア1つにつき1度スキャンし、各アレイを通常2度スキャンする。

20

#### 【0382】

通常、各スキャンの感度を較正するため、cDNA対照種を或る既知濃度でサンプル混合体に添加し、対照種が発生するシグナル強度を用いる。アレイ上の或る特定の位置には或る相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイゼーション種の重量比1:100,000で相関させる。異なる源泉(例えば代表的な試験細胞および対照細胞など)からの2つのサンプルを、各々異なるフルオロフォアで標識し、異なる発現をする遺伝子群を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、較正するcDNAのサンプルを2種のフルオロフォアで標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって較正を行う。

30

#### 【0383】

光電子増倍管の出力をデジタル化するため、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールした12ビットRTI-835Hアナログデジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いる。デジタル化したデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラースケールへのリニア20色変換を用いて、シグナル強度がマッピングされたイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なるフルオロフォアを同時に励起および測定する場合には、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いて、データは先ずフルオロフォア間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重なり起因する)を補正される。

40

#### 【0384】

グリッドが蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GE

50

MT00LS遺伝子発現分析プログラム (Incyte) である。少なくとも約2倍の発現変化、2.5以上のSB比、および少なくとも40%のエレメントスポットサイズを示したアレイエレメントが、差次的発現を示したとしてGEMT00LSプログラム (Incyte Genomics) で同定された。

#### 【0385】

##### 発現

SEQ ID NO:24は差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。例えば遺伝子の発現パターンの比較で、SEQ ID NO:24は、5名中3名の正常な肺組織において、同じ供与者の腫瘍性肺組織と比べて少なくとも2倍、上方制御された。どの例でも実験は2回行い、結果は元の分析を確認した。腫瘍の発生と進行に伴う遺伝子発現パターンの解析はこの病気の生物学的基盤への多くの病識を、また診断と治療の改善をもたらさう。したがってSEQ ID NO:24とSEQ ID NO:11 (SEQ ID NO:24がコード)は、肺癌の診断ツールおよび治療法として利用さう。

10

#### 【0386】

##### 1.2 相補的ポリヌクレオチド

DMEをコードする配列群に或いはその任意の一部に対して相補的な配列群は、天然DMEの発現を検出、低減または阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さなあるいは大きな配列の断片の場合でも、本質的に同じ手順を用いる。Oligo4.06ソフトウェア (National Biosciences) 及びDMEのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いて、プロモーターがコーディング配列に結合するのを防止する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがDMEをコードする転写物に結合するのを阻害する。

20

#### 【0387】

##### 1.3 DMEの発現

DMEの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌内でDMEを発現させるためには、抗生物質耐性遺伝子と、cDNA転写レベルを高める誘導性プロモーターとを持つ、好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターとしては、lacオペレーター調節エレメントと併用するT5またはT7バクテリオファージプロモーター、およびtrp-lac (tac) ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21 (DE3) などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌は、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド (IPTG) で誘発されるとDMEを発現する。真核細胞でのDMEの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に、一般にバキュロウイルスとして知られるAutographica californica核多角体病ウイルス (AcMNPV) の、組換え型を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え、或いはトランスファープラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、DMEをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモーターによって高レベルのcDNA転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は夜蛾の1種Spodoptera frugiperda (Sf9) 昆虫細胞への感染に用いるが、ヒト肝細胞への感染に用いることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスへの更なる遺伝的修飾が必要になる (Engelhard, E.K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V.他 (1996) Hum. Gene Ther. 7: 1937-1945)。

30

40

#### 【0388】

殆どの発現系では、DMEが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) と、または、FLAGや6-Hisなどペプチドエピトープ標識と合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの、組換え融合タンパク質の、親和性ベースの精製を迅速に1ステップで行い得る。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性および抗原性を維持した状態で、固定化したグルタチオン上での融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Biosciences)。精製の後、GST部分を、特異的に操作した部位でDMEから

50

タンパク分解的に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナルおよびポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いた免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂上での精製を可能にする (QIAGEN)。タンパク質の発現および精製の方法は、Ausubel他(前出、10および16章)に記載がある。これらの方法で得た精製DMEを直接用いて以下の実施例 17、18、および19の、適用可能なアッセイを行うことができる。

#### 【0389】

##### 1.4 機能的アッセイ

DMEの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理的に高められたレベルでの、DMEをコードする配列群の発現によって算定する。cDNAを、cDNAを高いレベルで発現させる強いプロモーターを持つ哺乳類発現ベクターにサブクローニングする。選択されるベクターとしては、PCMV SPORTプラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA) およびPCR 3.1プラスミド (Invitrogen) があり、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを持つ。リポソーム製剤あるいは電気穿孔法を用いて、5~10 $\mu$ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に、一過的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1~2 $\mu$ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、組換えベクターからのcDNA発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、それらの細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、ヨウ化プロピジウムによるDNA染色によって計測される核DNA含量の変化、前方散乱光と90°側方散乱光によって計測される細胞サイズと粒度の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変容、及びフルオレセイン抱合したアネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変容とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M.G. (1994; Flow Cytometry, Oxford, New York NY) に記述がある。

#### 【0390】

遺伝子発現におけるDMEの影響は、DMEをコードする配列群と、CD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された、高度に精製された細胞集団を用いて算定できる。CD64またはCD64-GFPは、形質移入された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存された複数の領域に結合する。形質移入された細胞と形質移入されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビーズを用いて効率よく分離できる (DYNAL, Lake Success NY)。mRNAは、これら細胞から当業者に周知の方法で精製できる。DMEと目的の他の遺伝子群とをコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析できる。

#### 【0391】

##### 1.5 DME特異抗体の産生

実質的に精製されたDMEを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE; 例えば, Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495を参照) または他の精製技術で行い、これを用いて標準的なプロトコルで動物 (例えばウサギ、マウスなど) を免疫化して抗体を作り出す。

#### 【0392】

あるいは、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてDMEアミノ酸配列を解析し、免疫原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。C末端付近あるいは親水性領域などの、適切なエピトープの選択方法については、当分野に記述が多い (前出Ausu

bel他, 11章)。

#### 【0393】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、FMOCケミストリを用いるABI 431Aペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫原性を高める (前出Ausubel他)。完全フロイントアジュバントにおいて、オリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗DME活性を試験するには、ペプチドまたはDMEを基板に結合し、1% BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

10

#### 【0394】

##### 1.6 特異抗体を用いる天然DMEの精製

天然DME或いは組換えDMEを、DMEに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE (Amersham Biosciences) のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗DME抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従ってこのレジンをブロックし、洗浄する。

#### 【0395】

DMEを有する培養液をイムノアフィニティークラムに通し、DMEを優先的に吸着できる条件で (例えば、界面活性剤の存在下で高イオン強度のバッファーで) そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とDMEとの結合を切るような条件で (例えば、pH 2~3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸イオンのようなカオトロップで) 溶出させ、DMEを収集する。

20

#### 【0396】

##### 1.7 DMEと相互作用する分子の同定

DMEまたはその生物活性断片を、<sup>125</sup>Iボルトンハンター試薬で標識する (Bolton A.E. 及び W.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529)。マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識したDMEと共にインキュベートし、洗浄して、標識されたDME複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なDME濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したDMEの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

30

#### 【0397】

別法では、DMEと相互作用する分子を、Fields, S. 及び O. Song (1989; Nature 340:245-246) に記載の酵母2-ハイブリッドシステム (yeast two-hybrid system) や、MATCHMAKERシステム (Clontech) などの2-ハイブリッドシステムに基づく市販キットを用いて分析する。

#### 【0398】

DMEはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2大ライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を判定できる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

40

#### 【0399】

##### 1.8 DME活性の実証

DMEのチトクロームP450活性は、アニリンの4-ヒドロキシル化を用いて測定する。アニリンは、この酵素によって4-アミノフェノールに変換され、アニリンの最大吸光波長は630nmである (Gibson および Skett, 前出)。このアッセイは便利な測定ではあるが、2- および3-位置でも発生する総ヒドロキシル化を過小評価する。アッセイは37 °Cで行い、反応バッファ (緩衝液) には一定分量の酵素および適量のアニリン (約2mM) が含まれる。この反応では、この緩衝液にNADPH または NADPHを産生する補因子系を含むようにする。この反応緩衝液の或る調製には85 mM のTris (pH 7.4)、15 mM 塩化マグネシウム、50 mM ニコチン酸アミド、40 mgイソクエン酸三ナトリウムおよび 2 単位のイソクエン酸デヒドロ

50

ゲナーゼが含まれており、アッセイの直前に10mlの反応バッファーストック溶液に8mgのNADP<sup>+</sup>を加える。反応は光学キュベットで行い、630nmでの吸光度を測定する。このアッセイでは、吸光度の増加率が酵素活性に比例する。標準曲線は4-アミノフェノールの既知濃度を用いて作成できる。

#### 【0400】

DMEの1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>24</sub>-ヒドロキシラーゼ活性は、DMEを発現する遺伝子組換えラットにおける、<sup>3</sup>H標識された1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25(OH)<sub>2</sub>D)から24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)<sub>2</sub>D)への変換をモニタリングして判定する。エタノールに溶解した1μgの1,25(OH)<sub>2</sub>D(或いはコントロールとしてエタノールのみ)を、DMEを発現する約6週齢のオス遺伝子組換えラット群または、DMEの欠損変異体を発現する若しくはDMEを発現していないという点を除けば同一のコントロールラット群に静脈内投与する。ラットを8時間後に断頭により屠殺し、腎臓を手早く取り除き、洗浄し、9倍量の氷冷バッファ(15mM Tris-acetate (pH7.4)、0.19Mスクロース(蔗糖)、2mM酢酸マグネシウム、および5mMのコハク酸ナトリウム)においてホモジナイズする。次に、各ホモジネートの所定量(例えば3ml)を、0.25nMの1,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]D(比放射能は約3.5GBq/mmol)と共に、常に振盪しながら酸素存在下、37°Cで15分間インキュベートする。総脂質を記載(Bligh, E.G.及びW.J. Dyer (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917)のとおり抽出し、流速1 ml/分にてn-ヘキサン/クロロホルム/メタノール(10:2.5:1.5)溶媒系を用いたFINEPAK SIL カラム(JASCO, 東京、日本)でのHPLCによってクロロホルム相を分析する。あるいは、クロロホルム相をJ SPHERE ODS-AM column (YMC Co. Ltd., 京都、日本)を用いてアセトニトリルバッファ系(40~100%、水中、30分)で、1ml/分の流速にて逆相HPLCによって分析する。この溶出物は30秒(以下)の分画で収集し、各分画中に存在する<sup>3</sup>Hの量をシンチレーションカウンターで測定する。コントロールサンプル(すなわち、1,25-ジヒドロキシビタミンDまたは24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)<sub>2</sub>D)を含むサンプル)のクロマトグラムと反応生成物のクロマトグラムとを比較することにより、基質(1,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]D)と生成物(24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]D)との相対的な移動度(mobilities)を判定し、収集した各画分と関連させる。コントロールラットにおいて生成された24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]Dの量を、DMEを発現する遺伝子組換えラットの24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]Dの量から差し引く。遺伝子組換えラットとコントロールラットとの24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]Dの生成の差が、そのサンプルに存在するDMEの25-ヒドロキシラーゼ活性の量に比例する。基質と生成物(群)との同一性の確認は、質量分光法によって行う(Miyamoto, Y.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14115-14119)。

10

20

30

#### 【0401】

DMEのフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)活性を測定するには、代謝産物群のクロマトグラフィ分析を行う。例えばRing, B.J.他(1999; Drug Metab. Dis. 27:1099-1103)は、FMOを0.1 Mリン酸ナトリウムバッファ(pH 7.4または8.3)および1 mM NADPH中37°Cでインキュベートし、反応を或る有機溶剤で停止させ、HPLCによって産物形成を判定した。あるいは、活性の測定は、酸素の取り込みをクラーク型電極(Clark-type electrode)を用いてモニタリングする。例えばZiegler, D.M.およびPoulsen, L.L. (1978; Methods Enzymol. 52:142-151)はFMOを、基質であるメチマゾール(methimazole)を含有するNADPH-産生補因子系(上記のものと同様)中、37°Cでインキュベートした。酸素取り込み率は酵素活性に比例する。

40

#### 【0402】

DMEのUDPグルクロニルトランスフェラーゼ(glucuronyltransferase)活性は遊離アミン基の比色判定で測定する(GibsonおよびSkett, 前出)。アミン含有基質(例えば2-アミノフェノール)のインキュベートを37°Cで、必要な補因子群を含有する反応バッファ(40 mM Tris (pH 8.0)、7.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.025% Triton X-100、1 mMアスコルビン酸、0.75 mM UDP-グルクロン酸)中のこの酵素のアリコットと共に進行。十分な時間をおき、反応は氷冷した20%トリクロ酢酸(0.1 Mリン酸バッファ(pH 2.7)中)を添加して停止させ、氷上でインキュベートし、遠心分離して上澄みを清澄化させる。全ての未反応2-アミノフェ

50

ノールは、このステップで破壊される。十分な、新たに調製した亜硝酸ナトリウムを次に添加し、このステップにより、グルクロン酸抱合産物のジアゾニウム塩が形成される。過剰な亜硝酸を除去するため十分なスルファミン酸アンモニウム (ammonium sulfamate) を添加し、ジアゾニウム塩を芳香族アミン (例えばN-ナフチルエチレンジアミン) と反応させ、着色したアゾ化合物を産生する。この化合物は、分光光度法でアッセイできる (540 nm など)。標準曲線は、既知濃度のアニリンを用いて作成できる。このアニリンは、2-アミノフェノール グルクロニドと同様の特性を持つ発色団を形成することとなる。

**【0403】**

DMEのグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 活性の測定には、モデル基質、例えば2,4-ジニトロ-1-クロロベンゼンを用いる。この基質はグルタチオンと反応して生成物である2,4-ジニトロフェニル-グルタチオンを形成し、生成物の最大吸光波長は340 nmである。重要な注意点はGST類が様々な基質特異性を持つことであり、モデル基質の選択は、目的のGSTの基質選択性 (substrate preference) に基づくべきである。アッセイは室温で行い、適切な反応バッファ (例えば1 mM グルタチオン、1 mM ジニトロクロロベンゼン、90 mM リン酸カリウムバッファ、pH 6.5) に一定量の酵素を入れる。反応は光学キュベットで行い、340nmでの吸光度を測定する。このアッセイでは、吸光度の増加率が酵素活性に比例する。

10

**【0404】**

DMEのN-アシルトランスフェラーゼ活性の測定には放射標識したアミノ酸基質を用い、抱合産物群への放射ラベルの取り込みを測定する。酵素をインキュベートする反応バッファには無標識のアシル-CoA化合物と放射標識したアミノ酸とを入れ、放射標識されたアシル抱合体と無反応アミノ酸とを分離するため、n-ブタノールまたは他の適切な有機溶剤への抽出を行う。例えばJohnson, M. R他(1990; J. Biol. Chem. 266:10227-10233)は、胆汁酸-CoA:アミノ酸N-アシルトランスフェラーゼ活性の測定を、この酵素をコリル-CoA および <sup>3</sup>H-グリシンまたは <sup>3</sup>H-タウリンと共にインキュベートし、また、トリチウム化コール酸抱合体 (tritiated cholate conjugate) をn-ブタノールへの抽出によって分離し、シンチレーションによって抽出産物内の放射活性を測定して行った。あるいはN-アシルトランスフェラーゼ活性の測定には、下記の還元されたCoA(CoASH)の分光光度測定法を用いる。

20

**【0405】**

DMEのN-アセチルトランスフェラーゼ活性は、放射ラベルの、[<sup>14</sup>C]アセチル-CoAから基質分子への転移を用いて測定される (例えば Deguchi, T. (1975) J. Neurochem. 24:1083-5を参照)。或いは、CoASHとのDTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid; Ellman試薬)反応に基づく分光光度アッセイを用い得る。遊離のチオール含有CoASHは、N-アセチルトランスフェラーゼが触媒する、基質へのアセチル基の転移時に形成される。CoASHの検出には、DTNB抱合体の吸光度(412nm)を用いる (De Angelis, J. 他(1997) J. Biol. Chem. 273:3045-3050)。酵素活性は、基質への放射能取り込み率、または、この分光光度アッセイでは吸光度の増加率に比例する。

30

**【0406】**

DMEのタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性を37 で様々な時間にわたり測定する。S-アデノシル-L-[メチル-<sup>3</sup>H]メチオニン ([<sup>3</sup>H]AdoMet; 比放射能 = 75 Ci/mmol; NEN Life Science Products) をメチル供与体基質として用いる。有用なメチル受容基質としては、グルタチオンS-トランスフェラーゼフィブリラリングリシン-アルギニンドメイン融合タンパク質 (GST-GAR)、不均一核リボ核タンパク質 (hnRNP) または、アデノシンジアルデヒドで処理した細胞からの可溶化液中に存在する低メチル化タンパク質が含まれる。メチル化反応はSDS-PAGEサンプルバッファを加えると停止する。反応の産物はSDS-PAGEによって分離され、蛍光光度分析によって視覚化される。<sup>3</sup>H標識メチル供与体基質の存在は、DMEのタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性の標示となる (Tang, J. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:7723-7730およびTang, J.他(2000) J. Biol. Chem.275:19866-19876)。

40

50

## 【0407】

DMEのカテコール - 0 - メチルトランスフェラーゼ活性は、50mM Tris-HCl (pH7.4)、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM SAM (S - アデノシル - L - メチオニン) ヨウ化物(0.5 μCiのメチル - [H<sup>3</sup>]SAMを含む)、1mMジチオスレイトール、および様々な濃度のカテコール基質(例えば、L - ドパ、ドーパミン、またはDBA)から成る最終容量1.0mlの反応混合液において測定する。この反応は、250 ~ 500 μgの精製したDMEまたは未精製のDMEを含むサンプルを加えて開始し、37 °Cで30分間行う。この反応を停止させるには、氷上で素早く冷却し、直後に7 mlの氷冷n - ヘプタンで抽出する。10分間1000 × gで遠心分離した後、液体シンチレーション計数で、この有機抽出物の3 mlのアリコット群を放射能含量について分析する。有機相におけるカテコール関連放射活性のレベルが、DMEのカテコール - 0 - メチルトランスフェラーゼ活性に比例する (Zhu, B. T.およびJ. G. Liehr (1996) 271:1357-1363)。

10

## 【0408】

DMEのDHFR活性を判定するには、15 °Cで分光光度法により、340nm ( $\epsilon_{340} = 11,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )においてNADPHの消滅を調べる。標準的なアッセイ混合液は、100 μM NADPH、14mM 2 -メルカプトエタノール、MTEN バッファ (50mM 2-morpholinoethanesulfonic acid、25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane、25mMエタノールアミン、および100mM NaCl、pH7.0) 並びにDMEを含み最終容量を2.0mlとする。反応は50 μmのジヒドロ葉酸を(基質として)添加して開始させる。反応液におけるNADPHのNADP<sup>+</sup>への酸化はジヒドロ葉酸の還元と一致し、また、サンプルにおけるDHFR活性の量に比例する (Nakamura, T.およびIwakura, M. (1999) J. Biol. Chem. 274:19041-19047)。

20

## 【0409】

DMEのアルドノケト還元酵素活性は、NADPHが消費される時の340nmにおける吸光度の低下で測定する。標準的な反応混合液は、135mMのリン酸ナトリウムバッファ(酵素によりpH6.2 ~ 7.2の範囲)、0.2mM NADPH、0.3M硫酸リチウム、0.5 ~ 2.5mg酵素、および好適なレベルの基質を含む。この反応液を30 °Cでインキュベートし、反応を分光光度計で連続的に測定する。酵素活性は、酵素1mg当たり消費されるNADPHのモル数として計算される。

## 【0410】

DMEのアルコールデヒドロゲナーゼ活性は、NAD<sup>+</sup>がNADHへ還元される時の340nmにおける吸光度の増大を利用して測定する。標準的な反応混合液は、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.5)、および0.25mM EDTAである。反応液を25 °Cでインキュベートし、分光光度計で

30

## 【0411】

DMEのカルボキシエステルゼ活性は、基質として4 - メチルウンベリフェリル酢酸 (4-methylumbelliferyl acetate) を用いて判定する。酵素反応は、37 °Cで1mlの反応バッファ(90 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、40 mM KCl、pH 7.3)に、およそ10 μlのDME含有サンプルを0.5mM 4 -メチルウンベリフェリル酢酸とともに加えて開始される。4 -メチルウンベリフェロンの産生を分光光度計 ( $\epsilon_{350} = 12.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )で1.5分間モニターする。特異的活性はタンパク質の一分間につき一ミリグラム形成される産物のマイクロモルとして表され、サンプル中のDMEの活性に相当する (Evgenia, V.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14769-14775)。

40

## 【0412】

別法では、DMEのコカインベンゾイルエステル加水分解酵素活性を、約0.1mlのDMEおよび3.3 mM コカインを、1mM benzamidineおよび1mM EDTAおよび1mMジチオスレイトールを含む反応バッファ(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4)中で、37 °Cでインキュベートして測定する。全量で0.4mlの反応液を1時間インキュベートし、等量の5%トリクロロ酢酸で終了させる。0.1 mlの内標準3,4 -ジメチル安息香酸(10 μg/ml)を加える。沈澱タンパク質を12,000 × gで10分間遠心して分離する。上澄を清潔な試験管に移して、0.4mlの塩化メチレンで2回抽出する。2つの抽出液を合わせて、窒素流下で乾燥する。この残留物を、100 ml当たり8 μlのジエチルアミンを含む14%アセトニトリル、250mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH4.0) に再懸濁してから、C18逆相HPLCカラム上に注入して分離する。このカラム溶出液を235nmでモニター

50

ングする。DME活性を定量するため、内標準に対する分析物のピーク面積比を比較する。標準曲線は、トリクロロ酢酸処理したタンパク質マトリクス内で調製した安息香酸標準で作成する (Evgenia, V.他 (1997) J. Biol. Chem. 272:14769-14775)。

#### 【0413】

別法では、水溶性基質のパラニトロフェニル酪酸に対するDMEカルボキシルエステラーゼ活性を当業者に周知の分光光度法で判定する。この方法では、DME含有サンプルを、6mMのタウロコール酸の存在下、0.5 M Tris-HCl (pH 7.4または8.0)または酢酸ナトリウム (pH 5.0)で希釈する。このアッセイは新たに調製されたパラ-ニトロフェニル酪酸溶液 (pH 5.0の酢酸ナトリウム中100 µg/ml)を加えることによって開始される。次にカルボキシルエステラーゼ活性をモニタリングし、405nmに設定した分光光度計で基質の対照自己加水分解と比較する (Wan, L.他 (2000) J. Biol. Chem. 275:10041-10046)。

10

#### 【0414】

DMEのスルホトランスフェラーゼ活性は、 $[^{35}\text{S}]$ PAPSからモデル基質 (フェノールなど)への $^{35}\text{S}$ の取り込みを用いて測定する (Folds, A. および J. L. Meek (1973) Biochim. Biophys. Acta 327:365-374)。一定量の酵素を、37 °Cにて、1 mLの10 mMリン酸バッファ (pH 6.4)、50 mMフェノール、および0.4~4.0 mM  $[^{35}\text{S}]$ アデノシン3-リン酸5-ホスホ硫酸 (PAPS)でインキュベートする。5~20%の放射ラベルが基質へ転移されるのに十分な時間の後、0.2 mlの0.1 M酢酸バリウムを加えてタンパク質とリン酸バッファとを沈殿させる。次に、0.2 mlの0.1 M水酸化バリウム ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ )を、続いて0.2 ml硫酸亜鉛 ( $\text{ZnSO}_4$ )を加える。上澄みを清澄化するため遠心分離し、これによりタンパク質と無反応 $[^{35}\text{S}]$ PAPSとを除去する。上澄みの放射能を、シンチレーションで測定する。酵素活性は、反応産物における放射能のモル数から判定する。

20

#### 【0415】

DMEのヘパラン硫酸6 - スルホトランスフェラーゼ活性を *in vitro*で測定するため、DME含有サンプルを2.5 µmolイミダゾールHCl (pH6.8)、3.75 µgの塩化プロタミン (protamine chloride)、25nmol (ヘキソサミンとして)の完全に脱硫酸化されN - 再硫酸化されたヘパリン、および50pmol (約  $5 \times 10^5$  cpm)の $[^{35}\text{S}]$  PAPSと共に最終反応量を50 µlとして37 °Cで20分間インキュベートする。この反応は、熱湯に反応チューブを1分間浸漬して停止させる。0.1 µmol (グルクロン酸として)のコンドロイチン硫酸Aを反応混液にキャリアとして加える。 $^{35}\text{S}$ 標識多糖を、1.3%酢酸カリウムを有する冷却した三倍量のエタノールで沈殿させ、脱塩カラムを用いるゲルクロマトグラフィによって、取り込まれなかった $[^{35}\text{S}]$ PAPSおよびその分解生成物から完全に分離する。一単位の酵素活性は1分間に1pmolの硫酸を転移するのに必要な量と定義し、沈殿した多糖の中に取り込まれた $[^{35}\text{S}]$ PAPSの量によって判定する (Habuchi, H.他 (1995) J. Biol. Chem. 270:4172-4179)。

30

#### 【0416】

別法では、DMEのヘパラン硫酸6 - スルホトランスフェラーゼ活性を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)によって分離した後、ゲルから酵素を抽出して再生し測定する。分離後、ゲルをバッファ (0.05M Tris-HCl, pH8.0)で洗浄し、3~5mmのセグメントに切断し、0.15M NaClを有する同じバッファ100 µlに4 °Cで48時間攪拌する。溶出した酵素を遠心分離して収集し、上記のようにスルホトランスフェラーゼ活性についてアッセイする (Habuchi, H.他 (1995) J. Biol. Chem. 270:4172-4179)。

40

#### 【0417】

別法では、DMEのスルホトランスフェラーゼ活性を、 $[^{35}\text{S}]$ PAPSから、固定されたペプチドへの、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の転移を測定して判定する。この固定されたペプチドは、C末端システイン残基が付加された成熟P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1ポリペプチドのN末端の15残基である。このペプチドは3つの潜在的なチロシン硫酸化部位にわたる。このペプチドは、このシステイン残基によって、ヨードアセトアミド活性化した樹脂に連結される (1mlの樹脂あたり1.5~3.0 µmolペプチドの密度)。この酵素アッセイは、40mM Pipes (pH6.8)、0.3M NaCl、20mM  $\text{MnCl}_2$ 、50mM NaF、1% Triton X-100、および1mM 5' - AMPを含む最終容量130 µlにおいて、10 µlのペプチド誘導体化ビーズと2~20 µlのDME含有サンプル

50

とを混合して行う。このアッセイは、0.5  $\mu\text{Ci}$  の [ $^{35}\text{S}$ ]PAPS (1.7  $\mu\text{M}$ ; 1Ci = 37GBq) を加えて開始させる。37 °C で30分経過後、反応ビーズを65 °C、6Mグアニジンで洗浄し、ビーズに取り込まれた放射活性を液体シンチレーション計数で測定する。ビーズ結合ペプチドに転移された [ $^{35}\text{S}$ ]硫酸を測定し、サンプルにおけるDME活性を判定する。1単位の活性で1分間に1pmolの生成物が形成されると定義する (Ouyang, Y.-B.他(1998) *Biochemistry* 95:2896-2901)。

#### 【0418】

別法では、DMEスルホトランスフェラーゼのアッセイを、50mM Hepes-NaOH (pH7.0)、250mM スクロース、1mMジチオスレイトール、14  $\mu\text{M}$  [ $^{35}\text{S}$ ]PAPS (15Ci/mmol) および、ドーパミン (25  $\mu\text{M}$ )、p-ニトロフェノール (5  $\mu\text{M}$ ) または他の候補基質を含む最終容量30  $\mu\text{l}$  において、硫酸供与体として [ $^{35}\text{S}$ ]PAPSを用いて行う。アッセイの反応は、精製されたDME酵素製剤、或いはDME活性を持つサンプルを加えて開始させ、その反応を37 °C で15分間続け、100 °C で3分間加熱して終了させる。形成された沈降物を遠心分離によって除去する。次に $^{35}\text{S}$ 硫酸化物を調べるために、上澄みを薄層クロマトグラフィ或いは二次元薄層分離法のいずれかによって分析する。 $^{35}\text{S}$ 硫酸化物の同定ができるように好適な標準を上澄みと平行して分析し、反応産物の移動の相対速度に基づいてDME含有サンプルの酵素特異性を判定する (Sakakibara, Y.他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:6242-6247)。

10

#### 【0419】

DMEのスクアレンエポキシダーゼ活性は、精製したDME(またはDMEを有する未精製の混合液)、20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.01mM FAD、0.2単位のNADPH - チトクロームC (P-450) レダクターゼ、0.01 mM [ $^{14}\text{C}$ ]スクアレン (20  $\mu\text{l}$  の Tween 80 を用いて分散済み)、および0.2% Triton X-100を有する混合液においてアッセイする。1mM NADPHを加えて反応を開始させ、37 °C で30分間インキュベートする。不けん化脂質を、酢酸エチル/ベンゼン (0.5:99.5, v/v) で展開したシリカゲルTLCによって分析する。反応生成物を、DMEを含まない反応混合液による反応生成物と比較する。2,3(S) - オキシドスクアレンの存在を、好適な脂質標準を用いて確認する (Sakakibara, J.他(1995) 270:17-20)。

20

#### 【0420】

DMEのエポキシドヒドロラーゼ活性は、エーテル抽出物のガスクロマトグラフィー分析 (GC) を用いて基質枯渇によって測定するか、またはアセトンで急冷した反応混合物のGC分析により基質枯渇とジオール生成によって測定する。DME含有サンプルまたはエポキシドヒドロラーゼ対照サンプルを10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、および5 mMエポキシド基質 (例えば、エチレンオキシド、スチレンオキシド、プロピレンオキシド、イソブレンモノオキシド、エピクロロヒドリン、エピプロモヒドリン、エピフルオロヒドリン、グリシドール、1,2-エポキシブタン、1,2-エポキシヘキサン、1,2-エポキシオクタン) でインキュベートする。様々な時点でサンプルの一部を反応混合液から取り出して、GC分析用の内標準 (例えば1-ノナノール) を有する1mlの氷冷アセトンに加える。タンパク質および塩類を遠心分離 (15分、4000  $\times$  g) によって除去し、抽出物を0.2mm  $\times$  25m CP-Wax57-CBカラム (CHROMPACK, Middelburg, The Netherlands) および水素炎イオン化検出器を用いてGCにより分析する。GC産物の同定は、当業者に周知の好適な標準およびコントロールを用いて行う。1単位のDME活性は、1分間に1  $\mu\text{mol}$  のジオール生成を触媒する酵素の量と定義する (Rink, R.他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:14650-14657)。

30

40

#### 【0421】

DMEのアミノトランスフェラーゼ活性は、DMEを有するサンプルを、1mM L-キヌレンインおよび1mM 2-オキソグルタル酸の存在下で、最終容量200  $\mu\text{l}$  の、70  $\mu\text{M}$  PLPを有する150mM Tris 酢酸バッファ (pH8.0)、37 °C で1時間インキュベートしてアッセイする。キヌレン酸の形成は、当業者に周知の好適な標準およびコントロールを用いて330nmで分光光度検出によりHPLCで定量する。別法では、L-3-ヒドロキシキヌレンインを基質として用い、キサンツレン酸の生成を340nmでのUV検出と生成物のHPLC分析により判定する。キヌレン酸およびキサンツレン酸の生成はそれぞれ、アミノトランスフェラーゼ活性を示す (Buchli

50

, R.他(1995) J. Biol. Chem. 270:29330-29335)。

#### 【0422】

別法では、DMEのアミノトランスフェラーゼ活性の測定は、酵素結合補因子であるピリドキサル5'-リン酸(PLP)のUV/VIS吸収スペクトルにおける変化をモニタリングして、一回のターンオーバー条件下で、精製したDME或いはDMEを有する未精製サンプルの、様々なアミノ酸およびオキソ酸基質に対する活性を判定して行う。この反応は、9 $\mu$ M 精製DMEまたはDME含有サンプルと試験する基質(アミノ酸およびオキソ酸基質)とを有する50mM 4-メチルモルフォリン(pH7.5)において25 で行う。アミノ酸からオキソ酸への半反応を調べるため、酵素結合したPLPのピリドキサミン5'-リン酸(PMP)への変換により生じる、360nmにおける吸光度の低下および330nmにおける吸光度の増加を測定する。DMEの特異性  
10  
および相対的な活性を、特定の基質に対する酵素製剤の活性によって測定する(Vacca, R. A.他(1997) J. Biol. Chem. 272:21932-21937)。

#### 【0423】

DMEのスーパーオキシドジスムターゼ活性は、細胞ペレット、培養上清、または精製したタンパク質製剤からアッセイする。サンプルまたは溶解物を15%非変性ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動法によって分離する。このゲルを、2.5mMのニトロブルーテトラゾリウムにおいて30分間インキュベートし、その後30mMリン酸カリウム、30mM TEMED、および30 $\mu$ Mリボフラビン(pH7.8)において20分間インキュベートする。スーパーオキシドジスムターゼ活性は背景のブルーに対して白いバンドとして可視化され、このためにはライトボックス上でゲルに照明を当てる。スーパーオキシドジスムターゼ活性の定量は、適切なスーパーオキシドジスムターゼの正負の対照(例えば様々な量の市販の大腸菌スーパーオキシドジスムターゼなど)を用い、活性ゲルの濃度走査で行う(Harth, G.およびHorwitz, M.A. (1999) J. Biol. Chem. 274:4281-4292)。  
20

#### 【0424】

##### 1.9 DMEインヒビターの同定

実施例17のアッセイで説明したように、試験する化合物を、好適なバッファーおよび基質と共に、様々な濃度でマルチウェルプレートのウェルに分注する。DME活性を各ウェル毎に測定し、DME活性を阻害するそれぞれの化合物の能力、および用量反応プロファイル(dose-response profiles)を判定できる。DME活性を増強する分子の同定にも、このアッセイを利用できる。  
30

#### 【0425】

当業者には、本発明の範囲および趣旨から逸脱しない限りの、記載した本発明の組成物、方法およびシステムの、種々の修正および変更については自明であろう。本発明が、新規かつ有用なタンパク質群およびそれらをコードするポリヌクレオチド群を提供し、これらを創薬過程に利用しうること、また本発明が、これらの組成を用いた、疾患と病態との検出、診断、および治療の方法を提供することは理解されよう。本発明について説明するにあたり幾つかの実施態様に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、そのような特定の実施態様に不当に限定されるべきではないことを理解されたい。このような実施態様の記載は完全であると考慮されるべきでなく、また本発明を開示したとおりの形態に限定するものでもない。更に、1つの実施態様の要素は、他の1つ以上の実施態様の要素と容易に組み換え得る。このような組み合わせにより、本発明の範囲にある多数の実施態様を形成し得る。本発明の範囲は、添付した請求の範囲およびそれらの等価物によって規定されるよう意図される。  
40

#### 【0426】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド実施態様およびポリペプチド実施態様の命名の概略である。

#### 【0427】

表2は、本発明のポリペプチド実施態様に最も近いGenBank相同体のGenBank識別番号と注釈を示す。また、各ポリペプチドとその相同体(1つ以上)が一致する確率スコアも併  
50

せて示す。

【0428】

表3は、予測されるモチーフおよびドメインなど、ポリペプチド実施態様の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いた方法、アルゴリズムおよび検索可能なデータベースと共に示す。

【0429】

表4は、ポリヌクレオチド実施態様をアセンブリするために用いたcDNAやゲノムDNA断片を、該ポリヌクレオチドの選択された断片と共に示す。

【0430】

表5は、ポリヌクレオチド実施態様の代表的cDNAライブラリを示す。

10

【0431】

表6は、表5に示したcDNAライブラリの作製に用いた組織およびベクターを説明する付表である。

【0432】

表7は、ポリヌクレオチドとポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、参照文献および閾値パラメータと共に示す。

【表 1】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID
7484676	1	7484676CDI	14	7484676CBI
7620224	2	7620224CDI	15	7620224CBI
7487081	3	7487081CDI	16	7487081CBI
2176536	4	2176536CDI	17	2176536CBI
7498076	5	7498076CDI	18	7498076CBI
1388154	6	1388154CDI	19	1388154CBI
7481664	7	7481664CDI	20	7481664CBI
7497661	8	7497661CDI	21	7497661CBI
7495116	9	7495116CDI	22	7495116CBI
7498400	10	7498400CDI	23	7498400CBI
1709240	11	1709240CDI	24	1709240CBI
4739684	12	4739684CDI	25	4739684CBI
72461345	13	72461345CDI	26	72461345CBI

10

20

30

40

【表 2】

表 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO:	確率スコア	GenBank 相同体
1	7484676CDI	g3329316 g5817244	9.3E-22 7.5E-84	[トラコマクラミジア] シトシンデアミナーゼ [ヒト] dJ20N2.1 (新規なタンパク質であり、酵母および細菌のシトシンデアミナーゼに類似)
2	7620224CDI	g2138330	0.0	[ヒト] アセチルCoA カルボキシラーゼ (Abu-Elheiga, L. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:10669-10677)
3	7487081CDI	g14571498	0.0	[ヒト] βガラクトース-3-0-スルホトランスフェラーゼ 3
4	2176536CDI	g13561516	6.5E-172	[マウス] 核小体タンパク質 C7 (Fischer, H. 他 (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 281:795-803)
5	7498076CDI	g2632113	8.2E-133	[ヒト] グルコサミン-6-リン酸デアミナーゼ (Shevchenko, V 他 (1998) Gene 216:31-38)
6	1388154CDI	g18226	4.5E-07	[ニチニチソウ (Catharanthus roseus)] トリプトファンデカルボキシラーゼ (Ouwerkerk, P.B. 他 (1999) Plant Mol. Biol. 41:491-503)
7	7481664CDI	g181358	2.1E-198	[ヒト] チトクローム P45011F1 (Namburo, P.T. 他 (1990) Biochemistry 29:5491-5499)
8	7497661CDI	g452045	0.0	[ヒト] エノイルCoA:ヒドラーゼ/3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ (Hoeffler, G. 他(1994) Genomics 19:60-67)
9	7495116CDI	g9502013	2.6E-115	[ヒト] コリンホスホトランスフェラーゼ Iβ (Henneberry, A.L. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275:29808-29815)
10	7498400CDI	g3360464	1.3E-71	[ヒト] サイトソル型アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Andersson, B. 他 (1996) Anal. Biochem. 236:107-113)
11	1709240CDI	g349538	2.7E-83	[アナウサギ (Oryctolagus cuniculus)] グルタチオンSトランスフェラーゼ (Gardlik, S.J. 他(1991) J. Biol. Chem. 266:19681-19687)
12	4739684CDI	g306810	1.3E-102	[ヒト] グルタチオンSトランスフェラーゼ Ha サブユニット I (EC 2.5.1.18) (Rhoads, D.M. 他 (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 145:474-481)
13	72461345CDI	g262093	0.0	[ラット (Rattus sp.)] アセチルコリンエステラーゼ T サブユニット, AChE [EC 3.1.1.7] (Legay, C. 他 (1993) J. Neurochem. 60:337-346)

【表 3 - 1】

表 3 - 1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法およびデータベース
1	7484676CDI	191	S18 S87 S90 T22 T148	N63 N67	シチジンおよびデオキシシチジル酸デアミナーゼ: L37-V122 デアミナーゼ 亜鉛 ヒドロラーゼ PD01010: P43-G56, H71-V80, H97-C107 仮説的 28.3 KD タンパク質、NSP1KAR2 遺伝子間領域内 ヒドロラーゼ 亜鉛 PD085099: K24-K182 シチジンデアミナーゼおよびデオキシシチジル酸デアミナーゼ 亜鉛結合領域 DM02375:  P47058 2-140: K24-I140  P30134 17-149: E23-I140  P21335 2-134: E21-I140  P44931 9-142: E20-S136 シチジンデアミナーゼおよびデオキシシチジル酸デアミナーゼ 亜鉛結合領域シグネチャ: H71-L114	HMMER-PFAM BLIMPS-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
2	7620224CDI	2458	S35 S72 S78 S91 S105 S136 S148 S169 S174 S175 S183 S187 S192 S246 S278 S423 S469 S676 S705 S725 S876 S921 S998 S1018 S1060 S1197 S1213 S1249 S1408 S1414 S1448	N118 N883 N1002 N1071 N1424 N1581 N1582 N1653 N2402	シグナル切断: M1-T16 シグナルペプチド: M1-L20, M1-S18 カルバモイルリン酸シントナーゼ (CPSase): K262-S685 カルボキシシルトランスフェラーゼドメイン: G1765-L2334 ピオチン要求酵素: T895-L961 カルバモイルリン酸シントナーゼ サブドメイン蛋白 BL00866: D2337-E2349, F490-P535, A1940-Y1974 ピオチン要求酵素 付着部位: L905-A954	SPSCAN HMMER HMMER-PFAM HMMER-PFAM HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS PROFILESAN

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

表 3 - 2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法およびデータベース
2			S1584 S1610 S2070 S2247 S2268 S2438 S2450 T188 T206 T216 T300 T412 T668 T732 T909 T1031 T1086 T1272 T1342 T1462 T1476 T1744 T1796 T1865 T1932 T1995 T2005 T2025 T2056 T2084 T2321 T2398 T2414 Y1613 Y1745 Y2255		カルボキシラーゼ アセチル CoA リガーゼ ピオチン ATP 結合 含む: 脂肪酸生成 多機能 PD002092: S1070-D1603, V1600-G1764 アセチル CoA カルボキシラーゼ ACCBETA 含む: ピオチン 脂肪酸生成 リガーゼ 多機能 PD037401: M1-A155 カルボキシラーゼ リガーゼ β 転移酵素 サブユニット 脂肪酸生成 A カルボキシル PD001372: T1928-R2332 アセチル CoA カルボキシラーゼ 含む: ピオチン 脂肪酸生成 リガーゼ 多機能酵素 PD011672: L2333-S2457 ピオチン要求酵素 付着部位 DM01562: IP11029 1510-2277: T1652-L2412 IQ00955 1445-2194: N1653-D2393 IP32874 1491-2243: T1652-Q2387 ピオチン要求酵素 付着部位 DM01850 P11029 619-1213: E762-T1336 細胞接着配列: R727-D729 カルバモイルリン酸シタターゼ サブドメイン シグネチャ 1:F449-G463 カルバモイルリン酸シタターゼ サブドメイン シグネチャ 2:F578-L585 signal_cleavage:M1-L32 シグナルペプチド: M14-G37, M14-L33, M15-L33, M15-Q36, M15-Q39	BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO BLAST-DOMO MOTIFS MOTIFS MOTIFS SPSCAN HMMER
3	7487081CD1	431	S16 S216 S273 S359 T71 Y191 Y223 Y367	N91 N110 N177 N302		

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

表 3 - 3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析 方法およびデータベース
3					セレブロシド スルホトランススフェラーゼ 転移酵素 PDI40372: R60-Y391	BLAST-PRODOM
4	2176536CD1	570	S13 S62 S148 S167 S201 S203 S223 S293 S300 S306 S329 S333 S353 S396 S401 S442 S447 S463 S495 S525 T57 S90 T118 T165 T175 T202 T210 T304 T340 T382 T497 T534	N5 N320	GRAM ドメイン(グルコシルトランススフェラーゼ、myotubularin(ミオチューブラリン)および他の推定上の膜結合蛋白にある新規ドメイン) E207-V267 LysM ドメイン(一般的なペプチドグリカン結合モジュール): Y100-P142 タンパク質前駆体シグナル PD00469: Y100-A112, V133-L139	HMMER-PFAM HMMER-PFAM
5	7498076CD1	276	S62 S271 T192 T251		グルコサミン-6-リン酸イソメラーゼ/6-phosphogluconolactonases: W15-K250 グルコサミン/ガラクトサミン-6-リン酸イソメラーゼ タンパク質 BL01161: L37-G76, E117-L159, N170-E198, V199-A243 タンパク質 異性化酵素 酸化還元酵素 デアミナーゼ グルコサミン 6 リン酸代謝 DEVB グルコサミン 6 リン酸 GNPDA PD004927: I24-E241 グルコサミン/ガラクトサミン-6-リン酸イソメラーゼ DM02069: IP46926 5-250: I5-T251 IP09375 1-250: M1-T251 IP44538 1-250: M1-T251 IQ04802 1-247: M1-A243	HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLAST-PRODOM BLAST-DMO

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

表 3 - 4

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法およびデータベース
5					グルコサミン/ガラクトサミン-6-リン酸イノスラーゼ シグネチャ: I125-HI43	MOTIFS
6	1388154CD1	867	S29 S78 S109 S133 S158 S182 S235 S408 S443 S449 S613 S616 S648 S789 S803 S816 S826 S858 S865 T70 T91 T113 T193 T329 T412 T525 T549 T639 T674	N246 N595 N687 N743	ビリドキサル依存性デカルボキシルラーゼ保存ドメイン: H293-V348, R416-F474 C14H10.3 線虫 (C. ELEGANS) コスミド蛋白 (Q9VRG8_DROME ビリドキサル依存性デカルボキシルラーゼ ファミリー)-PD148113; D505-E812 DDC / GAD / HDC / TYRDC ビリドキサルリン酸付着部位 (DDC / GAD / HDC ビリドキサルリン酸付着部位/芳香族 L アミノ酸デカルボキシルラーゼ) DM00568 P17770 22-499; C270-P490 (3.7e-08)	HMMER-PFAM BLAST-PRODOM BLAST-DMO
7	7481664CD1	422	S23 S96 S116 S141 S186 S222 S248 S260 S406 T160	N106	シグナル切断: M1-S23 サイトソール内ドメイン: M1-T6 膜貫通ドメイン: A7-S24 非サイトソール内ドメイン: R25-T422 シグナルペプチド: M1-D26, M1-S23, M1-S24, M1-R25, M1-G28, M1-T21, M1-L19 チトクロム P450: P31-C388 P450 スーパーファミリーシグネチャ PR00385: G298-M315, K316-D329, A351-I362 E-クラス P450 グループ I シグネチャ PR00463: S59-L78, A83-F104, S174-D192, T287-S304, L307-G333, D350-P368 E-クラス P450 グループ II シグネチャ PR00464: K316-G333, A345-M365, S403-P418, G118-G138, R173-D191, T287-M315	SPSCAN TMHMMER HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS

10

20

30

40

【表 3 - 5】

表 3 - 5

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析 方法およびデータベース
7					チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ オキシドレダクターゼ ヘム 電子 輸送 膜 ミクロソーム ENDOPLASMIC PD000021: P31-N203, L171-G379 チトクロム P450 DM00022: IP24903 71-475: G71-G385  A46588 15-478: L15-G385  Q05555 55-478: S54-A386  I48164 11-474: L15-G385 細胞接着配列: R98-D100	BLAST-PRODOM  BLAST-DOMO
8	7497661CD1	723	S154 S195 S288 S293 S328 S342 S368 S387 S411 S420 S463 S500 S533 S615 S720 T44 T422 T575 T674 Y258	N409 N461	3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ、C 末端ドメイン: G478-Y582, I619-S714 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ、NAD 結合ドメイン: A294-C476 エノイル CoA ヒドラーターゼ/異性化酵素ファミリシグネチャ: A12-N174 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ タンパク質 BL00067: G513-Y529, G572-Y582, V297-D327, D376-T410, T422-I446, K467-G499 エノイル CoA ヒドラーターゼ/異性化酵素 タンパク質 BL00166: A10-Y21, A47-A68, K88-A114, L139-N174, A271-R276 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ シグネチャ: T458-Q507 エノイル CoA ヒドラーターゼ/異性化酵素シグネチャ: L76-L129 ペルオキシソーム二頭酵素 PBE PBFE 含む: エノイル CoA ヒドラーターゼ 2 トランス エノイル CoA 異性化酵素 PD023473: N174-S299	MOTIFS HMMER-PFAM HMMER-PFAM HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-BLOCKS PROFILES CAN PROFILES CAN BLAST-PRODOM

【表 3 - 6】

表 3 - 6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析 方法および データベース
8					デヒドロゲナーゼ タンパク質 3 ヒドロキシアシル CoA 脂肪酸代謝 酸化還元酵素 3 ヒドロキシブチリル CoA 含む; エノイル CoA PD001126; V300-Y582 タンパク質 ヒドラーターゼ エノイル CoA 酸 脂肪酸 リアーゼ 異性化酵素 代謝 3 ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ PD000432; A10-V173 タンパク質 3 ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ 脂肪 含む; エノイル CoA ヒドラーターゼ 酸 酵素 α PD003524; R604-Y682 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ DM00842; IQ08426 292-581; S293-D583 IA49613 293-581; S293-Y582 エノイル CoA ヒドラーターゼ/異性化酵素 DM00366 IA49613 1-246; M1-V247 IQ08426 1-245; A2-V247 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ シグネチャ: N475-G499 エノイル CoA ヒドラーターゼ/異性化酵素 シグネチャ: V91-Y111 ミトコンドリアのエネルギー転移タンパク質群 シグネチャ: P694-A703 サイトソール内ドメイン: M1-L59, D111-D158, D214-S219, Q328-D362; 膜貫通ドメイン: W60-I82, A92-L110, W159-S181, V191-W213, V220-Y238, V305-I327; 非サイトソール内ドメイン: S83-E91, G182-D190, K239-Y304	BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO BLAST-DOMO MOTIFS MOTIFS MOTIFS TMHMMER
9	7495116CDI	362	S40 S241 S265 S314 S353 T87 T155 T211 T274 Y34			

【表 3 - 7】

表 3 - 7

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析 方法およびデータベース
9					CDP-アールコール ホスファチジル転移酵素 シグネチャ: W95-T155 転移酵素 アミノアールコール ホスホトランスフェラーゼ 磷脂質合成 膜 ミクロソーム 膜貫通蛋白質 コリン ホスホトランスフェラーゼ SNI PD008780: L21-W213 CDP-アールコール ホスファチジル転移酵素 DM07601 P2214011-390: A24-W213, Y253-V351 CDP-アールコール ホスファチジル転移酵素 シグネチャ: D114-D136	PROFILESCAN BLAST-PRODOM
10	7498400CDI	350	S94 S114 S151 S205 S242 T65 T109	N308	シグナル切断: M1-A54 シグナルペプチド: M34-A54, M34-V56 アミノトランスフェラーゼ クラス I: M1-L330 アミノトランスフェラーゼ クラス-I ペリドキサール-リン酸 付着部位タンパク質 BL00105: F140-S151, S175-G188, W215-V257 アミノトランスフェラーゼ クラス I ペリドキサール-リン酸 付着部位: E155-Q206 アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ シグネチャ PR00799: I137-S151, S173-V193, S205-L230, I273-E291, I299-I317 アミノトランスフェラーゼ クラス I ペリドキサール-リン酸 付着部位 DM00997: I3309715-411: L128-V328, T2-F142 I4664514-404: V131-V328, T2-D124 I12344132-429: L128-E326, N3-D124 I46248152-452: L128-I324, T2-D124	SPSCAN HMIMER HMIMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS PROFILESCAN BLIMPS-PRINTS BLAST-DBOM

【表 3 - 8】

表 3 - 8

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析 方法および データベース
11	1709240CD1	204	S18 S37 S184 S194 T175		シグナル切断: M1-F30 グルタチオンSトランスフェラーゼ、C末端ドメイン: G83-E137, A138-P174 グルタチオンSトランスフェラーゼ、N末端ドメイン: K4-S77 グルタチオンSトランスフェラーゼ PF00043: Q54-G83 グルタチオン転移酵素 S-トランスフェラーゼ 多重遺伝子族 タンパク質 クラス $\alpha$ S-クリスタリン GST リアーゼ PD000312: K6-L102, A138-Q181 グルタチオン転移酵素 DM00127: IP30115 71-190: L72-E137, A138-P174 IP04904 71-190: L72-E137, A138-P174 IP00502 71-190: L72-E137, D139-P174 IP04903 71-190: L72-E137, D139-P174	SPSCAN HMNER-PFAM HMNER-PFAM BLIMPS-PFAM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
12	4739684CD1	204	S18 S136 S184 S194 T175		シグナル切断: M1-F30 グルタチオンSトランスフェラーゼ、C末端ドメイン: G65-P174 グルタチオンSトランスフェラーゼ、N末端ドメイン: K4-K33, F34-S59 グルタチオンSトランスフェラーゼ PF00043: Q36-G65 グルタチオン転移酵素 S-トランスフェラーゼ 多重遺伝子族 タンパク質 クラス $\alpha$ S-クリスタリン GST リアーゼ PD000312: L63-Q181 グルタチオン転移酵素 DM00127: IP08263 71-190: L54-P174 IP00502 71-190: L54-P174 IP04904 71-190: L54-P174 IP30115 71-190: L54-P174	SPSCAN HMNER-PFAM HMNER-PFAM BLIMPS-PFAM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO

10

20

30

40

【表 3 - 9】

表 3 - 9

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析 方法およびデータベース
13	72461345CDI	614	S75 S159 S271 S528 S572 S606 T42 T280 T497 T576 Y129	N296 N381 N495	シグナル切断: MI-G30 シグナルペプチド: P11-A31, H9-A31, C6-G30, M1-A31, H9-G30, L13-A31, M1-G30 カルボキシルエステラーゼ: T10-W563 カルボキシルエステラーゼ タイプ B セリンタンパク質 BL00122:	SPSCAN HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS
					カルボキシルエステラーゼ タイプ B シグネチャ: N201-A256 コリンエステラーゼ シグネチャ PR00878: D105-P119, Y150-S179, G366-V374, V432-C440, W470-P477, H478-L490 エステラーゼ ヒドロラーゼ 前駆体 シグナル糖タンパク質 セリン タンパク質 カルボキシルエステラーゼ ファミリー, 多重遺伝子 PD00169: A62-L370, L17-A191, R327-L546, A454-W563 前駆体 シグナル ヒドロラーゼ セリン エステラーゼ 糖タンパク質 アセチルコリンエステラーゼ シナプス 膜 神経 PD005817: N564-L614 カルボキシルエステラーゼ タイプ B DM00175: I23795 4-341: E35-G373 I04058 23-355: E35-G373 I06276 28-360: E35-G373 I03311 29-361: D36-G373 カルボキシルエステラーゼ タイプ B セリン活性部位:F221-G236 カルボキシルエステラーゼ タイプ B シグネチャ 2: E125-P135	PROFLESCAN BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM MOTIFS MOTIFS

【表 4 - 1】

表 4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO./ Incyte ID/ 配列長	配列断片
14/7484676CB1/ 788	1-253, 1-360, 1-392, 1-454, 1-509, 1-525, 1-529, 1-613, 1-618, 1-626, 1-638, 1-640, 1-643, 1-660, 3-568, 7-360, 17-679, 59-788, 69-686, 188-585, 365-422, 409-494
15/7620224CB1/ 7446	1-455, 1-584, 1-585, 1-611, 1-613, 1-719, 16-660, 127-791, 127-797, 166-721, 219-743, 246-641, 277-834, 277-854, 282-843, 357-937, 380-964, 385-998, 395-1031, 401-1089, 405-1134, 412-1104, 425-1154, 449-1019, 459-1058, 468-1115, 473-1155, 492-996, 492-1141, 504-1094, 506-848, 506-1024, 511-953, 522-1068, 526-1186, 533-1186, 545-1034, 557-1148, 575-1165, 605-799, 622-1186, 624-1186, 636-1186, 654-985, 656-1186, 659-1101, 667-1186, 677-1186, 682-1186, 686-1186, 690-1186, 703-1186, 711-1186, 723-998, 724-1161, 724-1186, 737-1186, 738-1283, 744-1186, 757-1186, 759-982, 775-1186, 908-1413, 1023-1580, 1093-1757, 1115-1533, 1224-1872, 1360-1958, 1400-1991, 1450-1996, 1555-1991, 1693-2261, 2200-2639, 2200-2686, 2214-2332, 2248-2686, 2385-2688, 2422-2944, 2422-2945, 2432-2953, 2492-3083, 2554-3173, 2601-2902, 2767-3328, 2872-3406, 2874-3356, 3123-3419, 3185-3763, 3185-3764, 3185-3770, 3185-3771, 3318-3817, 3468-3771, 3602-3770, 3702-3963, 3801-4092, 3850-4182, 4039-6397, 5859-5972, 5910-6360, 5910-6394, 5910-6400, 5910-6401, 5910-6407, 5910-6427, 5910-6433, 5910-6449, 5910-6458, 5910-6464, 5910-6469, 5910-6470, 5910-6475, 5910-6483, 5910-6486, 5910-6493, 5910-6514, 5910-6566, 5910-6584, 5910-6604, 5910-6612, 5910-6629, 5910-6632, 5910-6681, 5911-6700, 5911-6703, 5911-6799, 5912-6681, 5913-6470, 5913-6488, 5924-6673, 5924-6789, 5929-6721, 5933-6767, 5954-6532, 5964-6653, 5971-6811, 5977-6779, 5977-6786, 5980-6381, 5992-6466, 5999-6713, 6026-6531, 6026-6606, 6031-6614, 6034-6787, 6047-6767, 6047-6800, 6050-6681, 6061-6610, 6067-6945, 6089-6558, 6096-6879, 6104-6786, 6127-6704, 6164-6559, 6194-7011, 6205-7010, 6208-7007, 6253-7011, 6261-7011, 6266-7006, 6267-6860, 6296-6951, 6300-6778, 6307-6768, 6317-7011, 6324-6568, 6360-7156, 6372-7026, 6388-7320, 6394-7001, 6424-7262, 6429-7077, 6466-7320, 6468-7047, 6480-7336, 6524-7248, 6542-7034, 6543-7011, 6555-7106, 6562-7371, 6564-7058, 6569-6995, 6569-7133, 6577-7004, 6590-7150, 6591-7033, 6602-7318, 6609-7092, 6622-7391, 6624-7379, 6625-7384, 6639-7146, 6639-7310, 6653-7051, 6657-7256, 6663-7260, 6716-6988, 6738-7184, 6742-7012, 6744-7435, 6746-7381, 6750-7232, 6751-7446, 6769-7279, 6782-7400, 6786-7406, 6787-7446, 6791-7374, 6794-7446, 6795-7446, 6796-7306, 6815-7402, 6817-7288, 6820-7130, 6821-7446, 6832-7179, 6836-7446, 6841-7446, 6863-7087, 6865-7401, 6868-7164, 6869-7420, 6873-7125, 6873-7446, 6888-7130, 6902-7446, 6911-7446, 6918-7446, 6923-7446, 6946-7219, 6958-7446
16/7487081CB1/ 1444	1-246, 1-247, 1-248, 2-247, 23-247, 27-292, 37-896, 42-246, 123-480, 188-670, 274-1444, 508-854, 508-974, 523-989, 628-1017

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

表 4 - 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO.:/ Ineyte ID/ 配列長.	配列断片
17/2176536CBI/ 2508	1-106, 33-753, 308-825, 463-1020, 547-916, 701-1237, 764-1264, 817-1409, 822-1274, 919-1182, 1114-1395, 1232-1751, 1234-1869, 1237-1756, 1315-1867, 1316-1905, 1326-1549, 1339-1717, 1383-1778, 1387-1820, 1405-1854, 1414-2021, 1420-1956, 1503-1875, 1504-1966, 1546-2160, 1547-1768, 1556-2155, 1828-2508, 1919-2453, 1984-2413, 2031-2413
18/7498076CBI/ 2162	1-225, 1-232, 1-407, 1-507, 1-514, 1-543, 1-545, 1-551, 4-246, 10-253, 10-571, 12-254, 12-515, 15-283, 19-195, 20-664, 29-316, 34-241, 34-264, 34-327, 34-393, 34-516, 34-520, 34-531, 34-546, 34-569, 34-583, 34-588, 34-638, 37-521, 43-310, 57-470, 73-357, 74-332, 76-353, 91-343, 192-477, 241-497, 265-800, 267-412, 267-787, 268-528, 494-1073, 527-757, 530-827, 551-742, 551-792, 552-820, 605-849, 607-938, 736-997, 736-1159, 736-1174, 845-980, 924-1202, 924-1554, 1145-1531, 1155-1405, 1166-1491, 1197-1441, 1197-1683, 1197-1739, 1223-1900, 1338-1626, 1342-1900, 1407-1671, 1420-1551, 1482-1725, 1523-1751, 1523-2035, 1530-1777, 1543-2160, 1554-2154, 1645-1827, 1645-1909, 1645-1917, 1649-1921, 1669-1947, 1669-1959, 1669-2145, 1674-2162, 1778-2030, 1861-2125
19/1388154CBI/ 4333	1-382, 189-382, 234-638, 455-1242, 455-4313, 455-4323, 475-1102, 478-1194, 478-1297, 483-1306, 491-1241, 497-1235, 505-1027, 510-1009, 539-1275, 559-1115, 703-1122, 788-1267, 863-1803, 928-1016, 956-1588, 1005-1803, 1039-1748, 1140-1441, 1157-1343, 1171-1453, 1191-1493, 1197-1411, 1198-1659, 1211-1475, 1212-1747, 1251-1510, 1267-1490, 1288-1543, 1341-1914, 1680-1942, 2059-2685, 2140-2810, 2164-2641, 2167-2641, 2169-2732, 2378-2628, 2381-2629, 2433-2686, 2434-2702, 2457-2721, 2517-2637, 2517-3089, 2528-2738, 2542-2763, 2551-2724, 2551-2816, 2556-2833, 2591-2844, 2594-2884, 2650-2782, 2651-2719, 2651-2745, 2651-2787, 2651-2802, 2651-2806, 2651-2920, 2651-2924, 2651-3065, 2653-2952, 2670-2964, 2690-2918, 2697-2954, 2706-2941, 2722-2997, 2759-3034, 2779-3138, 2816-3030, 2841-3105, 2862-3111, 2894-3031, 2895-3150, 2938-3198, 2959-3145, 2959-3577, 3128-3396, 3158-3388, 3192-3452, 3487-4308, 3644-4316, 3650-4310, 3668-4320, 3674-4295, 3676-4313, 3682-4313, 3688-4320, 3690-4314, 3693-4314, 3719-4315, 3726-4318, 3728-4333, 3731-4333, 3736-4333, 3748-4324, 3769-4003, 3772-4323, 3777-4331, 3778-4333, 3811-4333, 3846-4333, 3851-4314, 3856-4315, 3860-4326, 3861-4318, 3864-4323, 3865-4325, 3868-4324, 3872-4324, 3873-4323, 3873-4326, 3873-4333, 3875-4324, 3876-4325, 3876-4329, 3877-4323, 3879-4333, 3880-4085, 3880-4333, 3881-4120, 3881-4133, 3881-4331, 3882-4327, 3884-4087, 3887-4322, 3887-4330, 3888-4323, 3889-4329, 3889-4333, 3891-4328, 3893-4327, 3894-4322, 3894-4324, 3897-4332, 3898-4323, 3898-4326, 3899-4325, 3900-4323, 3900-4331, 3901-4326, 3902-4323, 3902-4324, 3903-4323, 3903-4326, 3905-4330, 3905-4331, 3905-4332, 3905-4333, 3906-4324, 3906-4326.

10

20

30

40

【表 4 - 3】

表 4 - 3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO: / Incyte ID / 配列長.	配列断片
19	3909-4324, 3909-4327, 3910-4315, 3915-4323, 3917-4322, 3928-4323, 3928-4331, 3931-4323, 3937-4327, 3937-4329, 3938-4328, 3939-4323, 3940-4321, 3945-4323, 3947-4323, 3947-4324, 3953-4328, 3956-4327, 3958-4323, 3966-4291, 3966-4323, 3968-4323, 3970-4323, 3971-4323, 3973-4323, 3975-4323, 3977-4323, 3986-4325, 3987-4333, 3988-4317, 3990-4323, 3993-4323, 3997-4330, 4019-4328, 4020-4324, 4036-4290, 4044-4324, 4047-4322, 4056-4327, 4057-4273, 4057-4313, 4057-4324, 4076-4323, 4078-4326, 4079-4318, 4080-4323, 4080-4332, 4080-4333, 4085-4322, 4087-4310, 4089-4289, 4090-4329, 4101-4323, 4102-4333, 4113-4325, 4113-4330, 4114-4327, 4115-4323, 4115-4331, 4119-4325, 4123-4326, 4129-4333, 4151-4333, 4153-4323, 4162-4323, 4164-4323, 4202-4333, 4205-4333, 4238-4324, 4253-4333, 4262-4330
20/7481664CB1/ 1727	1-559, 3-529, 13-494, 34-555, 34-583, 34-636, 35-304, 35-410, 35-422, 35-430, 35-434, 35-461, 35-462, 35-471, 35-485, 35-491, 35-500, 35-505, 35-520, 35-531, 35-533, 35-541, 35-544, 35-547, 35-559, 35-562, 35-574, 35-626, 35-664, 35-1727, 55-628, 73-649, 74-574, 80-328, 80-523, 125-648, 140-487, 141-663, 173-688, 187-709, 206-779, 252-844, 268-430, 268-580, 282-696, 284-530, 284-649, 284-673, 284-768, 284-784, 294-448, 296-727, 329-806, 342-969, 370-1039, 406-994, 409-921, 415-979, 428-977, 431-580, 431-741, 439-1002, 451-911, 465-774, 498-1027, 505-963, 511-1064, 523-1054, 566-1202, 575-1179, 581-741, 584-1176, 602-1050, 603-1197, 635-1074, 637-1074, 733-1231, 738-1414, 742-1441, 770-1046, 777-1472, 780-1404, 828-1456, 993-1671, 1247-1673, 1251-1683
21/7497661CB1/ 2400	1-2166, 1921-2400, 1965-2000, 2015-2147
22/7495116CB1/ 1929	1-768, 383-964, 405-626, 405-791, 416-897, 421-725, 421-1015, 445-849, 452-1097, 453-1100, 458-1016, 530-900, 617-1054, 801-838, 802-1391, 901-1047, 1136-1700, 1137-1385, 1341-1844, 1351-1831, 1362-1853, 1433-1929, 1486-1843
23/7498400CB1/ 1367	1-603, 310-1367, 932-1333, 1174-1303
24/1709240CB1/ 724	1-451, 1-456, 1-499, 1-716, 5-501, 5-506, 13-479, 15-594, 41-448, 41-701, 44-448, 44-511, 44-656, 44-680, 49-619, 49-697, 49-713, 52-506, 52-654, 52-705, 52-724, 55-467, 55-506, 55-659, 58-501, 58-506, 62-448, 62-510, 62-704, 604-724
25/4739684CB1/ 791	1-399, 19-361, 24-385, 67-412, 76-413, 76-414, 80-403, 224-412, 224-645, 224-708, 224-733, 224-789, 224-790, 224-791

【表 4 - 4】

表 4 - 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO: / Incyte ID / 配列長	配列断片
26/72461345CB1 / 2544	1-666, 439-524, 444-637, 444-646, 444-662, 444-668, 444-674, 444-683, 444-966, 446-629, 446-671, 446-683, 446-912, 469-2310, 560-673, 624-1133, 624-1150, 624-1220, 624-1279, 624-1292, 756-1458, 758-1338, 762-879, 772-1411, 881-1620, 904-1485, 918-1465, 985-1677, 1020-1514, 1020-1569, 1038-1509, 1072-1714, 1084-1618, 1103-1650, 1370-1929, 1376-1814, 1378-2055, 1386-1944, 1397-2066, 1416-1865, 1458-2066, 1527-2264, 1645-2354, 1671-2162, 1699-2378, 1708-2202, 1764-2250, 1830-2451, 1832-2404, 2153-2544, 2191-2310

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID	代表的 ライブラリ
14	7484676CBI	KIDNNOT19
15	7620224CBI	LIVRTUE01
17	2176536CBI	BRATNOT02
18	7498076CBI	KIDNNOT05
19	1388154CBI	SKINBIT01
20	7481664CBI	LUNGAST01
22	7495116CBI	ADRETUE02
24	1709240CBI	LUNGTUT09
26	72461345CBI	BLADTUT08

10

20

30

40

50

表 6 - 1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ADRETUE02	PCDNA2.1	この5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは、49才白人男性の一侧副腎摘出時に除去された右副腎腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は、副腎皮質細胞癌を示し、これは、ほぼ標本全体を構成した。腫瘍は副腎へ接着していた。副腎は軽度の皮質萎縮を示した。腫瘍は被包性で、周囲に薄い(1~3 mm)結合組織の縁があった。患者は副腎癌、腹痛、発熱(不明な起源による)、および欠乏性貧血を示した。患者の病歴には、カテコールアミン分泌症、高血圧がある。以前の手術としてはアデノイド口蓋扁桃摘出術があった。患者の服用薬剤には、アスピリン、カテコールアミン分泌症、祖父に良性高血圧がある。
BLADTUT08	pINCY	ライブラリは、根治的膀胱切除および前立腺切除時に72才白人男性から摘出した膀胱腫瘍組織から単離されたRNAを用いて作製された。病理は、右膀胱基部に浸潤性でグレード3(3の内)の移行上皮癌が見られた。患者の病歴には、純粋高コレステロール血症(pure hypercholesterolemia)およびタバコ濫用がある。家族歴には、心筋梗塞、脳血管疾患、および脳腫瘍がある。
BRATNOT02	pINCY	ライブラリは35才の白人男子の脳から採取した上側頭皮質組織から単離したRNAを用いて作製した。神経病理学的には何も見つからなかった。当患者の病歴には、拡張型心筋症、鬱血性心不全、及び肥大した脾臓と肝臓が含まれる。
KIDNNOT05	PSPORT1	ライブラリは、脳無酸素症で死亡した2才のヒスパニック系女子の腎組織から単離したRNAを用いて作製した。家族歴には、先天性心疾患がある。
KIDNNOT19	pINCY	ライブラリは65才の白人男子の試験開腹および腎尿管膀胱切除時に腎臓組織から単離したRNAを用いて作製した。随伴する腫瘍組織の病理学検査では、グレード1の腎細胞癌が左腎の上極内に見られた。患者の病歴には腹部皮膚の悪性黒色腫、結腸の良性腫瘍、脳血管障害および膵ヘルニアがある。家族歴には心筋梗塞、アテローム性冠動脈疾患、脳血管障害、前立腺癌、心筋梗塞およびアテローム性冠動脈疾患がある。

10

20

30

40

50

表 6 - 2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
LIVRTUE01	PCDNA2.1	この 5' に偏向しランダムプライムしたライブラリは、72 才白人男性の部分肝切除時に摘出された肝腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は転移性でグレード 2 (4 段階の内) の神経内分泌癌で、塊を形成していた。患者は転移性肝癌を有した。患者の病歴には良性高血圧、I 型糖尿病、前立腺肥大、前立腺癌、アルコールおよびタバコ濫用 (共に寛解期) がある。前に行われた手術には膀胱癌変部除去、非観血的前立腺生検 (closed prostatic biopsy)、経尿道的前立腺切除、両側の精巣摘出および脾臓全摘が含まれる。患者の服用薬剤には、Eulexin、Hytrin、Proscar、エコトリン およびインスリンがある。家族歴には母親にアテローム性冠動脈疾患と急性心筋梗塞、父親にアテローム性冠動脈疾患と II 型糖尿病がある。
LUNGAST01	PSPORT1	ライブラリは、頭部外傷で死亡した 17 才白人男子の肺組織から単離された RNA を用いて作製された。患者の病歴には、喘息がある。
LUNGUT09	pINCY	ライブラリは、部分的肺切除時に 68 才白人男性から取り除かれた肺腫瘍組織から単離された RNA を用いて作製された。病理学の示すところでは侵襲グレード 3 の扁平上皮癌および転移性腫瘍である。患者の病歴には、II 型糖尿病、甲状腺障害、鬱病、高脂血症、食道潰瘍と喫煙が含まれる。
SKINBIT01	pINCY	ライブラリは左下腿の罹患皮膚組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴には左下腿の結節性紅斑がある。

10

20

30

40

表 7 - 1

プログラム	説明	参照文献	パラメータ関値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して、あ いまいな塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸配列または核酸配列の比較、注釈に有 用なファーストデータファイル (Fast Data Finder)。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列のアセンブリを行うプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool。アミノ酸 配列および核酸配列の配列類似性検索に有用で ある。BLASTにはblastp, blastn, blastx, tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	EST: 確率スコア=1.0E-8以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の 類似性について検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最少5つの機能(fasta, ffasta, fastx, ffastxおよびssearch)がある。	Pearson, W.R. 及びD.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448, Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; およびSmith, T.F., and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.0E-6 アセンブリされたESTs: fasta 同 一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100以 上
BLIMPS	配列をBLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミ リ、配列相同性および構造的フィンガンブリン ト領域を検索するBLOCKS IMPROVED Searcher。	Henikoff, S. 及びJ.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572, Henikoff, J.G. 及びS. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105, Attwood, T.K. 他. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下
HMMER	問合せ配列を、タンパク質ファミリー-コンセン サス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づい たデータベース(PFAM, INCY, SMART, TIGRFAM等) に対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他. (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) Our World View, in a NutsShell, Cambridge Univ. Press, 1-350ページ。	PFAM, INCY, SMARTまたはTIGRFAM ヒット: 確率値=1.0E-3以下 シグナル ペプチド ヒット: スコ ア=0以上

【表 7 - 2】

## 表 7 - 2

プログラム	説明	参照文献	パラメータ閾値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列内の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他(1988) CABIOS 4:61-66. Gribskov, M. 他(1989) Methods Enzymol. 183:146-159, Bairoch, A. 他.(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	ノーマライズされた質スコアとその特定のProsite モチーフに対するGCC指定「HIGH」値通常、スコア=1.4~2.1.
Phred	高い感度と確率で自動配列決定機トレースを調べベースコーリングアルゴリズム。	Ewing, B. 他(1998) Genome Res. 8:175-185, Ewing, B及びP. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づくSWATやCrossMatchを含むPhyllis Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索やDNA配列のアセンブリに有用である。	Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56 以上
Consed	Phrap アセンブリ体の表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他(1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み行列解析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み行列を用いて蛋白質配列での膜貫通セグメントを描写し配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMMMER	隠れMarkovモデル(HMM)を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他(1998) Proc.Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol., Biol., Glasgow 他, 編集, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ.	
Motifs	Prositeで定義された配列と一致したパターンのあるアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual,バージョン9, M51-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

【配列表】

2005508614000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 B 0 6 4
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
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 17/00	A 6 1 P 17/00	
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 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 27/12	A 6 1 P 27/12	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/02	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 33/10	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 33/10	
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 37/08	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/18	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 M 1/00	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 M 1/00	A
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 9/00	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

F

A 6 1 K 37/02

(31)優先権主張番号 60/322,127

(32)優先日 平成13年9月14日(2001.9.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ランクマール、ジャヤラクシミ

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 5・フレモント・メイバードサークル 3 4 3 5 9

(72)発明者 エマーリング、ブルック・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 3・パロアルト・# 7 1・ウッドランドアベニュー 1 7 3 5

(72)発明者 リチャードソン、トマス・ダブリュ

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 2・レッドウッドシティ・# 1 0 7・キャニオンロード 6 1 6

(72)発明者 リー、ジョアナ・エックス

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 1 2・サンフランシスコ・ジュネーブアベニュー 1 2 6 4

(72)発明者 ワレン、ブリジット・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 4・ロスアルトス・# 2・ホームステッドコート 2 2 5 0

(72)発明者 ホンシェル、シンシア・ディー

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 7 0・サンカルロス・ローレルストリート 1 5 8

(72)発明者 ボーゲン、マライア・アール

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 7 7・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4

(72)発明者 タング、ワイ・トム

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 1 8・サンノゼ・ランウィックコート 4 2 3 0

(72)発明者 リー、アーンステーン・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 2・カストロバレー・クロークリークロード 2 0 5 2 3

(72)発明者 エリオット、ビッキー・エス

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 1・サンノゼ・ポルトンプレイスウェイ 3 7 7 0

(72)発明者 ユエ、ヘンリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 7・サニーバイル・ルイスアベニュー 8 2 6

(72)発明者 リー、サリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 1 0・サンフランシスコ・トウェンティシックスストリート 3 6 4 3

(72)発明者 スウォーナカール、アニータ

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 2 2・サンフランシスコ・# 5ディー・ロックスリーアベニュー 8

(72)発明者 フォーサイス、イアン・ジェイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 1・レッドウッドシティ・ローブルアベニュー 3 0 8

(72)発明者 サンジャンワラ、マデュスダン・エム

- アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 2 4 ・ロスアルトス・シルビアコート 2 1 0  
 (72)発明者 ヤオ、モニック・ジー  
 アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 0 3 3 ・カメル・ウッドゲートドライブ 1 1 8 9  
 (72)発明者 ゼバルジャディアン、イガナー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 2 7 ・サンフランシスコ・ジュニペロセラブールバード  
 8 3 0  
 (72)発明者 ゴーバッド、アン・イー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 0 ・リバモア・マリーコモン 3 6 9  
 (72)発明者 ベチャ、シャニア・ディー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 4 6 ・カストロバレー・# 1 1 7 ・ゲーリードライブ 2  
 1 0 6 2  
 (72)発明者 バーフォード、ニール  
 アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 4 2 2 ・ダラム・ワイルドウッドサークル 1 0 5
- F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02  
 4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA01 CA04 CA09 CA11 DA01 DA02  
 DA05 DA06 DA11 GA01 GA11 HA08 HA12  
 4B029 AA07 AA21 BB20 CC03 FA12  
 4B050 CC03 DD11 EE10 LL01 LL03  
 4B063 QA01 QA17 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR42 QR50 QR55  
 QR77 QR82 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36 QS38 QS39 QX01  
 4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA20 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA93Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA25  
 CA27 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA01 BA02 BA22 CA53 NA14 ZA022  
 ZA062 ZA332 ZA362 ZA452 ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812  
 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072 ZB092 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272  
 ZB332 ZB352 ZB382 ZB392 ZC022 ZC192 ZC202 ZC212 ZC352 ZC552  
 4C085 AA13 AA14  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA76 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	药物代谢酶		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005508614A</a>	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003510767	申请日	2002-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	グリフィンジェニファーエイ ランクマールジャヤラクシミ エマーリングブルックエム リチャードソントマスダブリュ リージョアナエックス ワレンブリジットエイ ホンシエルシンシアディー ボーグンマライアール タングワイトム リーアーンステイーンエイ エリオットビッキーエス ユエヘンリー リーサリー スウォーナカールアニータ フォーサイスイアンジェイ サンジャンワラマデユスダンエム ヤオモニークジー ゼバルジャディアンイガネー ゴーバッドアンイー ベチャシャニアディー バーフォードニール		
发明人	グリフィン、ジェニファー・エイ ランクマール、ジャヤラクシミ エマーリング、ブルック・エム リチャードソン、トマス・ダブリュ リー、ジョアナ・エックス ワレン、ブリジット・エイ ホンシエル、シンシア・ディー ボーグン、マライア・アール タング、ワイトム リー、アーンステイーン・エイ エリオット、ビッキー・エス ユエ、ヘンリー リー、サリー スウォーナカール、アニータ フォーサイス、イアン・ジェイ サンジャンワラ、マデユスダン・エム ヤオ、モニーク・ジー ゼバルジャディアン、イガネー ゴーバッド、アン・イー ベチャ、シャニア・ディー バーフォード、ニール		

IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 C07K14/47 C12N9/00
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.F A61K37/02
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/EE10 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB382 4C084/ZB392 4C084/ZC022 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC212 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74
优先权	60/303745 2001-07-06 US 60/305402 2001-07-13 US 60/308158 2001-07-27 US 60/322127 2001-09-14 US
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>

#### 摘要(译)

本发明的各种实施方案提供了鉴定和编码DME的人药物代谢酶 ( DME ) 和多核苷酸。 本发明的实施方案还提供表达载体， 宿主细胞， 抗体， 激动剂和拮抗剂。 其他实施方案提供了用于诊断， 治疗或预防与DME异常表达有关的疾病的方法。

(6) Int. Cl. <sup>7</sup>		F I		テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/00</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/00</b>	A 6 1 K	39/385	D	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	A 6 1 K	39/395	N	4 B O 2 9
<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	A 6 1 K	45/00		4 B O 5 0
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/04</b>	A 6 1 P	1/04		4 B O 6 3
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 118 頁)	最終頁に*

(2) 出願番号	特願2003-510767 (P2003-510767)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年7月5日 (2002.7.5)		インサイト・ゲノミクス・インコーポ イテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月25日 (2003.12.25)		アメリカ合衆国カリフォルニア州943 4・パロアルト・ボータードライブ 3 60
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/021105	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開番号	W02003/004608		弁理士 大島 陽一
(87) 国際公開日	平成15年1月16日 (2003.1.16)	(72) 発明者	グリフィン、ジェニファー・エイ アメリカ合衆国カリフォルニア州945 5・フレモント・メローウェイ 336 1
(31) 優先権主張番号	60/303, 745		
(32) 優先日	平成13年7月6日 (2001.7.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/305, 402		
(32) 優先日	平成13年7月13日 (2001.7.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/308, 158		
(32) 優先日	平成13年7月27日 (2001.7.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く