

(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2008-509655

(P2008-509655A)

(43) 公表日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/46 (2006.01)	C O 7 K 14/46	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-513969 (P2007-513969)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月3日 (2005.6.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年1月31日 (2007.1.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/052573
 (87) 国際公開番号 W02005/118641
 (87) 国際公開日 平成17年12月15日 (2005.12.15)
 (31) 優先権主張番号 04102511.5
 (32) 優先日 平成16年6月4日 (2004.6.4)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 599177396
 アプライド リサーチ システムズ エー
 アールエス ホールディング ナームロゼ
 フェンノートシャップ
 オランダ領アンチル, クラカオ, ピエテル
 マーイ 1 5
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 UNC5H2のsprays変異体

(57) 【要約】

本発明は、UNC5H2sprays変異体ポリペプチドであるUNC5H2d、及びそれをコードする核酸分子を提供する。本発明は、UNC5H2dポリペプチドを製造するための選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、及び方法もまた提供する。本発明は、UNC5H2dポリペプチドに関係する疾病、障害、及び健康状態の診断、処置、寛解、及び/又は予防のための方法及び医薬組成物を更に提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の：

(a) 配列番号1又は配列番号3のいずれかに記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドをコードするか、あるいは配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドに対して少なくとも約85%の同一性を示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、上記コードされたポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドの生物活性を有するが、但し、上記ポリペプチド配列が、配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のいずれとも同一ではないもの；

(c) 配列が配列番号2（配列番号4）に列挙したポリペプチドの成熟型をコードするヌクレオチド配列；

(d) 配列が配列番号2（配列番号11）に列挙したポリペプチドのヒスチジン・タグ型をコードするヌクレオチド配列；

(e) ストリンジェント条件下、配列番号1又は配列番号3のいずれかとハイブリダイズするか、配列番号1又は配列番号3のいずれかから成る核酸と少なくとも約30ヌクレオチドの長さにならって少なくとも約85%の同一性を示すか、あるいは上記DNA配列の相補体であるヌクレオチド配列であるが、但し、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のいずれとも同一ではないもの；

から成る群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 2】

少なくとも1つの保存アミノ酸置換を伴う、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子であって、コードされたポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに規定されたポリペプチドの生物活性を有する単離核酸分子。

【請求項 3】

請求項1又は2に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4】

請求項3に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 5】

真核細胞である、請求項4に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

原核細胞である、請求項4に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

UNC5H2dポリペプチドの製造方法であって、当該ポリペプチドを発現するのに好適な条件下、請求項4に記載の宿主細胞を培養するステップ、そして必要に応じて、上記培養物から当該ポリペプチドを分離するステップを含む方法。

【請求項 8】

請求項7に記載の方法によって入手可能なポリペプチド。

【請求項 9】

請求項1又は2に記載のいずれかの核酸分子によってコードされるポリペプチド。

【請求項 10】

前記核酸分子が、UNC5H2dポリペプチドをコードするDNAに作用可能に連結した天然のUNC5H2dポリペプチドのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 11】

前記同一性百分率が、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、及びSmithWatermanアルゴリズムから成る群から選択されるコンピュータ・プログラムを使用して測定される、請求項2に記載の単離核酸分子。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

化合物がUNC5H2dポリペプチド活性又はUNC5H2dポリペプチド産生を抑制するかどうか測定する方法であって、請求項4～6のいずれか1項に記載の細胞を当該化合物に曝露するステップ、そして上記細胞におけるUNC5H2dポリペプチド活性又はUNC5H2dポリペプチド産生を計測するステップを含む方法。

【請求項13】

配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項14】

配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のアミノ酸配列内の少なくとも1つの保存アミノ酸置換を伴う、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドの生物活性を有する単離ポリペプチド。

10

【請求項15】

配列が配列番号4に列挙された請求項13に記載の単離ポリペプチドの成熟型。

【請求項16】

前記単離ポリペプチドが配列番号2である、請求項13に記載の単離ポリペプチドの断片

。

【請求項17】

前記の断片が、以下の群：

(a) 配列番号2の第1～第355アミノ酸の範囲にわたる断片、又は

(b) 配列番号2の第26～第355アミノ酸の範囲にわたる断片、

から選択される、請求項16に記載の断片。

20

【請求項18】

前記の断片が、以下の群：

(a) 配列番号2の2つの免疫グロブリン・ドメイン及び2つのトロンボスポンジン・ドメインから成る断片、

(b) 配列番号2の2つの免疫グロブリン・ドメインから成る断片、又は

(c) 配列番号2の2つのトロンボスポンジン・ドメインから成る断片、

から選択される、請求項16に記載の断片。

【請求項19】

配列が配列番号11に列挙された請求項13に記載の単離ポリペプチドのヒスチジン・タグ型。

30

【請求項20】

請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチドに特異的に結合する選択的結合因子又はその断片。

【請求項21】

配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のアミノ酸配列、あるいはその断片を含むポリペプチドに特異的に結合する、請求項20に記載の選択的結合因子又はその断片。

【請求項22】

抗体又はその断片である、請求項21に記載の選択的結合因子。

40

【請求項23】

キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項22に記載の選択的結合因子。

【請求項24】

請求項22又は23に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与するステップを含むUNC5H2ポリペプチド関連疾患、健康状態、又は障害を処置、予防、又は寛解するための方法。

【請求項25】

配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって製造された選択的結合因子。

【請求項26】

50

請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチドに結合することができる選択的結合因子を産生するハイブリドーマ。

【請求項27】

請求項22又は23に記載の抗UNC5H2d抗体又はその断片を使用したUNC5H2dポリペプチドを検出するか、又はその量を定量する方法。

【請求項28】

請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチド、及び医薬として許容される製剤を含む組成物。

【請求項29】

前記医薬として許容される製剤が、担体、アジュバント、可溶化剤、安定化剤、又は抗酸化剤である、請求項28に記載の組成物。

10

【請求項30】

前記ポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、請求項28に記載の組成物。

【請求項31】

請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチドの誘導体を含むポリペプチド。

【請求項32】

水溶性高分子によって共有結合的に修飾される、請求項31に記載のポリペプチド。

【請求項33】

前記水溶性高分子が、ポリエチレングリコール、モノ-メトキシ・ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール・ホモポリマー、ポリプロピレン・オキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、及びポリビニルアルコールから成る群から選択される、請求項32に記載のポリペプチド。

20

【請求項34】

請求項1又は2に記載の核酸分子、及び医薬として許容される製剤を含む組成物。

【請求項35】

前記核酸分子が、ウイルス・ベクター内に含まれる、請求項34に記載の組成物。

【請求項36】

請求項1又は2に記載の核酸分子を含むウイルス・ベクター。

30

【請求項37】

異種アミノ酸配列に融合した請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む融合ポリペプチド。

【請求項38】

前記異種アミノ酸配列がIgG定常ドメイン又はその断片である、請求項37に記載の融合ポリペプチド。

【請求項39】

請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチド、あるいは請求項1又は2に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与するステップを含む病状を処置、予防、又は寛解するための方法。

40

【請求項40】

疾病の処置、及び/又は予防用医薬品の製造のための、請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項41】

以下の(i)請求項13～19のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項1又は2に記載の核酸分子、請求項3に記載のベクター、請求項4～6のいずれか1項に記載の宿主細胞、請求項20～23又は25のいずれか1項に記載の選択的結合因子、請求項28～30、34、又は35のいずれか1項に記載の組成物、請求項31～33のいずれか1項に記載の誘導体を含むポリペプチド、あるいは請求項37又は38に記載の融合ポリペプチド、(ii)少なくとも1種類の医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物。

50

【請求項42】

前記疾病が、癌、心臓血管障害、及び/又は血液学に関連した障害から選択される、請求項40に記載の使用。

【請求項43】

前記心臓血管障害が、心肺停止、弁膜心疾患、動脈高血圧、心内膜炎、体位性低血圧、失神、心膜疾患、動脈硬化、心臓腫瘍、冠動脈疾患、大動脈及びその分枝の疾病、心不全、末梢血管障害、ショック、スポーツ心臓症候群、又は不整脈から選択される、請求項42に記載の使用。

【請求項44】

前記血液学に関連した障害が、貧血、組織球性症候群、鉄過剰関連障害、白血病、リンパ腫、骨髄増殖性障害、プラズマ細胞疾患、止血及び凝固障害、脾臓障害、血栓障害、血小板障害、血管の出血性障害、白血球減少症、リンパ球減少症、又はエイズに関連する血液障害及び悪性腫瘍から選択される、請求項42に記載の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、UNC5H2スプライス変異体ポリペプチドであるUNC5H2d、及びそれをコードする核酸分子に関する。また、本発明は、UNC5H2dポリペプチドを製造するための選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、及び方法にも関する。更に、本発明は、UNC5H2dポリペプチドに関する疾病、障害、及び健康状態の診断、処置、寛解、及び/又は予防のための方法及び医薬組成物に関する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

UNC-5は、線虫 (*C. elegans*) におけるネトリン/UNC-6応答性ニューロンの軸索反発に必要とされる遺伝子として最初に説明された (Williams M. E., 2003年)。線虫UNC-5の相同体は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) UNC-5、マウス (*Mus musculus*) UNC-5、ラット (*Rattus norvegicus*) Unc5H2、及びヒト (*Homo sapiens*) UNC-5ファミリー (UNC5H1、2、及び3) を含む。ヒト遺伝子UNC5H2 (別名、UNC5B、p53RDL1、又は死亡と寿命に関するp53によって調節された受容体) は、第10染色体 (細胞遺伝学的バンド10q22.1) 上に位置する。

30

【0003】

UNC5H2の転写産物

Aceviewデータベース (AceViewは、ゲノム配列に対するmRNAとESTsのアラインメント、並びに遺伝子とAcemblyプログラムを使用してこれらのアラインメントから再構築された (代替) 転写産物のアラインメントを示す <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>) の分析によれば、UNC5H2は、3つの異なるタンパク質をコードすることが予測される3タイプの転写産物の選択的スプライシングによって生じる。UNC5H2変異体aは、Komatzuzakiらによって説明された通り、特徴付けされたSwissProt登録Q81ZJ1、並びにNCBI登録NP_734465、AAM95701、及びAY126437に相当し、b変異体はまだ特徴付けされていない予測されたタンパク質であり、そしてAceviewのc変異体は、おそらくTanikawaraによって説明された通り、p53RDL1と呼ばれるNCBI登録BAC57998に相当する (Aceview登録はp53RDL1の切断型である)。UNC5H2cは2835bpにおよぶ17個のエクソンを含み、UNC5H2aは16個のエクソンを含み、そしてUNC5Hbは7個のエクソンを含む。UNC5H2cと比べて、UNC5H2aは、たった11個のアミノ酸から成る短いエクソンである第8エクソンが抜けており、タンパク質の細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間の境界に起こる。UNC5H2cと比べて、UNC5H2bは、免疫グロブリン・ドメイン、1型トロンボスポンジン反復ドメイン、及びデスドメイン (以下を参照のこと) を含めた第1~第5及び第12~第17エクソンが抜けているが、追加の新しい3'側の選択的エクソンを持つ。UNC5H2は、17個の確認されたイントロン

40

50

を含み、その中の4つが選択的である。ゲノム配列との比較は17個のイントロンが [gt-ag] 則に従うことを示している。タンパク質ファミリーは、デスドメイン、免疫グロブリン / 主要組織適合複合体モチーフ、I型トロンボスポンジン・モチーフ、及びZU5ドメイン・モチーフのいくつかの特定されたドメインを含む。

【 0 0 0 4 】

UNC5H2の発現

Acemblyによれば、タンパク質は非常に高いレベルで発現される。UNC5H2のための主な支持クローンに対するAcemblyのアノテーションは、mRNAが発現された組織が扁桃、脾臓、変形性関節症軟骨の膝、神経芽細胞腫の脳、滑膜、及び子宮を含むことを示す。Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs>) クラスタにおける様々な組織からのESTsの定量化に基づく正常ヒト組織におけるUNC5H2 (Genecards登録LOC219699) 発現に対するGenecardsのアノテーション (Genecardsはヒト遺伝子に関する情報を統合するデータベースである、<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/>) は、脾臓、脳、前立腺、腎臓、及び肺を含む (「UniGeneは、GenBank配列を遺伝子指向型クラスタの冗長セットに自動的に分割するための実験的システムである。それぞれのUniGeneクラスタは固有の遺伝子を表す配列、並びに、例えばその遺伝子が発現された組織型及び地図位置といった関連情報を含む」)。Unigeneからの発現情報は、UNC5H2が以下の組織：神経芽細胞腫、副腎皮質癌腫、結腸、大細胞癌、肺、胎盤、変形性関節症軟骨、脾臓、骨、乳房、頭部、頸部、前立腺、メラニン細胞、胎児心臓、妊娠中の子宮、軟骨下骨、肺の病巣線維症、軟骨肉腫、及び精製豚島において発現されることを示す。

10

20

【 0 0 0 5 】

また、成人の神経系の発生中に特定のニューロンにおいて高度に発現される以外に、UNC5Hは、甲状腺、腎臓、卵巣、子宮、胃、結腸、肺、脾臓、膀胱、乳房組織、心臓、軟骨、造血組織、及び免疫組織で検出された (Komatsuzakiら、2002年)。

【 0 0 0 6 】

UNC5H2の機能

DCC及びneo1を含めた結腸直腸癌で低下する遺伝子 (Deleted in Colorectal Cancer) (DCC) ファミリーと一緒にUNC5Hファミリーは、ネトリン-1 (ntn1) 受容体である。ネトリン-1は、神経系の発生中にニューロンとそれらの軸索を目標に向ける短距離及び長距離の誘導に参与する (Mitchell KJ、1996年)。その誘引性又は消散性の二機能性活性は、ニューロン上で発現される受容体と、細胞内cAMP濃度に依存する (Hongら、1999)。DCCファミリーがネトリン-1の誘引の介在物質の役割を果たす一方で、ネトリン-1依存性UNC5H-DCC複合体が形成されて、G_i 2調節によって消散を介在する。

30

【 0 0 0 7 】

軸索誘導におけるそれらの役割以外に、DCC及びUNC5H2は、腫瘍抑制因子であることが示唆される (Thiebaultら、2003年)。ネトリン-1の不存の時、UNC5Hファミリーは細胞死誘発を促進する。このアポトーシス促進活性は、受容体のカスパーゼ切断とそれらの細胞内ドメインのC末端に位置する保存されているデスドメインに依存する (Tanikawaら、2003年)。UNC5H2は、腫瘍抑制因子p53の直接的な転写標的であり、p53のアポトーシス促進活性を介在する (Tanikawaら、2003)。Thiebaultらは、UNC5H受容体が細胞アポトーシスを誘導することによって腫瘍増殖の負の調節因子としての役割を担うかもしれないことを示唆した。更に、卵巣腫瘍、乳房の腫瘍、子宮腫瘍、結腸直腸の腫瘍、胃の腫瘍、肺腫瘍、及び腎腫瘍を含めた多くの癌で、UNC5H発現が失われているか又は減少することが観察された。UNC5H発現を調節する可能性がある3つの作用機序が提案された：

40

1) ヘテロ接合性の消失 (LOH) ; UNC5Cの突然変異、並びにUNC5A、UNC5B、及びUNC5C遺伝子座が位置する染色体領域の欠失が様々な癌に関連した。

2) 後成的な過程 ; UNC5H発現は、ヒストン・デアセチラーゼ活性によって調節されることが示された。

3) p53活性の喪失が、UNC5H発現の喪失 / 減少の主な原因となるかもしれない。

【 0 0 0 8 】

50

Thiebaultらは、LJNC5H発現の阻害、及び/又はUNC5Hのアポトーシス促進活性の阻害が、腫瘍の増殖を可能にする選択的過程となるであろうこと、並びにネトリン-1とUNC5H発現の間のバランスが腫瘍発生の制御に重要であるかもしれないことを更に示唆する。この観点において、ネトリン-1もまた、その存在が古い上皮細胞ほど徐々に減少することで細胞運命を制御する生存因子としての役割を担う。よって、ネトリン-1受容体のDCC及びUNC5Hは、適当な環境下で通常、スイッチが切られており、そしてネトリン-1が利用不可能な不適当な環境（例えば、移行中）においてスイッチが入れられる。ネトリン-1は、p53誘発性UNC5B介在アポトーシスに対抗することが示された（Tanikawaら、2003年）。

【発明の開示】

【0009】

10

発明の概要

本発明は、新規、且つ、独特のUNC5H2選択的スプライシング変異体であって、特にUNC5H2変異体d（以降「UNC5H2d」と表す）と記載のものに関する。UNC5H2dコード配列は、UNC5H2dコード配列が膜貫通ドメインの除去をもたらす第9エクソンを欠いている以外、UNC5H2aコード配列と同一である。UNC5H2dは、最も長いスプライス変異体のUNC5H2cと比べて第8及び第9エクソンを欠いている。よって、UNC5H2dは、UNC5H2a、UNC5H2b、UNC5H2cの可溶性分泌型バージョンであり、おそらく完全なUNC5H2シグナル伝達経路の拮抗物質として機能する。

【0010】

本発明は、以下の：

20

(a) 配列番号1又は配列番号3のいずれかに記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドをコードするか、あるいは配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドと少なくとも約85%の同一性を示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされたポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに規定されたポリペプチド・セットの活性を有するが、但し、当該ポリペプチド配列が、配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のいずれとも同一ではないもの；

(c) その配列が配列番号2（配列番号4）に挙げるポリペプチドの成熟型をコードするヌクレオチド配列；

(d) その配列が配列番号2（配列番号11）に挙げるポリペプチドのヒスチジン・タグ型をコードするヌクレオチド配列；

30

(e) ストリンジェント条件下で配列番号1又は配列番号3のいずれかとハイブリダイズするか、少なくとも約30ヌクレオチドの範囲にわたって、配列番号1又は配列番号3のいずれかから成る核酸と少なくとも約85%の同一性を示すか、あるいは上記DNA配列の相補体であるヌクレオチド配列であるが、但し、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のいずれとも同一ではないもの；

から成る群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

【0011】

本発明は、本明細書中に記載の単離核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に記載の組み換え核酸分子を含む組み換え宿主細胞、及び上記宿主細胞を培養し、そしてそのようにして製造されたポリペプチドを必要に応じて単離するステップを含むUNC5H2dポリペプチドの製造方法もまた提供する。

40

【0012】

UNC5H2dポリペプチドをコードした核酸分子を含むヒト以外のトランスジェニック動物もまた本発明に包含される。UNC5H2d核酸分子は、UNC5H2dポリペプチドの発現、及び高められた循環レベルを含みうるその高められたレベルを可能にする様式で動物内に導入される。あるいは、UNC5H2d核酸分子は、内因性UNC5H2dポリペプチドの発現を妨げる様式で動物内に挿入される（すなわち、UNC5H2dポリペプチド遺伝子を有するトランスジェニック動物を作り出す（ノックアウト））。

【0013】

50

ヒト以外のトランスジェニック動物は、好ましくは哺乳動物であり、そしてより好ましくは、例えばラット又はマウスなどの齧歯動物である。

【0014】

また、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含めた本発明のUNC5H2dポリペプチドの誘導體も提供される。

【0015】

更に、本発明のUNC5H2dポリペプチドに特異的に結合することができる、例えば抗体やペプチドなどの選択的結合因子が提供される。当該抗体及びペプチドは、作動性であっても又は拮抗性であってもよい。

【0016】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、又は選択的結合因子、及び1つ以上の医薬として許容される製剤化剤を含む医薬組成物もまた本発明に包含される。前記医薬組成物は、治療として有効な量の本発明のヌクレオチド又はポリペプチドを提供するために使用される。本発明は、ポリペプチド、核酸分子、及び選択的結合因子を使用する方法にも向けられる。

【0017】

UNC5H2dポリペプチド及び本発明の核酸分子を、本明細書中に挙げられたものを含めた疾病及び障害の処置、予防、寛解、及び/又は検出に使用することができる。

【0018】

本発明は、UNC5H2dポリペプチドに結合する試験分子を同定するために試験分子をアッセイする方法もまた提供する。前記方法は、UNC5H2dポリペプチドを試験分子と接触させて、ポリペプチドへの試験分子の結合の程度を測定するステップを含む。前記方法は、前記試験分子がUNC5H2dポリペプチドの作用物質又は拮抗物質のいずれであるかを測定するステップを更に含む。本発明は、UNC5H2dポリペプチドの発現、又はUNC5H2dポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を更に提供する。

【0019】

UNC5H2dポリペプチドの発現を調節する方法、及びそのレベルを調節する(すなわち、増減する)方法もまた本発明に包含される。1つの方法は、UNC5H2dポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与するステップを含む。他の方法において、UNC5H2dポリペプチドの発現を調節又は調節する要素を含む核酸分子が投与されてもよい。これらの方法に関する例は、本明細書中に更に説明される遺伝子療法、細胞療法、及びアンチセンス療法を含む。

【0020】

UNC5H2dポリペプチドはそのリガンドの同定に使用することができる。様々な形態の「発現クローニング」が、受容体のクローニング・リガンドについて使用された(例えば、Io Davisら、1996年、Cell、87:1161-69ページを参照のこと)。これらの及び他のUNC5H2dリガンド・クローニング実験は本明細書中に更に詳細に説明される。UNC5H2dリガンドの分離は、UNC5H2dシグナル伝達経路の新規な作用物質、及び/又は拮抗物質の同定又は開発を可能にする。当該作用物質及び拮抗物質は、UNC5H2dリガンド、抗UNC5H2dリガンド抗体及びその誘導體、小分子、又はアンチセンス・オリゴヌクレオチドを含み、場合によっては、そのいずれもが本明細書中に挙げたものを含めた1つ以上の疾病又は障害を治療するために使用できる。

【0021】

発明の詳細な説明

本明細書中に使用される節の見出しは、構成の目的のためだけに存在し、記載した内容を限定するものではない。当該出願に引用した全ての参考文献を、本明細書中に明確に援用する。

【0022】

本発明は、膜貫通UNC5H2 (UNC5B) の新しいスプライス変異体、すなわちUNC5H2d、及びその使用に言及する。よって、UNC5H2dが完全なUNC5H2a、UNC5H2b、又はUNC5H2cの分泌可

10

20

30

40

50

溶性型であることが理解される。UNC5H2dは膜貫通ドメインを欠いている（図10及び11を参照のこと）。この点で、UNC5H2dはUNC5H2受容体又はリガンドの拮抗物質として作用する可能性がある。UNC5H2dは、これだけに制限されることなく、抗体、融合ポリペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンス・オリゴヌクレオチド）、又は小分子量の有機分子を含めた拮抗性及び作用性分子のための標的として使用できる。例えば、UNC5H2dに特異的な拮抗物質はUNC5H2dの拮抗活性を抑制し、そうしてUNC5H2dリガンドの活性を高める、及び/又はUNC5H2受容体を通じたシグナル伝達を高めるであろう。逆に、UNC5H2受容体に特異的な作用物質はUNC5H2dの拮抗活性を高め、そうしてUNC5H2受容体リガンド活性を低下させる、及び/又はUNC5H2受容体を通じたシグナル伝達を低下させるであろう。

10

【0023】

定義

用語「UNC5H2d遺伝子」、「UNC5H2d核酸分子」、又は「UNC5H2dポリヌクレオチド」は、本明細書中で互換性を持って使用され、以下の：

(a) 配列番号1又は配列番号3のいずれかに記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドをコードするか、あるいは配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドに対して少なくとも約85%の同一性を示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドの生物活性を有するが、但し、上記ポリペ

20

チド配列が、配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のいずれとも同一ではないもの；

(c) その配列が配列番号2（配列番号4）に挙げるポリペプチドの成熟型をコードするヌクレオチド配列；

(d) その配列が配列番号2（配列番号11）に挙げるポリペプチドのヒスチジン・タグ型をコードするヌクレオチド配列；

(e) ストリンジント条件下で配列番号1又は配列番号3のいずれかハイブリダイズするか、少なくとも約30ヌクレオチドの範囲にわたって配列番号1又は配列番号3のいずれかから成る核酸と少なくとも約85%の同一性を示すか、あるいは上記DNA配列の相補体であるヌクレオチド配列であって、但し、配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のいずれとも同一ではないもの、

30

から成る群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子に言及する。

【0024】

本明細書で使用する「UNC5H2dポリペプチド」は、UNC5H2d遺伝子によってコードされたポリペプチドに言及する。

【0025】

配列番号2に挙げる配列を持つポリペプチドはUNC5H2dの完全長ポリペプチドである。配列番号4に挙げる配列を持つポリペプチドは成熟型UNC5H2dポリペプチドである。配列番号11に挙げる配列を持つポリペプチドは、成熟型hisタグ付きUNC5H2dポリペプチドである。よって、1つの態様において、UNC5H2dポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

40

【0026】

配列番号5に挙げる配列を持つポリペプチドはUNC5H2aポリペプチドである。配列番号6に挙げる配列を持つポリペプチドはUNC5H2bポリペプチドである。配列番号7に挙げる配列を持つポリペプチドはUNC5H2cポリペプチドである。

【0027】

配列番号1に挙げる配列を持つ核酸はUNC5H2dの完全長ポリペプチド（配列番号2）をコードする。配列番号3に挙げる配列を持つ核酸は成熟型UNC5H2dポリペプチド（配列番号4）をコードする。配列番号8に挙げる核酸配列はUNC5H2aポリペプチド（配列番号5）をコードする。配列番号9に挙げる核酸配列はUNC5H2bポリペプチド（配列番号6）をコードする。配列番号10に挙げる核酸配列はUNC5H2cポリペプチド（配列番号7）をコードする。

50

【0028】

用語「単離核酸性分子」は、(1)総核酸が源の細胞から分離される時、天然に見られるタンパク質、脂質、炭水化物、又は他の物質の中の少なくとも約50%から分離されたか、(2)上記「単離核酸分子」が天然で連結するポリヌクレオチドの全部又は一部と連結しないか、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドと作用可能に連結するか、あるいは(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然では生じない、本発明の核酸分子に言及する。好ましくは、本発明の単離核酸分子は、あらゆる他の混入核酸分子、あるいはポリペプチド製造におけるその使用、又はその治療的、診断的、予防的、若しくは研究的な使用を妨げるその自然環境内で見られる他の混入物を実質的に含まない。

【0029】

用語「核酸配列」又は「核酸性分子」は、DNA又はRNA配列に言及する。前記用語は、DNA及びRNAの既知の塩基類似体、例えばこれだけに制限されることなく、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン、5(カルボキシヒドロキシルメトリル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロムウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、及び2,6-ジアミノプリン of theいずれかから形成された分子を包含する。

【0030】

本発明は、UNC5H2d又はその断片をコードするDNA配列とハイブリダイズする組み換えDNA分子についても言及する。前記遺伝子は、天然のイントロンを含んでも含まなくてもよく、適当な細胞からの抽出、そして既知の方法での精製によって得ることができる。

【0031】

DNA、例えばヒト・ゲノムDNAの適当な準備は、適当な方法で、好ましくは制限酵素によって切断され、そのようにして得られた断片がDNAライブラリーを形成するために適当な組み換え型ベクター内に導入される。当該ベクターは、本発明によるUNC5H2dをコードする配列を同定するための合成オリゴヌクレオチド・プローブを用いて選択されることができる。

【0032】

その一方で、対応するmRNAがUNC5H2dを発現する細胞から単離され、そして既知の方法で相補的DNA(cDNA)を製造するのに使用されることができる。後に二本鎖cDNAに変換されるこのcDNAを、その後使用される宿主細胞を形質転換するために使用されうる適当なベクター内に導入することができる。

【0033】

そして、得られた培養物は、標的配列をコードするcDNAを得るために適当なプローブを用いて選択される。

【0034】

所望のクローンが一度単離されれば、原則的に、cDNAをゲノムDNAと同じように操作できる。cDNAはイントロンを含まない。

【0035】

遺伝子コードの縮重のため、1つ以上のオリゴヌクレオチドが製造され、それらのそれぞれがUNC5H2dの断片をコードすることができるような様々なコドンが特異的アミノ酸を

10

20

30

40

50

コードするために使用される可能性がある。しかしながら、このプールの中にたった1種類のメンバーだけが遺伝子のそれと同一のヌクレオチド配列を有する。プール中のその存在、及びプール中の他のメンバーの存在下でもDNAとハイブリダイズするその能力が、標的ペプチドをコードする遺伝子のクローニングのために単一オリゴヌクレオチドを使用できるのと同じ方法における非分画オリゴヌクレオチド群の使用を可能にする。

【0036】

あるいは、(Lathe Rら、J.Molec.Biol. 183:1~12ページ(1985年)中の”rules for the use of codons”に記載されたことに従って)UNC5H2dの遺伝子断片をコードできる可能性が理論的に最も高い配列を含む単一オリゴヌクレオチドは、UNC5H2d又はその断片をコードする相補DNAの識別を可能にする。

10

【0037】

核酸をハイブリダイズするための過程は知られており、そして(例えば、Maniatis T.ら、Molecular Cloning: A laboratory manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor, NY、1982年において)説明されている。前記プローブ又はヌクレオチド・プローブ群を使用したハイブリダイゼーションを通して、ゲノム又はcDNA遺伝子ライブラリーにおいて、その後それらが本発明によるポリペプチドをコードすることを確認するために分析される当該ハイブリダイゼーションができるDNA配列を同定することが可能である。そのような相補的配列を含むオリゴヌクレオチドは合成されてもよく、発明(Maniatis T.ら、前記)によるポリペプチドの遺伝子を同定及び単離するプローブとして使用できる。一旦、UNC5H2dに特異的な適当なオリゴヌクレオチドが先に述べた方法を使用して選択されると、それを合成し、そしてDNA、又は好ましくは、例えば高レベルの求める遺伝子を産生する細胞からのRNAの抽出、そして逆転写酵素といった酵素を使用したRNAの対応のcDNAへの変換によってcDNAの源に求める配列が高められた後に、好ましくは求める遺伝子を発現することができる細胞由来のcDNAとそれをハイブリダイズすることが可能である。

20

【0038】

あるいは、UNC5H2dに特異的な好適なオリゴヌクレオチドは、合成され、そしてRACE-PCR法によるUNC5H2d cDNA断片の増幅のためのプライマーとして使用されてもよい。

【0039】

用語「実質的に精製した」は、それらの自然環境から取り出され、単離されるか又は分離され、そして天然にそれらに伴う他の構成要素の少なくとも60%を含まない、好ましくは75%を、及び最も好ましくは90%を含まない核酸又はアミノ酸の配列のいずれかである分子に言及する。

30

【0040】

本明細書中では、用語「ハイブリダイゼーション」は、核酸の鎖が塩基対合を通して相補鎖と連結することによるあらゆる過程を含むものとする。「増幅」は、核酸配列の追加複製の製造と規定され、当該技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応技術を使用して一般に実施される。

【0041】

「ストリンジェンシー」は、約 $T_m - 5$ (プローブの融解温度を5 下回る) ~ T_m を約20 から25 下回る範囲で通常起こる。用語「ストリンジェント条件」は、当業者が慣習的に「ストリンジェント」と呼ぶ、ハイブリダイゼーションとそれに続く洗浄条件に言及する。

40

【0042】

本明細書中では、「ストリンジェンシー条件」は、ハイブリダイゼーション実験に使用される温度と、一価の陽イオンのモル濃度と、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの百分率との関数である。任意な所定の一連の条件に関係するストリンジェンシーの程度を測定するために、まず、当業者はDNA-DNAハイブリッドの融解温度 T_m として表される100%同一のハイブリッドの安定性を決定するために、以下のMeinkothら(1984年)の方程式:

50

$$T_m = 81.5C + 16.6 (\text{Log}M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\%form) - 500/L$$

{ 式中、Mが一価の陽イオンのモル濃度であり、%GCがDNA内のG及びCヌクレオチドの百分率であり、%formがハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの百分率であり、そしてLが塩基対内のハイブリッドの長さである。}を使用する。T_mが100%の同一性ハイブリッドについて計算された値から低下する1 ごとに、容認されるミスマッチの量が約1%ずつ増加する。よって、指定された塩とホルムアミド濃度での任意な所定のハイブリダイゼーション実験に使用されるT_mがMeinkothの方程式による100%ハイブリッドについて計算されたT_mを10 下回る場合、ミスマッチが約10%に達してもハイブリダイゼーションが起こる。

【0043】

本明細書中では「高いストリンジェント条件」は、先の式によって計算されるか、又は実際に計測される、標的配列と完全な2本鎖で存在するであろうT_mを10 以内しか下回らないT_mを提供する条件である。「中程度のストリンジェント条件」は、先の式によって計算されるか、又は実際に計測される、標的配列と完全な2本鎖で存在するであろうT_mを20

以内しか下回らないT_mを提供する条件である。制限することなく、高いストリンジェント（ハイブリッドの計算された又は計測されたT_mを5～10 下回る）及び中程度のストリンジェント（ハイブリッドの計算された又は計測されたT_mを15～20 下回る）条件は、ハイブリッドの計算されたT_mを下回る適当な温度にて2×SSC（標準的なクエン酸生理食塩水）及び0.5%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）から成る洗浄液を使用する。条件の最終的なストリンジェンシーは、特に使用されるハイブリダイゼーション条件がそれほど安定していないハイブリッドが安定したハイブリッドと共に形成されることを可能にする条件である場合に、主として洗浄条件に起因する。そして、より高いストリンジェンシーにおける洗浄条件は、それほど安定していないハイブリッドを排除する。先に説明した高いストリンジェント～中程度のストリンジェントな洗浄条件と一緒に使用できる一般的なハイブリダイゼーション条件は、T_mを約20～25 下回る温度にて、6×SSC（又は6×SSPE（標準的な生理食塩水-リン酸-EDTA））、5×デンハート試薬、0.5%のSDS、100microg/mlの変性させた断片化サケ精子DNAから成る溶液中でのハイブリダイゼーションである。混合プローブが使用される場合、SSCの代わりに塩化テトラメチル・アンモニウム（TMAC）を使用するのが望ましい。

【0044】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を運ぶために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、又はウイルス）について言及するために使用される。

【0045】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に好適であり、且つ、挿入された異種核酸配列の発現を指示する、及び/又は制御する核酸配列を含むベクターに言及する。発現は、これだけに制限されることなく、例えば転写、翻訳、及びイントロンが存在する場合には、RNAスプライシングといった過程を含む。

【0046】

用語「作用可能に連結した」は、そのように説明されるフランキング配列がそれらの普通の機能を果たすように構成されるか、又は組み立てられるフランキング配列の配置に言及するために本明細書中に使用される。よって、コード配列に作用可能に連結したフランキング配列は、コード配列の複製、転写、及び/又は翻訳を達成することができるであろう。例えば、プロモーターがそのコード配列の転写を指示できる時、コード配列はプロモーターに作用可能に連結される。正しく機能する限り、フランキング配列はコード配列に隣接する必要はない。よって、例えば介在している未翻訳の、まだ転写されていない配列がプロモーター配列とコード配列の間に存在することもできるが、上記プロモーター配列がコード配列に「作用可能に連結されている」と見なすことはまだできない。

【0047】

用語「宿主細胞」は、形質転換されたか、又は核酸配列により形質転換され、その後着目の選択された遺伝子を発現することができる細胞について言及するために使用される。

10

20

30

40

50

前記用語は、選択された遺伝子が存在している限り、子孫が元の親に対して形態学的又は遺伝的に同一であるか否かに関係なく親細胞の子孫を含む。

【0048】

用語「天然の("naturally occurring or native")」は、例えば核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などの生物物質に関して使用される時、自然界に見つから、且つ、人類によって操作されない物質に言及する。同様に、本明細書中では「非天然の("non-naturally occurring or non-native")」は、自然界に見られないか、又は人類によって構造的に修飾されたか、若しくは合成された物質に言及する。

【0049】

用語「有効量」及び「治療として有効な量」は、本明細書中に記載のUNC5H2dポリペプチドの観察可能なレベルの生物活性の1つ以上を支援するために使用されるUNC5H2dポリペプチド又はUNC5H2d核酸分子の量についてそれぞれ言及する。

10

【0050】

本明細書中では、用語「医薬として許容される担体」又は「生理学的に許容される担体」は、医薬組成物としてUNC5H2dポリペプチド、UNC5H2d核酸分子、又はUNC5H2d選択的結合因子のデリバリーを達成するか、又は促進するのに好適な1つ以上の製剤材料について言及する。

【0051】

用語「抗原」は、例えば抗体などの選択的結合因子によって結合されることができ、そして更に動物体内において、その抗原のエピトープに結合することができる抗体を産生するのに使用されることができ分子又は分子の一部について言及する。抗原は1つ以上のエピトープを持つことができる。

20

【0052】

用語「選択的結合因子」は、UNC5H2dポリペプチドに特異性を有する分子(単数又は複数)について言及する。本明細書中では、用語「特異的な」及び「特異性」は、好ましくは選択的結合因子がヒトUNC5H2dポリペプチドに結合し、且つ、ヒト非UNC5H2dポリペプチドに優先的に結合しない能力に言及する。しかしながら、選択的結合因子が配列番号2、配列番号4、又は配列番号11のいずれかに記載のポリペプチドのオルソログに結合することもまた可能であることが理解される。

【0053】

30

核酸分子

UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、これだけに制限されることなく、化学合成、cDNA若しくはゲノム・ライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリーのスクリーニング、及び/又はcDNAのPCR増幅を含む様々な方法によって容易に得ることができる。

【0054】

本明細書で使用する組み換えDNA法は、通常、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年)で説明されたものである。本発明は、本明細書中に説明した核酸分子、及び当該分子を得るための方法を提供する。

40

【0055】

UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子がある種から同定された場合には、その遺伝子の全部又は一部を同じ種からのオルソログ又は関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用することができる。そのプローブ又はプライマーを、UNC5H2dポリペプチドを発現すると考えられている様々な組織起源のcDNAライブラリーを選別するために使用できる。更に、配列番号1又は配列番号3のいずれかに記載の配列を持つ核酸分子の一部又は全部を、UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定し、そして単離するためのゲノム・ライブラリーを選別するために使用できる。通常、中程度の又は高いストリンジェンシー条件が、スクリーニングから得られる偽陽性の数を最小限にするようにスクリーニングに用いられる。

50

【 0 0 5 6 】

UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、発現タンパク質の特性に基づく陽性のクローンの検出を用いる発現クローニングによっても同定できる。通常、核酸ライブラリは、発現されるか、又は宿主細胞表面に提示されるクローン化タンパク質への抗体、又は他の結合パートナー（例えば、受容体又はリガンド）の結合によって選別される。抗体又は結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を特定するために検出可能な標識で修飾される。

【 0 0 5 7 】

以下に詳しく説明される記載に従って実施された組み換え発現技術には、これらのポリヌクレオチドを製造、そしてコードされたポリペプチドを発現がその後続くであろう。例えば、UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適当なベクターに挿入することによって、当業者は多量の所望のヌクレオチド配列を容易に製造できる。そして、その配列を、検出プローブ又は増幅プライマーを作製するために使用できる。

10

【 0 0 5 8 】

あるいは、UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを発現ベクター内に挿入できる。適当な宿主内に発現ベクターを導入することによって、コードされたUNC5H2dポリペプチドを大量に製造できる。

【 0 0 5 9 】

好適な核酸配列を得るための他の方法はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法では、cDNAは、ポリ（A）+RNA又は全RNAから酵素、逆転写酵素を使用することで調製される。そして、通常UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの離れた領域に相補的である2つのプライマーが、例えばTaqポリメラーゼなどのポリメラーゼを伴うcDNAに加えられ、そして上記ポリメラーゼが2つのプライマーの間のcDNA領域を増幅する。

20

【 0 0 6 0 】

UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、当業者に周知の方法、例えばEngelsら、1989年、Angew. Chem. Int. Ed. 28 : 716-34ページによって説明された方法を使用した化学合成法である。これらの方法は、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル法、ホスホラミダイト法、及びH-ホスホナート法を含む。このような化学合成のための好ましい方法は、標準的なホスホラミダイト化学反応を使用した高分子担持合成法である。通常、UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数100のヌクレオチドの長さである。約100ヌクレオチドより長い核酸を、これらの方法を使用して数個の断片として合成できる。そして、前記断片を一緒に連結して、UNC5H2d遺伝子の完全長ヌクレオチド配列を形成することができる。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNA断片は、メチオニン残基をコードするATGを持つ。このメチオニンは、宿主細胞内で産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるように設計されているかどうかによって、成熟型のUNC5H2dポリペプチド上に存在しているかもしれない。なお、当業者に知られている他の方法が使用されてもよい。

30

【 0 0 6 1 】

ある態様において、核酸変異体は、所定の宿主細胞におけるUNC5H2dポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン改変は、UNC5H2dポリペプチド、及び発現のために選択された宿主細胞に依存する。「コドンの最適化」は、様々な方法によって、例えば所定の宿主細胞内において高度に発現されている遺伝子での使用に好まれるコドンを選択することによって実施されることができる。コドン頻度表を組み込んだコンピュータ・アルゴリズム、例えば高度に発現された細菌遺伝子のコドン選択に関する「Eco-high. Cod」が使用されてもよく、ウィスコンシン大学のパッケージ・バージョン9.0（Genetics Computer Group, Madison, WI）によって提供される。他の有用なコドン頻度表は、「C. elegans-high. cod」、「C. elegans-slow. cod」、「Drosophila-high. cod」、「Human-high. cod」、「Maize-high. cod」、「Yeast-high. cod」を含む。

40

【 0 0 6 2 】

50

場合により、UNC5H2dポリペプチド変異体をコードした核酸分子を調製することが望ましいかもしれない。変異体をコードする核酸分子を、プライマーが所望の点突然変異体を持っているところの部位特異的突然変異、PCR増幅、又は他の適当な方法（例えば、Sambrookら、突然変異体誘発技術の記載について、を参照のこと）を使用することで製造することができる。Engelsら、前記、によって説明された方法を使用した化学合成法も同様にそのような変異体を調製するために使用できる。同様に、当業者に知られている他の方法も使用できる。

【0063】

ベクターと宿主細胞

UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、標準的な連結技術を使用して適当な発現ベクター内に挿入される。通常、ベクターは使用される特定の宿主細胞内で機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅、及び/又は遺伝子の発現が起こりうるように宿主細胞の機構に適合する）。UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物、酵母、昆虫（バキュロウイルス系）、及び/又は真核生物の宿主細胞内で増幅されるか又は発現されることができる。宿主細胞の選択は、UNC5H2dポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、及び/又はリン酸化）されるべきかどうかという部分に依存している。そうだとすれば、酵母、昆虫、又は哺乳動物の宿主細胞が望ましい。

【0064】

通常、任意な宿主細胞で使用される発現ベクターは、プラスミド維持のため、及び外因性ヌクレオチド配列のクローニングと発現のための配列を含む。ある態様において、まとめて「フランキング配列」と呼ばれるそのような配列は、通常、以下のヌクレオチド配列：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製開始点、転写終止配列、供与及び受容スプライス部位を含む完全なイントロン配列、配列がポリペプチド分泌のためにリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、並びに選択可能マーカ要素の1つ以上を含む。これらの配列のそれぞれについて以下で議論する。

【0065】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード化配列、すなわち、UNC5H2dポリペプチド・コード配列の5'又は3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含むことができ；上記オリゴヌクレオチド配列は、ポリHis（例えば、hexaHis）、又は例えばFLAG、HA（ヘマグルチニン・インフルエンザ・ウイルス）といった他の「タグ」、あるいは市販の抗体が存続するためのmycをコードする。このタグは、通常、ポリペプチドの発現の時点でポリペプチドに融合して、宿主細胞からのUNC5H2dポリペプチドのアフィニティー精製的手段として機能することができる。アフィニティー精製は、例えばアフィニティー・マトリックスとしてのタグに対する抗体を使用したカラムクロマトグラフィーによって達成できる。必要に応じて、続いて、例えば開裂のための特定のペプチダーゼを使用した様々な手段によって精製したUNC5H2dポリペプチドからタグを取り外すことができる。

【0066】

フランキング配列は、相同（すなわち、宿主細胞と同じ種、及び/又は菌株からのもの）、異種（すなわち、宿主細胞の種又は菌株以外の種からのもの）、ハイブリッド（すなわち、二種類の源からのフランキング配列の組み合わせ）、又は、合成であるか、あるいはフランキング配列は、通常、UNC5H2dポリペプチド発現を調節するために機能する天然配列であるかもしれない。そういうものとして、フランキング配列が宿主細胞の機構において機能的であり、且つ、それによって活性化されうる如果能够ならば、フランキング配列の源は、任意の原核生物若しくは真核生物、任意の脊椎動物若しくは無脊椎動物、又は任意の植物であってもよい。

【0067】

本発明のベクターにおいて有用なフランキング配列は、当該技術分野で周知のいくつかの方法のいずれかによって得ることができる。通常、UNC5H2d遺伝子フランキング配列を

10

20

30

40

50

除く本明細書中の有効なフランキング配列は、マッピング、及び/又は制限エンドヌクレアーゼ消化によってこれまでに同定されており、そのため適当な制限エンドヌクレアーゼを使用して適当な組織源から単離できる。場合によっては、フランキング配列の完全なヌクレオチド配列を知ることができる。この時、本明細書中に記載の核酸合成又はクローニング方法を使用して、フランキング配列を合成することができる。

【0068】

フランキング配列の全部又は一部だけが知られている場合、それはPCR法を使用することで、及び/又は同じ又は他の種からの好適なオリゴヌクレオチド、及び/又はフランキング配列断片を含むゲノム・ライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。

10

【0069】

フランキング配列が知られていない場合、フランキング配列を含むDNAの断片を、例えばコード配列、又は別の遺伝子(単数若しくは複数)さえも含むかもしれないより大きなDNA断片から単離できる。分離は、適当なDNA断片を作り出すための制限エンドヌクレアーゼ消化、それに続くアガロースゲル精製、Qiagenカラムクロマトグラフィー(Chatsworth、CA)、又は当業者に知られている他の方法によって達成することができる。この目的を達成するために好適な酵素の選択は当業者にとって容易に明らかになる。

【0070】

通常、複製開始点は、商業的に購入された原核生物発現ベクターの一部であり、開始点は宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。場合によっては、あるコピー数までのベクターの増幅が、UNC5H2dポリペプチドの最適な発現に重要である可能性がある。最適なベクターが複製開始点部位を含まない場合、当業者は既知の配列に基づいて化学的に合成し、そしてベクター内に連結してもよい。例えば、プラスミドpBR322(New England Biolabs、Beverly、MA)からの複製開始点が、ほとんどのグラム陰性菌に好適であり、そして、例えば様々な開始点(例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、又は乳頭腫ウイルス、例えばHPV又はBPV)が、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製開始点の構成要素は、哺乳動物発現ベクターに必要なではない(例えば、SV40開始点は単に初期プロモーターを含むので多くの場合に使用される)。

20

【0071】

転写終止配列は、通常、ポリペプチド・コード領域の3'側の末端に位置し、転写を終わらせる役割を担う。通常、原核細胞における転写終止配列は、G-Cリッチ断片とそれに続くポリ-T配列である。配列がライブラリから容易にクローン化されるか、又はベクターの一部として商業的に購入さえされる一方で、それも核酸合成方法、例えば本明細書中に記載される方法を使用して容易に合成することができる。

30

【0072】

選択可能マーカー遺伝子要素は、選択された培地中で増殖した宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、(a)抗生物質又は他の毒素、例えばアンピシリン、テトラサイクリン、又はカナマイシンに対する耐性を与えるか；(b)細胞の栄養要求性不全を補足するか；又は(c)複合培地から利用できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択可能マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子が、原核生物及び真核生物の宿主細胞における選択のために使用されてもよい。発現される遺伝子を増幅するために他の選択遺伝子を使用することができる。

40

【0073】

増幅は、成長のために重要なタンパク質の産生のためにより大きな要求がある遺伝子が、代々の組み換え細胞の染色体内でタンデムに繰り返される過程である。哺乳動物細胞のための好適な選択可能マーカーの例は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)及びチミジン・キナーゼを含む。哺乳動物細胞の形質転換体は、形質転換体だけにベクター内に存在してい

50

る選択遺伝子によって生き残るように独特に適合させた選択圧下に置かれる。選択圧は、培地中の選択剤の濃度を連続的に変える条件下で形質転換細胞を培養することによって課せられ、その結果、選択遺伝子とUNC5H2dポリペプチドをコードするDNAの両方の増幅をもたらす。その結果、増量したUNC5H2dポリペプチドは増幅されたDNAから合成される。

【0074】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、且つ、シャイン・ダルガノ配列（原核細胞）又はコザック配列（真核細胞）を特徴とする。その要素は、通常、3'側をプロモーターの方に、5'側を発現されるUNC5H2dポリペプチドのコード配列の方に配置される。シャイン・ダルガノ配列は、多様であるが、通常、ポリプリン（すなわち、高いA-G含量を持つ）である。多くのシャイン・ダルガノ配列が同定され、そのそれぞれが本明細書中に説明された方法を使用して容易に合成され、そして原核生物ベクターに使用されることができる。

10

【0075】

リーダー、又はシグナル、配列を、宿主細胞から外へUNC5H2dポリペプチドを誘導するために使用することができる。通常、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、UNC5H2d核酸分子のコード領域内、又はUNC5H2dポリペプチド・コード領域の5'末端に直に配置される。多くのシグナル配列が同定され、そして、選択された宿主細胞内で機能的なものはいずれもUNC5H2d核酸分子と結合させて使用できる。従って、シグナル配列は、UNC5H2d核酸性分子に対して相同（天然）であるか又は異種であってもよい。更に、シグナル配列は、本明細書中に説明された方法を使って化学的に合成されてもよい。多くの場合、シグナル・ペプチドの存在を通じての宿主細胞からのUNC5H2dポリペプチドの分泌は、分泌されたUNC5H2dポリペプチドからのシグナル・ペプチドの除去をもたらす。シグナル配列はベクターの構成要素であるか、又はそれはベクターに挿入されたUNC5H2d核酸分子の一部であるかもしれない。

20

【0076】

UNC5H2dポリペプチド・コード領域に連結された天然のUNC5H2dポリペプチド・シグナル配列をコードするヌクレオチド配列、又はUNC5H2dポリペプチド・コード領域に連結された異種のシグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が、本発明の範囲の中に含まれる。選択される異種のシグナル配列は、宿主細胞によって、認識され、且つ、加工される、すなわち、シグナル・ペプチダーゼによって開裂されるものであるべきである。天然のUNC5H2dポリペプチド・シグナル配列を認識し、且つ、加工しない原核生物の宿主細胞について、シグナル配列は、例えばアルカリ・ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、又は耐熱性エンテロトキシン11リーダーから成る群から選ばれる原核生物のシグナル配列によって置換される。酵母分泌について、天然のUNC5H2dポリペプチド・シグナル配列は、酵母インペルターゼ、アルファ因子、又は酸性ホスファターゼ・リーダーによって置換されるかもしれない。哺乳動物細胞発現において、天然のシグナル配列は満足できるが、他の哺乳動物シグナル配列が好適であるかもしれない。

30

【0077】

場合によって、例えばグリコシル化が真核宿主細胞発現系で所望とされる場合に、当業者はグリコシル化又は収量を改良するために様々なプレ配列を操作することができる。例えば、当業者は、特定のシグナル・ペプチドのペプチダーゼ開裂部位を変更するか、又はグリコシル化にも影響する可能性のあるプロ配列を付加することができる。最終的なタンパク質産物は、（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）-1位に、発現に伴う1つ以上の付加アミノ酸を持ち、それは完全に取り除かれないかもしれない。例えば、最終的なタンパク質産物は、アミノ末端に付加されたペプチダーゼ開裂部位に見られる1又は2つのアミノ酸残基を持つかもしれない。あるいは、酵素が成熟型ポリペプチド内のそのような区域にて切断する場合に、いくつかの酵素開裂部位の使用が、所望のUNC5H2dポリペプチドのわずかに端が欠けた形態をもたらす可能性がある。

40

【0078】

多くの場合、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増

50

強され；これはポリペプチドが真核宿主細胞、特に哺乳動物の宿主細胞内で産生される場合に特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が完全長のゲノム配列又はその断片である場合にUNC5H2遺伝子内に自然発生したものであってもよい。（ほとんどのcDNAsに関して）イントロンが遺伝子内に自然発生しない場合、イントロンは他の源から得ることができる。イントロンが有効になるように転写されなければならないので、フランキング配列とUNC5H2遺伝子に関するイントロンの位置は一般に重要である。よって、UNC5H2d cDNA分子が転写されている時、イントロンにとって好ましい位置は、3'側が転写開始部位の方にあり、そして5'側がポリA転写終止配列の方にある。好ましくは、イントロン（単数又は複数）は、コード配列を中断しないようにcDNAの一方又はもう片方（すなわち、5'又は3'）に配置される。それが挿入される宿主細胞に適合すれば、ウイルス、原核生物、及び真核生物（植物又は動物）を含めた任意の源からのあらゆるイントロンが、本発明を実施するために使用されてもよい。同様に、合成イントロンも本明細書中に含まれる。必要に応じて、2つ以上のイントロンがベクターに使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0079】

本発明の発現ベクター及びクローニング・ベクターは、宿主生物によって認識され、且つ、UNC5H2dポリペプチドをコードする分子に作用可能に連結されるプロモーターを通常含む。プロモーターは、構造遺伝子の開始コドンに対して上流（すなわち、5'）に配置される非転写配列であり（一般に約100~1000bp以内）、構造遺伝子の転写を制御する。プロモーターは、2つのクラス：誘導プロモーターと構成的プロモーター、のいずれかに慣習的に分類される。誘導プロモーターは、例えば栄養素の存在若しくは不存在、又は温度変化といった培養条件のいくつかの変化に対応してそれらの調節下でDNAからの増強されたレベルの転写を開始する。他方で、構成的プロモーターは、継続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現の間の制御はほとんど存在しない。様々な潜在的宿主細胞によって認識される多くのプロモーターが周知である。好適なプロモーターは、制限酵素消化によって源のDNAからプロモーターを取り外し、そして所望のプロモーター配列をそのベクター内に挿入することによってUNC5H2dポリペプチドをコードするDNAに作用可能に連結される。天然のUNC5H2dプロモーター配列を、UNC5H2d核酸分子の増幅、及び/又は発現を指示するために使用することができる。しかしながら、それが天然プロモーターと比較して、より高い転写及び発現タンパク質のより高い収率を可能にする場合、並びにそれが使用のために選択された宿主細胞系に適合する場合には、異種プロモーターが好ましい。

【0080】

原核生物宿主との使用に好適なプロモーターは、 λ -ラクタマーゼとラクトース・プロモーター系；アルカリ性ホスファターゼ；トリプトファン（trp）プロモーター系；及びハイブリッド・プロモーター、例えばtacプロモーターを含む。他の既知の細菌プロモーターもまた好適である。それらの配列は公表されており、それによって、いずれかの有用な制限部位を提供するために必要とされる場合に、リンカー又はアダプターを使用して当業者が所望のDNA配列にそれらを連結することを可能にする。

【0081】

酵母宿主との使用のための好適なプロモーターもまた当該技術分野で周知である。酵母エンハンサーは酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用のための好適なプロモーターは周知であり、これだけに制限されることなく、例えばポリオマウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、そして最も好ましくはシミアンウイルス40（SV40）といったウイルスのゲノムから得られるものを含む。他の好適な哺乳動物プロモーターは、例えば異種哺乳動物プロモーター、例えば熱ショック・プロモーター及びアクチン・プロモーターを含む。

【0082】

UNC5H2d遺伝子発現を制御するため着目され得る追加のプロモーターは、これだけに制限されることなく：SV40初期プロモーター領域；CWプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの

3'末端の長い反復配列に含まれるプロモーター；ヘルペス・チミジンキナーゼ・プロモーター；メタロチオン（metallothionine）遺伝子の調節配列；例えば -ラクタマーゼ・プロモーターといった原核生物発現ベクター；又はtaeプロモーターを含む。着目されるものは、組織特異性を示し、且つ、トランスジェニック動物で利用された、以下の：膵臓細胞内で活性なエラスターゼI遺伝子制御領域；膵臓細胞内で活性なインシュリン遺伝子制御領域；リンパ系細胞内で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域；精巣、乳房、リンパ系、及び肥満細胞内で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域；肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域；肝臓で活性な -フェトプロテイン遺伝子制御領域；肝臓で活性な 1-アンチトリプシン遺伝子制御領域；骨髄細胞内で活性な -グロビン遺伝子制御領域；脳の乏突起膠細胞内で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域；骨格筋で活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域；及び視床下部で活性な生殖腺刺激性の放出ホルモン遺伝子制御領域を含む動物転写制御領域である。

10

【0083】

高等真核生物による本発明のUNC5H2dポリペプチドをコードするDNAの転写を増強するために、エンハンサー配列がベクター内に挿入されてもよい。エンハンサーは、転写を増強するようにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、配向性及び位置に比較的依存していない。それらは、転写ユニットに対して5'側及び3'側に見られた。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が知られている（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 -フェトプロテイン、及びインスリン）。しかしながら、通常、ウイルスからのエンハンサーが使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーター・エンハンサー、ポリオーマ・エンハンサー、及びアデノウイルス・エンハンサーが、真核細胞プロモーターの活性化のための典型的な増強エレメントである。エンハンサーはUNC5H2d核酸分子に対して5'側又は3'側の位置でベクター内にスプライスされることができ、それはプロモーターから5'側に通常位置している。

20

【0084】

本発明の発現ベクターは、例えば市販のベクターといった開始ベクターから構築されてもよい。そのようなベクターは、所望のランキング配列の全部を含んでもふくまなくてもよい。本明細書中に記載のランキング配列の1つ以上がベクター内にまだ存在していない場合には、それらは個別に得られ、そしてベクター内に連結されるかもしれない。それぞれランキング配列を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

30

【0085】

本願発明を実施するための好ましいベクターは、細菌、昆虫、及び哺乳動物の宿主細胞に適合するものである。このようなベクターは、とりわけpCRII、pCR3、及びpCDNA3.1（Invitrogen、San Diego、CA）、pBSII（Stratagene、La Jolla、CA）、pET15（Novagen、Madison、WI）、pGEX（Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ）、pEGFP-N2（Clontech、Palo Alto、CA）、pETL（BlueBaeII、Invitrogen）、pDSRalpha（PCT公開番号W090/14363）、及びpFastBacDual（Gibco-BRL、Grand Island、NY）を含む。

【0086】

更に好適なベクターは、これだけに制限されることなく、コスミド、プラスミド、又は改変ウイルスを含むが、しかし、当然のことながら、ベクター系が選択された宿主細胞に適合しなければならない。そのようなベクターは、これだけに制限されることなく、例えばBluescriptプラスミド誘導體（高いコピー数のCol EIベースのファージミド；Stratagene Cloning Systems、La Jolla、CA）といったプラスミド、Taq増幅PCR産物のクローニングのために設計されたPCRクローニング・プラスミド（例えば、TOPO（商標）TA Cloning “Kit及びPCR2.1”プラスミド誘導體；Invitrogen）、並びに哺乳動物、酵母、又はウイルスのベクター、例えばパキウイルス発現系（pBacPAKプラスミド誘導體；Clontech）を含む。

40

【0087】

ベクターが構築され、そしてUNC5H2dポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの

50

適当な部位内に挿入された後に、増幅、及び/又はポリペプチド発現のための好適な宿主細胞内にその完全なベクターを挿入することができる。選択された宿主細胞内へのUNC5H2dポリペプチドのための発現ベクターの形質転換は、例えばトランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、又は他の既知の技術といった方法を含めた周知の方法で達成できる。選択される方法は、1つには、使用されるべき宿主細胞のタイプに依存する。これらの方法及び他の適当な方法は、当業者にとって周知であり、例えば、Sambrookら、前記、において規定されている。

【0088】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えばE.コリ（*E. coli*））又は真核生物宿主細胞（例えば、酵母、昆虫、又は脊椎動物細胞）であるかもしれない。適当な条件下で培養される場合に、宿主細胞は、続いて（宿主細胞が培地中にそれを分泌する場合）培地から、又は（それが分泌されない場合）直接それを産生する宿主細胞から回収することができるUNC5H2dポリペプチドを合成する。適当な宿主細胞の選択は、例えば所望の発現レベル、活性に望ましい又は必要なポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化又はリン酸化）、並びに生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さといった様々な要因に依存する。

【0089】

多くの好適な宿主細胞が当該技術分野で知られており、そして、多くがAmerican Type Culture Collection（ATCC）、Manassas, VAから入手可能である。例は、これだけに制限されることなく、哺乳動物細胞、例えばチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO）、CHO MFR（-）細胞、ヒト胚腎臓（HEK）293又は293T細胞、又は3T3細胞を含む。好適な哺乳動物宿主細胞の選択、並びに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物の産生、及び精製の方法は、当該技術分野で知られている。他の好適な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1及びCOS7細胞株、並びにCV-1細胞株である。更に典型的な哺乳動物宿主細胞は、形質転換細胞系を含めた霊長類の細胞株及び齧歯類の細胞株を含む。正常二倍体細胞、初代組織インビトロ培養由来の細胞系統、並びに初代体外移植片もまた好適である。候補細胞は、選択遺伝子が遺伝子型として欠くか、又は優位に作用する選択遺伝子を含むかもしれない。他の好適な哺乳動物細胞株は、これだけに制限されることなく、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、スイス人由来の3T3株、Balb-c若しくはNIHマウス、BHK、又はHaKハムスター細胞株を含む。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現の当業者に知られており、かつ、利用可能である。

【0090】

同様に、細菌細胞が、本発明に好適な宿主細胞として有用である。例えば、E.コリの様々な菌株（例えば、HB101、DH5、DH10、及びMC1061）が、宿主細胞としてバイオテクノロジーの分野で周知である。B.サブチリス（*B. subtilis*）、シュードモナス種（*Pseudomonas* spp.）、他のパチルス種（*Bacillus* spp.）、ストレプトマイセス種（*Streptomyces* spp.）等の様々な菌株もまた、この方法で使用することができる。

【0091】

当業者に知られている酵母細胞の多くの菌株もまた、本発明のポリペプチド発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞は、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）及びピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）を含む。

【0092】

更に、所望の場合には、昆虫細胞系が本発明の方法に利用されてもよい。そのような系は、例えばKittsら、1993年、*Biotechniques*、14:810-17ページに説明されている。好ましい昆虫細胞は、Sf-9及びH3（Invitrogen）である。

【0093】

当業者は、グリコシル化UNC5H2dポリペプチドを発現するのにトランスジェニック動物もまた使用できる。例えば、当業者は、ミルク産生トランスジェニック動物（例えば、ウシ又はヤギ）を使用して、畜乳中に存在するグリコシル化ポリペプチドを得ることができる。当業者は、UNC5H2dポリペプチドを製造するのに植物もまた使用できるが、しかしな

10

20

30

40

50

がら、一般に、植物に現れるグリコシル化は哺乳動物細胞において作り出されるそれと異なるので、ヒトの治療用途に好適でないグリコシル化誘導体をもたらすかもしれない。

【0094】

ポリペプチドの製造

UNC5H2dポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用することで培養できる。通常、培地は、細胞の増殖及び生存に必要な全ての栄養素を含む。E.コリ細胞を培養するための好適な培地は、例えばLuria Broth (LB)、及び/又はTerrific Broth (TB)を含む。真核細胞を培養するための好適な培地は、Roswell Park Memorial Institute培地1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM)、及び/又はDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を含み、その全てが培養される特定の細胞株に必要な血清、及び/又は増殖因子を補われるかもしれない。昆虫培養のための好適な培地は、イーストレート、ラクトアルブミン加水分解物、及び/又は必要に応じて、胎児ウシ血清が補われたGrace's培地である。

10

【0095】

通常、トランスフェクションされたか又は形質転換された細胞の選択的増殖に有用な抗生物質又は他の化合物が、補足物として培地に加えられる。使用すべき化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在している選択可能マーカー・エレメントによって決定される。例えば、選択可能マーカー・エレメントがカナマイシン耐性である場合には、培養液に加えられる化合物はカナマイシンになる。選択的増殖のための他の化合物は、アンピシリン、テトラサイクリン、及びネオマイシンを含む。

20

【0096】

ポリペプチドの精製と分離

宿主細胞によって産生されたUNC5H2ポリペプチドの量は、当該技術分野で既知の標準法を使用することで評価できる。そのような方法は、これだけに制限されることなく、ウエスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、及び/又は活性アッセイ、例えばDNA結合ゲルシフト・アッセイを含む。

【0097】

UNC5H2ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は細胞培地中に見られるであろう。しかしながら、UNC5H2dポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、それは(真核宿主細胞については)細胞質、及び/又は核、あるいは(グラム陰性細菌宿主細胞については)サイトゾルに存在する。宿主細胞の(真核宿主細胞について)細胞質、及び/又は核、あるいは(細菌宿主細胞について)サイトゾルに位置するUNC5H2ポリペプチドに関しては、(グラム陰性菌の封入体を含めた)細胞内物質は、当業者に知られるいずれかの標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出されることができる。例えば、宿主細胞を溶解させて、フレンチプレス、均質化处理、及び/又は超音波処理とそれに続く遠心分離によって周辺質/細胞質の内容物を放出させることができる。

30

【0098】

UNC5H2ポリペプチドがサイトゾル中で封入体を形成した場合には、多くの場合、封入体は、内側、及び/又は外側の細胞膜に結合するので、遠心分離後に主としてペレット物質中に見つけることができる。その後、封入体を放出させ、粉々に壊し、可溶化するために、前記ペレット物質を、極端なpHにて、あるいは、例えばアルカリ性pHにてジチオスレイトール又は酸性pHにてトリス・カルボキシエチル・ホスフィンといった還元剤の存在下、例えば界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、又は尿素誘導体といったカオトロピック剤で処理することができる。そして、可溶化されたUNC5H2ポリペプチドを、ゲル電気泳動、免疫沈降等を使用して分析できる。UNC5H2dポリペプチドを分離することが所望される場合、分離は、例えば本明細書中、及びMarstonら、1990年、Meth. Enz.、182:264-75ページに記載の標準法を使用して達成される。

40

【0099】

50

場合によっては、UNC5H2ポリペプチドは、分離の時点で生物学的に活性でないかもしれない。生物活性を復元するために、その三次元構造へのポリペプチドの「リフォールディング」又は変換のための、あるいはジスルフィド結合を作り出すための様々な方法を使用できる。そのような方法は、特定の濃度のカオトロープの存在下、通常7を越えるpHに可溶化されたポリペプチドをさらすステップを含む。カオトロープの選択は封入体の可溶化のために使用される選択に非常に類似しているが、通常、カオトロープはより低濃度にて使用されて、そして必ず可溶化に使用されるカオトロープと同じであるというわけではない。多くの場合、リフォールディング/酸化溶液は、還元剤、あるいはタンパク質のシステイン架橋の形成におけるジスルフィド・シャフリングの発生を可能にする特定の酸化還元電位を生み出すための特有の比で還元剤に加えてその酸化形態も含む。一般的に使用される酸化還元対のいくつかは、システイン/シスタミン、グルタチオン (GSH) / ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオスレイトール (DTT) / ジチアンDTT、及び2-2-メルカプトエタノール (bME) / ジチオ-b (ME) を含む。多くの事例において、共溶媒は、リフォールディングの有効性を高めるために使用されるか又は必要であるかもしれず、そしてこのために使用されるより一般的な試薬は、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール、アルギニン等を含む。

10

20

30

40

50

【0100】

封入体がUNC5H2ポリペプチド発現により顕著な程度まで形成されない場合、その後、ポリペプチドは細胞ホモジネートの遠心分離後に主として上清中に見られる。ポリペプチドは、例えば本明細書中に記載の方法といった方法を使用して上清から更に分離されることができる。

【0101】

溶液からのUNC5H2dポリペプチドの精製は、様々な技術を使用することで達成されることができ。カルボキシル-又はアミノ末端のいずれかに、例えばHexa-ヒスチジン (UNC5H2dポリペプチド/hexaHis) といったタグ、又は例えばFLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) 若しくはmyc (Invitrogen) といった他の小型ペプチドを含むようにポリペプチドが合成された場合、それは、カラム・マトリックスがタグに対して高い親和性を有するアフィニティー・カラムに溶液を通すことによって、ワンステップのプロセスで精製されることができる。例えば、ポリヒスチジンは、高い親和性及び特異性でニッケルに結合する。よって、ニッケルのアフィニティー・カラム (例えば、Qiagenニッケル・カラム) をUNC5H2dポリペプチド/ポリHisの精製に使用することができる。

【0102】

更に、UNC5H2dポリペプチドは、UNC5H2dポリペプチドを特異的に認識し、そして結合することができるモノクローナル抗体の使用を通じて精製されることができる。

【0103】

精製のための他の好適な手順は、これだけに制限されることなく、アフィニティー・クロマトグラフィー、免疫アフィニティー・クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、(天然ゲル電気泳動を含む) 電気泳動とそれに続くゲル溶出、及び調製用等電点電気泳動 (「イソプライム」機構/技術、Hoefler Scientific, San Francisco, CA) を含む。場合によっては、高い純度を達成するために2つ以上の精製技術を組み合わせてもよい。

【0104】

また、UNC5H2dポリペプチドは、当該技術分野で知られた技術を使用する化学合成法 (例えば、固相ペプチド合成) によってもまた調製されるかもしれない。そのようなポリペプチドは、アミノ末端上にメチオニンを伴って又はメチオニンを伴わずに合成されてもよい。化学的に合成されたUNC5H2dポリペプチドは、これらの参考文献の中で説明された方法を使用して酸化されて、ジスルフィド架橋を形成するかもしれない。化学的に合成されたUNC5H2dポリペプチドは、組み換えにより製造された又は天然源から精製した対応のUNC5H2dポリペプチドに匹敵する生物活性を持っていることが期待され、よって、組み換え又は天然のUNC5H2dポリペプチドと互換性を持って使用されることができる。

【0105】

UNC5H2dポリペプチドを得る他の手段は、例えばUNC5H2dポリペプチドが天然に見られる源の組織、及び/又は体液といった生体サンプルからの精製によるものである。そのような精製は、本明細書中に説明したタンパク質精製方法を使用して実施することができる。精製中のUNC5H2dポリペプチドの存在は、例えば組み換えにより調製されたUNC5H2dポリペプチド又はそのペプチド断片に対して作り出された抗体を使用して観察されることができる。核酸及びポリペプチドを製造するための多くのさらなる方法が、当該技術分野で知られており、そしてその方法がUNC5H2dポリペプチドに対する特異性を持つポリペプチドを製造するために使用できる。例えば、mRNAとそれをコードしたペプチドの間の融合タンパク質の製造について説明するRobertsら、1997年、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303ページを参照のこと。更に、米国特許番号第5,824,469号は、特異的な生物学的機能を実施することができるオリゴヌクレオチドを得るための方法を説明している。前記手順は、それぞれ5'側の無作為化された配列、中央のあらかじめ選択された配列、及び3'側の無作為化された配列を持つ、異種のオリゴヌクレオチドプールを製造することを伴う。得られた異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞集団内に導入される。そして、細胞の亜集団は、所定の生物学的機能を示すものに関してスクリーニングされる。その亜集団から、所望の生物学的機能を実施することができるオリゴヌクレオチドが分離される。

【0106】

ペプチド又はポリペプチドを製造するプロセスは当該技術分野で知られている。これは、推計学的遺伝子又はその断片を製造し、次に、これらの遺伝子を宿主細胞に導入することによって行なわれ、上記宿主細胞が推計学的遺伝子によってコードされた1つ以上のタンパク質を産生する。そして、宿主細胞はスクリーニングされ、所望の活性を持つペプチド又はポリペプチドを産生するそれらのクローンが同定される。

【0107】

ペプチド又はポリペプチドを製造するための他の方法は、Athensys, Inc.によって出願されたPCT/IJS98/20094 (WO99/15650)に記載されている。「遺伝子発見のための遺伝子発現の無作為の活性化」(RAGE-GD)として知られるプロセスは、インサイツ組み換え法による内因性遺伝子の発現又は過剰発現の活性化を伴う。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同的又は非正統的組み換えによって遺伝子の発現を活性化することができる標的細胞内に調節配列を組み入れることによって活性化されるか又は増強される。標的DNAは、最初に、放射線に晒され、そして遺伝子プロモーターを挿入される。プロモーターは、最終的に遺伝子の前部にて、遺伝子の転写を開始する裂け目を見つける。これが所望のペプチド又はポリペプチドの発現をもたらす。

【0108】

これらの方法が、例えば生化学アッセイ、細胞アッセイ、及び生物全体のアッセイ(例えば、植物、マウス等)といった様々なアッセイの統合における高速大量処理表現型スクリーニングのために後に使用できる総合的なUNC5H2dポリペプチド発現ライブラリーを作成するためにも使用できることは理解される。本明細書中に説明した核酸及びポリペプチド分子が組み換え及び他の手段によって製造されることができることは、当業者によって理解される。

【0109】

本明細書中では、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって、又は修飾ペプチド結合、すなわちペプチド同配体によって互いに結合した2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。この用語は、短鎖(ペプチド及びオリゴペプチド)、並びにより長い鎖(タンパク質)に言及する。

【0110】

本発明のポリペプチドは、成熟タンパク質の形態であるか、あるいは、プレ、プロ、又はプレプロ・タンパク質の開裂させて、活性な成熟型ポリペプチドを作り出すことによって活性化されることができるプレ、プロ、又はプレプロ・タンパク質であってもよい。そ

のようなポリペプチドにおいて、プレ、プロ、又はプレプロ配列は、リーダー又は分泌配列であるか、あるいは成熟型ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列であるかもしれない。

【0111】

ポリペプチドは、例えば翻訳後プロセッシングといった天然の過程によって、又は当該技術分野で周知の化学的修飾技術によって修飾された、20種の遺伝的にコードされたアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。例えば、本発明のポリペプチドの中に一般的に存在しているかもしれない既知の修飾の中には、グリコシル化、脂質付着、硫酸化、例えばグルタミン酸残基、ヒドロキシル化、及びADP-リボシル化といった -カルボキシ化がある。他の可能性のある修飾は、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、GPIアンカー形成、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、転移RNAを介したタンパク質へのアミノ酸の付加、例えばアルギニン化、及びユビキチン化を含む。

10

【0112】

修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、及びアミノ又はカルボキシル末端を含むポリペプチドの中のどこでも起こりうる。実際、共有結合修飾によるポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端、あるいはその両方の閉塞が、天然及び合成ポリペプチドにおいて一般的であり、そしてそのような修飾は本発明のポリペプチド内に存在するかもしれない。

20

【0113】

ポリペプチド内に生じる修飾は、多くの場合、ポリペプチドがどのように作られているかに依存する。組み換えによって作られたポリペプチドに関して、主に修飾の性質及び程度は、特定の宿主細胞の翻訳後修飾の潜在的可能性、及び問題のポリペプチドのアミノ酸配列内に存在している修飾シグナルによって判断される。例えば、グリコシル化パターンは様々な宿主細胞タイプの間で異なる。

【0114】

アミノ酸の置換、挿入、又は欠失を含むUNC5H2dの突然変異体は、1つ以上のアミノ酸残基が保存又は非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）で置換されるポリペプチドを含むことができ、そしてそのような置換されたアミノ酸残基は遺伝コードによってコードされるものか、又はそうでないかもしれない。典型的なそのような置換は、Ala、Val、Leuと、Ileの間；SerとThrの間；酸性残基AspとGluの間；AsnとGlnの間；塩基性残基LysとArgの間；芳香族残基PheとTyrの間にある。特に好ましいものは、任意な組み合わせのいくつか、すなわち、5~10、1~5、1~3、1~2、又はちょうど1つのアミノ酸が置換、付加、及び欠失される変異体である。特に好ましいものは、タンパク質の特性と活性を変更しないサイレント置換、付加、及び欠失である。また、この点で特に好まれているのは、保存的置換である。そのような突然変異体は、アミノ酸残基の1つ以上が置換基を含むポリペプチドも含む。

30

【0115】

本発明によると、どんな置換も好ましくは「保存的な」又は「害のない」アミノ酸置換であるべきである。分子の構造と生物学的機能を保存するために十分に類似した化学的特性（例えば、塩基性の陽性電荷アミノ酸は別の塩基性陽性電荷アミノ酸によって置き換えられるべきである）を持っているアミノ酸を導入する置換が一般的に規定される。

40

【0116】

好ましくは、1、2、3、4、5、10、20、30個以上の保存的アミノ酸置換が作り出される。

【0117】

文献は、保存的アミノ酸置換の選択がタンパク質の配列、及び/又は構造に関する統計的な及び物理化学的な研究に基づいて実施できることに関する多くのモデルを提供する（

50

Rogov SI及びNekrasov AN、2001年)。アミノ酸の特定のサブセットの使用が、タンパク質構造に更に容易に対応させることができ、且つ、機能及び構造のホモログとパラログを検出するために使用できるアミノ酸「同義」置換の分類の助けとなる折り畳み可能な、そして活性なタンパク質を作り出すことを、タンパク質設計実験が示した (Murphy LRら、2000年)。同義アミノ酸基、及びより好ましい同義アミノ酸基を表Iに示す。

【0118】

【表1】

表I

アミノ酸	同義基	より好ましい同義基
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

【0119】

異なる目的で、特定の非保存性突然変異も本発明のポリペプチド内に導入することができる。UNC5H2dの親和性を低下させる突然変異が、その治療能力を潜在的に高める、再利用及び再生されるべきその性能を高める (Robinson CR、2002年)。本発明のポリペプチド内に最終的に存在する免疫原性エピトープは、ワクチンを生み出すために使われるか (Stevanovic S、2002年)、又はタンパク質安定性を高めるか若しくはそれらを修正するための突然変異を選択する既知の方法に従ってそれらの配列を修飾することによって排除することができる (van den Burg B及びEijsink V、2002年; WO 02/05146、WO 00/34317、WO 98/52976)。

【0120】

ペプチドミメティクスに含まれるアミノ酸誘導体のための好ましい代替的な同義基は、表IIに記載のものである。アミノ酸誘導体の不完全な一覧は、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も同様に含む。

【0121】

【表2】

表11

アミノ酸	同義基
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-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, Om, D-Om
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdeA, AdeG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-1-チアゾリジン-4-カルボン酸, D-又はL-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Alb, 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, Alb, beta. -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, 又は5-フェニルプロリン, AdaA, AdaG, シス-3, 4, 又は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, Om, D-Om
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

【0122】

ポリペプチドの誘導体は、アミノ酸、又は20種の遺伝的にコードされた天然のアミノ酸以外のアミノ酸様化学成分を含む。特に、アミノ酸誘導体は、置換されたか又は置換されていない、直鎖又は分岐、あるいは環状アルキル部分を含むことができ、且つ、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、新規に作られるか、又は商業的供給源から得ることができる (Calbiochem-Novabiochem AG, Switzerland; Bachem, USA)

40

【0123】

好ましくは、誘導体は、1つ以上の官能基に結合した少なくとも1つの部分を含むが、その官能基はアミノ酸残基上の1つ以上の側鎖として生じる。

【0124】

好ましくは、誘導体は水溶性高分子である。

【0125】

好ましくは、水溶性高分子は、以下のポリエチレングリコール、モノ-メトキシ・ポリ

50

エチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール・ホモポリマー、ポリプロピレン・オキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、及びポリビニルアルコールから成る群から選択される。

【0126】

PEG化は、既知の方法、例えば、WO99/55377に記載されている方法によって行なうことができる。

【0127】

タンパク質の構造及び機能を調査するか、及び/又は改良するために、インビトロ及びインビボの翻訳系の両方を使用して非天然アミノ酸誘導体をタンパク質内に組み込むための様々な方法論が、文献に開示されている(Dougherty DA、2000年)。また、ペプチドミメティクス、並びに非ペプチドミメティクスの合成及び開発のための技術は、当該技術分野で周知である(Golebiowski Aら、2001年; Hruby VJ及びBalse PM、2000年; Sawyer TK、"Structure Based Drug Design"中、Veerapandian P編、Marcel Dekker Inc.、557-663ページ、1997年)。

10

【0128】

本発明のポリペプチドはUNC5H2dポリペプチドの断片も同様に含む。

【0129】

本明細書中では、用語「断片」は、UNC5H2dポリペプチドのアミノ酸配列の、全部ではなく、一部分と同じアミノ酸配列を持つポリペプチドについて言及する。断片は、配列からの少なくともn個の連続したアミノ酸を含むはずであり、そして、特定の配列に依存するnは、好ましくは7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、又はそれ以上)である。小断片は抗原決定基を形成できる。

20

【0130】

完全長UNC5H2dポリペプチドの断片は、それぞれUNC5H2dポリペプチド配列中の1、2、3、4つ、又はそれ以上の隣接エクソン配列の組み合わせから成ることができる。例えば、そのような組み合わせは、第1と第2エクソン、第2と第3エクソン、又は第1と第3エクソンなどを含む。そのような断片が本発明に含まれる。

【0131】

そのような断片は「独立型」である、すなわち、他のアミノ酸又はポリペプチドの一部分ではないか、又はそこに融合していなくても、あるいは、それらは、それらが一部又は領域を形成するより大きなポリペプチドの中に含まれてもよい。より大きなポリペプチドの中に含まれている場合、本発明の断片は、最も好ましくは1つの連続した領域を形成する。例えば、ある好ましい態様は、断片のアミノ末端に融合したプレ、及び/又はプロ・ポリペプチド領域、及び/又は断片のカルボキシル末端に融合した追加領域をもつ断片に関する。しかしながら、数個の断片が、1つのより大きなポリペプチド内に含まれるかもしれない。

30

【0132】

選択的結合因子

用語「選択的結合因子」は、UNC5H2dポリペプチドに対する特異性を有する分子に言及する。好適な選択的結合因子は、これだけに制限されることなく、抗体とその誘導体、ポリペプチド、及び小分子を含む。好適な選択的結合因子は、当該技術分野で知られている方法を使用して調製されることができる。

40

【0133】

典型的な本発明のUNC5H2dポリペプチド選択的結合因子は、UNC5H2dポリペプチドの特定の部分に結合することができ、それによってUNC5H2dポリペプチド受容体へのポリペプチドの結合を抑制する。

【0134】

例えばUNC5H2dポリペプチドに結合する抗体及び抗体断片といった選択的結合因子が、本発明の範囲の中に存在する。抗体は、単一特異性ポリクローナル抗体; ポリクローナル

50

抗体；モノクローナル（MAbs）抗体；組み換え抗体；キメラ抗体；例えば、相補性決定領域（CDR）グラフト化抗体といったヒト化抗体；ヒト抗体；単鎖抗体；及び／又は二重特異性抗体；並びにその断片；変異体；又は誘導体を含むかもしれない。抗体断片は、UNC5H2dポリペプチド上のエピトープに結合するそれらの抗体部分を含む。そのような断片の例は、完全長の抗体の酵素的開裂によって生み出されるFab及びF（ab'）を含む。他の結合断片は、遺伝子組み換え技術、例えば抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組み換えプラスミドの発現によって生み出されるものを含む。

【0135】

一般に、UNC5H2dポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、UNC5H2dポリペプチドとアジュバントの複数の皮下又は腹腔内投与によって動物（例えば、ウサギ又はマウス）において製造される。UNC5H2dポリペプチドを、免疫する種において免疫原性である担体タンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシ・チログロブリン、又はダイズ・トリプシンインヒビタに抱合することは有効であるかもしれない。また、凝集剤、例えばミョウバンは、免疫応答を強化するために使用される。免疫後に、動物は採血され、そして、血清が抗UNC5H2d抗体価についてアッセイされる。

10

【0136】

UNC5H2dポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養継代細胞株による抗体分子の産生を提供するいずれかの方法を使用することで製造される。モノクローナル抗体を製造するための好適な方法の例は、ハイブリードーマ法とヒトB細胞ハイブリードーマ法を含む。UNC5H2dポリペプチドに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリードーマ細胞系もまた本発明によって提供される。

20

【0137】

本発明のモノクローナル抗体は、治療に役立つものとしての使用のために修飾されるかもしれない。1つの態様は、重（H）鎖、及び／又は軽（L）鎖の一部が、特定の種由来の抗体の対応配列と同一若しくは相同であるか、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する一方で、その鎖の残りの部分が、別の種由来の抗体の対応配列と同一若しくは相同であるか、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する「キメラ」抗体である。所望の生物活性を示す限り、そのような抗体の断片もまた含まれる。

【0138】

他の態様において、本発明のモノクローナル抗体は「ヒト化」抗体である。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外の源からそこに導入された1つ以上のアミノ酸残基を持つ。ヒト化は、例えば当該技術分野で記載されている方法を使用して、齧歯動物の相補性決定領域の少なくとも一部をヒト抗体の対応部分に置換することによって実行されることができる。

30

【0139】

用語「抗体」又は「免疫グロブリン」は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方を含むことを意図する。好ましい抗体は、抗原に反応するモノクローナル抗体である。用語「抗体」は、抗原に反応する2つ以上の抗体の混合物（例えば、抗原に反応する様々なタイプのモノクローナル抗体のカクテル）も網羅することを意図する。用語「抗体」は、更に、抗体全体、生物学的に機能的なその断片、一本鎖抗体、及び、例えば2つ以上の種からの部分を含むキメラ抗体といった遺伝子操作された抗体、二機能性抗体、抗体複合体、ヒト化及びヒト抗体を網羅することを意図する。同様に使用できる、生物学的に機能的な抗体断片は、抗原に結合するのに十分である抗体由来のそれらのペプチド断片である。本明細書中において、抗体は、抗体全体、並びに着目のエピトープ、抗原、又は抗原断片に結合することができる任意の抗体断片（例えば、F（ab'）.sub.2、Fab'、Fab、Fv）を含むことを意図する。

40

【0140】

「精製抗体」は、それが一緒に天然に生じた他のタンパク質、炭水化物、及び脂質が十分に取り除かれているものを意味する。そのような抗体が、本発明のUNC5h2dポリペプチド（又はその抗原性断片）に「優先的に結合する」、すなわち、他の抗原性に関係ない分子を実質的に認識せず、且つ、結合しない。本発明の精製抗体は、好ましくは特定の種の

50

UNC5H2dに対して免疫反応性及び免疫特異性であり、そしてより好ましくは、天然のヒトUNC5H2dに対して免疫特異性である。

【0141】

「特異的に結合する」は、特定のポリペプチド、すなわち、UNC5H2dに対する抗体の高い結合活性、及び/又は高い親和性の結合を意味している。この特定のポリペプチド上のエピトープへの抗体の結合は、好ましくは、任意な他のエピトープへの同じ抗体の結合よりも強い。UNC5H2dに特異的に結合する抗体は、弱い、けれども検出可能な、レベル（例えば、着目のポリペプチドで示された結合の10%以下）で他のポリペプチドに結合することができるかもしれない。そのような弱い結合、又はバックグラウンド結合は、例えば、適当な対照の使用によって、着目の化合物又はポリペプチドへの特異的な抗体結合から容易に識別可能である。

10

【0142】

好ましくは、親和性は、UNC5ファミリーの既知のメンバーの他のメンバーに比べて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、又は 10^6 倍の高い。

【0143】

用語「遺伝子操作された抗体」は、アミノ酸配列が天然の抗体のものから変更された抗体を意味する。本願発明に対する遺伝子組み換え技術の関連性から、当業者は天然の抗体に見出されるアミノ酸の配列に限定される必要はない；抗体は、所望の特徴を得るために再設計されることができる。可能な変異は多く、たった1つだけ又はいくつかのアミノ酸の変化から、例えば可変又は定常領域の完全な再設計にまで及ぶ。一般に、定常領域における変更は、例えば補体結合、膜との相互作用、及び他のエフェクター機能といった特徴の改良又は変更のために行われる。可変領域における変更は、抗原結合特徴を改良するために行われる。

20

【0144】

用語「ヒト化抗体」又は「ヒト化免疫グロブリン」は、ヒト・フレームワーク、ヒト以外の抗体からの少なくとも1つ、そして好ましくは全ての相補性決定領域(CDRs)を含み、存在するあらゆる定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85~90%、好ましくは少なくとも95%同一である免疫グロブリンに言及する。従って、ことによると相補性決定領域以外のヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、1つ以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。例えば、Queenら、米国特許番号第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号；及び同第6,180,370号（上記各文献の全体を本明細書中に援用する）を参照のこと。

30

【0145】

「完全ヒト化抗体」は、ヒト免疫グロブリンの可変及び定常領域の両方を含む分子である。完全ヒト化抗体は、潜在的に、例えば自己免疫疾患といった慢性の、及び再発性の疾病に関して反復処置が必要である治療用途に使用される可能性がある。完全ヒト抗体の調製のための1つの方法は、マウス液性免疫系の「ヒト化」、すなわち、内因性Ig遺伝子が不活化されたマウスへのヒト免疫グロブリン(Ig)座の導入によってヒトIgを産生できるマウス系統(Xenomice)の製造から成る。Ig座は、それらの物理的構造、並びに最終的に幅広い免疫応答を生じるために必要とされる遺伝子の再配列及び発現過程の両方に関して非常に複雑である。抗体の多様性は、Ig座に存在している別個のV、D、及びJ遺伝子間の組み合わせ再配列によって主に作り出される。これらの座は、抗体発現、対立遺伝子排除、クラス・スイッチング、及び親和性成熟を制御する分散型調節要素も含む。マウスへの非再配列ヒトIg導入遺伝子の導入は、マウス組み換え機構がヒト遺伝子に適合することを実証した。更に、様々なイソタイプの抗原特異的hu-mAbsを分泌するハイブリドーマは、抗原によるXenomiceの免疫によって得られる。

40

【0146】

完全ヒト化抗体及びそれらの製造方法は当該技術分野で知られている(Mendezら、Nature Genetics 15:146-156ページ(1997年)；Buggemannら、Eur. J. Immunol. 21:1323-

50

1326ページ(1991年);Tomizukaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727ページ(2000年);特許WO 98/24893)。

【0147】

用語「キメラ抗体」は、定常領域が1つの種(通常、ヒト)の抗体に由来し、そして可変領域が他の種(通常、齧歯動物)の抗体に由来する抗体に言及する。従って、キメラ抗体は、様々な部分が異なる動物種に由来する分子、例えばマウスMab由来の可変領域とヒトIg定常領域を持ったものである。キメラ抗体は、適用において免疫原性を減少させ、且つ、製造において流量を増すために主に使用され、例えば、マウスMabsがハイブリドーマからの高い収量を持つがヒトにおいて高い免疫原性を持つ場合には、ヒト/マウス・キメラMabsが使用される。キメラ抗体及びそれらの製造方法は当該技術分野で知られている(Cabillyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277ページ(1984年);Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855ページ(1984年);Boulianneら、Nature 312:643-646ページ(1984年);Cabillyら、欧州特許出願第125023号(1984年11月14日公開);Neubergerら、Nature 314:268-270ページ(1985年);Taniguchiら、欧州特許出願第171496号(1985年2月19日公開);Morrisonら、欧州特許出願第173494号(1986年3月5日公開);Neubergerら、PCT出願WO8601533(1986年3月13日公開);Kudoら、欧州特許出願第184187号(1986年6月11日公開);Sahaganら、J. Immunol. 137:1066-1074ページ(1986年);Robinsonら、国際特許出願番号WO8702671(1987年5月7日公開);Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443ページ(1987年);Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218ページ(1987年);Betterら、Science 240:1041-1043ページ(1988年);Riechmannら、Nature 332:323-327ページ、並びにHarlow及びLane、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、前記)。これらの参考文献の全体を本明細書中に援用する。

10

20

【0148】

本明細書中では、語句「抗体断片」は、抗原、抗原決定基、又はエピトープに特異的に結合することができる抗体の一部を含む分子に言及する。本発明で有用な抗体のFabとF(ab')₂、及び他の断片は、完全な抗体分子について本明細書中に開示された方法に従って、それらの抗原の検出及び定量化に使用できる。そのような断片は、通常、例えばパバイン(Fab断片を生み出すため)又はペプシン(F(ab')₂断片を生み出すため)といった酵素を使用したタンパク質分解的開裂によって作り出される。

30

【0149】

本明細書中を通じて触れられる抗体に関して、用語「モノクローナル抗体」は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、完全ヒト化抗体、可溶性の又は結合型の標識をされ得る抗イディオタイプ抗体に対する抗体(抗抗Id抗体)、並びに任意な既知の技術、例えば、これだけに制限されることなく、酵素的開裂、ペプチド合成、又は組み換え技術によって提供される断片を含むことを意味する。モノクローナル抗体は、抗原に特異的な抗体の実質的に均一な集団を含み、その集団は実質的に類似したエピトープ結合部位を含む。Mabsは当業者に知られている方法で入手できる。例えば、Kohler及びMilstein、Nature、256:495-497ページ(1975年);米国特許番号第4,376,110号;Ausubelら編、Harlow及びLane、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory(1988年);並びにColliganら編、Current Protocols in Immunology、Greene Publishing Assoc.及びWiley Interscience N.Y.、(1992-1996年)を参照のこと。前記参考文献の内容の全体を本明細書中に援用する。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、GILDを含めた任意の免疫グロブリンクラス、及びそのサブクラスであってもよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロ、インサイツ、又はインビボで培養されてもよい。インビボ又はインサイツにおいて高力価のMabsの製造は、現在の好ましい製造方法でこれを作り出す。用語「モノクローナル抗体」は、完全な分子、並びにその断片、例えば抗原に結合できるFab及びF(ab')₂の両方を含むことも意味する。Fab及びF(ab')₂断片は、完全な抗体のFc断片を欠き、循環からより迅速に消え、そして完全な抗体より少ない非特異的組織結合を有するであろう(Wahlら、J. Nucl. Med. 24:316-325ページ(1983年))。

40

50

【0150】

モノクローナル抗体は、それによって抗体に分子が結合するようにそれが分子と特異的に反応できる場合に、分子に「結合できる」と考えられる。

【0151】

「抗原」は、抗体によって結合されることができ分子又は分子の一部であり、更に、抗原はその抗原のエピトープに結合することができる抗体を製造するように動物を誘導することができる。抗原は、1つ以上のエピトープを持つことができる。前記の特異的反応は、抗原が高度に選択的な様式でその対応する抗体上のエピトープと反応し、且つ、他の抗原によって誘発されたかもしれない多数の他の抗体と反応しないことを示すことを意味する。

10

【0152】

本発明において有効な、抗体の断片を含めた抗体は、サンプル中のそれらの抗原を量的又は質的に検出するか、又はそれらの抗原を発現する細胞の存在を検出するのに使用できる。蛍光顕微鏡による、フローサイトメトリーによる、又は蛍光分析による検出と組み合わせた蛍光標識した抗体（以下を参照のこと）を利用した免疫蛍光技術によってこれを達成できる。

【0153】

本発明に有用な抗体（又は、その断片）は、それらの抗原のインサイト検出のための、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡法のように、組織学的に利用することができる。インサイト検出は、患者から組織学的標本を取り出し、そして本発明の標識抗体を当該標本に供することによって達成できる。抗体（又は断片）は、好ましくは、標識抗体（又は断片）を生体サンプルに適用するか又はかぶせることによって提供される。そのような手順の使用を通じて、抗原の存在だけでなく、調べた組織上のその分布も測定することが可能である。本発明を使用して、当業者は、幅広い種類の組織学的方法（例えば、染色手順）のいずれかをそのようなインサイト検出を達成するために修飾することに容易に気付く。

20

【0154】

抗原に関するそのようなアッセイは、通常、抗原を同定できる標識抗体の存在下での生体サンプル、例えば体液、組織抽出物、例えばリンパ球又は白血球といった新たに採取した細胞、あるいは組織培養でインキューベートされた細胞をインキューベートし、そして当該技術分野で周知の多くの技術のいずれかによって抗体を検出するステップを含む。

30

【0155】

生体サンプルは、固相支持体又は担体、例えばニトロセルロース、あるいは細胞、細胞粒子、又は可溶性タンパク質を固定できる他の固形支持体又は担体に連結できる。そして、支持体又は担体は、上に述べたように、好適な緩衝液で洗浄し、続いて本発明による標識抗体で処理できる。そして、固相支持体又は担体は、もう一度、緩衝液で洗浄されて、結合していない抗体を取り除くことができる。そして、前記固形支持体又は担体上に結合した標識の量を、従来手段によって検出できる。

【0156】

本発明の抗体分子は、「2サイト」又は「サンドイッチ」アッセイとしても知られるイムノメトリック・アッセイにおける利用のために適合させることができる。典型的なイムノメトリック・アッセイにおいて、大量の非標識抗体（又は抗体断片）が固形支持体又は担体に結合され、そして固相抗体、抗原、及び標識抗体の間で形成された三重複合体の検出、及び/又は定量化を可能にするように、大量の検出可能な程度に標識した可溶性抗体が加えられる。

40

【0157】

本発明の抗体は、免疫親和性クロマトグラフィー技術に関連して使用できる。より詳しく述べると、抗体は、クロマトグラフィー・カラム内の物質の表面上に配置されることができる。その後、精製する組成物がカラムを通り抜けることができる。精製するサンプルが抗体に結合するいずれかのUNC5H2dポリペプチドを含む場合、それらのUNC5H2dポリペプチドがサンプルから取り出されて、それによって、精製される。

50

【0158】

従って、手短かに言えば、診断方法は、哺乳動物からの細胞サンプル（例えば、血液サンプル、リンパ節生検、又は組織）を使用してインビトロで実施できるか、又はin vivo造影によって実施できる。

【0159】

本発明の抗体を含む組成物が、例えば、放射免疫測定、ELISA、FACS等によってUNC5H2dの存在を検出するために使用できる。1つ以上の標識部分をヒト化免疫グロブリンに取り付けることができる。典型的な標識部分は、特に放射線学的又は磁気共鳴画像処理技術における、放射線不透過性色素、放射線造影剤、蛍光分子、スピン標識分子、酵素、又は他の標識残基の診断値を含む。

10

【0160】

本発明のIgG抗体調製は、本発明の抗血清から、好ましくはプロテインG免疫沈降反応を通して、プロテインG親和性精製を使用することで有利に精製することができる。免疫された動物由来の抗血清は、ウエスタン免疫ブロッティング分析、免疫沈降、及びELISAを通して、UNC5H2dポリペプチドを最適の感度で検出するために使用できる。

【0161】

一般に、最適な再現性、標準化、又は精度の利益を受ける適用に関して、標的抗原に特異的に結合することができる本発明の精製抗体又は抗体断片は、一般に、本発明の精製されていない調製物と比較して最適であろう。

【0162】

同種抗原に対する最大で 10^{-12} の解離定数を特徴とする親和性を有する抗体又は抗体断片が、一般的な当該技術分野の技術を使用して得ることができることは、当業者によって理解される。

20

【0163】

以上に説明したように、調製は、様々なタイプの検出可能な分子のいずれかに結合した抗体又は抗体断片を有利に含むことができる。

【0164】

抗体断片は、親抗体のように実質的に同一の標的-抗原結合特異性、又は結合特異性と結合親和性の両方を有すると同時に、それが生じた親抗体よりも小さいことの利点を有する。よって、抗体断片は、親抗体より小さいおかげで、その結果一般に、後者より（例えば、全身的にインビボにおいて、又は単独の組織において）優れた生体分布及び拡散特性を有する。例えば単鎖Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂、又はCDRといったFc領域を実質的に欠く抗体断片は、例えばFc領域に特異的に結合することができる分子に調製物を曝露することを伴い、且つ、そのような結合が、好ましくない適用に関して有利である。通常、これは、同族Fc受容体又はFc結合性補体成分（例えば、血清中に存在する補体成分C1q）に晒されるFc領域の望まれない結合を伴う可能性がある。Fc受容体は、以下の：例えば樹枝状細胞といった専門的APCs；Bリンパ球；並びに、例えば好中球、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、及び肥満細胞といった顆粒球を含む多数の免疫細胞型の表面に示される。よって、抗体断片からのFc領域の不存在は、特に調製物を個体にインビボで投与する場合に、望ましくないFc受容体を介在した免疫細胞の活性化、又は補体成分が介在した補体カスケードを特に避けるのに有利であるかもしれない。

30

40

【0165】

F(ab')₂は、抗体分子の2価抗原結合部分を含む抗体分子の断片である。

【0166】

本発明のF(ab')₂調製物は、本発明の抗体調製物、例えば本発明の抗血清を酵素であるペプシンで処理することによって標準的な当該技術分野の方法を使用することで都合よく得ることができる。得られたF(ab')₂生成物は5S粒子である。

【0167】

Fab又はFab'は、抗体の単価抗原結合部分を含む抗体分子の断片である。

【0168】

50

CDRは、例えば、EP0585939に説明のとおり、又はStrandbergら（Protein Eng. 2001年、1月；14（1）：67-74ページ）によって説明されるとおりに作り出されることができる。本発明によるCDRは、修飾CDRであってもよく、そのCDRはUNC5H2dポリペプチドの調節に対する効果を高めた。活性ペプチドの修飾方法の例は、Sawaら、1999年（J. Med. Chem. 42、3289-3299ページ）によって説明されている。

【0169】

本発明のFab'調製物は、本発明の抗体調製物、例えば本発明の抗血清を酵素であるペプシンで処理し、続いて得られたF(ab')₂の還元によって標準的な当該技術分野の方法を使用することで都合よく得ることができる。そのような還元は、チオール還元剤を使用して、そして必要に応じて、ジスルフィド結合の開裂に由来するスルフヒドリル基のためのブロッキング基を使用することで達成することができる。そのような処理は、2つの単価の3.5S Fab'のFc断片を生み出す。Fab調製物は、本発明の抗体調製、例えば本発明の抗血清を酵素であるパインで処理して、完全な軽鎖と、可変及びC_H1ドメインで構成される重鎖の一部をえることによって標準的な当該技術分野の方法を使用することで都合よく得ることができる。

10

【0170】

抗体の酵素的処理によって抗体断片を作り出すための十分な手引きは、当該技術分野の文献に提供される（例えば、以下の：Goldenberg、米国特許番号第4,036,945号及び同第4,331,647号；Porter RR.、1959年、Biochem J. 73：119-126ページを参照のこと）。

【0171】

単鎖Fv（当該技術分野で「scFv」とも呼ばれる）は、好適なポリペプチド・リンカーによって連結された軽鎖の可変領域と、重鎖の可変領域を含む単鎖分子である。

20

【0172】

本発明のF(ab')₂、Fab'、Fab、又は単鎖Fv、あるいはCDR調製物は、遺伝子組み換え技術を使用することで得られる。

【0173】

組み換え抗体断片を得ることは、標的抗原によって免疫された動物のBリンパ球のmRNAを分離し、RT-PCR法によって上記mRNAからcDNAを作り出し、そしてそのcDNAを使って、抗体断片ファージ・ディスプレイ・ライブラリーを構築することによって達成される。Bリンパ球は、免疫した動物の脾臓から、又はもう一つの方法として血液、骨髄、又はリンパ節から都合よく分離されることができる。先に記載の方法論が、任意な所望の標的抗原に結合する親和性、及び/又は特異性を本質的に有する本発明のモノクローナル抗体断片調製物を得るために使用できることは理解される。そのような調製物は、そのように規定された標的抗原結合特性を有する標的抗原に結合することができる試薬の利益を受ける様々な適用において利用できる。

30

【0174】

Fab'はFabと構造が本質的に似ているので、そのようなFab'とFabが、本質的に、同じ重鎖及び軽鎖可変領域を含む場合には、Fab'を含む本発明の調製物は、Fabを含むものと本質的に互換性を持って用いられることができる。多くの場合、最大の親和性で標的抗原に結合することができる抗体断片を含む本発明の調製物の利益を受ける適用に関して、本発明のF(ab')₂調製物は、本発明のFab、Fab'、scFv調製物よりも、そのような一価抗体断片の1価の結合と比較して標的抗原へのF(ab')₂の2価の結合に起因して優れているかもしれない。

40

【0175】

上記に触れられているとおり、適用及び目的に依存して、抗体又は抗体断片調製物は、様々な哺乳動物種が起源である。

【0176】

所望の種が起源である本発明の抗体又は抗体断片調製物は、標的抗原によって免疫されたそのような種の動物の血清由来であることができる。

【0177】

50

ヒト若しくはヒト化抗体又は抗体断片の本発明の調製物は、個体への上記調製物の投与を伴う適用に望ましいかもしれない。例えば、ヒト若しくはヒト化抗体又は抗体断片は、一般に、免疫学的に最適に許容される傾向があり、従って、ヒトにおけるインビボでの最適の半減期を示し、それによって、最適の有効性を示す。ヒト又はヒト化抗体の製造及び開発に関する更なる手引きは、以下に提供される。

【0178】

調製物は、それ自体で使用されるか、又は有効成分として医薬組成物中に処方されることができる。

【0179】

よって、本発明により、医薬として許容される担体、及び有効成分として本発明の抗体又は抗体断片を含む医薬組成物が提供される。

10

【0180】

医薬組成物中の有効成分として本発明の抗体又は抗体断片を処方する方法、及びそのような医薬組成物を開発する方法は、後述のとおりである。

【0181】

好ましくは、抗体又は抗体断片の投与は、有効成分として本発明の抗体又は抗体断片を含む本発明の医薬組成物を投与することによって行なわれる。

【0182】

抗体又は抗体断片は、好ましくは、生化学的活性の所望の調整を達成するように標的抗原に結合する抗体断片の十分なレベルを達成するように投与される。

20

【0183】

当業者、例えば医師、より好ましくはその疾病を専門とする医師は、本発明に関する教示により疾病を効果的に治療するための好適な投与経路、及び抗体又は抗体断片の好適な投与量を含めた好適な治療プロトコールを決定するのに必要な専門的知識を有する。

【0184】

上記のとおり、ポリペプチドである標的抗原、すなわちUNC5H2dは、いろいろな方法で得られる。

【0185】

好ましくは、標的抗原は、標準的な化学合成方法論によって得られる。

【0186】

例えば、標的抗原は、例えば標準的な固相技術を使用することで化学的に合成されうる。そのような技術は、排他的固相合成法、部分的固相合成法、断片縮合法、古典的な溶液合成を含む。固相ポリペプチド合成法は、当該技術分野で周知である [例えば、Stewartら、"Solid Phase Peptide Synthesis"、第2版、Pierce Chemical Company、(1984年)を参照すること]。

30

【0187】

合成ポリペプチドは、例えばCreighton T. [Proteins, structures and molecular principles, W. H. Freeman and Co. N. Y. (1983年)]によって説明されるとおり、調製用高速液体クロマトグラフィー手順によって精製され、そして標準的なアミノ酸配列決定手順によってアミノ酸配列は確認されることができる。

40

【0188】

上記のとおり、調製物は、好ましくは、標的抗原によって哺乳動物を免疫することによって誘導される。

【0189】

インビボで調製物を作り出すことは、血清中への抗体の産生を促すスケジュールに従った、アジュバントの存在下、哺乳動物への標的抗原の反復注射によって有利に行なわれる。標的抗原が適当な免疫原性反応を引き出すことができない程に小さい場合(当該技術分野で「ハプテン」と呼ばれる)、ハプテンを、抗原的に中性の担体、例えばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)又は血清アルブミン[例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)]担体と結合させることができる(例えば、米国特許番号第5,189,178号及び同第5,239,0

50

78号を参照のこと)。担体へのハプテンの結合は、当該技術分野で周知の様々な方法を使用することで行なわれることができる。例えば、アミノ基への直接的な結合が行なわれ、必要に応じて、続けて形成されたイミノ結合の還元が行なわれる。あるいは、例えばジシクロヘキシル・カルボジイミド又は他のカルボジイミド脱水剤といった縮合剤を使用することで担体を結合させることができる。リンカー化合物を、カップリングを達成するためにも使用できる；ホモ二機能リンカー及びヘテロ二機能リンカーの両方が、Pierce Chemical Company, Rockford, Illから入手可能である。そして、得られた免疫原性複合体は、例えばウシ、ヒツジ、マウス、ウサギ等といった好適な哺乳動物対象に注射することができる。インビボにおける抗体の産生に続いて、宿主哺乳動物のその血清力価を、当該技術分野で周知の免疫学的試験法を使用することで容易に計測することができる。

10

【0190】

上記のとおり、調製物は、ヒト化抗体又は抗体断片を有利に含むことができる。

【0191】

ヒト化抗体又は抗体断片は、-好ましくは最小限の-非ヒト抗体由来の部分を持った遺伝子操作されたキメラ抗体又は抗体断片である。ヒト化抗体は、ヒト抗体（レシピエント抗体）の相補性決定領域が、所望の機能性を有する、例えばマウス、ラット、又はウサギといった非ヒト種（ドナー抗体）の相補性決定領域からの残基に置き換えられている抗体を含む。ある場合に、ヒト抗体のFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体の中にも取り込まれた相補性決定領域又はフレームワーク配列の中にも見られない残基も含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、そして通常2つの可変領域の実質的に全てを含み、ここで、相補性決定領域の全部又は実質的に全部が非ヒト抗体のものに対応し、並びにフレームワーク領域の全部又は実質的に全部が関連するヒト共通配列のものに対応する。ヒト化抗体は、通常ヒト抗体から得られた抗体の定常領域、例えばFc領域の少なくとも一部を最適に含む（例えば、Jonesら、1986年、Nature 321：522-525ページ；Riechmannら、1988年、Nature 332：323-329ページ；及びPresta、1992年、Curr. Op. Struct. Biol. 2：593-596ページ）。非ヒト抗体又は抗体断片をヒト化するための方法は、当該技術分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、ヒト以外の源からその中に導入された1つ以上のアミノ酸残基を持つ。これらの非ヒト・アミノ酸残基は、多くの場合、通常可変領域から取られた移入残基と呼ばれる。ヒト化は、ヒト相補性決定領域に対応する齧歯動物の相補性決定領域と置換することによって説明されるとおり（例えば、Jonesら、1986年、Nature 321：522-525ページ；Riechmannら、1988年、Nature 332：323-327ページ；Verhoeyenら、1988年、Science 239：1534-1536ページ；米国特許番号第4,816,567号を参照のこと）本質的に実施されることができる。従って、そのようなヒト化抗体は、完全なものに比べて実質的に少ないヒト可変領域がヒト以外の種からの対応配列によって置換されたキメラ抗体である。実際、ヒト化抗体は、通常、いくつかの相補性決定領域残基、そして場合により、いくつかのフレームワーク残基が齧歯動物の抗体の類似部位からの残基によって置換されるヒト抗体であるかもしれない。ヒト抗体又は抗体断片は、ファージ・ディスプレイ・ライブラリーを含めた当該技術分野で既知の様々な技術を使用することでも製造できる〔例えば、Hoogenboom及びWinter、1991年、J. Mol. Biol. 227：381ページ；Marksら、1991年、J. Mol. Biol. 222：581ページ；Coleら、"Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy"、Alan R. Liss、77ページ（1985年）；Boernerら、1991年、J. Immunol. 147：86-95ページを参照のこと〕。ヒト化抗体は、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的に又は完全に不活されたトランスジェニック動物、例えばマウスの中にヒト免疫グロブリン座をコードする配列を導入することによっても作ることができる。抗原投与の時点で、ヒト抗体産生が、遺伝子再配列、鎖の構築、及び抗体レパートリーを含めたあらゆる点でヒトで見られることが非常に似ている当該動物で観測される。そのようなアプローチを実施するための十分な手引きは、当該技術分野の文献に提供されている（例えば、米国特許番号第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、及び同第5,661,016号；Marksら、1992年、Bio/Technology 10：779-783ページ；Lonbergら、1994年、Nat

20

30

40

50

ure 368 : 856-859ページ ; Morrison、1994年、Nature 368 : 812-13ページ ; Fishwildら、1996年、Nature Biotechnology 14 : 845-51ページ ; Neuberger、1996年、Nature Biotechnology 14 : 826ページ ; Lonberg及びHuszar、1995年、Intern. Rev. Immunol. 13 : 65-93ページを参照のこと。

【 0 1 9 2 】

UNC5H2dポリペプチドを使った細胞の源の同定

本発明のある態様に従って、UNC5H2dポリペプチドに関連している特定の細胞型の源を決定できることは有用であるかもしれない。例えば、適当な治療法を選択する際の補助として疾病又は病的状態の起源を決定することは有用であるかもしれない。ある態様において、UNC5H2dポリペプチドをコードする核酸は、そのようなプローブで細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に説明した細胞を同定するプローブとして使用できる。他の態様において、当業者は、細胞内のUNC5H2dポリペプチドの存在について試験して、それによって上記細胞が本明細書中に説明したタイプの細胞であるかどうか判断するために抗UNC5H2dポリペプチド抗体を使用してもよい。

10

【 0 1 9 3 】

UNC5H2dポリペプチド組成物と投与

治療用組成物は本発明の範囲の中にある。そのようなUNC5H2dポリペプチド医薬組成物は、投与様式との適合性に関して選ばれた医薬として又は生理学的に許容される製剤と混合された、治療的に有効な量のUNC5H2dポリペプチド又はUNC5H2d核酸分子を含むことができる。医薬組成物は、投与様式との適合性に関して選ばれた医薬として又は生理学的に許容される製剤と混合された、治療的に有効な量の1つ以上のUNC5H2dポリペプチド選択的結合因子を含むことができる。

20

【 0 1 9 4 】

本発明は、以下の (i) UNC5H2dポリペプチド、UNC5H2d核酸分子、本発明によるベクター、本発明による宿主細胞、本発明による選択的結合因子、本発明による組成物、本発明による誘導体を含むポリペプチド、又は本発明による融合ポリペプチド、及び (ii) 少なくとも1種類の医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物もまた提供する。賦形剤は、以下の製剤材料から選ぶことができる。

【 0 1 9 5 】

好ましくは、許容される製剤材料は、使用される用量及び濃度において受容者に対して無毒である。

30

【 0 1 9 6 】

医薬組成物は、例えば組成物のpH、浸透圧、粘性、透明度、色、等張性、におい、無菌性、安定性、溶解又は放出速度、吸着、あるいは浸透を修飾するか、維持するか、又は保護するための製剤材料を含むことができる。好適な製剤材料は、これだけに制限されることなく、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、又はリジン）、抗微生物薬、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、又は亜硫酸水素ナトリウム）、緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸、リン酸、又は他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトール又はグリシン）、キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、又はヒドロキシプロピル β -シクロデキストリン）、充填剤、単糖類、二糖類、及び他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、又はデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン）、着色料、着色料、希釈剤（diluting agents）、乳化剤、親水性重合体（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、防腐剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、又は過酸化水素）、5つの溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、又はポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトール又はソルビトール）、懸濁化剤、界面活性剤、又は湿潤剤（例えば、プルロニック；PEG；ソルビタン・エステル；ポリソ

40

50

ルベート、例えばポリソルベート20又はポリソルベート80；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロール又はチロキサパル（tyloxapal）、安定性増強剤（例えば、スクロース又はソルビトール）、張性増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属-好ましくは塩化ナトリウム若しくはカリウム-、又はマンニトール・ソルビトール）、デリバリー媒体、希釈剤（diluent）、賦形剤、及び/又は医薬用アジュバントを含む。

【0197】

最適な医薬組成物は、例えば意図された投与経路、デリバリー・フォーマット、及び所望の投与量に依存して当業者によって決定される。

【0198】

そのような組成物は、UNC5H2d分子の物理的状態、安定性、インピボにおける放出速度、及びインピボにおけるクリアランス速度に影響を与えることができる。

10

【0199】

医薬組成物中の主要な媒体又は担体は、事実上、水性又は非水性のいずれかであるかもしれない。例えば、注射のための好適な媒体又は担体は、水、生理的食塩水、又は人工脳脊髄液であるかもしれない。場合により、非経口投与のための組成物に一般的なその他の材料が補われる。中性緩衝化食塩水又は血清アルブミンと混合した食塩水は、なお一層典型的な媒体である。

【0200】

他の典型的な医薬組成物は、ソルビトール若しくは好適な代替物を更に含むかもしれない、約pH7.0~8.5のトリス緩衝液、又は約pH4.0~5.5の酢酸緩衝液を含む。本発明の1つの態様において、UNC5H2dポリペプチド組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態で任意の製剤と混合することによって保存のために調製されるかもしれない。更に、UNC5H2dポリペプチド産物は、適当な賦形剤、例えばスクロースを使用して、凍結乾燥物として処方されるかもしれない。

20

【0201】

UNC5H2dポリペプチド医薬組成物を非経口投与のために選択することができる。あるいは、組成物は、吸入法のために、又は消化管を通じた、例えば経口でのデリバリーのために選択されることができる。そのような医薬として許容される組成物の調製は、当該技術分野の技能の範囲内にある。

【0202】

製剤成分は投与場所に許容される濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理的pH又はわずかに低いpH、通常、約5~約8のpHの範囲内に組成物を維持するために使用される。

30

【0203】

非経口投与が想定される場合、本発明における使用のための治療用組成物は、医薬として許容される媒体中に所望のUNC5H2d分子を含む、発熱因子を含まない、非経口的に許容される水溶液の形態であることができる。注射剤として特に好適な媒体は、UNC5H2d分子が適当に保存される無菌の等張液として処方される滅菌蒸留水である。更に他の調製物は、その後デポー注射によってデリバリーできる生成物の制御放出又は徐放を提供する、例えば注射可能なマイクロスフィア、生体内分解性粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸若しくはポリグリコール酸）、ビーズ、又はリポソームといった剤を伴う所望の分子の製剤を必要とするかもしれない。ヒアルロン酸もまた使用でき、そしてこれは、循環内の持続した存続時間を促進する効果を持ちうる。所望の分子の導入のための他の好適な手段は、移植可能な薬物デリバリー・デバイスを含む。

40

【0204】

1つの態様において、医薬組成物は吸入法のために処方されてもよい。例えば、UNC5H2dポリペプチドは吸入法のための乾燥粉末として処方されてもよい。UNC5H2dポリペプチド又は核酸分子の吸入溶液は、エアゾール剤デリバリーのための推進剤もまた処方されるかもしれない。更に他の態様において、溶液は中和されてもよい。肺内投与がPCT公開番号W094/20069に更に説明されており、上記文献は化学変性タンパク質の肺デリバリーについて説明している。

50

【0205】

ある製剤が経口的に投与されるかもしれないこともまた想定される。本発明の1つの態様において、この様式で投与されるUNC5H2dポリペプチドは、例えば錠剤やカプセル剤といった固体剤形の調剤に通例、使用されるそれらの担体のあるなしにかかわらず処方できる。例えば、カプセル剤は、生物学的利用能が最大化され、且つ、プレ全身性分解が最小化される消化管内の地点で製剤の有効成分を放出するように設計されることができる。さらなる剤が、UNC5H2dポリペプチドの吸収を容易にするために含まれるかもしれない。希釈剤、着香料、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、及び結合剤もまた利用することができる。

【0206】

他の医薬組成物は、錠剤の製造に好適なイオン-毒性賦形剤との混合物中に有効な量のUNC5H2dポリペプチドを伴うかもしれない。錠剤を滅菌水又は他の適当な媒体中に溶解することによって、溶液を単位剤形で調製することができる。好適な賦形剤は、これだけに制限されることなく、例えば炭酸カルシウム、炭酸若しくは重炭酸ナトリウム、ラクトース、又はリン酸カルシウムといった不活性な希釈剤；あるいは、例えばデンプン、ゼラチン、又はアカシアといった結合剤；あるいは、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、又はテイル (talc) といった滑沢剤を含む。

【0207】

UNC5H2dポリペプチドの持続性又は制御デリバリー製剤に關与する製剤を含むさらなるUNC5H2dポリペプチド医薬組成物は、当業者に明らかである。他の様々な持続性又は制御デリバリー手段を処方するための技術、例えばリポソーム担体、生体内分解性微粒子又は多孔質ビーズ、あるいはデポー注射もまた当業者に知られている。

【0208】

徐放製剤のさらなる例は、成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態の半浸性重合体マトリックスを含む。

【0209】

徐放性マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、エチレン酢酸ビニル、又はポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含むことができる。徐放性組成物はリポソームも含むことができ、リポソームは当該技術分野で知られているいくつかの方法のいずれかによって調製することができる。

【0210】

インビボ投与に使用するUNC5H2d医薬組成物は、通常、無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜を通る過によって達成できる。組成物が凍結乾燥される場合には、この方法を使用した除菌は、凍結乾燥及び再構築の前又は後に行うことができる。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥した形態又は溶液で保存できる。更に、非経口組成物は、一般に、無菌の接触口を有する格納容器、例えば皮下注射針によって刺し通すことができる栓を持つ静脈注射用溶液バッグ又はバイアルの中に置かれる。

【0211】

医薬組成物は処方された時点で、溶液、懸濁液、ゲル、乳液、固体として、又は、脱水若しくは凍結乾燥された粉末として無菌バイアル内に保存されるかもしれない。そのような製剤は、使用する準備ができていない形態、又は投与前に再構築を必要とする形態(例えば、凍結乾燥されたもの)で保存できる。特定の態様において、本発明は、単回用量投与単位を製造するためのキットに向けられる。キットは、それぞれ、乾燥タンパク質の入った最初の格納容器と、水性製剤の入った第2の格納容器の両方を含むことができる。また、単独及び複数の部屋を持つ事前に充填されたシリンジ(例えば、液体シリンジ及びリオシリンジ (lyosyringes))を含むキットも本発明の範囲内に含まれる。

【0212】

治療的に利用するUNC5H2d医薬組成物の有効量は、例えば、治療の状況と目的に依存する。

10

20

30

40

50

【0213】

こうして、治療のための適当な投与量レベルが、デリバリーされた分子、UNC5H2d分子が使用されている適応、投与経路、並びに患者のサイズ（体重、体表面積、又は臓器サイズ）及び状態（年齢及び健康全般）にある程度依存して変化することを、当業者は理解している。従って、臨床医は、最適の治療効果を得るために、投与量の力価を調節し、そして、投与経路を修飾することができる。典型的な投与量は、先に触れた要因に依存して、約0.1mg/kg～最大で約100mg/kg以上の範囲に及ぶかもしれない。他の態様において、投与量は、0.1mg/kg～最大で約1g/kg；又は5mg/kg～最大で約100mg/kgの範囲に及ぶかもしれない。

【0214】

投薬頻度は、使用される製剤中のUNC5H2d分子の薬物動学的パラメータに依存する。通常、臨床医は、期待される効果を発揮する投与量に達するまで組成物を投与する。

【0215】

従って、組成物は、長期にわたり、単回投与として、（同じ量の所望の分子を含むかどうか分からないが）2回以上の投与として、あるいは移植デバイス又はカテーテルによる持続注入として投与されることができる。適当な投与量の更なる改良は、当業者によって日常的に行なわれ、且つ、それは彼らによって日常的に実施される職務の範囲内にある。適当な用量は、適当な用量-作用データの使用を通して確実にすることができる。

【0216】

医薬組成物の投与経路は、例えば、経口的な；静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼球内、動脈内、門脈内、又は病巣内経路ルートによる注射を通じた；徐放システムによる；あるいは移植デバイスによる既知の方法に合わせる。所望のである場合には、組成物は、ポラス注射によって、若しくは注入によって持続的に、又は移植デバイスによって投与されてもよい。

【0217】

代わりに又は更に、組成物は、膜、スポンジ、又は所望の分子を吸収させたか又は封入した他の適当な材料の移植によって局所的に投与できる。移植デバイスが使用される場合には、そのデバイスはいずれかの好適な組織又は臓器に移植され、そして所望の分子のデリバリーは、拡散、徐放ポラス、又は持続的投与によるものかもしれない。

【0218】

場合によっては、エクスピボ様式においてUNC5H2dポリペプチド医薬組成物を使用することが望ましいかもしれない。そういった場合には、患者から摘出された細胞、組織、又は臓器が、その細胞、組織、又は臓器が患者に移植し戻された後にUNC5H2dポリペプチド医薬組成物に晒される。

【0219】

他の場合において、UNC5H2dポリペプチドは、UNC5H2dポリペプチドを発現及び分泌するように、例えば本明細書中に説明した方法などの方法を使用して、遺伝子操作した特定の細胞を移植することによって提供できる。そのような細胞は動物又はヒト細胞であるかもしれない。且つ、自己、異種、又は異種間（xenogenic）であるかもしれない。必要に応じて、細胞を不死化してもよい。免疫応答の可能性を低減させるために、周辺組織の浸潤を避けるために、細胞を封入してもよい。封入材料は、通常、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系又は周辺組織からの他の有害因子による細胞の破壊を妨げる、生物適合性の、半透性重合体の封入体又は膜である。

【0220】

本発明のさらなる態様は、治療用ポリペプチドのインビトロでの製造のため、並びに遺伝子治療又は細胞療法による治療用ポリペプチドの製造とデリバリーの両方のための細胞及び方法（例えば、相同組み換え、及び/又は他の組み換えによる製造方法）に関する。相同及び他の組み換え法は、通常、転写的にサイレントなUNC5H2d遺伝子、又は低発現遺伝子を含む細胞を修飾して、それによって、治療的に有効な量のUNC5H2dポリペプチドを発現する細胞を作り出すために使用されることができる。

10

20

30

40

50

【0221】

相同組み換えは、元々、転写的に活性のある遺伝子における突然変異を引き起こすか又は修正するための、ターゲティング遺伝子のために開発された技術である。基本技術は、哺乳動物ゲノムの特定領域内に特異的突然変異を導入するか、又は欠陥遺伝子内の特異的突然変異を修正する方法として開発された。

【0222】

相同組み換えを通して、ゲノム内に挿入するDNA配列は、ターゲティングDNAにそれを加えることによって着目の遺伝子の特定領域に向けることができる。ターゲティングDNAはヌクレオチドである。

【0223】

治療としての使用

UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、本明細書中に挙げられたものを含めた多くの疾病、障害、又は健康状態を治療するか、診断するか、寛解するか、又は予防するために使用できる。

【0224】

当該特許出願は、いくつかの適用可能性を有するUNC5H2dポリペプチドを開示する。特に、疾病の療法又は予防において本発明のポリペプチドのUNC5H2活性の増大が望ましい時には、試薬、例えば開示されたUNC5H2dポリペプチド、対応する融合タンパク質及びペプチドミメティクス、コード核酸、発現細胞、又はそれらの発現を高める化合物が使用できる。

【0225】

従って、本発明は、本発明のポリペプチドのUNC5H2活性の増大を必要とする疾病の治療又は予防のための医薬組成物を開示するが、それは、有効成分として、開示したUNC5H2dポリペプチド、対応する融合タンパク質及びペプチドミメティクス、コード核酸、発現細胞、又はそれらの発現を高める化合物の1つを含む。これらの医薬組成物の調製過程は、開示したUNC5H2dポリペプチド、対応する融合タンパク質及びペプチドミメティクス、コード核酸、発現細胞、又はそれらの発現を高める化合物を医薬として許容される担体と組み合わせるステップを含む。本発明のポリペプチドのUNC5H2活性の増大を必要とする疾病の治療又は予防の方法は、治療的に有効量の開示したUNC5H2dポリペプチド、対応する融合タンパク質及びペプチドミメティクス、コード核酸、発現細胞、又はそれらの発現を高める化合物の投与を含む。

【0226】

当該特許出願で開示した試薬、リガンド、拮抗物質、又は本発明のポリペプチドの発現又は活性を減少させる化合物の間でいくつかの適用を持っており、そして、特にそれらは、本発明のポリペプチドの過剰なUNC5H2活性に関連する疾病の治療又は診断に使用できる。

【0227】

従って、本発明は、本発明のポリペプチドの過剰なUNC5H2活性に関連する疾病の治療又は予防のための医薬組成物を開示するが、それは、有効成分として、リガンド、拮抗物質、又はそのようなポリペプチドの発現若しくは活性を減少させる化合物の1つを含む。これらの医薬組成物の調製過程は、リガンド、拮抗物質、又は化合物を医薬として許容される担体と組み合わせるステップを含む。本発明のポリペプチドの過剰なUNC5H2活性に関連した疾病の治療又は予防の方法は、治療的に有効な量の拮抗物質、リガンド、又は化合物の投与を含む。UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、本明細書中に挙げたものを含めた多くの疾病、障害、又は健康状態を治療するか、診断するか、寛解するか、又は予防するために使用できる。UNC5H2dポリペプチドの作用物質及び拮抗物質は、UNC5H2dがポリペプチド活性を調節し、そして成熟型UNC5H2dポリペプチドの少なくとも1つの活性を増強するか又は減少させるそれらの分子を含む。用語「阻害剤」又は「拮抗物質」は、天然タンパク質の機能、及び/又は特性（例えば、受容体結合性、脂質親和性、酵素相互作用、構造配列、合成、分泌、代謝）を部分的に変更するか又は

10

20

30

40

50

低下させる分子について言及する。作用物質又は拮抗物質は、例えばタンパク質、ペプチド、抗体、炭水化物、脂質、又は低分子量分子といった補助因子であってもよく、それらは、UNC5H2dポリペプチドと相互作用して、それによりその活性を調節する。

【0228】

潜在的ポリペプチド作用物質又は拮抗物質は、前述のタンパク質の細胞外ドメインの一部又は全部を含むUNC5H2ポリペプチドの可溶型（UNC5H2d）又は膜結合型（UNC5H2a、UNC5H2b、又はUNC5H2c）のいずれかと反応する抗体を含む。UNC5H2dポリペプチド発現を調節する分子は、通常、発現のアンチセンス調節因子として作用することができるUNC5H2dポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0229】

いくつかのドメインがUNC5H2dタンパク質内で同定されたが、それらはUNC5H2dの関連障害の指標である。ドメイン内のミスセンス突然変異体に関連しているヒトの疾病をキュレイトしたSMART（Simple Modular Architecture Research Tool、これは遺伝子可動性ドメインの識別とアノテーション、及びドメイン構造の分析を可能にする、<http://smart.embl-heidelberg.de/>）並びにそのOMIM（Online Mendelian Inheritance in Man、これはヒトの遺伝子と遺伝病を目録にしたデータベースである、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>）を使用することによって、UNC5H2d内に見られるドメインに関連しているヒトの疾病（実施例3を参照のこと）、特にUNC5H2d内に存在している2つ以上のドメインに関連することがわかったそれらの疾病、又は（UNC5H2dが分泌タンパク質である場合に）分泌タンパク質に関連した疾病を検索することができる。

【0230】

エリテマトーデス（Lupus erythematosus）が、デスドメイン、免疫グロブリン・ドメイン、及び第1因子膜侵襲複合体に関連していることがわかっている。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、エリテマトーデスの診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0231】

マラリアが、免疫グロブリン・ドメイン及びサルモジウム（psalmodium）サーカムスポロゾイト・タンパク質シグネチャーに関連していることがわかっている。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、マラリアの診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0232】

リンパ球増殖性症候群、T細胞性白血病、及び多発性硬化症が、デスドメイン及び免疫グロブリン・ドメインに関連していることがわかっている。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、リンパ球増殖性症候群、T細胞性白血病、及び多発性硬化症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0233】

第V因子欠乏症が、トロンボスポンジン1型モチーフ及び免疫グロブリン・ドメインに関連していることがわかっている。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、第V因子欠乏症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0234】

補体成分タンパク質欠乏症（C3、C6、C8、及びC6/7混合型欠乏症）が、第1因子膜侵襲複合体及びトロンボスポンジン1型モチーフに関連していることがわかっている。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、補体成分タンパク質欠乏症の診断又は治療に有用であるかもしれない。好ましくは、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、C3、C6、C8、及びC6/7混合型欠乏症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0235】

喘息及び毛細血管拡張性運動失調が、免疫グロブリン・ドメイン及び第1因子膜侵襲複合体に関連していることがわかっている。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポ

10

20

30

40

50

リペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、喘息及び毛細血管拡張性運動失調の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0236】

アルツハイマー病が、第1因子膜侵襲複合体及びデスドメインに関連していることがわかっていてる。更に、UNC5H2は、アルツハイマー病の脳で発現され、正常な脳で発現されない(実施例4)。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、アルツハイマー病の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0237】

レーパー視神経萎縮症が、デスドメイン及びロダネーゼ・シグネチャーに関連している。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、レーパー視神経萎縮症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

10

【0238】

高コレステロール血症が、第1因子膜侵襲複合体及びメタロチオネイン・ドメインに関連していることがわかっていてる。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、高コレステロール血症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0239】

ミオパシーが、ロダネーゼ・シグネチャー及び第1因子膜侵襲複合体に関連していることがわかっていてる。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、ミオパシーの診断又は治療に有用であるかもしれない。

20

【0240】

プロパージン欠乏症が、分泌タンパク質(プロパージン前駆体又はP因子)に関連していることがわかっていてる。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、プロパージン欠乏症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0241】

UNC5H発現は、卵巣腫瘍、乳房の腫瘍、子宮腫瘍、結腸直腸の腫瘍、胃腫瘍、肺腫瘍、及び腎腫瘍を含む多くの癌で喪失するか又は減少する(Thiebaultら)。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、癌の診断又は治療に有用であるかもしれない。好ましくは、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、卵巣腫瘍、乳房の腫瘍、子宮腫瘍、結腸直腸の腫瘍、胃腫瘍、肺腫瘍、腎腫瘍、睾丸腫瘍、及び食道癌の診断又は治療に有用であるかもしれない。

30

【0242】

UNC5H2dポリペプチドは軸索誘導の役割を担っている可能性が高いので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、軸索誘導が役割を担っている病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。更に、Lee SSらは、発生中にヒト胎児星状細胞において別個に発現される2つの遺伝子を同定した(Lee SSら、Yonsei Med J. 2003年12月30日; 44(6): 1059-68ページ、"Characterization of the two genes differentially expressed during development in human fetal astrocytes.")。ある遺伝子、すなわちC8は、完全なUNC5H2の3'末端に対して96%を超える相同性を有する(全体で48.7%)。星状細胞は、CHSの神経障害及び自己免疫疾患、例えばアルツハイマー病、ハンチントン病、及び多発性硬化症において既知の役割を持っている。

40

【0243】

海馬の老化及び認知障害におけるUNC5H2の発現は、Gene Expression Omnibus(GEO)レコードGDS520(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=geo>)において計測された。GEOは、幅広い高速大量処理実験データのための公共の収納庫として機能する。これらのデータは、mRNA、ゲノムDNA、及びタンパク質量を計測するシングル及びデュアル・チャンネル・マイクロアレイに基づく実験、並びに非-アレイ技術、例えば遺伝子発現の連続分析(SAGE)及びマススペクトル法プロテオミクス・データを含む。GDS85にお

50

いて、加齢依存性認知機能低下遺伝子発現の識別は、7日間の水迷路及び物体記憶課題を課した後に4、14、及び24カ月齢の雄Fischer344ラットから採取した海馬CA1組織から実施された（シングル・チャンネル・マイクロアレイ実験）。結果は、4ヶ月齢ラットに比べて14及び24ヶ月齢ラットにおけるUNC5H2発現の一貫した増大を明確に示す。よって、これは、UNC5H2が認知障害に関与するかもしれないという更なる示唆である。

【0244】

そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、神経障害、中枢神経系の自己免疫異常、カルマン症候群1、皮膚弛緩症-マルファン症候群、糖尿病、黒色表皮腫、嗅葉無発育、ミラー・ハンド・ムーブメント（両手共同運動）、運動失調症、両側頭蓋狭窄症（bitemporal skull narrowing）、脳水腫、認知障害、認知症、クラッシュ症候群、マーシャ症候群、L1又はL1CAM疾患、II型無虹彩、妖精病、ラブソン-メンデンホール症候群、統合失調症、アルツハイマー病、脳虚血、失読症、パーキンソン病、ウィスコット-アルドリッチ症候群、バルデー-ビードル症候群、アンジェルマン症候群、多発性硬化症、ハンチントン病、及びプラダー-ウィリ症候群の診断又は治療に有用であるかもしれない。UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びに作用物質及び拮抗物質は、損傷又は疾病に続く軸索の再増殖、皮質発達、網膜神経節細胞の再生及び発達にも有用であるかもしれない。軸索誘導に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

10

【0245】

UNC5H2ポリペプチドは、腫瘍抑制因子p53の直接的な転写標的であり、且つ、p53のアポトーシス促進活性を仲介するので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、p53に関連する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのようなものとして、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、リー・フラウメニ症候群、神経線維腫症、乳癌（実施例4を参照のこと）、急性前骨髄球性白血病、原発性肝細胞癌、腺腫性白血病、原発性肝細胞癌、脳の神経膠腫、上咽頭癌、脳の神経膠腫、膵臓癌、ファンコニ貧血、結直腸癌、ブルーム症候群、副腎皮質癌、ハンチントン病、毛細血管拡張性運動失調、髄芽腫、網膜胚種細胞腫、色素性乾皮症、ウィルソン病、ヴェルナー病、血色素症、除去修復交差相補的齧歯動物修復不全（excision-repair cross-complementary rodent repair deficiency）、膀胱癌、脈絡叢の乳頭腫、睾丸腫瘍、ミラー-ディッカー脳回欠損症候群、前立腺癌、ポイツ-ジェガース症候群、外胚葉性異形成症、CYP1A1欠乏症、アンジェルマン症候群、ラウドイド腫瘍、SMARCB1欠乏症、胸膜肺芽腫、ファンコニ貧血、肺癌（実施例4を参照のこと）、ウィルムス腫瘍1、プロヒピチン欠乏症、ホスホリパーゼA2欠乏症、コーデン病、中皮腫、B細胞性リンパ腫、腸癌、神経線維腫症、ターコット症候群、甲状腺ホルモン受容体不全、胃癌、肝臓癌（実施例4を参照のこと）、食道癌、及び眼瞼癒着-外胚葉性欠陥の診断又は治療に有用であるかもしれない。p53に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。UNC5H2dのアポトーシス促進活性は、UNC5H2dのカスパーゼ切断とC末端に位置する保存されたデスドメインに依存するかもしれない。

20

30

【0246】

UNC5H2dポリペプチド発現は、関節リウマチの滑膜、骨関節炎の滑膜、ヒト・ループスの腎臓、ヒト・ループスの脾臓、ヒト・ループスの肝臓、並びにクローン小腸及び潰瘍性大腸炎の腸にて検出されるが、正常な小腸で検出されない（実施例4）、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、関節リウマチ、狼瘡（SLE）、変形性関節症、クローン病、及び潰瘍性大腸炎の診断又は治療において、そしてより一般に、炎症の治療、予防、及び/又は診断において有用であるかもしれない。

40

【0247】

UNC5H2ポリペプチド発現が骨格筋で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、骨格筋に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、悪液質、及び筋ジストロフィー症を含む。骨格筋の発生と機能に関連してい

50

る他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0248】

UNC5H2dポリペプチド発現が子宮で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、子宮に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、流産、子宮内膜症、子宮癌、及び女性の不妊症を含む。子宮の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0249】

UNC5H2dポリペプチド発現が骨髄で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、骨髄に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、白血病を含む。骨髄の発生及び機能に関連している他の病気及び健康状態が、本発明の範囲内に包含される。

10

【0250】

UNC5H2dポリペプチド発現が、腎臓（例えば、胎児腎臓）、ヒト・ループスの腎臓で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、腎臓に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、狼座（SLE）、腎多嚢胞病、グロメルロシスティック（glomerulocystic）腎臓病又は髄質腎臓病、蛇行性腓骨-多嚢胞腎症候群（serpentine fibula-polycystic kidney syndrome）、腎臓形成異常を含む。腎臓の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

20

【0251】

UNC5H2dポリペプチド発現が卵巣で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、卵巣に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、女性の不妊症及び卵巣癌を含む。卵巣の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0252】

UNC5H2dポリペプチド発現が甲状腺で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、甲状腺に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、甲状腺発育不全、甲状腺癌、カンジダ症、橋本甲状腺炎、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫を含む。甲状腺の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

30

【0253】

UNC5H2dポリペプチド発現が、胃及び小腸で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、胃に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、ポリポーシス、ポイツ-ジェガース症候群、腺腫様ポリープ、内臓ミオパシー、腸閉鎖症、幽門閉鎖、腸軸捻転症、胃癌、基底細胞母斑症候群、及びオスラー-ランデュ-ウェーバー症候群2を含む。胃及び小腸の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

40

【0254】

UNC5H2dポリペプチド発現が結腸で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、結腸に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、腺腫様ポリープ、結直腸癌、結腸癌、ターコット症候群、白血病、リンチ癌、及び結腸閉鎖を含む。結腸の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

50

【 0 2 5 5 】

UNC5H2dポリペプチド発現が肺（例えば、肺の病巣線維症）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、肺に影響する病気及び健康状態の診断又は治療において有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、肺の病巣線維症、肺癌、肺炎、肺無発育、肺の嚢胞性障害、嚢胞性繊維症、及びリー・フラウメニ症候群を含む。肺の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【 0 2 5 6 】

UNC5H2dポリペプチド発現が、脾線維症及び正常な脾臓で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、脾臓に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、脾線維症、細網症、無脾症、ロバーツ症候群、メッケル症候群、セファリン・リピドーシス、及びゴーシェ病を含む。脾臓の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

10

【 0 2 5 7 】

UNC5H2dポリペプチド発現が膀胱で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、膀胱に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、膀胱癌、膀胱外反症、膀胱憩室、ウルフラム症候群、及びコストロ症候群を含む。膀胱の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

20

【 0 2 5 8 】

UNC5H2dポリペプチド発現が、乳腺及び乳房で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、乳房に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、乳癌、毛細血管拡張性運動失調、コーデン病、及びリー・フラウメニ症候群を含む。乳房の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【 0 2 5 9 】

UNC5H2dポリペプチド発現が心臓（例えば、胎児心臓）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、心臓に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、心臓ブロック、ホルト-オラム症候群、後鼻孔閉鎖症、及び心臓弁形成異常を含む。心臓の発生及び機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

30

【 0 2 6 0 】

UNC5H2dポリペプチド発現が軟骨（例えば、変形性関節症軟骨の膝）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、軟骨に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、骨幹端形成異常、類骨毛髪形成不全、偽軟骨形成不全症性形成異常、コイテル（Keutel）症候群、変形性又は骨端の形成異常、滑膜軟骨腫症、及び軟骨無形成を含む。軟骨の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

40

【 0 2 6 1 】

UNC5H2dポリペプチド発現が造血組織で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、造血組織に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、ハンチントン病、神経線維腫症、及びクラッペ病を含む。造血組織の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【 0 2 6 2 】

50

UNC5H2ポリペプチド発現が免疫組織で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、免疫組織に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、血管拡張性失調症、ディジョージ症候群、及びハンチントン病を含む。免疫組織の発生及び機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0263】

UNC5H2dポリペプチド発現が脳（例えば、ニューロン、神経芽細胞腫、副腎皮質癌腫）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、ニューロン及び脳に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、神経芽細胞腫、副腎皮質癌腫、ピック病、神経膠腫、ニューロバシー、認知症、及び多発硬化症を含む。脳の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本発明の範囲内に網羅される。

10

【0264】

UNC5H2dポリペプチド発現が滑膜で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、滑膜に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、滑膜軟骨腫症及びパーター症候群を含む。滑膜の発生及び機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

20

【0265】

UNC5H2ポリペプチド発現が扁桃体で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、扁桃体に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、前頭側頭認知症及びウルパッハとビーテのリポイド・タンパク症を含む。扁桃体の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0266】

UNC5H2ポリペプチド発現が前立腺で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、前立腺に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、前立腺癌、アンドロゲン不感性症候群、リー・フラウメニ症候群、及びコーデン病を含む。前立腺の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

30

【0267】

UNC5H2dポリペプチド発現が脾臓（例えば、精製した脾臓）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、脾臓に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、脾臓細胞症、ピアソン病（Pearson Marrow syndrome）、シュパッハマン-ダイヤモンド症候群、及び無脾症を含む。脾臓の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

40

【0268】

UNC5H2ポリペプチド発現が骨（例えば、軟骨下骨、軟骨肉腫）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、骨に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、軟骨肉腫、骨嚢腫胞、真性軟骨腫症、パジェット病、及びブリュック症候群を含む。骨の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0269】

UNC5H2dポリペプチド発現が胎盤で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、

50

並びにその作用物質及び拮抗物質は、胎盤に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、周郭胎盤症候群、魚鱗癬、及びネウ-ラクリバ症候群を含む。胎盤の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0270】

UNC5H2ポリペプチド発現がメラニン細胞（例えば、プールされたヒト・メラニン細胞）で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、メラニン細胞に関連する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、ワーデンバーグ症候群、B細胞性リンパ腫、ヘアー・カラー-2、大理石骨病、エレハルデ症候群、ネフロパシー・シスチン症、グリセリ症候群、眼皮膚白皮症、ポイツ-ジェガース症候群、斑紋形質、ハーマンスキー-ブッドラック症候群、神経線維腫症を含む。メラニン細胞の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

10

【0271】

UNC5H2ポリペプチド発現が大細胞癌で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、大細胞癌に関連する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、基底細胞母斑症候群、甲状腺癌、肝細胞癌、及び多発性内分泌腺腫瘍を含む。大細胞癌に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

20

【0272】

UNC5H2ポリペプチド発現が首で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、首に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。そのような病気及び健康状態の例は、これだけに制限されることなく、コウッセフ（Kousseff）症候群、首筋の火炎状母斑、翼状片症候群、及びコストロ症候群を含む。首の発生と機能に関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【0273】

UNC5H2dポリペプチド発現が、肝臓、頸部、皮膚、唾液腺、副腎、及び眼で検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、肝臓、頸部、皮膚、唾液腺、副腎、及び眼に影響する病気及び健康状態の診断又は治療に有用であるかもしれない。

30

【0274】

UNC5H2dポリペプチド発現が動脈硬化プラークで検出されたので、UNC5H2d核酸分子、ポリペプチド、並びにその作用物質及び拮抗物質は、疾病アテローム性動脈硬化症の診断又は治療に有用であるかもしれない。

【0275】

UNC5H2dポリペプチド機能の作用物質又は拮抗物質は、治療する健康状態に適当なように、1種類以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、及び/又は化学療法薬と組み合わせて（同時に又は連続して）使用できる。

40

【0276】

好ましい態様において、UNC5H2dポリペプチドは、心臓血管疾患、及び/又は血液学に関連した障害の治療、及び/又は予防に使用される。

【0277】

好ましくは、心臓血管疾患は、心肺停止、弁膜心疾患、動脈高血圧、心内膜炎、体位性低血圧、失神、心膜疾患、動脈硬化、心臓腫瘍、冠動脈疾患、大動脈及びその分岐の疾患、心不全、末梢血管障害、ショック、スポーツ心臓症候群、又は不整脈から選択される。

【0278】

好ましくは、血液学に関連した障害は、貧血、組織球性症候群、鉄過剰に関連した障害、リンパ腫、骨髄増殖性障害、プラズマ細胞疾患、止血及び凝固障害、脾臓の障害、血栓

50

障害、血小板障害、血管の出血障害、白血球減少症、リンパ球減少症、白血病、又はエイズに関連した血液障害及び悪性腫瘍から選択される。

【0279】

UNC5H2dポリペプチドの望ましくないレベルによって引き起こされるか、又は介在される他の疾病又は障害が、本発明の範囲内に網羅される。望ましくないレベルは、UNC5H2dポリペプチドの過剰なレベル、及びUNC5H2dポリペプチドの正常以下のレベルを含む。

【0280】

UNC5H2d核酸及びポリペプチドの使用

(それら自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしないものを含めた)本発明の核酸分子は、染色体上にUNC5H2d遺伝子及び関連遺伝子の位置をマッピングするのに使用できる。マッピングは、例えばPCR増幅法及びインサイツ・ハイブリダイゼーション法といった当該技術分野で知られている技術によって行われることができる。

10

【0281】

(それら自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしないものを含めた)UNC5H2d核酸分子は、哺乳動物組織又は体液サンプル中のUNC5H2d核酸性分子の存在について、質的又は量的にのいずれかを、試験するための診断アッセイにおけるハイブリダイゼーション・プローブとして有用であるかもしれない。

【0282】

1つ以上のUNC5H2dポリペプチドの活性を阻害することが望ましい場合には、他の方法が利用されるかもしれない。そのような阻害は、発現制御配列(三重らせん形成)、又はUNC5H2d mRNAに相補的であり、且つ、ハイブリダイズする核酸分子によって達成されるであろう。例えば、UNC5H2dの遺伝子の少なくとも一部に相補的な配列を持つアンチセンスDNA又はRNA分子を、細胞内に導入することができる。アンチセンス・プローブは、本明細書中に開示されたUNC5H2d遺伝子の配列を使って利用可能な技術によって設計されるかもしれない。通常、それぞれのそのようなアンチセンス分子は、それぞれの選択されたUNC5H2d遺伝子の開始部位(5'末端)に対して相補的である。そして、アンチセンス分子が対応のUNC5H2d mRNAにハイブリダイズした時に、このmRNAの翻訳が妨げられるか、又は低減される。アンチセンス阻害剤は、細胞又は生物内のUNC5H2dポリペプチドの減少又は不存在に関連する情報を提供する。

20

【0283】

あるいは、遺伝子治療は、UNC5H2dポリペプチドのドミナントネガティブ阻害を作り出すために利用されるかもしれない。この状況において、UNC5H2dポリペプチドの突然変異ポリペプチドをコードするDNAは、本明細書中に説明したようにウイルス法又は非ウイルス法のいずれかを使用して調製され、そして患者の細胞内に挿入することができる。そのような突然変異体は、通常、生物学的役割において内在性ポリペプチドと競争するように設計される。

30

【0284】

更に、生物学的に活性であるか否かに関係なく、UNC5H2dポリペプチドは免疫原として使用されることができる、すなわち、上記ポリペプチドは抗体が産生される可能性がある少なくとも1つのエピトープを含む。(本明細書中に説明したように)UNC5H2dポリペプチドに結合する選択的結合因子が、これだけに制限されることなく、体液又は細胞サンプル内のUNC5H2dポリペプチドの存在を検出するための標識した形態での使用を含めたビトロ又はインビボにおける診断目的に使用できる。抗体は、本明細書中に挙げられたものを含めた多くの疾病及び障害を予防、治療、又は診断するためにも使用できる。抗体は、UNC5H2dポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を軽減するか、又は妨げるようにUNC5H2dポリペプチドに結合することができるか、あるいは(UNC5H2dポリペプチドの薬物動力学を高めることによることも含めた)UNC5H2dポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を高めるようにポリペプチドに結合することができる。

40

【0285】

UNC5H2dポリペプチドは、「発現クローニング」ストラテジーである放射性標識したも

50

の(125ヨウ素)を使用したUNC5H2dリガンドのクローン化に使用できる。UNC5H2dポリペプチド又は「親和性/活性タグ付き」UNC5H2dポリペプチド(例えば、Fc融合又はアルカリ性ホスファターゼ融合)は、UNC5H2dリガンドを発現する細胞型、細胞株、又は組織を特定するための結合アッセイで使用できる。そして、そのような細胞又は組織から分離されたRNAを、cDNAに変換し、哺乳動物発現ベクター内にクローン化し、そして哺乳動物細胞(例えば、COS又は293)内に感染させて、発現ライブラリーを作成することができる。そして、放射性標識又はタグ付けされたUNC5H2dポリペプチドは、UNC5H2dリガンドを発現するこのライブラリー中の細胞サブセットを同定及び分離するための親和性試薬として使用されることができる。そして、DNAを、これらの細胞から分離して、哺乳動物細胞内にトランスフェクションして、UNC5H2dリガンドを発現する細胞の画分が元のライブラリーに比べて何倍も高いであろう第2発現ライブラリーを作成する。この濃縮プロセスは、UNC5H2dリガンドを含む1つの組み換えクローンが単離されるまで反復して繰り返されるかもしれない。UNC5H2dリガンドの単離は、UNC5H2dシグナル伝達経路の新規な作用物質及び拮抗物質を同定又は開発するのに有用である。そのような作用物質及び拮抗物質は、UNC5H2dリガンド、抗UNC5H2dリガンド抗体、小分子、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0286】

本発明のヒトUNC5H2d核酸、並びにマウスUNC5H2d核酸は、対応する染色体のUNC5H2dポリペプチド遺伝子を分離するための有用な手段でもある。例えば、UNC5H2d配列を含むマウス染色体DNAは、ノックアウト・マウスを構築するのに使用でき、それにより、UNC5H2dポリペプチドのインビボにおける役割の実験を可能にする。ヒトUNC5H2dゲノムDNAは、遺伝性の組織変性疾患を同定するために使用されることができる。

20

【0287】

好ましくは、本発明のUNC5H2dポリペプチドは、疾病の治療、及び/又は予防のための薬物の調製に使用される。

【0288】

UNC5Hファミリーの他のメンバーと同様に、UNC5H2dは、UNC5H2受容体に結合するネトリン-1の調節によって、及び/又は膜結合型との直接的な相互作用によって以下の3つの主要な機能を示すことができる：

1) 例えば、それは、軸索の誘引又は反発のいずれかを助ける正中部の細胞(midline cells)に向かう又はそこからのニューロン及びそれらの軸索の遊走を調節できる。例えば、UNC5H2dの存在下、軸索の1つのカテゴリを正中部から退けることができる一方で、軸索のサブセットを正中部に向かって誘引することができる。よって、UNC5H2d活性は、例えば、正中部の細胞からの、又はそこに向かう軸索の誘引又は反発を計測することによって確認できる。理論に縛られることは望まないが、誘引を助けるために、UNC5H2dは反発を介在するために形成されるネトリン-1依存性UNC5H-DCC複合体を抑制するか又は分裂させることができる。この調節活性に係わる可能性のあるUNC5H2dの領域は、膜結合UNC5H2の細胞外部分、すなわち、UNC5H2dの第1~第355アミノ酸の範囲に相当する。または、本発明は、軸索遊走の調節における、例えばUNC5H2dの第1~第355アミノ酸、又は第26~第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2d又はその断片の使用もまた網羅する。軸索の遊走に係る疾病は既に先に開示した。

30

40

【0289】

好ましくは、本発明は、可溶性UNC5H2、及び軸索遊走の調節におけるその使用に関する。

【0290】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dポリペプチド、及び軸索遊走の調節におけるその使用に関する。

【0291】

好ましくは、本発明は、第1~第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2dの断片、及び軸索遊走の調節におけるその使用に関する。

50

【0292】

好ましくは、本発明は、第26～第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2dの断片、及び軸索遊走の調節におけるその使用に関する。

【0293】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dの2つの免疫グロブリン・ドメインと2つのトロンプスポンジン・ドメインから成るUNC5H2d断片、及び軸索遊走の調節におけるその使用に関する。

【0294】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dの2つの免疫グロブリン・ドメインから成るUNC5H2d断片、及び軸索遊走の調節におけるその使用に関する。

【0295】

2) 更に、UNC5H2dは、細胞死を調節して、腫瘍抑制因子として機能できる。UNC5H2dは、膜結合UNC5H2に結合したネトリン-1を抑制するか、又は分裂させることができる。UNC5H2dは、そのため、ネトリン-1の活性に拮抗し、アポトーシス促進活性を有する可能性がある。よって、UNC5H2d活性は、例えば、足場非依存性増殖及び浸潤能力の阻害における一般的、且つ、強力なカスパーゼ阻害剤（例えば、zVAD-fmk）による処理することによるか、あるいは結腸直腸LS174T、Ras-形質転換NIH 3T3、若しくはラージT-形質転換293細胞をネトリン-1付加あり若しくはなしのUNC5H2d発現性コンストラクトにより形質転換し、そして軟寒天中で増殖させるか、又は再構築した3D基底膜ゲル（Matrigel）を通り抜けて浸透させることにより、細胞死、又はアポトーシス促進活性を計測することによって確認できる。結腸直腸LS174T細胞又は膠芽腫U373MG細胞を、p53で形質転換し、そして軟寒天中での増殖及びMatrigel中での侵襲について分析することができる。活性は、アドリアマイシンへの暴露後のDNA損傷によって引き起こされたアポトーシスを抑制するようにAS3によってUNC5H2d発現の阻害によっても確認できる。UNC5H2d活性は、Ad-p53誘発アポトーシスのGST-ネトリン-1阻害に伴うUNC5H2d又はその断片の添加によっても確認できる。この活性化活性に係わる可能性のあるUNC5H2dの領域は、膜結合LJNC5H2の細胞外部分、すなわち、UNC5H2dの第1～第355アミノ酸の範囲に相当する。または、本発明は、アポトーシスの活性化における、UNC5H2dの断片、すなわち、UNC5H2dの第1～第355アミノ酸、又は第26～第355アミノ酸の範囲の使用もまた網羅する。よって、本発明は、癌の治療又は予防におけるUNC5H2d又はその断片の使用に関する。様々なタイプの癌を既に先に開示した。

【0296】

好ましくは、本発明は、可溶性UNC5H2、及びアポトーシスの活性化におけるその使用に関する。

【0297】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dポリペプチド、及びアポトーシスの活性化におけるその使用に関する。

【0298】

好ましくは、本発明は、第1～第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2d断片、及びアポトーシスの活性化におけるその使用に関する。

【0299】

好ましくは、本発明は、第26～第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2d断片、及びアポトーシスの活性化におけるその使用に関する。

【0300】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dの2つの免疫グロブリン・ドメイン、と2つのトロンプスポンジン・ドメインから成るUNC5H2d断片、及びアポトーシスの活性化におけるその使用に関する。

【0301】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dの2つの免疫グロブリン・ドメインから成るUNC5H2dの断片、及びアポトーシスの活性化におけるその使用に関する。

10

20

30

40

50

【0302】

3) 更に、UNC5H2dは、血管新生を調節して、血管新生促進因子として機能できる。UNC5H2dは、膜結合UNC5H2に結合するネトリン-1を妨げるか又は分裂させ、それにより、血管新生を促進する。UNC5H2dは、従って、ネトリン-1の活性に競合し、そして、血管新生を活性化することができる。よって、UNC5H2d活性は、例えば、KOマウスにおける、心膜活動中の静脈循環中の血液及び体液の蓄積のいずれかを計測することによって、変性した動脈血管系に起因する末梢抵抗を計測することによって、後脳における毛細管の厚さ及び分岐を計測することによって、内皮端細胞からの糸状仮足の伸展を計測することによって、又は節間血管 (ISVs) の軌跡の表現型、そして、より一般に、血管分岐の欠陥を特徴づけることによって確認できる。この活性化に係わる可能性のあるUNC5H2dの領域は、膜結合UNC5H2の細胞外部分、すなわち、UNC5H2dの第1～第355アミノ酸の範囲に相当する。または、本発明は、血管新生の活性化におけるUNC5H2dの断片、すなわち、UNC5H2dの第1～第355アミノ酸、又は第26～第355アミノ酸の範囲の使用もまた網羅する。よって、本発明は、心臓血管疾患、及び/又は肝臓学に関連した疾病の治療又は予防におけるUNC5H2d又はその断片の使用にも関する。様々なタイプの心臓血管疾患、及び/又は肝臓学に関連した疾病を既に先に開示した。

10

【0303】

好ましくは、本発明は、可溶性UNC5H2、及び血管新生の活性化におけるその使用に関する。

【0304】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dポリペプチド、及び化血管新生の活性におけるその使用に関する。

20

【0305】

好ましくは、本発明は、第1～第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2d断片、及び血管新生の活性化におけるその使用に関する。

【0306】

好ましくは、本発明は、第26～第355アミノ酸の範囲にわたるUNC5H2d断片、及び血管新生の活性化におけるその使用に関する。

【0307】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dの2つの免疫グロブリン・ドメインと2つのトロンボスポンジン・ドメインから成るUNC5H2d断片、及び血管新生の活性化におけるその使用に関する。

30

【0308】

好ましくは、本発明は、UNC5H2dの2つのトロンボスポンジン・ドメインから成るUNC5H2d断片、及び血管新生の活性化におけるその使用に関する。

【0309】

トロンボスポンジン・ドメインは、血管新生アポトーシスの阻害に関係して、血管の恒常性に貢献した。

【0310】

以下の実施例は、単に例示目的であって、何らかの方法で本発明の範囲を限定するものとして解釈されてはならない。

40

【実施例】

【0311】

実施例1

1. UNC5H2dの同定とクローニング

1.1 序論

NCBI Data Basesを、クエリー配列として (NCBI登録BAC57998に相当している) ヒトUNC5H2cヌクレオチド配列を使用して検索した。これは、(SwissProt登録Q81ZJ1、NCBI登録NP_734465、AAM95701、及びAY1264387に相当している) ヒトUNC5H2aヌクレオチド配列の同定につながる。UNC5H2a配列を肺cDNAライブラリからPCR法でクローン化した。5個のクロー

50

ーンの挿入断片を最初に配列決定した。2クローンが最も長いUNC5H2変異体、すなわち、17個のエクソンの範囲にわたるUNC5H2cを含むことがわかった。2個のクローンが（第8エクソンの無い）UNC5H2a変異体配列を含んでいた。第8及び第9エクソンを欠くが、他の部分はUNC5H2cと同じである1個のクローンを見つけた。第8及び第9エクソンの欠失は、推定上の膜貫通ドメインの除去につながり、この受容体の分泌型を予測する。第8及び第9エクソンを含まない配列をUNC5H2dと命名した。

【0312】

従って、我々は、このようにして、UNC5H2c又はUNC5H2a受容体の、より短くて可溶性と思われるスプライス変異体を同定した。UNC5H2dは膜貫通ドメインを含んでいないので、新規の可溶性分泌タンパク質であるかもしれない。それはインビボにおいてUNC5H2受容体拮抗物質として機能するかもしれない。UNC5H2a、UNC5H2b、UNC5H2c、及びUNC5H2dのアミノ酸配列のアラインメントを、図1に報告する。

10

【0313】

1.2 ヒト肺cDNAの調製

最初のcDNA鎖を、製造業者のプロトコールに従ってSuperscript II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) を使用して正常ヒト肺の全RNA (Clontech) から調製した。1 µlのオリゴ(dT)₁₅プライマー(500 µg/ml、Promega)、2 µgのヒト肺の全RNA、1 µlの10mM dNTPs(中性pHにてそれぞれ10mMのdATP、dGTP、dCTP、及びdTTP)、並びに12 µlの終量までの滅菌蒸留水を1.5mlエッペンドルフ・チューブ中で混ぜ合わせ、5分間で65度で加熱し、そして氷によって冷やした。内容物を短時間の遠心分離によって集め、そして、4 µlの5×First-Strand緩衝液、2 µlの0.1M DTT、及び1 µlのRnaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor、40単位/µl、Invitrogen)を加えた。チューブの内容物を軽く混合し、42度で2分間インキュベートし、次に1 µl(200単位)のSuperscript II酵素を加え、そしてピペティングによって軽く混合した。その混合物を、42度で50分間インキュベートし、その後70度で15分間、加熱することによって不活化した。RNAを取り除くために、1 µl(2単位)のE.コリRNase H(Invitrogen)を加え、そして反応混合物を37度で20分間インキュベートした。最終的に21 µlの反応ミックスを滅菌水で200 µlに希釈した。

20

【0314】

1.3 PCR法のための遺伝子特異的クローニング・プライマー

18~25塩基の長さを持つ一対のPCRプライマーを、Primer Designerソフトウェア(Scientific & Educational Software、PO Box 72045、Durham、NC 27722-2045、USA)を使用して、UNC5H2c cDNAの完全なコード配列を増幅するために設計した。PCRプライマーを、55±10に近いT_m、及び40~60%のGC含量を持つように最適化した。標的配列のUNC5H2cに対する高い選択性を有する(ほとんど非特異的プライミングがない)プライマーを選択した。

30

【0315】

1.4 ヒト肺cDNAからのUNC5H2cのPCR増幅

予測された第8エクソンの欠落以外、UNC5H2cに対して100%の同一性を有する、ヒト肺cDNAライブラリーからクローン化されたUNC5H2aに相当するGenBank受入番号AY126473によって公開された配列を、公共の配列データベースに検索によって同定した。遺伝子特異的クローニング・プライマー(UNC5H2c-CP1とUNC5H2c-CP2、図2、図3、及び表1)を、ヒト肺cDNAからのUNC5H2cの2835bpのコード配列全体の範囲にわたる2982bpのcDNA断片を増幅するように設計した。4つの同じPCRを、1×Platinum(登録商標) Taq High Fidelity PCR緩衝液、2mM MgSO₄、200 µM dNTPs、0.2 µMのそれぞれのクローニング・プライマー、2.5単位のPlatinum(登録商標) TaqDNA High Fidelity(Invitrogen)、及び100ngのヒト肺cDNAを含む50 µlの終量で、以下の: 94度で2分間; 94度で30秒間、59度で30秒間、68度で3分間の35サイクル、(ここで、59度が最も低いT_m-5度であり、そして3分間=産物1kbあたり1分間); 続いて68度で7分間の1サイクル、そして4度で保持サイクル、のようにプログラムしたMJ Research DNA Engineを使用してそれぞれ実施した。

40

50

【0316】

それぞれの増幅産物の5の μl のアリコート、1 \times TAE緩衝液 (Invitrogen) 中、0.8%のアガロースゲル上で視覚化し、そして、単一のPCR産物がほぼ予測された分子量で移動していることを確かめた。残ったPCR産物を、プールし、そしてWizard PCR Preps DNA精製システム (Promega) を使用してPCR混合物から直接精製し、そして50 μl の滅菌水中に溶かした。この産物を直接サブクローニングした。

【0317】

1.5 PCR産物のサブクローニング

PCR産物を、製造業者によって指定された条件を使用したTAクローニング・キット (Invitrogen Corporation) を使用して、長鎖PCR産物 (pCR-XL-TOPO) のためのトポイソメラーゼI修飾クローニングベクターにサブクローニングした。つまり、ヒト肺cDNA増幅からの精製したPCR産物4 μl を、1 μl のpCR-XL-TOPOベクターと室温で5分間インキュベートした。次に、1 μl の6 \times TOPO Cloning Stop溶液を加え、そしてその試薬を混合し、軽く遠心分離し、そして氷上に置いた。その反応混合物を以下のとおりE.コリ株TOP10 (Invitrogen) 内に形質転換した: One Shot TOP10エレクトロコンピテントセルの50 μl のアリコートを氷上で解凍し、そして2 μl のTOPO反応物を加えた。混合物を、冷やした0.1cmのエレクトロポレーション・キュベットに移し、そして前記細胞を製造業者の推奨するプロトコールに従ってBioRad Gene-Pulser (商標) を使用してエレクトロポレーション処理した。室温に加温したSOC培地 (450 μl) を、エレクトロポレーション直後に加え、そして溶液を15mlスナップキャップ・チューブに移し、振盪 (220rpm) しながら37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。次に、形質転換混合物のアリコート (50 μl 、100 μl 、及び200 μl) を、カナマイシン (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でコートしたL-ブロス (LB) プレート上にプレーティングし、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。cDNAインサートを含むカナマイシン抵抗性コロニーを、コロニーPCRで同定した。

【0318】

1.6 コロニーPCR

コロニーを、無菌ようじを使用して50 μl の滅菌水中に接種した。接種菌液の10 μl のアリコートを、次に、使用したプライマーがM13RとT7であったことを除いて先に説明したように、20 μl の総反応容量でPCRにかけた。サイクル条件は以下の通りであった: 94 $^{\circ}\text{C}$ で2分間; 94 $^{\circ}\text{C}$ で30秒間、47 $^{\circ}\text{C}$ で30秒間、そして72 $^{\circ}\text{C}$ で3.5分間の30サイクル。次に、更なる分析の前に、サンプルを4 (保持サイクル) で維持した。

【0319】

PCR反応産物を、1 \times TAE緩衝液中、1%アガロースゲルを用いて分析した。期待されるPCR産物サイズ (約2982bp cDNA + 186bpベクター内の多重クローニング部位又はMCSに起因する) を生じるコロニーを、37 $^{\circ}\text{C}$ で振盪 (220rpm) しながら、カナマイシン (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む5mlのL-ブロス (LB) 中、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩、培養した。

【0320】

1.7 プラスミドDNAの調製と配列決定

ミニプレップ・プラスミドDNAを、製造業者の指示に従って、Qiaprep Turbo 9600ロボットシステム (Qiagen) 又はWizard Plus SVミニプレップ・キット (Promega cat. no. 1460) を使用して5mlの培養物から調製した。プラスミドDNAを、100 μl の滅菌水で溶出した。DNA濃度を、Eppendorf BO光度計を使用して計測した。プラスミドDNA (200~500ng) を、製造業者の指示に従って、BigDyeTerminatorシステム (Applied Biosystems cat. no. 4390246) を使用した、T7、M13R、及びUNC5H2c遺伝子特異的配列決定プライマー (UNC5H2c-SP-1~-6) を用いたDNA配列決定にかけた。プライマー配列を、表1に挙げた。配列決定反応物を、Dye Exカラム (Qiagen) 又はMontage SEQ96クリーンアップ・プレート (Millipore cat. no. LSKS09624) を使用して精製し、そしてApplied Biosystemsの3700シーケンサを用いて分析した。

【0321】

配列分析は、UNC5H2c配列に対する100%の合致を含むが、第8及び第9エクソンを欠落し

ている1個のクローンを同定した。このクローン化cDNA断片(UNC5H2d)の配列を、図3に示す。クローン化PCR産物(pCR-XL-TOPO-UNC5H2d)(プラスミドID. 13855)のプラスミド遺伝子地図を、図4に示す。

【0322】

【表3】

表1. UNC5H2cクローニング及び配列決定プライマー

プライマー	配列(5'-3')
UNC5H2c-CP1	AGA CTG GGG CCA GGG AGA CA
UNC5H2c-CP2	GGC CAA ACA TCC CCA TCA GG
UNC5H2c-SP1	GAG GTG GAA TGG CTC AAG AA
UNC5H2c-SP2	CTC GTG GTG GCC ATC TTC GT
UNC5H2c-SP3	TCT TGC CGC CTG GCA CAT AC
UNC5H2c-SP4	ACT GTG CCG AAG TCA GTG
UNC5H2c-SP5	GGA GTG GAG CAA GTG GTC AG
UNC5H2c-SP6	TCA GGT CAG GAG GCA CAG AG
T7プライマー	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
M13Rプライマー	CAG GAA ACA GCT ATG ACC

10

20

【0323】

2. UNC5H2dのための哺乳動物細胞発現ベクターの構築

2.1 インフレーム6HISタグ配列に融合した連結準備ができていないUNC5H2d ORFの生成

クローニングプロセスの第一段階は、5'末端にてHindIII制限エンドヌクレアーゼ認識部位及びコザック配列によって隣接され、且つ、3'末端にてインフレーム6ヒスチジン(6HIS)タグ、終止コドン、及びEcoRI制限エンドヌクレアーゼ認識部位をコードする配列によって隣接されたUNC5H2dのORFを作り出すためのPCR反応に関与した。UNC5H2d ORF配列を、プラスミドpCR-XL-UNC5H2d(プラスミドID 13855)からPCR増幅プライマーUNC5H2d-DP1とUNC5H2d-DP2(表2及び図5)を使用して増幅した。順方向増幅プライマーUNC5H2d-DP1を、HindIII制限エンドヌクレアーゼ認識部位(AAGCTT)、及びUNC5H2dメチオニン開始コドンの直前のコザック配列(GCCACC)を加えるように設計した。逆方向増幅プライマーUNC5H2d-DP2を、UNC5H2dコード配列の3'末端に6HISタグ(CAC CAT CAC CAT CAC CAT)、終止コドン(TGA)、及びEcoRI(GAATTC)制限エンドヌクレアーゼ認識部位を加えるように設計した。

30

【0324】

PCRを、1×Platinum(登録商標) Pfx PCR緩衝液、1mMのMgSO₄、300µMのdNTPs、0.3µMのUNC5H2d-DP1、0.3µMのUNC5H2d-DP2、1.25単位のPlatinum(登録商標) Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)、170ngのプラスミド13855 DNA、及び0×、0.5×、1×、又は2×のPCR促進溶液(Invitrogen)を含む50µlの終量で実施した。以下の通りプログラムしたMJ Research DNA Engineを使用して、サイクルを実施した: 94 °Cで5分間、94 °Cで15秒間; 68 °Cで3分間の30サイクル; 続いて68 °Cで7分間の1サイクル、そして4 °Cでの保持サイクル。

40

【0325】

それぞれの増幅反応物の50µl全部を、1×TAE緩衝液(Invitrogen)中で0.8%アガロースゲルを用いて視覚化し、そして単一PCR産物が、全てのサンプルにおいて予測した分子量(2651bp)にて移動していることを確認した。PCR産物を、ゲルから切り出し、2つの画分にプールした。DNAを、Wizard PCR Preps DNA精製システム(Promega)を使用して抽出

50

し、50 μ lの滅菌水中に溶出した。精製した産物を合わせ、濃度を推定するために、5 μ lのアリコートをし、アガロースゲルを用いて視覚化した。

【0326】

精製したPCR産物(90 μ l中に約1.8 μ gのDNA)の全てを、11 μ lの10 \times EcoRI消化緩衝液(NEB)、50単位のEcoRIエンドヌクレアーゼ、及び50単位のHindIIIエンドヌクレアーゼを含む110 μ lの最終的な反応容量の中で、制限エンドヌクレアーゼのHindIIIとEcoRI(New England Biolabs、NEB)を使用して消化した。消化を37 $^{\circ}$ Cで1時間、行った。消化産物を、1 \times TAE緩衝液中で0.8%アガロースゲルを用いて視覚化した。2649bpの産物を、ゲルから切り出し、そしてそのDNAをQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)を使用して抽出した。DNAを、30 μ lのEB緩衝液(10mM Tris-Cl、pH8.5)中に溶出した。精製した産物の1 μ lのアリコートを、アガロースゲルを用いて視覚化し、そして濃度を約50ng/ μ lであると推定した。

10

【0327】

2.2 連結準備ができている直鎖発現ベクター断片の生成

空の発現ベクター-pEAK12M(プラスミドID 13040、図6)とpcDNA3.1(Invitrogen、図7)を、連続反応によってHindIII及びEcoRI制限エンドヌクレアーゼによって消化した。それぞれ5 μ gの空ベクターを、10 μ lの10 \times EcoRI消化緩衝液(NEB)と60単位のEcoRIエンドヌクレアーゼ(NEB)、又は10 μ lの10 \times NEB制限緩衝液2と60単位のHindIIIエンドヌクレアーゼ(NEB)のいずれかを含む100 μ lの最終的な反応容量で消化した。消化を37 $^{\circ}$ Cで1時間、行った。それぞれの消化産物の5 μ lのアリコートを、アガロースゲルを用いて視覚化して、ベクターが直鎖化されたことを確認した。産物を、Wizard DNA Clean-upシステム(Promega)を使用して精製し、そして50 μ lの水中に溶出した。そして、各産物を、次に、7 μ lの10 \times EcoRI消化緩衝液(NEB)と60単位のEcoRIエンドヌクレアーゼ(NEB)、又は7 μ lの10 \times NEB制限緩衝液2と60単位のHindIIIエンドヌクレアーゼ(NEB)のいずれかを含む70 μ lの最終的な反応容量で2番目の制限エンドヌクレアーゼによって消化した。消化を37 $^{\circ}$ Cで1時間、行った。全ての消化産物を、1 \times TAE緩衝液中で0.8%アガロースゲルを用いて視覚化し、そして、予想した分子量(直鎖pEAK12Mベクターに関して6903bp、及び直鎖pcDNA3.1ベクターに関して5387bp)の直鎖ベクター断片を、上述のとおりQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen)を使用して精製した。各産物を、30 μ lのEB緩衝液(10mM Tris-Cl、pH8.5)で溶出した。

20

30

【0328】

それぞれ30 μ lの直鎖ベクターのサンプルを、50 μ lの終量で、2単位の仔ウシ腸管アルカリホスファターゼ(CIAP、Roche)及び5 μ lの10 \times CIAP緩衝液(Roche)と混ぜ合わせた。その反応混合物を、37 $^{\circ}$ Cで15分間、次に50 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。更に2単位のCIAPを、各反応混合物に追加し、37 $^{\circ}$ C及び50 $^{\circ}$ Cのインキュベーションを繰り返した。次に、2個のpEAK12Mサンプル、及び2個のpcDNA3.1サンプルを合わせて、Wizard DNA Clean-upシステム(Promega)を使用して精製した。産物を、50 μ lの水中に溶出した。それぞれの溶出液の2 μ lのアリコートをアガロースゲルを用いて視覚化し、そしてDNAの濃度が直鎖pEAK12Mベクター・サンプルに関して約20ng/ μ l、及び直鎖pcDNA3.1ベクター・サンプルに関して約25ng/ μ lであると推定した。

40

【0329】

2.3 発現ベクター-pEAK12M及びpcDNA3.1へのUNC5H2d ORFのサブクローニング

第2.1節からの消化したPCR産物を、以下の式に従って、おおよそ「インサート3:ベクター1」の比で、100ngのそれぞれの直鎖ベクター(第2.2節で調製される)に連結した:

$$[(\text{ベクター}(\text{ng}) \times \text{インサートのサイズ}(\text{bp}) / \text{ベクターのサイズ}(\text{bp})) \times 3 = \text{インサート}(\text{ng})]$$

pEAK12M連結反応を、2 μ lの10 \times リガーゼ緩衝液(NEB)、400単位のT4 DNAリガーゼ(NEB)、100ngの直鎖化pEAK12Mベクター、及び115ngのPCR産物を含む20 μ lの終量で実施した。pcDNA3.1の連結反応を、2 μ lの10 \times リガーゼ緩衝液(NEB)、400単位のT4 DNAリガーゼ(NEB)、100ngの直鎖化pcDNA3.1ベクター、及び150ngのPCR産物を含む20 μ lの終量で

50

実施した。それぞれの連結反応混合物を、23 で40分間インキュベートした。

【0330】

2 μ lのそれぞれの連結反応物を、以下の通り、E. コリ株TOP10 (Invitrogen) 内に形質転換した：One Shot TOP10細胞の50 μ lのアリコートを上で解凍し、そして2 μ lの連結反応混合物を加えた。その混合物を上で15分間インキュベートし、次に42 で正確に30秒間のインキュベーションによって熱ショックを加えた。サンプルを上に戻し、250 μ lの温かいSOC培地 (室温) を加えた。サンプルを、振盪 (220rpm) しながら、37 で1時間インキュベートした。それぞれの形質転換混合物の10 μ l、50 μ l、及び200 μ lのアリコートを、アンピシリン (100 μ g/ml) を含むL-プロス (LB) プレート上にプレティングし、そして37 で一晩インキュベートした。それぞれの連結反応からの10個の得られたアンピシリン抵抗性コロニーを、37 、220rpmで振盪しながら、アンピシリン (100 μ g/ml) を含む5mlのL-プロス (LB) 中、37 で一晩、培養した。

10

【0331】

2.4 プラスミドDNAの調製と配列決定

ミニプレップ・プラスミドDNAを、製造業者の指示に従って、Qiaprep Turbo 9600ロボットシステム (Qiagen) を使用して、5mlの培養物から調製した。プラスミドDNAを、100 μ lの滅菌水中に溶出した。プラスミドDNA (200~500ng) を、製造業者の指示に従って、BigDye Terminatorシステム (Applied Biosystems cat. no. 4390246) を使用して、ベクター特異的プライマーによるDNA配列決定にかけた。pEAK12Mコンストラクトを、配列決定プライマー-pEAK12-FとpEAK12-Rを使用して配列決定し、そして、pcDNA3.1コンストラクトを、プライマー-T7とBGH reverseを使用して配列決定した。プライマー配列を、表2に示す。配列決定反応物を、Dye-Exカラム (Qiagen)、又はMontage SEQ96クリーンアップ・プレート (Millipore cat. no. LSKS09624) を使用して精製し、次に、Applied Biosystems 3700配列決定装置を用いて分析した。予想したインサートを含んでいると同定されたクローンを、内側の遺伝子特異的プライマー-UNC5H2d-SP1、UNC5H2d-SP2、及びUNC5H2d-SP3 (表2) を使用して配列決定にかけた。

20

【0332】

配列分析は、UNC5H2d-6HISインサートをベクター-pEAK12M (pEAK12M-UNC5H2d-6HIS、プラスミドID 13999) 内、及びベクター-pcDNA3.1 (pcDNA3.1-UNC5H2d-6HIS、プラスミドID 14000) 内に含んだクローンを同定した。クローン化cDNA断片の配列を図5に示す。クローン化PCR産物のプラスミド遺伝子地図を図8及び9に示す。

30

【0333】

CsClグラジエント精製maxi-prep DNAを、配列検証済みクローンpEAK12M-UNC5H2d-6HIS (プラスミドID番号13999) の500mlの培養物からSambrook J. ら、1989年 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press) によって説明されている方法を使用して調製した。プラスミドDNAを、滅菌水 (又は、10mM Tris-HCl pH8.5) 中に1 μ g/ μ lの濃度で再懸濁し、そして-20 で保存した。

【0334】

エンドトキシン不含maxi-prep DNAを、配列検証済みクローンpcDNA3.1-UNC5H2d (プラスミドID 14000) の500mlの培養物から、製造業者に指示に従って、EndoFree Plasmid Megaキット (Qiagen) を使用して調製した。プラスミドDNAを、500 μ lのエンドトキシン不含TE緩衝液 (10mM Tris-Cl、pH8.0、1mM EDTA) 中に再懸濁した。

40

【0335】

【表4】

表2. UNC5H2d-6HIS PCRクローニング及び配列決定プライマー

プライマー	配列 (5'-3')
UNC5H2d-DP1	TAT <u>AAG CTT</u> <u>GCC ACC</u> ATG GGG GCC CGG AGC GGA G
UNC5H2d-DP2	ATG <u>AAT TCT</u> CAA <u>TGG TGA</u> <u>TGG TGA</u> <u>TGG TGG</u> CAG TCC CCG TCG GTG G
UNC5H2d-SP1	GAG GTG GAA TGG CTC AAG AA
UNC5H2d-SP2	TCT TGC CGC CTG GCA CAT AC
UNC5H2d-SP3	ACT GTG CCG AAG TCA GTG
pEAK12-F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12-R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
BGH逆方向	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

下線を引いた配列 = コザック配列
 ボールド体 = 終止コドン
 イタリック体の配列 = Hisタグ
 ボールド体、且つ、イタリック体 = 制限エンドヌクレアーゼ認識部位

【0336】

実施例2: UNC5H2ドメインの同定と説明

2.1 同定

生物情報学ツールを、スプライス変異体UNC5H2dの推定上のドメインを同定するために使用した。全てのツールがクエリー配列内のドメインを同定する。SMART (図11に示される結果)、BLOCKS (<http://blocks.fhcrc.org/blocks/>)、及びPfam (アラインメント及びHMMsから成るタンパク質ファミリーのデータベース、<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>、図10に示される結果)は、以下の表(表2~6)で示したように、以下のドメインを同定した:

【0337】

【表5】

表3. 期待される一致-収集閾値より高いドメイン・スコアリング

ドメイン	開始	終了	ビット	値	アライ	モード
<u>ig</u>	167	227	30.00	4.8e-06	<u>Align</u>	ls
<u>tsp 1</u>	250	299	34.30	2.5e-07	<u>Align</u>	ls
<u>tsp 1</u>	306	353	20.90	0.0004	<u>Align</u>	ls
<u>ZU5</u>	465	568	202.00	8.2e-58	<u>Align</u>	ls
<u>death</u>	788	867	74.10	2.5e-19	<u>Align</u>	ls

【0338】

【表 6】

表 4. Pfam-Bに対する一致

ドメイン	開始	終了	アライ
Pfam-B 9659	20	164	Align

【 0 3 3 9 】

10

【表 7】

表 5. 可能性がある一致-カットオフを上回る値を有するドメイン

ドメイン	開始	終了	ヒット	値	アライ	モード
metalthio	276	350	-12.30	0.77	Align	ls

【 0 3 4 0 】

20

【表 8】

表 6. 他の領域

タイプ	源	開始	終了
low_complexity	seg	2	17
low_complexity	seg	4.17	431
low_complexity	seg	4.52	461

30

【 0 3 4 1 】

2) BLOCKS

クエリー = UNC5H2d

サイズ = 869アミノ酸

検索したブロック = 10004755

ヒットに関するカットオフ組み合わせ期待値

反復 / その他に関するカットオフ・ブロック期待値

【 0 3 4 2 】

【表 9】

表 7.
組み合わせたファミリー

		鎖	ブロック	E-値
<u>IPB000906</u>	ZU5ドメイン	1	8つの中の1つ	1e-06
<u>IPB002861</u>	リーラー・ドメイン	1	3つの中の2つ	2.9e-06
<u>IPB001862</u>	膜侵襲複合体成分	1	6つの中の1つ	0.0073
<u>PRO1303</u>	マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質	1	6つの中の1つ	0.093
<u>IPB003884</u>	第I因子膜侵襲複合体	1	6つの中の2つ	0.67
<u>IPB001307</u>	ロダネーゼ・シグネチャー	1	7つの中の1つ	0.98

10

【0343】

2.2 ドメインの説明

デスドメイン・モチーフは、この遺伝子からの2つのアイソフォームで見つかっている。データベース内の35個の他の遺伝子もこのモチーフを含んでいる。

【0344】

[InterProアノテーション] デスドメイン (FAS/TNF細胞内可溶質相互作用ドメイン) は、最初に、TNF介在細胞死シグナル伝達に關与する75KdのTNF受容体 (TNFR-1) ([PROSITEDOC:PDOC005661] を参照のこと) の細胞質側末端のドメインとして説明された。対応部分は、アポトーシス細胞死を誘導するFAS/AP01の別の表面受容体の細胞質側末端に見られる。この領域はこれらの受容体の自己会合を介在し、それによって、アポトーシスにつながる下流の事象にシグナルを発する。それに続いて、他の多くのタンパク質が、デスドメインの領域内のFAS又はTNF受容体のいずれかの細胞質部分と相互作用することがわかった。これらのタンパク質の過剰発現は、通常、細胞死につながる。特性分析によって、他の多くのタンパク質がデスドメインに対して有意な類似性を有する領域を含むことが示された。興味深いことに、これらのタンパク質のいくつかは、細胞死シグナル伝達との関連においても動作する。これらのタンパク質の大部分において、デスドメインはC末端の最

20

30

【0345】

免疫グロブリン / 主要組織適合性複合体モチーフは、この遺伝子の産物中に見られる。データベース内の506個の他の遺伝子もこのモチーフを含んでいる。

【0346】

[InterProアノテーション] 免疫グロブリン (Ig) 分子の基本構造は、ジスルフィド結合によって連結した2個の軽鎖と2個の重鎖から成る四量体である。2つのタイプの軽鎖：
と が存在し、それぞれ定常ドメイン (CL) と可変ドメイン (VL) を構築した。5つのタイプの重鎖：
、
、
、及び μ が存在し、全てが可変ドメイン (VH) と (
、
、及び の中の) 3つ、又は (
及び μ の中の) 4つの定常ドメイン (CH1 ~ CH4) から成る。主要組織適合複合体 (MHC) 分子は、2本の鎖で作られている。クラスIでは、
鎖は3つの細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞質側末端で構築される。
鎖 (
-2-ミクログロブリン) は1つの細胞外ドメインで構築される。クラスIIでは、
及び
鎖の両方が2つの細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び細胞質側末端で構築される。Igの定常鎖ドメインと、それぞれのタイプの主要組織適合複合体鎖の1つの細胞外ドメインが関連していることが知られている。これらの相同ドメインは、約100アミノ酸の長さであり、且つ、保存されたドメイン内ジスルフィド結合を含む。免疫グロブリン・スーパーファミリーのメンバーは、様々な機能の何百ものタンパク質で見られる。例は、抗体、巨大な筋キナーゼとし

40

50

てのタイチン、及び受容体チロシンキナーゼを含む。免疫グロブリン様ドメインは、タンパク質-タンパク質、及びタンパク質-リガンドの相互作用に参与することができる。Pfamアラインメントは、免疫グロブリン様ドメインの最初と最後の鎖を含んでいない。この群のいくつかのタンパク質は、血液型抗原の中心となる分子、赤血球細胞膜の外部の表面マーカーに参与する。これらのマーカーの大部分はタンパク質であるが、いくつかは脂質又はタンパク質に付随する炭水化物である [Reid M.E., Lomas-Francis C., The Blood Group Antigen FactsBook Academic Press, London / San Diego, (1997年)]。ルセラン血液型糖タンパク質 (B-CAM細胞表面糖タンパク質) (オーベルジュB抗原) (F8/G253抗原) は、ルセラン式血液型に属して、Lu (a/b)、Au (a/b)、LU6~LU20抗原に関連する。Igc2サブファミリーは、C-2-タイプであり、免疫グロビン・ドメインを有する糖タンパク質並びに非関連タンパク質、例えば癌胎児抗原及び線維芽細胞増殖因子受容体を含む。IGサブファミリーは、キラー細胞阻害受容体、並びに免疫グロビン・ドメインを含む他の細胞表面受容体を含む。

10

【0347】

トロンボスポンジン I 型モチーフは、この遺伝子の産物内に見られる。データベース内の59個の他の遺伝子もこのモチーフを含む。

【0348】

[InterProアノテーション] この反復は、Lawler及びHynesによって1986年に最初に説明された。それは、それが3回繰り返されるトロンボスポンジン・タンパク質で見つかった。現在、多くのタンパク質は、補体経路 (プロパージン、C6、C7、C8A、C8B、C9)、並びに細胞外マトリックス・タンパク質様ミンジン (mindin)、F-スポンジン、SCO-スポンジン、更にサーカムスポロゾイト表面タンパク質2及びマラリア原虫、ADAMTS、及びGタンパク質結合受容体のTRAPタンパク質、例えば脳特異的血管新生阻害剤を含むこの反復の1つ以上の事例に参与する。そのドメインは、血管の恒常性に貢献する、細胞付着性、細胞-細胞の相互作用、運動性、増殖、細胞外プロテアーゼの活性、及び血管新生アポトーシス阻害に対する効果を含めた多くの機能を持っている。プロパージン遺伝子のイントロン-エクソン機構は、反復がエクソン・シャッフリングを伴う過程によって進化したかもしれないという仮説を裏付ける。そのドメインは、~60アミノ酸残基の長さであり、そして高度に保存されたW-S-X-Wモチーフ及び6つのシステイン残基を特徴とする。プロパージンの構造の研究は、TSP1反復が2つの両親媒性tum領域、及び親水性鎖を含む。

20

30

【0349】

ZU5ドメイン・モチーフは、この遺伝子から3つのアイソフォームで見つかった。データベース内の他の遺伝子/TJP1、ANK3、ANK1、UNC5D、ZU5、ZU5.1、ANK2、UNC5C/もこのモチーフを含む。

【0350】

[InterProアノテーション] これは、未知の機能のドメインであり、閉鎖帯1 (ZO-1又は密着結合タンパク質1) 及びUnc5様ネトリン受容体中に存在している。それは、アンキリンの様々な変異体でも見つかり、細胞骨格要素への必須膜タンパク質の付着に参与する。

40

【0351】

BLOCKS : リーラー・ドメイン :

[InterProアノテーション] 細胞外マトリックス (ECM) タンパク質は、初期皮質発達において、特に神経接触の形成、及び中枢神経系の細胞構築を制御において重要な役割を果たす。マウスのリーラー遺伝子の産物は、神経発生中に細胞の位置決定を調整するパイオニア・ニューロンによって分泌される巨大細胞外タンパク質であるリーリンである [1]。F-スポンジン及びミンジンは、構造類似性と発現の重複ドメインを共有するマトリックスに付着した接着分子のファミリーである。F-スポンジン及びミンジンの両方が、海馬胚神経細胞の接着及び伸長、そして海馬と感覚性ニューロンの両方で発現した推定上の受容体への結合を促進する [2]。未知の機能のこのドメインは、リーリン及びF-スポンジンのN末端で見られる (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/Modules/Q7-matrix.gif>を

50

参照のこと)。

【0352】

BLOCKS：マラリア原虫サーカムスポロゾイト・タンパク質シグネチャー

[PRINTSアノテーション]サーカムスポロゾイト(CS)タンパク質は、マラリア寄生虫であるマラリア原虫(Plasmodium spp.)のスポロゾイト上の最も有名な表面抗原である。スポロゾイトは、マラリア原虫ライフサイクルの感染段階において、マラリアが蚊のベクターから哺乳動物宿主に感染する形態である。このタンパク質に対する抗体は、マラリアへの暴露を検出するための分野で使用され、そしてそれはいくものワクチンの標的である。CSタンパク質の配列は、頭部及び尾部ドメインから成り、それらのドメインは大部分が保存された、低複雑度反復の多数の集まりであり、それらは菌株及び種を越えた変異体である。C末端領域は、おそらく、タンパク質を細胞膜に固定するために使用されるのに対して、主要な反復配列は生物の表面抗原であろう。反復は、CSタンパク質の免疫優勢エピトープをコードするものであり、遺伝子の残りの部分よりも迅速に分化する。反復の維持と進化は、タンパク質レベルでなく、むしろ、直接的にDNA配列に対して働く作用機序によって達成されると思われる。

10

【0353】

CRCMSPRZOITEは、マラリア原虫サーカムスポロゾイト・タンパク質に関するシグネチャーを提供する6-エレメントのフィンガープリントである。推定上のシグナル配列の範囲にわたる主要な反復-モチーフ1に隣接するフィンガープリントは、7つの配列の最初のアラインメントから導かれる：モチーフは上記アラインメントの保存されたN及びC末端から選ばれた。SPTR37_10f上の2つの反復が、49個の配列を含む本物のセットを同定する集合点に至るために必要であった。

20

【0354】

BLOCKS：膜侵襲複合体第I因子

[InterProアノテーション]このドメインは、補体成分タンパク質、補体成分第1因子、及びアグリンに見られる。第I因子は、補助因子C4結合タンパク質及びH因子の存在下で、それぞれC4B及びC3Bの鎖の開裂に参与する。アグリンは、神経筋連結部の筋繊維表面上のアセチルコリン受容体とアセチルコリンエステラーゼの集合を引き起こす基底層の構築要素である。

30

【0355】

BLOCKS：ロダネーゼ・シグネチャー

チオ硫酸スルフートランスフェラーゼ(EC:2.8.1.1)は、チオ硫酸のスルファン原子のシアン化物への移動を触媒して、亜硫酸塩とチオシアン酸塩を形成する酵素である。脊椎動物において、ロダネーゼは、鉄-硫黄錯体の形成及びシアン化物解毒作用に参与するミトコンドリア酵素である。システイン残基は、触媒機構に参与する[1, 2]。いくつかの細菌性タンパク質もまた、スルフートランスフェラーゼ活性を発現することができる。これらは、マイコバクテリウム・レプレ(*Mycobacterium leprae*)及びE.コリからのsseA、アゾトバクター・ビネランジー(*Azotobacter vinelandii*)のrhdA、サッカロポリスボラ・エリスラエア(*Saccharopolyspora erythraea*)のcysA[3]、並びにシネココッカス(*Synechococcus*)株PCC 7942のrhdA[4]を含む。シアン化物解毒作用に参与する(IPR001307を参照のこと)ロダネーゼ、スルフートランスフェラーゼは、以下の：

40

- ・Cdc25ホスファターゼ触媒ドメイン、
- ・真核生物の二重特異性MAPK-ホスファターゼの非触媒ドメイン、
- ・酵母PTP型MAPK-ホスファターゼの非触媒ドメイン、
- ・酵母Ubp4、Ubp5、Ubp7の非触媒ドメイン、
- ・哺乳動物Ubp-Yの非触媒ドメイン、
- ・ドロソフィラ熱ショックタンパク質HSP-67BB、
- ・いくつかの細菌の低温ショック及びファージ・ショックタンパク質、
- ・植物老化関連タンパク質、
- ・ロダネーゼの触媒及び非触媒ドメイン(IPR001307を参照のこと)、

50

を含めたタンパク質の大ファミリーと進化的関係を共有する [1]。

【0356】

ロダナーゼは内部重複を持つ。このドメインは、ホスファターゼ及びユビキチンC末端ヒドロラーゼを含めた他のタンパク質において単一コピーとして見つかった [2]。

【0357】

[INTERPROアノテーション] メタロチオネイン (MT) は、例えば、亜鉛、銅、カドミウム、ニッケルなどの重金属に結合する小タンパク質である。それらは、チオラート結合のクラスタを通じて金属イオンに結合するシステイン残基の高い含有率を持つ [MEDLINE:89118264]、PUB00001490。3つのクラスへの実証的な分類が、Fowlerと同僚PUB00001490、及びKojima PUB00001490によって提案された。クラスIのメンバーは、それらのシステインの位置がウマMT-1Bに関連するポリペプチドを含み、且つ、哺乳動物MTs、並びに甲殻類及び軟体動物からのものを含むように記載の。クラスIIは、ウニ、真菌、昆虫、及びシアノバクテリアを含む様々な種からのMTsを分類する。クラスIII MTsは、-グルタミルシステニル単位から成る異型ポリペプチドである [MEDLINE:88029881]。

10

【0358】

この元の分類システムは、クラス間又はクラス中のいずれの構造類似性のパターンの明確な区別ができないという意味で制限されることがわかった。従って、全てのクラスI及びクラスII MTs (タンパク様配列) を、これから系統学的関連、ひいてはアラインメント可能な配列のファミリーに分類した。このシステムは、MTスーパーファミリーを、ファミリー、サブファミリー、サブグループ、並びに分離されたアイソフォーム及び対立遺伝子に細分する。

20

【0359】

メタロチオネイン・スーパーファミリーは、いくつかの観点：例えば、低分子量；高い金属含有量；高いCysと低い芳香族残基含有量を有するアミノ酸組成；システインの特徴的な分布を伴う独特の配列、及び金属チオラート・クラスタを示す分光学的表示、においてウマ腎臓メタロチオネインに類似している全てのポリペプチドを含む [MEDLINE:880298811]。MTファミリーは、特定の配列特異的な特徴を共有し、且つ、進化的に関連すると思われるMTsを包含する。ファミリー内へのMTsの包含は、そのアミノ酸配列が全てのメンバーの配列とアラインメント可能であることを前提とする。15のMTファミリー [<http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>] が特徴づけられ、各ファミリーがその番号及びその分類学的範囲によって同定された：例えば、ファミリー1：脊椎動物のMTs。

30

【0360】

この登録は、3つのファミリーを含むメタロチオネインのスーパーファミリーである。

【0361】

[QUICKGOアノテーション]

【0362】

【表 10】

表 8.

<u>機能 (1)</u>	<u>機能 (8)</u>
<u>金属イオン結合活性 (GO:0046872)</u>	<u>カドミウムイオン結合活性 (GO:0046870)</u>
	<u>亜鉛イオン結合活性 (GO:0008270)</u>
	<u>マンガンイオン結合活性 (GO:0030145)</u>
	<u>モリブデンイオン結合活性 (GO:0030151)</u>
	<u>水銀イオン結合活性 (GO:0045340)</u>
	<u>ニッケルイオン結合活性 (GO:0016151)</u>
	<u>鉄イオン結合活性 (GO:0005506)</u>
	<u>銅イオン結合活性 (GO:0005507)</u>

10

【0363】

実施例3：同定したドメインに関連している疾病の同定

ドメイン内のミスセンス変異に関連しているヒト疾病をキュレートしたSMART及びそのOMIMの使用によって、第1段階において、UNC5H2d内に見られるドメインに関連しているヒト疾病を検索することができる（表8～10）。相補的な検索を既にアノテートされたドメインに対してOMIMを用いて実施し、そして、追加検索をアノテートされていないドメインに関して行った。第2段階において、UNC5H2d内に見られる2つ以上のドメインに関連した疾病、又は（UNC5H2dが分泌タンパク質であるので）分泌タンパク質に関連した疾病を検索した。

20

【0364】

[SMARTアノテーション]

3.1 第1段階：ドメインに関連しているのが明らかとなった疾病

1) SwissProt配列、及びIGドメインの中のミスセンス突然変異体に関連しているヒト疾病をキュレートしたOMIM。

【0365】

30

【表 1 1】

表 9.

タンパク質	疾病	
腫瘍抑制タンパク質DCC前駆体 (結直腸癌抑制遺伝子) (SRS) (SMART)	(OMIM:120470) : 結直腸癌	
ポリオウイルス受容体前駆体 (CD155抗原) (SRS) (SMART)	(OMIM:173850) : {ポリオ、罹患性}	10
低親和性免疫グロブリン γ Fc領域受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FcRII-A) (IgG Fc受容体II-A) (Fc- γ -RIIA) (CD32) (CDW32) (SRS) (SMART)	(OMIM:146790) : {ループス腎炎、罹患性}	
(SRS) (SMART)	(OMIM:146740) : {エリテマトーデス、全身性、罹患性} (OMIM:152700) : 好中球減少症、新生児同種免疫 ; {ウイルス感染、再発性}	20
細胞間接着分子-1前駆体 (ICAM-1) (主要な群のライノウイルス受容体) (CD54抗原) (SRS) (SMART)	(OMIM:147840) : {マラリア、脳性、罹患性}	
(SRS) (SMART)	(OMIM:176943) : クルーゾン症候群 (OMIM:123500) : ジャクソン-ウィス症候群 (OMIM:123150) : ペーレスチーブンソン cutis gyrata症候群 (OMIM:123790) : パイフェル症候群	30

【 0 3 6 6 】

【表 1 2】

	(OMIM:101600) : アペール症候群	
	(OMIM:101200) : セスレ-コツツェン症候群	
高親和性神経成長因子受容体前駆体 (EC 2.7.1.112) (TRK1トランスフォーミング・チロシンキナーゼ・タンパク質) (p140-TrkA) (Trk-A) (SRS) (SMART)	(OMIM:191315) : 無痛症、先天性、無汗症を伴う (OMIM:256800) : 甲状腺髄様癌腫、家族性 (OMIM:155240) :	10
ミエリンP0タンパク質前駆体 (ミエリン・タンパク質ゼロ) (ミエリン辺縁タンパク質) (MPP) (SRS) (SMART)	(OMIM:159440) : シャルコー-マリー-トゥース神経障害-1B (OMIM:118200) : デジェリン-ソッタス病、ミエリンP-ゼロ関連 (OMIM:145900) : 低髄鞘形成、先天性	
神経細胞接着分子L1前駆体 (N-CAM L1) (CD171抗原) (SRS) (SMART)	(OMIM:308840) : 中脳水道狭窄による脳水腫 (OMIM:307000) : MASA症候群 (OMIM:303350) : 痙性対麻痺 (OMIM:312900) :	20
ミオシン結合タンパク質C、心臓型、(心臓MyBP-C) (C-タンパク質、心筋アイソフォーム) (SRS) (SMART)	(OMIM:600958) : 心筋症、家族性肥大性、4 (OMIM:115197) :	
T細胞表面糖タンパク質CD4前駆体 (T細胞表面抗原T4/Leu-3) (SRS) (SMART)	(OMIM:186940) : {エリテマトーデス、罹患性}	

【0367】

30

他のOMIMヒト疾病の検索は、おそらく免疫グロブリン・ドメインに関連している：ウォルフ-ヒルスコム (Wolf-Hirschhorn) 症候群、リンパ球増殖性症候群、急性骨髄白血病、ブルートン無グロブリン血症、毛細血管拡張性運動失調、慢性骨髄性白血病、軟骨形成不全症、多発性硬化症、オピッツ症候群、T細胞性急性リンパ性白血病、先天性角化不全異常症、第V因子欠乏症、喘息、T細胞性白血病、IPEX、低-γグロブリン血症、好中球減少症、骨髄性白血病、アンチトロンビンIII欠乏症、HIGM1、多嚢胞腎、及びパイフェル症候群。

【0368】

2) SwissProt配列、及びIGc2ドメイン内のミスセンス突然変異体に関連しているヒト疾病をキュレートしたOMIM。

40

【0369】

【表 1 3】

表10.

タンパク質	疾病	
(SRS) (SMART)	(OMIM:176943) : クルゾン症候群 (OMIM:123500) : ジャクソン-ワイス症候群 (OMIM:123150) : ベーレスティーヴンソン cutis gyrata症候群 (OMIM:123790) : パイフェル症候群 (OMIM:101600) : アペール症候群 (OMIM:101200) : セレス-コッツェン症候群	10
神経細胞接着分子L1前駆体 (N-CAM L1) (CD171抗原) (SRS) (SMART)	(OMIM:308840) : 中脳水道狭窄による脳水腫 (OMIM:307000) : MASA症候群 (OMIM:303350) : 痙性対麻痺 (OMIM:312900) :	
腫瘍抑制タンパク質DCC前駆体 (結直腸癌抑制遺伝子) (SRS) (SMART)	(OMIM:120470) : 結直腸癌	20
低親和性免疫グロブリンγFc領域受容体II-A前駆体、(Fc-γRII-A) (FcRII-A) (IgG Fc受容体II-A) (Fc-γ-RIIA) (CD32) (CDW32) (SRS) (SMART)	(OMIM:146790) : {ループス腎炎、罹患性}	
ミオシン結合タンパク質C、心臓型、(心臓MyBP-C) (C-タンパク質、心筋アイソフォーム) (SRS) (SMART)	(OMIM:600958) : 心筋症、家族性肥大性、4 (OMIM:115197) :	30
(SRS) (SMART)	(OMIM:146740) : {エリテマトーデス、全身性、罹患性} (OMIM:152700) : 好中球減少症、新生児同種免疫 ; {ウイルス感染、再発性}	

【 0 3 7 0】

3) SwissProt 配列、及びTSP1ドメイン内のミスセンス突然変異体に関連しているヒト疾病をキュレートしたOMIM。

【 0 3 7 1】

40

【表 1 4】

表11.

タンパク質	疾病	
プロパージン前駆体 (P因子) (SRS) (SMART)	(OMIM:312060) : プロパージン欠損症、X連鎖性	
補体成分C6前駆体 (SRS) (SMART)	(OMIM:217050) : C6欠損症 ; 混合型C6/C7欠損症	10

【 0 3 7 2 】

他のOMIMヒト疾病の検索は、おそらくTSP1ドメインに関連している：虚血、悪性新生物、カボジ肉腫、体位性低血圧、第V因子欠損症、グランツマン血小板無力症、血栓性血小板減少性紫斑症、並びにネーグリ及びケベック血小板障害。

【 0 3 7 3 】

4) OMIMヒト疾病の検索は、おそらくデスドメインに関連している：リンパ球増殖性症候群、グルココルチコイド受容体欠陥、外胚葉性異形成症1、アルツハイマー病、レーパー視神経萎縮症、T細胞性悪性リンパ腫 / 白血病、セザリー症候群、エリテマトーデス (Lupus erythematosus)、多発性硬化症、APOE欠損症、及び高血圧症。

【 0 3 7 4 】

5) OMIMヒト疾病の検索は、おそらくZU5ドメインに関連している：球状赤血球症、ウェルナー症候群、log QT症候群4、溶解性奇形赤血球性貧血、貧血、高ビリルビン血症、橢円赤血球症、奇形赤血球症、及び不全リンパ球症候群。

【 0 3 7 5 】

6) OMIMヒト疾病の検索は、おそらくメタロチオネイン・ドメインに関連している：ウルフエルリヒトとランドバーグのミオクロームステんかん、メンケス病、高コレステロール血症、高尿酸血症、皮膚悪性黒色腫、弛緩性皮膚、脳下垂体矮小発育症、血友病B、ウィルソン病、及びチロシントランスアミナーゼ欠損症。

【 0 3 7 6 】

7) OMIMヒト疾病の検索は、おそらくリーラー・ドメインに関連している：ミラー-ディッカー脳回欠損症候群。リーラー・ドメインに関連している他の病気及び健康状態が、本願発明の範囲内に包含される。

【 0 3 7 7 】

8) OMIMヒト疾病の検索は、おそらくマラリア原虫サーカムスポロゾイト・タンパク質シグネチャー・ドメインに関連している：マラリア。

【 0 3 7 8 】

9) OMIMヒト疾病の検索は、おそらく第1因子膜侵襲複合体に関連している：補体成分タンパク質欠損症 (例えば、C3及びC8欠損症)、糸球体腎炎、脂質栄養障害、D因子欠損症、タンパク尿、福山型先天性筋ジストロフィー症、筋-目-脳病、溶解性尿毒症症候群、喘息、関節リウマチ、H欠損症、統合失調症、血管性水腫、ネマリン・ミオパシー1、プレセリン認知症、パーキンソン症候群、エリテマトーデス、硫黄欠乏性毛髪発育異常症、毛細血管拡張性運動失調、テイ-サックス病、腸癌、アンジェルマン症候群、高コレステロール血症、アルツハイマー病、アルポート症候群、ファンコニ貧血、腎不全症、房室中隔無発育、ニーマン-ピック病、ムコ多糖体症1型、特殊顆粒欠失、近位肢型斑状軟骨形成不全症、神経線維腫症、筋強直性ジストロフィー。

【 0 3 7 9 】

10) OMIMヒト疾病の検索は、おそらくロダナーゼ・シグネチャー・ドメインに関連している：ミオパシー、レーパー視神経萎縮症、及びいわゆるロダナーゼ欠損。

【0380】

3.2 2つ以上のドメインに関連している疾病、又は分泌タンパク質に関連している疾病

3.2.1 エリテマトーデスが、デスドメイン、免疫グロブリン・ドメイン、及び第1因子膜侵襲複合体に関連することがわかっている。

【0381】

3.2.2 マラリアが、免疫グロブリン・ドメイン及びサルモジウム・サーカムスポロゾイト・タンパク質シグネチャーに関連することがわかっている。

【0382】

3.2.3 リンパ球増殖性症候群、T細胞性白血病、及び多発性硬化症が、デスドメイン及び免疫グロブリン・ドメインに関連することがわかっている。

10

【0383】

3.2.4 第V因子欠損症が、トロンボスポンジン1型モチーフ及び免疫グロブリン・ドメインに関連することがわかっている。

【0384】

3.2.5 補体成分タンパク質欠損症 (C3、C6、C8、及びC6/7混合型欠損症) が、第1因子膜侵襲複合体及びトロンボスポンジン1型モチーフに関連することがわかっている。

【0385】

3.2.6 喘息及び毛細血管拡張性運動失調が、免疫グロブリン・ドメイン及び第1因子膜侵襲複合体に関連することがわかっている。

【0386】

3.2.7 アルツハイマー病が、第1因子膜侵襲複合体及びデスドメインに関連することがわかっている。

20

【0387】

3.2.8 レーバー視神経萎縮症が、デスドメイン及びロダナーゼ・シグネチャーに関連する。

【0388】

3.2.9 高コレステロール血症が、第1因子膜侵襲複合体及びメタロチオネイン・ドメインに関連することがわかっている。

【0389】

3.2.10 ミオパシーが、ロダナーゼ・シグネチャー及び第1因子膜侵襲複合体に関連することがわかっている。

30

【0390】

3.2.11 プロパージン欠損症が、分泌タンパク質 (プロパージン前駆体又はP因子) に関連することがわかっている。

【0391】

実施例4：TagMan分析によるUNC5H2d遺伝子発現レベルの分析

各サンプルからの全RNAを、20 µlの最終的な反応容量で、RT-PCR用のSuperscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. No. 18080-051) を使用して逆転写した。2 µgの全RNAを、10 µlの容量で、50ngのランダム六量体プライマー、それぞれ10mMのdATP、dGTP、dCTP、及びdTTP、並びにDEPC処理水を混ぜ合わせた。その混合物を、65 °Cで5分間インキュベートし、次に、氷上で1分間、冷やした。以下の10 µlのcDNA合成ミックスを別々のチューブの中に調製した：2 µlの10×RT緩衝液、4 µlの25mM MgCl₂、2 µlの0.1M DTT、1 µlのRnaseOUT (商標) (40単位/µl)、及び1 µlのSuperscript (商標) III RT酵素 (200単位/µl)。cDNA合成ミックスを、RNA/プライマー混合物に加え、軽く混合し、そして25 °Cで10分間、次に50 °Cで50分間インキュベートした。次に、85 °Cで5分間インキュベートすることによってRT酵素を不活化した。混合物を、氷上で冷やし、次に、1 µlのE. コリ Rnase H (2単位/µl) を加え、そして、その混合物を37 °Cで20分間インキュベートした。混合物を、氷上で冷やし、次に、滅菌水で1/250に希釈した。逆転写酵素反応の希釈物を、次に、TaqMan機器 (PE Biosystems 7700) を用いたリアルタイムPCR分析にかけた。

40

50

【 0 3 9 2 】

ヒトUNC5H2d及びハウスキーピング対照遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対するPCRプライマーを、Primer Expressソフトウェア (PE Biosystems) を使用して設計した。プライマーの配列を、表12に示す。TaqMan分析に使用する特異性と最適プライマー濃度を、プラスミドpCR-XL-TOPO-UNC5H2d (プラスミドI.D. 13855) の一連の希釈物を用いてUNC5H2d遺伝子特異的プライマーを試験することによって決定した。cDNAの潜在的なゲノムDNA混入を、GAPDHイントロン配列に特異的なプライマーを使用してPCR反応を実施することによって除去した。非特異性増幅の不存在を、4%アガロースゲルを用いてPCR産物を分析して、予想した分子量の単一バンドが製造されたことを保証することによって制御した。

10

【 0 3 9 3 】

SYBR GreenリアルタイムPCR反応を、25 μ lのSYBR Green PCRマスターミックス (PE Biosystems) (そこに0.5単位のAmpEraseウラシルN-グリコシラーゼ (UNG, PE Biosystems) を、前もって加えた)、300nMのそれぞれの増幅プライマー、及び5 μ lのRT-PCR産物を含む50 μ lの反応容量で行った。サイクルを、以下の通りプログラムしたABI PRISM 7700 (TaqMan) 検出システムを使用して実施した: 50 で2分間の1サイクル; 95 で10分間の1サイクル; 95 で15秒間、60 で1分間の40サイクル。各反応を、デュプリケートで行ない、結果を平均した。

【 0 3 9 4 】

よって、逆転写したcDNAサンプルのプライマー特異的ドメインを増幅し、そしてそれらのサイクル閾値 (Ct) の値を決定する。それぞれのcDNAサンプルのCt値を、以下の通りハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの値に対して標準化した。それぞれのcDNAサンプルにおけるGAPDH遺伝子及びUNC5H2d遺伝子の間の発現レベルの相違点は、Ct値の差として、すなわち、 $\Delta Ct = Ct (GAPDH) - Ct (UNC5H2d)$ で表された。次に、各サンプルについての結果を、式、 $Fold\ Difference = 2^{(-\Delta Ct)}$ に従って、検出可能なGAPDH遺伝子発現に必要なサイクル数に対する検出可能なUNC5H2d遺伝子発現に必要なサイクル数の倍数差 (a fold difference) として表した。最終的に、それぞれのcDNAサンプル中のUNC5H2d遺伝子の遺伝子発現レベルを、UNC5H2dの倍数差で100を割ることによって、GAPDH発現レベル = 100%であるところのGAPDH遺伝子発現レベルに対して示した。結果を表13に示す。

20

【 0 3 9 5 】

【表 1 5】

30

表12: TaqMan PCRプライマー配列

プライマー	配列 (5'-3')
UNC5H2d-121F	CGC TGC TCG ACT CTA AGA ACT G
UNC5H2d-183R	GTA GGA GCT GCG GGT TGC T
hGAPDH-F	CCA CCC ATG GCA AAT TCC
hGAPDH-R	GAT GGG ATT TCC ATT GAT GAC A
イントロンhGAPDH-F	CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT
イントロンhGAPDH-R	CTG TGC TCC CAC TCC TGA TTT

40

【 0 3 9 6 】

【表 16】

表13. RT-PCR (TaqMan) によって計測される様々な人体組織のUNC5H2d発現

cDNAサンプル	Ct (hGAPDH)	Ct (UNC5H2d)	デルタ (δ) ct	倍数差	GAPDH発現に 対する UNC5H2dの 発現レベル (GAPDH=100%)
S76 脳	22.62	34.03	-11.42	2730.60	0.04
S77 心臓	24.00	35.45	-11.45	2797.65	0.04
S78 腎臓	22.93	34.49	-11.86	3019.30	0.03
S79 肝臓	25.29	34.78	-9.49	719.08	0.14
S80 肺	25.23	34.08	-8.66	463.04	0.22
S81 胎盤	24.61	34.55	-9.95	985.70	0.10
S82 骨格筋	19.42	34.72	-15.30	40342.14	0.00
S83 小腸	23.65	34.11	-10.47	1413.44	0.07
S84 脾臓	25.70	35.70	-10.01	1027.56	0.10
S85 胸腺	23.03	35.15	-12.12	4435.87	0.02
S86 子宮	24.28	34.85	-10.57	1514.89	0.07
S87 骨髄	25.12	36.06	-9.94	978.89	0.10
S88 甲状腺	23.66	35.25	-11.69	3072.06	0.03
S89 脊髄	22.11	34.30	-12.20	4688.79	0.02
S90 頸部	23.99	33.71	-9.72	640.44	0.12
S91 結腸	22.26	33.62	-11.36	2628.46	0.04
S92 卵巣	23.37	33.31	-9.94	982.29	0.10
S93 前立腺	21.28	32.96	-11.57	3256.52	0.03
S94 睾丸	21.93	33.69	-11.76	3460.27	0.03
S95 皮膚	24.06	34.32	-10.24	1205.15	0.06
S113 膵臓	24.26	34.14	-9.68	942.27	0.11
S115 唾液腺	23.13	33.76	-10.63	1579.22	0.06
S116 副腎	22.50	33.03	-10.53	1478.58	0.07
S117 ユニバーサルh-ref	17.39	33.16	-15.79	56462.29	0.00
S119 乳房	21.46	33.17	-11.72	3361.76	0.03
S120 胃	22.16	34.20	-12.04	4196.58	0.02
S121 胎児の腎臓	20.30	31.02	-10.72	1680.88	0.06
S122 目	23.30	33.58	-10.26	1243.34	0.08
S123 乳腺	24.98	34.03	-9.06	531.90	0.19
S124 卵巣	20.19	33.49	-13.30	10085.54	0.01
S125 下垂体	20.65	34.07	-11.43	2749.59	0.04
S127 ヒト・ループスの肝臓	24.41	34.67	-10.47	1413.44	0.07
S128 ヒト・ループスの肺	22.42	34.01	-11.59	3082.75	0.03
S129 ヒト・ループスの脾臓	23.63	33.99	-10.36	1314.23	0.08
S130 ヒト・ループスの腎臓	22.93	33.49	-10.57	1514.89	0.07
S131 肝硬変	21.86	33.71	-11.65	3691.52	0.03
S132 硬変症の肺	16.01	33.41	-15.40	43237.64	0.00
S133 硬変症の脾臓	22.52	33.54	-11.03	2083.80	0.05
S134 硬変症の小腸	20.73	34.28	-13.55	11952.29	0.01

【 0 3 9 7 】

【表 17】

S135 腎腫瘍	20.01	31.69	-11.69	3292.57	0.03
S136 肝腫瘍	19.55	33.66	-14.11	17682.06	0.01
S137 肺腫瘍	22.29	33.61	-11.52	2936.74	0.03
S138 結腸腫瘍	19.52	33.69	-14.18	18496.95	0.01
S139 乳房の腫瘍	20.05	33.53	-13.46	11425.74	0.01
S140 胎児の脳	20.07	33.05	-12.99	8107.27	0.01
S141 胎児の脾臓	21.21	32.93	-11.72	3373.43	0.03
S142 胎児の肝臓	21.22	34.07	-12.65	7383.04	0.01
S143 胎児の心臓	19.89	33.27	-13.36	10660.59	0.01
S144 胎児の肺	17.47	34.12	-16.66	103194.03	0.00
S145 リンパ節	22.32	34.18	-11.66	3704.34	0.03
S146 脂肪	20.27	32.38	-12.11	4405.23	0.02
S147 膀胱	21.24	33.26	-12.03	4167.60	0.02
S148 盲腸	22.06	33.25	-11.19	2336.26	0.04
S149 血管動脈	21.63	33.16	-11.33	2574.36	0.04
S150 咽喉	19.56	33.89	-14.34	20738.16	0.00
S151 疾患の脳	22.56	31.96	-9.42	685.02	0.15
S1 繊維芽細胞 AG1518	20.62	33.25	-12.64	6360.83	0.02
S2 繊維芽細胞 Howard ab	21.33	33.71	-12.36	5330.30	0.02
S3 繊維芽細胞 Clark N	20.33	32.47	-12.14	4513.40	0.02
S4 繊維芽細胞 NF1	20.58	32.44	-11.66	3769.09	0.03
S5 繊維芽細胞 NFS	21.72	33.60	-11.66	3769.09	0.03
S6 繊維芽細胞 SSc N2	19.44	32.25	-12.81	7181.15	0.01
S7 繊維芽細胞 SScA2	19.11	32.45	-13.34	10369.06	0.01
S11 混合 RA2	23.17	33.62	-10.65	1601.27	0.06
S12 混合 RA3	21.94	33.28	-11.34	2583.30	0.04
S13 混合 OA1	25.63	34.16	-8.35	326.29	0.31
S15 繊維芽細胞 LN1	20.03	33.08	-13.06	8460.69	0.01
S16 繊維芽細胞 LAb1	18.66	32.32	-13.66	12944.04	0.01
S17 繊維芽細胞 LN14	19.55	33.17	-13.62	12590.08	0.01
S18 繊維芽細胞 LN13	19.83	32.97	-13.14	9026.61	0.01
S19 混合 OA4	24.45	34.11	-9.66	809.00	0.12
S27 混合A	24.00	33.88	-9.89	945.54	0.11
S28 混合C	23.26	33.82	-10.56	1504.43	0.07
S29 混合D	23.41	33.68	-10.27	1230.48	0.08
S50 混合結腸 13224	22.14	33.32	-11.18	2320.15	0.04
S62 混合小腸 正常int21	22.26	33.93	-11.67	3258.52	0.03
S63 混合小腸 正常int23	22.18	33.40	-11.22	2977.12	0.04
S64 混合小腸 クロウン病6	25.16	34.50	-9.33	641.36	0.16
S65 混合小腸 クロウン病7	22.52	33.63	-11.12	2217.93	0.05
S67 混合小腸 UC18	23.65	33.37	-9.72	843.36	0.12
BN1 動脈硬化ブランク Z1	22.64	33.43	-10.79	1764.45	0.06
BN3 動脈硬化ブランク Z2	24.40	34.30	-9.90	952.12	0.11
BN5 動脈硬化ブランク Z3	24.43	34.11	-9.69	823.14	0.12

【0398】

0.05のGAPDH発現に対するUNC5H2dの発現レベルの閾値を規定することによって、TaqMan発現の結果は、UNC5H2dが肝臓、肺、胎盤、小腸、脾臓、子宮、骨髄、頸部、卵巣、皮膚、膵臓、唾液腺、副腎、胎児の腎臓、目、乳腺、ヒト・ループスの肝臓、ヒト・ループスの脾臓、ヒト・ループスの腎臓、硬変症の脾臓、アルツハイマー病の脳（S151 疾患の脳）にて、関節リウマチの滑膜、骨関節炎の滑膜、肺、クローン病の混合小腸（S64とS65）

にて、潰瘍性大腸炎の混合小腸（S67）にて、並びに動脈硬化プラークにて、わずかに発現されていることを示している。Dalvin S.らは、UNC5H2が肺で発現されて、肺形成で機能的役割を担っているかもしれないことを示した（Dalvin S.ら、Gene Expr Patterns.、2003年6月；3（3）：279-83ページ、"Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung."）。興味深いことに、正常な乳腺（S123、発現レベルは0.19である）と比べて、乳房の腫瘍（S139、発現レベルは0.01である）におけるUNC5H2dの発現は全くない。同様に、正常な肝臓（S79、発現レベルは0.14である）と比べて肝腫瘍（S136、発現レベルは0.01である）において、又は正常な肺（S80、発現レベルは0.22である）と比べて、肺腫瘍（S137、発現レベルは0.03である）において、UNC5H2dは検知されない。よって、UNC5H2d、その作用物質、又は拮抗物質（例えば、抗体）は、癌、例えば乳房の腫瘍、肝腫瘍、又は肺腫瘍の治療に有用であるかもしれない。Srinivasanらは、乳腺の形態形成におけるネトリン-1の役割、及び癌におけるその潜在的役割について議論している（Srinivasanら、Dev Cell、2003年3月；4（3）：371-82ページ、"Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis."）。正常な脳（S76、発現レベルは0.04である）と比べて、アルツハイマー病の脳（S151 疾患の脳、発現レベルは0.15である）のUNC5H2dの発現の間には一貫した相違点も存在する。そのようなものとして、UNC5H2d、その作用物質、又は拮抗物質（例えば、抗体）は、アルツハイマー病のような神経病理の治療において有用であるかもしれない。先に説明したように、アルツハイマー病が、第1因子膜侵襲複合体及びデスドメインに関連することも既に分かっており、それらはUNC5H2dによって検出される。最後に、相違点は、正常な小腸（S62及びS63、発現レベルは0.03～0.04である）と、クローン病の小腸（S64、発現レベルは0.16である）及び潰瘍性大腸炎の腸（S67、発現レベルは0.12である）におけるUNC5H2dの発現の間に顕著である。そのようなものとして、UNC5H2d、その作用物質、又は拮抗物質（例えば、抗体）は、クローン病及び潰瘍性大腸炎の治療、より一般に、炎症を治療又は予防するのに有用であるかもしれない。

10

20

30

40

50

【0399】

実施例5 - 自己免疫 / 炎症のアッセイ

以下のアッセイを、UNC5H2dポリペプチドの生物活性を確認するために使用できる。

【0400】

Tリンパ球反応を狙ったアッセイ

・ Fasリガンド誘発T細胞死

このアッセイは、受容体介在細胞死の新しい調節因子を明らかにする。

【0401】

このアッセイにおいて、モノクローナル抗6-his抗体と組み合わせた組み換え6ヒスチジン・タグ付けFasリガンドでジャーカット細胞（ヒトT細胞株）を刺激することによって、T細胞アポトーシスを誘発する。死滅を、細胞が死滅する時に培養液中に放出される細胞質酵素であるLDHの放出によって定量する。読み出しは、490nmにて読み取られる比色である。T細胞は、多くの自己免疫疾患において、治療ストラテジー（例えば、クローン病の患者における抗TNF 処置）である抗原特異的T細胞死を制御できる病原であることが示された。

【0402】

・ ヒト-MLR：増殖とサイトカイン分泌

この細胞ベースのアッセイは、他の提供者からのPBMCによる刺激後のリンパ球の増殖、及びサイトカインの分泌又は阻害に対する新規タンパク質の効果を計測する（アロ反応性）。これらのアッセイは、抗原特異的T細胞及び抗原提示細胞の機能を対象とし、その細胞機能はあらゆる自己免疫疾患において重要な細胞応答である。分泌サイトカイン（IL-2、4、5、10、TNF-、及びIFN-）をCBAによって定量する。注釈：増殖とサイトカイン分泌は非依存性反応である。

【0403】

・ マウス-MLR：増殖

この細胞ベースのアッセイは、他の提供体（マウス系統）からの脾臓細胞によって刺激した後のマウス脾臓細胞のリンパ球の増殖又は阻害に対する新規タンパク質の効果を計測する。この細胞ベースのアッセイは、T細胞及び抗原提示細胞の応答に対する新規タンパク質の効果を計測し、h-MLRアッセイにおける正の活性を裏付けるのに使用され、そして同定に至る。このアッセイは、ヒト疾病のマウス・モデルにおいて試験されるタンパク質を選択するために使用される。

【0404】

・ スーパー抗原、TSSTで刺激されたヒトPBMC

スーパー抗原は、T細胞に影響する免疫系の強力な調節因子である。スーパー抗原影響は、例えばIBD、アトピー性皮膚炎及び乾癬のような炎症性皮膚疾患といった障害を免疫学的に媒介した。この細胞アッセイにおいて、我々は、TCRを介するが、古典的な抗原、特に共刺激分子に関してT細胞応答と異なった要件によってTリンパ球活性化を特異的にならせた。

10

【0405】

・ ConA又はPHAのいずれかによって刺激されたヒトPBMC

これらの細胞ベースのアッセイは、サイトカイン・ピース・アレイ（CBA）アッセイ（IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-5、IL-4、及びIL-10）によって計測される異種細胞に作用する2つの異なった刺激によって誘発されるサイトカイン分泌に対する新規タンパク質の効果を計測する。サイトカインの大部分は、損傷、環境、及び細胞標的に依存して、炎症促進性又は抗炎症性の二重作用を有することができる。サイトカイン分泌を調節する能力を有するあらゆるタンパク質が、治療的素質を持つことができる（例えば、IFN- γ 及びTNF- α の減少はTh1介在自己免疫疾患で有益であるだろうし、その一方で、IL-4、IL-5の減少は、Th2介在疾病で有益であるかもしれない、IL-10の誘発はMS及びSLEにおいて興味深い）。

20

【0406】

単球/マクロファージ、及び顆粒球の反応を狙ったアッセイ

・ LPSで刺激したヒトPBMC

この細胞ベースのアッセイは、単球/マクロファージ、及び顆粒球に作用するLPSによって誘発されるサイトカイン分泌（IFN- γ 、TNF- α ）に対する新規タンパク質の効果を計測する。IFN- γ 及びTNF- α 分泌を調節する能力を有するあらゆるタンパク質が、Th1介在自己免疫疾患に有益であろう。

30

【0407】

好中球の反応を狙ったアッセイ

好中球は、例えば関節リウマチといった炎症及び自己免疫疾患で重要である。例えばIL-8といった白血球化学遊走物質は、好中球の活性化、接着、及び最終的に移動をもたらす細胞と微小血管内皮の間の接着相互作用配列を開始する。好中球の組織浸潤は、これらの細胞の細胞形態の特定の変化に関連する細胞骨格要素の再構築に依存する。

【0408】

この細胞ベースのアッセイは、ヒト好中球の細胞骨格再構築に対する新規タンパク質の効果を計測する。

【0409】

Bリンパ球の反応を狙ったアッセイ

自己抗体、並びに浸潤B細胞は、例えば全身のエリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、シェーグレン症候群、及び重症筋無力症といった様々な自己免疫疾患の発症において重要であると考えられる。無視できない証拠は、B細胞恒常性の「無調節」が、病原性抗体を産生する自己反応性B細胞の不適切な生存、そして持続的炎症につながる免疫寛容に影響することもあり得ることを示唆している。B細胞受容体始動に続いて起こる、B細胞の増殖、生存、及び分化の調節における重要な役割を担う新規な因子の同定は、新規な療法の開発において高い関連性がある。

40

【0410】

・ B細胞の増殖

50

この細胞ベースのアッセイは、B細胞生存に対する新規タンパク質の効果を計測する。

【0411】

・ B細胞の共刺激

この細胞ベースのアッセイは、B細胞共刺激に対する新規タンパク質の効果を計測する。

【0412】

単球及び小膠細胞の反応を狙ったアッセイ

・ THP-1のカルシウムの流れ

THP-1細胞におけるCa⁺の流れのアッセイは、小胞体からの細胞内カルシウム放出（一般的な二次情報伝達物質事象）を引き起こすそれらの能力に対する新規タンパク質の効果を計測する。

10

【0413】

・ 小膠細胞の増殖（次のIACに提示される）

前駆小膠細胞の増殖中、いくつかのサイトカインを含む多くのコロニー刺激因子が重要な役割を担っていることが知られている。中でも、M-CSFは、マクロファージ/小膠細胞の成熟の最終段階に不可欠であり、いかなる他の因子でも置き換えられない。この生物反応の評価は、小膠細胞活性に影響を及ぼす方法を示し、その結果、MSへの治療的な潜在能力を有する分子を同定する機会を示すことができる。

【0414】

細胞ベースのアッセイは、M-CSFに対する小膠細胞株の分裂反応を計測するために開発された。実現可能性及びロバスト性の面は最良の結果を示した。このアッセイは、非放射性基材を必要とし、容易に自動化される96ウェルプレートで行われる。

20

【0415】

実施例6 - タンパク質機能の生物学的関連性の調査のための神経学的アッセイ

以下のアッセイを、UNC5H2dポリペプチドの生物活性を確認するために使用できる。多くの神経学的アッセイが出願人によって開発され、それらはタンパク質機能の生物学的関連性の調査で役に立つ。出願人によって開発された神経学的アッセイの例は、4つのタイプのアッセイを含む。これらについて以下で議論する。

【0416】

i. 乏突起膠細胞ベースのアッセイ

30

乏突起膠細胞は、CNSにおけるミエリン形成に関与する。多発性硬化症において、それらは侵襲した最初の細胞であり、そして、それらの喪失は広範囲にわたる行動障害をもたらす。炎症を制限することに加えて、MSにおいて生じる病巣の不完全な再ミエリン化を高めることが、MSの治療戦略として提案された。ニューロンのように、成熟型乏突起膠細胞は分裂しないが、新しい乏突起膠細胞は前駆体から生じることができる。これらの前駆細胞は成人脳においてほんのわずかしが存在せず、胎児においてでさえ、前駆細胞の数はHTSには不十分である。

【0417】

Oli-neuは、t-neu発癌遺伝子による乏突起膠細胞前駆体の不死化によって得られたマウス細胞株である。それらは、よく研究されており、若い乏突起膠細胞の生物学を研究するための代表的な細胞株として利用可能である。これらの細胞を、2つのタイプのアッセイで使用できる。

40

【0418】

1つは、乏突起膠細胞増殖を活性化する因子を同定するためのもの、そしてもう一方が、それらの分化を促進する因子を見つけるためのものである。両事象は、脱髄性疾患の再生と再対合を助ける点において重要である。

【0419】

他の可能性のある細胞株はヒト細胞株のMO3-13である。MO3-13は、rabdo筋肉肉腫細胞と、成人の乏突起膠細胞との融合に由来する。しかしながら、これらの細胞は乏突起膠細胞に分化する能力が低下しているため、それらの増殖速度は増殖検定を可能にするのに十

50

分ではない。それにもかかわらず、それらは、乏突起膠細胞の一定の特徴を発現し、且つ、それらの形態は核内移行の研究に十分に適合している。

【0420】

従って、この細胞株を、3つの転写因子、それぞれNF- κ B、Stat-1、及びStat-2の核内移行に基づくアッセイに使用できる。Jak/Stat転写経路は、例えばIFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-5、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-6；IL-5）、又はホルモン（例えば、GH、TPO、EPO）といった多くの因子によって活性化される複雑な経路である。反応の特異性は、活性化されたStatsの組み合わせによる。例えば、IFN- γ は、Stat1、2、及び3の核内移行を活性化する一方で、IFN- α は、Stat1しか活性化しない。同様に、多くのサイトカイン及び増殖因子が、NF- κ B移行を引き起こした。これらのアッセイにおいて、目標は、所定のタンパク質の活性経路の実態を得ることである。

10

【0421】

ii. 星状細胞ベースのアッセイ

星状細胞の生態は非常に複雑であるが、2つの一般的な状態が認められている。静止状態と呼ばれる一方の状態において、星状細胞は、ニューロン及び乏突起膠細胞にグルタミン酸をポンプで送り、エネルギー基質を提供することによってニューロンの代謝及び興奮レベルを調節している。活性化状態において、星状細胞は、ケモカイン及びサイトカイン、並びに一酸化窒素を産生する。最初の状態は正常な健康的な状態とみなされるのに対して、2番目の状態は、炎症、卒中、又は神経変性疾患中に起こっている。この活性化状態が持続する時、それは病理状態と見なされるべきである。

20

【0422】

多くの因子及び多くの経路が、星状細胞の活性化を調節することが知られている。星状細胞の活性化を調節する新規の因子を同定するために、星状細胞腫起源のヒト細胞株であるU373細胞を使用できる。NF- κ B、Stats、並びにc-Junは、星状細胞活性化において極めて重要な役割を担うことが知られているシグナル伝達分子である。

【0423】

NF- κ B、c-Jun、及びStat1、2、及び3の核内移行に基づく一群のスクリーンを行うことができる。これらの経路の典型的な活性化因子は、IL-1 β 、IFN- γ 、又はIFN- α である。目標は、CNS疾病の治療における治療薬として使用できるタンパク質の同定である。

【0424】

iii. ニューロン・ベースのアッセイ

ニューロンは、非常に複雑で、且つ、多様性のある細胞であるが、それらは皆、2つのものが共通である。1つ目に、それらは分裂終了細胞である、2つ目に、それらは他の細胞を神経支配している。それらの生存は、多くの場合、神経支配された標的細胞によって産生される栄養素の存在に結び付いている。多くの神経変性疾患において、標的の神経支配の喪失が、細胞体萎縮とアポトーシス細胞死につながる。従って、標的欠損症を補う栄養素の同定が、神経変性疾患の治療において非常に重要である。この観点で、ラットPC12細胞のサブクローンであるNS1細胞を使用した生存試験を実施することができる。これらの細胞は長年使用されてきて、そして、ニューロンの生存と分化（MEK、PI3K、CREB）に関する経路を含めた初代神経細胞を用いて確認する前に、多くの神経生物学の知識が、まず、これらの細胞を用いて習得された。対照的に、マウス神経芽細胞腫であるN2A細胞は、古典的な神経栄養因子に反応しないが、Junキナーゼ阻害剤が、血清除去によって誘発されたアポトーシスを妨げる。従って、これらの2つの細胞株を用いたアッセイは、様々なタイプの「生存促進」タンパク質を見つけるのを助ける。

40

【0425】

先のアッセイにおいて、我々が増殖及び分化の両方を促進する因子を同定することに留意することが重要である。神経分化を特異的に促進する因子を同定するために、神経突起の増殖に基づくNS1分化アッセイを使用できる。神経変性疾患において促進軸索又は樹枝状発芽は、2つの理由から有利であるかもしれない。1つ目に、それは、変性ニューロンを再生し、そして標的細胞との接触を再確立するのを助ける。2つ目に、それは、例えばバ

50

ーキンソン又はADといった神経変性の終末期を遅らせる代償現象、いわゆる健康な繊維からの側枝発芽を増強する。

【0426】

iv. 内皮細胞ベースのアッセイ

脳と血管の間の血液脳関門 (BBB) は、皮質脊髄液と血清組成物の相違の原因である。BBBは、内皮細胞と星状細胞の間の密接な接触に由来する。それは、脳内への白血球透過を妨げることによって免疫寛容状態を維持して、同じ細胞内信号経路を使用した2つの並列内分泌系の発達を可能にしている。しかしながら、多くの疾病又は外傷において、BBB完全性は、変更され、そして血清タンパク質、並びに白血球が脳に入り神経炎症を誘発する。BBBのインビトロでのモデルは簡単ではないが、例えばヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) といった初代内皮細胞培養物は、BBB生物学の何らかの側面を模倣することができた。例えば、タンパク質活性化細胞内カルシウムの放出によってBBB漏出を引き起こすことができるだろう。BBB完全性を調節する同定タンパク質の観点で、トロンビンのあるなしにかかわらずカルシウム動員アッセイを、HUVECを用いて実施できる。

10

【0427】

実施例7 - マウス・モデル

以下のマウス・モデルを、本明細書中に開示されるUNC5H2dポリペプチドの生物活性を確認するために使用できる。

マウス・モデルは、Chura (Gene-engineered models for genetic manipulation and functional analysis of the cardiovascular system in mice, *Chang Gung Med J.*, 2003年12月; 26 (12) : 868-78ページ) に、Mara (Neurocardiovascular regulation in mice: experimental approaches and novel findings, *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 2003年11月; 30 (11) : 885-93ページ) に、又はSvensonら (Invited review: Identifying new mouse models of cardiovascular disease: a review of high-throughput screens of mutagenized and inbred strains, *J Appl Physiol.*, 2003年4月; 94 (4) : 1650-9ページ; 考察、1673ページ) に記載されている。

20

【0428】

あるいは、以下のマウス・モデルを、血管発生においてUNC5H2dポリペプチドをアッセイすることによって、特に、心臓活動中の静脈循環中の血液及び体液の蓄積を計測することによって、又は変性動脈血管から生じる末梢抵抗を計測することによって、又は後脳内の毛細管の厚さ及び分岐を計測することによって、又は内皮先端細胞からの糸状仮足の伸長を計測することによって、又は節間血管 (ISVs) の軌道表現型、より一般には、血管分枝欠陥を特徴付けすることによってLuら (Luら, *Nature*, 2004年11月11日; 432 (7014) : 179-86ページ, Epub 2004年10月27日) で開示されるようにUNC5H2dポリペプチドの生物活性を確認するのに使用できる。

30

【0429】

【表 1 8】

参考文献

- 1) Engels et al., 1989, *Angew. Chem. Int. Ed.* 28:716-34.
- 2) Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell.* 1999 Jun 25; 97(7):927-41. 10
- 3) lo Davis et al., 1996, *Cell*, 87:1161-69.
- 4) Kitts et al., 1993, *Biotechniques*, 14:810-17.
- 5) Komatsuzaki K, Dalvin S, Kinane TB. Modulation of G(ialpha(2)) signaling by the axonal guidance molecule UNC5H2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Oct 4; 297(4): 898-905. 20
- 6) Lathe R, et al. *J.Molec.Biol.* 183:1-12 (1985).
- 7) Lu et al. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):179-86. Epub 2004 Oct 27.
- 8) Maniatis T. et al. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982. 30
- 9) Marston et al., 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.
- 10) Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem.* 1984 May 1; 138(2):267-84.
- 11) Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. 40

【 0 4 3 0 】

【表 1 9】

Neuron. 1996 Aug; 17(2):203-15.

12) Roberts et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303.

13) Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

10

14) Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. Dev Cell. 2003 Mar; 4(3): 371-82.

15) Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. Nat Cell Biol. 2003 Mar; 5(3): 216-23.

20

16) Thiebault K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Scoazec JY, Saurin JC, Romeo G, Mehlen P. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1; 100(7): 4173-8.

17) Williams ME, Strickland P, Watanabe K, Hinck L. UNC5H1 Induces Apoptosis via Its Juxtamembrane Region through an Interaction with NRAGE. J Biol Chem. 2003 May 9; 278(19): 17483-90.

30

18) U.S. 5,824,469; University of Washington.

19) PCT/IJS98/20094 (W099/15650), Athersys.

20) WO 94/20069; Amgen inc.

【図面の簡単な説明】

40

【 0 4 3 1】

【図 1】 Multalinバージョン5.4.1著作権I.N.R.A.フランス1989年、1991年、1994年、1996年を使用したUNC5H2a、UNC5H2b、UNC5H2c、及びUNC5H2dのアミノ酸配列のアラインメントを図解する。階層的なクラスタリングを伴う多重配列アラインメント。F. CORPET、1988年、Nucl. Acids Res.、16(22)、10881-10890ページ。使用されるシンボル比較表：12のGap加重及び2のGap長加重を有するblosum62使用されるコンセンサス・レベル：高 = 90%、低 = 50%使用されるコンセンサス記号：

【表 2 0】

IはIVのうちのいずれかである
 \$はLMのうちのいずれかである
 %はFYのうちのいずれかである
 #はNDQEBZのうちのいずれかである

【図 2】 UNC5H2cのヌクレオチド配列と翻訳を表す。

【図 3】 プライマーUNC5H2c-CP1とUNC5H2c-CP2を使用してクローン化されたUNC5H2dのPCR産物のヌクレオチド配列と翻訳を表す。 10

【図 4】 プラスミドpCR-XL-TOPO-UNC5H2dの遺伝子地図を図解する。

【表 2 1】

分子：		pCR-XL-TOPO-UNC5H2d 6273 bps DNA環		
分子特性：				
タイプ	開始	終了	名称	説明
領域	95	216	Plac	Lacプロモーター
マーカー	205		M13R	M13Rプライマー
領域	337	3090	C Insert	挿入されたUNC5H2d PCR産物 20
遺伝子	3032	426	C cds	UNC5H2d cds
マーカー	3160		C T7	T7プロモーター・プライミング部位
遺伝子	3340	3642	ccdB	ccdB致死遺伝子ORF
遺伝子	3991	4785	Kan	カナマイシン耐性ORF
遺伝子	4992	5366	Zeo	ゼオシン耐性ORF
領域	5434	6147	pUC	pUC開始点

【図 5】 プライマーUNC5H2d-DP1とUNC5H2d-DP2を使用して増幅したUNC5H2d-6HIS PCR産物のヌクレオチド配列と翻訳を表す。 30

【図 6】 pEAK12Mの遺伝子地図を図解する。

【表 2 2】

分子：		peak12M, 6909 bps DNA環		
分子特性：				
タイプ	開始	終了	名称	説明
領域	2	595	pmb-ori	
遺伝子	659	1516	Amp	アンピシリン耐性ORF
遺伝子	1690	2796	EF-1alpha	EF-1 α プロモーター
領域	2846	2886	MCS	ポリリンカー
遺伝子	3927	3331	C Pur	ピューロマイシン耐性ORF 40
領域	4154	3931	C tK	tKプロモーター
遺伝子	4649	4155	C Ori P	
遺伝子	6701	4646	C EBNA-1	EBNA-1 ORF
領域	6702	6901	sv40	sv40プロモーター

【図 7】 pcDNA3.1のMapを示す。

【表 2 3】

分子 :		pcDNA3.1+, 5428 bps DNA環		
タイプ	開始	終了	名称	説明
マーカー	209		CMV	CMVプロモーター
マーカー	863		T7	T7プロモーター
領域	1021	1235	BGH polyA	
マーカー	1021		BGHrev	BGH逆方向プライミング部位
領域	1298	1711	f1	f1開始点
領域	1776	2101	SV40 prom	SV40プロモーター
遺伝子	2137	2931	Neo	ネオマイシン耐性ORF
領域	2947	3186	SV40 polyA	
領域	3618	4291	ColE1	ColE1開始点
遺伝子	4436	5297	Amp	アンピシリン耐性ORF

10

【図 8】 pEAK12M-UNC5H2d-6HISの遺伝子地図を図解する。

【表 2 4】

分子 :		pEAK12M-UNC5H2d-6HIS, 9543 bps DNA環		
タイプ	開始	終了	名称	説明
領域	2	595	pmb-ori	
遺伝子	659	1516	Amp	アンピシリン耐性ORF
遺伝子	1690	2796	EF-1alpha	
マーカー	2703		pEAK12-F	pEAK12-Fプライミング部位
マーカー	2846		UNC5H2d-DP1	UNC5H2d-DP1プライミング部位
遺伝子	2858	5464	cds	UNC5H2d cds
マーカー	3407		UNC5H2d-SP1	UNC5H2d-SP1プライミング部位
マーカー	4143		UNC5H2d-SP2	UNC5H2d-SP2プライミング部位
マーカー	4500		UNC5H2d-SP3	UNC5H2d-SP3プライミング部位
マーカー	5465		6HIS	6HISタグ
マーカー	5483		stop	終止コドン
マーカー	5491		C UNC5H2d-DP2	UNC5H2d-DP2プライミング部位
マーカー	5631		C pEAK12-R	pEAK12-Rプライミング部位
遺伝子	6561	5965	C PUR	ピューロマイシン耐性ORF
領域	6788	6565	C tK	tKプロモーター
遺伝子	7283	6789	C Ori P	
遺伝子	9335	7283	C EBNA-1	
領域	9336	9535	sv40	

20

30

40

【図 9】 pcDNA3.1-UNC5H2d-6HISの遺伝子地図を図解する。

【表 2 5】

分子：		pcDNA3.1-UNC5H2d-6HIS, 8027 bps DNA環		
タイプ	開始	終了	名称	説明
マーカー	209		CMV	CMVプロモーター
マーカー	863		T7	T7プロモーター
マーカー	911		UNC5H2d-D1	UNC5H2d-D1プライミング部位
遺伝子	923	3529	cds	UNC5H2d cds
マーカー	1472		UNC5H2d-SP1	UNC5H2d-SP1プライミング部位
マーカー	2206		UNC5H2d-SP2	UNC5H2d-SP2プライミング部位
マーカー	2565		UNC5H2d-SP3	UNC5H2d-SP3プライミング部位
マーカー	3530		6HIS	6HISタグ
マーカー	3548		stop	終止コドン
マーカー	3556		C UNC5H2d-DP2	UNC5H2d-DP2プライミング部位
マーカー	3620		BGHrev	BGH逆方向・プライミング部位
マーカー	3897		f1	f1開始点
マーカー	4375		sv40 prom	SV40プロモーター
遺伝子	4736	5530	Neo	ネオマイシン耐性ORF
マーカー	6216		pUC	pUC開始点
マーカー	6216		Co1E1	Co1E1開始点
遺伝子	7896	7035	Amp	アンピシリン耐性 ORF

10

20

【図 1 0】 UNC5H2dとUNC5H2aのPfamドメインのアラインメントを報告する。

【図 1 1】 UNC5H2c、UNC5H2a、UNC5H2d、及びUNC5HbのSMARTドメインのアラインメントを報告する。

【図 1 - 1】

Figure 1.

UNC5H2a, UNC5H2b, UNC5H2c, 及びUNC5H2dの
アミノ酸のアライメント

UNC5H2.a	1	MGARSGARGA	LLALLLLCND	PRLSQAGTDS	GSEVLPDSEFP	SAPAEPLPYF	50
UNC5H2.b	1	mgarsgarga	llallllcnd	prlsqagtds	gsevlpdsefp	sapaeplyf	50
UNC5H2.c	1	MGARSGARGA	LLALLLLCND	PRLSQAGTDS	GSEVLPDSEFP	SAPAEPLPYF	50
UNC5H2.d	1	MGARSGARGA	LLALLLLCND	PRLSQAGTDS	GSEVLPDSEFP	SAPAEPLPYF	50
コンセンサス		
UNC5H2.a	51	LQEPQDAYIV	NKNFVRLRCR	AFPATQIYFK	CNGEIVSQND	HVTQEGLEDA	100
UNC5H2.b	51	lqepqdayiv	nknfvrlrcr	afpatqiylk	cngelvsnqd	hvtqeglede	100
UNC5H2.c	51	LQEPQDAYIV	NKNFVRLRCR	AFPATQIYFK	CNGEIVSQND	HVTQEGLEDA	100
UNC5H2.d	51	LQEPQDAYIV	NKNFVRLRCR	AFPATQIYFK	CNGEIVSQND	HVTQEGLEDA	100
コンセンサス		
UNC5H2.a	101	TGLRVREVOI	EVSROQVEEL	FGLEDYWCQC	VAMSSAGTTK	SRRAYVRIAY	150
UNC5H2.b	101	tglrvrevoi	evsroqveel	fgledywcqc	vamssagttk	rrayvriay	150
UNC5H2.c	101	TGLRVREVOI	EVSROQVEEL	FGLEDYWCQC	VAMSSAGTTK	SRRAYVRIAY	150
UNC5H2.d	101	TGLRVREVOI	EVSROQVEEL	FGLEDYWCQC	VAMSSAGTTK	SRRAYVRIAY	150
コンセンサス		
UNC5H2.a	151	LRRNFDQEP	LKGVPLDHEV	LQCRPPEGV	PVAEVEWLN	EDVIDPTQD	200
UNC5H2.b	151	lrrnfdqep	lksvpldhev	lqcrppegv	pvaevewln	edvidptqd	200
UNC5H2.c	151	LRRNFDQEP	LKGVPLDHEV	LQCRPPEGV	PVAEVEWLN	EDVIDPTQD	200
UNC5H2.d	151	LRRNFDQEP	LKGVPLDHEV	LQCRPPEGV	PVAEVEWLN	EDVIDPTQD	200
コンセンサス		
UNC5H2.a	201	NFLITIDNLI	IRQARLSDT	ANYTCVAKNI	VAKRRSTTAT	VIVVYVNGWS	250
UNC5H2.b	201	nflitidnli	irqarlsdt	anytcvakni	vakrrsttat	vivyvngws	250
UNC5H2.c	201	NFLITIDNLI	IRQARLSDT	ANYTCVAKNI	VAKRRSTTAT	VIVVYVNGWS	250
UNC5H2.d	201	NFLITIDNLI	IRQARLSDT	ANYTCVAKNI	VAKRRSTTAT	VIVVYVNGWS	250
コンセンサス		
UNC5H2.a	251	SWAEWSPCSN	RCGRGQKRT	RTCTNPAPLN	GGAFCEGQAF	QKTACTTICP	300
UNC5H2.b	251	swaewspcsn	rcgrgqkrt	rtctnpapln	ggafceqaf	qktactticip	300
UNC5H2.c	251	SWAEWSPCSN	RCGRGQKRT	RTCTNPAPLN	GGAFCEGQAF	QKTACTTICP	300
UNC5H2.d	251	SWAEWSPCSN	RCGRGQKRT	RTCTNPAPLN	GGAFCEGQAF	QKTACTTICP	300
コンセンサス		
UNC5H2.a	301	VDGAWTEWSK	WSACSTECAN	WRSRECHAPP	PQNGGRDCSG	TLLDSKNCTD	350
UNC5H2.b	301	vdgawteWSK	wsacstecan	wrsrechapp	pqnggrdcsg	tlldsknctd	350
UNC5H2.c	301	VDGAWTEWSK	WSACSTECAN	WRSRECHAPP	PQNGGRDCSG	TLLDSKNCTD	350
UNC5H2.d	301	VDGAWTEWSK	WSACSTECAN	WRSRECHAPP	PQNGGRDCSG	TLLDSKNCTD	350
コンセンサス		
UNC5H2.a	351	GLCMQ.....MIEA	SGDAALYAGL	VVAIFVVAIV	IMAVGVVVYR	400
UNC5H2.b	351	glcmq.....miea	sgdaalyagl	vvaifvvaiv	imavgvvyr	400
UNC5H2.c	351	GLCMQ.....MIEA	SGDAALYAGL	VVAIFVVAIV	IMAVGVVVYR	400
UNC5H2.d	351	GLCMQ.....MIEA	SGDAALYAGL	VVAIFVVAIV	IMAVGVVVYR	400
コンセンサス		

【図 1 - 3】

UNC5H2.a	801	LSTELTCKI	CVRVQEGEQ	IFQLHTLLAE	TPAGSLDTIC	SAPGSTVTQ	850
UNC5H2.b	801	lstelctki	cvrvqegeq	ifqlhtllae	tpagsldtic	sapgstvtq	850
UNC5H2.c	801	LSTELTCKI	CVRVQEGEQ	IFQLHTLLAE	TPAGSLDTIC	SAPGSTVTQ	850
UNC5H2.d	801	LSTELTCKI	CVRVQEGEQ	IFQLHTLLAE	TPAGSLDTIC	SAPGSTVTQ	850
コンセンサス		
UNC5H2.a	851	LGPIYAFKIPL	SIRQKICNSL	DAPNSRGNDW	RMLAQKLSMD	RYLNYFATKA	900
UNC5H2.b	851	lgyafkipl	sirqkicnsl	dapnsgndw	rmlaqklsmd	rylnyfatka	900
UNC5H2.c	851	LGPIYAFKIPL	SIRQKICNSL	DAPNSRGNDW	RMLAQKLSMD	RYLNYFATKA	900
UNC5H2.d	851	LGPIYAFKIPL	SIRQKICNSL	DAPNSRGNDW	RMLAQKLSMD	RYLNYFATKA	900
コンセンサス		
UNC5H2.a	901	SPTGVILDLN	EALQDDGDL	NLSALALEM	GKSEMLVAVA	TDGDC	945
UNC5H2.b	901	sptgvildln	ealqddgd	nlsalaleem	gksmlvava	tdgdc	945
UNC5H2.c	901	SPTGVILDLN	EALQDDGDL	NLSALALEM	GKSEMLVAVA	TDGDC	945
UNC5H2.d	901	SPTGVILDLN	EALQDDGDL	NLSALALEM	GKSEMLVAVA	TDGDC	945
コンセンサス		

【図 1 - 2】

UNC5H2.a	401	RNCRDFETDI	TDSSAALGCG	FHPNFVKTAR	PSMQLLHPS	VEPDLTASAG	450
UNC5H2.b	401	rncrdfetdi	tdssaalggc	fhpnfktar	psmqllhps	vepdltasag	450
UNC5H2.c	401	RNCRDFETDI	TDSSAALGCG	FHPNFVKTAR	PSMQLLHPS	VEPDLTASAG	450
UNC5H2.d	401	RNCRDFETDI	TDSSAALGCG	FHPNFVKTAR	PSMQLLHPS	VEPDLTASAG	450
コンセンサス		
UNC5H2.a	451	IYRGPVYALQ	DSTDKIPMTN	SPILLDFEFL	KVYVSSSTT	GGGGLADGA	500
UNC5H2.b	451	iyrgpvyalq	dstdkimpnt	spilldfepl	kvvyssstt	ggggladga	500
UNC5H2.c	451	IYRGPVYALQ	DSTDKIPMTN	SPILLDFEFL	KVYVSSSTT	GGGGLADGA	500
UNC5H2.d	451	IYRGPVYALQ	DSTDKIPMTN	SPILLDFEFL	KVYVSSSTT	GGGGLADGA	500
コンセンサス		
UNC5H2.a	501	DLLGVLPFGT	YPSDFARDTH	FHLHRSASIG	SOQLLGLPRD	FGSSVSGFTG	550
UNC5H2.b	501	dllgvlpfgt	ypsdfardth	fhlhrsasig	soqllglprd	fgssvsgftg	550
UNC5H2.c	501	DLLGVLPFGT	YPSDFARDTH	FHLHRSASIG	SOQLLGLPRD	FGSSVSGFTG	550
UNC5H2.d	501	DLLGVLPFGT	YPSDFARDTH	FHLHRSASIG	SOQLLGLPRD	FGSSVSGFTG	550
コンセンサス		
UNC5H2.a	551	CLGRLSIFG	TGVSILVFPNG	ATPOGKPYEM	YLLINKAEST	LPLSEGTQV	600
UNC5H2.b	551	clgrlsifg	tgvsilvpng	atpogkpyem	yllinkaest	lplsegtqv	600
UNC5H2.c	551	CLGRLSIFG	TGVSILVFPNG	ATPOGKPYEM	YLLINKAEST	LPLSEGTQV	600
UNC5H2.d	551	CLGRLSIFG	TGVSILVFPNG	ATPOGKPYEM	YLLINKAEST	LPLSEGTQV	600
コンセンサス		
UNC5H2.a	601	LSPSVTCGPT	GLLRCRPVIL	TMPHCAEVA	RDWIFQIKTQ	AHQGHWEVV	650
UNC5H2.b	601	lpsvtcgpt	gllrcrpvil	tmphcaeVA	rdwifqiktq	ahqghwevv	650
UNC5H2.c	601	LSPSVTCGPT	GLLRCRPVIL	TMPHCAEVA	RDWIFQIKTQ	AHQGHWEVV	650
UNC5H2.d	601	LSPSVTCGPT	GLLRCRPVIL	TMPHCAEVA	RDWIFQIKTQ	AHQGHWEVV	650
コンセンサス		
UNC5H2.a	651	TLEESTLINTP	CYQCLEPRAC	HILLDQIGTY	VFTGSEYSRS	AVRKLQIAVF	700
UNC5H2.b	651	tleestlntp	cyqcleprac	hilldqigtY	vftgseyrsr	avrklqiavf	700
UNC5H2.c	651	TLEESTLINTP	CYQCLEPRAC	HILLDQIGTY	VFTGSEYSRS	AVRKLQIAVF	700
UNC5H2.d	651	TLEESTLINTP	CYQCLEPRAC	HILLDQIGTY	VFTGSEYSRS	AVRKLQIAVF	700
コンセンサス		
UNC5H2.a	701	APALCTSLRY	SIRVYCIEDT	PWALKEVLEL	ERTLGGYLV	EKPKLMEKDS	750
UNC5H2.b	701	apalctslry	sirvyciedt	pwalkevel	ertlgylyve	ekpklmekds	750
UNC5H2.c	701	APALCTSLRY	SIRVYCIEDT	PWALKEVLEL	ERTLGGYLV	EKPKLMEKDS	750
UNC5H2.d	701	APALCTSLRY	SIRVYCIEDT	PWALKEVLEL	ERTLGGYLV	EKPKLMEKDS	750
コンセンサス		

【図 2 - 1】

Figure 2. UNC5H2cのヌクレオチド配列と翻訳

1	agactggggc	caggagagaca	gcctcggggg	agagggcccc	gaaccagggc	ggcgagagcat
	UNC5H2c-CPI					
61	ggggggcccg	agcggaagctc	ggggcgctct	gctgtggcca	ctctctctct	gctggagacc
	m g a r	s g a r	g a l l	a l l l	c e w d	
121	gaggctgagc	caagcaggca	ctgattctgg	cagcagagtg	ctctccctct	ctctccctct
	p r l s	q a g t	d s g s e v	l p d s f s		
181	agcgccagca	gagccctctc	ctactctctc	gcagagagca	caggagcctc	actattggaa
	s a p a	e p l p y f	l q e p	q d a y i v		
241	gaacaagcct	gtggagctcc	gctgcgcgcg	ctctccccc	acaacagatc	acttcaagtg
	k n k p	v e l r	c r a f	a p a t	q i y f k	
301	caacggcgag	tggttgaccg	agaaagca	ctgacacag	gaagcctgag	atgagaccac
	c n g e	w s q n d	h v t c	g e g l d e		
361	cgggctggcg	gtgcgcgagg	tgcaatgca	gggtgcgcg	cagcagagtg	agagactctt
	t g l r	v r e v	q i e v s r	q q v e e l		
421	tgggctggag	gattactggt	gccagctgct	ggcctggagc	tcgcgggca	caaccagag
	f g l e	d y w c	q c v a w s	s a g t t k		
481	tcggcagacc	taegtccgca	tcgctactc	gcgcaagaac	ttcgatcagg	agcctctggg
	s r r a	y v r i	a y l r	k n f d	q e p l	
541	caagggagtg	ccctcgacc	atgagttct	ctcgcagtc	cgcccgcg	agggggtgcc
	g k e v	p l d h	e v l l	q c r p p e	g v	
601	tgtggccgag	gtggatggc	tcaagaatga	ggatgtcatt	gacccacc	aggaacacaa
	p v a e	v e w l	k n e d	v i d p t	q d t	
661	cttctgctc	accatgacc	acaactcat	catccggag	gcccgctgt	cgaacatgc
	n f l l	t i d h	n l i i	r q a r l	s d t	
721	caactatacc	tgctgggcca	agaactcgt	ggccaacgc	cgagcacc	ctgcaacctg
	a n y t	c v a k n i	v a k r	r s t t	a t	
781	catcgtctac	gtgaatggc	gctgtccag	ctgggcagag	tgctcaacct	gctccaaccg
	v i v y	v n g g	w s s w	a e w s p c	s n	
841	ctgtggccga	ggctggcaga	agcgaccgc	gacctgcacc	aacccctc	caactaacgg
	c g r g	w q k r t	r t c t	n p a p l n		
901	agggccttc	tgaggggccc	aggatccca	gaagaccgc	tgcaaccaca	ctgcccactg
	g g a f	c e g q a f	q k t a	c t t i	c p	
961	cgatggggcg	tgagcagagt	ggagcaagt	gtcaagctc	agcactgagt	gtgcccactg
	v d g a	w t e w s k	w s a c	s t e c a h		
1021	gctgagccgc	gagtcagtg	cgccccacc	ccagaacgga	ggcgtgact	gcagcgggac
	w r s r	e c m a	p p p q n g	g g c r d c	s g	
1081	gctgctcgac	tctaagaact	gcacagatgg	gctgtgcatg	caaaataaga	aaactctaa

【 図 3 - 2 】

```

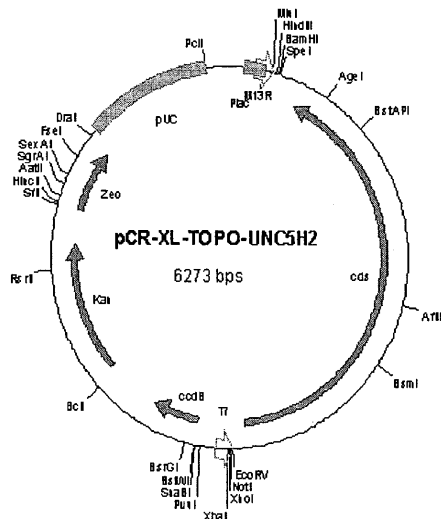
2221 gaggcacagc ttggcctcca cagagctcac ctgcaagatc tgcgtgcggc aagtgaagg
    e r h s l a s t e l t c k i c v r q v e
2281 ggaggccagc atattccagc tgcataccac tctggcagag acacctgctg gctccctgga
    g e g q i f q l h t t l a e t p a g s l
2341 cactctctgc tctgccctgc gcagcactgc caccaccagc ctggagcact atgctctoa
    d t l c s a p g s t v t t q l g p y a f
2401 gatccactgc tccatccgcc agaagatg caacagccta gatgcccaca actcaagggg
    k i p l s i r q k i c n s l d a p n s r
2461 caatgactgg cggatgttag cacagaagct ctctatggac cggctactga attactttgc
    g n d w r m l a q k l s m d r y l n y f
2521 caccaaacgc agcccacagc gtgtgactct ggaactctgg gaagctctgc agcaggacga
    a t k a s p t g v i l d i w e a l q q d
2581 tggggacctc aacagcctgg cgaigtccct ggaggagatg ggcaagatg agatctggt
    d g d l n s l a s a l e e m g k s e m l
2641 ggctgtggcc accagcgggc actgctgacc ctctgggac agcggcctgg caaggactgg
    v a v a t d g d c -
2701 caggagccag gtgcagggag gctctgggca gcctctgat ggggatgttt ggcc
    U N C S H 2 - C P 2

```

PCRプライマーの位置と方向 →

【 図 4 】

Figure 4. pCR-XL-TOPO-UNC5H2dの遺伝子地図



【 図 5 】

Figure 5. プライマーUNC5H2d-DP1とUNC5H2d-DP2を使用して増幅したUNC5H2d-6HIS PCR産物のヌクレオチド配列と翻訳

```

1  tataagcttg ccaccatgg ggcccggagc ggagctcggg gcgcctgct gctggcactg
    m g a r s g a r g a l l l a l
    U N C S H 2 - D P 1
61  ctgctctgct gggaccgag gctgagccaa gcaagcactg attctggcag cggagtgtc
    l l c w d p r l s q a g t d s g s e v l
121  cctgactctc tcccctcagc gccagcagag cgcctgccct actctctgca ggagccacag
    p d s f p s a p a e c p l p y f l q e p q
181  gacgcctaca ttgtgaagaa caagcctgtg gagctcctc gccgcgctt ccccgccaca
    d a y i v k n k p v e l r c r a f p a t
241  cagatctact tcaagtcaa cggcagatgg gtcagccaga acgaccactc cacacagaa
    q i y f k c n g e w v s q n d h v t q e
301  ggctctggat aggcaccggy cctgcgggtg cgcagagctc agatcgaggt gtcgcygag
    g l d e a t g l r v r e v q i e v s r q
361  caggtggagg agctcttttg gctgagagat tactgtgtcc agtgcgtggc ctggagctcc
    q v e e l f g l e d y w c q c v a w s s
421  gwagccacca ccaagagctg ccgagctcac gtcgcgatcg cctactctgc caagaactc
    a g t t k s r r a y v r i a y l r k n f
481  gatcaggacc ctctgggcaa ggaagtgccc ctggaacatg agyttctct cagtgctgcc
    d q e p l g k e v p l d h e v l l q c r
541  ccgcccggag gggtgctctg ggcccagatg gaatgctca agaattgaga tgcactcagc
    p p e g v p v a e v e w l k n e d v i d
601  cccaccaggy acaccaactc cctgctcaec atcgaccaca acctcatcat ccgcccagcc
    p t q d t n f i l l t i d h n l i i r q a
661  cgcctgtggc acactgcaa ctatactcgc gtggccaaga acatcgtggc caaacgcgg
    r l s d t a n y t c v a k n i v a k r r
721  agcaccactg ccaccgtcat cgtctactg aatggcggct ggtccagctg gpcagagtg
    s t t a t v i v y n g g w s s w a e w
781  tcacctctgc ccaactgctc tggccagcgc tggcagaagc gcacccagc ctgaccacag
    s p c s n r c g r g w q k r t r t c t c n
841  cccgctccac tcaacggagg gccctctctg gaggccagc cattccagaa gaccgcctgc
    p a p l n g g a f c e g q a f q k t a c
901  accaccatct gccacgtcga tgggcctgtg acggagtgga gcaagtgttc agcctgcagc
    t t i c p v d g a w t e w s k w s a c s
961  actgagtgcc cccactggcg tagccgcgag tgcactggcg ccccaccca gaacggagc
    t e c a h w r s r e c m a p p p q n g g

```

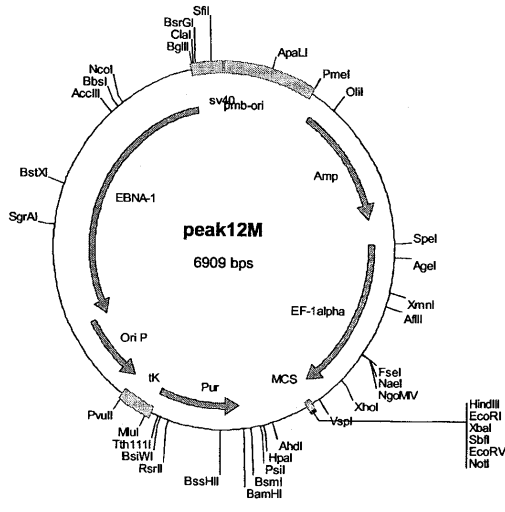
```

1021  cgtgactgca ggggacgct gctgactct sagsactgca cagatggctc gtgcagtaa
    r d c s g t l l d s k n c t d g l c a q
1081  agcaaccgca agctctcaca cccctctgtg cctctgacc tgcagccagc cgcggcctc
    a n p q l l h p a v p p d l t a s a g l
1141  taccggagac ccgtgtatgc cctgcagagc tccaccgaca aaatcccact gaccactct
    y r g p v y a l q d s t d k i p m t n s
1201  cctctgtggy acccttaac cagcttaag gtaagctct acagctcag caccagggc
    p l l d p l p s l k v k v y s s s t t g
1261  tctggccagc gctggcaga tgggctgac ctctggggg tctggcgc tggcaccac
    s g p g l a d g a d l l g v l p p g t y
1321  cctagagatt tggccggaga caaccacttc ctgcaactgc gaagccagc cctgcttc
    p s d f a r d t h f l h l r s a a l g s
1381  cagcagctct tggcctgccc ccgagaccca gggagcagcg tcaaggacc cttggctgc
    q l l g l p r d p g a s v s g t f g c
1441  ctgggtggga ggtcagact cccggcaca gggctcagct tctctgctc caatggagc
    l g g r l s i p g t g v s l i v p n g a
1501  attccccaga gcaattcta agagatgat ctactatca acagccaga aagtaacct
    i p q g k f y e m y l l i n k a e s t l
1561  ccgcttccag aaggaccaca cagatattg agccctcgg tgaactgtg acccaacgg
    p l s e g t q t v l s p s v t c g p t g
1621  cctctgtgct gcccgcctc cactctcaac atgcccaact gtcgcaagc cagtgccct
    l i l c r p v i l t m p h c a e v s a r
1681  gactgattct tcaactcaa gaaccagccc caccagggc actggagga gytgtacc
    d w l f q l k t q a h q g h w e e v t
1741  ctggatgag agacctgaa caacctctgc tactgcagc tgaagccag gctctgca
    l d e e t l n t p c y c q l e p r a c h
1801  atcctgtggy accagctgg cactactgt tcaagggg agtctatc ccctcaga
    l l l d q l g t y v f t g e s y s r s a
1861  gtaagcggc tcaagctgag cgtctctgca ccgcctctc gcaactcct ggaatcagc
    v k r l q l a v f a p a l c t a l e y s
1921  ctccggctct actgctgga gcaacgctct gtagactga agagagctc agactgag
    l r v y c l e d t p v a l k e v l e l e
1981  cggactctgg cggatctt ggtggagag ccgaaccgc taatgtcaa gacagttac
    r t l g g y l v e e p k p l m f k d e y
2041  caaacctgca gctctcctc ccatgactc cccatgccc attgagagc caagctgtg
    h n l r l s l h d l p h a h w s s k l l
2101  gccaatacc aggatctcc cttctatcc attgagagc gaaagccga gccctccac
    a k y q e i p f y h i w s g s q k a l h
2161  tgaacttca cctggagag gcaagctgt gctccaagc agctcactg caagatgctc
    c t f t l e r h s l a s t e l t c k i c
2221  gtcggcagc tgaagagga gggccagata ttcactgctc ataccctct gcaagaca
    v r q v e g e g q i f q l h t t l a e t
2281  cctgtgctc cctggacc tctctgctc gccctggca gcactgac caccagctgc
    p a g s l d t l c s a p g s t v t t q l
2341  ggaactgtg cctcaagat ccaactgctc atcccgaga agatgtcaa cagctagat
    g p y a f k i p l s i r q k i c n s l d
2401  gcccccactc caaggggaaa tgactgggg atgttagac agaactctc tatgaccgc
    a p n s r g n d w r m l a q k l s m d r
2461  tactgaatt actttgacc caaagagag ccaagggg tgaactgga cctctggaa
    y l n y f a t k a s p t g v i l d l w a
2521  gctctcagc agcagatgg ggaactaac agctcgoga gtccttga ggaatggc
    a l q q d d g d l n s l a s a l e e m g
2581  aagatgaga tctggtgctc tctggcacc gaagggact gcaacctca ccaactcact
    k s e m l v a v t d g d c h h h h h h
2641  tgaattca t
    U N C S H 2 - D P 2

```

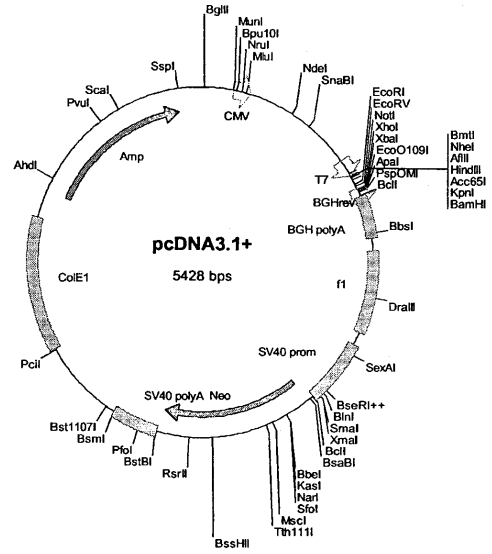
【 図 6 】

Figure 6. pEAK12Mの遺伝子地図



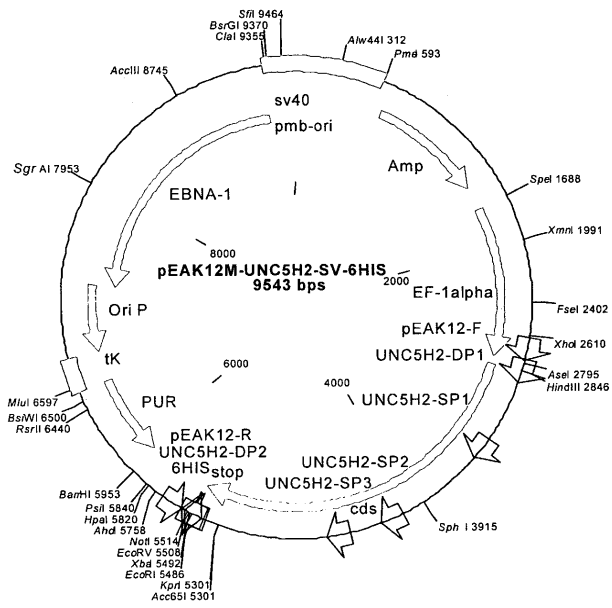
【 図 7 】

Figure 7. pcDNA3.1の遺伝子地図



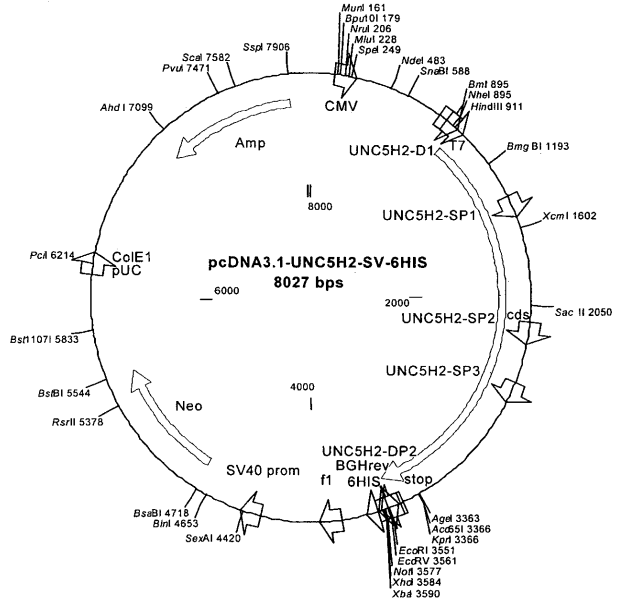
【 図 8 】

Figure 8. pEAK12M-UNC5H2d-6HISの遺伝子地図



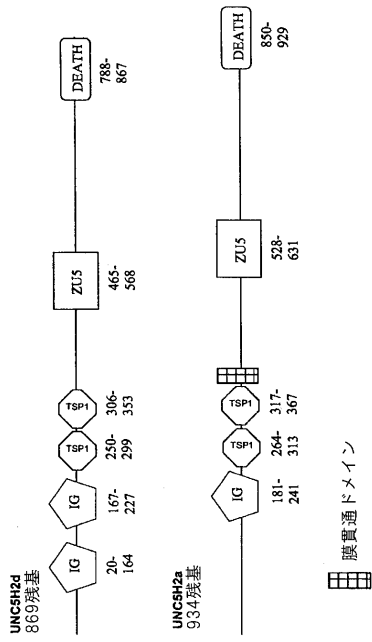
【 図 9 】

Figure 9. pcDNA3.1-UNC5H2d-6HISの遺伝子地図



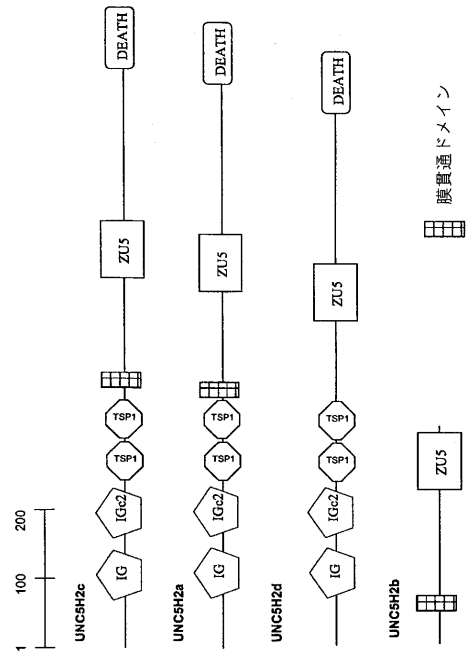
【 図 1 0 】

Figure 10. UNC5H2dとUNC5H2aのPfamドメインのアライメント



【 図 1 1 】

Figure 11. UNC5H2c、UNC5H2a、UNC5H2d、及びUNC5HbのSMARTドメインのアライメント



【 配列表 】

2008509655000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP2005/052573
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/71 C07K14/705 C12N15/00 C12N15/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL genomic DNA, 2532 bp 13 December 2003 (2003-12-13), XP002297115 retrieved from EBI Database accession no. AY411747 the whole document	1-12, 14, 22, 23, 26-29, 31-41
X	WO 03/080640 A (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH; LICENTIA, LTD; ALITALO, KARI; MA) 2 October 2003 (2003-10-02) claims 22,23; sequences 24, 39	1-12, 14, 16, 22, 23, 26-29, 31-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 August 2005		Date of mailing of the international search report 22/08/2005
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 Bladier, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/052573

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/042661 A (EOS BIOTECHNOLOGY, INC; AFAR, DANIEL; AZIZ, NATASHA; GINSBURG, WENDY,) 22 May 2003 (2003-05-22) claim 8; sequence C177 -----	1-12,14, 22,23, 26-29, 31-44
X	WO 02/068579 A (PE CORPORATION (NY)) 6 September 2002 (2002-09-06) Sequence 7311 -----	1-12,14, 22-24, 26-29, 31-44
X	WO 01/40466 A (STEWART TIMOTHY A; BAKER KEVIN P (US); DEFORGE LAURA (US); DESNOYE) 7 June 2001 (2001-06-07) claims 2,3 sequence 145 -----	1-12,14, 22,23, 26-29, 31-44
X	DATABASE EMBL 'Online! 3770 nt 7 November 2002 (2002-11-07), "Homo sapiens transmembrane receptor UNC5H2 mRNA, complete cds." XP002339762 retrieved from EBI Database accession no. AY126437 cited in the application the whole document -----	13,15, 17-19, 24,30
A	LLAMBI F. ET AL.: "Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 11, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 2715-2722, XP002255752 ISSN: 0261-4189 the whole document -----	
A	DATABASE SWALL 'Online! 1 October 2002 (2002-10-01), "Hypothetical protein FLJ37276" XP002255753 retrieved from EBI Database accession no. Q8N1Y2 the whole document -----	
A	WO 02/057450 A (MILLET ISABELLE; MACDOUGALL JOHN R; CURAGEN CORP (US); EDINGER SHLOMI) 25 July 2002 (2002-07-25) claim 1 sequence 2 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/052573**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 24 and 39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 20, 21, 25 (fully); 41 (partially)
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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 24 and 39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 20, 21, 25 (fully); 41 (partially)

Claims 20, 21, 25 and 41 refer to a binding agent of the polypeptide of claims 13-19 without giving a true technical characterization. Moreover, no such specific compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims are ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims which wording is, in fact, a mere recitation of the result to be achieved.

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/052573

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03080640	A	02-10-2003	AU 2003217966 A1	08-10-2003
			CA 2478063 A1	02-10-2003
			EP 1487857 A1	22-12-2004
			WO 03080640 A1	02-10-2003
WO 03042661	A	22-05-2003	CA 2438030 A1	10-10-2002
			CA 2444691 A1	31-10-2002
			CA 2451465 A1	27-12-2002
			CA 2453098 A1	16-01-2003
			CA 2459219 A1	27-03-2003
			CA 2467433 A1	22-05-2003
			EP 1418943 A1	19-05-2004
			EP 1463928 A2	06-10-2004
			EP 1408811 A2	21-04-2004
			EP 1517998 A2	30-03-2005
			EP 1434881 A2	07-07-2004
			EP 1497454 A2	19-01-2005
			JP 2004531249 T	14-10-2004
			JP 2005508144 T	31-03-2005
			JP 2005514908 T	26-05-2005
			JP 2005518782 T	30-06-2005
			MX PA04000080 A	21-05-2004
			WO 02079492 A2	10-10-2002
			WO 02086443 A2	31-10-2002
			WO 02098358 A2	12-12-2002
			WO 02102235 A2	27-12-2002
			WO 03003906 A2	16-01-2003
			WO 03025138 A2	27-03-2003
WO 03042661 A2	22-05-2003			
US 2004005563 A1	08-01-2004			
US 2004076955 A1	22-04-2004			
US 2003124579 A1	03-07-2003			
US 2003232350 A1	18-12-2003			
WO 02068579	A	06-09-2002	WO 02068579 A2	06-09-2002
WO 0140466	A	07-06-2001	AU 2055401 A	12-06-2001
			AU 2192800 A	12-07-2000
			AU 2474700 A	19-06-2000
			AU 756400 B2	09-01-2003
			AU 2879400 A	31-07-2001
			AU 3514400 A	28-09-2000
			AU 3774300 A	18-12-2000
			AU 5152700 A	02-01-2001
			AU 6391000 A	19-02-2001
			CA 2347677 A1	08-06-2000
			CA 2353775 A1	29-06-2000
			CA 2362427 A1	14-09-2000
			CA 2365610 A1	26-07-2001
			CA 2372511 A1	21-12-2000
			CA 2383254 A1	07-12-2000
			CA 2391455 A1	07-06-2001
			CA 2479476 A1	26-07-2001
			CA 2479494 A1	26-07-2001
			CA 2479498 A1	26-07-2001
			CA 2479511 A1	26-07-2001
CA 2490853 A1	07-06-2001			
CA 2490909 A1	07-06-2001			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/052573

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0140466	A	CA 2491258 A1	07-06-2001	
		CA 2491433 A1	07-06-2001	
		CA 2491610 A1	07-06-2001	
		CA 2492049 A1	07-06-2001	
		CA 2492070 A1	07-06-2001	
		CA 2494705 A1	07-06-2001	
		CA 2496312 A1	07-06-2001	
		EP 1173563 A1	23-01-2002	
		EP 1220905 A2	10-07-2002	
		EP 1210418 A1	05-06-2002	
		EP 1208195 A2	29-05-2002	
		EP 1250426 A2	23-10-2002	
		EP 1141289 A2	10-10-2001	
		EP 1135495 A2	26-09-2001	
		JP 2003524387 T	19-08-2003	
		JP 2003524390 T	19-08-2003	
		JP 2004516227 T	03-06-2004	
		JP 2004522402 T	29-07-2004	
		JP 2003529324 T	07-10-2003	
		JP 2004522404 T	29-07-2004	
		JP 2004520003 T	08-07-2004	
		JP 2004203742 A	22-07-2004	
		JP 2004201652 A	22-07-2004	
		JP 2004201653 A	22-07-2004	
		JP 2004229503 A	19-08-2004	
JP 2004201654 A	22-07-2004			
WO 02057450	A	25-07-2002	AU 3097602 A	11-06-2002
			WO 0244211 A2	06-06-2002
			WO 02057450 A2	25-07-2002
			US 2004029222 A1	12-02-2004
			US 2003195149 A1	16-10-2003
			US 2004029116 A1	12-02-2004

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 4		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 C 0 8 5		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z	4 C 0 8 7		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 H 0 4 5		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00				
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18				
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C			
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02				
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N			
A 6 1 K	35/12	(2006.01)	A 6 1 K	48/00				
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/12				
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00				
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00				
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	7/00				
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/12				
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1			
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10				
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/06				
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06				
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02				
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	7/04				
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	7/02				
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	A 6 1 P	31/18				
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D			
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z			
			G 0 1 N	33/50	Z			
			G 0 1 N	33/68				

(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, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(72)発明者 パワー, クリスティン

フランス国, エフ - 0 1 7 1 0 トワリー, リュ デ ジョンキーユ, 1 0

(72)発明者 ヨーク - スミス, メラニー

スイス国, セアッシュ - 1 2 3 2 コンフィニョン, シュマン ドゥ ビュイロネ 2 0 アー

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA36 DA37 FB03

4B024 AA01 AA11 AA20 BA44 BA53 BA80 CA04 CA07 CA20 DA02

EA04 GA03 GA11 HA11 HA20

4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79 QQ89

QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR55 QR56 QR62

专利名称(译)	UNC 5 H 2的拼接变体		
公开(公告)号	JP2008509655A	公开(公告)日	2008-04-03
申请号	JP2007513969	申请日	2005-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	应用研究系统ARS股份公司		
申请(专利权)人(译)	应用研究系统代理伯爵S.控股Namuroze奋笔记本闭嘴		
[标]发明人	パワークリスティン ヨークスミスメラニー		
发明人	パワー,クリスティン ヨーク-スミス,メラニー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/68 C12P21/02 C07K19/00 C07K16/18 C12N15/02 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K35/12 A61P35/00 A61P9 /00 A61P7/00 A61P9/12 A61P9/10 A61P9/06 A61P7/06 A61P35/02 A61P7/04 A61P7/02 A61P31/18 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/68 C07K14/705 C07K14/71		
CPC分类号	C07K14/71		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.Z C12P21/02.C C07K19/00 C07K16/18 C12N15/00.C A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48 /00 A61K35/12 A61P35/00 A61P9/00 A61P7/00 A61P9/12 A61P9/10.101 A61P9/10 A61P9/06 A61P7 /06 A61P35/02 A61P7/04 A61P7/02 A61P31/18 G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045 /FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024 /HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063 /QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063 /QX02 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065 /CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA432 4C084 /ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084 /ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/EE05 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BB63 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA43 4C087/ZA45 4C087 /ZA51 4C087/ZA53 4C087/ZA54 4C087/ZA55 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045 /EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一		
优先权	2004102511 2004-06-04 EP		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明中，一个UNC5H2d UNC5H2剪接变体多肽和核酸分子编码相同。本发明是一种用于生产UNC5H2d多肽，载体，宿主细胞的选择性结合剂，以及还提供了方法。另外，本发明有关的疾病UNC5H2d多肽，病症和医疗诊断，治疗还提供了缓解，和/或方法和药物组合物用于预防。

アミノ酸	同義基	より好ましい同義基
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