

(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2008-536483

(P2008-536483A)

(43) 公表日 平成20年9月11日(2008.9.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-500259 (P2008-500259)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月8日 (2006.3.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月31日 (2007.10.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2006/000820
 (87) 国際公開番号 W02006/095164
 (87) 国際公開日 平成18年9月14日 (2006.9.14)
 (31) 優先権主張番号 0504767.5
 (32) 優先日 平成17年3月8日 (2005.3.8)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 504238862
 アレス トレイディング ソシエテ アノ
 ニム
 スイス ツェーハー 1 1 7 0 オーボンヌ
 ゾーナ アンデュストリエル ド ルー
 リエッタ
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポカリンタンパク質

(57) 【要約】

本発明は本明細書で INSP181 と称されるヒトのタンパク質がリポカリンであるという発見によるものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列を含む、又は前記アミノ酸配列から成るポリペプチド；

(ii) リボカリンである、又は(i)記載のポリペプチドの1つ以上と共通の抗原決定基を有する、(i)のポリペプチドの断片；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物。

【請求項 2】

請求項1(ii)記載の断片であるポリペプチドであって、配列番号:18のアミノ酸25 - 174、アミノ酸26 - 180、アミノ酸33 - 166、若しくはアミノ酸41 - 189、又は配列番号:24のアミノ酸25 - 206を含む、又は前記から成り、かつリボカリンであることを特徴とする、前記ポリペプチド。

【請求項 3】

請求項1(iii)記載の機能的等価物であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列と相同であり、かつリボカリンであることを特徴とする、前記ポリペプチド。

【請求項 4】

請求項1又は2記載の断片又は機能的等価物であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、若しくは配列番号:66に示すアミノ酸配列、又はその活性な断片と80%を超える配列同一性、好ましくは85%、90%、95%、98%、98.5%、99%又は99.5%を超える配列同一性を有するポリペプチド。

【請求項 5】

請求項1から3のいずれか1項記載の機能的等価物であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドと有意な構造的相同性を示す、前記ポリペプチド。

【請求項 6】

請求項1(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する請求項1又は4記載の断片であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列の7つ以上のアミノ酸残基から成る前記ポリペプチド。

【請求項 7】

アミノ酸置換N92T及び/又はG114Sを含む、請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:56、配列番号:58又は配列番号:60に示された配列を有する、請求項6記載のポリペプチド。

【請求項 9】

請求項1から8のいずれか1項記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 10】

ヒスチジンタグを含む、請求項1から9のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

請求項10記載のポリペプチドであって、前記ポリペプチドの配列が配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:68又は配列番号:72に示された配列である、前記ポリペプチド。

【請求項12】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする精製核酸分子。

【請求項13】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71若しくは配列番号:72に示す核酸配列を含む、又は前記配列から成る、又はその重複等価物若しくは断片である、請求項12記載の精製核酸分子。

10

【請求項14】

請求項12又は13記載の核酸分子と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする精製核酸分子。

【請求項15】

請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子を含むベクター。

20

【請求項16】

請求項15記載のベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項17】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドと特異的に結合し、好ましくはその活性を調節するリガンド。

【請求項18】

抗体である、請求項17記載のリガンド。

【請求項19】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドの発現レベル又は活性を増加若しくは減少させる化合物。

30

【請求項20】

請求項1から9のいずれか1項記載のポリペプチドの生物学的作用のいずれも誘導することなく前記ポリペプチドと結合する、請求項19記載の化合物。

【請求項21】

天然又は改変された基質、リガンド、酵素、レセプター又は構造的若しくは機能的模倣物である、請求項20記載の化合物。

【請求項22】

疾患の治療又は診断に使用される、請求項1から9のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項15記載のベクター、請求項17記載の宿主細胞、請求項18若しくは19記載のリガンド、又は請求項20から21のいずれか1項記載の化合物。

40

【請求項23】

患者からの組織において請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価すること、または、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドの活性を評価すること、および、前記発現レベルまたは活性をコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと相違するレベルを疾患の指標とする、患者の疾患を診断する方法。

【請求項24】

in vitroで実施される、請求項23記載の方法。

【請求項25】

50

以下の工程を含む、請求項23又は24記載の方法：

(a) 請求項17又は18記載のリガンドを生物学的サンプルとリガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；及び

(b) 前記複合体を検出する工程。

【請求項26】

(a) 患者の組織サンプルと核酸プローブとを、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体を形成させることができるストリンジエントな条件下で接触させる工程；

(b) コントロールサンプルと前記プローブとを、工程(a)で使用した条件と同じ条件下で接触させる工程；及び

前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程を含み、コントロールサンプルのハイブリッド複合体のレベルと異なるハイブリッド複合体のレベルが患者サンプルで検出されることを疾患の指標とする、請求項23または24記載の方法。

【請求項27】

(a) 患者の組織の核酸サンプルと核酸プライマーとを、請求項12から15のいずれか1項記載の核酸分子と前記プライマーとの間でハイブリッド複合体を形成させることができるストリンジエントな条件下で接触させること；

(b) コントロールサンプルと前記プライマーとを、工程(a)で使用した条件と同じ条件下で接触させること；及び、

(c) 前記サンプル核酸を増幅させること；

(d) 患者及びコントロールサンプルの両方から増幅された核酸のレベルを検出すること、を含み、

コントロールサンプルで増幅された核酸のレベルと有意に異なる増幅核酸レベルが患者サンプルで検出されることを疾患の指標とする、請求項24又は25記載の方法。

【請求項28】

以下の工程を含む、請求項23又は24記載の方法：

(a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子を単離する工程；

(c) 疾患に付随する変異の存在を前記疾患の指標として前記核酸分子で検出することにより、疾患について患者を診断する工程。

【請求項29】

さらに核酸分子を増幅させて増幅生成物を形成する工程及び前記増幅生成物中に変異の有無を検出する工程を含む、請求項28記載の方法。

【請求項30】

患者における変異の有無が、核酸分子を前記核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブとストリンジエントな条件下で接触させて、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分において前記核酸プローブ中に非ハイブリダイズ部分を有するハイブリッド二本鎖分子を形成させること；および、前記プローブ鎖の非ハイブリダイズ部分の有無を疾患付随変異の有無の指標として検出することを含む、請求項28又は29記載の方法。

【請求項31】

前記疾患が、視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患（たとえばTh1皮膚疾患、例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病；Th2皮膚疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹）、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節、1型糖尿病、橋本病、グレーヴズ病（甲状腺炎）、慢性関節リウマチ、増殖

10

20

30

40

50

性系球体半月形成性系球体腎炎、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシス、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症、アレルギー（例えばアレルギー性鼻炎、喘息、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎）、セザリー症候群、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染を含む（ただしこれらに限定されない）、請求項21から30のいずれか1項記載の方法。

【請求項32】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドのリポカリンとしての使用。

【請求項33】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項15記載のベクター、請求項16記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、又は請求項19から21のいずれか1項記載の化合物、を含む医薬組成物。

10

【請求項34】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、を含むワクチン組成物。

【請求項35】

視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患（例えばTh1皮膚疾患、例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病；Th2皮膚疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹）、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節、1型糖尿病、橋本病、グレーブズ病（甲状腺炎）、慢性関節リウマチ、増殖性系球体半月形成性系球体腎炎、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシス、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症、アレルギー（例えばアレルギー性鼻炎、喘息、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎）、セザリー症候群、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染を含む（ただしこれらに限定されない）疾患の治療用医薬の製造に使用される、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項14記載のベクター、請求項16記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、請求項19から21のいずれか1項記載の化合物、又は請求項27記載の医薬組成物。

20

30

【請求項36】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項14記載のベクター、請求項16記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、請求項19から21のいずれか1項記載の化合物、又は請求項27記載の医薬組成物。

【請求項37】

健常な者における天然の遺伝子の発現又はポリペプチドの活性と比較した場合に症状を有する患者において前記遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が低い疾患について、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、宿主細胞、リガンド、化合物又は組成物がアゴニストである、請求項35記載の方法。

40

【請求項38】

健常な者における天然の遺伝子の発現又はポリペプチドの活性と比較した場合に症状を有する患者において前記遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が高い疾患について、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、宿主細胞、リガンド、化合物又は組成物がアンタゴニストである、請求項35記載の方法。

【請求項39】

患者由来の組織で請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドの発現レベル若しくは活性、又は請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子の発現レベルを一定期間モニ

50

ターすることを含み、前記一定期間にわたる前記発現レベル若しくは活性のコントロールレベルへ向かう変化を疾患の緩解の指標とする、患者の疾患の治療処置をモニターする方法。

【請求項 40】

疾患の治療及び/又は診断に有効な化合物を同定する方法であって、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド又は請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子を、前記ポリペプチド又は核酸分子に対して結合アフィニティーを有すると考えられる1以上の化合物と接触させる工程、及び前記核酸分子又はポリペプチドと特異的に結合する化合物を選択する工程を含む、前記方法。

【請求項 41】

以下を含む疾患の診断に有用なキット：
 ストリンジェントな条件下で請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；
 前記核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを含む第二の容器；及び
 疾患の診断を容易にするために、前記プローブ及びプライマーを使用するための指示書。

【請求項 42】

ハイブリダイズしないRNAを消化するための試薬を含む第三の容器をさらに含む、請求項41記載のキット。

【請求項 43】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも1つが請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子である、前記キット。

【請求項 44】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドと結合する1以上の抗体、及び、前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬を含むキット。

【請求項 45】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドをより高いレベル若しくはより低いレベルで発現するか、又は発現しないように形質転換された、非ヒトトランスジェニック若しくは非ヒトノックアウト動物。

【請求項 46】

請求項45記載の非ヒトトランスジェニック動物を候補化合物と接触させ、前記動物の疾患に対する前記化合物の影響を決定することを含む、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 47】

リポカリン関連疾患の治療又は予防を目的とする候補薬剤のスクリーニングのための標的としてのINSP181ポリペプチドの使用。

【請求項 48】

以下の工程を含む、生物学的に活性な化合物を選択する方法：
 (a) 候補化合物とINSP181ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞とを接触させる工程；
 (b) 前記細胞の表面で前記INSP181ポリペプチドと結合する、及び/又は、INSP181ポリペプチドの活性を調節する化合物を選択する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、本明細書でリポカリンとして同定された新規なタンパク質（INSP181と称される）及びその誘導体、並びに疾患の診断、予防及び治療における前記タンパク質及びコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

本明細書に引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は引用により完全に本明細書に含まれる。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

薬剤発見のプロセスは、機能ゲノミクスの時代が到来したために目下のところ重大な改革を受けている。“機能ゲノミクス”という用語は、機能を対象となっているタンパク質の配列に帰するためにバイオインフォマティクスツールを利用するアプローチに適用される。そのようなツールは、配列データの生産速度が、機能をこれらタンパク質配列に割り当てる研究室の能力を急速に凌駕しつつあるためにますます必要となっている。

バイオインフォマティクスツールの有効性及び正確さが増加しているため、これらのツールによって生化学的に性状を決定する通常技術は急速に置き換えられつつある。実際に、本発明の同定に用いられた高度なバイオインフォマティクスツールは、今や高度な信頼を置き得る結果を生産することができる。

配列データが利用可能になるにつれ、種々の機関及び商業的機構がそれらを調査し、重大な発見が継続的に達成されている。しかしながら、研究及び薬剤発見のための標的として、更なる遺伝子及びそれらがコードするポリペプチドの同定及び性状決定を求める持続的な要求がなお存在する。

リポカリンは、疎水性小分子の輸送に関与すると考えられている小さな分泌タンパク質である。リポカリンは、リガンド結合ドメイン（疎水性小分子との結合に典型的に関与する）、及び保存された細胞表面レセプター結合ドメイン（いくつかの仮想細胞表面レセプター（1つ以上のリポカリンに対して共通であり得る）との結合に典型的に関与する）、及び巨大分子複合体を形成する（おそらく細胞表面レセプターを含む）折畳み構造をもつ開放末端を含むマルチドメイン構造を特徴とする。

【0003】

配列レベルにおける顕著な多様性にもかかわらず、リポカリンは構造的ホモログである。すなわち α -ヘリックスが結合した、単一の8本のアンチパラレル β -バレルによって明瞭な“リポカリン骨格”が形成される。このバレルの一方の末端は溶媒に向けて開放されており、リガンド結合部位を含む。連続する鎖を接続する4ループのセットはリガンド結合について特異性を付与する。

リポカリンファミリーのもっとも関係の深いメンバーは、3つの特徴的な保存配列モチーフを共有する。このグループのメンバーには以下が含まれる：レチノール結合タンパク質；プルプリン；レチン酸結合タンパク質；アルファ-2-ミクログロブリン；主要尿タンパク質；ピリン結合タンパク質；アルファ-クルスタシアニン；妊娠タンパク質14；ベータ-ラクトグロビン；好中球リポカリン及び脈絡叢タンパク質。外郭リポカリンは、それらは2つ以下の保存配列モチーフしかもたず、さらにこれらタンパク質は、芳香物質結合タンパク質、フォン・エブナー腺タンパク質、プロバシン及びアフロジシンを含むので、このように分類される。

したがってリポカリンの同定は、下記で述べるある種の症状及び合併症状をもたらす根幹的経路のより深い理解において、さらにこれらの異常の治療により効果的な遺伝子療法及び/又は薬剤療法の開発において極めて重要である。

【発明の開示】

【0004】

本発明は、本明細書で INSP181 と称されるヒトのタンパク質がリポカリンであるという発見に基づくものである。

本発明は、本発明のポリペプチドが、Tヘルパー細胞2 (Th2) サイトカイン、より具体的にはインターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-4 (IL-4) 及びインターロイキン-5 (IL-5) をアップレギュレートするという発見に基づいている。INSP181ポリペプチドは、細胞分裂誘起物質、コンカナバリン A (ConA) で刺激したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) によるサイトカイン分泌に対するその影響について試験された。前記ポリペプチドは、1/10稀釈 (アッセイでは 46.2 μ g) で調べたとき、ConA-刺激ヒトPBMCのIL-10、IL-4及びIL-5分泌を刺激することが見出された。IFN- γ 、TNF- α 又はIL-2のレベルに対する影響は認められなかった。

さらにまた、驚くべきことに、予想に反して本発明のポリペプチドは、皮膚生検材料で

10

20

30

40

50

、特に乾癬の皮膚生検材料で制限された発現を示す。簡単に記せば、INSP181特異的プライマーをほぼ100の正常及び病的ヒト組織サンプル、初代細胞及び細胞株を含むパネルの他に、44の炎症性腸疾患の結腸及び回腸生検材料並びにIL-18結合タンパク質 (IL18BP) 臨床試験から得た39の乾癬生検材料について試験した。結果は表3及び4に示され、図12及び13ではグラフに表されている。INSP181の発現は、驚くべきことに皮膚において (GAPDHの0.16%) (表5、図12)、及び乾癬患者の皮膚生検材料において (19/39サンプルが陽性) (表4、図13) 低レベルで検出されただけであった。エキソン4/6に特異的な第二のプライマー対 (エキソン4ではフォワードプライマー及びエキソン6ではリバースプライマー) によって皮膚特異性が確認された。

【0005】

第一の特徴では、本発明は以下のポリペプチドを提供する：

(i) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列を含むか、又は前記配列から成るポリペプチド；

(ii) リポカリンである、又は(i)記載のポリペプチドの1つ以上と共通の抗原決定基を有する、(i)のポリペプチドの断片；又は

(iii) (i)又は(ii)の機能的等価物。

好ましくは、本発明のこの第一の特徴のポリペプチドは、配列番号:18又は配列番号:24に示すアミノ酸配列から成るか若しくは前記配列を含み；リポカリンとして機能するか若しくは前記のようなポリペプチドと共通の抗原決定基を有するものの断片であるか；又は前記のようなポリペプチドの機能的等価物である。

配列番号:2に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン1ポリペプチド”と称される。配列番号:4に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン2ポリペプチド”と称される。配列番号:6に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン3ポリペプチド”と称される。配列番号:8に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1エキソン3ポリペプチド”と称される。配列番号:10に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1エキソン4ポリペプチド”と称される。配列番号:12に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン4ポリペプチド”と称される。配列番号:14に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン5ポリペプチド”と称される。配列番号:16に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン6ポリペプチド”と称される。

配列番号:18は、配列番号:2、4、6、12、14及び16を結合させることによって生成される。配列番号:18に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181ポリペプチド”と称される。

配列番号:24は、配列番号:2、4、8、14及び16を結合させることによって生成される。配列番号:24に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1ポリペプチド”と称される。INSP181-SV1タンパク質はエキソン4の開始部に25アミノ酸の挿入物を含む。

【0006】

第二のINSP181-SV1クローン (INSP181-SV1-多形) が、唾液腺、副腎、眼、及びStratagene社の汎用リファレンスRNA鋳型から得られたcDNAを含むプール (前記はINSP181-SV1のcDNAを含んでいた) から同定された。このクローンはヌクレオチド置換A275C及びG340Aを含む (前記置換はアミノ酸置換N92T及びG114Sを生じる)。これらはINSP181配列の多型性の説明になる。

配列番号:36に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181エキソン3 N92T多形ポリペプチド”と称され、アミノ酸置換N92Tを含む。配列番号:38に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1エキソン3 N92T多形ポリペプチド”と称され、アミノ酸置換N92Tを含む。

配列番号:40に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181N92T多形ポリペプチド”と称される。配列番号:40は、配列番号:2、4、36、12、14及び16を結合させることによって生成される。

10

20

30

40

50

配列番号:44に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド”と称される。配列番号:44は、配列番号:2、4、38、10、14及び16を結合させることによって生成される。

配列番号:56に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1エキソン4 G114S多形ポリペプチド”と称され、アミノ酸置換G114Sを含む。

配列番号:58に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド”と称される。配列番号:58は、配列番号:2、4、8、56、14及び16を結合させることによって生成される。

【0007】

出願人らはこの理論に拘束されないが、INSP181ポリペプチド、INSP181-SV1ポリペプチド、INSP181 N92T多形ポリペプチド、INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド及びINSP181-SV1 G114S多形ポリペプチドは、N-末端に、長さが20アミノ酸のシグナルペプチドを含み得ると想定される。

この想定シグナル配列をもたないINSP181ポリペプチド及びINSP181-SV1ポリペプチドのエキソン1は配列番号:20に示され、以下では“INSP181成熟エキソン1ポリペプチド”と称される。この想定シグナル配列をもたないINSP181ポリペプチド配列は配列番号:22に示され、以下では“INSP181成熟ポリペプチド”と称される。この想定シグナル配列をもたないINSP181-SV1ポリペプチド配列は配列番号:26に示され、以下では“INSP181-SV1成熟ポリペプチド”と称される。この想定シグナル配列をもたないINSP181 N92T多形ポリペプチド配列は配列番号:42に示され、以下では“INSP181 N92T多形成熟ポリペプチド”と称される。この想定シグナル配列をもたないINSP181-SV1-N92T多形ポリペプチド配列は配列番号:46に示され、以下では“INSP181-SV1-N92T多形成熟ポリペプチド”と称される。この想定シグナル配列をもたないINSP181-SV1-G114S多形ポリペプチド配列は配列番号:60に示され、以下では“INSP181-SV1-N92T多形成熟ポリペプチド”と称される。

配列番号:66に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“リボカリンドメインINSP181ポリペプチド”と称され、リボカリンドメインを含む。配列番号:70に示す配列を有するポリペプチドは、以下では“リボカリンドメインINSP181-SV1ポリペプチド”と称され、スプライス変種のリボカリンドメインを含む。

【0008】

本発明の第一の特徴のポリペプチドはさらにヒスチジンタグを含むことができる。好ましくは、ヒスチジンタグは前記ポリペプチドのC-末端に見出される。好ましくは、ヒスチジンタグは1-10のヒスチジン残基(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10残基)を含む。より好ましくは、ヒスチジンタグは6ヒスチジン残基を含む。したがって、好ましいポリペプチドは、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:62、配列番号:68及び/又は配列番号:72に示す配列を含むものである。

配列番号:28に示す配列を有するポリペプチドは以下では“hisタグINSP181ポリペプチド”と称される。配列番号:30に示す配列を有するポリペプチドは以下では“成熟hisタグINSP181ポリペプチド”と称される。配列番号:32に示す配列を有するポリペプチドは以下では“hisタグINSP181-SV1ポリペプチド”と称される。配列番号:34に示す配列を有するポリペプチドは以下では“成熟hisタグINSP181-SV1ポリペプチド”と称される。配列番号:48に示す配列を有するポリペプチドは以下では“hisタグINSP181 N92T多形ポリペプチド”と称される。配列番号:50に示す配列を有するポリペプチドは以下では“成熟hisタグINSP181 N92T多形ポリペプチド”と称される。配列番号:52に示す配列を有するポリペプチドは以下では“hisタグINSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド”と称される。配列番号:54に示す配列を有するポリペプチドは以下では“成熟hisタグINSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド”と称される。配列番号:62に示す配列を有するポリペプチドは以下では“hisタグINSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド”と称される。配列番号:64に示す配列を有するポリペプチドは以下では“成熟hisタグINSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド”と称される。配列番号:68に示す配列を有するポリペプチドは以下では“リボカリンドメインINSP181 hisタグ”

グポリペプチド”と称され、hisタグをもつリボカリンドメインを含む。配列番号:72に示す配列を有するポリペプチドは以下では“リボカリンドメインINSP181-SV1 hisタグポリペプチド”と称され、hisタグをもつスプライス変種のリボカリンドメインを含む。

【0009】

本明細書で用いられる“INSP181ポリペプチド”という用語には、INSP181成熟エキソン1ポリペプチド、INSP181ポリペプチド、成熟INSP181ポリペプチド、INSP181-SV1ポリペプチド、成熟INSP-SV1ポリペプチド、hisタグINSP181ポリペプチド、成熟hisタグINSP181ポリペプチド、hisタグINSP181-SV1ポリペプチド、成熟hisタグINSP-181-SV1ポリペプチド、INSP181 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181 N92T多形ポリペプチド、INSP181-SV1-N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181-SV1-N92T多形ポリペプチド、hisタグINSP181 N92T多形ポリペプチド、成熟hisタグINSP181 N92T多形ポリペプチド、hisタグINSP-SV1 N92T多形ポリペプチド、成熟hisタグINSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド、hisタグINSP-SV1 G114S多形ポリペプチド、INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド、リボカリンドメインINSP181ポリペプチド及びリボカリンドメインINSP181-SV1ポリペプチド並びにhis-タグ付加ヴァージョンを含むポリペプチドが含まれる。リボカリンドメインポリペプチド(N92T及びG114S多型性の両方を含む)を含むポリペプチドもまた本発明の特徴として含まれる。

10

INSP181及びINSP181-SV1は、アミノ酸92に同じ予想グリコシル化部位を共有し(図10)、前記部位はまた予想されるN92T多型性の場所である。92位のアスパラギンの置換はN-グリコシル化を妨げるであろう。糖部分の有無はINSP181ポリペプチドの機能に重要な影響を有し得る。

20

【0010】

我々はまた、90位及び181位のアミノ酸システインの間に形成されたジスルフィド結合の存在に気付いた。これらのシステイン残基がジスルフィド結合する本発明のポリペプチドは本発明の特徴として含まれる。

“リボカリン”という用語は、少なくとも1つのリボカリンドメインを含む分子を指す。

好ましくは、“リボカリン”は、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.0002、0.00001、0.000001又は0.0000001より小さいe-値で検出されるリボカリンドメインを含む分子であり得る。

好ましくは、“リボカリン”という用語は、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.0002、0.00001、0.000001又は0.0000001より小さいe-値で検出されるPfamエントリーのHMM構造(build)と適合する分子であり得る。

30

好ましくは、本発明の上記に述べた特徴のいずれかに合致するポリペプチドはリボカリンとして機能する。好ましくは、リボカリンドメインは、INSP181のアミノ酸配列の残基41-189によってコードされる。リボカリンドメイン配列は配列番号:66に示されている。

本発明のさらに別のポリペプチドには、リボカリン活性を維持し、さらに図14に示されるリボカリンドメイン(すなわちaa25-174、又はaa26-180、又はaa33-166)及び図11に示されるリボカリンドメイン(すなわちaa41-189)を含むか又はそれらから成るポリペプチド、或いはジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含む断片(すなわちaa96-187)である、断片が含まれる。

40

本発明のさらに別のポリペプチドは、INSP181の残基25と181の間に位置するリボカリンドメインである。INSP181-SV1については、リボカリンドメインは残基25と206の間に位置し、配列番号:70に示す配列を含む。

【0011】

“リボカリンとして機能する”とは、当該ポリペプチドとその生物学的パートナーとの相互作用が、完全長の野生型ポリペプチドの機能と比較して実質的に有害な影響を被っていない、リボカリンタンパク質ファミリー内で保存された特質として認識され得るアミノ酸配列又は構造的特質を含むポリペプチドを指す。特に、我々は、ジスルフィド結合の形成を可能にするポリペプチド内の特異的に位置にシステイン残基が存在することに注意を

50

向けている。

リポカリンは、多様な症状の診断マーカー及び予後マーカーとして用いられる。AGPの血中レベルは、妊娠時並びに、癌化学療法、腎不全、心筋梗塞、関節炎及び多発性硬化症を含む症状の診断及び予後でモニターされる。レチノール-結合タンパク質(RBP)は、腎臓における尿細管の再吸収マーカーとして臨床的に用いられ、アポDは肉眼的乳房嚢胞病のマーカーである。

フォン・エブナー腺タンパク質もまた、涙液リポカリン、涙液プレアルブミン又はVEGFとして知られている。他のリポカリンと同様に、VEGPはレチノール又は他の小さな疎水性化合物に対する担体である。VEGPはレチノールと*in vitro*で結合し、眼で抗微生物機能を有すると考えられている。これは、部分的には前記が、リゾチームの活性化を阻害する長鎖脂肪酸と結合するためである(Glasgow, 1995, Arch Clin Exp Ophthalmol 233:513-522)。前記タンパク質はまた、エンベロープをもつウイルスを不活化し、眼における脂質フィルムの表面拡散を促進し、及び/又は上皮を保護することができる。

10

リポカリンファミリーのまた別のメンバーには、精巣上体レチン酸結合タンパク質(ERBP)が含まれる(前記はヒト血清由来のレチノール結合タンパク質と三次元構造相同性を有する:Newcomer et al. 1990, J Biol Chem 265:12876-12879)。ERBPは、精子が精巣上体を通過するときに精子の成熟に重要な役割を果たすと考えられている。ERBPは、広スペクトルのレチノイド(レチノール(ビタミンA)、レチナール、レチニルアセテート、 α -イオノン、cisレチノイド、 β -カロテン、コレステロール、テルペノイド、 α -ロニリデンアセテート、レチノールとレチン酸の長鎖エステル(Flower, 1996, Biochem J 318:1-14)を含む)と*in vivo*及び/又は*in vitro*で結合することが示された。レチノイドは、細胞分化及び増殖だけでなく視覚、生殖生物学及び粘液分泌で重要な役割を果たすことが示された。レチノイド並びに疾患及び恒常性維持におけるそれらの役割に関する概論については以下を参照されたい:D. Goodman, 1984, N Engl J Med 310:1023-1031。

20

【0012】

プロスタグランジンD2シンターゼは、プロスタグランジンH2をプロスタグランジンD2に触媒することにより脳におけるプロスタグランジンD2の合成に関与する、リポカリンファミリーのメンバーである。他のリポカリンと同様に、PD2は疎水性化合物のための担体である。PD2シンターゼは*in vitro*でレチノールと結合し、分泌性レチノイド輸送物質(多様な体液中でレチノイドを循環させ、レチノイドをそれらの細胞内輸送物質へと輸送する)と提唱された。いったん細胞内に入ると、レチノイドはダイマー化したレセプターと結合し、最終的に多様なプロセスの調節で生物学的な役割(例えば形態発生、分化及び有糸分裂誘発)を果たす(Tanaka et al. 1997, 同書)。

30

リポカリンファミリーのメンバーに関連する他の活性には、抗微生物活性、フェロモン輸送、炎症調節物質活性、嗅覚活性、免疫応答の調節、神経系発生の調節、及び抗菌活性が含まれる。

免疫調節に関連するあるリポカリンは、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)である。NGALは、モノマー及びダイマーとして好中球の特定の顆粒に存在することが突き止められた(Bartsch et al. 1995 FEBS Letters 357:255-259)。NGALは、小さな疎水性分子を親水性の液体中を輸送するために前記分子と結合するという点で典型的なりポカリンである。NGALの生理学的リガンドは未だ同定されていないが、前記は細菌の化学走性因子FMLPと結合することが示され、前記分子は親油性炎症性仲介物質と結合することが示唆されている(Bungaard et al. 1994, Biochem Biophys Res Comm 202:1468-1475)。

40

【0013】

本発明は、本発明のポリペプチドは、Th2サイトカイン、より具体的にはインターロイキン-10(IL-10)、インターロイキン-4(IL-4)及びインターロイキン-5(IL-5)をアップレギュレートするという発見に基づく。さらにまた驚くべきことに、本発明のポリペプチドは、皮膚生検サンプル(特に乾癬の皮膚生検)で予想に反して制限された発現を示すことが見出された。

免疫疾患は、Tヘルパー細胞1(Th1)優勢を特徴とするもの又はTヘルパー細胞2(Th2)

50

優勢を特徴とするものに分けることができる。薬剤は、問題の自己免疫疾患を改変する目的でTh1/Th2バランスに影響を与えることができる。

Th1疾患は、本明細書では、クローン病、1型糖尿病、橋本病、グレーブズ病（甲状腺炎）、乾癬、Th1皮膚病（例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病）、慢性関節リウマチ、増殖性系球体半月形成性系球体腎炎、多発性硬化症、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシスから選択される疾患と定義される。

好ましくは、Th1皮膚病は乾癬である。

好ましくは、角質増殖性皮膚病は、乾癬、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症から選択される。

Th2疾患は、本明細書では、アレルギー、例えばアレルギー性鼻炎、喘息、Th2皮膚病、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎、セザリ-症候群、癌、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染から選択される疾患と定義される。

好ましくは、Th2皮膚病は、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹から選択される。

好ましくは、アトピー性皮膚炎は急性アトピー性皮膚炎である。

好ましくは、癌は、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌から選択される。

【0014】

理論に拘束されないが、本発明のポリペプチド（単独又は融合タンパク質の部分として）及び/又はその断片は、T細胞サイトカインの偏りをTh1からTh2へと切り換えることができる。

したがって、本発明のポリペプチド（単独又は融合タンパク質の部分として）及び/又はその断片は、Th1疾患の治療に有用である。

理論に拘束されないが、アンタゴニスト（例えば本発明のポリペプチドに対して生成された抗体）は、T細胞サイトカインの偏りをTh2からTh1へと切り換えることができる。

したがって、アンタゴニスト（例えば本発明のポリペプチドに対して生成された抗体）はTh2疾患の治療に有用である。例えば、Th2免疫応答の強化及びサイトカイン（例えばIL-4、IL-5及びIL-13）の入念な産生は、アレルギー及び喘息の誘発を促進する（Ngoc et al. 2005, Curr Opin Allergy Clin Immunol Apr.5(2):161-6）。したがって、アンタゴニスト（例えば本発明のポリペプチドに対して生成された抗体）は、喘息及び/又はアレルギーの治療に有用である。

細胞性メカニズムを標的とすることは別として、乾癬治療のアプローチは、IL-2、-6、-8、TNF- α 又はIFN- γ レベルの上昇を示す1型優勢サイトカイン不均衡の影響による液性免疫を調節することによって成果が得られる。これは、欠乏している反調節性2型サイトカイン（例えばIL-4、-10及び-11）を外因的に投与して、1型サイトカイン産生T細胞の分化を2型サイトカイン（正常な免疫応答で2型Tリンパ球の内因性分化を刺激する）の産生へ強力に逸脱させることによって達成することができる。理論に拘束されないが、本発明のポリペプチドは同様な態様で機能すると考えられる。

【0015】

サイトカイン産生を調節する薬剤（例えばIL-4又はIL-10）が知られており、組換えサイトカイン（例えばIL-4、IL-10又はIL-11）の投与が乾癬の治療のために考慮されつつある（Schleyer et al. 2005, J Eur Acad Dermatol Venereol Jan, 19(1):1-20）。

例えば、種々の用量の組換えIL-4を用いる初期相1b試験によって強い抗乾癬作用が示された（Schleyer et al.）。5種類の異なる用量で6週間の治療期間にわたって毎週IL-4を注射するために集められた22人の患者のうち20人で実験が終了し、1人の患者は第II級の副作用を示した。18人の患者でPASIは6週間以内の60 - 80%低下し、6週間の追跡調査の間再発は発生しなかった。乾癬の改善は用量依存性であり、皮膚浸潤細胞の減少及び表皮構造の正常化を伴った。これらの初期のデータは、前記の試みは、もっぱら活性化されたばかりのT細胞に影響を与えて免疫を変更させることによる乾癬の治療として非常に優れた

10

20

30

40

50

アプローチであり得ることを示唆している。

乾癬病巣では、皮膚IL-10の発現が相対的に欠乏している。このTh2サイトカインは、APC機能（例えばT-細胞増殖）の強力な阻害物質である。前記はまた、IFN- γ 又はTNF- α を含む1型サイトカイン産生を抑制し、したがって炎症性皮膚応答の制御に必須の役割を果たす。

通常的治療（例えばとりわけ内在性IL-10のアップレギュレーションを介して機能するフマル酸エステル誘導体、局所ビタミンD3類似体及びUV-照射）と同様に、IL-10の全身的投与は、サイトカインバランスの相対的回復により乾癬の治療に有効であると考えられた。

【0016】

リポカリンが以下の疾患の治療に有用であり得ることが実験によって示された：視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患（例えばTh1皮膚疾患、例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病；Th2皮膚疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹）、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節、1型糖尿病、橋本病、グレーヴズ病（甲状腺炎）、慢性関節リウマチ、増殖性系球体半月形成性系球体腎炎、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシス、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症、アレルギー（例えばアレルギー性鼻炎、喘息、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎）、セザリー症候群、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染。

INSP181はイムノカリンサブファミリーに属し、イムノカリンメンバー（より具体的にはグリコデリン）の機能性を共有するかもしれないと仮定されている（概説については例えば以下を参照されたい：Loegdberg and Wester. *Biochem Biophys Acta* 2000, 1482(1-2):284-97）。ファミリーメンバーは、ヒトゲノムの第9番目染色体のq32 - 34の遺伝子クラスターによってコードされる（INSP181はq34領域内）。グリコデリンは、受精、免疫調節及び分化での関与が示唆されている。グリコデリンの3つの主要なアイソフォーム（GdA、GdS及びGdF）が検出され、前記は固有の機能性を付与し、イムノカリンサブファミリーの生物学的活性のためにグリコシル化の重要性を強調する。

【0017】

WO02/053701は、リポカリン核酸及びポリペプチド（より具体的にはヒトEP17遺伝子）を開示している。前記は、薬剤開発スクリーニング、及び生殖関連症状の治療的処置を目的とする男性生殖能低下のマウスモデルの作製に用いることができる。DE19807389は、癌の治療に有用なグリコデリンAに対するモノクローナル抗体を開示する。

好ましくは、本発明のポリペプチド（単独又は融合タンパク質の部分として）及び/又はその断片及び/又はそのアンタゴニストの活性は、以下のアッセイの少なくとも1つで確認することができる：

(a) Odashiroら（*Drug Discovery Today: Disease Models* 2005、印刷中）が概説する皮膚癌モデル；又は

(b) Gutermuthら（*Drug Discovery Today: Disease Models* 2005、印刷中）が概説する接触皮膚炎又はアトピー性湿疹モデル；又は

(c) Zheng & Zhu（*Curr Allergy Asthma Rep* 2005, Jul, 5(4):291-7）が概説するアトピー性皮膚炎モデル；又は

(d) Jamiesonら（*Nat Immunol* 2005, Apr, 6(4):403-11）が開示するD6マウスモデル；又は

(e) 実施例5に記載する、ConA刺激PBMCによるサイトカイン分泌測定アッセイ。

より具体的には、本発明のポリペプチド（単独又は融合タンパク質の部分として）及び

10

20

30

40

50

/又はその断片及び/又はそのアンタゴニストの活性は、以下のサイトカインの少なくとも1つが調節されるならば確認することができる：IL-4、IL-5及び/又はIL-10。好ましくは2つ（例えばIL-4及びIL-5；IL-4及びIL-10；又はIL-5及びIL-10）又は3つ全てのサイトカインが調節される。好ましくは、本発明のポリペプチド（単独又は融合タンパク質の部分として）及び/又はそのフラグメントは、上記に記載のサイトカインの1つ以上をアップレギュレートする。好ましくは、アンタゴニスト（例えば本発明のポリペプチドに対して生成された抗体）は、上記に記載のサイトカインの1つ以上をダウンレギュレートする。

【0018】

本発明のポリペプチド（例えばINSP181）の活性は、本発明で開示されるか又は当分野で公知の方法のいずれかによって判定することができる。

本発明の第一の特徴のポリペプチドはさらにヒスチジntagを含むことができる。好ましくはこのヒスチジntagは前記ポリペプチドのC末端に見られる。好ましくは、前記ヒスチジntagは1-10のヒスチジン残基（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10残基）を含む。より好ましくは、前記ヒスチジntagは6ヒスチジン残基を含む。

本発明の“抗原決定基”は、抗体結合部位と又はT-細胞レセプター（TCR）と結合する本発明のポリペプチドの部分であり得る。また別には、“抗原決定基”は、単一の抗体分子が結合する、本発明のポリペプチドの表面の部位であり得る。一般的には、いくつかの又は多くの別個の抗原決定基を有し、多くの異なる特異性をもつ抗体と反応する。好ましくは、前記抗体は本発明のポリペプチドに対して免疫特異性を有する。好ましくは、前記抗体は、融合タンパク質の部分ではない本発明のポリペプチドに対して免疫特異性を有する。好ましくは、前記抗体は、INSP181、INSP-SV又はその断片に対して免疫特異性を有する。抗原決定基は、通常は化学的に活性な表面分子群（例えばアミノ酸、糖側鎖）から成り、固有の荷電性特徴および固有の三次元構造的な特徴を有することができる。好ましくは、“抗原決定基”は、抗原性を有する（すなわち特異的免疫応答を誘引する）本発明のポリペプチド上の固有の化学基を指す。

【0019】

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

“精製核酸分子”という用語は、好ましくは以下の状態の本発明の核酸を指す：（1）全核酸がその供給源の細胞から単離されたとき、天然の状態と一緒に見出されるタンパク質、炭水化物又はその他の物質の少なくとも50%から分離されている、本発明の核酸、（2）“精製核酸分子”が天然の状態においては結合されているポリヌクレオチドの全部又は一部分と結合していない、本発明の核酸、（3）天然の状態においては結合していないポリヌクレオチドと機能的に連結されている、本発明の核酸、又は（4）より大きな核酸の部分として天然に存在しない、本発明の核酸。好ましくは、本発明の単離核酸分子は、他のいずれの夾雑核酸分子も、又は本発明の核酸分子の天然の環境中で見出され、ポリペプチドの生成におけるその使用、又はその治療的、診断的、予防的若しくは研究的使用を妨害する他の夾雑物も実質的に含まない。好ましい実施態様では、ゲノムDNAは本発明の範囲から特に除外される。好ましくは、10kb（キロ塩基対）、50kb、100kb、150kb、200kb、250kb又は300kbより大きいゲノムDNAは、本発明の範囲から特に除外される。好ましくは、“精製核酸分子”はcDNAのみから成る。

【0020】

好ましくは、前記精製核酸分子は、配列番号:1（INSP181エキソン1ポリペプチドをコードする）、配列番号:3（INSP181エキソン2ポリペプチドをコードする）、配列番号:5に（INSP181エキソン3ポリペプチドをコードする）、配列番号:7（INSP181-SV1エキソン3ポリペプチドをコードする）、配列番号:9（INSP181-SV1エキソン4ポリペプチドをコードする）、配列番号:11（INSP181エキソン4ポリペプチドをコードする）、配列番号:13（INSP181エキソン5ポリペプチドをコードする）、配列番号:15（INSP181エキソン6ポリペプチドをコードする）、配列番号:17（INSP181ポリペプチドをコードする）、配列番号:19（INSP181成熟エキソン1ポリペプチドをコードする）、配列番号:21（INSP181成熟ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドをコードする)、配列番号:33 (INSP181-SV1ポリペプチドをコードする)、配列番号:22 (成熟 INSP181-SV1ポリペプチドをコードする)、配列番号:27 (hisタグ INSP181ポリペプチドをコードする)、配列番号:29 (成熟 hisタグ INSP181ポリペプチドをコードする)、配列番号:31 (hisタグ INSP181-SV1ポリペプチドをコードする)、配列番号:23 (成熟 hisタグ INSP181-SV1ポリペプチドをコードする)、配列番号:35 (INSP181-エキソン3 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:37 (INSP181-SV1エキソン3 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:39 (INSP181-N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:41 (INSP181-N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:43 (INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:45 (成熟 INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:47 (hisタグ INSP181 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:49 (成熟 hisタグ INSP181 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:51 (hisタグ INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:53 (成熟 hisタグ INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:55 (INSP181-SV1エキソン4 G114S多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:57 (INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:59 (成熟 INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:61 (hisタグ INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:63 (成熟 hisタグ INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチドをコードする)、配列番号:65 (また別のエキソン2ヌクレオチド)、配列番号:67 (リボカリンドメイン INSP181ポリペプチドをコードする)、配列番号:69 (リボカリンドメイン INSP181 hisタグポリペプチドをコードする)、配列番号:71 (リボカリンドメイン INSP181-SV1ポリペプチドをコードする)及び/又は配列番号:73 (リボカリンドメイン INSP181-SV1 hisタグポリペプチドをコードする)に示す核酸配列から成るか、又は前記配列を含む。

【0021】

第三の特徴では、本発明は、高ストリンジェンシー条件下で本発明の第二の特徴の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸分子を提供する。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は以下のように規定される: 50%ホルムアミド、5xのSSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20 µg/mLの変性せん断サケ精子DNAを含む溶液で42 での一晚のインキュベーション、続いて0.1xのSSCで約65 でフィルターを洗浄。

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

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

第六の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、疎水性小分子を輸送する前記ポリペプチドの能力を阻害するリガンドを提供する。

本発明のポリペプチドに対するリガンドは多様な形態で存在し得る。前記形態には天然又は改変基質、酵素、レセプター、小有機分子 (例えば2000Daまで、好ましくは800Da未満の小さな天然又は合成有機分子)、ペプチド模倣体、無機分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体、前述の構造的若しくは機能的模倣物が含まれる。

そのような化合物は本明細書に開示するアッセイ及びスクリーニング方法を用いて同定することができる。

【0022】

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

本発明の第七の特徴の化合物は、前記遺伝子の発現レベル又は前記ポリペプチドの活性を増加 (アゴナイズ) 又は低下 (アンタゴナイズ) させることができる。

重要なことには、INSP181ポリペプチドの機能を同定することによって、疾患の治療及び/又は診断に有効な化合物を同定することができるスクリーニング方法を設計することが可能になる。本発明の第六及び第七の特徴のリガンド及び化合物は、そのような方法を

用いて同定することができる。これらの方法は本発明の特徴として含まれる。

本発明のポリペプチドのアゴニストとして同定された化合物は、*in vitro*又は*in vivo*のどちらかで疎水性小分子の輸送に有用であり得る。例えば、アゴニスト化合物は、疎水性小分子を細胞にデリバリーし、さらに前記小分子を血清中に存在する酵素により分解から保護するために、規定の細胞培養液の成分として有用である。

INSP181、INSP-SV1、INSP181 N92T多形、INSP181-SV1 N92T多形及び/又はINSP181-G114S多形のアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌、より具体的には脳、卵巣、精巣、脾臓、膵臓、子宮、血液及び/又は肺臓を冒す癌の治療に有用かもしれない。

好ましくは、INSP-SV1、INSP181 N92T多形又はINSP181-SV1 G114S多形（唾液腺、副腎及び眼のcDNAに由来する）のアンタゴニスト（例えば抗体）は、癌、より具体的には唾液腺、副腎及び/又は眼を冒す癌の治療に有用かもしれない。

【0023】

本発明の別の特徴は、薬剤調製候補物質、特にリポカリン関連疾患に対して活性を有する候補薬剤のスクリーニングの標的としてのINSP181遺伝子又はポリペプチドの使用にある。

本発明のさらに別の特徴は、リポカリン関連疾患の治療用化合物をスクリーニングする方法にある。前記方法は、INSP181遺伝子又はポリペプチド若しくはその断片と結合する化合物の能力を決定することを含む。

【0024】

第八の特徴では、本発明は、治療又は診断で使用するために、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を提供する。

本発明の一部は、以下を含む（ただしこれらに限定されない）ある種の疾患を治療することを目的とする医薬の製造で使用することができる：視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患（たとえばTh1皮膚疾患、例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病；Th2皮膚疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹）、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節、1型糖尿病、橋本病、グレーブズ病（甲状腺炎）、慢性関節リウマチ、増殖性系球体半月形成性系球体腎炎、多発性硬化症、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシス、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症、アレルギー（例えばアレルギー性鼻炎、喘息、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎）、セザリー症候群、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染。

実施例で説明するアッセイはまた治療的に有用な成分の同定に有用であり得る。

【0025】

第九の特徴では、本発明は患者の疾患を診断する方法を提供する。前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベル、又は本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を前記患者由来の組織で判定し、前記発現又は活性のレベルをコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと異なるレベルを疾患の指標とする。そのような方法は、好ましくは*in vitro*で実施されるであろう。同様の方法を患者における疾患の治療的処置をモニターするために用いることができ、ポリペプチド又は核酸分子の発現レベル又は活性がある期間にわたってコントロールレベルへ向かって変化すれば疾患の緩解の指標となる。

皮膚疾患（例えば乾癬）に罹患している患者では、非罹患患者と比較して、又は患者をアレルギーに暴露したとき、より高いリポカリンの発現が検出され得る。例えば、ニッケル又は金に暴露された患者では（接触アレルギー）、好中球ゼラチナーゼ付随リポカリン（

10

20

30

40

50

NGAL)の有意な増加が測定された(Moller et al. Contact Dermatitis 1999, Apr,40(4):200-4)。例えばNGALのようなペプチド/ポリペプチドのアップレギュレーションはまた、創傷治癒後に検出され、乾癬及び創傷治癒でこれらペプチド/ポリペプチドの発現の説明となっている(Sorensen et al. J Immunol 2003 Jun1, 170(11):5583-9)。さらにまた、表皮でのNGALの強い誘発は、上皮の分化の調節異常を特徴とする多様な皮膚疾患(例えば乾癬、紅色ひこう疹及び扁平上皮癌)で観察された(Mallbris et al. Exp Dermatol 2002, Dec,11(6):584-91)。したがって、Mallbrisらは、NGALはヒトの皮膚におけるケラチノサイト分化の調節異常のマーカーであると結論している。

したがって、本発明のある種のポリペプチドの過剰発現は疾患の進行及び予後と相関性を有し得る。したがって、本発明のポリペプチドは疾患の進行及び/又は予後のためのマーカーとして有用である。

10

【0026】

Th1疾患又はTh2疾患をもつ哺乳動物のある種の組織は、“標準的”哺乳動物(すなわちTh1疾患又はTh2疾患をもたない同じ種の哺乳動物)と比較したとき、有意に高いINSP181遺伝子コピー数を含み、さらに有意に強化されたINSP181タンパク質レベル及びINSP181タンパク質コードmRNAレベルを発現すると考えられる。INSP181タンパク質のレベル増大は、Th1疾患又はTh2疾患をもつ哺乳動物のある種の体液(例えば血清、血漿、尿、脊髄液及び滑液)及び/又は皮膚で、Th1疾患又はTh2疾患をもたない同じ種の哺乳動物由来の血清/皮膚と比較したときに検出されるであろう。したがって、本発明は、Th1疾患又はTh2疾患診断時に有用な方法を提供する。前記方法は、哺乳動物細胞(特に皮膚)又は体液でINSPタンパク質コード遺伝子の発現レベル又は遺伝子コピー数をアッセイし、さらに前記遺伝子発現レベル又は遺伝子数をINSP181タンパク質遺伝子の標準的な発現レベル又は遺伝子コピー数を比較することを含み、それによって標準を超える遺伝子発現レベル又は遺伝子コピー数の増加がある種のTh1疾患又はTh2疾患の指標となる。

20

Th1疾患又はTh2疾患の診断が通常的な方法にしたがって既になされている場合は、本発明は予後の指標として有用である。

“INSP181タンパク質コード遺伝子の発現レベルをアッセイする”とは、INSP181タンパク質レベル又はINSP181コードmRNAレベルを第一の生物学的サンプルで直接的に(例えば絶対的タンパク質レベル又はmRNAレベルを測定又は評価することによって)又は相対的に(例えば第二の生物学的サンプル中のINSP181タンパク質レベル又はmRNAレベルと比較することによって)、定量的に又は定性的に測定又は評価することを意味する。“INSP181タンパク質コード遺伝子のコピー数をアッセイする”とは、遺伝子コピー数を第一の生物学的サンプルで直接的に(例えば絶対的遺伝子コピー数を測定又は評価することによって)又は相対的に(例えば第二の生物学的サンプル中のINSP181タンパク質遺伝子コピー数と比較することによって)、定量的に又は定性的に測定又は評価することを意味する。

30

【0027】

好ましくは、第一の生物学的サンプル中のINSP181タンパク質レベル、mRNAレベル又は遺伝子コピー数が測定又は評価され、さらに標準的なINSP181タンパク質レベル、mRNAレベル又は遺伝子コピー数と比較される。前記標準は、Th1疾患又はTh2疾患をもたない個体から入手した第二の生物学的サンプルから得られる。また別には、前記方法が予後の指標として用いられる場合は、第一及び第二の両生物学的サンプルをTh1及びTh2疾患をもつ個体から入手し、さらに相対的発現レベル又はコピー数を測定して予後を決定することができる。当業界では理解されるところであるが、標準的なINSP181タンパク質レベル、mRNAレベル又は遺伝子コピー数が判明したら、それを比較のための標準として繰り返し用いることができる。

40

“生物学的サンプル”とは、INSP181タンパク質又はmRNAを含む、個体、細胞株、組織培養、又は他の供給源(好ましくは皮膚)から得られた任意の生物学的サンプルを意図する。組織生検材料及び体液を哺乳動物から入手する方法は当分野で周知である。生物学的サンプルは組織サンプルがmRNAを含むべきである場合は、組織生検材料が好ましい供給源である。

50

本発明は哺乳動物のTh1疾患又はTh2疾患を検出するために有用である。特に、本発明は、本発明で述べるTh1疾患又はTh2疾患のタイプの哺乳動物における診断又は予後で有用である。好ましい哺乳動物には、サル(monkey)、類人猿(ape)、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ及びヒトが含まれる。特に好ましいものはヒトである。

本発明の第一の特徴のポリペプチドを検出する可能なある方法は以下の工程を含む：(a)本発明の第六の特徴のリガンド(例えば抗体)を生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；及び(b)前記複合体を検出する工程。

【0028】

当業者には明らかであろうが、本発明の第九の特徴の方法には種々の多数の方法が存在し、例えば短いプローブによる核酸のハイブリダイゼーション、点変異解析、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅及び抗体を使用して異常なタンパク質レベルを検出する方法である。同様な方法が短期又は長期ベースで用いられ、患者で疾患の治療処置をモニターすることが可能になる。本発明はまた、疾患を診断するこれらの方法で有用なキットを提供する。

10番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドのリポカリンとしての使用を提供する。

本発明のポリペプチドを用いて、例えば血中又は組織中の小さな脂肪酸の生物学的機能を調節するためにそれらと結合させることが可能であろう。本発明のポリペプチドを用いて、特に乳癌、気腫及び皮膚の疾患のための治療の一部としてレチノイド又はステロイドをレセプターへ輸送し、再生における重要な役割を果たすことができよう。その他の使用には、抗炎症性応答の調節、酵素機能の強化物質としての又は酵素様分子自体としての抗微生物剤活性が含まれる。

本発明のポリペプチドはそれらの抗微生物特性のために有用であるかもしれない。抗微生物活性は、培養細胞を用いて*in vitro*で、又は本発明の分子を適切な動物モデルに投与することによって*in vivo*で測定することができる。抗微生物活性を試験するためのアッセイは微生物に特異的であり、当業者には一般的に知られている。例えば、抗微生物活性の*in vivo*試験は、マウスの腹腔に適切なプロス中の病原微生物を接種することによって実施される。接種後直ぐに、前記ポリペプチドを含む組成物を投与し、その後の7日間の死亡を記録する。一般に投与は静脈内、皮下、腹腔内又は経口的に実施される。抗微生物剤の*in vivo*及び*in vitro*試験の考察のためには例えば以下の文献を参照されたい：Musiek et al. *Antimicrobial Agents Chemother* 3:40, 1973。

【0029】

本発明のポリペプチドの活性は、疎水性小分子と結合する能力を測定する多様なアッセイを用いて測定することができる。そのようなアッセイには、蛍光強度の変化を測定するアッセイ(Cogan et al. *Eur J Biochem* 65:71-78, 1976)及び水溶性化合物の平衡透析(Hase et al. *J Biochem* 79:373-380, 1976)が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

本発明の分子の他の有用性には、親油性小分子の輸送及び/又は安定化のためのデリバリー系としての有用性が含まれる。例えば、本発明の分子は、活性な薬剤を形成する親油性小分子を微小被包化し、したがって腸内の極端なpH、強力な消化酵素への暴露及び胃腸膜の非透過性から前記薬剤を保護するために用いることができよう。薬剤の被包化の他の利点には前記薬剤の未熟な活性化の防止、又は胃の刺激物質からの保護が含まれ得る。

最近では、リポカリン骨格を用いて天然に存在しないリガンドに対する個々に逃れた特異性を有するタンパク質が作り出された。そのような設計リポカリンは抗体模倣物と考えることができ、したがって“アンチカリン”と命名されている(概説として以下を参照されたい：Skerra, *Biochim Biophys Acta* 2000, Oct 18:1482(1-2):337-50)。したがって、本発明のポリペプチドは“アンチカリン”の合成において有用性を見出すことができよう。

11番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二

10

20

30

40

50

若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を医薬的に許容できる担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。

【0030】

12番目の特徴では、本発明は、視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、及び多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、及び神経系発生の調節、を含む疾患の診断又は治療用医薬の製造で使用される、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を提供する。

13番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、又は本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、又は本発明の第四の特徴のベクター、又は本発明の第五の特徴の宿主細胞、又は本発明の第六の特徴のリガンド、又は本発明の第七の特徴の化合物を患者に投与することを含む、患者の疾患を診断する方法を提供する。

本発明のポリペプチドは、それら自体で、融合タンパク質（例えばFc融合物）の成分として、及び/又はTh1のダウンレギュレーターとして作用する1つ以上の薬剤との併用である。アンタゴニスト、例えば本発明のポリペプチドに対して生成された抗体は、それら自体で、又はTh2のダウンレギュレーターとして作用する1つ以上の薬剤と併用して用いることができる。

Th1又はTh2のダウンレギュレーターとして作用する薬剤は当業界で周知であり、下記記載の薬剤に限定されるべきではない。

【0031】

好ましくは、Th1のダウンレギュレーターとして作用する薬剤は以下から選択される：細胞性免疫調節物質、液性免疫調節物質、ポリペプチドT、マイコバクテリウム・バッカエ（*mycobacterium vaccae*）、タザロテン、ベキサロテン、トログリタゾン、リアロゾール、ランバゾール、アルギニン、酸化窒素、シクロスポリン、メトトレキサート、ビタミンD3アナログ、レチノイド、コルチコステロイド、アントラリン、タール、ソラレン＋UVA（PUV）、クルクミン、ポリボジウム、ロイコトマス、グルココルチコイド（例えばプレジソン）、及び/又はTh1/Th2のバランス（アダプトゲン）、例えばダイズイソフラボン、植物ステロール、ステロリン、共生細菌製剤及び/又はプレグネナロン。

好ましくは、細胞性免疫調節物質は、DAB389IL-2、ミコフェノレート・モフェチル（*mycophenolate mofetil*）、VX-497、レフルノミド、エファリズマブ、OKTcdr4a、CTLA4-Ig、MEDI 507、LFA3TIP、ダクリズマブ、パシリキシマブ、タクロリムス、ピメクロリムス及び/又はシロリムスから選択される。

好ましくは、液性免疫調節物質はIL-4、IL-10、IL-11、インフリキシマブ、エタナーセプト、オナーセプト及び/又はアダリムマブから選択される。

【0032】

好ましくは、Th2のダウンレギュレーターとして作用する薬剤は以下から選択される：ケモカインレセプターCCR3又はCCR4に対するアンタゴニスト（例えば抗体）、CXCR4アンタゴニスト、抗-TARC、粘着分子VLA-4の阻害物質、シクロペンテノンプロスタグランジン、チアゾロジンジオン、SB203580、SB239063、RWJ67657、ビタミンD3類似体、グルココルチコイド、マイコバクテリウム、抗-IL-5/IL-13/IL-9、可溶性IL-4R、CD80/86の阻害物質、ICOSリガンド、トール様レセプター（TLR）-9アゴニスト（例えばCpG DNA）、CTLA4-Ig、アンチセンスGATA3オリゴヌクレオチド、マイコバクテリウム・バシルス・カルメット-ゲリン（BCG）、マイコバクテリウム・バッカエ、抗IgE、ベータレセプターアゴニスト、コルチコステロイド、シソの種子、ケルセチン、ルテオリン、イソフラボン、グルココルチコイド（例えばプレジソン）、及び/又はTh1/Th2のバランス（アダプトゲン）

、例えばダイズイソフラビン、植物ステロール、ステロリン、共生細菌製剤及び/又はプレグネナロン。本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現が、又は本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性が、健常者の発現レベル又は活性と比較したとき、罹患患者において低い疾患については、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物はアゴニストであるべきである。反対に、前記天然の遺伝子の発現又は前記ポリペプチドの活性が、健常者の発現レベル又は活性と比較したとき、罹患患者において高い疾患については、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物はアンタゴニストであるべきである。そのようなアンタゴニストの例には、アンチセンス核酸分子、リボザイム及びリガンド（例えば抗体）が含まれる。

INSP181ポリペプチドはリポカリンであり、したがって多くの病的状態で役割を有する。INSP181ポリペプチドのアンタゴニストはこれら病的状態を調節する方法を提供するので特に重要である。

【0033】

14番目の特徴では、本発明は、本発明のポリペプチドをより高いレベル、より低いレベルで発現するか、又は発現しないように形質転換された、非ヒトトランスジェニック若しくはノックアウト動物を提供する。そのようなトランスジェニック動物は疾患の研究のために非常に有用なモデルであり、さらにそのような疾患の治療又は診断に有効な化合物の同定を目的とするスクリーニングレジメンでもまた用いることができる。

本明細書で用いられる、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチド又は核酸分子と実質的に類似する機能的又は構造的な特徴を有するタンパク質又は核酸を指す。タンパク質の機能的等価物は、特定の機能の遂行を目的とする変更の必要性に応じてそのような変更を含むことができる。“機能的等価物”という用語は、分子の断片、変異体、ハイブリッド、変種、類似体又は化学的誘導体を含むことを意図する。

好ましくは、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチドの任意の1つ以上の機能的活性を示すタンパク質又は核酸分子で有り得る。

好ましくは、“機能的等価物”は、生物学的活性又は機能の測定のための適切なアッセイにおいてINSP181又はその断片と比較して、実質的に類似の活性を示すタンパク質又は核酸であり得る。好ましくは、“機能的等価物”は、生物学的活性又は機能の測定のための適切なアッセイにおいてINSP181又はその断片と比較して、同一又はより高い活性を示すタンパク質又は核酸であり得る。好ましくは、“機能的等価物”は、生物学的活性又は機能の測定のための適切なアッセイでINSP181又はその断片と比較して、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、100%又はそれより高い活性を示すタンパク質又は核酸であり得る。

好ましくは、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチドと実質的に類似するin vivo又はin vitro活性を示すことができるタンパク質又は核酸であり得る。好ましくは、“機能的等価物”は、本発明のポリペプチドの対応する部分が他の細胞内又は細胞外分子と相互作用する態様と実質的に類似の態様でそれら分子と相互作用することができるタンパク質又は核酸であり得る。例えば、“機能的等価物”は、免疫アッセイにおいて、本発明のポリペプチドの対応するペプチド（すなわち“機能的等価物”を達成するためにそのアミノ酸配列が変更されたペプチド）又は本発明のペプチドそのものと抗体との結合を低下させることができよう（ここで前記抗体は本発明のポリペプチドの対応するペプチドに対して生成されてあった）。等モル濃度の機能的等価物は、前述の対応するペプチドの結合を少なくとも約5%、好ましくは約5%から10%、より好ましくは約10%から25%、さらに好ましくは約25%から50%、もっとも好ましくは約40%から50%低下させるであろう。

例えば、機能的等価物は完全に機能的であってもよいが、また1つ以上の活性を欠いていてもよい。したがって、本発明では、変更は、例えばリポカリンドメインの所有を反映するポリペプチドの活性の機能に影響を与えることができる。

【0034】

本発明を利用するために用いることができる標準的な技術及び方法の要旨は以下で提供される。本発明は、記載した特定の方法論、プロトコル、細胞株、ベクター及び試薬に限

10

20

30

40

50

定されないことは理解されよう。さらにまた、本明細書で用いられる用語は、具体的な実施態様を記載することを単に目的としており、この用語によって本発明の範囲を限定すべきではないこともまた理解されよう。本発明の範囲は添付の請求項の語句によってのみ限定される。

ヌクレオチド及びアミノ酸についての標準的な略語が本明細書では用いられる。

別に指定がなければ、本発明の実施には、通常の分子生物学、微生物学、組換えDNA技術及び免疫学の技術が用いられ、前記技術は当業者の技量の範囲内である。

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

【 0 0 3 5 】

本明細書で用いられる、“ポリペプチド”という用語には、2つ以上のアミノ酸が互いにペプチド結合又は改変ペプチド結合（すなわちペプチドイソステア）によって結合されたものを含む、任意のペプチド又はタンパク質が含まれる。この用語は、短い鎖（ペプチド及びオリゴペプチド）及び長い鎖（タンパク質）の両者を指す。

本発明のポリペプチドは成熟タンパク質型であっても、プレ-、プロ-又はプレプロ-タンパク質であってもよい。後者は、プレ-、プロ-又はプレプロ-部分の切断によって活性化され、活性を有する成熟ポリペプチドを生成する。そのようなポリペプチドでは、前記プレ-、プロ-又はプレプロ-配列はリーダー配列又は分泌配列でもよく、又は成熟ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列でもよい。

本発明の第一の特徴のポリペプチドは融合タンパク質の一部を形成することができる。

例えば、1つ以上の付加されたアミノ酸配列を含むことはしばしば有利である。前記付加される配列は、分泌配列若しくはリーダー配列、プロ-配列、生成を促進する配列、又はより高い安定性を例えば組換え体の生成中に付与する配列を含むことができる。また別には、又は前記に加えて、成熟ポリペプチドは別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えばポリエチレングリコール）と融合させることができる。

特に前記融合タンパク質は、1つ以上の付加されたアミノ酸配列及び本発明のポリペプチドの断片を含むことができる。前記断片は、好ましくはリポカリンドメイン、例えば配列番号:66、配列番号:70、又は配列番号:18のアミノ酸25 - 174、アミノ酸26 - 180、アミノ酸33 - 166、若しくはアミノ酸41 - 189又は配列番号:24のアミノ酸25 - 206に示されるものである。

好ましくは、INSP181ポリペプチドと少なくとも85%の相同性を有する配列を含む本発明のポリペプチドは融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、異種タンパク質配列のためのコード配列を含むフレーム内でINSP181と少なくとも85%相同性を有する配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをクローニングすることによって入手することができる。

【 0 0 3 6 】

本明細書で用いられるとき、“異種の”という用語は、ヒトINSP181以外の任意のポリ

ペプチドを指す。融合タンパク質のN-又はC-末端に含み得る異種配列の例には以下が含まれる：膜結合タンパク質の細胞外ドメイン、免疫グロブリン定常領域、マルチマー化ドメイン、細胞外タンパク質のドメイン、シグナル配列、エキスポードドメイン、及びアフィニティークロマトグラフィーによる精製を可能にする配列。

これら異種配列の多くが発現プラスミドにおいて市場で入手することができる。なぜならばこれらの配列は、それらが融合されているタンパク質の特異的な生物学的活性を顕著に障害することなく別に付加された特性を提供するために、融合タンパク質中に通常的に含まれるからである (K. Terpe 2003, Appl Microbiol Biotechnol 60:523-33)。そのような別に付加される特性の例は、体液中でより長く持続する半減期、細胞外分布、又はいわゆる“ヒスチジンタグ”を形成する一連のヒスチジン (Gentz et al. 1989 Proc Natl Acad Sci USA, 86:821-4)、若しくは“HA”タグ (インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープ) (Wilson et al. 1994, Cell, 37:767-78) によって可能となるより容易な精製方法である。必要な場合には、前記異種配列は、例えば前記タンパク質と異種配列との間にタンパク質分解切断部位を挿入し、精製融合タンパク質を適切なプロテアーゼに暴露することによりタンパク質分解切断によって除去することができる。これらの特色は、融合タンパク質の生成及び医薬組成物の製造におけるそれらの使用を促進するので融合タンパク質にとって特に重要である。例えば実施例で用いられるタンパク質 (成熟 INSPポリペプチド; 配列番号:22) は、INSP181のC-末端に融合させた6ヒスチジンペプチドの手段によって精製された。融合タンパク質が免疫グロブリン領域を含むとき、前記融合は直接的であっても、又は短いリンカーペプチド (長さが1から3アミノ酸の短いものでも又は前記より長いもの、例えば長さが13アミノ酸残基でもよい) を介してもよい。前記リンカーは、例えば、配列E-F-M (Glu-Phe-Met) のトリペプチド、又はGlu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Metを含む13-アミノ酸リンカー配列でもよい。前記リンカー配列は、本発明の物質の配列と免疫グロブリン配列との間に導入される。生成された融合タンパク質は、改善された特性、例えば体液中での残留時間の延長 (すなわち半減期の延長)、比活性の増加、発現レベルの増加、又は融合タンパク質の精製の促進である。

【0037】

好ましい実施態様では、前記タンパク質はIg分子の定常領域に融合される。好ましくは、前記は、例えばヒトIgG1のCH2及びCH3ドメインのような重鎖領域に融合される。Ig分子の他のアイソフォーム、例えばアイソフォームIgG₂若しくはIgG₄、又は他のIgクラス、例えばIgMもしくはIgAもまた、本発明の融合タンパク質の生成に適している。融合タンパク質はモノマーでもマルチマーでも、ヘテロ-若しくはホモ-マルチマーでもよい。

さらに好ましい実施態様では、前記機能的誘導体は、1つ以上の官能基 (アミノ酸残基の1つ以上の側鎖として存在する) に結合した少なくとも1つの部分を含む。好ましくは、前記部分はポリエチレン (PEG) 部分である。PEG化は公知の方法、例えばW099/55377に記載の方法によって実行することができる。

ポリペプチドは20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができ、前記は、天然のプロセス、例えば翻訳後プロセッシングによって、又は当分野で周知の化学的改変技術によって改変される。本発明のポリペプチドで通常的に存在し得る公知の改変には、グリコシル化、脂質の結合、硫酸化、ガンマ-カルボキシル化 (例えばグルタミン酸残基のカルボキシル化)、ヒドロキシル化及びADP-リボシル化がある。他の可能な改変には、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、GPIアンカー形成、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、タンパク質へのトランスファー-RNA仲介アミノ酸添加 (例えばアルギニル化)、及びユビキチン化が含まれる。

【0038】

改変は、ポリペプチドのいずれの場所（ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びアミノ又はカルボキシ末端を含む）に生じていてもよい。実際、ポリペプチドのアミノ又はカルボキシ末端又はその両端の共有結合的改変によるブロッキングは、天然に存在するポリペプチド及び合成ポリペプチドで一般的であり、そのような改変は本発明のポリペプチドで存在し得る。

ポリペプチド中に生じる改変は、しばしばどのように前記ポリペプチドが生成されるかの相関的要素であろう。組換えによって生成されるポリペプチドの場合、改変の性質及び程度は、大きな比率で、個々の宿主細胞の翻訳後修飾能力及び注目するポリペプチドのアミノ酸配列に存在する改変シグナルによって決定されるであろう。例えば、グリコシル化パターンは宿主細胞の種々のタイプ間で変動する。

本発明のポリペプチドは任意の適切な態様で調製することができる。そのようなポリペプチドには単離された天然に存在するポリペプチド（例えば細胞培養由来の精製形）、組換え生成ポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成により生成されたポリペプチド、又は前記方法の組合せにより生成されたポリペプチドが含まれる。

本発明の第一の特徴の機能的に等価のポリペプチドは、INSP181ポリペプチドと相同なポリペプチドであり得る。ポリペプチドの一方の配列が他方のポリペプチドの配列と十分に高度な同一性又は類似性を有する場合、これらの2つのポリペプチドは、本明細書で当該用語が用いられるように“相同”である。“同一性”とは、アラインメントを実施した複数の配列の個々の任意の位置においてアミノ酸残基が前記配列間で同一であることを示す。“類似性”とは、アラインメントを実施した配列の個々の任意の位置においてアミノ酸残基が前記配列間で類似のタイプであることを示す。同一性及び類似性の程度は容易に計算することができる（Computational Molecular Biology, A. M. Lesk, ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, D.W. Smith ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, G. von Heinje Academic Press, 1987; 及び Sequence Analysis Primer, M. Gribskov and J. Devereux eds., M. Stockton Press, New York, 1991）。

【0039】

したがって相同なポリペプチドには、INSP181ポリペプチドの天然の生物学的変種（例えば前記ポリペプチドが由来する種の中での対立遺伝子座変種、又は地理的変種）及び変異体（例えばアミノ酸置換、挿入又は欠失を含む変異体）が含まれる。そのような変異体には、1つ以上のアミノ酸残基が保存的又は非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されているポリペプチドが含まれ得る。そのような置換アミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされるものであってもなくてもよい。典型的な前記置換は、Ala、Val、Leu及びIle間で；Ser及びThr間で；酸性残基Asp及びGlu間で；Asn及びGln間で；塩基性残基Lys及びArg間で；又は芳香族残基Phe及びTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつかのアミノ酸、すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、又は1つだけのアミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失又は添加されてある。特に好ましいものは、前記タンパク質の特性及び活性を変化させないサイレント置換、付加及び欠失である。これに関して

また特に好ましいものは保存的置換である。

そのような変異体には、1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドが含まれる。

本発明にしたがえば、いずれの置換も好ましくは“保存的”又は“安全な”置換であるべきで、前記は、一般的には、十分に類似する化学的特性（例えば塩基性、陽性荷電アミノ酸がまた別の塩基性、陽性荷電アミノ酸で置き換えられるべきである）を有するアミノ酸を導入し、分子の構造及び生物学的機能を保存する置換と定義される。

文献には、タンパク質の配列及び/又は構造における統計的及び物理化学的研究をもとにして保存的アミノ酸置換の選択を実施することができる多くのモデルが提供されている（S.I. Rogov and A.N. Nekrasov, 2001）。タンパク質設計実験によって、アミノ酸の特

10

20

30

40

50

定のサブセットの使用が折りたたみ可能で活性を有するタンパク質を生成することができることが示され、タンパク質構造で容易に収容することができ、機能的及び構造的ホモログ並びにパラログの検出に用いることができるアミノ酸の“同義”置換物の分類に役立った(L.R. Murphy et al. 2000)。同義アミノ酸のグループ及びより好ましい同義アミノ酸のグループは表1に示されている。

特定の非保存的変異もまた、種々の目的をもつ本発明のポリペプチドに導入することができる。CD24様タンパク質のアフィニティーが低下した変異は、再使用されリサイクルされるその能力を高め、潜在的にその治療能力を高めることができる(C.R. Robinson, 2002)。本発明のポリペプチドに最終的に存在する免疫原性エピトープはワクチンの開発に利用することができ(S. Stevanovic, 2002)、または、タンパク質の安定性を高める変異を選択するために公知の方法に従って改変し、さらにそれらを修正することによって除去することができる(B. van den Burg and V. Eijsink, 2002; WO02/05146, WO00/34317, WO98/52976)。

【0040】

ペプチド模倣物に含まれるアミノ酸誘導体の好ましいまた別の同義グループは表2に定義されているものである。アミノ酸誘導体の非包括的リストにはまた以下が含まれる：アミノイソ酪酸(Aib)、ヒドロキシプロリン(Hyp)、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-COOH、インドリン-2カルボン酸、4-ジフルオロ-プロリン、L-チアゾリジン-4-カルボン酸、L-ホモプロリン、3,4-デヒドロ-プロリン、3,4-ジヒドロキシ-フェニルアラニン、シクロヘキシル-グリシン及びフェニルグリシン。

“アミノ酸誘導体”とは、20の遺伝的にコードされた天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸又はアミノ酸様化学物質を指す。特に、アミノ酸誘導体は、置換又は非置換、直鎖、分枝若しくは環式アルキル部分を含むことができ、さらに1つ以上のヘテロ原子を含むことができる。アミノ酸誘導体はde novoに生成するか、又は市販の供給源(Calbiochem-Novabiochem AG, Switzerland; Bachem, USA)から入手することができる。

タンパク質の構造及び機能を調べ及び/又はこれを改善するために、in vitro及びin vivo翻訳系を用いる、非天然アミノ酸誘導体をタンパク質に取り込むための種々の方法が文献に開示されている(D.A. Dougherty, 2000)。非ペプチド模倣物と同様にペプチド模倣物の合成及び開発もまた当分野では周知である(A. Golebiowski et al. 2001; V.J. Hruby and P.M. Balse 2000; T.K. Sawyer, in "Structure Based Drug Design", edited by P. Veerapandia, Marcel Dekker Inc., pg.557-663, 1997)。

典型的には、2つのポリペプチド間の30%を超える同一性は、機能的等価性を示していると考えられる。好ましくは、本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP181ポリペプチド又はその活性な断片と70%又は80%を超える配列同一性の程度を有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ85%、90%、95%、98%、98.5%、99%又は99.5%を超える同一性の程度を有する。

【0041】

本発明の第一の特徴の機能的に等価のポリペプチドはまた、構造的アラインメントの1つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであろう。例えば、バイオペンジウム(Biopendium(商標))検索データベースを作製するために用いられた検索ツールの1つの特徴を構成するインファーマティカ・ゲノムスレッダー(Inpharmatica Genome Threader)技術を用いて(WO01/67507を参照されたい)、現時点では機能が未知であってINSP181エキソンポリペプチド又はINSP181ポリペプチド(配列番号:14及び18)と比較して低い配列同一性を有するが、INSP181エキソンポリペプチド、INSP181ポリペプチド、INSP181-SV1ポリペプチド、INSP181成熟ポリペプチド、INSP181-SV1成熟ポリペプチド、INSP181 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181多形ポリペプチド、INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181 N92T多形ポリペプチド、INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド、又は成熟INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチドと有意な構造相同性を共有するためにリボカリンであると予想されるポリペプチドを同定することができる。

“有意な構造相同性”とは、インファーマティカ・ゲノムスレッダー(商標)が、2つの

タンパク質又はタンパク質領域は10%より高い、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%及びそれより高い確実性で構造的相同性を共有すると予想することを意味する。インフォーマティカ・ゲノムスレッダー(商標)の確実性の値は以下のように算出される: もっぱら公知の構造の配列を用いインフォーマティカ・ゲノムスレッダー(商標)により一組の比較を先ず実施した。前記比較のいくつかは、(構造を基準にして)関連性を有することが判明しているタンパク質間で実施された。続いて、CATH構造分類(www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath)から入手した公知の関連性と公知の非関連性をもっとも明瞭に識別するために必要とされた基準にしたがってニューラルネットワークをトレーニングした。これによって0と1の間のニューラルネットワークスコアが得られた。しかしながら、ここでも、関連性を有するタンパク質の数及び関連性がないタンパク質の数は判明していたので、前記ニューラルネットワークの結果をパッケージに分配し、正しい結果のパーセンテージを経験的に算出することが可能であった。このようにして、バイオペンジウム検索データベースの純粋な予想のいずれもが付随するニューラルネットワークスコアを有し、信頼度百分率は、インフォーマティカ・ゲノムスレッダー(商標)のトレーニング/試験セットにおける成功を反映する。

10

【0042】

本発明の第一の特徴のポリペプチドはまた、INSP181ポリペプチドの断片及びINSP181ポリペプチドの機能的等価物の断片を含むが、ただし、これら断片がリポカリンであるか、又はINSP181ポリペプチド、INSP181成熟ポリペプチド、INSP181-SV1ポリペプチド、INSP181-SV1成熟ポリペプチド、INSP181 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181多形ポリペプチド、INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181 N92T多形ポリペプチド、INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド、又は成熟INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド、INSP181リポカリンドメイン又はINSP181-SV1リポカリンドメインと共通の抗原決定基を有することを条件とする。

20

リポカリン活性を維持する断片の例は、配列番号:66に示すリポカリンドメイン、又は図12に示す配列(すなわちいずれかの完全長INSP181配列のアミノ酸25 - 174、アミノ酸26 - 180及び/又はアミノ酸33 - 166)と同様に、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含む断片(すなわちいずれかの完全長INSP181配列のアミノ酸96 - 187)を含むか、又はこれらから成るものである。好ましくは、ジスルフィド結合は90位と181位のシステイン残基間で形成される。

30

本明細書で用いられる、“断片”という用語は、INSP181ポリペプチド、又はその機能的等価物のアミノ酸配列の部分(全体ではない)と同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記断片は、前記配列由来の少なくともn個の連続するアミノ酸を含むべきであり、さらに、個々の配列に応じてnは好ましくは7以上(例えば8、10、12、14、16、18、20またはそれより多い)である。小さな断片が抗原決定基を形成することができる。本発明の断片は長さが1 - 100、好ましくは5 - 50、より好ましくは7 - 20アミノ酸である。

本発明の核酸は、長さが好ましくは10 - 1000ヌクレオチド、好ましくは50 - 800ヌクレオチド、好ましくは100 - 600、好ましくは200 - 550、好ましくは長さが300 - 500ヌクレオチドである。本発明のポリペプチドは、好ましくは長さが5 - 500アミノ酸、好ましくは50 - 400、好ましくは100 - 300、好ましくは長さが150 - 250アミノ酸である。

40

【0043】

完全長INSP181ポリペプチドの断片は、INSP1813ポリペプチド配列中のそれぞれ1つ又は2、3、4、5...の隣接エキソン配列の組合せから成るであろう。これらのエキソンはさらに本発明の成熟断片と組み合わせることができる。例えばそのような組合せにはエキソン1及び2等々が含まれる。そのような断片は本発明に含まれる。断片はまた、INSP181タンパク質の種々のドメインの組合せから成り得る。例えば、断片は、上記に示すINSP181の種々のリポカリンドメインの組合せから成り得る。そのような断片は“独立して”、すなわちそれらは他のアミノ酸又はポリペプチドの部分ではなく、それらと融合していなくてもよく、また、それらは、それらが部分又は領域を形成するより大きなポリペプチド内に

50

含まれていてもよい。より大きなポリペプチド内に含まれているときは、本発明の断片はもっとも好ましくはただ1つの連続する領域を形成する。例えば、ある種の好ましい実施態様は、断片のアミノ末端に融合されたプレ-及び/又はプロ-ポリペプチド領域を有する断片、及び/又は断片のカルボキシ末端に融合された付加領域を有する断片に関する。しかしながら、いくつかの断片がただ1つのより大きなポリペプチド内に含まれていてもよい。

本発明のポリペプチド又はそれらの免疫原性断片（少なくとも1つの抗原決定基を含む）を用いて、前記ポリペプチドに対して免疫特異的であるリガンド（例えばポリクローナル又はモノクローナル抗体）を作製することができる。そのような抗体を利用して、本発明のポリペプチドを発現するクローンを単離又は同定するか、又は前記ポリペプチドをアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。前記抗体はまた、当業者に明白なように、他の適用の中でとりわけ診断又は治療促進物質として利用することができる。

“免疫特異的”という用語は、本発明のポリペプチドに対して、従来技術の他の関連するポリペプチドに対するアフィニティーよりも実質的に強いアフィニティーを有する抗体を意味する。本明細書で用いられる、“抗体”という用語は、完全な分子と同様にその断片、例えばFab、F(ab')及びFvを指し、前記断片は注目する抗原決定基と結合することができる。そのような抗体は、したがって本発明の第一の特徴のポリペプチドと結合する。

【0044】

“実質的に強いアフィニティー”とは、従来技術の他の関連するポリペプチドに対するアフィニティーと比較した時、本発明のポリペプチドに対するアフィニティーにおいて測定可能な増加が存在することを意味する。

好ましくは、前記アフィニティーは、従来技術の他の関連するポリペプチドに対するよりも、本発明のポリペプチドに対して少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍又はそれより強い。

好ましくは、公知のリポカリンと比較した時、本発明のポリペプチドに対するアフィニティーにおいて測定可能な増加が存在する。

好ましくは、天然のリポカリンと比較した時、本発明のポリペプチドに対するアフィニティーにおいて測定可能な増加が存在する。

ポリクローナル抗体が所望される場合は、選択した哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ヤギ又はウマを本発明の第一の特徴のポリペプチドで免疫することができる。前記動物の免疫に用いられるポリペプチドは、組換えDNA技術によって誘導しても、又は化学的に合成してもよい。所望の場合は、前記ポリペプチドは担体タンパク質と結合させることができる。ポリペプチドを化学的に結合させることができる一般的に用いられる担体には、ウシ血清アルブミン、タイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニンが含まれる。続いて前記結合させたポリペプチドを用いて、動物を免疫することができる。前記免疫動物の血清を採集し、公知の方法にしたがって、例えば免疫アフィニティークロマトグラフィーによって処理する。

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

【0045】

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対して生成されたモノクローナル抗体のパネルを種々の特性、すなわちアイソタイプ、エピトープ、アフィニティーなどについてスクリーニングすることができる。モノクローナル抗体は、それらを誘導した個々のポリペプチドの精製で特に有用である。また別には、注目するモノクローナル抗体をコードする遺伝子を、例えば当分野で公知のPCR技術によってハイブリドーマから単離し、適切なベクター

10

20

30

40

50

でクローニングし発現させることができる。

非ヒト可変領域がヒトの定常領域に結合又は融合されているキメラ抗体（例えば以下を参照されたい：Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:3439）もまた有用であり得る。

前記抗体を改変し（例えばヒト化によって）、個体における免疫原性を低下させることができる（例えば以下を参照されたい：Jones et al. Nature 1986, 321:522；Verhoeyen et al. Science 1988, 239, 1534；Kabat et al. J. Immunol. 1991, 147:1709；Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:10029；Gorman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:34181；及びHodgson et al. Bio/Technology 1991, 9:421）。本明細書で用いられる、“ヒト化抗体”という用語は、非ヒトドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメイン中のCDRアミノ酸及び選択した他のアミノ酸がヒト抗体中の同等のアミノ酸の代わりに代用された抗体分子を指す。したがってヒト化抗体はヒト抗体に極めて類似するが、ドナー抗体の結合能力を有する。

さらに別の態様では、前記抗体は“二重特異的”抗体であってもよい。すなわち抗体は2つの異なる抗原結合ドメインを有し、各ドメインは異なるエピトープに向けられている。

ファージディスプレイ技術を用いて、関連抗体の保持についてスクリーニングしたヒトのリンパ球のPCR増幅V-遺伝子レポーターから、又はナイーブライブラリーから、本発明のポリペプチドに対して結合活性を有する抗体をコードする遺伝子を選別することができる（J. McCafferty et al. 1990, Nature 348:552-554；J. Marks et al. 1992, Biotechnology 10:779-783）。これら抗体のアフィニティーは、チェーンシャッフリングによっても改善することができる（T. Clackson et al. 1991, Nature 352:624-628）。

上記技術によって生成された抗体は、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、それらは免疫アッセイ、放射性免疫アッセイ（RIA）又は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）における試薬として用いることができるという点で更なる有用性を有する。これらの適用では、抗体は、解析により検出可能な試薬（例えば放射性同位体、蛍光分子又は酵素）で標識することができる。

【0046】

本発明の第二及び第三の特徴の好ましい核酸分子は、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66又は配列番号:68に示すポリペプチド配列及び機能的の等価なポリペプチドをコードする核酸分子である。これら核酸分子は本明細書に記載する方法及び適用で用いることができる。本発明の核酸分子は好ましくは本明細書に開示する配列に由来する少なくともnの連続するヌクレオチドを含み、ここでnは個々の配列に応じて10又はそれより大きい（例えば12、14、15、18、20、25、30、35、40又はそれより大きい）。

本発明の核酸分子はまた、上記に記載した核酸分子に対して相補的である配列を含む（例えばアンチセンス又はプローブの目的のため）。

本発明の核酸分子はRNAの形態（例えばmRNA）であってもよく、又はDNAの形態（例えばcDNA、合成DNA又はゲノムDNAを含む）であってもよい。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学的合成技術によって、又は前記の組合せによって入手することができる。前記核酸分子は、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成を用いて化学的合成によって、ゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーから、又は生物から分離することによって調製することができる。RNA分子は一般的にはDNA配列のin vitro又はin vivo転写によって生成することができる。

【0047】

核酸分子は二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖DNAはコード鎖（センス鎖としても知られている）でもよいが、また前記は非コード鎖（アンチセンス鎖とも称される）であってもよい。

“核酸分子”という用語にはまたDNA及びRNAの類似体、例えば改変骨格を含むもの及びペプチド核酸（PNA）が含まれる。本明細書で用いられる、“PNA”という用語は、アンチセンス分子又は抗遺伝子作用因子を指し、複数のアミノ酸残基のペプチド骨格（好ましくはリジンで終わる）に連結された長さが少なくとも5ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含む。末端のリジンは組成物に可溶性を付与する。PNAはPEG化させて細胞内でそれらの寿命を延長することができ、細胞内でPNAは相補的な一本鎖DNA及びRNAと優先的に結合し、転写物の伸長を停止させる（P. E. Nielsen 1993, Anticancer Drug Des. 8:53-63）。

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、本明細書に開示する核酸分子の1つ以上のコード配列と同一であり得る。

これらの分子はまた、遺伝暗号の縮退の結果として、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66又は配列番号:68に示すポリペプチド、及び機能的に等価なポリペプチドをコードする、異なる配列を有することができる。

【0048】

そのような核酸分子には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：成熟ポリペプチドのみのためのコード配列；成熟ポリペプチドのためのコード配列及び付加コード配列（例えばリーダー配列又は分泌配列（例えばプロ-、プレ-、又はプレプロ-ポリペプチド配列）をコードする配列）；前述の付加コード配列を含むか、又は含まない成熟ポリペプチドのコード配列であって、更なる付加的非コード配列と一緒に有する前記コード配列（前記更なる付加的非コード配列は非コード5'及び3'配列を含み、例えば転写されるが、翻訳されない転写（終了シグナルを含む）、リボソーム結合及びmRNAの安定性で役割を果たす配列が含まれる）。前記核酸分子はまた、付加的なアミノ酸（例えば付加的な機能を提供するもの）をコードする付加的な配列を含むことができる。

本発明の第二及び第三の特徴の核酸分子はまた、本発明の第一の特徴のポリペプチドの断片又はその機能的等価物をコードすることができる。そのような核酸分子は、天然に存在する変種、例えば天然に存在する対立遺伝子座変種でもよいが、又は前記分子は天然に存在することが知られていない変種であってもよい。前記核酸分子の天然に存在しないそのような変種は変異導入技術（核酸分子、細胞又は生物に応用できる変異導入技術を含む）によって作製することができる。

この点に関する変種では、ヌクレオチド置換、欠失又は挿入によって前述の核酸分子とは異なる変種が存在する。前記置換、欠失又は挿入は1つ以上のヌクレオチドを含むことができる。前記変種は、コード領域又は非コード領域又はその両方で変異を有することができる。コード領域における変異は、保存的又は非保存的アミノ酸置換、欠失又は挿入を生じることができる。

本発明の核酸分子はまた、多様な理由のために、当分野で一般的に知られている方法（遺伝子生成物（ポリペプチド）のクローニング、プロセッシング及び/又は発現の改変を含む）を用いて操作することができる。ランダム断片化並びに遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのPCRによる再アッセンブリーによるDNAシャッフリングは、前記ヌクレオチド配列の操作に用いることができる技術として含まれる。位置特異的変異導入を用いて新規な制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを改変し、コドン優先性を変化させ、スプライス変種を生成し、変異を導入することができる、云々。

【0049】

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする核酸分子を異種配列に連結し、その結果、一体となった核酸分子は融合たんぱく質をコードすることができる。そのような合体核酸分子は本発明の第二又は第三の特徴に含まれる。例えば、前記ポリペプチドの活性の阻害物質についてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、そのような合体核酸分子を用いて、市販の抗体によって認識することができる融合タンパク質を発現させることは有用であろう。融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチド配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作することができ、それによって、前記ポリペプチドを異種タンパク質から切断して精製することができる。

本発明の核酸分子はまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と部分的に相補的であり、したがって前記コード核酸分子とハイブリダイズする（ハイブリダイゼーション）アンチセンス分子を含む。当業者には公知のように、そのようなアンチセンス分子（例えばオリゴヌクレオチド）を設計して、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、これと特異的に結合して転写を妨げることができる（例えば以下を参照されたい：J.S. Cohen 1989, Trends in Pharm. Sci. 10:435 ; Okano 1991, J. Neurochem. 56:560 ; O'Connor J. Neurochem. 56:560(1991) ; Lee et al. Nucleic Acids Res. 6:3073(1979) ; Cooney et al. 1998, Science 241:456 ; Dervan et al. 1991, Science 251:1360)

本明細書で用いられる、“ハイブリダイゼーション”という用語は、水素結合によって2つの核酸分子が互いに結合することを指す。典型的には、1つの分子が固体支持体に固定され、他方は溶液中で遊離しているであろう。続いて、この2つの分子は、水素結合に適した条件下で互いに接触できるように配置される。この結合に影響を与える因子には以下が含まれる：溶媒のタイプ及び体積；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液相分子の固体支持体との非特異的結合を阻止する薬剤（デンハルト試薬又はBLOTTO）；前記分子の濃度；分子の結合速度を高める化合物の使用（硫酸デキストラン又はポリエチレングリコール）；及びハイブリダイゼーション後の洗浄条件のストリンジェンシー（上掲書（Sambrook et al.）を参照されたい）。

【0050】

標的分子と完全に相補的な分子のハイブリダイゼーションの阻害は、当分野で公知のように（例えば上掲書（Sambrook et al.）を参照されたい）ハイブリダイゼーションアッセイを用いて調べることができる。実質的に相同な分子は、種々のストリンジェンシー条件下で完全に相同な分子の標的分子との結合に競合し、これを阻害するであろう（前記は以下によって教示されている：G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987, Methods Enzymol. 152:399-407 ; A.R. Kimmel, 1987, Methods Enzymol. 152:507-511）。

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の結合よりも非常に類似する分子の結合に有利なハイブリダイゼーション反応における条件を指す。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、50%のホルムアミド、5xのSSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5xのデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20 µg/mLの変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中で42 にて一晩のインキュベーション、続いて0.1xのSSC、約65 におけるフィルターの洗浄と規定される。低ストリンジェンシー条件は、35 におけるハイブリダイゼーション反応の実施を含む（上掲書（Sambrook et al.）を参照されたい）。好ましくは、ハイブリダイゼーションに使用される条件は高ストリンジェンシー条件である。

【0051】

本発明のこの特徴の好ましい実施態様は、INSP181ポリペプチド（配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66及び配列番

号:68)をコードする核酸分子とそれらの全長にわたって少なくとも70%同一である核酸分子、及びこれら核酸分子と実質的に相補的な核酸分子である。好ましくは、本発明のこの特徴の核酸分子は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67又は配列番号:69に示される配列を有する核酸分子とその全長にわたって少なくとも80%同一である領域を含むか、又は前記と相補的な核酸分子である。これに関しては、それらの全長にわたって、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、98.5%、99%又は99%同一である核酸分子が特に好ましい。これに関して好ましい実施態様は、INSP181ポリペプチド、INSP181成熟ポリペプチド、INSP181-SV1ポリペプチド、INSP181-SV1成熟ポリペプチド、INSP181 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181多形ポリペプチド、INSP181-SV1 N92T多形ポリペプチド、成熟INSP181 N92T多形ポリペプチド、INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド、成熟INSP181-SV1 G114S多形ポリペプチド、又はリポカリンドメインINSP181ポリペプチドと同じ生物学的機能又は活性を保持するポリペプチドをコードする核酸分子である。

10

【0052】

本発明はまた、以下の工程を含む、本発明の核酸分子を検出す方法を提供する：(a)本発明の核酸プローブをハイブリダイズする条件下で生物学的サンプルと接触させて二重鎖複合体を形成する工程；及び(b)形成されたそのような二重鎖複合体の一切を検出する工程。

20

本発明にしたがって利用することができるアッセイとの関係でさらに下記で考察するように、上記に記載した核酸分子は、RNA、cDNA又はゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用し、完全長cDNA及びINSP181ポリペプチドをコードするゲノムクローンを単離することができ、さらにこれらポリペプチドをコードする遺伝子と高い配列類似性を有する相同遺伝子又はオルソログス遺伝子のcDNA及びゲノムクローンを単離することができる。

これに関しては、当分野で公知の他の技術の中でとりわけ下記の技術を利用することができ、これらは例示のために下記で考察する。DNAの配列決定および解析のための方法は周知であり、当分野で一般的に利用可能である。実際、それらは本明細書で考察する本発明の実施態様の多くを実施するために用いることができる。そのような方法では、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、シークエナーゼ(US Biochemical Corp. Cleveland, OH)、Taqポリメラーゼ(Perkin Elmer)、熱耐性T7ポリメラーゼ(Amersham, Chicago, IL)、又はポリメラーゼ及びプルーフリーディングエキソヌクレアーゼ(例えばGibco/BRL(Gaithersburg, MD)が市販するELONGASE増幅系で見出されるもの)の組合せのような酵素を用いることができる。好ましくは、配列決定プロセスは以下のような機械を用いて自動化することができる：Hamilton Micro Lab2200(Hamilton, Reno, NV)、Peltier Thermo Cycler(PTC200; MJ Research, Watertown, MA)並びにABI Catalyst及び373及び377D NA Sequencers(Perkin Elmer)。

30

40

【0053】

INSP181ポリペプチドの機能と等価な機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子を単離するある方法は、当分野で公知の標準的方法を用いて、天然のプローブ又は人工的に設計したプローブによりゲノムDNA又はcDNAを探索することである(例えば以下を参照されたい：“Current Protocols in Molecular Biology”, Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992)。適切なコード遺伝子(配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15及び配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25及び配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35及び配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45及び

50

配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55及び配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65及び配列番号:67、配列番号:69)由来の核酸配列に一致するか、又は前記と相補的な、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプローブが特に有用なプローブである。そのようなプローブは、解析によって検出することができる試薬で標識され、それらの同定を促進することができる。有用な試薬には、放射性同位元素、蛍光色素及び検出可能な生成物の形成を触媒することができる酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプローブを用いて、当業者は、ゲノムDNAの相補的なコピー、cDNA又はRNAポリヌクレオチド(前記はヒト、哺乳動物又は他の動物由来の注目するタンパク質をコードする)を単離し、関連する配列(例えば前記ファミリー、タイプ及び/又はサブタイプのさらに別のメンバー)について、前記のような供給源をスクリーニングすることができる。

10

【0054】

多くの事例で、単離されたcDNAは、ポリペプチドをコードする領域が短く切断されている(通常は5'末端で)という点で不完全であろう。完全長のcDNAを得るために、又は短いcDNAを伸長させるためにいくつかの方法が利用可能である。前記のような配列は、部分的なヌクレオチド配列を利用し、さらに上流の配列(例えばプロモーター及び調節エレメント)を検出するために当分野で公知の種々の方法を用いて伸長させることができる。例えば、利用することができるある方法は、cDNA末端迅速増幅法(Rapid Amplification of cDNA: RACE)を基にしている(例えば以下を参照されたい:Frohman et al. 1988, PNAS US A 85:8998-9002)。マラソン(Marathon(商標))テクノロジー(Clontech Laboratories Inc.)によって実施されるこの技術の最近の改変により、例えばより長いcDNAの検索が顕著に単純化された。わずかに異なる技術("制限部位"PCRと称される)はユニバーサルプライマーを用い、既知の遺伝子座に隣接する未知の核酸配列を回収する(G. Sarkar, 1993, PCR Methods Applic. 2:318-322)。インバースPCRもまた、公知領域に基づくダイバージェントプライマーを用いて配列を増幅又は伸長させるために用いることができる(T. Triglia et al. 1988, Nucleic Acids Res. 16:8186)。利用できるまた別の方法は捕捉PCRであり、前記はヒト及び酵母人工染色体DNA中の公知の配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む(M. Lagerstrom et al. 1991, PCR Methods Applic., 1:111-119)。未知の配列を回収するために利用できるまた別の方法は、Parkerらの方法である(J.D. Parker et al. 1991, Nucleic Acids Res. 19:3055-3060)。さらにまた、PCR、ネストプライマー及びプロモーターファインダー(PromoterFinder(商標))ライブラリーをゲノムDNAウォーキングのために用いてもよい(Clontech, Palo Alto, CA)。この工程ではライブラリー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。

20

30

完全長cDNAをスクリーニングするとき、より大きなcDNAを含むようにサイズ選別したライブラリーを使用することが好ましい。さらにまた、ランダムプライミングされたライブラリーが、それらは遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含むという点で好ましい。ランダムにプライミングされたライブラリーの使用が、オリゴd(T)ライブラリーは完全長cDNAをもたらさないという状況においては特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、5'非転写調節領域への配列の伸張のために有用であろう。

40

【0055】

本発明のある実施態様では、本発明の核酸分子を染色体位置決定のために用いることができる。この技術では、核酸分子は、個々のヒト染色体上の特定の位置を特異的に標的とし、これとハイブリダイズすることができる。本発明にしたがって、染色体に対して関連する配列をマッピングすることは、それら配列と遺伝子関連疾患との相関性確認で重要な工程である。いったん配列が染色体上の正確な位置に対してマッピングされたら、染色体上での配列の物理的な位置を遺伝子地図データと相関させることができる。そのようなデータは、例えば以下で見出される(V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man、ジョーンズホプキンス大学ウェルヒメディカルライブラリーからオンラインで入手できる)。

50

同じ染色体の領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係は、続いてリンケージ解析により識別される（物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝）。これにより、ポジショナルクローニング又は他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子について探索を行っている研究者に貴重な情報が提供される。いったん遺伝的リンケージによって特定のゲノム領域に疾患又は症状が大雑把に位置決定されたら、前記領域にマッピングされる任意の配列が更なる調査のための関連遺伝子又は調節遺伝子となる。前記核酸分子はまた、転座、逆位などによる染色体上の位置の相違を正常個体、キャリア個体又は罹患個体間で検出するために用いることができる。

本発明の核酸分子はまた組織内位置決定のために貴重である。そのような技術は、それらをコードするmRNAを検出することによって組織における前記ポリペプチドの発現パターンの決定を可能にする。これらの技術には、*in situ*ハイブリダイゼーション技術及びヌクレオチド増幅技術（例えばPCR）が含まれる。これらの研究から得られる結果は、生物体内における前記ポリペプチドの正常機能の指標を提供する。さらにまた、mRNAの正常な発現パターンと変異遺伝子によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、疾患における変異遺伝子の役割についての貴重な洞察を提供する。そのような不適切な発現は時間的、空間的又は定量的性質を有し得る。

【0056】

遺伝子サイレンシングアプローチもまた、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内因性発現をダウンレギュレートするために行うことができる。RNA干渉（RNAi）（S.M. Elbashir et al. 2001, Nature 411:494-498）は、用いることができる配列特異的転写後遺伝子サイレンシングの一方法である。短いdsRNAオリゴヌクレオチドが、*in vitro*で合成され、細胞内に導入される。これらdsRNAオリゴヌクレオチドの配列特異的結合は、標的mRNAの分解、標的タンパク質発現の低下又は除去の引き金となる。

上記で評価した遺伝子サイレンシングアプローチの有効性はポリペプチド発現の測定により（例えばウェスタンブロッティングによる）判定することができ、さらにRNAレベルではタックマン（TaqMan）による方法を用いることができる。

本発明のベクターは本発明の核酸分子を含み、前記はクローニングベクター又は発現ベクターであり得る。本発明の宿主細胞は原核細胞でも真核細胞でもよい（前記は本発明のベクターで形質転換、トランスフェクト又は形質導入されている）。

本発明のポリペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中で前記ポリペプチドのコード核酸分子の発現によって組換え形態で調製され得る。そのような発現方法は、当業者に周知であり、例えば以下に詳細に記載されている：Sambrook et al.（上掲書）及びFernandez & Hoeffler（1998, eds. “Gene expression systems. Using nature for the art of expression”. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto）。

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを調製するために核酸分子の維持、増殖又は発現に適した任意の系を用いることができる。多様な周知で公知の技術、例えば上掲書（Sambrook et al.）に記載されたようなもののいずれかによって、適切なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。一般的には、コード遺伝子は、コントロールエレメント（例えばプロモーター、リボソーム結合部位（細菌での発現の場合）及び場合によってオペレーター）の制御下に置かれ、それによって所望のポリペプチドをコードするDNA配列が形質転換宿主細胞内でRNAに転写される。

【0057】

適切な発現系の例は、例えば染色体系、エピソーム系及びウイルス由来系を含み、例えば以下に由来するベクターが含まれる：細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス（例えばバキュロウイルス、パポバウイルス（例えばSV40）、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、擬似狂犬病ウイルス及びレトロウイルス）又は前記の組合せ、例えばプラスミドとバクテリオファージ遺伝エレメント（コスミド及びファージミドを含む）に由来するもの。ヒト人工染色体（HAC）もまた、プラスミド中に含まれ発現され得るDNAよ

10

20

30

40

50

りも大型の断片DNAのデリバーに用いることができる。以下のベクター、pCR4-TOPO-INSP181、pCR4-TOPO-INSP181-SV1、pDONR221-INSP181-6HIS、pDONR221-INSP181SV1-6HIS、pEAK-INSP181-6HIS、pEAK-INSP181SV1-6HIS、pDEST12.2-INSP181-6HIS及びpDEST12.2-INSP181SV1-6HISが、INSP181に関連して本発明の特徴にしたがって使用される適切なベクターの好ましい例である。

特に適切な発現系には微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、タバコモザイクウイルス（TMV））又は細菌発現ベクター（例えばTi又はpBR322プラスミド）で形質転換感染させた植物細胞系；又は動物細胞系が含まれる。無細胞翻訳系を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の宿主細胞への導入は、多くの標準的な実験室用マニュアル（例えばDavis et al. 1986, Basic Methods in Molecular Biology；及びSambrook et al. 上掲書）に記載されている方法によって実施することができる。特に適切な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング、弾道導入又は感染が含まれる（以下を参照されたい：Sambrook et al. 1989（上掲書）；Ausubel et al. 1991（上掲書）；Spector, Goldman & Leinwald, 1998）。真核細胞では、発現系は系の要求に応じて一過性でも（例えばエピソーム系）又は永久性（染色体組込み）であってもよい。

【0058】

コード核酸分子は、例えば翻訳されたポリペプチドの小胞体腔への又は細胞周囲間隙への又は細胞外環境への分泌のために、制御配列をコードする配列、例えばシグナルペプチド又はリーダー配列を含んでいても、又は含んでなくてもよい。これらのシグナルはポリペプチドにとって内在性であってもよいが、またそれらは異種シグナル配列であってもよい。リーダー配列は細菌宿主により翻訳後プロセッシングで除去され得る。

制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に対してポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが所望され得る。調節配列の例は、化学的又は物理的的刺激（調節性化合物の存在を含む）、種々の温度又は代謝条件に应答して遺伝子の発現を増減させる配列である。調節配列は、ベクターの非翻訳領域にあるもの、例えばエンハンサー、プロモーター並びに5'及び3'非翻訳領域である。これらは宿主細胞タンパク質と相互作用し、転写及び翻訳を遂行することができる。そのような調節配列はそれらの強度及び特異性において変動し得る。利用されるベクター系及び宿主に応じて、多数の適切な転写及び翻訳エレメント（構成的プロモーター、誘導性プロモーターを含む）を用いることができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、誘導性プロモーター（例えばブルスクリプトファージミド（Stratagene, LaJolla, CA）又はpSport1（商標）プラスミド（Gibco BRL）の）ハイブリッドlacZプロモーターなどを用いることができる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターを昆虫細胞で用いることができる。植物細胞（例えば熱ショック、RUBISCO及び貯蔵タンパク質遺伝子）又は植物ウイルス（例えばウイルスプロモーター又はリーダー配列）に由来するプロモーター又はエンハンサーをベクターにクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来のプロモーター又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。多数の配列コピーを含む細胞株を作製する必要がある場合は、SV40又はEBVを土台にしたベクターを適切な選択性マーカーとともに用いることができる。

【0059】

発現ベクターは、個々の核酸コード配列が適切な調節配列とともにベクター内に配置されるように構築される。調節配列に対するコード配列の配置及び方位は、コード配列が前記調節配列の“制御”下で転写されることのできるようなものである。すなわち、前記制

10

20

30

40

50

御配列でDNA分子と結合するRNAポリメラーゼが前記コード配列を転写する。いくつかの事例では、適切な向きで制御配列に前記配列を結合させることができるように（すなわちリーディングフレームを維持するために）、前記配列を改変する必要があるかもしれない。

前記制御配列及び他の調節配列は、ベクターに挿入する前に核酸コード配列と連結することができる。また別には、前記コード配列は、既に制御配列及び適切な制限部位を含む発現ベクターに直接クローニングすることができる。

組換えポリペプチドの長期的な高収量産生のためには安定な発現が好ましい。例えば、注目するポリペプチドを安定的に発現する細胞株を、ウイルス起源の複製及び/又は内因性発現エレメント及び選別可能マーカー遺伝子を同じ又は別個のベクターに含み得る発現ベクターを用いて形質転換することができる。前記ベクターの導入に続いて、前記細胞を選択培養液に切り替える前に、細胞を1-2日間富裕培養液で増殖させることができる。選別可能マーカーの目的は選択に対する耐性を付与するためであり、前記マーカーの存在は、導入された配列を発現させることができる細胞の増殖及び回収を可能にする。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンを前記細胞タイプに適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0060】

発現のために宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当分野では公知であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から入手できる、以下を含む（ただしこれらに限定されない）多くの哺乳動物細胞株が含まれる：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、サル腎（COS）細胞、C127、3T3、BHK、HE K293、ボウズメラノーマ細胞及びヒト肝細胞癌（例えばHep G2）細胞並びに多数の他の細胞株。

パキユロウイルス系では、パキユロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料がキットの形（“MaxBac”キット）でとりわけインビトロジェン（Invitrogen, San Diego, CA）から市販されている。これらの技術は一般的に当業者には公知であり、以下に完全に記載されている：Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)。この系で使用される特に適切な宿主細胞には、例えばショウジョウバエS2及びスポドプテラSf9細胞が含まれる。

当分野で公知の多くの植物細胞培養および完全な植物遺伝子発現系が存在する。適切な植物細胞遺伝子発現系の例にはUS5,693,506；US5,659,122及びUS5,608,143に記載されたものが含まれる。植物細胞培養での遺伝子発現の更なる例は以下に記載されている：Zenk, 1991, *Phytochemistry* 30:3861-3863。

特に、プロトプラストを単離し、これを培養して完全な再生植物を得て、それによって移入された遺伝子を含む完全な植物が得られる全ての植物を利用することができる。特に、サトウキビ、サトウダイコン、綿花、果実及び他の樹木、豆類及び野菜の全ての主要な種を含む（ただしこれらに限定されない）培養細胞又は組織から全ての植物を再生することができる。

【0061】

特に好ましい細菌宿主細胞の例には連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌（*E. coli*）、ストレプトミセス属及び枯草菌（*Bacillus subtilis*）細胞が含まれる。

真菌類での発現のために特に適切な宿主細胞の例には酵母細胞（例えば*S. cerevisiae*）及びアスペルギルス細胞が含まれる。

形質転換細胞を回収するために用いることができる多数の選別系が当分野で公知である。前記の例には、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（M. Wigler et al. 1977, *Cell* 11:223-32）及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（L. Lowy et al. 1980, *Cell* 22:817-23）遺伝子が含まれ、前記はそれぞれ tk^- 又は $aprt^{+/}$ 細胞を利用することができる。

さらにまた、選別のための基準として例えば以下のように抗代謝薬、抗生物質又は除草剤耐性を用いることができる：メトトレキセート耐性を付与するジヒドロフォレートレダクターゼ（DHFR）（M. Wigler et al. 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70）；np

10

20

30

40

50

t、アミノグリコシド系のネオマイシン及びG-418に対する耐性を付与する（F. Colbere-G arapin et al. 1981, J. Mol. Biol. 150:1-14）；及びals又はpat、それぞれクロロスル フロン及びホスフィノトリシニアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する。さら に別の選別可能な遺伝子が文献に記載されており、前記の例は当業者には明白であろう。

マーカー遺伝子発現の有無は注目の遺伝子もまた存在することを示唆するが、その存在 及び発現は確認する必要がある。例えば、注目する配列がマーカー遺伝子配列内に挿入さ れるならば、前記適切な配列を含む形質転換細胞はマーカー遺伝子機能が存在しないこと によって識別することができる。また別には、マーカー遺伝子をただ1つのプロモーター の存在下で本発明のポリペプチドとタンデムに配置することができる。誘導又は選別に 応答するマーカー遺伝子の発現は通常、前記タンデム遺伝子の発現も同様に示す。

【0062】

また別には、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、前記ポリペプチドを 発現する宿主細胞は、当業者に公知の多様な方法によって同定することができる。これら の方法には、DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション及びタンパク質バイオアッセイ、 例えば蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）又は免疫アッセイ技術（例えば酵素結合免 疫吸着アッセイ（ELISA）及び放射性免疫アッセイ（RIA））が含まれるが、ただしこれら に限定されない。前記方法は、核酸又はタンパク質の検出及び/又は定量のために膜系、 溶液系、チップ系技術を含む（以下を参照されたい：R. Hampton et al. 1990, Serologi cal Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN；及びD.E. Maddox et al. 1983, J. Exp. Med. 158:1211-1216）。

多様な標識及びそれらの結合技術が当業者には公知であり、種々の核酸アッセイ及びア ミノ酸アッセイで用いることができる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関 連する配列の検出のために標識されたハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプローブ を生成する手段には、オリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識又は標識ポリヌ クレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。また別には、本発明のポリペプチドをコードす る配列はmRNAプローブの産生のためにベクターにクローニングしてもよい。そのようなベ クターは当分野で公知であり、市販されている。前記は、適切なRNAポリメラーゼ（例え ばT7、T3又はSP6）及び標識ヌクレオチドを添加することによって、in vitroでのRNAプロ ープの合成に用いることができる。これらの方法は、多様な市販キット（Pharmacia & Up john, Kalamazoo, MI；Promega, Madison, WI；及びU.S. Biochemical Corp., Clevelan d, OH）を用いて実施することができる。

【0063】

検出を容易にするために用いることができる適切なレポーター分子又は標識には、放射 性核種、酵素並びに蛍光性、化学発光性薬剤又は発色剤が、基質、補助因子、阻害剤、磁 性粒子などと同様に含まれる。

本発明の核酸分子もまた、トランスジェニック動物、特にげっ歯類動物の作製に用いる ことができる。そのようなトランスジェニック動物は本発明の更なる特徴を構成する。前 記は、体細胞の改変によって局所的に実施するか、又は生殖系列療法によって実施し遺伝 可能な改変を取り込ませることができる。そのようなトランスジェニック動物は、本発明 のポリペプチドの調節物質として有効な薬剤分子のための動物モデルの作製で特に有用で あり得る。

前記ポリペプチドは、組換え細胞培養から以下を含む周知の方法によって回収すること ができる：硫酸又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフ ィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用によるクロマトグラフィー、 アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及びレ シチンクロマトグラフィー。高速液体クロマトグラフィーは精製に特に有用である。ポ リペプチドが単離及び精製の間に変性したときは、タンパク質をリフォールディングさせ るための周知の技術を用いて、活性な構造を再生することができる。

所望にしたがってタンパク質の精製を促進するために特殊化したベクター構築物を用い

ることにもできる。前記は、本発明のポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させることによって実施することができる。そのような精製促進ドメインの例には、金属キレートペプチド（例えば固定金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール）、固定された免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、及びFLAGS伸長/アフィニティー精製系で利用されるドメイン（Immunex Corp., Seattle, WA）が含まれる。切断可能なリンカー配列（例えばXA因子又はエンテロキナーゼに対して特異的なもの）（Invitrogen, San Diego, CA）を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に含有させることによって精製を促進してもよい。そのような発現ベクターの一つは、チオレドキシシン又はエンテロキナーゼ切断部位に先行するいくつかのヒスチジン残基と融合した本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。前記ヒスチジン残基はIMAC（Porathら（J. Porath et al. 1992, Prot. Exp. Purif. 3:263-281）が記載した固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー）による精製を促進し、一方、チオレドキシシン又はエンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質から本発明のポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターに関する考察は以下に提供されている：D.J. Kroll et al. 1993, DNA Cell Biol. 12:441-453。

10

20

30

40

50

【0064】

前記ポリペプチドをスクリーニングアッセイで使用するために発現させる場合は、一般的には、前記が発現される宿主細胞の表面で前記ポリペプチドを産生させるのが好ましい。この場合には、宿主細胞は、例えば蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）又は免疫アフィニティー技術のような技術を用いるスクリーニングアッセイでの使用の前に採集することができる。前記ポリペプチドが培養液中に分泌される場合は、前記培養液は、発現ポリペプチドの回収及び精製のために回収することができる。ポリペプチドが細胞内で産生される場合は、細胞は、ポリペプチドを回収する前に先ず溶解させねばならない。

上記に示したように、本発明はまた、新規な標的及び薬剤候補物質又は先導物質のスクリーニングのための方法を提供する。これらのスクリーニング方法には結合アッセイ及び/又は機能的アッセイが含まれ、これらはin vitroで、細胞系で、又は動物で実施することができる。

これに関しては、本発明の具体的な目的は、リポカリン関連疾患の治療又は予防を目的とする候補薬剤をスクリーニングするための標的としてINSP181ポリペプチドを使用することにある。

本発明のまた別の目的は、生物学的に活性な化合物を選別する方法にあり、前記方法は、候補化合物をINSP181遺伝子又はポリペプチドと接触させる工程及び前記遺伝子又はポリペプチドと結合する化合物を選別する工程を含む。

本発明のさらに他の目的は、生物学的に活性な化合物を選別する方法にあり、前記方法は、INSP181ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞と候補化合物を接触させる工程及び前記INSP181ポリペプチドと前記細胞の表面で結合し、及び/又はINSP181ポリペプチドの活性を調節する化合物を選別する工程を含む。

“生物学的に活性な”化合物とは、対象で生物学的な活性、好ましくは治療的活性を有する任意の化合物、より好ましくはリポカリン活性を有する化合物、さらに好ましくはINSP181関連疾患を治療するために使用できる化合物、又はリポカリン関連疾患を治療する薬剤を開発するための先導物質として使用できる化合物を指す。“生物学的に活性な”化合物は、好ましくはINSP181の活性を調節する化合物である。

【0065】

上記の方法は、種々の装置及び条件（固定化試薬の使用を含む）を用いて実施ことができ、さらにリポカリン関連疾患モデル（例えば動物モデル）で前記選別された化合物の活性をアッセイする追加の工程を含むことができる。

好ましい選別化合物は、INSP181のアゴニスト、すなわちINSP181と結合しその内在性リガンドの活性を模倣することができる化合物である。

本発明の更なる目的は、生物学的に活性な化合物を選別する方法にあり、前記方法は、

テスト化合物を本発明のINSP181ポリペプチドとin vitroで接触させる工程、及び前記INSP181ポリペプチドの活性を調節する前記テスト化合物の能力を決定する工程を含む。

本発明の更なる目的は、生物学的に活性な化合物を選別する方法にあり、前記方法は、テスト化合物を本発明のINSP181遺伝子とin vitroで接触させる工程、及び前記INSP181遺伝子の発現を調節する、好ましくはその発現を刺激する前記テスト化合物の能力を決定する工程を含む。

また別の実施態様では、本発明は、活性な化合物、特に多発性硬化症又は関連疾患に対して活性を有する化合物をスクリーニング、選別又は同定する方法に関する。前記方法は、レポーター構築物を含む組換え宿主細胞とテスト化合物を接触させる工程（前記レポーター構築物はINSP181遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含む）、及び前記レポーター遺伝子の発現を調節する（例えば刺激また低下、好ましくは低下させる）テスト化合物を選別する工程を含む。

本発明のポリペプチドは、多様な薬剤スクリーニング技術のいずれかにおいて化合物ライブラリーをスクリーニングするために用いることができる。そのような化合物は、本発明の遺伝子の発現レベル、又は本発明のポリペプチドの活性を活性化（アゴナイズ）し、又は阻害（アンタゴナイズ）して、更なる本発明の特徴を構成することができる。好ましい化合物は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させるか、本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節するために有効である。

【0066】

アゴニスト又はアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、化学ライブラリー又は天然生成物の混合物から単離することができる。これらのアゴニスト又はアンタゴニストは、天然又は改変された基質、リガンド、酵素、レセプター又は構造的若しくは機能的模倣物であり得る。そのようなスクリーニング技術の適切な概覧のためには以下の文献を参照されたい：Coligan et al. *Current Protocols in Immunology* (1991) 1(2):Chapter 5.

標的遺伝子又はポリペプチドとの結合は、前記標的の活性を調節する、したがって対象者でリポカリン関連疾患に至る経路に影響を与える化合物の能力に関する指標を提供する。結合の決定は多様な技術によって、例えば候補化合物の標識によって、標識したリファレンスリガンドとの競合などによって実施することができる。in vitro結合アッセイのためには、前記ポリペプチドは、本質的に純粋な形態で、懸濁状態で、支持体に固定されて、又は膜（無傷の細胞、膜調製物、リボソームなど）で発現された状態で用いることができる。

活性の調節には、INSP181レセプターの表面発現の刺激、前記レセプターのマルチマー形成の調節（例えば他のサブユニットとのマルチマー複合体の形成）などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。アッセイで用いられる細胞は、任意の組換え細胞（すなわちINSP181ポリペプチドをコードする組換え核酸を含む任意の細胞）又は、内因性INSP181ポリペプチドを発現する任意の細胞であろう。そのような細胞の例には原核細胞（例えば細菌）及び真核細胞（例えば酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。具体的な例には、大腸菌、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、ハンセヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、クルイベロミセス（*Kluyveromyces*）又はサッカロミセス（*Saccharomyces*）属の酵母、哺乳動物細胞株（例えばVero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など）および、哺乳動物細胞の初代又は樹立細胞培養物が含まれる（例えば線維芽細胞、胎児細胞、上皮細胞、神経系細胞及び脂肪細胞などから作製される）。

【0067】

良好なアンタゴニストである可能性が極めて高い化合物は、その結合に際して本発明のポリペプチドの生物学的作用を誘発することなく、前記ポリペプチドと結合する分子である。潜在的なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドと結合し、それによってその活性を阻害又は消滅させる小有機分子、ペプチド、ポリペプチド及び抗体が含まれる。この

態様では、正常な細胞結合分子と前記ポリペプチドとの結合が阻害され、その結果前記ポリペプチドの正常な生物学的活性を妨げることができる。

そのようなスクリーニング技術で用いられる本発明のポリペプチドは、溶液中で遊離していても、固体支持体に固定されていても、細胞表面に保持されていても、又は細胞内に存在していてもよい。一般的には、そのようなスクリーニング方法は、前記ポリペプチドを発現し、結合又は機能的応答の刺激若しくは阻害を観察するためにテスト化合物と接触させる適切な細胞又は細胞膜の使用を含むことができる。続いてテスト化合物と接触させた細胞の機能的応答を、テスト化合物と接触させなかったコントロール細胞と比較する。そのようなアッセイによって、前記ポリペプチドの活性化によって発生するシグナルを前記テスト化合物がもたらすか否かを適切な検出系を用いて判定することができる。活性化の阻害因子は一般的には公知のアゴニストの存在下でアッセイし、さらにテスト化合物の存在下における前記アゴニストによる活性化に対する影響を観察する。

【0068】

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

(a) 本発明の第一の特徴のポリペプチドを（場合により、その表面で）発現する細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下でスクリーニングされるべき化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、化合物と前記ポリペプチドとの結合に応答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されているポリペプチドである、前記工程；および

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

本明細書に記載するアッセイタイプで検出可能なシグナルを発生させる方法は当業者には公知であろう。具体的な例は、本発明のポリペプチド又は断片（例えばLBD）をGAL4 DNA結合ドメインと融合された状態で発現する構築物を、レポータープラスミド（前記の例はpFR-Luc（Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands）である）とともに同時トランスフェクトすることである。このプラスミドはGAL4結合部位の5つのタンデムリピートをもつ合成プロモーターを含む（ルシフェラーゼ遺伝子の発現を制御する）。潜在的なリガンドが細胞に添加されると、前記リガンドはGAL4-ポリペプチド融合物と結合し、ルシフェラーゼ遺伝子の転写を誘導する。ルミネッセンスリーダーを用いて、ルシフェラーゼ発現レベルをその活性によってモニターすることができる（例えば以下を参照されたい：Lehman et al. 1995, JBC 270:12953；Pawar et al. 2002, JBC 277:39243）。

【0069】

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

(a) 標識化合物又は未標識化合物を、任意の固体支持体（例えばビーズ、プレート、マトリックス支持体、チップ）に固定した前記ポリペプチドと接触させ、前記標識を測定することによって又は化合物それ自体の存在によって前記化合物を検出する工程；又は

(b) 細胞膜に前記ポリペプチドを人工的に係留する手段によって、又は化合物と前記ポリペプチドとの結合に応答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合させたキメラレセプターを構築することによって、細胞表面に前記ポリペプチドを発現する細胞を、前記ポリペプチドとの結合が許容される条件下でスクリーニングされるべき化合物と接触させる工程；及び

(c) 化合物とポリペプチドとの相互作用から生じたシグナルのレベルを前記化合物の非存在下におけるシグナルのレベルと比較することによって、前記化合物が前記ポリペプチドと結合し、これを活性化又は阻害したか否かを決定する工程。

例えば、ペプチドコアクチベーターの存在下で前記ポリペプチドと結合したりリガンドのFRET検出のような方法を用いることができる（Norris et al. Science, 1999, 285:744）。

。

10

20

30

40

50

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

(a) 前記ポリペプチドを(場合により、その表面で)発現する細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下でスクリーニングされるべき化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、化合物と前記ポリペプチドとの結合に应答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されたペプチドである、前記工程；および

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用から生じるシグナルのレベルを前記化合物の非存在下におけるシグナルのレベルと比較することによって、前記化合物が前記ポリペプチドと結合してこれを活性化又は阻害するか否かを決定する工程。

更に別の好ましい実施態様では、上記記載の一般的な方法は、さらに前記ポリペプチドのための標識又は未標識リガンドの存在下でアゴニスト又はアンタゴニストの同定を実施する工程をさらに含むことができる。

【0070】

また別の実施態様では、本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は以下の工程を含む：本発明のポリペプチドを発現する細胞(及び場合によって本発明のポリペプチドをその表面に有する細胞)又はそのようなポリペプチドを含む細胞膜とリガンドとの結合の阻害を、リガンドと前記ポリペプチドとの結合を許容する条件において、候補化合物の存在下で決定し、前記ポリペプチドと結合したリガンドの量を決定する工程。リガンドの結合を低下させることができる化合物はアゴニスト又はアンタゴニストであると考えられる。好ましくは、リガンドは標識される。

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

(a) 本発明のポリペプチドを(場合により、細胞表面で)発現する細胞全体(まるごとの細胞)、又は本発明のポリペプチドを含む細胞膜と標識リガンドをインキュベートする工程；

(b) 前記細胞全体又は細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 工程(a)の標識リガンドと細胞全体又は細胞膜の混合物に候補化合物を添加し、前記混合物の平衡化を許容する工程；

(d) 工程(c)の後で細胞全体又は細胞膜に結合した標識リガンドの量を測定する工程；及び

(e) 工程(b)及び(d)で結合した標識リガンドの相違を比較する工程であって、工程(d)において結合を減少させる化合物をアゴニスト又はアンタゴニストであると考え、前記工程。

同様に、以下の工程を含む、ポリペプチドのアンタゴニスト又はアゴニスト化合物についてスクリーニングする方法が提供される：

(a) 任意の固体支持体若しくは細胞表面上の本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチドを含む細胞膜と標識リガンドをインキュベートする工程；

(b) 前記固体支持体、細胞全体又は細胞膜上のポリペプチドと結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 工程(a)の標識リガンド及び固体支持体上のポリペプチド、細胞全体又は細胞膜の混合物に候補化合物を添加し、前記混合物の平衡化を許容する工程；

(d) 工程(c)の後で固定ポリペプチド又は細胞全体若しくは細胞膜に結合した標識リガンドの量を測定する工程；及び

(e) 工程(b)及び(d)で結合した標識リガンドの相違を比較する工程であって、工程(d)において結合を減少させる化合物をアゴニスト又はアンタゴニストであると考え、前記工程。

【0071】

INSP181ポリペプチドは、用量依存態様で多様な生理学的及び病理学的プロセスを調節することが上記に記載したアッセイで見出すことができる。したがって、本発明のポリペ

10

20

30

40

50

プチドの“機能的等価物”には、上記記載のアッセイで同じ調節活性のいずれかを用量依存態様で示すポリペプチドが含まれる。用量依存活性の程度は本発明のポリペプチドのそれと同一である必要はないが、好ましくは、与えられた活性アッセイにおいて、前記“機能的等価物”は本発明のポリペプチドと比較して実質的に類似する用量依存性を示すであろう。

上記に記載のある種の実施態様では、単純な結合アッセイを用いることができる。このアッセイでは、ポリペプチドを保持している表面へのテスト化合物の粘着はテスト化合物に直接的又は間接的に結合させた標識の手段によって検出するか、又は標識競合物との競合を必要とする。また別の実施態様では、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、ポリペプチドと結合することができる中和抗体はテスト化合物と結合について特異的に競合する。この態様で、前記ポリペプチドに対して特異的な結合アフィニティーを有するいずれのテスト化合物の存在の検出にも前記抗体を用いることができる。

前記ポリペプチドをコードするmRNAの細胞内での産生に対する添加テスト化合物の影響を検出するためのアッセイもまた設計することができる。例えば、モノクローナル又はポリクローナル抗体を用い当分野で公知の標準的な方法によって、分泌又は細胞結合ポリペプチドレベルを測定するELISAを構築することができ、適切に操作した細胞又は組織の前記ポリペプチド産生を阻害又は強化することができる化合物についての探索のために用いることができる。続いてポリペプチドと被検化合物間での結合複合体の形成を測定することができる。

本発明の語に含まれるアッセイ方法は、過剰発現アッセイ又は削除アッセイで本発明の遺伝子及びポリペプチドを使用することを含む方法である。そのようなアッセイは、細胞内のこれら遺伝子/ポリペプチドのレベルを操作すること及び操作した細胞の生理学に対するこの操作の影響を判定することを含む。例えば、そのような実験は、特定の遺伝子/ポリペプチドが関係するシグナリング及び代謝経路の詳細を明らかにし、前記研究対象のポリペプチドが互いに影響しあうポリペプチドの実体に関する情報をもたらし、関連遺伝子及びタンパク質を調節する方法に関する手がかりを提供する。

【0072】

用いることができる薬剤スクリーニングのためのまた別の技術は、注目のポリペプチドに対して適切な結合アフィニティーを有する化合物の高処理スクリーニングを提供することができる（国際特許出願WO84/03564を参照されたい）。この方法では、大量の小さな種々のテスト化合物を固体支持層上で合成し、続いて前記を本発明のポリペプチドと反応させ洗浄する。ペプチドを固定する一つの方法は、非中和抗体を用いることである。続いて結合ポリペプチドを当分野で周知の方法を用いて検出することができる。上述の薬剤スクリーニング技術で使用するために、精製ポリペプチドはまたプレート上に直接被覆することができる。

本発明のポリペプチドを用い、当分野で公知の標準的なレセプター結合技術、例えばリガンド結合アッセイ及び架橋アッセイを介して膜結合又は可溶性レセプターを同定することができる。前記アッセイでは、ポリペプチドは放射活性同位体で標識されるか、化学的に改変されるか、又はその検出若しくは精製を促進するペプチド配列と融合され、さらに仮想的レセプターの供給源（例えば細胞組成物、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、又は体液）とインキュベートされる。結合効率は、生物物理学的技術（例えば表面プラズモン共鳴及び分光解析）を用いて測定することができる。結合アッセイはレセプターの精製又はクローニングのために用いることができるが、また、前記ポリペプチドとそのレセプターとの結合と競合するアゴニスト及びアンタゴニストを同定することもできる。スクリーニングアッセイを実施する標準的な方法は当分野では周知である。

【0073】

また別の実施態様では、本発明は、免疫関連疾患治療用INSP181ポリペプチドアゴニスト又は刺激物質を単離又は精製するために、INSP181ポリペプチド又はその断片（したがって前記断片は好ましくはINSP181遺伝子特異的断片である）を使用することに関する。

ここで前記アゴニスト又は刺激物質は以下から成る群から選択される：

- 1．特異的抗体又はその断片（以下を含む）：a）キメラ抗体、b）ヒト化抗体、又は完全にヒトの抗体、および、
- 2．二重特異性抗体又は多重特異性抗体、
- 3．単鎖（例えばscFv）抗体、
- 4．単一ドメイン抗体、
- 5．前記抗体に由来するペプチド-又は非ペプチド-模倣物、又は
- 6．抗体模倣物、例えばa）アンチカリン又はb）フィブロネクチン系結合分子（例えばトリネクチン又はアドネクチン）。

抗体からペプチド-又は非ペプチド-模倣物を作製することは当分野で公知である（Sara bovi et al. 1991；及びSaragovi et al. 1992）。 10

アンチカリンもまた当分野で公知である（Vogt et al. 2004）。フィブロネクチン系結合分子はUS6818418及びWO2004029224に記載されている。

さらにまた、テスト化合物は、多様な起源、性質及び組成物であり得る。前記は例えば任意の小分子、核酸、脂質、ペプチド、ポリペプチドであり、前記ポリペプチドには抗体（例えばキメラ抗体、ヒト化抗体又は完全にヒトの抗体又は抗体断片を含む）、それらに由来するペプチド-又は非ペプチド-模倣物と同様に二重特異性抗体若しくは多重特異性抗体、単鎖（例えばscFv）若しくは単一ドメイン抗体又は抗体模倣物（例えばアンチカリン又はフィブロネクチン系結合分子（例えばトリネクチン又はアドネクチン））などが含まれ、前記は単離形又は混合物又はその組合せである。 20

【0074】

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

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

上記で述べたように、本発明の多様な構成要素（すなわち、本発明の第一の特徴のポリペプチド、本発明の第二若しくは第三の特徴の核酸分子、本発明の第四の特徴のベクター、本発明の第五の特徴の宿主細胞、本発明の第六の特徴のリガンド、本発明の第七の特徴の化合物）が、疾患の治療又は診断で有用であり得ることが意図される。疾患の治療又は診断についての本発明の構成要素の有用性を判定するために、1つ以上の以下のアッセイを実施することができる。以下のアッセイのいくつかはテスト化合物がタンパク質/ペプチドであるとして言及されているが、当業者は以下のアッセイを容易に改変して本発明の他の成分もまた“テスト化合物”として用いることができることに留意されたい。 30

本発明はまた、本発明のポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物を適切な医薬担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、下記で詳しく述べるように、治療薬若しくは診断薬として、ワクチンとして、又は他の免疫原性組成物として適切であり得る。

本明細書で用いられる用語にしたがえば、ポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物を含む組成物[X]は、組成物中のX+Y（Yは不純物）の合計の少なくとも85質量%がXであるときに、不純物[Y]が“実質的に除かれている”。好ましくは、Xは、組成物中のX+Yの合計の少なくとも約90質量%を構成し、より好ましくは、少なくとも約95質量%、98質量%、98.5質量%又は99質量%ですらある。 40

【0075】

前記医薬組成物は、好ましくは治療的に有効な量の本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物を含む。本明細書で用いられる、“治療的に有効な量”という用語は、標的の疾患又は症状を治療、軽減若しくは予防するために、又は検出可能な治療的若しくは予防的効果を示すために必要な治療薬剤の量を指す。いずれの化合物についても、先ず初めに治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイ（例えば新形成細胞の細胞培養アッセイ）で、又は動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌ又はブタ）で評価することができ 50

る。前記動物モデルはまた、適切な濃度範囲及び投与ルートを決断するために用いることができる。続いて、そのような情報を用いて、ヒトでの投与のために有用な用量及びルートを決定する。

ヒト対象者のための厳密な有効用量は、症状の重篤度、対象者の一般的な健康状態、年齢、体重及び性別、食事、投与の時期及び頻度、薬剤の組合せ、反応の鋭敏性、並びに治療に対する耐性/応答に左右される。前記用量は日常的な検査によって決定することができる、臨床医の裁量の範囲内である。一般的には、有効用量は、0.01mg/kgから50mg/kg、好ましくは0.05mg/kgから10mg/kgであろう。組成物は患者に個々に投与してもよいが、また他の物質、薬剤又はホルモンと組み合わせで投与してもよい。

医薬組成物はまた、治療用物質の投与のために医薬的に許容できる担体を含むことができる。そのような担体には抗体及び他のポリペプチド、遺伝子および他の治療用物質（例えばリポソーム）が含まれるが、ただし前記担体はそれ自体、前記組成物を受容する固体に有害な抗体の産生を誘発せず、さらに不適切な毒性を生じることなく投与され得ることを条件とする。適切な担体は大きく、ゆっくりと代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸ポリマー、アミノ酸コポリマー及び不活性なウイルス粒子であり得る。

【0076】

医薬的に許容できる塩、例えば鉱酸塩（例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、その他）；有機酸の塩（例えば酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩、その他）をここでは用いることができる。医薬的に許容できる担体についての完全な考察は以下の成書で入手できる：Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991)。

治療用組成物中の医薬的に許容できる担体にはさらに液体（例えば水、食塩水、グリセロール及びエタノール）が含まれ得る。さらにまた、補助物質（例えば湿潤剤、乳化剤、pH緩衝物質など）もそのような組成物中に存在することができる。そのような担体は、前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などに処方することを可能にする。

いったん処方されたら、本発明の組成物は患者に直接投与することができる。治療されるべき対象者は動物であり、特に人間が治療され得る。

本発明で利用される医薬組成物は多数の経路によって投与することができる。前記経路には経口、静脈内、筋肉内、動脈内、脊髄内、腱鞘内、脳室内、経皮又は皮膚貫通適用（例えばWO98/20734を参照されたい）、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内又は直腸投与が含まれるが、ただしこれらに限定されない。遺伝子銃又はヒボスプレーもまた本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。典型的には、治療用組成物は、注射可能剤として（流動溶液又は懸濁物として）；注射前に流動ビヒクル中の溶液又は懸濁液として調製するために適切な固体形として調製され得る。

前記組成物の直接的デリバリーは、一般的には、皮下、腹腔内、静脈内、又は筋肉内に注射することによって達成されるか、又は組織間隙腔にデリバリーすることができる。前記組成物はまた病巣に投与することもできる。投薬処置は1回投薬スケジュールでも複数回投薬スケジュールでもよい。

【0077】

個々の症状において、本発明のポリペプチドの活性が過剰な場合は、いくつかのアプローチが利用可能である。あるアプローチは、対象者に上記に記載した阻害化合物（アンタゴニスト）を、本発明のポリペプチドの機能を抑制するために有効な量で医薬的に許容できる担体と一緒に投与することを含む（前記ポリペプチドの機能の抑制は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を阻止し、又は第二のシグナルを阻害しそれによって異常な症状を軽減することによって達成される）。好ましくは、そのようなアンタゴニストは抗体である。もっとも好ましくは、そのような抗体は、それらの免疫原性を最小限にするために、上記で考察したようにキメラ化及び/又はヒト化されている。

また別のアプローチでは、注目のリガンド、基質、酵素、レセプターに対する結合アフ

10

20

30

40

50

ィニティーを保持するポリペプチドの可溶形を投与することができる。典型的には、前記ポリペプチドは注目の部分を保有する断片の形態で投与することができる。

更に別のアプローチでは、前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、発現ブロック技術を用いて（例えば上記に記載したようなアンチセンス核酸モジュールの使用（内部で生成させるか、又は別個に投与される））抑制することができる。遺伝子発現の改変は、ポリペプチドをコードする遺伝子の制御5'領域、調節領域（シグナル配列、プロモーター、エンハンサー及びイントロン）の相補性配列又はアンチセンス分子（DNA、RNA又はPNA）を設計することによって達成することができる。同様に、抑制は“トリプルヘリックス”塩基対法を用いて達成することができる。トリプルヘリックスペアリングは、ポリメラーゼ、転写因子又は調節分子の結合のために十分に開き得るというダブルヘリックスの能力の阻害を惹起するので有用である。トリプレックスDNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている（J.E. Gee et al. 1994, In: B.E. Huber and B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY）。相補性配列又はアンチセンス分子はまた、転写物のリボソームへの結合を妨げることによってmRNAの翻訳を阻止するように設計することができる。そのようなオリゴヌクレオチドは投与するか、又はin vivo発現からin situで生成させてもよい。

10

【0078】

さらにまた、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げることができる。リボザイムは触媒活性を有するRNAであり、天然又は合成であり得る（例えば以下を参照されたい：N. Usman et al. Curr. Opin. Struc. Biol. 1996, 6(4):527-33）。合成リボザイムは、mRNAを選択した位置で特異的切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を防げることができるように設計することができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるように、天然のリン酸リボース骨格及び天然の塩基を用いて合成することができる。また別には、リボザイムは、非天然骨格（例えば2'-O-メチルRNA）を用いて合成しリボヌクレアーゼによる分解から保護することができる。さらに改変塩基を含むことができる。

20

RNA分子を改変して、細胞内安定性及び半減期を高めることができる。可能な改変には、前記分子の5'及び/又は3'末端におけるフランキング配列の付加、又は前記分子の骨格内でのホスホジエステル結合以外のホスホロチオエート又は2'-O-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限定されない。この概念はPNAの作製で固有であり、非慣用的塩基（例えばイノシン、ケオシン及びプトシン）と同様に、アセチル-、メチル-、チオ-並びにアデニン、シチジン、グアニン、チミン及びウリジンの同様な改変型（内在性エンドヌクレアーゼはこれらを容易に認識しない）を含有させることによって、これらの分子の全てに広く適用することができる。

30

本発明のポリペプチド及びその活性の過小発現に関連する異常状態を治療するために、いくつかのアプローチがまた利用可能である。あるアプローチは、対象者に前記ポリペプチドを活性化する化合物（すなわち上記に記載したアゴニスト）の治療的に有効な量を投与し、前記異常な症状を軽減することを含む。また別には、前記ポリペプチドの治療量を適切な医薬担体と一緒に投与して、ポリペプチドの注目する生理学的バランスを回復させることができる。

40

【0079】

遺伝子療法を用い、対象者で注目する細胞による前記ポリペプチドの内在性産生を達成することができる。遺伝子療法は、修正した治療用遺伝子で欠損遺伝子を置換することによって前記ポリペプチドの不適切な産生を永久的に治療するために用いられる。

本発明の遺伝子療法はin vivo又はex vivoで実施することができる。ex vivo遺伝子療法は、患者細胞の単離及び精製、治療遺伝子の導入、及び遺伝的に変化させた細胞を前記患者に戻すことを必要とする。対照的に、in vivo遺伝子療法は患者の細胞の単離及び精製を必要としない。

前記治療用遺伝子は患者への投与のために典型的には“パッケージングされている”。遺伝子デリバリービヒクルは、非ウイルス性（例えばリボソーム）、又は複製欠損ウイル

50

ス（例えばK.L. Berkner (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1992, 158:30-66) 記載のアデノウイルス、又はN. Muzyczka (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1992, 158:97-129; 及び米国特許5,252,479号) 記載のアデノ関連ウイルス(AAV)) であり得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、複製欠損レトロウイルスベクターとして発現のために操作することができる。続いてこの発現構築物を単離し、さらに、前記ポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージング細胞に導入することができる。その結果、前記パッケージング細胞は注目の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生することができる。in vivoで細胞を操作し、さらにin vivoで前記ポリペプチドを、発現するために、これらのプロデューサー細胞を対象者に投与することができる（以下の成書の20章を参照されたい：Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches in Human Molecular Genetics (1996), T. Strachan and A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd. (及びその中に引用された参考文献)）。

10

また別のアプローチは“裸のDNA”の投与であり、前記アプローチでは治療用遺伝子は血流又は筋肉組織に直接注射される。

【0080】

本発明のポリペプチド又は核酸が疾患惹起因子である状況では、本発明は、前記ポリペプチド又は核酸をワクチンとして用いて前記疾患惹起因子に対する抗体の生成を提供する。

本発明のワクチンは、予防的（すなわち感染を防ぐ）又は治療的（すなわち感染後の疾患を治療する）であり得る。そのようなワクチンは免疫抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質又は核酸を含み、前記は通常は上記に記載したように医薬的に許容できる担体と組み合わせられている。前記担体には、前記組成物を受容する個体において有害な抗体をそれ自体誘発しない任意の担体が含まれる。さらにまた、これらの担体は免疫刺激物質（“アジュバント”）として機能することができる。さらにまた、前記抗原又は免疫原は、細菌の類毒素（例えばジフテリア、破傷風、コレラ、H.ピロリ及び他の病原体由来の類毒素）と結合させることができる。

20

ポリペプチドは胃で分解され得るので、ポリペプチドを含むワクチンは好ましくは非経口的に（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内注射）投与される。非経口投与に適した処方物には、水性及び非水性無菌的注射溶液（抗酸化剤、緩衝物質、制菌剤、及び処方物をレシピエントの血液と等張にさせる溶質を含むことができる）、及び水性及び非水性無菌的懸濁物（懸濁剤又は膨張剤を含むことができる）が含まれる。

30

本発明のワクチン処方物はユニットドース又はマルチドース容器で提供することができる。例えば、封入アンプル及びバイアルは、使用直前に無菌的液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。投与量は、ワクチンの具体的な活性に左右され、日常的な実験によって容易に決定することができる。

本発明のポリペプチドと結合する抗体の遺伝的デリバリーはまた、例えば国際特許出願WO98/55607に記載されているように実施することができる。

ジェットインジェクション（例えば以下を参照されたい：www.powderject.com）と称される技術もまたワクチン組成物の処方でも有用である。

40

ワクチン接種及びワクチンデリバリー系のために多数の適切な方法が国際特許出願WO00/29428に記載されている

【0081】

本発明はまた、診断試薬としての本発明の核酸分子の使用に関する。本発明の核酸分子の特徴を有する遺伝子の変異型（前記は機能不全を伴う）の検出は、疾患の診断又は疾患に対する感受性（前記遺伝子の過少発現、過剰発現又は空間的若しくは時間的発現の変異により生じる）の診断に付け加えることができるか、又は前記を限定することができる診断的ツールを提供する。遺伝子に変異を有する個体は、多様な技術によってDNAレベルで検出することができる。

診断用核酸分子は、対象者の細胞（例えば血液、尿、唾液、組織生検又は剖検材料）か

50

ら入手できる。ゲノムDNAは直接検出に用いてもよいが、又は、解析の前にPCR、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）又は他の増幅技術によって酵素的に増幅してもよい（例えば以下を参照されたい：Saiki et al. *Nature* 1986, 324:163-166；Bej et al. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1991, 26:301-334；Birkenmeyer et al. *J. Virol. Meth.* 1991, 35:117-126；J. Van Brunt *Bio/Technology* 1990, 8:291-294）。

ある実施態様では、本発明のこの特徴は患者の疾患を診断する方法を提供し、前記方法は、本発明のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価し、さらに前記発現レベルをコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと相違するレベルが疾患の指標となる。前記方法は、

(a) 患者の組織サンプルと核酸プローブとを、本発明の核酸分子と前記プローブとの間でのハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で接触させる工程；

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

(c) 前記サンプルにおいてハイブリッド複合体の存在を検出する工程、を含み、コントロールサンプル中のハイブリッド複合体レベルと異なる患者サンプル中のハイブリッド複合体レベルが検出されることを疾患の指標とする。

本発明の更なる特徴は以下の工程を含む診断方法を含む：

(a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから本発明の核酸分子を単離する工程；

(c) 疾患と関連した核酸分子の変異の存在を検出することにより、疾患について患者を診断する工程。

【0082】

上記の方法で核酸分子の検出を促進するために、例えばPCRを用いる増幅工程を含むことができる。

欠失及び挿入は、正常な遺伝子型と比較して増幅生成物のサイズの変化によって検出することができる。点変異は、本発明の標識RNA或いは本発明の標識アンチセンスDNA配列に対して増幅DNAをハイブリダイズさせることによって識別することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によるか又は融解温度における相違を評価することによってミスマッチ二重鎖と区別することができる。患者における変異の有無は、ストリンジェントな条件下でDNAとハイブリダイズしてハイブリッド二本鎖分子を形成する核酸プローブとDNAを接触させることによって検出することができる。前記ハイブリッド二本鎖分子は、疾患に関連する変異に対応する任意の部分において核酸プローブがハイブリダイズしない部分を有しており、前記プローブがハイブリダイズしない部分の有無を、DNA鎖の対応する部分における疾患関連変異の有無の指標として検出する。

このような診断は出生前および出生後検査として特に有用である。

点変異及びリファレンス遺伝子と“変異体”遺伝子との間の他の配列の相違は他の周知の技術、例えば直接的DNA配列決定又は一本鎖コンフォメーション多形性によって特定することができる（以下を参照されたい：Orita et al. *Genomics* 1989, 5:874-879）。例えば、改変PCRによって生成された二本鎖PCR生成物又は一本鎖鋳型分子とともに配列決定プライマーを用いることができる。前記配列決定は、放射能標識ヌクレオチドを用いる通常の工程によって、又は蛍光タグを用いる自動配列決定工程によって実施される。クローン化DNAセグメントもまたプローブとして用いて、特定のDNAセグメントを検出することができる。この方法の感度は、PCRと併用されたときに極めて強化される。さらに、点変異及び他の配列変動（例えば多形性）は、上記のように、例えばただ1つのヌクレオチドが異なる配列のPCR増幅のために対立遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドを用いることにより検出することができる。

【0083】

DNAの配列相違はまた、変性剤含有又は非含有ゲルにおけるDNA断片の電気泳動移動度の変化によって、又は直接DNA配列決定によって検出することができる（例えば、Meyers et

10

20

30

40

50

al. Science 1985, 230:1242)。特定の位置における配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えばRNase）及びS1保護又は化学的切断方法によって示すことができる（Cotton et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 85:4397-4401）。

通常のゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、ミクロ欠失、異数体、転座、倒置のような変異はまたin situ解析によっても検出することができる（例えば以下を参照されたい：Keller et al. DNA Probes, 2nd Ed. (1993) Stockton Press, New York, N.Y. USA）。すなわち、細胞内のDNA又はRNA配列は、それらを単離及び/又は膜上に固定する必要なしに変異について解析することができる。フルオレッセンスin situハイブリダイゼーション（FISH）は現在のところもっとも一般的に用いられる方法であり、FISHに関しては多数の概説が存在する（例えば以下を参照されたい：Trachuck et al. Science 1990, 250:559-562；Trask et al. Trends. Genet. 1991, 7:149-154）。

本発明の別の実施態様では、本発明の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築し、遺伝的変種、変異及び多形性の効率的なスクリーニングを実施することができる。アレイテクノロジーの方法は周知であり、普遍的な応用性を有し、遺伝子発現、遺伝的連鎖及び遺伝的変動性を含む分子遺伝学における多様な疑問に答えるために用いることができる（例えば以下を参照されたい：M. Chee et al. Science 1996, 274:610-613）。

【0084】

ある実施態様では、前記アレイは、文献（PCT出願WO95/11995（Chee et al.）；D.J. Lockhart et al. 1996, Nat. Biotech. 14:1675-1680；M. Schena 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619）に記載された方法にしたがって調製され、使用された。オリゴヌクレオチド対は2つから100万を超える範囲であり得る。オリゴマーは、光誘導化学反応を用いて支持層上の指定の領域で合成される。前記支持層は紙、ナイロン若しくは他のタイプのメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライド又は任意の他の適切な固体支持体であろう。別の特徴では、オリゴヌクレオチドは、化学的結合方法及びインクジェット適用装置をPCT出願WO95/25116（Balteschweiler et al.）に記載されたように用いて、支持層の表面で合成することができる。別の特徴では、真空系、熱、UV、機械的又は化学的結合方法によって、ドット（又はスロット）プロットに類似する“グリッド化（gridded）”アレイを用い、支持層の表面にcDNA断片又はオリゴヌクレオチドを配列し、結合させることができる。アレイ（例えば上記に記載のもの）は手動で作製するか、又は利用可能な装置（スロットプロット又はドットプロット装置）、材料（任意の適切な固相）及び機械（自動装置を含む）を用いて製作することができ、8、24、96、384、1536又は6144のオリゴヌクレオチド、又は2から100万を超える他の任意の数（前記100万を超える数は市販の装置の効率的な使用に役立つ）のオリゴヌクレオチドを含むことができる。

上記に考察した方法に加えて、対象者に由来するサンプルから異常に低下又は増加したレベルのポリペプチド又はmRNAを測定することを含む方法によって疾患を診断することができる。発現の低下又は増加は、ポリヌクレオチドの定量について当分野で周知の方法のいずれか（例えば核酸増幅、例えばPCR、RT-PCR、RNase保護、ノザンプロットティング及び他のハイブリダイゼーション方法）を用いて、RNAレベルで測定することができる。

【0085】

宿主由来のサンプルについて本発明のポリペプチドレベルを決定するために用いることができるアッセイ技術は当業者には周知であり、ある程度詳細に上記で考察されている（放射能免疫アッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンプロット解析及びELISAアッセイを含む）。本発明のこの特徴は以下の工程を含む診断方法を提供する：（a）上記に記載のリガンドを生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；及び（b）前記複合体を検出する工程。

ポリペプチドレベルを測定するためのプロトコル、例えばELISA、RIA及びFACSはさらにまた、変化した又は異常なポリペプチド発現レベルの診断の根拠を提供する。ポリペプチド発現の正常又は標準値は、正常な哺乳動物対象、好ましくはヒトから採取した体液又は細胞抽出物を、前記ポリペプチドに対する抗体と複合体形成に適した条件下で一緒にする

10

20

30

40

50

ことによって確立される。標準的な複合体形成量は種々の方法（例えば光測定手段）によって定量することができる。

本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を、前記ポリペプチドの発現を特徴とする症状又は疾患の診断に用いるか、又は本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンド及び他の化合物で処置される患者をモニターするアッセイで用いることができる。治療薬について上記で述べた態様と同じ態様で診断のために有用な抗体を調製することができる。前記ポリペプチドのための診断アッセイには、前記抗体及びヒトの体液又は細胞若しくは組織の抽出物中で前記ポリペプチドを検出するための標識を利用する方法が含まれる。前記抗体は改変して又は改変せずに用いることができる。さらに前記抗体は、共有結合又は非共有結合によりそれらをレポーター分子と結合させることによって標識することができる。当分野で公知の極めて多様なレポーター分子を使用することができ、それらのいくつかは上記に記載されている。

10

【0086】

対象者、生検組織由来のコントロールサンプル及び疾患サンプルで発現されるポリペプチドの量を標準値と比較する。標準値及び対象の値との間の偏差によって疾患を診断するためのパラメーターが確立される。診断アッセイは、ポリペプチド発現の有無、及び過剰を識別し、さらに、治療的介入時のポリペプチドレベルの調節をモニターするために用いることができる。そのようなアッセイはまた、具体的な治療的レジメンの有効性を判定するために動物実験、臨床試験又は個々の患者の治療のモニターで用いることができる。

20

本発明の診断キットは以下を含むことができる：

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

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

本発明のまた別の特徴では、診断キットは核酸分子のアレイを含むことができ、前記分子の少なくとも1つは本発明の核酸分子である。

30

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

そのようなキットは、疾患又は疾患（特にある種の疾患）に対する感受性の診断で有用であろう。前記疾患には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節。

40

本発明の種々の特徴及び実施態様を、INSP181ポリペプチドに具体的に言及しながらこれから実施例によってより詳細に述べる。

細部の改変は本発明の範囲から逸脱することなく実施され得ることは理解されよう。

【0087】

表 1

アミノ酸	同義グループ	より好ましい同義グループ
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

10

20

【 0 0 8 8 】

表 2

アミノ酸	同義グループ
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, アロ-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-チアゾリジン-4-カルボン酸, D-または L-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, アロ-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, トランス-3,4, または 5-フェニルプロリン, AdaA, AdaG, cis-3,4, または 5-フェニルプロリン, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

実施例

実施例1 : INSP181

INSP181ポリペプチド配列をNCBI非重複配列データベースに対しBLASTクエリー配列として用いた。BLAST検索から得られた上位10適合物が図1に示されている。図2は、最高blastヒットに対するINSP181クエリー配列のアラインメントを示す。

INSP181 cDNAのクローニングは、原核細胞及び真核細胞系でのINSP181タンパク質の発現並びにその後の発現及び性状決定を可能にするであろう。例えば、組換えINSP181を用いて、INSP181特異的モノクローナル又はポリクローナル抗体を生成することができる。前記抗体はさらにINSP181の生化学的性状の決定で用いることができよう。また別には、組換えINSP181は、上記記載のアッセイ及び下記実施例5に記載のアッセイを含む多様なスクリーニングアッセイに用いることができる。

【 0 0 9 0 】

実施例2 : INSP181及びINSP181SVのクローニング

2.1 ヒトcDNA鋳型の調製 :

第一鎖cDNAをヒトの多様な組織の全RNAサンプル(Clontech, Stratagene, Ambion, Bio chain Institute及び本研究室調製物)から、SuperScript II又はSuperScript III RNAseH⁻逆転写酵素(Invitrogen)を用い製造業者のプロトコルにしたがい調製した。

SuperScript IIについては、オリゴヌクレオチド(dT)₁₅プライマー(500 µg/mLで1 µL)(Promega)、2 µgのヒト全RNA、1 µLの10mM dNTPミックス(それぞれ10mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、中性pH)及び滅菌蒸留水(最終溶液12 µLに調節)を1.5mLのエッペン

ドルフ管で混合し、65℃に5分加熱してさらに氷上で冷却した。内容物を短時間の遠心で集め、4µLの5x第一鎖緩衝液、2µLの0.1M DTT、及び1µLのRNaseOUT(商標)リコンビナントリボヌクレアーゼ阻害剤(40ユニット/µL、Invitrogen)を添加した。前記管の内容物を穏やかに混合し、42℃で2分インキュベートし、続いて1µL(200単位)のSuperScript II(商標)酵素を添加し、ピペット操作により穏やかに混合した。前記混合物を42℃で50分インキュベートし、続いて70℃で15分加熱することにより不活化した。cDNAに相補的なRNAを除去するために、1µL(2単位)の大腸菌RNaseH(Invitrogen)を添加し、前記反応混合物を37℃で20分インキュベートした。

【0091】

SuperScript IIIについては、1µLのオリゴヌクレオチド(dT)₂₀プライマー(50 nM, Invitrogen)、2µgのヒト全RNA、1µLの10mM dNTPミックス(それぞれ10mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、中性pH)及び滅菌蒸留水(最終溶液10µLに調節)を1.5mLのエペンドルフ管で混合し、65℃に5分加熱してさらに氷上で冷却した。各RT反応のために、cDNA合成ミックスを以下のように調製した: 別個の管で2µLの10x RT緩衝液、4µLのMgCl₂(25mM)、2µLのDTT(0.1M)、1µLのRNaseOUT(商標)(40U/µL)及び1µLのSuperScript III(商標)RT酵素を一緒にし、続いてこの混合物の10µLをRNA/プライマー混合物を含む管に添加した。管の内容物を穏やかに混合し、簡単な遠心で集め、50℃で5分インキュベートした。80℃で5分インキュベートして反応を終了させ、前記反応混合物を続いて氷上で冷却し、簡単な遠心で集めた。cDNAに相補的なRNAを除去するために、1µL(2単位)の大腸菌RNaseH(Invitrogen)を添加し、前記反応混合物を37℃で20分インキュベートした。

最終21µLの反応混合物を179µLの滅菌水を添加して希釈し最終体積200µLを得た。各プールが5つまでの別個のcDNAサンプルを含むように、前記RNAサンプルと一緒にしてプールを作製した。各cDNAプールの5µLを50µLの最終反応体積でのPCRのための鋳型として用い、これは前記プール中に各々のcDNAサンプル1µLから成っていた。これは、個々のcDNA鋳型の各々のほぼ20ngを提供した。

【0092】

2.2 cDNAライブラリー:

ヒトcDNAライブラリー(バクテリオファージラムダ()ベクター中)はStratagene、Clontech若しくはInvitrogenから購入するか、またはSerono Pharmaceutical Research Instituteにおいて ZAP、GT10、GT11又はTriplEx2ベクターで製造業者(Stratagene及びClontech)のプロトコルにしたがって調製した。バクテリオファージのDNAは、Wizard Lambda Preps DNA精製システムを用い、感染大腸菌宿主株の小規模培養から製造業者の指示(Promega, Corporation, Madison, WI)にしたがって調製した。

2.3 PCRのための遺伝子特異的クローニングプライマー:

INSP181予想コードを増幅するために、18から30塩基の長さを有する2つのPCRプライマー対をPrimer Designerソフト(Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC27722-2045, USA)を用いて設計した。PCRプライマーは55±10℃に近いT_m及び40-60%のGC含有量を有するように最適化した。標的配列(INSP181)に対して高い選択性を有し、殆ど又は全く非特異的プライミングを示さないプライマーを選択した。INSP181-CP3/INSP181-CP4プライマーが、INSP181-CP1/INSP181-CP2プライマーに対し内側に位置するように2つのネスト対を形成するべくプライマーを設計した。

2.4 ヒトcDNA鋳型からINSP181のPCR増幅:

遺伝子特異的クローニングプライマーINSP181-CP1及びINSP181-CP2(表1、図5)を設計して、INSP181コードを含む540bpのcDNA断片を増幅させた。前記プライマーを、cDNAライブラリーのパネル及びPCR鋳型としてヒトcDNAサンプルプールとともに用いた。このPCR1は、最終体積50µLで、MJ Research DNA Engine(以下のようにプログラムした: 94℃で2分; 94℃で1分、55℃で1分及び72℃で1分を40サイクル; 続いて72℃で7分の1サイクル及び4℃での維持サイクル)を用いて実施した。前記最終体積50µLは以下を含んでいた: 1xのAmpliTaq(商標)緩衝液、200µMのdNTP、50pmolの各クローニングプライマー、2.5単位のAmpliTaq(商標)(Applied Biosystems)及びほぼ20ngのcDNAライブラリー鋳型又は10

0ngのcDNAプール鑄型。

続いて、INSP181-CP1/INSP181-CP2生成物内の496bpのcDNA断片を増幅するために設計した増幅プライマーINSP181-CP3及びINSP181-CP4(表1、図5-9)によるPCR2のための鑄型として、各PCR1生成物を用いた。PCR2は、最終体積50 μ L(1xのAmpliTaq(商標)緩衝液、200 μ MのdNTP、50pmolの各クローニングプライマー、2.5単位のAmpliTaq(商標)(Applied Biosystems)及び1 μ LのPCR1生成物を含む)で、MJ Research DNA Engine(以下のようにプログラムした:94 $^{\circ}$ Cで2分;94 $^{\circ}$ Cで1分、59 $^{\circ}$ Cで1分及び72 $^{\circ}$ Cで1分を40サイクル;続いて72 $^{\circ}$ Cで7分を1サイクル及び4 $^{\circ}$ Cでの維持サイクル)を用いて実施した。

PCR1及びPCR2の各増幅生成物の30 μ Lを1xのTAE緩衝液(Invitrogen)中の0.8%アガロースゲル上で可視化した。ほぼ予想の分子量(PCR1については540bp、PCR2については496bp)をもつ生成物をWizard PCR Preps DNA精製システム(Promega)を用いてゲルから精製し、50 μ Lの水に溶出させ、直接サブクローニングした。

【0093】

2.5 PCR産物のサブクローニング:

Invitrogen社から購入したTAクローニングキットを用いて、業者指定の条件でPCR生成物をトポイソメラーゼI改変クローニングベクター(pCR4-TOPO)にサブクローニングした。簡単に記せば、4 μ Lのゲル精製PCR生成物を15分間1 μ LのTOPOベクターおよび1 μ Lの塩溶液と室温にてインキュベートした。次に、この反応混合物で大腸菌株TOP10(Invitrogen)を以下のように形質転換した:小分けした50 μ LのOne Shot TOP10細胞を氷上で溶解し、2 μ LのTOPO反応物を添加した。この混合物を氷上で15分間インキュベートし、次に42 $^{\circ}$ Cにて正確に30秒間インキュベーションすることによって熱ショックをかけた。サンプルを氷上に戻し、250 μ Lの加温した(室温)SOC培地を添加した。サンプルを振盪しながら(220rpm)37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。この形質転換混合物の全量をアンピシリン(100 μ g/ml)を含むL-ブロス(LB)プレート上にプレーティングし、37 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。

2.6 コロニーPCR:

滅菌ようじを用いてコロニーを50 μ Lの滅菌水に接種した。接種物の10 μ Lを、1xAmpliTaq(商標)緩衝液、200 μ M dNTPs、20pmolのT7プライマー、20pmolのT3プライマーおよび1ユニットのAmpliTaq(商標)(Applied Biosystems)を用い、総反応体積20 μ LでMJ Research DNA Engineを用いてPCRを実施した。サイクル条件は以下の通りであった:94 $^{\circ}$ Cで2分;94 $^{\circ}$ Cで30秒、48 $^{\circ}$ Cで30秒及び72 $^{\circ}$ Cで1分を30サイクル。更なる解析までサンプルを4 $^{\circ}$ Cに保持した(保持サイクル)。

PCR生成物を1%アガロースゲル上で1xTAE緩衝液で解析した。ほぼ予想される分子量(540bp又は496bp+マルチクローニング部位(MCS)のための105bp)のPCR生成物を生じるコロニーを37 $^{\circ}$ Cにてアンピシリンを含む(100 μ g/ml)5mlのL-ブロス(LB)中で220rpmにて振盪しながら一晩増殖させた。

【0094】

2.7 プラスミドDNA調製および配列決定:

ミニプレッププラスミドDNAを5ml培養物からBiorobot 8000ロボットシステム(Qiagen)またはWizard Plus SV Miniprepsキット(Promega、カタログ番号1460)を用い、業者の指示に従って調製した。プラスミドDNAは80 μ Lの滅菌水中に溶出させた。DNA濃度は、Eppendorf BO光度計又はSpectramax 190光度計(Molecular Devices)を用いて測定した。プラスミドDNA(200-500ng)をシーケンシングプライマーT7及びT3(表1)により、BigDye Terminatorシステム(Applied Biosystems、カタログ番号4390246)を用い業者の指示に従ってDNAシーケンシングに付した。シーケンシング反応物はDye-Exカラム(Qiagen)又はMontage SEQ 96クリーンアッププレート(Milliporeカタログ番号LSKS09624)を用いて精製し、続いてApplied Biosystems 3700シーケンサーで解析した。

配列解析により、アテローム硬化症のプラーク及び好塩基球に由来するcDNAを含むプールからPCR2で増幅した1つのクローンを同定した。このクローンは、予想されるINSP181-CP3/INSP-CP4 PCR生成物の配列を含んでいた。このクローン化されたcDNA断片の配列は図8

10

20

30

40

50

に示されている。前記クローン化PCR生成物はプラスミドpCR4-TOPO-INSP181に存在する。

唾液腺、眼及びStratageneユニバーサルリファレンスRNA鋳型に由来するcDNA含有プールからPCR2で増幅した第二のクローンを同定した。このクローンは、予想されるINSP181-CP3/INSP-CP4生成物を含んでいたが、エキソン4の開始部に25アミノ酸挿入物を含んでいた。この挿入物はアミノ酸置換F113Vをもたらす。ゲノムDNA配列と比較して、このクローンはまたアミノ酸置換N92T及びG114Sを含み、これはおそらくPCRによって導入された誤りであろうと思われるが、この段階では多型性を排除することはできない。クローン化cDNA断片の配列は図9に示されている。前記クローン化PCR生成物はプラスミドpCR4-TOPO-INSP181-SV1に存在する。

【0095】

10

表1

プライマー	配列 (5'-3')
INSP181-CP1	CCC TGG AGA AAG GCC CGC TCC TG
INSP181-CP2	AGG GTG GGG GAC ATG GGC CAT C
INSP181-CP3	GCT GCT GGC CCT TGG CCT GG
INSP181-CP4	TAT GTT GAA GAC CGG GGC TTT CTG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG

【0096】

20

実施例3：インフレーム6HISタグ配列と融合したゲートウェイ (Gateway) 適合INSP181 ORFの作製

INSP181はネストPCRによってクローニングし、したがってpCR4-TOPOクローン中(プラスミドpCR4-TOPO-INSP181)のcDNA挿入物は、コード配列の5'末端において26bpが失われ、3'末端において21bpが失われていた。失われたヌクレオチド、6HISタグ及びストップコドンの取り込みは、いずれも適切なヌクレオチドをPCR増幅に使用されるプライマーに含有させることによって行った。クローニングに使用したPCRプライマーの配列は表2に示されている。

【0097】

表2

30

プライマー	配列 (5' -3')
INSP181 MAT FP	<u>GCC ACC</u> ATG GCC CTG GAG AAA GGC CCG CTC CTG CTG CTG GCC CTT GGC
INSP181 MAT RP	GTG ATG GTG ATG GTG GGG TGG GGG ACA TGG GCC ATC GT T GAA GAC CGG
INSP181 ATTB1 FP	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> A TG GCC CTG
ATTB1 PCR RP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TCA <i>ATG GTG</i> <i>ATG GTG ATG GTG</i>
INSP181 SV1 (T92N) FP	GGG TGT GTA AAG AAA CAA ACA TCA CCG TCC ATC CAA C
INSP181 SV1 (T92N) RP	GTT GGA TGG ACG GTG ATG T TTG TTT CTT TAC ACA CCC
INSP181 SV1 (S114G) FP	TGG CAT GGG GGG GTC CAG G GCC TGG GGG ACG GAG GAG
INSP181 SV1 (S114G) RP	CTC CTC CGT CCC CCA GGC C CTG GAC CCC CCC ATG CCA
21 M13 FP	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 RP	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pEAK12 FP	AGC CTC AGA CAG TGG TTC AA
pEAK12 RP	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG

10

20

下線を付した配列 = コザック配列

太字 = ストップコドン

斜字体 = Hisタグ

【 0 0 9 8 】

プラスミドpCR4-TOPO-INSP181をPCR鋳型として用いて、C-末端の6HISタグ及びストップコドンを含む完全長のORFを作製した。このGatewayクローニング工程の第一段階は、5'末端側がattB1組換え部位およびコザック配列によりフランキングされ、3'末端側がインフレーション6ヒスチジン(6HIS)タグをコードする配列、ストップコドン及びattB2組換え部位にフランキングされたINSP181の完全長ORF(Gateway適合cDNA)を生じる二工程PCR反応を含む。第一のPCR反応PCR1(50μLの最終体積)はそれぞれ以下を含む: 1μL(25ng)のプラスミドpCR4-TOPO-INSP181、4.0μLのdNTPs(10mM)、5μLの10x Pfxポリメラーゼ緩衝液、1μL MgSO₄(50mM)、1.0μLの各遺伝子特異的プライマー(最終濃度100pmolとする)(INSP181 MAT FP及びINSP181 MAT RP)、及び0.5μL Platinum Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)。PCR反応は、95℃で2分の初期変性工程に続いて、94℃で30秒、64℃で30秒及び68℃で1分の12サイクル、及び68℃で5分の最終伸長サイクル、及び4℃の維持サイクルを用いた。Perfectprep Gelクリーンアップキット(Eppendorf)を業者の指示に従って用いて増幅生成物を直接精製し、50μLの滅菌水中に回収した。2μLアリコットを1xTAE緩衝液中の1.6%アガロースゲルで可視化し、生成物が予想の分子量(543bp+24bp=567bp)を有することを確認した。

30

40

第2のPCR反応(最終体積50μL)は、希釈した精製PCR1生成物(最終濃度10ng)の1μL、4.0μL dNTPs(10mM)、5μLの10x Pfxポリメラーゼ緩衝液、1μL MgSO₄(50mM)、1.0μLの各Gateway変換プライマー(最終濃度100pmolを提供する)(INSP181 ATTB1 FP及びATTB1 PCR RP)及び0.5μLのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼを含んでいた。この第2のPCR反応の条件は以下の通りであった: 95℃にて2分、続いて94℃で30秒、60℃で30秒及び68℃で1分の30サイクル; さらに68℃で5分の最終伸長サイクル及び4℃の保持サイクル。業者の指示に従って、Perfectprep Gelクリーンアップキット(Eppendorf)を用いてPCR生成物をゲル精製し、50μLの滅菌水中に回収した。2μLのアリコットを1xTAE緩衝液中の1.6%アガロースゲル上で可視化し、生成物が予想の分子量(567bp+64bp=631bp)を有す

50

ることを確認した。

【0099】

3.1 Gateway適合 INSP181-6HIS ORFのGatewayエンターベクターpDONR221へのサブクローニング：

Gatewayクローニング方法の第2段階は、以下のようなGateway改変PCR生成物のGatewayエンターベクターpDONR221 (Invitrogen) へのサブクローニングを含む：PCR2のゲル抽出生成物の5 μ Lを1.5 μ L pDONR221ベクター (0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのBP緩衝液及び1.5 μ LのBPクロナーゼ酵素ミックス (Invitrogen) と共に最終体積10 μ Lで室温にて1時間インキュベートした。プロテイナーゼKの1 μ L (2 μ g/ μ L) の添加、および37 °Cで更に10分間インキュベートすることにより反応を停止させ。この反応物の一部 (2 μ L) を用いてDH5 α 株 (Invitrogen) を以下のように形質転換した：DH5 α 細胞の50 μ Lを氷上で融解し、2 μ Lの反応混合物を添加した。この混合物を30分氷上でインキュベートし、続いて42 °Cで厳密に30秒インキュベートすることによって熱ショックを施した。サンプルを氷上に戻し、250 μ Lの温かい (室温) SOC培地 (0.5ml) を添加した。サンプルを振盪しながら (250rpm) 37 °Cにて1時間インキュベートした。続いて、この形質転換混合物をカナマイシン (40 μ g/ml) 含有L-ブロス (LB) プレート上にプレATINGし、37 °Cで一晩インキュベートした。

10

5つの形質転換体を採取し、カナマイシン (40 μ g/ml) 含有LB寒天プレートに接種し37 °Cで一晩インキュベートした。前記接種プレート由来の増殖培養の1すくい (50 μ L) の水に再懸濁し5分間煮沸して細胞を溶解させた。前記細胞溶解物を遠心して細胞破砕物を除去し、得られた上清をコロニーPCRスクリーニングのための鑄型として用いた。

20

PCR混合物 (最終体積25 μ L) は、10 μ Lの遠心細胞溶解物、2.0 μ LのdNTP (10mM)、2.5 μ LのTaqポリメラーゼ緩衝液、0.5 μ Lのスクリーニングプライマー (最終濃度が100ピコモルとなるように) (21M13 FP及びATTB1 PCR RP) 及び0.5 μ LのTaq DNAポリメラーゼを含んでいた。

スクリーニングPCR反応のための条件は以下のとおりであった：95 °Cで2分；続いて94 °Cで30秒、60 °Cで30秒及び72 °Cで1分の30サイクル；及び72 °Cで5分の最終伸長サイクルさらに4 °Cでの維持サイクル。PCR生成物を1.6%のアガロースゲルにロードして断片のサイズを確認した。

1個の陽性クローンを選別し、QIAprep Spin Miniprepキット (Qiagen) を用いて5mLの培養物から少量調製プラスミドDNAを調製した。CEQ Dye Terminator CycleシーケンシングQuick Start Kit (Beckman Coulter P/N 608120) を用い製造業者の指示にしたがって、21M13及びM13RevプライマーによりプラスミドDNA (150 - 200ng) をDNAシーケンシングに付した。前記プライマー配列は表2に示されている。シーケンシング反応をCEQ2000 XL DNA解析システム (Beckman Coulter P/N608450) で解析した。挿入物の配列を確認した後、pDONR221_INSP181-6HISを発現クローンの作製に用いた。

30

【0100】

3.2 Gateway適合 INSP181 ORFの発現ベクターpEAK12d及びpDEST12.2へのサブクローニング：

次に、pDONR221_INSP181-6HISのプラスミドDNA (2 μ L又は約150ng) を用いて、pEAK12dベクター又はpDEST12.2ベクター (0.1 μ g/ μ L) のどちらか1.5 μ L、2 μ LのLR緩衝液及び1.5 μ LのLRクロナーゼを最終体積10 μ L中に含む組換え反応を行った。

40

1 μ LのプロテイナーゼK (2 μ g/ml) を添加し、37 °Cにてさらに10分間インキュベーションすることにより反応を停止させた。この反応物の一部 (2 μ L) を用いてDH5 α 株 (Invitrogen) を以下のように形質転換した：DH5 α 細胞の50 μ Lアリコットを氷上で融解し、2 μ Lの反応混合物を添加した。前記混合物を30分氷上でインキュベートし、続いて42 °Cで厳密に30秒インキュベートすることによって熱ショックを施した。サンプルを氷上に戻し、250 μ Lの温かい (室温) SOC培地を添加した。サンプルを振盪しながら (250rpm) 37 °Cで1時間インキュベートした。続いて、この形質転換混合物をアンピシリン (100 μ g/ml) 含有L-ブロス (LB) プレート上にプレATINGし、37 °Cで一晩インキュベートした。

50

5つの形質転換体を採取し、アンピシリン (100 µg/mL) 含有LB寒天プレートに接種し37度で一晩インキュベートした。前記接種プレート由来の増殖培養の1すくいを50 µLの水に再懸濁し5分間煮沸して細胞を溶解させた。前記細胞溶解物を遠心して細胞破砕物を除去し、得られた上清をコロニーPCRスクリーニングのための鑄型として用いた。

PCR混合物 (最終体積25 µL) は、10 µLの遠心細胞溶解物、2.0 µLのdNTP (10mM)、2.5 µLのTaqポリメラーゼ緩衝液、0.5 µLのスクリーニングプライマー (最終濃度が100ピコモルとなるように) 及び0.5 µLのTaq DNAポリメラーゼを含んでいた。pEAK12dクローンをプライマー-pEAK12 FP及びINSP181 MAT RPを用いてスクリーニングし、さらにpDEST12.2クローンはプライマー-21M13 FP及びINSP181 MAT RPを用いてスクリーニングした。

スクリーニングPCR反応のための条件は以下のとおりであった: 95度で2分; 続いて94度で30秒、60度で30秒及び72度で1分を30サイクル; 及び72度で5分の最終伸長サイクルさらに4度の維持サイクル。PCR生成物を1.6%のアガロースゲルにロードして断片のサイズを確認した。

1個の陽性クローンを選別し、QIAprep Spin Miniprepキット (Qiagen) を用いて5mLの培養物からミニプレッププラスミドDNAを調製した。

上記に記載したように、シーケンシングプライマー-pEAK12 FP及びpEAK12 RPを用い、pEAK12dベクター中のプラスミドDNA (150 - 200ng) をDNAシーケンシングに付した。pDEST12.2ベクター中のプラスミドDNA (150 - 200ng) は、上記に記載したようにシーケンシングプライマー-21M13 FP及びM13Rev RPによりDNAシーケンシングに付した。

配列を確認したクローンを、pEAK12d_INSP181-6HIS及びpDEST12.2_INSP181-6HISと称した。

配列を確認したクローンpEAK12d_INSP181-6HISの500mL培養から、Qiagen Maxi prepキットを製造業者の指示にしたがって用いMaxi-prep DNAを調製した。プラスミドDNAは1 µg / µLの濃度でTE緩衝液中に再懸濁させ、-20度で保存した。

配列を確認したクローン (pDEST12.2_INSP181-6HIS) の500mL培養から、EndoFree Plasmid Megaキットを製造業者の指示にしたがって用い、エンドトキシンを含まないmaxi-prep DNAを調製した。精製プラスミドDNAは少なくとも3 µg / µLの最終濃度でエンドトキシンを含まないTE緩衝液中に再懸濁させ、-20度で保存した。

【 0 1 0 1 】

実施例4: インフレーム6HISタグ配列と融合したGateway適合 INSP181SV1 ORFの作製

INSP181SV1をネストPCRでクローニングした。したがってpCR4-TOPOクローン (プラスミドpCR4-TOPO-INSP181-SV1) 中のcDNA挿入物は、前記コード配列の5'末端で26bpを、さらに3'末端で21bpを失っていた。さらにまた、アミノ酸変化を生じる2つの変異 (N92T及びG114S) が配列決定で検出された (この変異は修正されねばならない)。失われたヌクレオチド、6HISタグ及びストップコドンの取り込みは、いずれも適切なヌクレオチドをPCR増幅で使用するプライマーに含有させることによって行った。完全長のINSP181SV1エンタークローンを作製した後、位置特異的変異導入を実施してこの2つの変異を修正した。

プラスミドpCR4-TOPO-INSP181-SV1をPCR鑄型として用い、C-末端の6HISタグ及びストップコドンを含む完全長ORFを作製した。このGatewayクローニング方法の第一段階は、5'末端側がattB1組換え部位およびコザック配列によりフランキングされ、3'末端側がインフレーム6ヒスチジン (6HIS) タグをコードする配列、ストップコドン及びattB2組換え部位にフランキングされたINSP181SV1の完全長ORF (Gateway適合cDNA) を生じる二工程PCR反応を含む。第一のPCR反応PCR1 (50 µLの最終体積) はそれぞれ以下を含む: 1 µL (25ng) のプラスミドpCR4-TOPO-INSP181-SV1、4.0 µLのdNTP (10mM)、5 µLの10x Pfxポリメラーゼ緩衝液、1 µL MgSO₄ (50mM)、各々1.0 µLの遺伝子特異的プライマー (最終濃度100 pmolを提供する) (INSP181 MAT FP及びINSP181 MAT RP)、及び0.5 µL Platinum Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen)。PCR反応は、95度で2分の初期変性工程に続いて、94度で30秒、64度で30秒及び68度で1分を30サイクル、及び68度で5分の最終伸長サイクル、さらに4度の維持サイクルを用いた。Perfectprep Gelクリーンアップキット (Eppendorf) を業者の指示に従って用いて増幅生成物を直接精製し、50 µLの滅菌水中に回収した。2 µLア

リコットを1×TAE緩衝液中の1.6%アガロースゲルで可視化し、生成物が予想の分子量を有することを確認した(618bp + 24bp = 642bp)。

第2のPCR反応(最終体積50 µL)は、希釈した精製PCR1生成物(最終濃度10ng)の1 µL、4.0 µL dNTP(10mM)、5 µLの10x Pfxポリメラーゼ緩衝液、1 µLのMgSO₄(50mM)、1.0 µLの各Gateway変換プライマー(最終濃度100pmolを提供する)(INSP181 ATTB1 FP及びATTB1 PCR RP)及び0.5 µLのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼを含んでいた。この第2のPCR反応の条件は以下の通りであった: 95 °Cで2分、続いて94 °Cで30秒、60 °Cで30秒及び68 °Cで1分を30サイクル; さらに68 °Cで5分の最終伸長サイクル及び4 °Cの維持サイクル。Perfectprep Gelクリーンアップキット(Eppendorf)を業者の指示に従って用いてPCR生成物をゲル精製し、50 µLの滅菌水中に回収した。2 µLアリコットを1×TAE緩衝液中の1.6%アガロースゲル上で可視化し、生成物が予想の分子量(642bp + 64bp = 706bp)を有することを確認した。

10

【0102】

4.1 Gateway適合INSP181SV1-6HIS ORFのGatewayエンターベクター-pDONR221へのサブクロニング:

Gatewayクロニング方法の第2段階は、以下のようなGateway改変PCR生成物のGatewayエンターベクター-pDONR221(Invitrogen)へのサブクロニングを含む: PCR2のゲル抽出生成物の5 µLを1.5 µLのpDONR221ベクター(0.1 µg/µL)、2 µLのBP緩衝液及び1.5 µLのBPクローナーゼ酵素ミックス(Invitrogen)とともに最終体積10 µLで室温にて1時間インキュベートした。プロテイナーゼKの1 µL(2 µg/µL)の添加および37 °Cで更に10分間インキュベートすることにより反応を停止させた。この反応物の一部(2 µL)を用いてDH5 α株(Invitrogen)を以下のように形質転換した: DH5 α細胞の50 µLを氷上で融解し、2 µLの反応混合物を添加した。この混合物を30分氷上でインキュベートし、続いて42 °Cで厳密に30秒インキュベートすることによって熱ショックを施した。サンプルを氷上に戻し、250 µLの温かい(室温)SOC培地(0.5ml)を添加した。サンプルを振盪しながら(250 rpm)37 °Cにて1時間インキュベートした。続いて、この形質転換混合物をカナマイシン(40 µg/ml)含有L-ブロス(LB)プレート上にプレーティングし、37 °Cで一晩インキュベートした。

20

5つの形質転換体を採取し、カナマイシン(40 µg/ml)含有LB寒天プレートに接種し37 °Cで一晩インキュベートした。前記接種プレート由来の増殖培養の1すくいを50 µLの水に再懸濁し5分間煮沸して細胞を溶解させた。前記細胞溶解物を遠心して細胞破砕物を除去し、得られた上清をコロニーPCRスクリーニングのための鑄型として用いた。

30

PCR混合物(最終体積25 µL)は、10 µLの遠心細胞溶解物、2.0 µLのdNTP(10mM)、2.5 µLのTaqポリメラーゼ緩衝液、0.5 µLのスクリーニングプライマー(最終濃度100ピコモルにする)(21M13 FP及びATTB1 PCR RP)及び0.5 µLのTaq DNAポリメラーゼを含んでいた。

スクリーニングPCR反応のための条件は以下のとおりであった: 95 °Cで2分; 続いて94 °Cで30秒、60 °Cで30秒及び72 °Cで1分を30サイクル; 及び72 °Cで5分の最終伸長サイクルさらに4 °Cでの維持サイクル。PCR生成物を1.6%のアガロースゲルにロードして断片のサイズを確認した。

40

1個の陽性クローンを選別し、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen)を用いて5mLの培養からプラスミドmini-prep DNAを調製した。CEQ Dye Terminator CycleシーケンシングQuick Start Kit(Beckman Coulter P/N 608120)を製造業者の指示にしたがって用い、21M13及びM13RevプライマーによりプラスミドDNA(150 - 200ng)をDNAシーケンシングに付した。前記プライマー配列は表2に示されている。シーケンシング反応をCEQ2000 XL DNA解析システム(Beckman Coulter P/N608450)で解析した。配列を確認した後、pDONR221-INSP181SV1(N92T, G114S)-6HISを位置特異的変異導入のための鑄型として用い、前記2つの変異を修正した。

【0103】

4.2 INSP181SV1-6HISの位置特異的変異導入:

50

PCRによってクローニングしたINSP181SV1配列は、予想したINSP181SV1とは2つの別個の位置における置換によって異なっていた(A275C及びG340A)(アミノ酸変異N92T及びG114Sをもたらす)。これらの変異はゲノムDNAでは検出されなかったので(Celera又はGenbank)、PCRクローニング工程から生じたと考えられる。正確なINSP181SV1配列を含むpDONR221クローンを作製するために、pDONR221_INSP181SV1-(N92T, G114S)-6HISクローンを位置特異的変異導入のための鋳型として用いた。

4.3 INSP181SV1の位置特異的変異導入のための遺伝子特異的クローニングプライマー

2つのPCRプライマー対、INSP181SV1(T92N) FP、INSP181SV1(T92N) RP及びINSP181SV1(S114G) FP、INSP181SV1(S114G) RPを、前記プライマーがpDONR221_INSP181SV1-(N92T, G114S)-6HIS配列の対抗鎖とアニールし、さらに各プライマーが、変異を導入されるべきアミノ酸のどちらかの側の15 - 25塩基とアニールするように設計した。前記PCRプライマーは、QuickChange(商標)II XL位置特異的変異導入キット(Stratagene)のための指示マニュアルに提供されている指示にしたがって設計した。

【0104】

4.4 INSP181SV1の位置特異的変異導入：

位置特異的変異導入-1は、QuickChange(商標)II XL位置特異的変異導入キット(Stratagene)を製造業者の指示にしたがって用いて実施した。コントロール反応は、1xの反応緩衝液、10ngのpWhitescript 4.5kbコントロールプラスミド、125ngのオリゴヌクレオチドコントロールプライマー#1、125ngのコントロールプライマー#2、1µLのdNTPミックス、及び2.5ユニットのPfuUltra HF DNAポリメラーゼを含む50µLの最終体積中で実施した。サンプル反応は、1xの反応緩衝液、10ngのプラスミド鋳型DNA(pDONR221_INSP181SV1-(N92T, G114S)-6HIS)、125ngのINSP181SV1(T92N) FP、125ngのINSP181SV1(T92N) RP、1µLのdNTPミックス、及び2.5ユニットのPfuUltra HF DNAポリメラーゼを含む50µLの最終体積中で実施した。温度サイクリングは、MJ Research DNA Engine(以下のようにプログラムした：95 で1分；95 で30秒、60 で1分及び68 で3分30秒を18サイクル；続いて68 で7分の最終伸長さらに4 での維持サイクル)を用いて実施した。

DpnI消化を用いてメチル化又はヘミメチル化された親DNA鋳型(サンプル反応中のpDONR221_INSP181SV1-6HIS)を消化した。1µLのDpnI制限酵素(10U/µL, Stratagene)をコントロール及びサンプル増幅反応物に添加した。前記反応物を穏やかに混合し、37 で1時間インキュベートした。続いて、各反応混合物でXL1-Blue高コンピテント細胞(Stratagene)を以下のように形質転換した。XL1-Blue細胞の50µLを氷上で融解し、1µLのDpnI処理DNAを添加した。前記混合物を氷上で30分インキュベートし、続いて厳密に45秒でインキュベートして熱ショックを施した。サンプルを氷上に2分戻し、250µLの予め加温した(42) NZY培養液を添加した。サンプルを振盪しながら(220rpm) 37 で1時間インキュベートした。続いて、コントロールの形質転換混合物(250µL)をアンピシリン(100µg/ml)、X-gal(80µg/ml)及び20mMのIPTGを含むL-ブロス(LB)プレート上にプレATINGし、37 にて一晩インキュベートした。サンプルの形質転換混合物(2枚のプレートの各々に250µL)をアンピシリン(100µg/ml)、X-gal(80µg/ml)及び20mMのIPTGを含むL-ブロス(LB)プレート上にプレATINGした。プレートを37 で一晩インキュ

【0105】

4.5 プラスミドDNAの調製及び配列決定：

1個の形質転換体を選別し、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen)を用いて5mLの培養からミニプレッププラスミドDNAを調製した。CEQ Dye Terminator CycleシーケンシングQuick Start Kit(Beckman Coulter P/N 608120)を用い製造業者の指示にしたがって、21M13及びM13RevプライマーによりプラスミドDNA(150 - 200ng)をDNAシーケンシングに付した。前記プライマー配列は表2に示されている。シーケンシング反応をCEQ2000 XL DNA解析システム(Beckman Coulter P/N608450)で解析した。修正した変異を有する挿入物の配列を確認した後、pDONR221_INSP181SV1-(G114S)-6HISを第二の修正(S114G)を実施

するための鑄型として用いた。位置特異的変異導入-2は、上記に記載したプロトコル及び条件を用いて実施した。位置特異的変異導入-2に用いたプライマーは、INSP181SV1(S114G) FP及びINSP181SV1(S114G) RPであった。配列解析で、予想したINSP181SV1挿入物配列を含むクローンが同定された(pDONR221_INSP181SV1-6HIS)。

4.6 Gateway適合INSP181SV1 ORFの発現ベクター-pEAK12d及びpDEST12.2へのサブクローニング：

次にpDONR221_INSP181SV1-6HISのプラスミドDNA(2µL又は約150ng)を、最終体積10µL中にpEAK12dベクター又はpDEST12.2ベクター(0.1µg/µL)のどちらかの1.5µL、2µLのLR緩衝液及び1.5µLのLRクローナーゼ(Invitrogen)を含む組換え反応に用いた。

1µLのプロテイナーゼK(2µg/µL)を添加し、37℃で更に10分間インキュベートすることにより反応を停止させた。この反応物の一部(2µL)を用いてDH5株(Invitrogen)を以下のように形質転換した：DH5細胞の50µLを氷上で融解し、2µLの反応混合物を添加した。この混合物を30分氷上でインキュベートし、続いて42℃で厳密に30秒インキュベートすることによって熱ショックを施した。サンプルを氷上に戻し、250µLの温かい(室温)SOC培地(0.5ml)を添加した。サンプルを振盪しながら(250rpm)37℃で1時間インキュベートした。続いて、この形質転換混合物をアンピシリン(100µg/ml)含有L-ブロス(LB)プレート上にプレーティングし、37℃で一晩インキュベートした。

5つの形質転換体を採取し、アンピシリン(100µg/mL)含有LB寒天プレートに接種し37℃で一晩インキュベートした。前記接種プレート由来の増殖培養の1すくい(50µLの水)に再懸濁し5分間煮沸して細胞を溶解させた。前記細胞溶解物を遠心して細胞破砕物を除去し、得られた上清をコロニーPCRスクリーニングのための鑄型として用いた。

PCR混合物(最終体積25µL)は、10µLの遠心細胞溶解物、2.0µLのdNTP(10mM)、2.5µLのTaqポリメラーゼ緩衝液、0.5µLのスクリーニングプライマー(最終濃度100ピコモルを提供する)及び0.5µLのTaq DNAポリメラーゼを含んでいた。pEAK12dクローンはプライマー-pEAK12 FP及びINSP181 MAT RPを用いてスクリーニングし、さらにpDEST12.2クローンはプライマー-21M13FP及びINSP181 MAT RPを用いてスクリーニングした。

スクリーニングPCR反応のための条件は以下のとおりであった：95℃で2分；続いて94℃で30秒、60℃で30秒及び72℃で1分を30サイクル；及び72℃で5分の最終伸長サイクルさらに4℃での維持サイクル。PCR生成物は1.6%のアガロースゲルにロードして断片のサイズを確認した。

1個の陽性クローンを選別し、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen)を用いて5mLの培養物からミニプレッププラスミドDNAを調製した。

上記に記載したように、シーケンシングプライマー-pEAK12 FP及びpEAK12 RPを用いて、pEAK12dベクター中のプラスミドDNA(150-200ng)をDNAシーケンシングに付した。pDEST12.2ベクター中のプラスミドDNA(150-200ng)は、シーケンシングプライマー-21M13 FP及びM13Rev RPを用いて上記に記載したようにDNAシーケンシングに付した。

配列を確認したクローンを、pEAK12d_INSP181SV1-6HIS及びpDEST12.2_INSP181SV1-6HISと称した。

配列を確認したクローンpEAK12d_INSP181-6HISの500mL培養から、Qiagen Maxi prepキットを製造業者の指示にしたがって用いMaxi-prep DNAを調製した。プラスミドDNAは1µg/µLの濃度でTE緩衝液中に再懸濁させ、-20℃で保存した。

配列を確認したクローンpDEST12.2_INSP181-6HISの500mL培養から、EndoFree Plasmid Megaキットを製造業者の指示にしたがって用い、エンドトキシンを含まないmaxi-prep DNAを調製した。精製プラスミドDNAは少なくとも3µg/µLの最終濃度でエンドトキシンを含まないTE緩衝液中に再懸濁させ、-20℃で保存した。

【0106】

実施例5：INSP181機能の生物学的関連の研究に適切なアッセイ

本発明の一部は、生殖系の異常/疾患及び自己免疫疾患/異常の治療又は診断に特に有用であろうと考えられる。以下のアッセイは、有用な生物学的効果を有する成分について試験するために有用であろうと考えられる。以下のアッセイのいくつかはテスト化合物を

タンパク質/ポリペプチドとして言及しているが、本発明の他の部分もまた“テスト化合物”として用いることができるように、当業者は容易に以下のアッセイを改変し得ることに留意されたい。

A. 生殖系の健康状態のアッセイ

JEG-3移植アッセイ：

このアッセイでは2-チャンバー系が用いられる。前記チャンバーでは、イシカワ細胞又はイシカワ条件付け培養液が下部チャンバーに配置されると、蛍光標識JEG-3細胞が、上部のチャンバーからマトリゲル被覆多孔質膜を通して下部チャンバーへ侵入する。遊走細胞をプレートリーダーで定量する。目的は、in vivoで着床促進に使用される、JEG-3細胞の侵入を増加させるタンパク質の同定である。

10

【0107】

オステオポンチンピースアッセイ（イシカワ細胞）：

このアッセイでは、オステオポンチン被覆蛍光ピースは胚盤胞の代わりにし、イシカワ細胞は、エストラジオールでそれら进行处理することによって結合を受容するように刺激される。目的は、着床時の子宮内膜の受容性を高めるための補助物質として、イシカワ細胞がオステオポンチンピースと結合する能力を増加させるタンパク質の同定である。

HuF6アッセイ：

このアッセイでは、目的は、妊娠初期の脱落膜形成強化の方法としてHuF6細胞によるPG E2（脱落膜形成のマーカ）の産生を増加させるタンパク質の同定である。

20

子宮内膜症アッセイ：

腹腔TNFαは、子宮から脱落した内膜細胞の腹腔中皮細胞への付着及び前記細胞上での増殖を誘発することにより子宮内膜症で役割を果たす。このアッセイでは、子宮内膜症時の付着についてのアッセイとして、BEND細胞がTNFαで処理される（前記はBEND細胞のフィブロネクチン被覆蛍光ピースとの結合能力を増加させる）。目的は、細胞のピース結合能に対するTNFαの刺激能力を低下又は阻害するタンパク質の同定である。

hLHRで安定的にトランスフェクトしたJC-410ブタ顆粒細胞を用いたサイクリックAMPアッセイ：

多嚢胞性卵巣症候群では、下垂体のLHが比較的高く、卵巣膜細胞からのアンドロゲン放出を誘発する。このアッセイでは、我々は、PCOS時の卵巣におけるLHの作用を低下させるために用いることができるLHシグナリングの阻害物質を探索する。JC-410ブタ顆粒細胞株をヒトLHレセプターで安定的にトランスフェクトした。LHによる処理はcAMP産生をもたらす。

30

hFSHRで安定的にトランスフェクトしたJC-410ブタ顆粒細胞を用いたサイクリックAMPアッセイ：

JC-410ブタ顆粒細胞株をヒトFSHRで安定的にトランスフェクトした。FSHによる処理はcAMP産生を刺激する（本アッセイでは前記が測定される）。目的は、顆粒細胞でFSH作用を強化するタンパク質の同定である。

【0108】

LベータT2（マウス）下垂体細胞アッセイ：

LbT2は不死化したネズミ下垂体性腺刺激細胞株である。アクチビン単独刺激又はGnRH+アクチビン刺激はFSHの分泌をもたらす。細胞は、GnRH+バイオスクリーン（Bioscreen）タンパク質で処理して、GnRHと協調的に作用してFSH産生を刺激するタンパク質を見つけるか、又はバイオスクリーンタンパク質単独で処理して、アクチビン単独処理のようにFSH分泌を刺激することができるタンパク質を見つけることができる。

40

卵丘膨張アッセイ：

卵丘-卵母細胞（cumulus-oocyte）複合体を用い、膨張を促進する成分を同定するアッセイを開発することができる。

RWPE増殖アッセイ：

良性前立腺過形成は、アポトーシスによる均衡が保たれていない前立腺上皮及び間質の増殖を特徴とし、前記器官の肥大をもたらす。RWPEは、HPV-18により不死化された正常な

50

ヒト前立腺上皮細胞株であり、初代ヒト前立腺上皮細胞（前記は常に利用可能であるとは限らない）の代用として用いられる。

HT-1080線維肉腫侵襲アッセイ：

蛍光標識HT-1080ヒト線維肉腫細胞を、2チャンパーシステムの上部チャンパーで培養し、多孔質マトリゲル被覆膜を通して底部チャンパーへ侵襲するように刺激することができる（底部チャンパーで前記細胞を定量する）。目的は前記侵襲を阻害する成分の同定である。

初代ヒト平滑筋アッセイ：

子宮の類線維症の1つの特徴は、平滑筋腫となった子宮平滑筋細胞によるコラーゲン沈着である。初代ヒト平滑筋細胞は、TGFβ処理によって刺激を受けてコラーゲンを産生する（前記はレピフ（Rebif）によってブロックされる）。目的は、この線維化現象を阻害するタンパク質の発見である。

ヒト平滑筋腫細胞増殖アッセイ：

ヒト平滑筋腫細胞を子宮の類線維症のモデルとして増殖アッセイで用いることができる。細胞は非常にゆっくりと増殖するが、エストラジオール及び増殖因子で刺激することができる。目的は、平滑筋腫細胞のエストラジオール依存増殖を阻害するタンパク質の同定である。

【0109】

U937遊走アッセイ：

子宮内膜症病巣は、腹腔へ免疫細胞を補充するサイトカインを分泌し、これにより内膜症に共通の炎症性症状を仲介する。RANTESは、子宮内膜症性間質細胞によって産生されることが示され、腹腔液に存在する。このアッセイでは、2-チャンパーシステムの下層を処理することによって、U937（活性化マクロファージのモデルとして用いられる単球細胞株）を上部チャンパーからの遊走を誘発することができる。細胞に予め蛍光色素を付加するならば、下部チャンパーで細胞を定量することができる。目的は、U937細胞の遊走を阻害するタンパク質を同定することである。

JEG3ヒト栄養膜アッセイ：

胚盤胞の栄養膜はHLA-G（クラスI HLA分子）を産生し、前記は母体による胎児の免疫学的拒絶の防止に重要であると考えられる。前子癩時に、HLA-Gレベルは低い又は存在しない。JEG-3ヒト栄養膜細胞株はHLA-Gを産生し、HLA-G産生を増加させることができる成分を同定することができる。

初代ラット卵巣分散物アッセイ：

未成熟ラット又は他のげっ歯類から採取した全卵巣の細胞培養のエストラジオール産生量は、FSH及び/又はLH処理後に測定することができる。目的は、ゴナドトロピン刺激ステロイド産生を強化するタンパク質、又はこれらの培養によるステロイド産生を増加させるために単独で機能するタンパク質を同定することであろう。

マウスIVFアッセイ：

本アッセイでは、精子機能（卵母細胞を受精させる能力によって測定される）が、精子の授精能力を刺激するタンパク質を発見するという目的でアッセイされる。そのようなアッセイは、例えばマウスの精子及び卵母細胞を用いて実施することができる。

初代ヒト前立腺基質細胞増殖アッセイ：

BPHの上皮成分のためのアッセイは既に開発されている（上記RWPEを参照されたい）。本アッセイは、初代ヒト前立腺基質細胞を、BPH時のこれら細胞の増殖のモデルとして用いる。目的は、これら細胞の増殖を阻害するタンパク質の同定であろう。

初代ヒト子宮平滑筋増殖アッセイ：

タンパク質及び他の成分を試験し、それによって初代ヒト子宮平滑筋細胞の増殖を阻害することができる成分を同定することができる。子宮平滑筋細胞の増殖は、子宮類線維症における腫瘍の発達の先触れである。

【0110】

B. 自己免疫アッセイ

10

20

30

40

50

	細胞及び刺激	リードアウト	生物学的解 釈	標的疾患
Tリンパ球	Fas-リガンド誘導Jurkat T細胞死	LDHの放出	T細胞死の調 節	自己免疫疾 患
	スーパー抗原 (TSST) で刺激したヒトPBMC	増殖	T細胞増殖の 調節	自己免疫疾 患
		サイトカイン 分泌	T細胞サイト カイン分泌 調節	自己免疫疾 患
Tリンパ球 及び 抗原提示細胞	ヒト及びマウスMLR	増殖	T細胞増殖の 調節	自己免疫疾 患
		サイトカイン 分泌	T細胞サイト カイン分泌 調節	自己免疫疾 患
	ConA又はPHAで刺激 したヒトPBMC	サイトカイン 分泌	T細胞サイト カイン分泌 調節	自己免疫疾 患
単球 マクロファージ及び 顆粒球	LPSで刺激したヒトPBMC	サイトカイン 分泌	マクロファ ージ及び顆 粒球サイト カイン分泌 の調節	自己免疫疾 患
単球	THP-1のRANTES-誘導 カルシウムフラックス	FlipRによるカル シウムフラ ックス	単球活性化 の誘導	自己免疫疾 患
好中球	IL-8で刺激したヒト 好中球	細胞骨格再編 成	好中球遊走 の調節	自己免疫疾 患
Bリンパ球	ヤギ抗ヒトIgM抗体 及びrhIL-4で刺激し たヒトB細胞	生存	B細胞生存の 調節	自己免疫疾 患
	ヤギ抗ヒトIgM抗体、 rhIL-4及び可溶性rh BAFFで刺激したヒト B細胞	増殖	T細胞同時刺 激の調節	自己免疫疾 患
ミクログリア細胞	M-CSF活性化ミクロ グリア細胞	増殖	ミクログリ ア細胞の活 性化	MS

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

Tリンパ球応答を標的とするアッセイ

・ Fas-リガンド誘導T細胞死：このアッセイはレセプター仲介細胞死の新規な調節物質を明らかにするであろう。本アッセイでは、抗6Hisモノクローナル抗体と結合させた組換え6ヒスチジンタグ付加FasリガンドによるJurkat細胞の刺激によって、T細胞アポトーシスが誘発される。細胞死は、LDHの放出によって定量される（LDHは、細胞が死んだときに培養液中に放出される細胞質酵素である）。多くの自己免疫疾患でT細胞が病因であることが示され、抗原特異的T細胞死の制御能力をもつということは治療に有効な方法である。

。

・ ヒト-MLR：増殖及びサイトカイン分泌：この細胞性アッセイは、別のドナー由来のPB

MC (アロ反応性) による刺激時のリンパ球増殖及びサイトカイン分泌又は阻害に対する新規なタンパク質の影響を測定する。

・スーパー抗原 (TSST) で刺激したヒトPBMC: この細胞性アッセイでは、Tリンパ球活性化はTCRを介して特異的に標的化されるが、ただし特に同時刺激分子に関して、古典的抗原に対するT細胞応答とは異なる要件が存在する。

・ConA又はPHAで刺激したヒトPBMC: これらの細胞系アッセイは、種々の細胞に作用する2つの異なる刺激によって誘導されるサイトカイン分泌に対する新規なタンパク質の影響を測定する。前記はサイトカインビーズアレイ (CBA) アッセイ (IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-5、IL-4及びIL-10) によって測定される。

単球/マクロファージ及び顆粒球応答を標的とするアッセイ

・LPSで刺激したヒトPBMC: この細胞性アッセイは、単球/マクロファージ及び顆粒球に作用するLPSによって誘導されるサイトカイン分泌 (IFN- γ 、IFN- α) に対する新規なタンパク質の影響を測定する。

好中球応答を標的とするアッセイ

好中球の組織浸潤は、これら細胞の細胞形態学における特定の変化に付随する細胞骨格成分の再編成に左右される。本細胞性アッセイは、ヒト好中球の細胞骨格再編成に対する新規なタンパク質の影響を測定する。

Bリンパ球応答を標的とするアッセイ

・B細胞増殖: この細胞性アッセイはB細胞生存に対する新規なタンパク質の影響を測定する。

・B細胞同時刺激: この細胞性アッセイはB細胞同時刺激に対する新規なタンパク質の影響を測定する。

単球及びミクログリア細胞応答を標的とするアッセイ

・THP-1カルシウムフラックス: THP1-細胞アッセイのCa⁺-フラックスは、小胞体から細胞内カルシウムの放出を始動させるそれらの能力に対する新規なタンパク質の影響を測定する。

・ミクログリア細胞増殖: ミクログリア前駆細胞の増殖時に多数のコロニー刺激因子 (いくつかのサイトカインを含む) が重要な役割を果たすことが知られている。その中でM-CSFはマクロファージ/ミクログリアの成熟の最終工程にとって極めて重要であり、他のいずれの因子によっても代用し得ない。この生物学的応答の評価は、ミクログリア活性に影響を与える態様を示し、したがって治療的潜在能力を有する分子のMSからの同定の機会を提供することができる。当業者は、M-CSFに対するミクログリア細胞の増殖性応答を測定することができる細胞性アッセイを開発することができるであろう。

有用な他のアッセイには、サイトカイン発現調節アッセイが含まれる。簡単に記せば、種々のヒト末梢血単核球 (hPBMC) 細胞に対して作用するコンカナバリンAによって誘発されるサイトカイン分泌に対するテストタンパク質の影響が測定される。前記は、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-5、IL-4及びIL-10についてサイトカインビーズアレイ (CBA) アッセイで測定される。そのようなアッセイを用いて、“もっとも阻害される” サイトカインを決定し、そのようなサイトカインと相関性を有する疾患を文献で見出すことができる。

【 0 1 1 2 】

実施例5: ConA刺激PBMCによるサイトカイン分泌に対するINSP181の影響

5.1 要旨

マイトジェン (コンカナバリンA (ConA)) 刺激ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) によるサイトカイン分泌に対する影響についてINSP181を試験した。INSP181-6HISは、1/10希釈 (アッセイ中で46.2 μ g) で調べたとき、ConA刺激ヒトPBMCからのIL-10、IL-4及びIL-5分泌を刺激する。IFN- γ 、TNF- α 又はIL-2レベルに対する影響は認められなかった。

5.2 材料と試薬

- ・パフィーコート
- ・DMEM GIBCO Ref: 21331-020
- ・ヒト血清型AB SIGMA Ref: H1513

10

20

30

40

50

- ・ L-グルタミン GIBCO Ref:250 030-020
- ・ ペニシリン-ストレプトマイシン GIBCO Ref:150 070-063
- ・ フィコール PHARMACIA ref;17-1440-03
- ・ 細胞培養用96ウェルマイクロタイタープレート COSTAR Ref: 3596
- ・ コンカナバリンA SIGMA Ref: C0412
- ・ 水溶性デキサメタゾン SIGMA Ref: D2915
- ・ ヒトTh1/Th2サイトカインCBAキット Becton-Dicknson Ref: 550749
- ・ PBS GIBCO Ref: 14190-094
- ・ 滅菌FALCON 50mL Becton-Dicknson Ref: 2070
- ・ グリセロール MERCK Ref: 1-04092-2500
- ・ 円錐底96ウェルマイクロタイタープレート NUNC Ref: 249570

10

【 0 1 1 3 】

5.3 方法

5.3.1 パフィーコートからのヒトPBMCの精製

パフィーコートをDMEMで1：2に希釈する。

50mLのファルコン管中の15mLフィコール層に25mLの希釈血液をゆっくりと添加する。

前記管を遠心する（2000rpm、20分、室温、ブレーキ無し）。

界面（リング）を採集し、25mLのDMEMで細胞を洗浄し、続いて遠心工程（1200rpm、5分）を実施する。3回繰り返す。パフィーコートは合計約 600×10^6 の細胞を提供するであろう。

20

5.3.2 活性テスト

1.25×10^6 細胞/mL（DMEM + 2.5%のヒト血清 + 1%のL-グルタミン + 1%のペニシリン-ストレプトマイシンで希釈）の80 μ Lを96ウェルマイクロタイタープレートに添加する。

以下を各ウェルに10 μ L添加する（各ウェルに1条件）：PBS + 20%グリセロール中にAS902285/1。

以下を各ウェルに10 μ L添加する：50 μ g/mLのConA（ConAの最終濃度は5 μ g/mL）。

48時間後に細胞上清を採集し、ヒトサイトカインをヒトTh1/Th2サイトカインCBAキット（Becton-Dickinson）で測定する。

5.3.3 CBA解析

ヒトTh1/Th2捕捉ビーズ混合物を供給業者（CBAキット、Becton-Dickinson Ref: 550749）の指示に従って調製する。簡単に記せば：

30

- 実験に必要なアッセイ管の数を決定する。
- 混合の前に各捕捉ビーズ懸濁物を数秒間激しく渦流で攪拌する。
- 解析されるべき各アッセイについて、各捕捉ビーズの10 μ Lアリコットを“混合捕捉ビーズ”と標識した単一の管に添加する。
- ビーズ混合物を渦流で完全に攪拌する。

テストサンプルの調製

- アッセイ希釈液を用いて上清を1：5に希釈する（20 μ Lの上清 + 60 μ Lのアッセイ希釈液）。

- サンプル希釈物を混合し、その後サンプルを円錐底96ウェルマイクロタイタープレート（Nunc）に移す。

40

ヒトTh1/Th2サイトカインCBAアッセイ手順

- 前記希釈上清の50 μ Lを円錐底96ウェルマイクロタイタープレート（Nunc）に添加する。

- 50 μ Lの混合捕捉ビーズを添加する。
- 50 μ LのヒトTh1/Th2 PE検出試薬を添加する。
- 前記プレートを3時間RTでインキュベートし、直射光の暴露を防ぐ。
- 1500rpmで5分遠心する。
- 上清を注意深く廃棄する。
- 200 μ Lの洗浄緩衝液を各ウェルに添加し、1500rpmで5分遠心する。

50

- 注意深く上清を廃棄する。
- 200 μ Lの洗浄緩衝液を各ウェルに添加し、1500rpmで5分遠心する。
- 注意深く上清を廃棄する。
- 130 μ Lの洗浄緩衝液を各ウェルに添加し、ビーズペレットを再懸濁する。
- サンプルをフローサイトメトリーで分析する。
- データはCBAアプリケーションソフト、アクティビティーベース及びマイクロソフトエクセルソフトを用いて解析する。
- 結果は、ConA刺激によって達成されたサイトカインレベル（100%）対非刺激細胞（0%）と比較したサイトカイン分泌の百分率で示される。

【0114】

10

5.4 結果

ある実験では、INSP181-6HISは、CBAアッセイを用いて測定したとき、ConA刺激PBMCからのIL-10（196%）並びにTh2サイトカインIL-4（257%）及びIL-5（165%）の分泌を刺激したが、IFN- γ 、TNF- α 又はIL-2分泌に対する影響は示されなかった（表3）。したがって、本発明は、本発明のポリペプチドはTh2サイトカイン、より具体的にはインターロイキン-10（IL-10）、インターロイキン-4（IL-4）及びインターロイキン-5（IL-5）をアップレギュレートするという発見に基づく。さらにまた、このアップレギュレーションはTh2サイトカインに特異的である。なぜならば、Th1サイトカインレベル（すなわちIFN- γ 、TNF- α 又はIL-2）は不変であったからである。このサイトカイン発現の固有のプロファイルは、本発明のポリペプチドのTh1疾患の治療薬としての潜在的な有用性をもたらす（そのアンタゴニストはTh2疾患で有用である）。

20

【0115】

表3：ConA刺激ヒトPBMCによるサイトカイン分泌に対するINSP181-6HISの影響

アッセイ	プロトコル	プレート/ウェル	回数	%刺激	標準偏差	濃度
細胞-CBA	CON-HPBL-IFN-10-02	MP-9089/G05	1	96.00%	N/A	.1希釈
細胞-CBA	CON-HPBL-IL10-10-02	MP-9089/G05	1	196.00%	N/A	.1希釈
細胞-CBA	CON-HPBL-IL2-10-02	MP-9089/G05	1	107.00%	N/A	.1希釈
細胞-CBA	CON-HPBL-IL4-10-02	MP-9089/G05	1	257.00%	N/A	.1希釈
細胞-CBA	CON-HPBL-IL5-10-02	MP-9089/G05	1	165.00%	N/A	.1希釈
細胞-CBA	CON-HPBL-TNF-10-02	MP-9089/G05	1	138.00%	N/A	.1希釈

30

【0116】

実施例6

6.1リアルタイムPCR（Taqman）によるINSP181遺伝子発現レベルの解析

RT-PCR用Superscript III第一鎖合成システム（Invitrogen、カタログ番号18080-051）を用いて、各サンプル由来の全RNAを最終反応体積20 μ Lで逆転写した。全RNAの2 μ gを以下と混合した：10 μ Lの体積中に50ngのランダムヘキサマープライマー、各々10mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、並びにDEPC処理水。前記混合物を65 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートし、続いて氷上で1分冷却した。以下のcDNA合成ミックス10 μ Lを別個の管で調製した：2 μ Lの10 \times RT緩衝液、4 μ LのMgCl₂（25mM）、2 μ LのDTT（0.1M）、1 μ LのRNaseOUT（商標）（40ユニット/ μ L）及び1 μ LのSuperScript III（商標）RT酵素（200ユニット/ μ L）。前記cDNA合成ミックスをRNA/プライマー混合物に添加し、穏やかに混合し、さらに25 $^{\circ}$ Cで10分、続いて50 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートした。RT酵素を85 $^{\circ}$ Cで5分インキュベートして不活化した。前記反応混合物を氷上で冷却し、続いて1 μ Lの大腸菌RNaseH（2単位/ μ L）を添加し、前記混合物を37 $^{\circ}$ Cで20分インキュベートした。この混合物を氷上で冷却し、続いて滅菌水で1/250に希釈した。続いて前記逆転写酵素反応の希釈物をTaqMan装置（PE Biosystems 7700）でリアルタイムPCR解析に付した。ヒトINSP181及びハウスキーピングコントロール遺伝子（グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（GAPDH）のためのPCRプライマーは、プライマー発現ソフト（PE Biosystems）を用いて設計した。フォワードプライマ

40

50

ーはエキソン1中に設計した。リバースプライマーはエキソン2中に設計した、このプライマーはINSP181とINSPSV1を区別しないであろう。

【0117】

プライマーの配列は表4に示されている。特異性及びTaqMan解析に用いられる最適プライマー濃度は、プラスミドpEAK12d-INSP181-6HIS及びpEAK12d-INSP181SV-6HISの一連の希釈に対してINSP181プライマーを試験することによって決定した。cDNAへのゲノムDNA夾雑の可能性は、GAPDHイントロン配列に特異的なプライマーを用いるPCR反応の実施によって排除された。非特異的な増幅が存在しないように、4%アガロースゲルでのPCR生成物を解析することによって管理し、予想される分子量の単一バンドの生成を確認した。

SYBRグリーンリアルタイムPCR反応は以下を含む50 μ Lの反応体積で実施した：25 μ LのSYBRグリーンPCRマスターミックス（PE Biosystems）（前記に対して0.5ユニットのAmpErase ウラシルN-グリコシラーゼ（UNG, PE Biosystems）が先に添加されてあった）、各々300nMの増幅プライマー及び5 μ LのRT-PCR生成物。サイクリングは、以下のようにプログラムしたABI PRISM 7700（TaqMan）検出システムを用いて実施した：50 で2分の1サイクル；95 で10分；95 で15秒、60 で1分を40サイクル。各反応は二つ組で実施し、結果を平均した。

このようにして逆転写cDNAサンプルのプライマー特異的領域が増幅され、それらのサイクル閾値（Ct）が決定された。各cDNAサンプルに対するCt値は、ハウスキーピング遺伝子GAPDHのCt値に対し以下のように正規化した。各cDNAサンプルにおけるGAPDH遺伝子とINSP181遺伝子との間の発現レベルの相違をCt値の相違として表した。すなわちデルタ（ Δ ）Ct = Ct（GAPDH） - Ct（INSP181）。続いて各サンプルについての結果を、GAPDH遺伝子発現のサイクル数に対して検出可能なINSP181遺伝子発現に要求されるサイクル数の相違倍数として、以下の式にしたがって表した：相違倍数 = $2^{-(\Delta Ct)}$ 。最後に、各cDNAサンプルにおけるINSP181遺伝子の発現レベルは、INSP181の相違倍数で100を割ることにより、GAPDH遺伝子発現レベルに対して相対的に示した（ここでGAPDH発現レベル = 100%）。

【0118】

6.2 結果

INSP181プライマーを約100の正常及び病気のヒト組織サンプル、初代細胞及び細胞株パネルに加えてIL18BP臨床試験から得た44の炎症性腸疾患の結腸及び回腸生検材料並びに39の乾癬生検材料で調べた。結果は表5及び6に示され、図12及び13ではグラフで表されている。INSP181発現は、驚くべきことに、皮膚（GAPDHの0.16%）（表5、図12）及び乾癬患者由来の皮膚生検材料（19/39サンプルが陽性）（表6、図13）において低レベルで検出されただけであった。エキソン4/6（エキソン4でフォワードプライマー及びエキソン6でリバースプライマー）に特異的な第二のプライマー対によって皮膚特異性が確認された。

発現の結果は、皮膚生検サンプル及び乾癬皮膚生検材料で予想に反するINSP181の限定的な発現を示している。

この特有の発現パターンによって、INSP181の皮膚疾患における中心的関与が結論付けられた。好ましくは、前記皮膚疾患はTh1又はTh2皮膚疾患である。好ましくは、Th1疾患は乾癬である。

本発明のポリヌクレオチド及び対応するポリペプチドの特徴であるこれらの驚くべき特性によって、前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドは薬剤又は医薬組成物の調製に特に適切である。このようにして本発明のポリヌクレオチド又は対応するポリペプチドは、特定の組織で限定的に発現されるという予想し得なかった発見が得られた。

【0119】

表4：TaqMan PCRプライマー配列

プライマー	配列 (5'-3')
h-INSP181-57F4	TGCCCAGAAGGCTCTGGAA
h-INSP181-199R4	GAGTGGAGAGCGAGCCTCAG
hGAPDH-F	CCACCCATGGCAAATTC
hGAPDH-R	GATGGGATTTCCATTGATGACA
Intron-hGAPDH-F	CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT
Intron-hGAPDH-R	CTGTGCTCCCCTCTGATTT

【 0 1 2 0 】

表5：RT-PCR (TaqMan) によって測定した主要ヒト組織における INSP181 の発現

正常ヒト組織	Ct hGAPDH	Ct hINSP181	デルタct	相違倍数	GAPDH (=100)比
S76脳	19.44	35.87	-16.43	88307.33	0.00
S77心臓	20.16	36.81	-16.65	102847.63	0.00
S78腎臓	19.41	34.71	-15.30	40248.46	0.00
S79肝臓	20.93	37.96	-17.03	133696.30	0.00
S80肺臓	21.65	36.46	-14.81	28811.12	0.00
S81胎盤	21.71	33.42	-11.71	3345.11	0.03
S82骨格筋	15.59	37.22	-21.63	3251044.79	0.00
S83小腸	18.27	35.85	-17.59	196700.49	0.00
S84脾臓	21.63	35.17	-13.54	11885.82	0.01
S85胸腺	19.36	33.64	-14.28	19884.13	0.01
S86子宮	19.76	38.67	-18.91	493684.90	0.00
S89脊髄	19.75	35.61	-15.87	59718.96	0.00
S 90子宮頸	22.17	34.98	-12.81	7179.00	0.01
S91結腸	19.67	36.65	-16.99	129964.13	0.00
S92卵巣	20.84	37.72	-16.88	120767.86	0.00
S93前立腺	19.80	35.88	-16.08	69164.90	0.00
S94精巣	20.05	35.80	-15.75	55167.63	0.00
S95皮膚	23.39	32.72	-9.33	641.93	0.16
S113膵臓	21.12	36.18	-15.06	34140.49	0.00
S119乳房	20.28	39.91	-19.62	806755.23	0.00
S120 胃	21.80	38.54	-16.74	109334.52	0.00
S122 眼	21.16	37.70	-16.54	95534.29	0.00
S147膀胱	19.21	33.69	-14.48	22777.41	0.00

【 0 1 2 1 】

表6：RT-PCR (TaqMan) によって測定した、IL18BP臨床試験から得た病気の皮膚生検材料における INSP181 の発現

乾癬	Ct hGAPDH	Ct hINSP181	デルタct	相違倍数	GAPDH (=100)比
#11 A2872102 -2	20.90	34.36	-13.46	11306.74	0.01
#16 A2872103 -1	24.39	29.31	-4.92	30.19	3.31
#28 A2872023 -1	22.85	38.42	-15.57	48690.17	0.00

10

20

30

40

50

#36 -1	A2872028	25.37	34.04	-8.67	406.67	0.25
#39 -1	A2872025	22.41	34.00	-11.59	3089.02	0.03
#59 3	E1328972-	23.46	31.89	-8.44	346.19	0.29
#60 -2	E1328972	21.22	37.35	-16.12	71255.76	0.00
#61	E1329004	25.11	38.12	-13.00	8203.29	0.01
#63 3	E1328973-	23.15	40.00	-16.85	118472.89	0.00
#64 2	E1329003-	21.05	36.32	-15.27	39647.25	0.00
#66 4	E1328974-	22.28	32.06	-9.78	881.12	0.11
#68 3	E1328975-	22.80	28.83	-6.03	65.14	1.54
#69 -4	E1328975	23.75	39.20	-15.45	44792.00	0.00
#70 6-1	E132900	25.60	36.62	-11.02	2075.71	0.05
#71 -3	E1328976	24.41	32.68	-8.27	308.23	0.32
#72 -4	E1328976	23.01	35.38	-12.37	5282.35	0.02
#73 -1	E1329005	23.67	34.77	-11.10	2193.42	0.05
#74 -2	E1328977	24.00	32.14	-8.14	282.24	0.35
#75 -3	E1328977	21.88	32.04	-10.16	1146.47	0.09
#77 3	E1348411-	23.19	31.49	-8.30	315.93	0.32
#78 2	E1348411-	23.19	31.63	-8.44	346.92	0.29
#79 1	E1348411-	18.93	35.83	-16.91	122965.58	0.00
#80 2	E1348414-	21.24	29.00	-7.76	216.69	0.46
#81	E1348414-1	21.07	40.00	-18.93	500034.81	0.00
#82 1	E1348446-	20.77	28.87	-8.10	274.63	0.36

10

20

30

40

#83	E1348415-3	20.77	29.81	-9.04	526.35	0.19
#84	E1348415-2	18.54	32.15	-13.60	12438.44	0.01
#85	E1348442-1	19.84	34.46	-14.61	25074.26	0.00
#86	E1348416-3	21.58	28.59	-7.02	129.48	0.77
#88	E1348445-1	21.55	39.17	-17.61	200512.76	0.00
#91	E1317749-2	24.51	32.70	-8.20	293.22	0.34
#95	E1317719-2	25.37	33.66	-8.29	312.71	0.32
#96	E1317719-3	23.52	40.00	-16.48	91584.99	0.00
#97	E1317751-2	22.80	35.40	-12.60	6201.23	0.02
#98	E1317723-2	25.21	35.90	-10.70	1657.76	0.06
#99	E1317723-3	23.86	32.91	-9.06	532.89	0.19
#101	E1317718-2	20.80	30.04	-9.24	606.53	0.16
#102	E1317718-3	22.86	36.13	-13.27	9887.33	0.01
#103	E1317750-2	20.94	35.46	-14.52	23478.87	0.00

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

実施例7：マイクロアレイ実験

60-mer長のオリゴヌクレオチドプローブを1塩基ずつプリントするアジレント・テクノロジー社 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) の非接触 *in situ* 合成プロセスを用いてデジタル配列ファイルからオーダーメイドのマイクロアレイを製造した。前記は、スポットされるべき化学物質の微量で正確な体積をデリバリーするインクジェット製法を用いて達成される。この反応で用いられる標準的なホスホロアミダイト化学は、完全長オリゴヌクレオチド合成の各工程で非常に高いカップリング効率の維持を可能にする。正確な量が再現性をもって“空中を飛んで”沈着される。この操作妙技は、スライド表面と接触するために停止することなく、かつ表面接触特徴変則性を導入することなく達成され、首尾一貫したスポット均質性及びトレース性をもたらされる (Hughes et al. 2001, Nat Biotech Apr; 19(4):342-7. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer)。

プローブ合成

方法はアジレント社の指示にしたがって実施された。本質的には、cDNA合成及びその後のシアニン3(5)-CTP標識cRNAプローブのT7ポリメラーゼ増幅は、アジレント社の低RNAインプットフルオレセントリニア増幅キットを用い、5 µgの全RNA鋳型からキットプロトコル (ヴァージョン2 August 2003, Agilent, Palo Alto, CA) にしたがって実施された。続いて、cRNAをアジレントの *In situ* ハイブリダイゼーションキット-プラスを用いて断片

化し、アジレントのプロトコル（アジレント60-merオリゴマイクロアレイプロセッシングプロトコル、バージョン4.1 April 2004, Agilent, Palo Alto, CA）にしたがって双方をハイブリダイズさせる。

マイクロアレイチップの設計

- ・ 10,536プローブがアレイ上に存在する。
- ・ 5557のプローブは、主要対象の分泌配列を検出するために特異的に設計される。
- ・ 1000プローブは陰性コントロールとして設計される。
- ・ 500プローブは陽性コントロールとして設計される。
- ・ 残りのプローブは、可溶性細胞外分泌タンパク質であるか、又は細胞外環境と接触する細胞外ドメインをもつ膜結合タンパク質であることが判明している、公開ドメイン配列に対して設計される。

10

INSP181に特異的な研究

INSP181はそれぞれ別個のエキソン成分から構成される。我々は、10の正常組織、骨髄、脳、肺、卵巣、PBMC、胎盤、前立腺、脾及び精巣から合成したプローブを用いてチップをプロファイリングしようとした。発現の記録はエキソン毎に入手することができる。

データの平均化は、One-step Tukey Bi-Weightアルゴリズム（Data Analysis and Regression: A Second Course in Statistics", Mosteller and Tukey, Addison-Wesley, 1977, pp.203-209；さらにまたAffymetrix MAS5.0アルゴリズムも参照されたい）を用いて実施する。この目的は、データセットの平均値の大雑把な概算を明瞭に規定することである。この事例では、我々のデータセットは、単一エキソンについて多数のプローブの発現値を含むであろう。

20

このカスタムアレイは多くの理由から有用である。第一に、それによって転写物の存在及び配列の確認が可能になる。第二に、INSP181ポリペプチド配列の組織分布を評価することができ、したがって疾患におけるこのポリペプチドの役割を明らかにすることができる。本アレイをまた診断ツールとして用いて、このポリペプチドが相関性を示す症状を有する患者の発症率を診断することができる。エキソン特異的プローブを使用することによって、このポリペプチド配列のサブタイプ変種の発現におけるいずれの変動も、一般的に、特定の組織で、及び特定の症状で評価することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0123】

30

【図1】 INSP181と公開タンパク質データベースとのBLASTの結果。

【図2】 INSP181に対する最高blastヒットのアラインメント。

【図3】 INSP181についてのSignalPの出力結果。

【図4】 INSP181及び関連リポカリンドメイン含有配列のマルチ配列アラインメント。

【図5】 INSP DNA及びタンパク質配列。PCRプライマーの位置及び向きは矢印で示されている。

【図6】 INSP181-CP3及びINSP181-CP4 PCRプライマーを用いてクローニングしたcDNAのINSP181予想物とのヌクレオチド配列アラインメント。

【図7】 INSP181-CP3及びINSP181-CP4 PCRプライマーを用いてクローニングしたcDNAのINSP181予想物とのアミノ酸配列アラインメント。

40

【図8】 プライマーINSP181-CP3及びINSP181-CP4を用いてクローニングしたINSP181 PCR生成物のヌクレオチド配列と翻訳物。

【図9】 プライマーINSP181-CP3及びINSP181-CP4を用いてクローニングしたINSP181-SV PCR生成物ヌクレオチド配列と翻訳物。

【図10】 INSP181のNetNGycの結果。グリコシル化部位は92位に示されている。

【図11】 INSP181の配列の翻訳及び特徴。

【図11-1】 図11の続き。

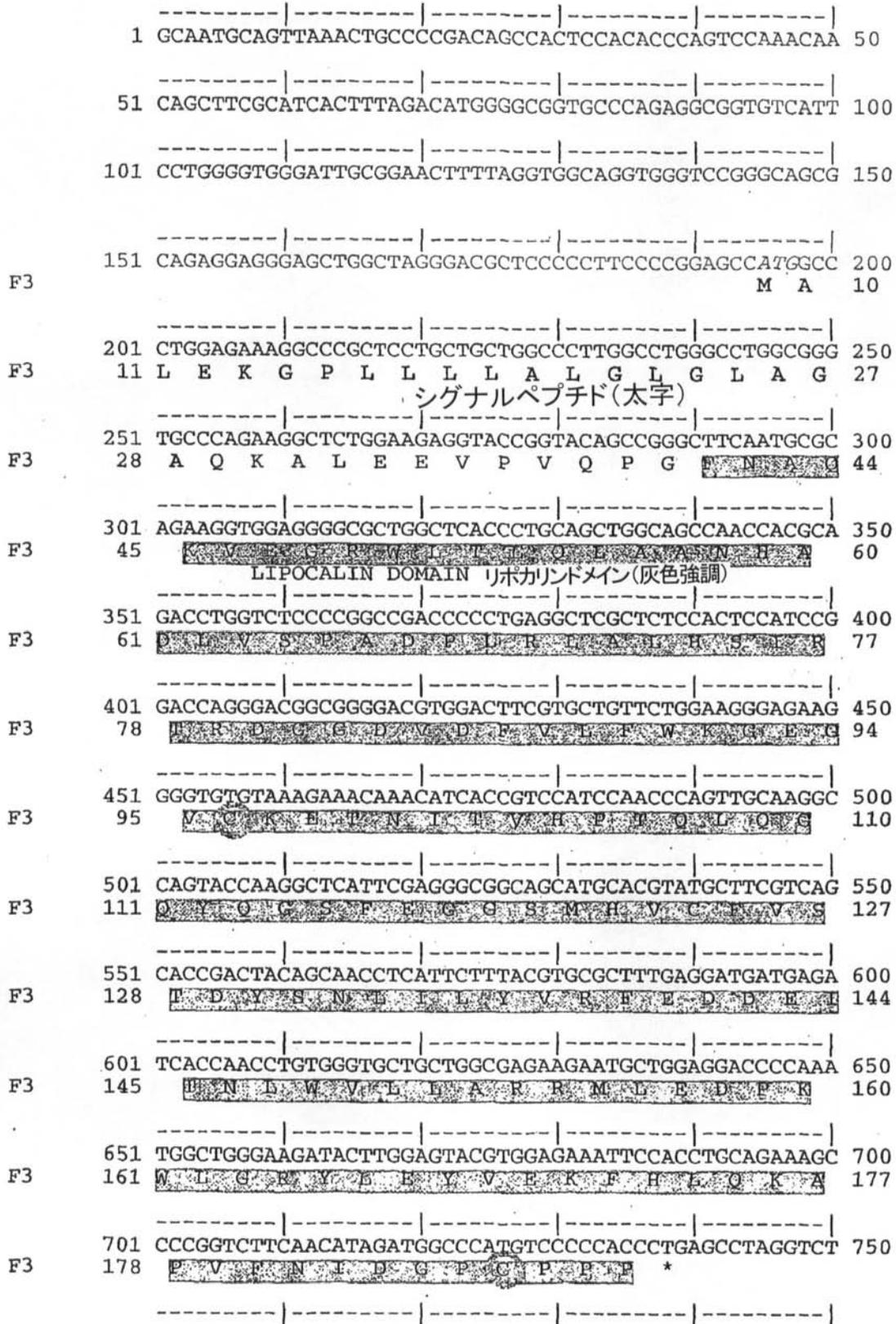
【図12】 RT-PCR (TaqMan) によって測定したヒトの主要組織におけるINSP181の発現。

【図13】 RT-PCR (TaqMan) によって測定した、IL18BP臨床試験から得た罹患皮膚生検材料におけるINSP181の発現。

50

【 図 1 1 】

Figure 11



2008536483000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年11月15日(2007.11.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列を含む、又は前記アミノ酸配列から成るポリペプチド；

(ii) リポカリンである、又は(i)記載のポリペプチドの1つ以上と共通の抗原決定基を有する、(i)のポリペプチドの断片；又は

(iii) (i)又は(ii)記載のポリペプチドの機能的等価物。

【請求項2】

請求項1(ii)記載の断片であるポリペプチドであって、配列番号:18のアミノ酸25 - 174、アミノ酸26 - 180、アミノ酸33 - 166、若しくはアミノ酸41 - 189、又は配列番号:24のアミノ酸25 - 206を含む、又は前記から成り、かつリポカリンであることを特徴とする、前記ポリペプチド。

【請求項3】

請求項1(iii)記載の機能的等価物であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列と相同であり、かつリポカリンであることを特徴とする、前記ポリペプチド。

【請求項4】

請求項1又は2記載の断片又は機能的等価物であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、若しくは配列番号:66に示すアミノ酸配列、又はその活性な断片と80%を超える配列同一性、好ましくは85%、90%、95%、98%、98.5%、99%又は99.5%を超える配列同一性を有するポリペプチド。

【請求項5】

請求項1から3のいずれか1項記載の機能的等価物であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドと有意な構造的相同性を示す、前記ポリペプチド。

【請求項6】

請求項1(i)記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する請求項1又は4記載の断片であるポリペプチドであって、配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:66又は配列番号:70に示すアミノ酸配列の7つ以上のアミノ酸残基から成る前記ポリペプチド。

【請求項7】

アミノ酸置換N92T及び/又はG114Sを含む、請求項1から6のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項8】

配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:56、配列番号:58又は配列番号:60に示された配列を有する、請求項6記載のポリペプチド。

【請求項 9】

請求項1から8のいずれか1項記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 10】

ヒスチジンタグを含む、請求項1から9のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項 11】

請求項10記載のポリペプチドであって、前記ポリペプチドの配列が配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:68又は配列番号:72に示された配列である、前記ポリペプチド。

【請求項 12】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする精製核酸分子。

【請求項 13】

配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71若しくは配列番号:72に示す核酸配列を含む、又は前記配列から成る、又はその重複等価物若しくは断片である、請求項12記載の精製核酸分子。

【請求項 14】

請求項12又は13記載の核酸分子と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする精製核酸分子。

【請求項 15】

請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 16】

請求項15記載のベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項 17】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドと特異的に結合し、好ましくはその活性を調節するリガンド。

【請求項 18】

抗体である、請求項17記載のリガンド。

【請求項 19】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドの発現レベル又は活性を増加若しくは減少させる化合物。

【請求項 20】

請求項1から9のいずれか1項記載のポリペプチドの生物学的作用のいずれも誘導することなく前記ポリペプチドと結合する、請求項19記載の化合物。

【請求項 21】

天然又は改変された基質、リガンド、酵素、レセプター又は構造的若しくは機能的模倣物である、請求項20記載の化合物。

【請求項 22】

疾患の治療又は診断に使用される、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項15記載のベクター、請求項16記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、又は請求項19から21のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 23】

患者からの組織において請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価すること、または、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドの活性を評価すること、および、前記発現レベルまたは活性をコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと相違するレベルを疾患の指標とする、患者の疾患を診断する方法。

【請求項24】

in vitroで実施される、請求項23記載の方法。

【請求項25】

以下の工程を含む、請求項23又は24記載の方法：

(a) 請求項17又は18記載のリガンドを生物学的サンプルとリガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；及び

(b) 前記複合体を検出する工程。

【請求項26】

(a) 患者の組織サンプルと核酸プローブとを、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体を形成させることができるストリンジェントな条件下で接触させる工程；

(b) コントロールサンプルと前記プローブとを、工程(a)で使用した条件と同じ条件下で接触させる工程；及び

前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程を含み、

コントロールサンプルのハイブリッド複合体のレベルと異なるハイブリッド複合体のレベルが患者サンプルで検出されることを疾患の指標とする、請求項23または24記載の方法。

【請求項27】

(a) 患者の組織の核酸サンプルと核酸プライマーとを、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子と前記プライマーとの間でハイブリッド複合体を形成させることができるストリンジェントな条件下で接触させること；

(b) コントロールサンプルと前記プライマーとを、工程(a)で使用した条件と同じ条件下で接触させること；及び、

(c) 前記サンプル核酸を増幅させること；

(d) 患者及びコントロールサンプルの両方から増幅された核酸のレベルを検出すること、を含み、

コントロールサンプルで増幅された核酸のレベルと有意に異なる増幅核酸レベルが患者サンプルで検出されることを疾患の指標とする、請求項23又は24記載の方法。

【請求項28】

以下の工程を含む、請求項23又は24記載の方法：

(a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子を単離する工程；

(c) 疾患に付随する変異の存在を前記疾患の指標として前記核酸分子で検出することにより、疾患について患者を診断する工程。

【請求項29】

さらに核酸分子を増幅させて増幅生成物を形成する工程及び前記増幅生成物中に変異の有無を検出する工程を含む、請求項28記載の方法。

【請求項30】

患者における変異の有無が、核酸分子を前記核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブとストリンジェントな条件下で接触させて、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分において前記核酸プローブ中に非ハイブリダイズ部分を有するハイブリッド二本鎖分子を形成させること；および、前記プローブ鎖の非ハイブリダイズ部分の有無を疾患付随変異の有無の指標として検出することを含む、請求項28又は29記載の方法。

【請求項31】

前記疾患が、視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症

性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患（例えばTh1皮膚疾患、例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病；Th2皮膚疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹）、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節、1型糖尿病、橋本病、グレーヴズ病（甲状腺炎）、慢性関節リウマチ、増殖性系球体半月形成性系球体腎炎、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシス、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症、アレルギー（例えばアレルギー性鼻炎、喘息、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎）、セザリー症候群、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染を含む（ただしこれらに限定されない）、請求項23から30のいずれか1項記載の方法。

【請求項32】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドのリポカリンとしての使用。

【請求項33】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項15記載のベクター、請求項16記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、又は請求項19から21のいずれか1項記載の化合物、を含む医薬組成物。

【請求項34】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、を含むワクチン組成物。

【請求項35】

視覚異常（例えば夜盲症）、免疫系の異常（例えば自己免疫疾患）、炎症性異常、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、直腸炎、細胞増殖性異常、癌（例えば乳癌、皮膚T-細胞リンパ腫、扁平上皮癌及び/又は基底細胞癌）、微生物感染（例えばウイルス、細菌及び菌類感染）、気腫、皮膚疾患（例えばTh1皮膚疾患、例えば乾癬又は角質増殖性皮膚病；Th2皮膚疾患、例えばアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、例えばニッケル又は金に対する接触アレルギー、皮膚T-細胞リンパ腫、アトピー性湿疹、急性湿疹及び/又は慢性湿疹）、生殖異常（例えば生殖能低下、特に男性の生殖能低下）、腎機能不全、心筋梗塞、関節炎、多発性硬化症、肉眼的乳房嚢胞病、神経系発生の調節、1型糖尿病、橋本病、グレーヴズ病（甲状腺炎）、慢性関節リウマチ、増殖性系球体半月形成性系球体腎炎、後部ブドウ膜炎、創傷治癒、及び/又はサルコイドーシス、紅色ひこう疹及び/又は汗孔角化症、アレルギー（例えばアレルギー性鼻炎、喘息、扁平紅色苔癬、慢性副鼻腔炎）、セザリー症候群、光線性角化症、C型肝炎、潰瘍性大腸炎、膜性系球体腎炎及び/又はウイルス感染を含む（ただしこれらに限定されない）疾患の治療用医薬の製造に使用される、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項15記載のベクター、請求項16記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、請求項19から21のいずれか1項記載の化合物、又は請求項33記載の医薬組成物。

【請求項36】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項14記載のベクター、請求項15記載の宿主細胞、請求項17若しくは18記載のリガンド、請求項19から21のいずれか1項記載の化合物、又は請求項33記載の医薬組成物。

【請求項37】

健常な者における天然の遺伝子の発現又はポリペプチドの活性と比較した場合に症状を有する患者において前記遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が低い疾患について、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、宿主細胞、リガンド、化合物又は組成物がアゴニストである、請求項36記載の方法。

【請求項 38】

健常な者における天然の遺伝子の発現又はポリペプチドの活性と比較した場合に症状を有する患者において前記遺伝子の発現又はポリペプチドの活性が高い疾患について、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、宿主細胞、リガンド、化合物又は組成物がアンタゴニストである、請求項36記載の方法。

【請求項 39】

患者由来の組織で請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドの発現レベル若しくは活性、又は請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子の発現レベルを一定期間モニターすることを含み、前記一定期間にわたる前記発現レベル若しくは活性のコントロールレベルへ向かう変化を疾患の緩解の指標とする、患者の疾患の治療処置をモニターする方法。

【請求項 40】

疾患の治療及び/又は診断に有効な化合物を同定する方法であって、請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチド又は請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子を、前記ポリペプチド又は核酸分子に対して結合アフィニティーを有すると考えられる1以上の化合物と接触させる工程、及び前記核酸分子又はポリペプチドと特異的に結合する化合物を選択する工程を含む、前記方法。

【請求項 41】

以下を含む疾患の診断に有用なキット：

ストリンジェントな条件下で請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；

前記核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを含む第二の容器；及び

疾患の診断を容易にするために、前記プローブ及びプライマーを使用するための指示書。

【請求項 42】

ハイブリダイズしないRNAを消化するための試薬を含む第三の容器をさらに含む、請求項41記載のキット。

【請求項 43】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも1つが請求項12から14のいずれか1項記載の核酸分子である、前記キット。

【請求項 44】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドと結合する1以上の抗体、及び、前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬を含むキット。

【請求項 45】

請求項1から11のいずれか1項記載のポリペプチドをより高いレベル若しくはより低いレベルで発現するか、又は発現しないように形質転換された、非ヒトトランスジェニック若しくは非ヒトノックアウト動物。

【請求項 46】

請求項45記載の非ヒトトランスジェニック動物を候補化合物と接触させ、前記動物の疾患に対する前記化合物の影響を決定することを含む、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 47】

リポカリン関連疾患の治療又は予防を目的とする候補薬剤のスクリーニングのための標的としてのINSP181ポリペプチドの使用。

【請求項 48】

以下の工程を含む、生物学的に活性な化合物を選択する方法：

(a) 候補化合物とINSP181ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞とを接触させる工程；

(b) 前記細胞の表面で前記INSP181ポリペプチドと結合する、及び/又は、INSP181ポリペプチドの活性を調節する化合物を選択する工程。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/000820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, PAJ, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MALLBRIS LOTUS ET AL: "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin." EXPERIMENTAL DERMATOLOGY. DEC 2002, vol. 11, no. 6, December 2002 (2002-12), pages 584-591, XP002382544 ISSN: 0906-6705	
A	XU S ET AL: "Lipocalins as biochemical markers of disease." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 18 OCT 2000, vol. 1482, no. 1-2, 18 October 2000 (2000-10-18), pages 298-307, XP002382545 ISSN: 0006-3002	
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
E earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 May 2006	26/06/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Weinberg, S	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2006/000820

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FLOWER D R ET AL: "The lipocalin protein family: structural and sequence overview." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 18 OCT 2000, vol. 1482, no. 1-2, 18 October 2000 (2000-10-18), pages 9-24, XP002382546 ISSN: 0006-3002	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/000820**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 23-31 are directed to a method of treatment or diagnosis practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB2006/000820

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 23-31 are directed to a method of treatment or diagnosis practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Continuation of Box II.2

Claims 17-21 are directed to compounds that are defined only by reference to a desirable property, namely that they bind to a polypeptide according to Claim 1, or that they either increase or decrease the level of expression or activity of a polypeptide according to Claim 1.

The claims cover all compounds having these characteristics or properties, whereas the application provides little or no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The search is restricted to those compounds for which support in the sense of Article 6 PCT exists in the application, namely antibodies and antisense polynucleotides.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	4 C 0 8 6	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 C 0 8 7	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 H 0 4 5	
A 0 1 K	67/033	(2006.01)	A 0 1 K	67/033	5 0 1		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02			
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02			
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/00			
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00			
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00			
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00			
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00			
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06			
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08			
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02			
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00			
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12			
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10			
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02			
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10			
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	5/14			
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/06			
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/02			
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	11/06			
A 6 1 K	35/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/16			
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	35/12			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	48/00			
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	45/00			
			G 0 1 N	33/53	D		

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

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 ヨーク スミス メラニー

スイス ツェーハー 1 2 3 2 コンフィニョン シュマン ド ヴィヨネックス 2 0 ア

(72)発明者 パワー クリスティン

フランス エフ - 0 1 7 1 0 トワリー リュー ド ジョンクイエ 1 0
(72)発明者 ボーシェルト ウルスラ
スイス ツェーハー 1 2 5 6 トロワネックス ルート ダネシー 1 0 0 セ
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11 HA14
4B063 QA01 QQ08 QQ42 QR08 QR62 QS25 QS34
4B065 AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 AA17 BA01 BA19 BA20 CA18 DA01
NA14 ZA012 ZA332 ZA362 ZA592 ZA662 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962
ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB312 ZB332 ZC352
4C085 AA03 AA13 BB11
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA33 ZA36
ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15
ZB26 ZB31 ZB33 ZC35
4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA59 ZA66 ZA75
ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB31 ZB33
ZC35
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	脂质运载蛋白		
公开(公告)号	JP2008536483A	公开(公告)日	2008-09-11
申请号	JP2008500259	申请日	2006-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	战神托盘资金兴业ANONYME		
[标]发明人	ヨークスミスメラニー パワークリスティン ポーシェルトウルスラ		
发明人	ヨーク スミス メラニー パワー クリスティン ポーシェルト ウルスラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/68 A01K67/033 A61K38/00 A61P27/02 A61P37/00 A61P29/00 A61P1/04 A61P35/00 A61P31/00 A61P11/00 A61P17 /00 A61P17/06 A61P37/08 A61P35/02 A61P15/00 A61P13/12 A61P9/10 A61P19/02 A61P3/10 A61P5 /14 A61P37/06 A61P17/02 A61P11/06 A61P1/16 A61K35/12 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/395 A61K39/00 A61K45/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35 /02 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A A01K67/033.501 A61K37/02 A61P27/02 A61P37/00 A61P29/00 A61P1/04 A61P35/00 A61P31/00 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P35/02 A61P15/00 A61P13/12 A61P9/10 A61P19 /02 A61P3/10 A61P5/14 A61P29/00.101 A61P37/06 A61P17/02 A61P11/06 A61P1/16 A61K35/12 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/00.H A61K45/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084 /BA01 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/CA18 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZB332 4C084/ZC352 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/BB11 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086 /EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086 /ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB31 4C086/ZB33 4C086/ZC35 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA33 4C087/ZA36 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087 /ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB31 4C087/ZB33 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	2005004767 2005-03-08 GB		
其他公开文献	JP4933527B2 JP2008536483A5		

摘要(译)

本发明基于以下发现：本文中称为INSP181蛋白的人蛋白是脂质运载蛋白。

アミノ酸	同義グループ	より好ましい同義グループ
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp