

(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2009-525730

(P2009-525730A)

(43) 公表日 平成21年7月16日 (2009.7.16)

(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 4 O B 40/06 (2006.01)	C 4 O B 40/06	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 175 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-553592 (P2008-553592)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月13日 (2007.2.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月8日 (2008.10.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2007/000210
 (87) 国際公開番号 W02007/093042
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)
 (31) 優先権主張番号 60/772,585
 (32) 優先日 平成18年2月13日 (2006.2.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/816,858
 (32) 優先日 平成18年6月28日 (2006.6.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

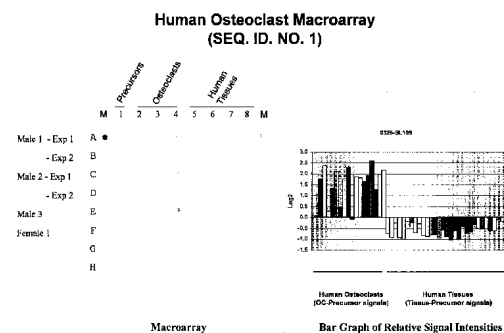
(71) 出願人 507196491
 アレシア・バイオセラピューティクス・インコーポレーテッド
 カナダ・H 2 X・1 Y 4・ケベック・モン
 トリオール・SB-5100・アヴニユ・
 プレジダン・ケネディ・141
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨リモデリングのプロセスと関係があるポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列

(57) 【要約】

本発明は部分的に、骨リモデリングのプロセスと関係がある特有かつ新たに同定した遺伝的ポリヌクレオチド; そのポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変異体および誘導体; ポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の使用; ならびに骨リモデリング障害によって引き起こされる症状を改善するための方法および組成物に関する。特に開示するのは、破骨活性と関係があるポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の単離および同定、同定したポリヌクレオチドの治療用標的としてのそれらの能力の確認、ならびに病状の改善および研究目的でのポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の使用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される単離ポリヌクレオチドであって、

- a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、
 - b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、
 - c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、
 - f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および
 - g) a)～f)のいずれか1つの断片
- からなる群から選択される1種を含む単離ポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

前記実質的に同一であるポリヌクレオチドが配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの変異体である、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記実質的に同一であるポリヌクレオチドが単離した非ヒトオルソログである、請求項1または2に記載の単離ポリヌクレオチド。

20

【請求項 4】

前記非ヒトオルソログが配列番号35を含む、請求項3に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記断片が、配列番号1～33、85または86のいずれか1つの核酸配列と実質的に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記断片が配列番号42～45のいずれか1つからなる群から選択される、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

RNA分子である、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

30

【請求項 8】

DNA分子である、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項7または8のいずれか一項に記載のDNAまたはRNA分子を含むベクター。

【請求項 10】

発現ベクターである、請求項9に記載のベクター。

【請求項 11】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現されるポリヌクレオチド配列のライブラリーであって、

40

- a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、
- b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、
- c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、
- d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、
- e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、
- f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および
- g) a)～f)のいずれか1つの断片

50

からなる群から選択される少なくとも1種を含むライブラリー。

【請求項12】

請求項11に記載のポリヌクレオチドのライブラリーを含む発現ライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドのそれぞれが発現ベクター内に含まれる発現ライブラリー。

【請求項13】

請求項11に記載のポリヌクレオチド配列のライブラリーを含むアレイ。

【請求項14】

骨疾患を予防するための医薬組成物であって、

a) 請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドおよび

b) 薬剤として許容される担体

を含む医薬組成物。

【請求項15】

それを必要とする哺乳動物における骨疾患を予防するための方法であって、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドまたは請求項14に記載の医薬組成物を前記哺乳動物に投与するステップを含む方法。

【請求項16】

前記哺乳動物が、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストーシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害からなる群から選択される状態に罹患している、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

骨疾患を治療するための医薬品を調製するための、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドの使用。

【請求項18】

a) 請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドおよび

b) 薬剤として許容される担体

を含む医薬組成物。

【請求項19】

骨疾患の診断における、

a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、

e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、

g) a)～f)のいずれか1つの断片および、

h) a)～g)のいずれか1つを含むライブラリー

からなる群から選択される少なくとも1つのポリヌクレオチドの使用。

【請求項20】

骨リモデリングと関連がある状態を診断するためのキットであって、配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つと実質的に相補的である少なくとも1つの配列、配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム、およびそれら断片を含むキット。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される単離ポリペプチド配列であって、単離ポリペプチドが、

a) 配列番号48～80のいずれか1つ、

b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、

c) a) または b) のいずれか1つの生物活性断片、

d) a) または b) のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む、単離ポリペプチド配列。

【請求項 2 2】

前記生物活性類似体が、前記配列中に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、請求項21に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 2 3】

請求項21または22のいずれか一項に記載のポリペプチドおよび薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 2 4】

骨疾患を治療するための医薬品を調製するための、請求項21または22に記載の単離ポリペプチドの使用。

【請求項 2 5】

それを必要とする個体における骨疾患を治療するための方法であって、配列番号48～80または配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの活性または発現を妨害することができる化合物を投与するステップを含む方法。

【請求項 2 6】

前記哺乳動物が、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストーシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害からなる群から選択される状態に罹患している、請求項25に記載の方法。

【請求項 2 7】

配列番号48～80または配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの機能または発現を損なうことができる阻害化合物を同定するための方法であって、前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させるステップ、および前記ポリペプチドの機能または発現を測定するステップを含み、それにより前記ポリペプチドの機能または活性の低下によって適切な阻害化合物が明確に同定される方法。

【請求項 2 8】

前記損われる機能または活性が、破骨細胞の分化を促進する前記ポリペプチドの低下した能力と関係がある、請求項27に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記破骨細胞の分化が誘導される、請求項28に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記細胞が前記ポリペプチドを自然に発現しない、また自然に発現されるポリペプチド類似体の発現が抑制される、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 3 1】

外因性型の請求項1から8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項21もしくは22のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現する細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

骨細胞である、請求項31に記載の細胞。

【請求項 3 3】

破骨細胞である、請求項32に記載の細胞。

【請求項 3 4】

a) 配列番号48～80のいずれか1つを含む、またはそれからなるポリペプチド、および

b) 配列番号1～33もしくは配列番号85もしくは86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片

からなる群から選択されるポリペプチド配列を含むポリペプチドと特異的に結合することができる、単離または精製抗体およびその抗原結合断片。

10

【請求項 3 5】

配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド配列を含むポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片と特異的に結合することができる、請求項35に記載の抗体。

【請求項 3 6】

a) 配列番号48～80のいずれか1つを含む、またはそれからなるポリペプチド、および

b) 配列番号1～33または配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片

からなる群から選択されるポリペプチドと特異的に結合することができる抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

20

【請求項 3 7】

請求項34または35のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

【請求項 3 8】

a) 配列番号48～80のいずれか1つを含む、またはそれからなるポリペプチド、および

b) 配列番号1～33もしくは配列番号85もしくは86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片

からなる群から選択されるポリペプチドの免疫原性断片で非ヒト動物を免疫処置するステップを含む、抗体を作製する方法。

【請求項 3 9】

前記ポリペプチドが配列番号85または86のいずれか1つによってコードされている、請求項38に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

ポリペプチドと特異的に結合する抗体を検出するための、請求項21または22に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 4 1】

請求項21または22に記載の少なくとも1つのポリペプチドと特異的に結合する抗体を検出するためのイムノアッセイであって、

a) 哺乳動物由来の生物体液サンプルのサンプルを前記ポリペプチドと接触させるステップ、および

b) 前記サンプル中のポリペプチドと抗体の免疫複合体の形成を検出するステップを含むイムノアッセイ。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は部分的に、骨リモデリングのプロセスと関係がある特有の新たに同定した遺伝的ポリヌクレオチド;そのポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変異体および誘導体;ポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の使用;骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴー

50

シェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病(ビタミンD依存性、タイプIおよびII、およびX染色体関連低ホスファターゼ症くる病を含む)、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストーシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害だけには限られないが、これらを含めた骨リモデリング障害によって引き起こされる症状を改善するための方法および組成物に関する。

【0002】

詳細には本発明は、活性破骨細胞のポリヌクレオチド発現プロファイル、破骨活性と関係があるポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の単離および同定、同定したポリヌクレオチドの治療用標的としてのそれらの能力の確認、および病状の改善および研究目的、ならびに病状または病状が発症する素因の診断におけるポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

骨は、骨およびヒト身体のミネラルの恒常性の構造的、機械的および生化学的完全性の持続を必要とする機能的に異なる細胞集団からなる動的結合組織である。関連する主な細胞型には、骨形成および骨質量の維持を担う骨芽細胞、および骨吸収を担う破骨細胞がある。骨芽細胞および破骨細胞は、骨リモデリングと呼ばれる動的プロセスにおいて働く。これらの細胞のそれらの先祖からの発生および増殖は、骨のミクロ環境中で生成される増殖因子およびサイトカインのネットワーク、ならびに全身性ホルモンによって支配されている。骨リモデリングは個体の生存期間中続き、健康な骨組織およびミネラルの恒常性の維持に必要不可欠である。このプロセスは大部分が平衡状態であり、全身性ホルモン、ペプチドおよび下流シグナル経路のタンパク質、局所の転写因子、サイトカイン、増殖因子およびマトリクスリモデリング遺伝子の複雑な相互作用によって支配されている。

【0004】

骨リモデリングプロセスにおいて生じる任意の干渉または不均衡によって骨疾患が生じる可能性があり、最も一般的な骨障害は骨質量の実際の減少によって特徴付けられる。この骨質量の減少の主な原因は、破骨細胞数および/または活性の増大である。最も一般的なこのような疾患、およびおそらく最もよく知られているのは、特に更年期の発症後の女性において生じる骨粗しょう症である。実際骨粗しょう症は、中年後期および老年女性における骨格破壊の最も重大な根本の原因である。エストロゲンの欠乏は閉経後の骨粗しょう症の要因として強く示されてきているが、Frostによって40年より前に最初に記載されたように(Frost H.M.1964)、リモデリングは局所的に制御されているプロセスであり、骨格中の離散した塊において生じるという長期にわたる証拠が存在する。

【0005】

骨リモデリングは離散した塊において生じるので、局所で生成されるホルモンおよび酵素は、骨吸収の開始および正常なリモデリングプロセスのために全身性ホルモンより重要である可能性がある。このような局所の制御は、骨芽細胞および破骨細胞によってそれらが作用するミクロ環境において媒介される。例えば、破骨細胞は骨マトリクスと結合し、波状境界周囲のアクチン環により形成される密封帯によって境界が画される骨表面と、それらの間に別の区画を形成する。多数の小胞が酵素を骨マトリクスに運び、部分的に消化された骨マトリクスに内面化させる。密封帯内のミクロ環境にはリソソーム酵素が多量に存在し、身体の正常な生理的pHと比較して非常に酸性である。波状境界膜はいずれも破骨細胞の分化を担うRANK、RANKLの受容体、およびマクロファージ-コロニー刺激因子(M-CSF)受容体、ならびに破骨細胞を早急に不活性状態にすることができるカルシトニン受容体も発現する(Baron、R.2003)。

【0006】

依然として完全には理解されていない複雑な型の阻害および刺激では、成長ホルモン、インスリン様増殖因子-1、性ステロイド、甲状腺ホルモン、PTHおよびプロスタグランジ

10

20

30

40

50

ンE2などのカルシウム要求性ホルモン、さまざまなサイトカイン、インターロイキン-1 β 、インターロイキン-6、および腫瘍壊死因子 α 、および1,25-ジヒドロキシビタミンD(カルシトリオール)は、骨リモデリングプロセスにおいて調和的に作用する(Jilkaら、1992 ; Poliら、1994 ; Srivastavaら、1998 ; de Vemejoul 1996)。

【0007】

したがって、これらの特化細胞によって生じる特有の局所環境は、他の組織中および/または他の組織中で発現されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドのスプライス変異体中で発現されない、いずれか特有の遺伝子配列の発現によるものであると理由付けることは妥当である。破骨活性に特異的なポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびにその変異体および誘導体の単離および同定は、リモデリングプロセスの明確に理解を可能にし、骨

10

【0008】

骨リモデリングと関連がある多くの疾患はあまり理解されておらず、一般に治療不能であるか、あるいは限られた程度でのみ治療可能である。例えば、骨関節炎を治療することは難しい、何故なら、痛みを軽減し冒された関節が変形状態になるのを防ぐことに関する、治療法および治療焦点は存在しないからである。非ステロイド抗炎症薬(NSAID)を一般に使用して、痛みを軽減する。

【0009】

他の例は、米国における使用に関してFDAにより承認されている現在の唯一の薬剤が骨の破壊を予防する抗吸収薬である、骨粗しょう症である。エストロゲン補充療法剤は抗吸収薬の一例である。他の例にはアレンドロネート(Fosamax-ビスホスホネート抗吸収薬)、リセドロネート(Actonel-ビスホスホネート抗吸収薬)、ラロキシフェン(Evista-選択的エストロゲン受容体調節物質(SERM))、カルシトニン(Calcimar-ホルモン)、および副甲状腺ホルモン/テリパラチド(Forteo-カルシウム代謝の制御を手助けするヒトホルモン、副甲状腺ホルモンの合成型)がある。

20

【0010】

アレンドロネートおよびリセドロネートなどのビスホスホネートは骨の表面に常に結合し、破骨活性に干渉する。これによって骨芽細胞の再吸収率を増大させることが可能である。最も一般的な副作用は悪心、腹部痛および緩い腸運動である。しかしながらアレンドロネートは、食道の過敏症および炎症、および幾つかの場合、食道の潰瘍を引き起こすことも報告されている。リセドロネートはアレンドロネートと化学的に異なり、食道の過敏症を引き起こす可能性が低い。しかしながら、幾つかの食品、カルシウム、鉄サプリメント、ビタミンおよびミネラル、またはカルシウム、マグネシウム、またはアルミニウムを含む酸中和剤はリセドロネートの吸収を低下させ、これによって有効性の消失をもたらす可能性がある。

30

【0011】

ラロキシフェンおよび他のSERMs(タモキシフェンなど)の、最も一般的な副作用は顔面潮紅である。しかしながら、ラロキシフェンおよび他のホルモン補充療法剤は、深部静脈血栓症および肺塞栓症を含めた凝血、心臓血管疾患および癌の危険を増大させることが示されてきている。

40

【0012】

カルシトニンは、骨密度の増大および骨の強化において、エストロゲンおよび他の抗吸収薬ほど有効ではない。注射用または鼻腔スプレー用カルシトニンの一般的な副作用は、悪心および潮紅である。患者は鼻過敏症、鼻水、または鼻血を発症する可能性がある。注射用カルシトニンは、注射部位における局所的な皮膚の発赤、皮膚の発疹、および潮紅を引き起こす可能性がある。

【0013】

骨リモデリングに関する幾つかの障害または病状間の関連を例証する状況は、パジェット病を治療するためにFDAによって最初に承認されたエチドロネート(ジドロネル)を使用

50

する状況である。パジェット病は、無秩序かつ加速的な骨のリモデリングによって特徴付けられる骨疾患であり、骨の弱化および痛みをもたらす。ジドロネルは「オフラベル」で使用されてきており、かつ幾つかの試験では、確定した骨粗しょう症を有する閉経後の女性の骨密度を増大させることが示されている。ジドロネルは、長期のステロイド療法(プレドニソンまたはコルチゾンなど)を必要とする患者の、骨の消失を予防する際に有効であることも見出されてきている。しかしながら、高用量のジドロネルまたはその連続的使用は、骨軟化症と呼ばれる他の骨疾患を引き起こす可能性がある。骨粗しょう症と同様に、骨軟化症は骨折の危険性が高い弱い骨をもたらす可能性がある。骨軟化症に関する懸念、および骨折率の低下に関する研究が依然として不十分であるために、米国FDAはジドロネルを骨粗しょう症の治療用に承認していない。

10

【0014】

骨粗しょう症療法は、骨の消失率を低下させる抗吸収薬に主に焦点を合わせてきているが、新興療法は単に骨を維持するかあるいはその劣化を遅らせる代わりに、骨のミネラル密度を増大させる際に有望性を示す。骨粗しょう症初期段階用のパイプライン化合物は、新しい治療クラスの薬剤候補、特にカテプシンK阻害剤、オステオプロテゲリンおよびカルシウム受容体アンタゴニストならびに新規のビスホスホネートから主になる。これらの幾つかは、骨の生物学の深い理解に基づきゲノムプログラムを利用して新規の薬剤を開発している例であり、これらは長期間の骨障害の治療の様相を変える可能性を有する。

【特許文献1】米国特許第5,712,127号

【特許文献2】米国特許出願第11/000,958号

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、骨のリモデリングプロセスをさらに理解して、骨のリモデリングおよび関連障害の療法の診断、予後、治療、予防および評価に有用である新たな組成物を提供する必要性が依然として存在する。ポリヌクレオチドの発現パターンを分析するための方法が開発されてきており、これを適用して骨のリモデリングと特に関係があるポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体を同定する。

【0016】

本発明は、これらおよび他の必要性に見合うよう努める。

30

【0017】

本発明の記載は幾つかの文書を参照し、その内容は参照によりその全容を本明細書に組み込む。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、骨リモデリングのプロセスと関係がある配列、そのような配列のオープンリーディングフレーム、実質的に同一である配列(例えば、変異体(例えば、対立遺伝子変異体)、非ヒトオルソログ)、実質的に相補的である配列および前述のいずれか1つの断片を含むポリヌクレオチドに関する。

【0019】

本発明は、その生物活性類似体および生物活性断片を含めた、骨リモデリングのプロセスと関係がある配列を含むポリペプチドに関する。本発明はさらに、骨のリモデリングおよび関連障害の療法の診断、予後、治療、予防および/または評価に有用である組成物に関する。

40

【0020】

さらに本発明は、ポリヌクレオチドの発現パターンを分析するための方法に関するものであり、骨のリモデリングと特に関係があるポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の同定においてこれを適用する。

【0021】

本発明は、破骨細胞のポリヌクレオチド発現プロファイル、破骨活性と関係があるポリ

50

ヌクレオチド、その対応するポリペプチド、変異体および誘導体の単離および同定、治療用標的としてのそれらの能力に関するこれらの同定した要素の確認、ならびに病状を改善するための前記ポリヌクレオチド、ポリペプチド、変異体および誘導体の使用に関する。

【0022】

本発明の目的は、単離および同定されているポリヌクレオチドおよび/または関連ポリペプチドを提供することである。より詳細には、本発明は、破骨細胞において非常に特異的な形式で上方制御されることが示されている、配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つ、それらのコード配列(オープンリーディングフレーム)実質的に同一である配列(例えば、変異体、オルソログ(例えば、配列番号35))、実質的に相補的である配列、および配列番号48~80のいずれか1つを含む関連ポリペプチド、および配列番号85または配列番号86によってコードされているポリペプチドを含むかあるいはそれらからなる、(単離または実質的に精製された)ポリヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、ポリペプチド類似体、変異体(例えば、配列番号81)およびそれらの断片に関する。

【0023】

NSEQは本発明のポリヌクレオチド配列を一般に指し、例えば配列番号1~33、配列番号85または配列番号86を含み、一方PSEQは本発明のポリペプチド配列を一般に指し、例えば配列番号48~82および配列番号85または配列番号86によってコードされているポリペプチドを含む。当然ながら、NSEQは配列番号1~33、配列番号85または配列番号86、例えばそれらのコード配列、相補配列から設計または誘導されるポリヌクレオチド配列も含むことは理解されるはずである。このような配列の非制限的な例は本明細書に開示する(例えば配列番号42~45)。

【0024】

本明細書で使用する用語「NSEQ」は、配列番号1~33、85または86のいずれか1つ(例えば、単離形)を含むかあるいはそれらからなる、あるいは配列番号1~33、85または86のいずれか1つの断片を含むかあるいはそれらからなる、ポリヌクレオチド配列を一般に指す。用語「NSEQ」は、より詳細には例えば非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性がある、配列番号1~33、85または86のいずれか1つの転写部分(すなわち、配列番号1~33、85または86のいずれか1つのコード部分)を含むかあるいはそれらからなる、ポリヌクレオチド配列を指す。用語「NSEQ」はさらに、前述のいずれか1つと実質的に同一である配列、およびより詳細には非翻訳または翻訳不能部分を例えば含まない可能性がある、配列番号1~33、85または86のいずれか1つの転写部分を含むかあるいはそれらからなるポリヌクレオチド配列と実質的に同一である配列を指す。用語「NSEQ」はさらに、ポリペプチドをコードするかあるいはコードすることができる、配列番号1~33、85または86のいずれか1つのポリヌクレオチド配列領域を指す。用語「NSEQ」は、本明細書に記載するポリペプチドのいずれか1つ、前述のいずれか1つのポリペプチド断片をコードすることができるポリヌクレオチド配列も指す。

【0025】

最後に、用語「NSEQ」は、前述のいずれか1つと実質的に相補的である配列も含む。

【0026】

用語「阻害NSEQ」は、配列番号1~33、85または86のいずれか1つと実質的に相補的であり、配列番号1~33、85または86のいずれか1つの断片と実質的に相補的であり、配列番号1~33、85または86と実質的に同一である配列と実質的に相補的であり、かつより詳細には配列番号1~33、85または86のいずれか1つの転写部分と実質的に相補的であり(例えば、非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性がある)、mRNAの転写あるいは対応する配列番号1~33、85または86によってコードされているポリペプチドの発現に対する、軽減あるいはさらに阻害作用を有する可能性がある配列を一般に指す。適切な「阻害NSEQ」は、例えば非制限的に約10~約30個のヌクレオチド、約10~約25個のヌクレオチド、あるいは約15~約20個のヌクレオチドを有する可能性がある。本明細書で使用する用語「ヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを意味する。代表的な実施形態では、ヌクレオチド類似体の使用も本発明中に含まれる。

【0027】

本発明は、その一態様において、(a)配列番号1~33または配列番号85または配列番号86のいずれか1つ、(b)(a)のオープンリーディングフレーム、(c)(a)または(b)の完全相補配列、および(d)(a)~(c)のいずれか1つの断片を含むポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列と、少なくとも約80%~約100%(例えば80%、90%、95%など)の配列同一性を有する単離ポリヌクレオチド配列に関する。

【0028】

本明細書で使用する用語「転写不能領域」は、例えばポリヌクレオチド配列のプロモーター領域(またはその一部分)、サイレンサー領域、エンハンサー領域などを含み得る。

【0029】

本明細書で使用する用語「翻訳不能領域」は、例えばポリヌクレオチド配列の開始部分(開始コドンの上流、例えばAUG)、イントロン領域、停止コドンおよび/または停止コドンの下流領域(ポリA尾部などを含む)を含み得る。

【0030】

本発明によって含まれる単離ポリヌクレオチド配列の相補配列は、例えば高ストリンジエンシー条件下で(a)中のヌクレオチド配列のいずれか、または(b)とハイブリダイズする相補配列であってよい。高ストリンジエンシー条件は、例えば5×SSC、5×Denhardt's溶液、1%SDS、および100 μg/mlの変性したサケ精子のDNA中での65℃におけるハイブリダイゼーション反応を含むことができる。

【0031】

本発明によれば、例えば骨のリモデリングと関係がある疾患または障害の治療において、ポリヌクレオチド配列を使用することができる。

【0032】

実験目的または骨のリモデリングと関係がある疾患または障害の診断目的で、サンプル、細胞、組織などの中の、例えば単離ポリヌクレオチド(またはその相補配列またはその断片)の存在を測定するためのプローブとして、ポリヌクレオチドの断片を使用することができる。

【0033】

本発明はさらに、(実質的に精製および/または単離した)複数のポリヌクレオチドを含む組合せに関する。ポリヌクレオチドは、骨のリモデリングと関係があることが知られている1つまたは複数の遺伝子と同時発現することができる。さらに、複数のポリヌクレオチドは、例えば(a)配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つ、(b)(a)のオープンリーディングフレーム、(c)例えば非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性がある、配列番号1~33、85または86のいずれか1つの転写部分を含む、またはそれからなるポリヌクレオチド配列、(d)(a)~(c)のいずれか1つの相補配列、(e)高ストリンジエンシー条件下で(a)~(d)のヌクレオチド配列のいずれか1つとハイブリダイズする配列、および(f)(a)~(e)のいずれか1つの断片を含むポリヌクレオチドからなる群から選択することができる。

【0034】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリペプチドのいずれか1つをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明によれば、ポリヌクレオチド(RNA、DNAなど)は、配列番号48~80のいずれか1つからなる群から選択することができるポリペプチド、配列番号85または86によってコードされているポリペプチド、その類似体または断片(例えば生物活性断片、免疫活性断片など)をコードすることができる。

【0035】

本発明はさらに、異種ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結しており、したがって融合ポリペプチドをコードする、本発明のポリヌクレオチドを含む単離核酸分子に関する。

【0036】

本発明はさらに、配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

より詳細には配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム、またはその一部分由来のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに関する。本発明は、骨のリモデリングと関係があることが知られている1つまたは複数の遺伝子と同時発現される遺伝子産物も含む。

【0037】

単離した自然に存在する対立遺伝子変異体、ならびに(例えば自然に存在するポリペプチドと比較して)1つまたは複数のアミノ酸置換、保存的または非保存的アミノ酸置換などを含み得る生物活性変異体などの、(例えば組換えDNA技術または化学合成などによって作製された)合成変異体も、本発明によって含まれる。

【0038】

本発明はさらに、発現ベクターなどの、本明細書に記載するポリヌクレオチドまたはその断片を含む(哺乳動物、細菌、ウイルスなどの)ベクターを提供する。ベクターは、タグ(例えば親和性タグ、HA、GST、Hisなど)をコードするポリヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド配列の発現の制御に助力することができる、核酸配列をさらに含むことができる。

【0039】

本発明によれば、発現ベクターは、例えば以下の作動可能に連結したエレメント:

- a) 転写プロモーター、
 - b) (配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含み得る)ポリヌクレオチドセグメント、および
 - c) 転写ターミネーター
- を含むことができる。

【0040】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリヌクレオチドを含む発現ベクター、発現ベクターで形質転換した宿主細胞、および本発明のポリペプチドを生成するための方法に関する。

【0041】

本発明はさらに、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド断片を含むベクターに関する。本発明のポリヌクレオチドと実質的に相補的である配列(例えばsiRNA、shRNA)を含むことができるベクターは、したがって本発明によって含まれる。ベクターは、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド断片の転写を可能にする配列を含むことができる。

【0042】

より詳細には本発明は、遺伝子工学処理して本発明のポリヌクレオチド(相補配列および断片含む)および/またはポリペプチドを含ませるか/あるいは発現させることが可能である細胞をしたがって提供する。細胞は、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、細菌細胞などであってよい。

【0043】

したがって本発明は、本明細書に記載するベクターを含むことができる宿主細胞を提供する。細胞は、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、細菌細胞などであってよい。細胞は、本明細書に記載するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを発現することができる可能性があるか、あるいは発現する。

【0044】

本明細書に含まれる本発明のポリペプチドを生成する方法は、例えば遺伝子の転写またはポリペプチドの発現を可能にする条件で、細胞を培養することを含む。ポリペプチドは、例えば細胞溶解物から、あるいは細胞上清から回収することができる。

【0045】

本発明は、配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つ、そのコード配列、その実質的に同一である配列、実質的に相補的である配列または断片を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドのアレイ上での使用に関する。複合体形成を可能にする条件下で患者のサンプルとアレイをハイブリダイズさせ、複合体形成を検出し、および患者のサ

10

20

30

40

50

ンプル中の複合体形成の量を正常および疾患組織の標準の量と比較するステップであって、患者のサンプル中の複合体形成が骨リモデリングの疾患または障害の存在を示すステップによる、骨リモデリングの疾患または障害の診断法においてアレイを使用することができる。当然ながら、診断法における本発明のポリヌクレオチドの使用は、例えば特定のアクセイのみに依存するわけではない。1つまたは複数の配列を、当技術分野で知られている従来使用される診断法において使用することができる。

【0046】

本発明はさらに、骨リモデリングの疾患または障害症状を改善する、あるいは骨疾患または障害を阻害するか遅延させる方法に関するものであり、この方法は骨リモデリングの疾患または障害の症状を改善することができるように、あるいは疾患または障害を予防する、遅延させるあるいは低下させることが可能であるように、破骨細胞中の本明細書に記載するポリヌクレオチド配列または本明細書に記載するポリペプチドの活性または発現を特異的に阻害することができる化合物を接触させるステップを含むことができる。

10

【0047】

本発明はさらに、骨リモデリングの疾患または障害症状を改善する、あるいは骨疾患または障害を阻害するか遅延させる方法に関するものであり、この方法は骨リモデリングの疾患または障害の症状を改善することができるように、あるいは疾患または障害を予防する、遅延させるあるいは低下させることが可能であるように、破骨細胞中の本明細書に記載するポリヌクレオチド配列または本明細書に記載するポリペプチドの活性または発現を特異的に促進することができる化合物を接触させるステップを含むことができる。

20

【0048】

本発明はさらに、骨の成長または補充の欠陥または必要性、および/または望ましくないレベルの骨の再吸収によって特徴付けられる哺乳動物の状態を治療する方法に関するものであり、この方法は有効量の本明細書に記載する適切な化合物を、このような治療を必要とする哺乳動物対象に投与するステップを含むことができる。

【0049】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列、本明細書に記載するポリペプチドのアレイ上での使用法、ならびに複合体形成を可能にする条件下で患者のサンプルとアレイをハイブリダイズさせ、複合体形成を検出し、および患者のサンプル中の複合体形成の量を正常および疾患組織の標準の量と比較するステップであって、患者のサンプル中の複合体形成が骨リモデリングの疾患または障害の存在を示し得るステップによる、骨リモデリングの疾患または障害の診断法におけるそのアレイの使用に関する。

30

【0050】

本発明によれば、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列は、体細胞遺伝子療法または幹細胞遺伝子療法に使用することができる。

【0051】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリヌクレオチド、または選択したポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分、および適切な医薬担体を含む医薬組成物に関する。

【0052】

さらに本発明は、研究、生物学的、臨床および療法目的の、本明細書に記載するポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、その一部分、それらの変異体または誘導体を含む生成物、組成物、プロセスおよび方法に関する。

40

【0053】

NSEQおよびPSEQは、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病(ビタミンD依存性、タイプIおよびII、およびX

50

染色体関連低ホスファターゼ症くる病を含む)、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストロシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害だけには限られないが、これらを含めた、骨のリモデリングと関係がある疾患および障害に関する療法の診断、予後、治療、予防、および選択および評価において使用することができる。

【0054】

スクリーニングツールとしてのNSEQの使用

本発明によって得られるポリヌクレオチドを使用して、発現産物、例えばNSEQ由来あるいはNSEQと相同的なmRNA、相補的DNA(cDNA)およびタンパク質を検出および単離することができる。一実施形態では、本発明のNSEQと相同的なmRNAの発現を、例えばハイブリダイゼーション分析、逆転写およびin vitro核酸増幅法によって検出することができる。このような手順によって、さまざまな組織型または異なる発生段階におけるmRNAを検出することができる。組織特異的または発生段階に特異的な形式で発現される対象の核酸は、組織特異的マーカーとして、あるいは特定の病状を定義することができる細胞または組織のサンプルの発生段階を定義するのに有用である。当業者は、NSEQをこれらの目的に容易に適合させることが可能である。

【0055】

当業者はさらに、NSEQ、およびcDNA核酸およびゲノムDNAなどのその発現産物を使用して、短鎖オリゴヌクレオチド配列を調製することができることを理解しているはずである。例えば、本発明のNSEQおよびcDNAと特異的にハイブリダイズし、ハイブリダイゼーションにより特有の核酸配列の検出、同定および単離を可能にする、10~12個あるいはそれより多くのヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを調製することができる。例えば、少なくとも15~20個ヌクレオチドの配列を使用することができ、他の知られている配列との相同性を欠く領域から選択することができる。このような相同性を欠く20以上のヌクレオチドの配列は、標的配列に対して高い特性を示す。プローブおよびプライマーに関する有用なハイブリダイゼーション条件は、当業者によって容易に決定することができる。本明細書に含まれる厳しいハイブリダイゼーション条件は、90%を超えて相同的である核酸のハイブリダイゼーションを可能にすることはできるが、70%より低い相同性である核酸のハイブリダイゼーションは妨げる可能性がある条件である。プローブの特異性は、それが特有の領域、制御領域から作製されたか、あるいは保存的モチーフから作製されたかによって測定することができる。プローブの特異性および診断用ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーまたは増幅の(最高度、高度、中程度、または低度の)反応は、プローブが正確に相同的な配列、対立遺伝子変異体、または関連配列を同定するかどうかによって測定することができる。関連配列を検出するように設計されたプローブは、選択したポリヌクレオチドのいずれかと少なくとも50%の配列同一性を有することができる。

【0056】

NSEQ(実質的に同一である配列およびその断片)は、試験サンプル中に見られる実質的に相補的である配列とハイブリダイズすることができることは、本明細書において理解されるはずである。さらに、NSEQと実質的に相補的である配列は、試験サンプル中に見られるNSEQと結合することができる。

【0057】

さらに、当技術分野で知られている任意の手順によって、例えば「レポーター分子」と連結したヌクレオチドの取り込みによってプローブを標識することができる。本明細書で使用する「レポーター分子」は、ハイブリダイズしたプローブの検出を可能にする、分析によって識別可能なシグナルを与える分子であってよい。検出は定性的または定量的であってよい。一般的に使用されているレポーター分子には、蛍光物質、酵素、ビオチン、化学発光分子、生物発光分子、ジゴキシゲニン、アビジン、ストレプトアビジンまたは放射性同位体がある。一般的に使用されている酵素には、特にホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼがある。ビオチン化プローブと共に使用するために、酵素はアビジンまたはストレプトア

ビジンと結合させることが可能である。同様に、ビオチン化酵素と共に使用するために、プローブをアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることが可能である。DNAプローブ中へのレポーター分子の取り込みは、当業者に知られている任意の方法、例えばニクトランスレーション、プライマー伸張、ランダムオリゴプライマー処理によって、3'または5'末端標識あるいは他の手段によって行うことができる。さらにハイブリダイゼーションプローブは、mRNAプローブを生成するためのベクターへの核酸配列のクローニングを含む。このようなベクターは当技術分野で知られており、市販されており、これらを使用してin vitroでRNAプローブを合成することができる。標識したポリヌクレオチド配列は、対象由来のサンプルを使用して変化した発現を検出する、サザンまたはノーザン分析、ドットプロット、または他の膜系技術において、PCR技術において、かつマイクロアレイにおいて使用することができる。ハイブリダイゼーションアッセイによってサンプルをスクリーニングするためのプローブとして、あるいは増幅用のプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドを、キットにパッケージ化することができる。このようなキットは、個々のハイブリダイゼーションまたは増幅プロトコルに必要とされる、予め測定した量または所定量のプローブまたはプライマー、ならびに他の適切にパッケージ化された試薬および物質を含むことができる。他の実施形態では本発明は、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされた実質的に精製されたポリペプチド、そのポリペプチド類似体またはポリペプチド断片に関する。未熟、成熟または融合形であろうとポリペプチドは、溶解細胞から、あるいは培養培地から単離して、目的とする使用に必要とされる程度まで精製することができる。当業者はこれらのタンパク質、ポリペプチドおよびペプチドを、任意の利用可能な手順によって容易に精製することができる。例えば精製は、塩分画化、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなどによって実施することができる。

10

20

【0058】

発現系を開発するためのNSEQの使用

生物活性ポリペプチドを発現させるために、NSEQまたはその誘導体を発現ベクター、すなわち個々の宿主中の挿入コード配列の転写および翻訳制御用のエレメントを含むベクターに挿入することができる。これらのエレメントは制御配列、エンハンサー、構成性および誘導性プロモーター、ならびに5'および3'非翻訳領域などを含むことができる。当業者によく知られている方法を使用して、このような発現ベクターを構築することができる。これらの方法にはin vitro組換えDNA技法、合成技法、およびin vivoでの遺伝的組換えがある。

30

【0059】

当業者に知られているさまざまな発現ベクター/宿主細胞系を使用して、NSEQを発現させることが可能である。これらは組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母菌発現ベクターで形質転換した酵母菌；バキュロウイルスベクターで感染させた昆虫細胞系；ウイルスまたは細菌発現ベクターで形質転換した植物細胞系；または動物細胞系を含むが、これらだけには限られない。哺乳動物系において組換えタンパク質を長期間生成するために、安定した細胞系の発現を実施することができる。例えばNSEQは、ウイルスの複製起点および/または内因性発現エレメント、ならびに同じまたは別のベクター上の選択可能または眼に見えるマーカー遺伝子を含むことができる発現ベクターを使用して、細胞系に形質転換することができる。本発明は、使用するベクターまたは宿主細胞によって制限されない。

40

【0060】

一般に、NSEQを含みNSEQによってコードされるポリペプチド、またはその一部分を発現する宿主細胞は、当業者に知られているさまざまな手順によって同定することができる。これらの手順には、核酸またはアミノ酸配列を検出および/または定量化するための膜、溶液、またはチップ系技術を含めた、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR増幅、およびタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技法があるが、これらだけには限られない。特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用

50

して、ポリペプチドの発現を検出および測定するための免疫法は、当技術分野で知られている。このような技法の例には酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化細胞選別(FACS)がある。当業者はこれらの方法を本発明に容易に適合させることが可能である。

【0061】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリペプチドの考えられるアンタゴニストとしての化合物を評価するためのバイオアッセイに関するものであり、このバイオアッセイは：

a)本明細書に記載するポリペプチドの作用を阻害するその能力を測定しようと調べる高濃度の少なくとも1つの化合物を含む培養培地中で試験細胞を培養するステップであって、試験細胞が本明細書に記載するポリヌクレオチド配列を含み得るステップ(例えば、野生型ポリヌクレオチドと比較して改善されたトランス活性化転写活性を有し、かつレポーター遺伝子と作動可能に連結した応答エレメントを含む形で);およびその後

b)培養培地中の考えられるアンタゴニスト化合物の濃度の関数としてレポーター遺伝子の産物の発現レベルを細胞においてモニタリングし、それによって本明細書に記載するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの活性を阻害する、考えられるアンタゴニスト化合物の能力を示すステップを含むことができる。

【0062】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの考えられるアゴニストとしての化合物を評価するためのバイオアッセイに関するものであり、このバイオアッセイは：

a)本明細書に記載するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの作用を促進するその能力を測定しようと調べる高濃度の少なくとも1つの化合物を含む培養培地中で試験細胞を培養するステップであって、試験細胞が本明細書に記載するポリヌクレオチド配列を含み得るステップ(例えば、野生型ポリヌクレオチドと比較して改善されたトランス活性化転写活性を有し、かつレポーター遺伝子と作動可能に連結した応答エレメントを含む形で);およびその後

b)培養培地中の考えられるアゴニスト化合物の濃度の関数として、レポーター遺伝子の産物の発現レベルを細胞においてモニタリングし、それによって本明細書に記載するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの活性を促進する、考えられるアゴニスト化合物の能力を示すステップを含むことができる。

【0063】

NSEQで形質転換した宿主細胞は、細胞培養物からのポリペプチドの発現および回収のための条件下で培養することができる。トランスジェニック細胞によって生成されるポリペプチドは、使用する配列および/またはベクターに応じて、細胞内に分泌されるかあるいは保持される可能性がある。当業者によって理解されるように、原核または真核細胞膜中のポリペプチドの分泌を誘導するシグナル配列を含むように、NSEQを含む発現ベクターを設計することができる。遺伝コードの固有の縮重性のため、実質的に同じであるかあるいは機能上同等なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を生成することができ、これを使用してNSEQによってコードされるポリペプチドを発現させることが可能である。本発明のヌクレオチド配列を、当技術分野で一般に知られている方法を使用して工学処理して、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現の改変だけには限られないが、これらを含めたさまざまな目的でヌクレオチド配列を変えることができる。ランダムな断片化によるDNAシャッフリング、ならびに遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCRによるリモデリングを使用して、ヌクレオチド配列を工学処理することができる。例えば、オリゴヌクレオチド媒介性の部位特異的突然変異誘発を使用して、新たな制限部位を生み出す突然変異を導入する、グリコシル化パターンを変える、コドンの優先性を変える、スプライス変異体を生成することなどができる。

【0064】

さらに、挿入配列の発現を調節するその能力、または望ましい形式で発現したポリペプチドをプロセッシングするその能力に関して、宿主細胞系統を選択することができる。この

ようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化があるが、これらだけには限られない。「プレプロ」形のポリペプチドを切断する翻訳後プロセッシングを使用して、タンパク質の標的化、フォールディング、および/または活性を特定することもできる。特定の細胞機構および翻訳後活性に関して特徴的な機構を有する異なる宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、およびW138)はAmerican Type Culture Collection(ATCC)から市販されており、これらを選択して発現したポリペプチドの正確な修飾およびプロセッシングを保證することができる。

【0065】

当業者は、天然、修飾、または組換え核酸配列を異種配列と結合させて、前述の宿主系のいずれかにおいて、異種ポリペプチド部分を含む融合ポリペプチドの翻訳をもたらすことを容易に理解するはずである。このような異種ポリペプチド成分は、市販の親和性マトリクスを使用した融合ポリペプチドの精製を容易にする可能性がある。このような成分にはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン、カルモジュリン結合ペプチド、6-His(His)、FLAG、c-myc、ヘマグルチニン(HA)、およびモノクローナル抗体エピトープがあるが、これらだけには限られない。

【0066】

さらに他の態様では、本発明は、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む可能性がある単離ポリヌクレオチドに関するものであり、この融合タンパク質は、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列によってコードされる、自然に存在する対立遺伝子変異体ポリペプチドによってあるいはコードされる、タンパク質のペプチド断片と融合した融合パートナーを含む可能性がある。

【0067】

当業者は、核酸およびポリペプチド配列は、当技術分野でよく知られている化学または酵素法を使用して、全体または一部分を合成することができることも容易に理解するはずである。例えばペプチド合成は、さまざまな固相技法およびABI431Aなどの機械を使用して実施することができる。ペプチド合成装置(PE Biosystems)を使用して、合成を自動化することができる。望むならば、アミノ酸配列を合成中に変えること、かつ/あるいは他のタンパク質由来の配列と組合せて変異体タンパク質を生成することができる。

【0068】

診断用スクリーニングツールとしてのNSEQの使用

当業者は、NSEQを診断目的で使用して、遺伝子の不在、存在、または変化した発現(すなわち、正常と比較して増大または低下した発現)を測定することができることを容易に理解するはずである。ポリヌクレオチドは少なくとも10ヌクレオチド長または少なくとも12ヌクレオチド長、あるいは少なくとも15ヌクレオチド長、任意の望ましい長さまでであってよく、相補的RNAおよびDNA分子、枝分かれ核酸、および/またはペプチド核酸(PNA)を含むことができる。一代替では、ポリヌクレオチドを使用して、NSEQの発現が疾患と関係あるサンプル中の遺伝子発現を検出および定量化することができる。他の代替では、NSEQを使用して、疾患と関係ある遺伝的多型を検出することができる。これらの多型は転写産物cDNAにおいて検出することができる。

【0069】

本発明は、NSEQ(例えば、NSEQのオープンリーディングフレーム、実質的に相補的である配列、実質的に同一である配列、およびそれらの断片)を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドのアレイ上での使用、ならびに複合体形成を可能にする条件下で患者のサンプルとアレイをハイブリダイズさせ、複合体形成を検出し、および患者のサンプル中の複合体形成の量を正常および疾患組織の標準の量と比較するステップであって、患者のサンプル中の複合体形成が骨リモデリングの疾患または障害の存在を示すステップによる、骨リモデリングの疾患または障害の診断法におけるそのアレイの使用を提供する。

【0070】

他の実施形態では本発明は、骨吸収疾患の状態を検出するための1つまたは複数の区画型キットを提供する。第一のキットは、少なくとも1つの単離プローブを含む容器を有す

10

20

30

40

50

る。このようなプローブは、正常細胞のゲノムDNA中に存在する/不在であるが、ただし感染細胞のゲノムDNA中に存在する/不在である核酸断片であってよい。このようなプローブは、通常は活性/不活性であるが、ただし幾つかの細胞型中では活性/不活性である可能性があるDNA部位に特異的である可能性がある。同様に、このようなプローブは、幾つかの細胞型中で異常に発現する可能性があるDNA部位に特異的である可能性がある。最後に、このようなプローブは、特異的なDNAの突然変異を同定することができる。DNA部位に特異的であるということによって、プローブが突然変異するDNA配列とハイブリダイズすることができる可能性があること、あるいは突然変異するDNA配列と隣接したDNA配列とハイブリダイズすることができる可能性があることを意味する。本発明のキット中に提供するプローブは、共有結合したレポーター分子を有することができる。プローブおよびレポーター分子は、前に記載したように当業者によって容易に調製することができる。

10

【0071】

治療物質としてのNSEQの使用

当業者は、前に論じた発現系およびアッセイを使用して、動物試験、臨床試験における個々の療法治療レジメンの有効性を評価すること、個々の対象の治療をモニタリングすることもできることを容易に理解するはずである。ひとたび疾患の存在が確定した後、治療プロトコルを開始し、ハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイを通常の基準で繰り返して、患者中の発現のレベルが、健康な対象中で観察されるレベルに近づき始めているかどうか測定することができる。連続アッセイから得た結果を使用して、数日～数年の範囲の期間の治療の有効性を示すことができる。

20

【0072】

本発明のさらに他の態様では、NSEQ、その一部分、またはその補体を、mRNAおよびポリペプチドを発現させる目的で、あるいは逆にmRNAの転写または翻訳を阻害する目的で、治療上使用することができる。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスまたはワクシニアウイルス、または細菌プラスミドなどに由来するエレメントを使用して、発現ベクターを構築することができる。個々の標的器官、組織、または細胞集団にヌクレオチド配列を送達するために、これらのベクターを使用することができる。当業者によく知られている方法を使用して、ベクターを構築すること、および核酸配列またはそれらの相補配列を発現させることが可能である。

【0073】

あるいはNSEQ、その一部分、またはその相補配列を、体細胞または幹細胞の遺伝子療法に使用することができる。ベクターはin vivo、in vitro、およびex vivoに導入することができる。ex vivo療法用に、ベクターを対象から採取した幹細胞に導入し、生成したトランスジェニック細胞は、その同じ対象に戻す自己移植用にクローン増殖させる。トランスフェクション、リポソーム注入によるNSEQ、またはポリカチオン性アミノポリマーの送達は、当業者によく知られている方法を使用して実施することができる。さらに、不活性遺伝子配列をコード領域またはNSEQの他の標的領域に挿入する相同的組換え法を使用して、内因性NSEQの発現を不活性化することができる。

30

【0074】

達成すべき特定の目標に応じて、NSEQを含むベクターを細胞または組織中に導入して、消失したポリペプチドを発現させる、あるいは非機能性ポリペプチドを置換することができる。当然ながら、細胞または組織中でPSEQを発現させることを望むときは、その目的でこのようなPSEQをコードし得るNSEQを使用することができ、あるいはその細胞または組織にPSEQを直接投与することができる。

40

【0075】

他方で、PSEQの発現を軽減または阻害することを望むときは、このようなPSEQをコードすることができるNSEQの少なくとも一部分と実質的に相補的であるNSEQ(例えば、阻害NSEQ)を使用することができる。

【0076】

阻害NSEQの発現は、阻害NSEQをベクターにクローニングすること、およびそのベクター

50

を細胞に導入して標的NSEQによってコードされるポリペプチドの発現を下方制御することによって行うことができる。

【0077】

(例えば、阻害NSEQを含めた)NSEQを含むベクターを細胞または組織に形質転換して、欠失ポリペプチドを発現させることが可能であるか、あるいは非機能的ポリペプチドを置換することができる。同様に、NSEQの相補配列を発現させるために構築したベクターを細胞に形質転換して、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分の過剰発現を下方制御することができる。相補的またはアンチセンス配列は転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドからなる可能性があり、ATG由来のおよそ位置-10と+10の間のヌクレオチドが好ましい。同様に、三重らせん塩基対形成法を使用して阻害を

10

【0078】

リボザイム、酵素RNA分子を使用して、本発明のポリヌクレオチド配列を含むmRNAなどの、mRNAの切断および個々のmRNAのレベルの低下を触媒することもできる。リボザイムは、特定の切断部位でmRNAを切断することができる。あるいはリボザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成する側面領域によって示される場所で、mRNAを切断することができる。リボザイムの構築および生成は、当技術分野でよく知られている。

20

【0079】

RNA分子を修飾して、細胞内安定性および半減期を増大させることが可能である。考えられる修飾には、分子の5'および/または3'両端における側面配列の付加、あるいは分子の骨格内のホスホジエステル結合ではなくホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用があるが、これらだけには限られない。あるいは、内因性エンドヌクレアーゼによって容易に認識されない、イノシン、ケオシン、およびビブトシンなどの非従来の塩基、ならびにアセチル-、メチル-、チオ-、および同様の修飾形のアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンが含まれる可能性がある。

【0080】

活性成分以外に、医薬組成物は、医薬的に使用することができる調製物への活性化合物の処理を容易にする賦形剤および助剤を含む、薬剤として許容される担体を含むことができる。

30

【0081】

任意の化合物に関して、治療有効用量を細胞培養アッセイにおいて、あるいはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、またはブタなどの動物モデルのいずれかにおいて最初に推定することができる。動物モデルを使用して、濃度範囲および投与経路を決定することもできる。したがってこのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量および投与経路を決定することができる。これらの技法は当業者によく知られており、治療有効用量は症状または状態を改善する活性成分の量を指す。治療有効性および毒性は、ED₅₀(50%の集団に治療上有効な用量)およびLD₅₀(50%の集団に致命的な用量)統計値を計算し対比させることなど

40

【0082】

本発明中で利用する医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髓内、嚢内、心室内、経皮、皮下、腹膜内、鼻腔内、腸、局所、舌下、または直腸手段だけには限られないが、これらを含めた任意の幾つかの経路によって投与することができる。

【0083】

本開示の目的の用語「治療」は、療法治療および予防または防止措置を指し、その目的

50

は標的とする病状または障害を予防するかあるいは遅延(軽減)させることである。治療を必要とする人には、既に障害を有する人、および障害を有する傾向がある人、または障害を予防すべき人がある。

【0084】

一般的な研究におけるNSEQの使用

本発明は最終的に、研究、生物学的、臨床および療法目的で、NSEQ、それらのオープンリーディングフレーム、あるいはNSEQのポリヌクレオチドまたはそのオープンリーディングフレームによってコードされるポリペプチド、またはその一部分、それらの変異体、類似体および誘導体および断片を利用する生成物、組成物、プロセスおよび方法を提供する。例えば、スプライス変異体、突然変異体、および多型を同定するために

10

【0085】

部分的ヌクレオチド配列を利用して、当技術分野で知られているさまざまなPCR系の方法を使用して、プロモーターおよび他の制御エレメントなどの上流配列を検出することによって、NSEQを延長させることが可能である。さらに、XL-PCRキット(PE Biosystems, Foster City Calif.)、ネスト化プライマー、および市販のcDNAライブラリー(Life Technologies, Rockville Md.)またはゲノムライブラリー(Clontech, Palo Alto Calif.)を使用して、配列を延長させることが可能である。

【0086】

ポリヌクレオチドは、マイクロアレイ中の標的として使用することもできる。マイクロアレイを使用して、多数の遺伝子の発現パターンを同時にモニタリングすること、およびスプライス変異体、突然変異体、および多型を同定することができる。発現パターンの分析から導かれる情報を使用して、遺伝子機能を測定すること、疾患の遺伝的基盤を理解すること、疾患を診断すること、および治療物質を開発し、それらの活性をモニタリングして疾患を治療することができる。マイクロアレイを使用して、ゲノムレベルで個々の集団を特徴付けることができる、遺伝的多様性、一ヌクレオチド多型を検出することもできる。

20

【0087】

さらに他の実施形態では、ポリヌクレオチドを使用して、自然に存在するゲノム配列をマッピングする際に有用である、ハイブリダイゼーションプローブを作製することができる。蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)は、他の物理的な染色体マッピング技法および遺伝子マップデータと関連付けることができる。

30

【0088】

本発明はより詳細には、その一態様において、破骨細胞の分化と関係がある内因的に示差的に発現される配列を代表的に同定する方法に関する。配列は例えば、未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される可能性がある。

【0089】

本発明の方法は、

a) (成熟または中間段階) 分化ヒト破骨細胞および未分化ヒト破骨前駆細胞由来の全メッセンジャーRNAを別々に提供するステップであって、全メッセンジャーRNAが例えば少なくとも1つの内因的に示差的に発現される配列を含むことができるステップ、

40

b) 分化ヒト破骨細胞の各メッセンジャーRNA由来の一本鎖cDNAを作製するステップ、および(例えばランダムに)一本鎖cDNAの3'末端を、RNAポリメラーゼプロモーター配列および第一の配列タグでタグ付けするステップ、

c) 未分化ヒト破骨前駆細胞の各メッセンジャーRNA由来の一本鎖cDNAを作製するステップ、および(例えばランダムに)一本鎖cDNAの3'末端を、RNAポリメラーゼプロモーター配列および第二の配列タグでタグ付けするステップ、

d) それぞれb)およびc)由来の部分的または完全二本鎖5'-タグ付けDNAを別々に作製するステップであって、したがって二本鎖5'-タグ付けDNAが、二本鎖RNAポリメラーゼプロモーター、第一または第二の配列タグおよび内因的に発現される配列を5'~3'方向に含む得るステップ、

50

e)d)のそれぞれ由来の第一および第二のタグ付けセンスRNAを、(タグ付けに使用するプロモーターに基づいて選択することができる)RNAポリメラーゼ酵素を用いて別々に線形的に増幅させるステップ、

f)e)の1つ由来の一本鎖の相補的な第一または第二のタグ付けDNAを作製するステップ、

g)f)の一本鎖の相補的な第一または第二のタグ付けDNAと、e)の他の線形的に増幅させたセンスRNAをハイブリダイズさせるステップ、

h)第一または第二の配列タグの助力により(例えば、PCRまたはハイブリダイゼーションによって)非ハイブリダイズRNAを回収するステップ、および

i)非ハイブリダイズRNAのヌクレオチド配列を同定(測定)するステップを含むことができる。

10

【0090】

ステップb)および/またはc)は、一本鎖cDNAの1つのコピーを作製することを含むことができる。

【0091】

この方法はさらに、未分化破骨前駆細胞に対して、分化破骨細胞中で同定した内因的に示差的に発現される配列の存在を比較して測定するステップを含むことができる。

【0092】

分化破骨細胞または未分化破骨前駆細胞の1つに実質的に不在である(例えば、完全に不在であるかあるいは非常に少量で存在する)配列、および他の分化破骨細胞または未分化破骨前駆細胞中に存在する配列を、したがって選択することができる。

20

【0093】

このように選択した配列は破骨細胞分化の正の調節因子である可能性があり、したがって有利に使用して骨吸収を促進することができる魅力的な標的を表す可能性があり、あるいは代替的に、このような標的を阻害して骨吸収を低下させるかあるいは予防することができる。

【0094】

あるいは、前述の方法を使用して選択した配列は破骨細胞分化の負の調節因子である可能性があり、したがって(例えば、転写、翻訳、活性などのレベルで)有利に誘導することができる魅力的な標的を表す可能性があり、あるいは細胞に与えて骨吸収を低下させるかあるいは予防することができる。さらにこのような負の調節因子は、その阻害により、標

30

【0095】

本発明によれば、配列は他の正常組織中の低下した発現または実質的に不在である発現に基づいてさらに選択することができ、したがって破骨細胞の分化および骨リモデリングと特に関係がある候補配列を表すことができる。

【0096】

方法はさらに、ヌクレオチド配列の完全配列を測定するステップも含むことができ、ヌクレオチド配列のコード配列を測定するステップも含むことができる。

【0097】

本発明はさらに、他の態様において、本発明の方法によって同定される単離した内因的かつ示差的に発現される配列(ポリヌクレオチドおよびポリペプチド)に関する。

40

【0098】

より詳細には本発明は、同定したポリヌクレオチド配列を含み得るポリヌクレオチド、同定したポリヌクレオチド配列のオープンリーディングフレームを含み得るポリヌクレオチド、本発明の方法によって同定されるポリヌクレオチドと実質的に同一であるヌクレオチド配列を含み得るポリヌクレオチド、本発明の方法によって同定されるポリヌクレオチドと実質的に相補的であるヌクレオチド配列を含み得るポリヌクレオチド、それらの断片およびスプライス変異体を含むが、ただし配列は配列番号34からなることはなく、あるいは配列番号34は含まないものとする。

【0099】

50

本発明によれば、本発明の単離した内因的かつ示差的に発現される配列は、完全または部分的なRNA分子であってよい。

【0100】

本発明のRNA分子に転写され得る単離DNA分子、およびこのようなDNAまたはRNA分子を含む(発現ベクターを含めた)ベクターも本明細書に含まれる。

【0101】

本発明はさらに、本明細書で同定した少なくとも1つの単離した内因的かつ示差的に発現される配列(例えば、部分的または完全なRNAまたはDNA、実質的に同一である配列または実質的に相補的である配列(例えばプローブ)およびその断片(例えばオリゴヌクレオチド))を含むライブラリーに関する。

10

【0102】

本発明によれば、単離した内因的かつ示差的に発現される配列は、例えば

a) 配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つ、

b) 配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム、

c) a) または b) と実質的に同一であるヌクレオチド配列を含み得るポリヌクレオチド、および

d) a) ~ c) のいずれか1つと実質的に相補的であるヌクレオチド配列を含み得るポリヌクレオチド、

e) a) ~ d) のいずれか1つの断片

20

からなるか、あるいはこれらを含み得るポリヌクレオチドからなる群から選択することができる。

【0103】

他の態様では本発明は、本発明の単離した内因的かつ示差的に発現される配列によってコードされ得るポリペプチドに関する。

【0104】

さらに他の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードすることができるポリヌクレオチドに関する。遺伝コードの縮重性のため、多数のポリヌクレオチド配列が同じポリペプチド配列をコードすることができ、したがって本発明によって含まれることは、本明細書において理解されよう。

30

【0105】

代表的なポリペプチドは、配列番号48~80のいずれか1つからなる群から選択される配列、配列番号85または配列番号86によってコードされているポリペプチドを含むことができる。

【0106】

本発明はさらに、(骨リモデリングと関係がある)単離した非ヒトオルソログポリヌクレオチド配列、非ヒトオルソログのオープンリーディングフレーム、実質的に同一である配列、実質的に相補的である配列、それらの断片およびスプライス変異体に関する。

【0107】

本発明は、非ヒトオルソログポリヌクレオチドによってコードされている単離ポリペプチド、ならびにその生物活性類似体および生物活性断片にも関する。

40

【0108】

本明細書に含まれる非ヒト(例えば、マウス)オルソログポリヌクレオチドの代表的な実施形態は、例えば配列番号35を含む。

【0109】

本明細書で同定した幾つかの非ヒトオルソログによってコードされている単離ポリペプチドの代表的な実施形態は、例えば配列番号82などのポリペプチドを含む。

【0110】

本発明はさらにより詳細には、その他の態様において、未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される可能性がある、単離ポリヌクレオチドに関する

50

。

【0111】

単離ポリヌクレオチドは、

a) 配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つを含み得るポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含み得るポリヌクレオチド、

c) 例えば非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性があり、配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写または転写可能部分を含み得るポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳または翻訳可能部分(例えば、コード部分)を含み得るポリヌクレオチド、

e) a)、b) c) または d) と実質的に同一である配列を含み得るポリヌクレオチド(例えば、配列全体または配列の一部分が約50～100%、または約60～100%または約70～100%または約80～100%または約85、90、95～100%同一)、

f) a)、b)、c) または d) と実質的に相補的である配列を含み得るポリヌクレオチド(例えば、配列全体または配列の一部分が約50～100%、または約60～100%または約70～100%または約80～100%または約85、90、95～100%相補的)、および

g) a)～f) のいずれか1つの断片

h) a)～g) のいずれか1つからなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド

からなる群から選択される1種を含むことができる。

【0112】

前に列挙したポリヌクレオチド断片の代表的なポリヌクレオチド断片は、配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの核酸配列と実質的に相補的である可能性がある少なくとも10核酸のポリヌクレオチド、例えば配列番号42～45のいずれか1つからなる群から選択される断片などを含む。

【0113】

本発明はさらに、破骨細胞の分化と関係がある単離ポリヌクレオチドに関するものであり、単離ポリヌクレオチドは例えば

a) 配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド

、

b) 配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 例えば非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性があり、配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写または転写可能部分を含み得るポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳または翻訳可能部分(例えば、コード部分)を含み得るポリヌクレオチド、

e) a)、b)、c) または d) と実質的に同一であるポリヌクレオチド、および

f) 配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つあるいはより詳細にはa)、b)、c) または d) の核酸配列と実質的に相補的である可能性がある少なくとも10核酸の配列

からなる群から選択することができる。

【0114】

本発明によれば、(例えば、哺乳動物またはその哺乳動物の細胞において)単離ポリヌクレオチドは破骨細胞分化を促進することができる、すなわち破骨細胞分化の正の調節因子であり得る。

【0115】

さらに本発明によれば、(例えば、哺乳動物またはその哺乳動物の細胞において)単離ポリヌクレオチドは破骨細胞分化を阻害する、防止するあるいは低下させることができる、

すなわち破骨細胞分化の負の調節因子であり得る。

【0116】

さらに他の態様では、本発明は、(例えば、哺乳動物またはその哺乳動物の細胞において)破骨細胞分化を阻害することができる単離ポリヌクレオチドに関する。ポリヌクレオチドは、例えば本明細書に記載するNSEQのいずれか1つの核酸配列と相補的である少なくとも10核酸の配列を含み得るポリヌクレオチドからなる群から選択することができる。

【0117】

適切なポリヌクレオチドは、例えば配列番号42～45からなる群から選択される配列を有するかあるいは含むポリヌクレオチドを含む。

【0118】

適切なポリヌクレオチドは、破骨細胞の分化を阻害することができるポリヌクレオチドであってよく、この分化は本明細書に列挙した物質などの、破骨細胞の分化の誘導物質によって誘導されている。

【0119】

本発明によれば、ポリヌクレオチドは、例えば部分的または完全、一本鎖または二本鎖、ハイブリッドなどである分子を含めたRNA分子、DNA分子であってよい。

【0120】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター(例えば発現ベクター)に関する。

【0121】

本発明はさらに、その一態様において、未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される可能性があるポリヌクレオチド配列のライブラリーに関する。このライブラリーは、例えば

a) 配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つを含み得るポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含み得るポリヌクレオチド、

c) 例えば非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性があり、配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写または転写可能部分を含み得るポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳または翻訳可能部分(例えば、コード部分)を含み得るポリヌクレオチド、

e) a)、b)、c)またはd)と実質的に同一である配列を含み得るポリヌクレオチド(例えば、配列全体または配列の一部分が約50～100%、または約60～100%または約70～100%または約80～100%または約85、90、95～100%同一)、

f) a)、b)、c)またはd)と実質的に相補的である配列を含み得るポリヌクレオチド(例えば、配列全体または配列の一部分が約50～100%、または約60～100%または約70～100%または約80～100%または約85、90、95～100%相補的)、および

g) a)～d)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される少なくとも1種を含むことができる。

【0122】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリヌクレオチドのライブラリーを含むことができる発現ライブラリーに関する。本発明によれば、ポリヌクレオチドのそれぞれを発現ベクター内に含めることが可能である。

【0123】

本発明の(相補配列などの少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む)ポリヌクレオチド配列のライブラリーを含むアレイおよびキットも、本明細書に含まれる。

【0124】

本発明はさらに、他の態様において、破骨細胞の分化(骨吸収および骨吸収関連疾患または障害)を阻害するための医薬組成物を提供し、この医薬組成物は例えば、

10

20

30

40

50

a) (例えば、破骨細胞の分化を阻害することができる) 本明細書で定義した単離ポリヌクレオチドおよび;

b) 薬剤として許容される担体を含むことができる。

【0125】

本発明はさらに、さらに他の態様において、それを必要とする哺乳動物(個体)における(または哺乳動物の細胞における)の、破骨細胞の分化を阻害するため(例えば骨吸収を阻害するため、あるいは骨吸収を改善するため)の方法を提供し、この方法は、(例えば、破骨細胞の分化を阻害することができる)単離ポリヌクレオチド、またはこのような適切なポリヌクレオチドを含む適切な医薬組成物を投与することを含むことができる。

10

【0126】

本発明によれば、それを必要とする哺乳動物は、例えば非制限的に骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病(ビタミンD依存性、タイプIおよびII、およびX染色体関連低ホスファターゼ症くる病を含む)、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストロシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害などからなる群から選択される状態に罹患している

20

【0127】

他の態様では本発明は、骨吸収疾患を治療するための医薬品を調製するための、(例えば、破骨細胞の分化を阻害することができる)単離ポリヌクレオチドの使用に関する。

【0128】

本発明は、その他の態様において、それを必要とする哺乳動物における破骨細胞の分化を促進するための医薬組成物を提供する。この医薬組成物は例えば、

a) (例えば、破骨細胞の分化を促進することができる)単離ポリヌクレオチドおよび;

b) 薬剤として許容される担体を含むことができる。

30

【0129】

本発明はさらに、それを必要とする哺乳動物中(または哺乳動物の細胞中)の破骨細胞の分化を促進するための方法も提供し、この方法は例えば、(例えば、破骨細胞の分化を促進することができる)単離ポリヌクレオチドまたは前に記載した適切な医薬組成物を投与することを含むことができる。

【0130】

本発明はさらに、不十分な骨吸収または過剰な骨の成長と関係がある疾患(例えば、骨化過剰症)を治療するための医薬品を調製するための、(例えば、破骨細胞の分化を促進することができる)単離ポリヌクレオチドの使用に関する。

【0131】

40

本発明はさらに、骨リモデリング(骨疾患)と関連がある状態の診断における、

a) 配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 例えば非翻訳または翻訳不能部分を含まない可能性があり、配列番号1~配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写または転写可能部分を含み得るポリヌクレオチド、

d) 配列番号1~配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳または翻訳可能部分(例えば、コード部分)を含み得るポリヌクレオチド、

50

e)a)、b)、c)またはd)と実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド(例えば、配列全体または配列の一部が約50～100%、または約60～100%または約70～100%または約80～100%または約85、90、95～100%同一)、

f)a)、b)、c)またはd)と実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド(例えば、配列全体または配列の一部が約50～100%、または約60～100%または約70～100%または約80～100%または約85、90、95～100%相補的)、

g)a)～f)のいずれか1つの断片および;

h)a)～g)のいずれか1つを含むライブラリー

からなる群から選択することができる少なくとも1つのポリヌクレオチドの使用に関する。

10

【0132】

骨リモデリングと関連がある状態を診断するためのキットも、本発明によって含まれる。このキットは、本明細書に記載するポリヌクレオチドを含むことができる。

【0133】

本発明はさらに、他の態様において、(哺乳動物またはその哺乳動物の細胞中の)破骨細胞の分化と関係がある単離ポリペプチド(ポリペプチド配列)を提供する。ポリペプチドは、

a)配列番号48～80のいずれか1つ、

b)配列番号1～33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つによってコードされ得るか/あるいはそれによってコードされるポリペプチド(それらのコード部分)

20

c)a)またはb)のいずれか1つの生物活性断片、

d)a)またはb)のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む(またはこれらからなる)可能性がある。

【0134】

本発明によれば、生物活性類似体は例えば、原型配列と比較して少なくとも1つの(保存的または非保存的)アミノ酸置換を含むことができる。本発明によれば、類似体は例えば、そのアミノ酸配列中に少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または挿入を含むことができる。

【0135】

置換は保存的または非保存的であってよい。ポリペプチド類似体は、原型配列と比較して例えば1つのアミノ酸置換(保存的または非保存的)、例えば1～5、1～10、1～15、1～20、1～50など(この間の任意の数含む)を含むことができる、生物活性類似体または免疫類似体であってよい。免疫類似体は、原型配列と比較して例えば少なくとも1つのアミノ酸置換を含むことができ、原型配列に特異的な抗体によって結合させることがさらに可能である。

30

【0136】

本発明によれば、ポリペプチド断片は、例えば本明細書に記載する少なくとも6個の連続アミノ酸、少なくとも8個の連続アミノ酸あるいはより多くのアミノ酸配列を含むことができる。

【0137】

さらに他の態様において、本発明は、例えば本明細書に記載するポリペプチドおよび薬剤として許容される担体を含むことができる医薬組成物を提供する。

40

【0138】

それを必要とする哺乳動物中(または哺乳動物の細胞中)の破骨細胞の分化を調節するための方法も本発明によって提供し、この方法は(例えば、破骨細胞の分化を促進することができる)単離ポリペプチドまたは本明細書に記載する適切な医薬組成物を投与することを含むことができる。

【0139】

他の態様では本発明は、不十分な骨吸収と関係がある疾患を治療するための医薬品を調製するための、(例えば、破骨細胞の分化を促進することができる)単離ポリペプチドの使

50

用に関する。

【0140】

それを必要とする個体における骨吸収を改善するための方法も本明細書に含まれ、この方法は、例えば(例えば、破骨細胞の分化を阻害することができる)単離ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドを含み得る適切な医薬組成物を投与することを含むことができる。

【0141】

本発明によれば、哺乳動物は例えば骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラース-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病(ビタミンD依存性、タイプIおよびII、およびX染色体関連低ホスファターゼ症くる病を含む)、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストロシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害などからなる群から選択される状態に罹患する可能性がある。

【0142】

さらに他の態様では、本発明は、それを必要とする個体における骨吸収疾患を治療するための医薬品を調製する際の、破骨細胞の分化を阻害することができるポリペプチドの使用に関する。

【0143】

本発明はさらに、それを必要とする個体における骨疾患を治療するための医薬品を調製するための、例えば配列番号48~80または配列番号85または配列番号86によってコードされるポリペプチドからなる群から選択することができるポリペプチドの、活性または発現を(例えば、破骨前駆細胞において)阻害することができる化合物、および化合物の使用に関する。

【0144】

さらに他の態様では本発明は、それを必要とする個体における骨吸収障害または疾患と関連がある状態の診断法に関する。この方法は、本明細書に記載するポリヌクレオチド、例えば(a)配列番号1~33、配列番号85または配列番号86、(b)配列番号1~33、配列番号85または配列番号86のオープンリーディングフレームを含み得るポリヌクレオチド、(c)配列番号1~配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写または転写可能部分を含み得るポリヌクレオチド、(d)配列番号1~配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳または翻訳可能部分を含み得るポリヌクレオチド、(e)(a)~(d)のいずれか1つの実質的に同一である配列、(f)(a)~(e)のいずれか1つの実質的に相補的である配列を含むか、あるいはこれらからなるポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチド、あるいは例えば配列番号48~80または配列番号85または配列番号86によってコードされるポリペプチド、およびそれらの類似体からなる群から選択することができるポリペプチド配列などを、個体由来のサンプル中で標準または正常値と比較して定量化することを例えば含むことができる。

【0145】

本発明は、骨リモデリングと関係がある遺伝子および/またはタンパク質を同定するためのアッセイおよび方法にも関する。このアッセイおよび方法は、破骨細胞の内因性遺伝子を発現阻害すること、および候補遺伝子(またはタンパク質)を細胞に提供することを含むことができる。骨リモデリングに積極的に関わる候補遺伝子(またはタンパク質)は、発現阻害される内因性遺伝子を補うその能力によって同定することができる。例えば、内因性遺伝子が発現阻害されている細胞に与えられる破骨細胞分化と関係がある候補遺伝子は、例えばRANKLなどの誘導物質の存在下で細胞を分化させることが可能である。

【0146】

本発明はさらに、外因性型のいずれか1つのポリペプチド(変異体、類似体などを含む)

または本発明のポリヌクレオチド(実質的に同一である配列、実質的に相補的である配列、断片、変異体、オルソログなどを含む)を発現する細胞に関する。

【0147】

本発明によれば、細胞は例えば骨細胞であってよい。さらに本発明によれば、細胞は(任意の分化レベルの)破骨細胞であってよい。

【0148】

本明細書で使用する用語「外因性型」は、問題の細胞によって自然には発現されない形として、本明細書では理解されたい。

【0149】

他の態様では本発明は、本明細書に記載するタンパク質またはポリペプチドと特異的に結合することができる、抗体(例えば、単離抗体)、またはその抗原結合断片に関する。抗体は例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換えDNA技術を使用して作製される抗体であってよい。抗体は例えば、マウス、ラットまたは任意の他の哺乳動物に由来してよい。

【0150】

抗体は、例えばヒトIg遺伝子を発現することができる、トランスジェニック非ヒト哺乳動物から得ることができるヒト抗体であってもよい。抗体は、例えば非ヒト起源の1つまたは複数の相補性決定領域を含むことができる、ヒト化抗体であってもよい。ヒト化抗体は、ヒト抗体および/またはヒト抗体のフレームワーク領域の表面残基を含むこともできる。抗体は、例えば非ヒト抗体の可変ドメインとヒト抗体の定常ドメインを含むことができる、キメラ抗体であってもよい。

【0151】

適切な抗体は、例えば抗原結合断片、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFv断片、または抗原結合断片を含む単鎖抗体(例えば単鎖Fv)も含むことができる。

【0152】

本発明の抗体は突然変異させることができ、本明細書に記載するポリペプチドの1つに関する高い親和性および/または特異性に基づいて、かつ/あるいは所望の宿主中の低下した免疫原性に基づいて選択することができる。

【0153】

抗体はさらに、それと結合した検出可能な標識を含むことができる。

【0154】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリペプチド、ポリペプチド断片、またはポリペプチド類似体の1つと結合することができる抗体の産生方法に関するものであり、この方法は

a)例えばPSEQの少なくとも6個の連続したアミノ酸を含むポリペプチド断片を含む適量の本明細書に記載するPSEQで哺乳動物(例えばマウス、ヒトIgを生成することができるトランスジェニック哺乳動物など)を免疫処置するステップ、

b)哺乳動物から血清を回収するステップ、および

c)哺乳動物の血清からポリペプチド特異的抗体を単離するステップを含むことができる。

【0155】

この方法は、動物に第二の用量を投与するステップをさらに含むことができる。

【0156】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリペプチドと結合する抗体を分泌するハイブリドーマの産生方法に関するものであり、この方法は

a)哺乳動物(例えばマウス、ヒトIgを生成することができるトランスジェニック哺乳動物など)をその適量のPSEQで免疫処置するステップ、

b)(a)から得た免疫処置動物からリンパ様細胞を得るステップ、

c)リンパ様細胞と不死化細胞を融合させてハイブリッド細胞を生成させるステップ、および

d) そのPSEQと特異的に結合する抗体を生成するハイブリッド細胞を選択するステップを含むことができる。

【0157】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリペプチドの1つと結合する抗体の産生方法に関するものであり、この方法は

a) ファージまたはリボソーム上で抗体(抗原結合断片)のライブラリーを合成するステップ、

b) 本明細書に記載するポリペプチドまたはポリペプチド断片を含む組成物とファージまたはリボソームを接触させることによって、サンプルに対してライブラリーを選別するステップ、

c) ポリペプチドまたはポリペプチド断片と結合するファージを単離するステップ、および

d) ファージまたはリボソームから抗体を得るステップを含むことができる。

【0158】

したがって本発明の抗体は、例えばライブラリー(例えば、バクテリオファージライブラリー)から得ることができ、例えば

a) 宿主哺乳動物からの抗体の生成を担う細胞を抽出するステップ、

b) (a)の細胞からRNAを単離するステップ、

c) mRNAを逆転写してcDNAを生成するステップ、

d) (抗体特異的)プライマーを使用してcDNAを増幅させるステップ、および

e) 抗体がファージまたはリボソーム上で発現されるように、ファージディスプレイベクターまたはリボソームディスプレイカセット中に(d)のcDNAを挿入するステップによって調製することができる。

【0159】

宿主哺乳動物を本明細書に記載するポリペプチドおよび/またはポリペプチド断片および/または類似体で免疫処置して、抗体の生成を担う細胞を抽出する前に免疫応答を誘導することができる。

【0160】

本発明はさらに、本明細書に記載するポリペプチドを特異的にアッセイするためのキットに関するものであり、キットは例えば、本明細書に記載するポリペプチドと特異的に結合することができる抗体または抗体断片を含むことができる。

【0161】

本発明はさらに、PSEQと結合することができる抗体を企図する。適切な抗体は、ポリペプチド、またはその一部分中の特有の抗原領域またはエピトープと結合することができる。抗体を作製するのに有用なエピトープおよび抗原領域は、当業者が利用可能な手順によってタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド内で発見することができる。例えば、短鎖の特有のペプチド配列を、知られているアミノ酸配列とほとんどあるいは全く相同性がなない、タンパク質およびポリペプチド中で同定することができる。ペプチドエピトープまたは抗原として働かせるために選択するタンパク質の領域は、完全には疎水性でないことが好ましい、親水性領域が好ましい、何故ならこれらの領域は、タンパク質およびポリペプチドの内部領域ではなく表面エピトープをおそらく構成するからである。これらの表面エピトープは、タンパク質およびポリペプチドの存在に関して試験するサンプル中で、さらに容易に検出される。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、および単鎖抗体、Fab断片、およびFab発現ライブラリーによって生成される断片を含み得るが、これらだけには限られない。抗体の生成は当業者によく知られている。

【0162】

当業者に知られている任意の手順によって、例えばin vitro翻訳または化学合成手順を使用することによってペプチドを作製することができる。抗原エピトープを与えるが、それ自体は免疫応答を誘導するのに小さすぎる短鎖ペプチドは、適切な担体と結合させることが可能である。適切な担体および結合法は、当技術分野でよく知られている。適切な担

10

20

30

40

50

体は、典型的にはタンパク質、多糖およびポリマーアミノ酸などの大きなマクロ分子である。例には血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン、ポリリシンなどがある。当業者は利用可能な手順およびカップリング試薬を使用して、望ましいペプチドエピトープとこのような担体を結合させることができる。例えば、カップリング試薬を使用して、担体から当該のペプチドまでジスルフィド結合またはチオエーテル結合を形成することができる。ペプチドがジスルフィド基を欠く場合、システイン残基を加えることによって与えることができる。あるいは、カルボキシル基の活性化によってカップリングを実施することができる。

【0163】

抗原特異的抗体を得るのに有用なペプチドの最小の大きさは、大きく変わる可能性がある。最小の大きさは、タンパク質またはポリペプチドに特異的な抗原エピトープを与えるのに充分でなければならない。1つの特定のエピトープに対する抗体を得ることが望ましい場合以外、最大の大きさは重要ではない。例えば大きなポリペプチドは、1つのエピトープが非常に有用であり第二のエピトープが免疫優性である、多数のエピトープを含む可能性がある。典型的には、本発明のタンパク質およびポリペプチドから選択される抗原ペプチドは、5～約100アミノ酸長の範囲であろう。しかしながら、さらに典型的には、このような抗原ペプチドは最大約50アミノ酸長であり、および好ましくは最大約30アミノ酸であろう。約6、8、10、12または15アミノ酸、約20または25アミノ酸までの配列を選択することが通常望ましい。

【0164】

有用なエピトープを含むアミノ酸配列は、幾つかの方法で同定することができる。例えば、タンパク質配列全体に1つになって広がる一連の短鎖ペプチドの調製を使用して、そのタンパク質配列全体をスクリーニングすることができる。当業者は通常、望ましい反応性を示すエピトープの存在に関して数個の大きなポリペプチドを試験し、段階的に小さく重複する断片をさらに試験して、望ましい特異性および反応性を有する好ましいエピトープを同定する。

【0165】

抗原ポリペプチドおよびペプチドは、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を生成するのに有用である。NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、そのポリペプチド類似体または一部分に対する抗体は、当技術分野でよく知られている方法を使用して作製することができる。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、および単鎖抗体、Fab断片、およびFab発現ライブラリーによって生成される断片を含み得るが、これらだけには限られない。二量体形成を阻害する抗体などの中和抗体が、療法用途に特に好ましい。モノクローナル抗体は、培養中の継代細胞系による抗体分子の生成をもたらす任意の技法を使用して調製することができる。これらにはハイブリドーマ、ヒトB細胞ハイブリドーマ、およびEBVハイブリドーマ技法があるが、これらだけには限られない。さらに、キメラ抗体の生成用に開発された技法を使用することができる。あるいは、単鎖抗体の生成に関して記載した技法を使用することができる。NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、そのポリペプチドの一部分に関する特異的結合部位を含み得るFabも作製することができる。さまざまなイムノアッセイを使用して、望ましい特異性を有する抗体を同定することができる。立証された特異性を有するポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用する、競合結合または免疫放射分析アッセイ用の多数のプロトコルは、当技術分野でよく知られている。

【0166】

ポリクローナル抗体を得るために、選択した動物をタンパク質またはポリペプチドで免疫処置することができる。知られている手順に従って、動物由来の血清を回収し処理することができる。当該のタンパク質またはポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、したがって親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。ポリクローナル抗血清を生成するための技法は、当技術分野でよく知られている。

【0167】

当業者が利用可能な数個の手順の1つによって、例えば抗体産生細胞と不死化細胞を融合させ、それによりハイブリドーマを作製することによって、モノクローナル抗体(MAb)を作製することができる。抗体産生B細胞と不死化細胞系の融合に関する一般的な方法は、十分に当技術分野内にある。他の例は、抗体のコンビナトリアルライブラリー技術を使用した、免疫処置済動物の骨髄および脾臓細胞から抽出したmRNAからのMAbの作製である。

【0168】

動物または誘導細胞系由来のモノクローナル抗体の1つの欠点は、診断または療法目的で患者にモノクローナル抗体を投与することはできるが、それらは免疫系によって外来性抗原として認識されることが多く、連続的な使用に適していないということである。ヒト免疫系によって外来性抗原として認識されない抗体は、診断と治療の両方に関して高い可能性を有する。ヒトおよびヒト化抗体を作製するための方法は現在、当技術分野でよく知られている。

【0169】

非ヒトモノクローナル抗体の領域がそのヒト相当物によって置換されている、キメラ抗体を構築することができる。好ましいキメラ抗体は、ヒトフレームワーク(FW)領域に移植した、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、その一部分と結合した、非ヒトモノクローナル抗体の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を含むアミノ酸配列を有する抗体である。このような抗体を生成するための方法は、当技術分野でよく知られている。CDRおよびFWに対応するアミノ酸残基は当業者に知られている。

【0170】

移植CDRを含む抗体の抗原に対する親和性を維持するか増大させるための、さまざまな方法が開発されてきている。1つの方法は、CDR領域の立体配座に影響を与える外来性フレームワーク残基を、キメラ抗体中に含ませることである。第二の方法は、外来性可変領域と最も相同性を有するヒト可変ドメインに、外来性CDRを移植することである。したがって、1つまたは複数の非ヒトCDRのヒト抗体への移植はさらに、特定のCDR配列と隣接しているか、あるいはCDR配列とは隣接していないが、抗体の可変ドメイン構造全体中のCDRに対してパッケージ化されており、CDR領域の立体配座に影響を与えるアミノ酸残基の置換を含み得る。したがって本発明のヒト化抗体は、1つまたは複数の非ヒトCDRを含むヒト抗体、および結合特性を維持するか増大させるための他の置換または交換が施されているような抗体を含む。

【0171】

本発明のキメラ抗体は、表面露出残基を交換してヒトと似たモノクローナル抗体を作製することによって、ヒト化されている抗体も含む。抗原結合部位付近のアミノ酸残基の内部パッケージ化は不変状態であるので、親和性は保たれる。ヒト化目的の本発明によるNSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド(またはその一部分)-抗体の表面露出残基の置換は、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分に対する親和性に影響を与えるCDR残基または隣接残基の置換を意味しない。

【0172】

キメラ抗体は、一部分または全ての非ヒト定常ドメインがヒト相当物と置換されている抗体も含むことができる。この手法は、抗原結合部位が影響を受けない状態にあるという利点を有する。しかしながら、可変ドメインが非ヒト抗体に完全に由来する、相当量の非ヒト配列が存在する可能性がある。

【0173】

本発明の抗体は、ヒト配列から本質的になる抗体であるヒト抗体(例えばヒト化)を含む。ヒト重鎖と軽鎖の可変ドメインの組合せが繊維状ファージの表面上に提示される、ファージディスプレイライブラリーからヒト抗体を得ることができる。可変ドメインの組合せは典型的には、FabまたはscFvの形で繊維状ファージ上に提示される。望ましい抗原結合特性を有する可変ドメインの組合せを有するファージに関して、ライブラリーをスクリー

ニングすることができる。好ましい可変ドメインの組合せは、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分に対する高い親和性によって特徴付けられる。好ましい可変ドメインの組合せは、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分に対する高い特異性、および他の関連抗原に対してほとんど交差反応性がないことによって特徴付けることもできる。抗体断片の非常に大きなレパートリーからのスクリーニングによって、 $(2 \sim 10 \times 10^{10})$ の充分多様な高親和性のモノクローナル抗体を単離することができ、多くはNSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分に対するナノモル未満の親和性を有すると予想される。

【0174】

あるいは、内因性マウスIg遺伝子が不活性化された非再配列ヒトIg遺伝子セグメントが導入されているトランスジェニック動物から、ヒト抗体を得ることができる。好ましいトランスジェニック動物は、大きさが1Mbを超える非常に大きな隣接したIg遺伝子断片を含むが、適度な親和性のヒトポリペプチド特異的モノクローナル抗体を、より小さな遺伝子の遺伝子座を含むトランスジェニック動物から産生することができる。ヒトIg遺伝子のみを発現することができるトランスジェニック動物を使用して、ヒト起源の抗体のみを含むポリクローナル抗血清を産生することもできる。

【0175】

本発明の抗体は、その結合特性が直接突然変異によって、あるいは親和性成熟法によって改善されている抗体を含むことができる。CDRを突然変異させること、および所望の特性を有する抗原結合部位をスクリーニングすることによって、親和性および特異性を改変または改善することができる。CDRはさまざまな方法によって突然変異させることができる。1つの方法は、他の場合同一である抗原結合部位の群中において、全20個のアミノ酸を個々の位置で発見することができるように、個々の残基または残基の組合せを無作為化することである。あるいは突然変異を、誤りがちのPCR法によって一定範囲のCDR残基で誘導することができる。重鎖および軽鎖可変領域遺伝子を含むファージディスプレイベクターは、ミューテーター大腸菌菌株において増大させることができる。これらの突然変異誘発法は、当業者に知られている多くの方法の例証となるものである。

【0176】

本発明の抗体は、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分の結合部位を含む、完全抗ポリペプチド抗体、ならびに抗体断片および誘導体を含むことができる。誘導体は、機能性ドメインと連結した結合部位を含むマクロ分子である。機能性ドメインは、シグナルドメイン、毒素、酵素およびサイトカインだけには限られないが、これらを含むことができる。

【0177】

本明細書に記載する手段によって得られる抗体は、特定組織または体液中のタンパク質、変異体および誘導体ポリペプチドを検出するのに有用である可能性がある。さらに、異常に発現するタンパク質またはタンパク質断片の検出は、疾患状態を立証する。例えば、本発明のNSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分の発現は、タンパク質が不適切な割合または不適切な発生段階で発現されていることを示す可能性がある。したがって本発明の抗体は、本明細書に開示するNSEQからのタンパク質の発現と関係がある疾患を検出するのに有用である可能性がある。

【0178】

ELISA、RIA、およびFACSを含めたポリペプチドを測定するためのさまざまなプロトコルは当技術分野でよく知られており、変化したレベルまたは異常なレベルの発現を診断する基盤を与える。ポリペプチド発現に関する標準値は、複合体形成の条件下で、健康な対象、好ましくはヒトから採取したサンプルとポリペプチドに対する抗体を組合せることによって確定する。複合体形成の量は、光度測定手段などのさまざまな方法によって定量化することができる。疾患サンプル中で発現されるポリペプチドの量は、標準値と比較することができる。標準値と対象値の間の偏差によって、疾患の診断またはモニタリングに関す

10

20

30

40

50

るパラメータを確定することができる。

【0179】

イムノアッセイの設計は多大な変化を免れず、さまざまなこれらのイムノアッセイが当技術分野で知られている。イムノアッセイは、アッセイする抗原の1つのエピトープを対象とする、モノクローナルまたはポリクローナル抗体試薬を使用することができる。あるいは、2つ以上のエピトープを対象とする、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の組合せを使用することができる。プロトコルは例えば競合に基づくものであってよく、競合薬剤スクリーニングアッセイを使用することができ、そのアッセイ中では、NSEQのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、またはその一部分と結合することができる中和抗体が、ポリペプチドとの結合に関して試験化合物と特異的に競合する。あるいは、直接的な抗原抗体反応またはサンドイッチ型アッセイを使用することができ、プロトコルは例えば、固形担体または免疫沈降を利用することができる。さらに、容易な検出のためにレポーター分子で抗体を標識することができる。結合試薬からシグナルを増幅させるアッセイも知られている。例には、アビジンおよびビオチンを利用するイムノアッセイ、あるいは酵素標識抗体または抗原結合体を利用するイムノアッセイ、ELISAアッセイなどがある。

10

【0180】

免疫診断に適しており適切な標識試薬を含むキットは、残りの試薬と共に適切にパッケージ化されたポリペプチドタンパク質エピトープまたは抗原領域を対象とする抗体、およびアッセイの実施に必要とされる物質、ならびにアッセイ教示書の適切なセットを含む。

20

【0181】

したがって本発明は、本明細書に記載するポリペプチドを特異的にアッセイするためのキットを提供し、このキットは例えば、本明細書に記載するポリペプチドと特異的に結合することができる抗体または抗体断片を含むことができる。

【0182】

本発明によれば、キットは診断用キットであってよく、

a) 本明細書に記載する1つまたは複数の抗体、および

b) レポーター基を含み得る検出用試薬

を含むことができる。

【0183】

本発明によれば、抗体は固形担体上に固定することができる。検出用試薬は例えば、免疫グロブリン、タンパク質G、タンパク質Aまたはレクチンなどを含むことができる。レポーター基は、放射性同位体、蛍光基、発光基、酵素、ビオチンおよび色素粒子からなる群から非制限的に選択することができる。

30

【0184】

他の態様では本発明は、本明細書に記載するポリペプチド、例えば配列番号48～80または配列番号85または配列番号86によってコードされるポリペプチドおよびそれらの類似体からなる群から選択することができるポリペプチドなどの、機能(活性)または発現を損なうことができる阻害化合物(阻害剤、アンタゴニスト)を同定するための方法を提供する。この方法は、ポリペプチドまたはポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させること、およびポリペプチドの機能(活性)または発現を測定することを含むことができる。(候補化合物の不在状態と比較した)ポリペプチドの機能または活性の低下によって、適切な阻害化合物が明確に同定され得る。

40

【0185】

本発明によれば、損われる機能または活性は破骨細胞の分化、本明細書に記載する誘導物質または当技術分野で知られている誘導物質によって誘導される破骨細胞の分化などを促進する、ポリペプチドの低下した能力と関係がある可能性がある。

【0186】

本発明によれば、細胞はポリペプチドまたは類似体を自然に(内因的に)発現することができず(ポリペプチドは細胞中で実質的に発現される可能性がない)、あるいは代替的に、

50

自然に発現されるポリペプチド類似体の発現が阻害される可能性がある。

【0187】

例えば、配列番号1の阻害物質の適切なスクリーニング法は、マウス破骨細胞におけるマウスオルソログ配列番号35の発現を抑制すること、および候補阻害物質、例えば破骨細胞分化の誘導物質(例えばRANKL)の存在または不在下での、配列番号1を含む破骨細胞の分化を評価することを含むことができる。

【0188】

本発明はさらに、例えば配列番号1または配列番号2などのポリペプチドの、機能(活性)または発現を損なうことができる阻害化合物(阻害剤、アンタゴニスト)を同定するための方法を提供する。この方法は、例えば(単離された)ポリペプチドまたはポリペプチドを発現する細胞と候補化合物を接触させること、およびポリペプチドの機能(活性)または発現を測定することを含むことができる。(候補化合物の不在状態と比較した)ポリペプチドの機能または活性の低下によって、したがって適切な阻害化合物を明確に同定することができる。

【0189】

本発明によれば、損われる機能または活性は、例えば破骨細胞の分化を阻害または促進するポリペプチドの低下した能力と関係がある可能性がある。

【0190】

スクリーニング試験を実施するために使用する細胞は、ポリペプチドまたは類似体を自然に(内因的に)発現することができず、あるいは代替的に、自然に発現されるポリペプチド類似体の発現が抑制される可能性がある。

【0191】

本発明はさらに、破骨細胞分化の正または負の調節因子を同定する方法に関する。この方法は、例えば本明細書に記載するノックダウン効果を実施することを含み得る。この方法は、より詳細にはa)標的配列(例えば、本明細書に記載するポリヌクレオチドまたはポリペプチド)を特異的に阻害することができる化合物(例えばsiRNA)を破骨細胞に提供するステップ、b)分化を誘導するステップ(例えば、RANKLなどの誘導物質を例えば用いて)およびc)破骨細胞の分化のレベルを決定するステップ(例えば、分化した細胞の数、それらの分化率、分化の特異的マーカーなどを測定するステップ)を含み得る。

【0192】

正の調節因子の阻害によって、破骨細胞の分化のレベルはおそらく低下するはずである。負の調節因子の阻害によって、破骨細胞の分化のレベルはおそらく増大するはずである。

【0193】

破骨細胞分化の正または負の調節因子を同定する他の方法は、a)本明細書に記載する標的配列の1つ(ポリペプチドまたはポリペプチドを発現することができるポリヌクレオチド)を細胞に提供するステップ、b)分化を誘導するステップ(例えば、RANKLなどの誘導物質を例えば用いて)およびc)破骨細胞の分化のレベルを決定するステップ(例えば、分化した細胞の数、それらの分化率、分化の特異的マーカーなどを測定するステップ)である。

【0194】

破骨細胞分化の正の調節因子を提供した細胞は、増大した分化のレベルを有する可能性がある。破骨細胞分化の負の調節因子を提供した細胞は、低下した分化のレベルを有する可能性がある。

【0195】

本発明は、破骨細胞分化に干渉することができる化合物を同定する方法も提供し、この方法は、配列番号1~33、85、86のいずれか1つ(コード部分)を含む非内因性ポリヌクレオチド配列を内部に含む細胞を接触させるステップ、および分化した破骨細胞の(例えば数)を定量化するステップを含むことができる。化合物の不在下と比較した化合物の存在下での破骨細胞分化の低下は、破骨細胞分化のアンタゴニストを示す可能性があり、一方で化合物の不在下と比較した化合物の存在下での破骨細胞分化の増大は、破骨細胞分化のアゴ

ニストを示す可能性がある。

【0196】

本発明によれば、細胞は内因性形のポリヌクレオチドも含むことができる。

【0197】

本明細書で使用する用語「内因性」は、生物、組織または細胞内に自然に由来する物質を意味する。用語「内因性ポリヌクレオチド」は、染色体形のポリヌクレオチドまたは染色体形のポリヌクレオチドによって生成されるRNAバージョン(hnRNA、mRNA)を指す。用語「内因性ポリペプチド」は、「内因性ポリヌクレオチド」によってコードされるタンパク質の形を指す。

【0198】

本明細書で使用する用語「非内因性」または「外因性」は、物質が外部供給源から提供される点で「内因性」とは反対に使用するが、それは細胞内に導入することができる。用語「非内因性ポリヌクレオチド」は細胞内に導入される合成ポリヌクレオチドを指し、例えば当該の配列を含むベクター、合成mRNA、NSEQを含むオリゴヌクレオチドなどを非制限的に含む。用語「非内因性ポリペプチド」は、「非内因性ポリヌクレオチド」によってコードされるタンパク質の形を指す。

【0199】

本発明はさらに、破骨細胞分化に干渉することができる化合物を同定する方法に関するものであり、この方法は、配列番号48～80のいずれか1つを含む非内因性ポリペプチド配列を内部に含む細胞を接触させるステップ、および分化した破骨細胞の(例えば数)を定量化するステップを含むことができる。化合物の不在下と比較した化合物の存在下での破骨細胞分化の低下は、破骨細胞分化のアнтаゴニストを示す可能性があり、一方で化合物の不在下と比較した化合物の存在下での破骨細胞分化の増大は、破骨細胞分化のアゴニストを示す可能性がある。

【0200】

本明細書で使用する用語「配列同一性」は、元のヌクレオチド配列を参照したヌクレオチド配列の(構成)ヌクレオチドに関する。核酸配列の領域または配列全体で、同一性を比較することができる。

【0201】

したがって、例えば3、4、5、10、19、20ヌクレオチド以上(およびこの間の任意の数)の領域で、「同一性」を比較することができる。非同ーヌクレオチドのギャップは同一核酸間で見ることができることは、本明細書において理解されよう。例えばポリヌクレオチドは、他のポリヌクレオチドとその一部分で100%の同一性を有する可能性がある。しかしながら、両方のポリヌクレオチドの配列全体を比較すると、2つのポリヌクレオチドは、互いに同一である50%のその全体(全)配列を有する可能性がある。

【0202】

元のポリヌクレオチドと約50～約100%、あるいは約60～約100%または約70～約100%または約80～約100%または約85%、約90%、約95～約100%の配列同一性を有する本発明のポリヌクレオチドまたはその一部分は、本明細書に含まれる。約50～100%の同一性を有するポリヌクレオチドは、元のポリヌクレオチドと類似した形式で機能することができ(例えば、実質的に相補的である配列にアニールすることができる)、したがって元のポリヌクレオチドの代わりに使用することができることは、当業者によって知られている。例えば、ポリヌクレオチド(核酸配列)は定義した領域で元のポリヌクレオチドと約50～100%の同一性を含むか、あるいは有する可能性があり、さらに本発明を達成するほど有効あるいは充分に働く可能性がある。

【0203】

同一性の割合は、例えばデフォルトギャップ加重値を使用して、Wisconsin Genetics Software Package Release7.0におけるアルゴリズムGAP、BESTFIT、またはFASTAによって測定することができる。

【0204】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する用語「配列相補性」は、参照(元の)ヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列の(構成)ヌクレオチドを指す。核酸配列の領域または配列全体で、相補性を比較することができる。

【0205】

元のポリヌクレオチドと約50～約100%、あるいは約60～約100%または約70～約100%または約80～約100%または約85%、約90%、約95～約100%の配列相補性を有する本発明のポリヌクレオチドまたはその一部分は、したがって本明細書に含まれる。元の配列と約50～100%の相補性を有するポリヌクレオチドは、本発明を実施する(例えば、元のポリヌクレオチドの発現を阻害する)のに十分な形式でその配列にアニールすることができることは、当業者によって知られている。

10

【0206】

「類似体」は、本明細書に記載するポリペプチドのそれと類似した、生物活性および化学構造を有する分子として本明細書では理解される。「類似体」は、元の配列または元の配列の一部分と配列類似性を有する可能性があり、本明細書で論じるその構造の修飾を有する可能性もある。例えば「類似体」は、元の配列または元の配列の一部分と、少なくとも90%の配列類似性を有する可能性がある。「類似体」は例えば、元の配列または元の配列の一部分と、少なくとも70%あるいはさらに50%の配列類似性(またはより少ない、すなわち少なくとも40%の配列類似性)を有する可能性もある。

【0207】

さらに、ポリペプチドに関する「類似体」は例えば、アミノ酸の骨格または側鎖の1つまたは複数の修飾、あるいは基または他の分子の付加などと組合せて、元の配列と少なくとも50%の配列類似性を有する可能性がある。

20

【0208】

「ポリヌクレオチド」は一般に、非修飾RNAまたはDNA、あるいは修飾RNAまたはDNAであってよい、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」は非制限的に、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、あるいはより典型的には二本鎖、あるいは一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であってよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。さらに「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAの両方を含む三重鎖領域を指す。用語ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性または他の理由で修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。「修飾」塩基は例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの珍しい塩基を含む。さまざまな修飾をDNAおよびRNAに施すことができ、したがって「ポリヌクレオチド」は、自然に典型的に見られる化学的、酵素的、あるいは代謝によって修飾された形のポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的な化学形のDNAおよびRNAを含む。「ポリヌクレオチド」は、線状分子および末端閉環状分子を含むが、これらだけに限られない。「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短鎖のポリヌクレオチドも含む。

30

【0209】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合(すなわち、ペプチド等電子体)により互いに接合した2つ以上のアミノ酸を含む、任意のペプチドまたはタンパク質を指す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと一般に呼ばれる短鎖、およびタンパク質と一般に呼ばれる長鎖の両方を指す。前に記載したように、ポリペプチドは20遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。

40

【0210】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド類似体」は、突然変異体、変異体、キメラ、融合体、欠失体、付加体、および所与のポリペプチドに対して施される任意の他の型の修飾に関する。

【0211】

本明細書で使用する用語「生物活性がある」は、元のポリペプチドの生物活性の一部分

50

または全体を保持する、すなわち破骨細胞の分化を促進または阻害することができる変異体または断片を指す。本発明のポリペプチドまたは断片は、「免疫活性がある」ポリペプチドまたは断片も含み得る。「免疫活性がある」ポリペプチドまたは断片は、免疫処置目的で(例えば、抗体の作製において)有用である可能性がある。

【0212】

したがって、元のポリペプチド、本明細書に記載するポリペプチドの断片(修飾または非修飾)、類似体(修飾または非修飾)、誘導體(修飾または非修飾)、相同体(修飾または非修飾)の形である生物学的活性があるポリペプチドは、本発明によって含まれる。

【0213】

したがって、望ましい生物学的活性を著しく害さない、元のポリペプチドと比較して修飾を有する任意のポリペプチドが、本明細書に含まれる。本発明のポリペプチドに幾つかの修飾を、それらの生物学的活性に有害な影響を与えずに施すことができることは、当技術分野でよく知られている。これらの修飾は他方で、元のポリペプチドの生物学的活性を維持または増大させることができ、あるいは1つまたは複数の本発明のポリペプチドの特性(例えば安定性、生物学的利用能など)を最適化することができ、幾つの場合望ましい可能性がある。本発明のポリペプチドは例えば、翻訳後プロセッシングなどの自然のプロセス、または当技術分野で知られている化学修飾技法のいずれかによって修飾される、アミノ酸配列を含むポリペプチドを含むことができる。ポリペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含めた、ポリペプチド中の任意の場所に修飾が存在してよい。同じ型の修飾が、所与のポリペプチド中の数個の部位に同じまたはさまざまな程度で、存在する可能性があることは理解されるはずである。さらに、1つの所与のポリペプチドは多くの型の修飾を含むことができる。本明細書に記載するポリペプチドに対する2つ以上の修飾は、生物学的活性が元の(親)ポリペプチドと同等である程度で、本発明によって含まれることは本明細書において理解されよう。

【0214】

前に論じたように、ポリペプチド修飾は、例えばポリペプチド配列中にアミノ酸挿入(すなわち付加)、欠失および置換(すなわち置換)、保存的または非保存的のいずれか(例えばD-アミノ酸、デスアミノ酸)を含むことができ、この場合このような変化はポリペプチドの全体的な生物学的活性を実質的に変えない。

【0215】

置換の例は、保存的である(すなわち、残基が他の同じ一般的な型または基によって置換されている)置換、あるいは望ましいときは、非保存的である(すなわち、残基が他の型のアミノ酸によって置換されている)置換であってよい。さらに、非天然アミノ酸は天然アミノ酸に置換することができる(すなわち、非天然保存的アミノ酸置換または非天然非保存的アミノ酸置換)。

【0216】

理解されるように、天然アミノ酸は酸性、塩基性、中性および極性、または中性および無極性として下位分類することができる。さらに、3つのコードされているアミノ酸は芳香族である。本発明の所定のポリペプチドと異なるコードされているポリペプチドが、置換されるアミノ酸のそれと同じ型または基に由来するアミノ酸の置換コドンを含むことは、有用である可能性がある。したがって、幾つの場合、塩基性アミノ酸Lys、ArgおよびHisは交換することが可能であり、酸性アミノ酸AspおよびGluは交換することが可能であり、中性極性アミノ酸Ser、Thr、Cys、GlnおよびAsnは交換することが可能であり、無極性脂肪族アミノ酸Gly、Ala、Val、Ile、およびLeuは交換可能であるが、大きさのため、GlyとAlaはより密接に関連しており、Val、Ile、およびLeuは互いにより密接に関連しており、芳香族アミノ酸Phe、TrpおよびTyrは交換することが可能である。

【0217】

ポリペプチドを合成によって作製する場合、DNAによって自然にコードされていない(天然に存在しないあるいは非天然アミノ酸)アミノ酸による置換を施すこともできることを、さらに記さなければならない。

10

20

30

40

50

【0218】

天然に存在しないアミノ酸は、哺乳動物中で自然に生成または発見されないアミノ酸として本明細書では理解されよう。非天然アミノ酸はD-アミノ酸、システインのイオウ原子と結合したアセチルアミノメチル基を有するアミノ酸、ペグ化アミノ酸などを含む。非天然アミノ酸を明確なポリペプチド配列中に封入することによって、元のポリペプチドの誘導体がしたがって生成するはずである。非天然アミノ酸(残基)は、 n が2~6である式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ のオメガアミノ酸、中性無極性アミノ酸、例えばサルコシン、*t*-ブチルアラニン、*t*-ブチルグリシン、*N*-メチルイソロイシン、ノルロイシンなども含む。フェニルグリシンはTrp、TyrまたはPheで置換することができ、シトルリンおよびメチオニンスルホキシドは中性無極性であり、システイン酸は酸性であり、かつオルニチンは塩基性である。プロリンはヒドロキシプロリンで置換することができ、形態付与性を保持することができる。

10

【0219】

類似体は置換型突然変異誘発によって作製することができ、本発明のポリペプチドの生物学的活性を保持することができることは、当技術分野で知られている。これらの類似体は、除去されるタンパク質分子中に少なくとも1つのアミノ酸残基、およびその場所に挿入される異なる残基を有する。例えば、置換型突然変異誘発の当該の1つの部位は、活性部位、または免疫部位として同定される部位だけには限られないが、これらを含む可能性がある。当該の他の部位は、例えばさまざまな種から得た個々の残基が同一である部位であってよい。これらの位置は、生物学的活性に重要である可能性がある。「保存型置換」として同定した置換の例は表A中に示す。このような置換が望ましくない変化をもたらす場合、したがって表A中に「代表的な置換」と称する、あるいはアミノ酸クラスを参照して本明細書にさらに記載する他の型の置換を導入し、生成物をスクリーニングする。

20

【0220】

幾つかの場合、アミノ酸の置換、挿入、または欠失によって、ポリペプチドの生物学的活性を改変することは重要である可能性がある。例えば、ポリペプチドの修飾はポリペプチドの生物学的活性の増大をもたらす可能性があり、その毒性を調節する可能性があり、生物学的利用能または安定性の変化をもたらす可能性があり、あるいはその免疫学的活性または免疫学的同一性を調節する可能性がある。機能または免疫学的同一性の実質的改変は、(a)例えばシートまたはらせん状立体配座としての、置換の領域中のポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは(c)側鎖の容積の維持に対するその影響が著しく異なる置換を選択することによって実施する。天然に存在する残基は、一般的な側鎖の性質に基づいて幾つかの群に分けられる：

30

(1)疎水性:ノルロイシン、メチオニン(Met)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)

(2)中性親水性:システイン(Cys)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)

(3)酸性:アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)

(4)塩基性:アスパラギン(Asp)、グルタミン(Gln)、ヒスチジン(His)、リシン(Lys)、アルギニン(Arg)

(5)鎖の配向に影響を与える残基:グリシン(Gly)、プロリン(Pro);および芳香族:トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、フェニルアラニン(Phe)

40

【0221】

非保存的置換は、これらのクラスの1つの要素と他の要素の交換を必然的に伴うはずである。

【0222】

【表 1】

表A.代表的なアミノ酸置換

元の残基	代表的な置換	保存的置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

【0223】

物質(例えばアミノ酸)、代替物などの「範囲」または「群」を言及する場合、あるいは他の型の個々の特性(例えば温度、圧力、化学構造、時間など)を言及する場合、本発明は各それぞれの特異的要素、ならびにその全ての下位範囲または下位群の組合せに関するものであり、それらを本明細書に明らかに組み込むことは、本明細書において理解されよう。したがって、任意の指定範囲または群が、ある範囲または群の各それぞれの要素を個別に、およびその中に含まれる各それぞれの考えられる下位範囲または下位群を参照する、かつ同様にその中の任意の下位範囲または下位群に関して参照する、簡単な形式として理解されよう。したがって例えば、約80~100%の同一性のパーセンテージ(%)に関して、各それぞれの個々の%、および例えば80%、81%、84.78%、93%、99%などの下位範囲が本明細書に具体的に組み込まれるとして、かつ同様に濃度、要素などの他のパラメータに関して理解されよう。

30

40

【0224】

本発明の方法はそれぞれ、それに関して記載する各それぞれの個々のステップ、ならびに特定のステップを明らかに含み特定のステップまたはその組合せは除外するとして定義されるステップを含むことは本明細書において特に理解され、例えば、本発明の方法に関する除外定義は以下のように読むことができる:「ただし前記ポリヌクレオチドは、配列番号34または配列番号34のオープンリーディングフレームを含まず、それからなることはないものとする」、あるいは「ただし前記ポリペプチドは、配列番号82を含まず、それからなることはないものとする」、あるいは「ただし前記ポリヌクレオチド断片または前記ポリペプチド断片は、X単位(例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸)長未満、あるいはX単位(例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸)長より大きいものとする」。

50

【0225】

本発明の他の目的、特徴、利点、および態様は、以下の記載から当業者に明らかとなるはずである。しかしながら、以下の記載および具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すが、例示によってのみ与えられることは理解されるはずである。開示する本発明の精神および範囲内の、さまざまな変化および変更形態が以下の記載を読むことから、および本開示の他の部分を読むことから当業者に容易に明らかとなるはずである。

【0226】

添付の図面中：

図1～34および38～39のそれぞれに関して、マクロアレイをヒト前駆体細胞(A～F1)、および分化中間段階(A～F2～3)および4人のヒトドナーの成熟破骨細胞(A～F4)、30の異なる正常ヒト組織(副腎(A5)、肝臓(B5)、肺(C5)、卵巣(D5)、骨格筋(E5)、心臓(F5)、頸部(G5)、甲状腺(H5)、乳房(A6)、胎盤(B6)、副腎皮質(C6)、腎臓(D6)、大静脈(E6)、卵管(F6)、膵臓(G6)、精巣(H6)、空腸(A7)、大動脈(B7)、食道(C7)、前立腺(D7)、胃(E7)、脾臓(F7)、回腸(G7)、気管(A8)、脳(B8)、結腸(C8)、胸腺(D8)、小腸(E8)、膀胱(F8)および十二指腸(G8))由来のRAMP増幅RNAを使用して調製した。個々の配列番号を表すSTARdsDNAクローンを³²Pで標識し、マクロアレイとハイブリダイズさせた。プローブ標識反応には、マクロアレイ(M)上に点在する同じ配列とハイブリダイズするArabidopsisのdsDNA配列も混ぜて、標識反応の対照として働かせた。各スポットにおけるハイブリダイゼーションシグナルの定量化は、STORM820phosphorimagerおよびImageQuantTLソフトウェア(Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)を使用して実施した。前駆体(A～F1)に関するシグナルの平均を表すlog₂値をベースラインとして使用し、残りのサンプルのそれぞれに関して得たlog₂値から差し引いて、前駆体と比較したそれらの相対量を測定し、棒グラフとしてプロットした(右図)。

【発明を実施するための最良の形態】

【0227】

例示の実施形態の説明

本出願人は念入りに設計された戦略を使用して、破骨細胞形成および骨のリモデリングと関係がある遺伝子配列を同定および単離した。この方法は以下のステップ:1)ヒト起源の前駆体細胞および分化の中間段階および成熟段階の破骨細胞から単離したmRNAを使用して非常に代表的なcDNAライブラリーを調製するステップ、2)破骨細胞形成中に上方制御された配列を単離するステップ、3)上方制御された配列を同定および特徴付けするステップ、4)組織特異性に関して上方制御された配列を選択するステップ、および5)破骨細胞形成に対するノックダウン効果を測定するステップを含んでいた。本開示中に論じる結果は、この分化細胞型に特異的である破骨細胞遺伝子を標的化する利点を実証し、疾患および障害の遺伝的基盤を研究する際により有効なスクリーニング法を与える。生物学の他の領域で役割を有することが知られている遺伝子が、破骨細胞形成および破骨細胞機能において重要な役割を果たすことが示されてきている。本開示前に知られているが、それらに割り当てられた役割を有していなかった遺伝子も単離し、破骨細胞形成および破骨細胞機能において重要な役割を有することが示されてきている。最後に、新規の遺伝子が同定されてきており、役割を果たしているが、しかしながら、本出願人はさらなる試験が終了するまでその開示を保留する。

【0228】

本発明は、非制限的に以下でさらに詳細に例示する。

【0229】

A-材料および方法

本開示中で言及する市販の試薬は、他に示さない限り供給者の教示書に従い使用した。本開示を通じて、幾つかの出発物質は以下のように調製した：

【0230】

B-分化した破骨細胞の調製

RAW264.7(RAW)破骨細胞前駆体細胞系およびヒト前駆体細胞(末梢血単核細胞またはCD34

+前駆体細胞)は、破骨細胞形成のネズミおよびヒトモデルとして当技術分野でよく知られている。したがってこれらのネズミおよびヒト破骨細胞は、破骨細胞機能に特化した遺伝子を単離し特徴付けるための材料のよい供給源である。

【0231】

ヒト初代破骨細胞は、35ng/mlのM-CSFおよび100ng/mlのRANKリガンドの存在下において、供給者によって記載されたのと同様にG-CSF動員末梢血単核細胞(Cambrex、East Rutherford、NJ)から分化させた。多核TRAP染色破骨細胞は11~14日までに見ることができた。破骨細胞はヒト破骨細胞の前駆体細胞(CD34+前駆体細胞)(Cambrex、East Rutherford、NJ)からも誘導し、供給者によって記載されたのと同様に培養した。後者の場合、破骨細胞を7日後に得た。

10

【0232】

RAW細胞はAmerican Type Culture Collectionから購入し、10%ウシ胎児血清および抗生物質を含む高グルコースDMEM中に保った。細胞は最大10~12代まで二週間に一回継代培養した。破骨細胞分化の実験用に、RAW細胞を 4×10^3 個の細胞/ウエルの密度で96ウエルプレートに接種し、24時間平板培養した。高グルコースDMEM、10%チャコール処理ウシ胎児血清(Hyclone、Logan、UT)、0.05%BSA、抗生物質、10ng/mlのマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、および100ng/mlのNF- κ B(RANK)リガンドの受容体アクチベーターにおいて分化を誘導した。第3日にプレートに再供給し、破骨細胞は第4日までに明らかに目に見える状態になった。典型的には細胞は、他に示さない限り第4日または第5日に酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)で染色した。TRAP染色用に、細胞はPBSで洗浄し、10%ホルムアルデヒド中に1時間固定した。二回のPBS洗浄後、PBS中で洗浄する前に5分間、0.2%TritonX-100を溶かしたPBS中に細胞をわずかに浸透させた。染色は0.01%のNaphtol AS-MXホスフェート、0.06%のFast Red Violet、50mMの酒石酸ナトリウム、100mMの酢酸ナトリウム、pH5.2中で37℃において20~25分間実施した。細胞は顕微鏡によって見ることができた。

20

【0233】

C-示差的に発現されるmRNAを単離する方法

破骨細胞に特有の示差的に発現される配列を発見する鍵は、本出願人の特許取得STAR技術(Subtractive Transcription-based Amplification of mRNA;1998年1月27日に発行された米国特許第5,712,127号、Malekら)の使用である。この手順では、中間および成熟段階の破骨細胞から単離したmRNAを使用して、破骨細胞前駆体mRNAから調製した相補的一本鎖「ドライバーDNA」とハイブリダイズする「テスターRNA」を調製し、非ハイブリダイズ「テスターRNA」のみを回収し、これを使用して「サブトラクトライブラリー」と呼ばれるクローンcDNAライブラリーを作製する。したがって、「サブトラクトライブラリー」は、マイクロアレイハイブリダイゼーション分析によって見逃されることが多い稀で新規なmRNAを含む示差的に発現される配列が豊富である。これらの稀で新規なmRNAは、より良い診断および治療戦略を開発するための重要な遺伝子標的を代表すると考えられる。

30

【0234】

濃縮「サブトラクトライブラリー」中に含まれるクローンはDNA配列分析によって同定し、それらの考えられる機能は公のデータベース(NCBIおよびGeneCard)において入手可能な情報を得ることによって評価する。次いで非冗長クローンを使用してDNAマイクロアレイを調製し、これを使用して蛍光cDNAプローブとのハイブリダイゼーションによりそれらの相対的な示差的発現パターンを定量化する。2クラスのcDNAプローブ、同じサブトラクトライブラリーから調製したRNA転写産物(サブトラクトプローブ)、または異なる破骨細胞サンプルから単離したmRNA(標準プローブ)のいずれかから作製したプローブを使用することができる。サブトラクトプローブの使用は、保存されておりSTARによって増大する少量のmRNA配列を検出するための増大した感度をもたらす。さらに、破骨細胞に対して示差的に発現される配列の特異性は、それぞれの選択した配列から調製した放射標識プローブと異なる破骨細胞サンプルおよび異なる正常ヒト組織由来のRNAを含むマイクロアレイをハイブリダイズさせることによって測定する。さらに、ノーザンブロット分析を実施して、破骨細胞サンプル中の1つまたは複数の特異的mRNA種の存在を確認する。この後、mRNA

40

50

種の代表的な完全長cDNAおよび/またはスプライシング変異体を大腸菌DH10Bでクローニングする。

【0235】

遺伝子発現プロファイリングにおける大きな課題は、分子分析に利用可能なRNAの限られた量である。多くの破骨細胞サンプルまたはヒト試料(針吸引、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)サンプルおよびトランスフェクト培養細胞)から単離されるRNAの量は、1)STAR用の従来のテスターおよびドライバー材料、2)DNAマイクロアレイ分析用の標準cDNAプローブ、3)発現の特異性を試験するためのRNAマイクロアレイ、4)ノーザンブロット試料および5)他の生物学的検証および特徴付けなどのための完全長cDNAクローンを調製するのに不十分であることが多い。したがって、本出願人はRAMP(RNA増幅手順)と呼ばれる占有技術を開発しており(2005年7月14日にNo.US2005/0153333A1で公開され「Selective Terminal Tagging of Nucleic Acids」という表題の米国特許出願第11/000,958号)、この技術は全RNAサンプル中に含まれるmRNAを直線的に増幅させ、様々な分析用途に十分なマイクログラム量の増幅RNAを生成する。RAMPにより生成するRNAは、直線的転写増幅において使用するために、一本鎖cDNA分子の3'末端に末端配列タグを加えるための占有法の結果として、主に完全長mRNA様配列である。RAMP反応において増幅した99.5%を超える配列が2倍未満の変動性を示し、したがって、RAMPは破骨細胞形成と関係がある特有のmRNA配列の発見を可能にするのに十分な量の不偏RNAサンプルを提供する。

【0236】

D-ヒト破骨細胞サブトラクトライブラリーの調製

2つの異なるドナー(Cambrex、East Rutherford、NJ)由来の2つのヒト初代前駆体細胞、ならびに対応する中間段階(第3日および第7日)および成熟段階(第11~14日)の破骨細胞を、前に記載したのと同様に調製した。各々からのmRNA精製前の細胞RNAの単離は、標準的な方法(Qiagen、Mississauga、ON)を使用して実施した。Malekら(米国特許第5,712,127号)の教示に従い、各サンプル由来の2μgのポリA+mRNAを使用して、テスターおよびドライバー材料を調製するのに必要な特化プラスミドベクターにおいて、非常に代表的な(>2×10⁶のCFU)cDNAライブラリーを調製した。各々の場合、3'固定ヌクレオチド(例えば、A、GまたはC)を有しNotI制限部位を含むオリゴdT₁₁プライマーを使用して第一鎖cDNAを合成した。次に、第二鎖cDNA合成を二本鎖cDNA合成に関する製造者の手順(Invitrogen、Burlington、ON)に従い実施し、生成した二本鎖cDNAはAscI認識部位(New England Biolabs、Pickering、ON)を含むリンカーと連結させた。次いで二本鎖cDNAをAscIおよびNotI制限酵素(New England Biolabs、Pickering、ON)で消化し、製造者により指定されたのと同様Invitrogen(Burlington、ON)からのcDNA分画カラムを使用して過剰なリンカーから精製し、各々をそれぞれテスターおよびドライバー材料を調製するために使用した特化プラスミドベクター-p14(配列番号36)およびp17+(配列番号37)と連結させた。その後、連結したcDNAを大腸菌DH10Bに形質転換し、望ましいcDNAライブラリー(RAW264.7-前駆体細胞-p14、RAW264.7-前駆体細胞-p17+、RAW264.7-破骨細胞-p14およびRAW264.7-破骨細胞-p17+)を生成した。各cDNAライブラリーに関するプラスミドDNAプールを精製し、各々の2μgの等分試料をNotI制限酵素で線状化した。NotIで消化したp14およびp17+プラスミドライブラリーのin vitro転写を、次いでそれぞれT7RNAポリメラーゼおよびsp6RNAポリメラーゼ(Ambion、Austin、TX)を用いて実施した。

【0237】

次に、3'を表すテスターおよびドライバーライブラリーを調製するために、in vitro合成したRNAの各々の10μgの等分試料を、前に記載したのと同様の第一鎖cDNA合成、次にAdvantage-2Taqポリメラーゼ(BD Biosciences Clontech、Mississauga、ON)を使用するプライマー誘導型(p14(配列番号40)用にプライマーOGS77およびp17+(配列番号41)用にプライマーOGS302)第二鎖DNA合成を実施することによって二本鎖cDNAに転換した。OGS77およびOGS302に相当する配列を、cDNAライブラリーを調製するために使用した特化ベクターによりin vitro合成したRNAに導入した。その後、各二本鎖cDNAの6×1μgの等分試料を、以下の4塩基認識制限酵素RsaI、Sau3A1、MseI、MspI、MinPIIおよびBsh12361(MBI Fermentas

、Burlington、ON)の1つで個別に消化し、cDNAライブラリー中に含まれる各RNA種に関する6個までの考えられる3'断片が生成した。消化後、フェノールを用いて制限酵素を不活性化し、6個の反応混合物のセットを回収した。次いで制限酵素部位をT4DNAポリメラーゼを用いて平滑状態にし、AscI認識部位を含むリンカーと連結させた。各リンカーに適合する回収したDNAサンプルをAscIおよびNotI制限酵素で消化し、脱塩し特化プラスミドベクター、p14およびp17(p17プラスミドベクターは、配列番号41に相当する配列以外はp17+プラスミドベクターと類似している)と連結させ、大腸菌DH10Bに形質転換した。それぞれp14およびp17の3'を表すライブラリーに関するプラスミドDNAプールを精製し(Qiagen、Mississauga、ON)、各々の2μgの等分試料をNotI制限酵素で消化し、T7RNAポリメラーゼまたはsp6RNAポリメラーゼ(Ambion、Austin、TX)のいずれかでin vitro転写した。生成したp14の3'を表すRNAは「テスターRNA」として直接使用し、一方p17の3'を表すRNAを使用して、前に記載したのと同様に第一鎖cDNAを合成し、それは次いで「ドライバーDNA」として働いた。各「ドライバーDNA」の反応混合物をRNaseAおよびRNaseHで処理してRNAを除去し、フェノール抽出し、使用前に脱塩した。

【0238】

以下の3'を表すライブラリーを調製した：

テスター1(ドナー1-第3日)-ヒトの中間段階の破骨細胞-3'、p14中
 テスター2(ドナー1-第7日-ヒトの中間段階の破骨細胞)-3'、p14中
 テスター3(ドナー1-第11日-ヒトの成熟段階の破骨細胞)-3'、p14中
 テスター4(ドナー2-第3日-ヒトの中間段階の破骨細胞)-3'、p14中
 テスター5(ドナー2-第7日-ヒトの中間段階の破骨細胞)-3'、p14中
 テスター6(ドナー2-第13日-ヒトの成熟段階の破骨細胞)-3'、p14中
 ドライバー1(ドナー1-第3日)-ヒト前駆体細胞-3'、p17中
 ドライバー2(ドナー2-第3日)-ヒト前駆体細胞-3'、p17中

【0239】

テスターRNAサンプルを、Malekら(米国特許第5,712,127号)の教示に従い1ラウンドまたは2ラウンドのいずれかにおいて1:100の比で相当するドライバーDNAを用いて、米国特許第5,712,127号の教示に従い差し引いた。さらに、テスターRNAを含みドライバーDNAを含まない、ならびにテスターRNAおよびドライバーDNAを含むがRNaseHを含まない、対照反応混合物を調製した。サブトラクション後に各反応混合物中に残存したテスターRNAは二本鎖DNAに転換し、5%の体積を除去し、分析目的で標準的なPCR反応において30サイクルで増幅させた。残りの95%のドライバーのみおよびRNaseHを差し引いたサンプルは、PCRにおいて4サイクルで増幅させ、AscIおよびNotI制限酵素で消化し、半分はpCATRMAN(配列番号38)プラスミドベクターと連結させ、他の半分はp20(配列番号39)プラスミドベクターと連結させた。連結した物質は大腸菌DH10Bに形質転換し、pCATRMANライブラリー中に含まれていた個々のクローンは他の分析(DNAシーケンシングおよびハイブリダイゼーション)用に採取し、一方各p20ライブラリー中に含まれていたクローンは、サブトラクトプローブとして使用するために回収した。各4サイクルで増幅させたクローニングサブトラクトライブラリーは、25,000~40,000コロニーを含んでいた。

【0240】

以下のクローニングしたサブトラクトライブラリーを調製した：

SL90-テスター1(第3日の破骨細胞)マイナスイライバー1(前駆体)(1-ラウンド)、pCATRMAN中；

SL91-テスター2(第7日の破骨細胞)マイナスイライバー1(前駆体)(1-ラウンド)、pCATRMAN中；

SL92-テスター3(第11日の破骨細胞)マイナスイライバー1(前駆体)(1-ラウンド)、pCATRMAN中；

SL108-テスター1(第3日の破骨細胞)マイナスイライバー1(前駆体)(2-ラウンド)、pCATRMAN中；

SL109-テスター2(第7日の破骨細胞)マイナスイライバー1(前駆体)(2-ラウンド)、pCATR

MAN中;

SL110-テスター3(第11日の破骨細胞)マイナスイライバー1(前駆体)(2-ラウンド)、pCATRMAN中;

SL93-テスター4(第3日の破骨細胞)マイナスイライバー2(前駆体)(1-ラウンド)、pCATRMAN中;

SL94-テスター5(第7日の破骨細胞)マイナスイライバー2(前駆体)(1-ラウンド)、pCATRMAN中;

SL95-テスター6(第13日の破骨細胞)マイナスイライバー2(前駆体)(1-ラウンド)、pCATRMAN中;

SL87-テスター4(第3日の破骨細胞)マイナスイライバー2(前駆体)(2-ラウンド)、pCATRMAN中; 10

SL88-テスター5(第7日の破骨細胞)マイナスイライバー2(前駆体)(2-ラウンド)、pCATRMAN中;

SL89-テスター6(第11日の破骨細胞)マイナスイライバー2(前駆体)(2-ラウンド)、pCATRMAN中

【0241】

前に記載した30サイクルのPCRで増幅させたサブトラクト物質の5 μ Lの等分試料を、臭化エチジウムを含む1.5%アガロースゲル上で目に見える状態にし、次いでサザンブロット分析用にHybondN+(Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)ナイロン膜に移した。破骨細胞中で上方制御されることが知られているCTSK(カテプシンK;NM_000396.2)遺伝子、および非示差的に発現されるハウスキーピング遺伝子であるGAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ;M32599.1)に特異的な放射標識プローブを使用すると、CTSKではなくGAPDHのサブトラクションがあったことは明らかであった。これらの結果に基づいて、サブトラクトライブラリーは示差的に発現される上方制御配列が豊富なはずであると予想した。 20

【0242】

E-サブトラクトライブラリー中に含まれたクローンの配列識別および注釈:

前に記載したpCATRMANサブトラクトライブラリー(SL87-95およびSL108-110)中に含まれていた合計6,912の個々のクローンを、Qbot(Genetix Inc、Boston、MA)を使用して60 μ Lのオートクレーブ処理水にランダムに採取した。次いで42 μ Lの各々を、オリゴヌクレオチドプライマー、OGS1およびOGS142を含む100 μ Lの標準PCR反応混合物中に使用し、HotStartTMTaqポリメラーゼ(Qiagen、Mississauga、ON)を使用して96ウェルマイクロタイタープレート中で、40サイクル(94 $^{\circ}$ Cで10分間、40 $\times$ (94 $^{\circ}$ Cで40秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間、および72 $^{\circ}$ Cで2分間)、次に72 $^{\circ}$ Cで7分間)増幅させた。生成したPCR反応混合物は96ウェルフィルタープレート(Corning)を使用して脱塩し、100 μ Lの10mMTris(pH8.0)においてアンプリコンを回収した。各PCR反応混合物の5 μ Lの等分試料を、臭化エチジウムを含む1.5%アガロースゲル上で目に見える状態にし、1つの増幅産物を含む反応混合物のみを、ABI3100機器(Applied Biosystems、Foster City、CA)上で実施される標準的なDNAシーケンシングを使用するDNA配列分析用に選択した。得られた各DNA配列に配列識別番号を与え、後の追跡および注釈のためにデータベースに入れた。 30 40

【0243】

公のデータベース(例えばNCBI)のBLAST分析用に各配列を選択した。これらの配列には、標準的なハウスキーピング遺伝子(GAPDH、アクチン、大部分のリボソームタンパク質など)が存在せず、これはサブトラクトライブラリーが少なくとも比較的多量の非示差的に発現される配列を欠いていたよい指標であった。

【0244】

選択したクローンのシーケンシングおよび注釈がひとたび終了した後、次のステップは、前駆体細胞と比較して破骨細胞中で実際に上方制御された配列の同定を含んでいた。

【0245】

F-上方制御された配列を同定するためのハイブリダイゼーション分析

前に記載したpCATRMANライブラリー由来の注釈付けした配列を表すPCRアンプリコンを使用して、DNAマイクロアレイを調製した。前項で調製した70 μ LのPCR反応混合物中に含まれていた精製PCRアンプリコンを凍結乾燥させ、3 $\times$ SSCおよび0.1%のサルコシルを含む20 μ Lのスポッティング溶液中で各々を戻した。三連の各アンプリコンのDNAマイクロアレイを、CMT-GAP2スライド(Corning、Corning、NY)およびGMS417スポッター(Affymetrix、Santa Clara、CA)を使用して次いで調製した。

【0246】

次いでDNAマイクロアレイを、供給者(Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)により推奨されたのと同様に、標準またはサブトラクトcy3およびcy5標識cDNAプローブのいずれかとハイブリダイズさせた。標準cDNAプローブは、異なるヒト破骨細胞サンプルおよび相当する前駆体細胞から調製したRAMP増幅RNAを使用して合成した。標準cDNAプローブは限られた検出感度のみを与え、およびその結果、cDNAプローブ中に含まれる少量の配列は通常見逃されることは、当業者によく知られている。したがって、ハイブリダイゼーション分析は、異なるテストおよびドライバ物質を表すサブトラクトライブラリーから調製したcy3およびcy5標識サブトラクトcDNAプローブも使用して実施した。Maiekらの教示に従った結果として、これらのサブトラクトライブラリーは少量の配列に関して増大させることが可能であり、したがって増大した検出感度を与えることができる。

【0247】

全てのハイブリダイゼーション反応は、供給者(Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)により推奨されたのと同様にダイスワップ手順を使用して実施し、約500のおそらく示差的に発現される上方制御(>2倍)配列を他の分析用に選択した。

【0248】

G-同定した示差的に発現された配列の破骨細胞特異性の測定:

異なるヒト破骨細胞サブトラクトライブラリーに関するセクションFで同定した示差的に発現された配列を、ナイロン膜ベースのマイクロアレイとのハイブリダイゼーションによって破骨細胞特異性に関して試験した。マイクロアレイは、購入した市販の(Ambion、Austin、TX)4個の異なるドナー(雄3および雌1)、および30の正常ヒト組織(副腎、肝臓、肺、卵巣、骨格筋、心臓、頸部、甲状腺、乳房、胎盤、副腎皮質、腎臓、大静脈、卵管、脾臓、精巣、空腸、大動脈、食道、前立腺、胃、脾臓、回腸、気管、脳、結腸、胸腺、小腸、膀胱および十二指腸)からの6個の個別の実験のヒト前駆体細胞および破骨細胞(中間および成熟段階)からのRAMP増幅RNAを使用して調製した。これらのサンプルの多くに関して入手可能なmRNAの限られた量のために、RAMP法を使用して最初にmRNAを増幅させることが必要であった。各々の増幅RNAサンプルは、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて3 $\times$ SSCおよび0.1%のサルコシル中250ng/ μ Lの最終濃度に戻し、1 μ Lを特殊MULTI-PRINT(商標)装置(VP Scientific、San Diego、CA)を使用してHybondN+ナイロン膜上にスポットし、空気乾燥させUV架橋させた。SL87-95およびSL108-110から選択した合計400の異なる配列を、供給者(Amersham、Piscataway、NJ)により推奨されたランダムなプライマー処理手順を使用して、 α -³²P-dCTPを用いて個別に放射標識し、マイクロアレイにおけるプローブとして使用した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄ステップは、当業者によく知られている標準的な手順に従い実施した。

【0249】

試験した500の配列のうち、約85%がマイクロアレイを調製するために使用した破骨細胞RNAサンプルの全てにおいて、上方制御されたことが分かった。しかしながら、これらの配列の多くは、大部分の異なる正常ヒト組織においてもさらに容易に検出した。これらの結果に基づいて、実験の変動性に関係があったと思われる配列、および有意に高いレベルで他のヒト組織の多くにおいて検出した配列は除去した。結果として、上方制御され非常に破骨細胞特異的であると思われる35の配列のみを、生物学的検証試験用に選択した。この35の遺伝子のセット中には4個(配列番号30~33)が含まれており、この場合大部分の正常組織と比較して成熟段階の破骨細胞において有意な上方制御があったが、これらの遺伝子の発現は前駆体細胞において全体的に低かったもので、これらの遺伝子の発現は定量化後の

正常組織中では高かったと思われる、図30～33;棒グラフ)。しかしながら、正常組織中でのそれらの発現は、成熟段階の破骨細胞のそれよりさらに比較的低かった。したがって、これらの遺伝子は、破骨細胞形成および骨吸収において依然として重要な調節因子である可能性があり、したがって生物学的検証用に選択した。この35配列のサブセットは特にCTSK、TRAP、MMP9、CST3およびCKBなどの同定済みの遺伝子も含まない、何故ならこれらは、破骨細胞中で上方制御されることが文献中で以前に報告されたからである。CST3(配列番号34)に関するマクロアレイのデータを、破骨細胞の吸収プロセスの重要な調節因子であることが既に知られている遺伝子のハイブリダイゼーションパターンおよび特異性を例証するために含める。1つの遺伝子(ANKH;配列番号17)は35遺伝子のサブセット中に含まれたが、骨石灰化において役割を果たすことはデータベース(NCBI-Gene)で以前に報告された。しかしながら、ANKH遺伝子の突然変異から生じた観察した骨の表現型は、破骨細胞中でのその上方制御と特に関連していたわけではなかった。したがって我々のデータは、ANKHの重要な役割は骨のリモデリング中の破骨細胞活性と関連し得ることを示唆する。

10

【0250】

図1～33、38および39は、生物学的検証用に選択した35配列に関する前駆体細胞と比較した破骨細胞および正常ヒト組織の、マクロアレイパターンおよびハイブリダイゼーションシグナルの定量化を示す。35の選択した配列中、24個の遺伝子が機能注解を有し、9個の遺伝子が機能注解を有さず、2個は新規の配列であった(ゲノムのヒット)。破骨細胞の分化および機能の制御と関係がある遺伝子産物の同定は、異常な骨のリモデリングによって特徴付けられる病状の新しい特異的な療法の開発に関する、新規の標的の発見をしたがってもたらした。表1中に要約する代表的な配列は以下に表し、相当する配列は表5中に示す。

20

【0251】

配列番号1:

配列番号1(表5)は、機能未知の推定タンパク質LOC284266をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図1)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

30

【0252】

配列番号2:

配列番号2(表5)は、機能未知の予測オープンリーディングフレーム、C6orf82をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図2)、これらは以前に報告されていない。3つのタンパク質イソ型をコードするこの遺伝子の少なくとも5つの転写産物変異体が、これまで同定されている(NCBI)。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0253】

配列番号3:

配列番号3(表5)は、機能未知のがpH制御のプロセスに関連する可能性がある、推定タンパク質LOC133308をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図3)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

40

【0254】

配列番号4:

配列番号4(表5)は、機能未知の推定タンパク質LOC116211をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、

50

この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図4)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があるとし唆される。

【0255】

配列番号5

配列番号5(表5)は、機能未知の予測タンパク質、LOC151194(肝細胞癌関連抗原HCA557bと類似)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図5)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

10

【0256】

配列番号6:

配列番号6(表5)は、CXCケモカインファミリーに属する炎症性ケモカインである、タンパク質、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5(CXCL5)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図6)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

20

【0257】

配列番号7:

配列番号7(表5)は、アデノシントリホスファターゼ(ATPase)と関係があるタンパク質、ATPase、H⁺輸送、リソソームアクセサリータンパク質2(ATP6AP2)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する。プロトン輸送型ATPaseは、エネルギー保存、二次性能動輸送、細胞内区画の酸性化、および細胞pHのホメオスタシスにおいて基本的役割を有する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図7)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

30

【0258】

配列番号8

配列番号8(表5)は、ユビキチン依存性タンパク質異化と関係があるタンパク質、ユビキチン特異的プロテアーゼ12様1(USP12)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図8)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0259】

配列番号9

配列番号9(表5)は、ユビキチン依存性タンパク質異化と関係があるタンパク質、ユビキチン結合酵素E2E1(UBC4/5ホモログ、酵母菌)(UBE2E1)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。これまで、この遺伝子に関して報告されている2つの転写産物変異体およびタンパク質イソ型が存在する。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図9)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

40

【0260】

配列番号10

配列番号10(表5)は、コレステノールΔ-イソメラーゼ活性を有する可能性があるタンパク質、エモパミル(Emopamil)結合タンパク質様(EBPL)をコードする以前に同定した遺伝子

50

に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図10)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0261】

配列番号11

配列番号11(表5)は、細胞の運動および接着と関連し得るタンパク質、発生および分化促進因子1(DDEF1)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図11)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

10

【0262】

配列番号12

配列番号12(表5)は、受容体活性を有し細胞接着と関連するが依然として完全には特徴付けされていない可能性があるタンパク質、SLAMファミリーのメンバー7(SLAM7)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図12)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

20

【0263】

配列番号13

配列番号13(表5)は、ユビキチン依存性タンパク質異化と関係があるタンパク質、ユビキチン結合酵素E2E3(UBC4/5ホモログ、酵母菌)(UBE2E3)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。これまでに文書化された2つの転写産物変異体が存在し、これらは同じタンパク質イソ型をコードする。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図1)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0264】

配列番号14

配列番号14(表5)は、神経ペプチドホルモンの活性と関係があるタンパク質、ガラニン(Galanin)(GAL)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および結腸以外の他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図14)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

30

【0265】

配列番号15

配列番号15(表5)は、酸化還元酵素活性を有する可能性があるタンパク質、サイトカイン様核因子n-pac(N-PAC)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図15)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、この遺伝子の幾らかの過剰発現が、成熟破骨細胞のそれよりはるかに低い心臓、卵管、脾臓および頸部において見られた。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

40

【0266】

配列番号16

配列番号16(表5)は、細胞接着およびイオン結合と関係があるタンパク質、インテグリ

50

ン α X(抗原CD11C(p150)、 α ポリペプチド)(ITGAX)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図16)、これらは以前に報告されていない。最小の発現、ただし成熟破骨細胞よりはるかに低い発現が、正常組織中、特に副腎、肺および脾臓において、この遺伝子に関して観察される。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0267】

配列番号17

配列番号17(表5)は、組織硬化を制御する可能な機構として示唆されるピロリン酸レベルの制御と関係があるタンパク質、癒着、進行性ホモログ(マウス)(ANKH)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図17)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、この遺伝子は骨石灰化と関係があることが報告されてきている、ただし破骨細胞におけるその上方制御の証拠はない(Malkinら、2005)。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0268】

配列番号18

配列番号18(表5)は、水素輸送ATPase活性、回転機構と関係があるタンパク質、ATPase、H⁺輸送、リソソーム70kD、V1サブユニットAをコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図18)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0269】

配列番号19

配列番号19(表5)は、機能未知のタンパク質FLJ10874をコードする予測オープンリーディングフレーム(第1染色体のオープンリーディングフレーム75)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図19)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0270】

配列番号20

配列番号20(表5)は、インテグリン依存性細胞接着中に重要な役割を有するタンパク質、インテグリン β 1結合タンパク質1(ITGB1BP1)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。この遺伝子に関する2つの転写産物変異体およびタンパク質イソ型が単離されてきている。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図20)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0271】

配列番号21

配列番号21(表5)は、機能未知のタンパク質、チオレドキシン様5(TXNL5)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および食道以外の他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図21)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0272】

配列番号22

配列番号22(表5)は、知られている特定の機能を有していないタンパク質、C型レクチンドメインファミリー4、メンバーE(CLECSF9)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。このファミリーのメンバーは共通のタンパク質折り畳みを共有し、細胞接着、細胞間シグナル伝達、糖タンパク質の代謝回転、ならびに炎症および免疫応答における役割などの多様な機能を保持し有する。我々は、前駆体細胞ならびに肺および脾臓以外の他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図22)、これらは以前に報告されていない。この点において、我々は肺および脾臓中でのファミリーのメンバーとのクロスハイブリダイゼーションを排除することができない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

10

【0273】

配列番号23

配列番号23(表5)は、GTPase活性を有するタンパク質、RAB33A、メンバーRAS癌遺伝子ファミリー(RAB33A)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および脳以外の他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図23)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

20

【0274】

配列番号24

配列番号24(表5)は、カルシニューリンAと相互作用しカルシニューリン依存性シグナル伝達経路を阻害し、中枢神経系の発生におそらく影響を与えるタンパク質、ダウン症に重要な領域の遺伝子1(DSCR1)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。これまでに単離されている3つの転写産物変異体およびタンパク質イソ型が存在する。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図24)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

30

【0275】

配列番号25

配列番号25(表5)は、分泌区画間の小胞輸送と関係があるSNARE認識分子の1つであるタンパク質、SNAREタンパク質Ykt6(YKT6)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図25)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0276】

配列番号26

配列番号26(表5)は、細胞骨格であり、アクチン結合および接着と関係があるタンパク質、アクチニン、 $\alpha 1$ (ACTN1)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図26)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

40

【0277】

配列番号27

配列番号27(表5)は、タンパク質の代謝回転と関係し得るタンパク質、ClpXカゼイン溶解性ペプチダーゼXホモログ(大腸菌)(CLPX)をコードする以前に同定した遺伝子に相当す

50

る(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図27)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0278】

配列番号28

配列番号28(表5)は、炭酸脱水酵素活性を有するタンパク質、炭酸脱水酵素II(CA2)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。この酵素の欠陥は大理石骨病および尿細管性アシドーシスと関係があり(McMahonら、2001)、誘導酸性pH条件下で成熟段階の破骨細胞において上方制御されることが示されてきている(BiskobingおよびFan、2000)。我々は、誘導酸性pH条件と無関係に前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図28)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、この遺伝子の高い発現は結腸および胃中でも観察したが、成熟段階破骨細胞のレベルよりさらに有意に低かった。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0279】

配列番号29

配列番号29(表5)は、その機能が測定されていないタンパク質、ソーディングネキシン(Sorting nexin)10(SNX10)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および大部分の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図29)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、この遺伝子の高い発現は肝臓、脳、肺、副腎皮質、腎臓および脾臓中でも観察したが、成熟段階破骨細胞のレベルよりさらに有意に低かった。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0280】

配列番号30

配列番号30(表5)は、その機能が測定されていないが核酸結合と関係する可能性があるタンパク質、Tudorドメイン含有3(TDRD3)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および大部分の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図30)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、正常前駆体レベルより低いレベルのため正常ヒト組織中でベースラインを超えてこの遺伝子の発現を観察したが、成熟段階破骨細胞のレベルよりさらに有意に低かった。したがって、この遺伝子をさらに選択した。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0281】

配列番号31

配列番号31(表5)は、細胞外空間およびセレンの輸送において酸化防御物質として関係しているタンパク質、セレノプロテインP、血漿1(SEPP1)をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。この遺伝子は多数のセレノシステインを含むセレノプロテインをコードする。セレノシステインは通常の停止コドンUGAによってコードされる。異常なアミノ酸は配列番号78のアミノ酸配列において「U」として示され(表5)、あるいは配列表中ではXaaによって示される。我々は、前駆体細胞および大部分の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図31)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、正常前駆体レベルより低いレベルのため正常ヒト組織中でベースラインを超えてこの遺伝子の発現を観察したが、成熟段階破骨細胞のレベルよりさらに有意に低かった。したがって、この遺伝子をさらに選択した。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリ

ングに必要とされる可能性があると考えられる。

【0282】

配列番号32

配列番号32(表5)は、機能未知の推定タンパク質、KIAA0040をコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および大部分の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図32)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、正常前駆体レベルより低いレベルのため正常ヒト組織中でベースラインを超えてこの遺伝子の発現を観察したが、成熟段階破骨細胞のレベルよりさらに有意に低かった。したがって、この遺伝子をさらに選択した。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

10

【0283】

配列番号33

配列番号33(表5)は、固有の膜糖タンパク質であるタンパク質、ジペプチジルペプチダーゼ4(CD26、アデノシンデアミナーゼ複合タンパク質2)(DPP4)、およびポリペプチドのN末端からX-プロリンジペプチドを切断するセリンエクソペプチダーゼをコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および大部分の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図33)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、正常前駆体レベルより低いレベルのため、胎盤、肺、卵巣、腎臓、前立腺および小腸以外の正常ヒト組織中でベースラインを超えてこの遺伝子の発現を観察したが、成熟段階破骨細胞のレベルよりさらに有意に低かった。したがって、この遺伝子をさらに選択した。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

20

【0284】

配列番号34:

配列番号34(表5)は、タンパク質、シスタチンC前駆体、およびシステインプロテアーゼの阻害剤であることが知られているシスタチンファミリーのメンバーをコードする以前に同定した遺伝子に相当する(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図34)、これらは以前に報告されていない。しかしながら、シスタチンCが破骨細胞による骨吸収を阻害する際に重要な役割を果たすことは十分に文書化されている(Brageら、2005)。したがって、この遺伝子に関するハイブリダイゼーションプロファイルは、破骨細胞と関係がある高度に上方制御され且つ特異的な配列のよい一例である。

30

【0285】

配列番号85

配列番号85(表5)は、新規の遺伝子を含む第1染色体上で見られる未知のタンパク質(クローンRP11-344F13)をコードする(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図38)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

40

【0286】

配列番号86

配列番号86(表5)は、知られているタンパク質をコードしていない。変形性関節症軟骨サンプルから単離したBQ182670に相当するデータベース中の未知の遺伝子および整合Est配列(表1参照)。我々は、前駆体細胞および他の正常ヒト組織と比較して、この遺伝子が中間および成熟段階の破骨細胞において著しく上方制御されることを実証しており(図39)、これらは以前に報告されていない。したがって、この遺伝子は破骨細胞形成および/または骨のリモデリングに必要とされる可能性があると考えられる。

50

【0287】

H-破骨細胞mRNAから選択した配列の完全長cDNAのクローニング:

完全長cDNA配列を得て、発現したタンパク質の機能試験を実施することが必要であった。スプライシング変異体は組織特異的機能とますます関係しており、したがって、試験中の系からのcDNAクローンをを用いて作業することが重要である。本出願者は、スプライシング変異体が常に関係し得ないことも理解している。したがって、本出願者の手法は破骨細胞から直接関連する完全長cDNA配列を単離して、変異体および特異性に関するそれらの考えられる役割を同定することになっている。

【0288】

コードcDNAクローンを、5'-RACE戦略(Invitrogen、Burlington、ON)とPCRにおける標準的な2プライマー遺伝子特異的手法の両方を使用して単離した。5'-RACE戦略は、キャップ選択した破骨細胞のRNAおよび/またはRAMP増幅させた破骨細胞のRNAから調製したcDNAを使用した。遺伝子特異的プライマーを使用する増幅用に、RAMPRNAまたは全RNAから調製したいずれかのcDNAを使用した。全てのcDNAは、標準的な逆転写手順(Invitrogen、Burlington、ON)に従い合成した。得られたcDNA配列は大腸菌DH10Bにクローニングし、多数のクローンのヌクレオチド配列を決定した。その後、各セットのcDNA配列をアラインメントをとり、オープンリーディングフレーム(ORF)は標準的なソフトウェア(例えば、ORFFinder-NCBI)を使用して同定した。表2は、それぞれアクセッション番号NM_213602およびNM_001014433(NCBI)に相当する公開済みの配列のコード領域と同一であった、ヒト破骨細胞サンプルから得た配列番号1(配列番号83)および配列番号2(配列番号84)のコード領域の、cDNAクローンのコンセンサス配列を示す。

【0289】

I-RNA干渉試験

RNA干渉は、mRNAを分解に関して標的化することによる遺伝子の発現の配列特異的低下と関係がある近年発見された遺伝子制御機構であり、元来植物において記載されてきたが、原生動物および無脊椎動物から高等真核生物まで多くの動物界において発見されてきている(Agrawalら、2003において総説された)。生理的設定では、RNA干渉の機構は、21~23 bpのsiRNAを放出するDicerと呼ばれ細胞内で活性があるRNaseIII様タンパク質によって切断される、二本鎖RNA分子の存在によって誘発される。siRNAは、相同性誘導式に、mRNAの存在下でRISC(RNA誘導サイレンシング複合体)と呼ばれるRNA-タンパク質混合体に複合体形成して、そのmRNAの発現の減衰をもたらす分解を引き起こす(Agrawalら、2003)。

【0290】

遺伝子ノックアウトマウスおよび優性ネガティブなどの遺伝子の機能を試験するための現在の手法は、しばしば効率が悪く、かつ一般に高価であり、かつ時間がかかる。RNA干渉は、迅速かつ比較的安価な方法で多数の遺伝子を分析するための選択法であることが判明している。合成siRNAのトランスフェクションは有効な方法であるが、その効果はせいぜい一時的であることが多い(Hannon G.J.、2002)。安定したトランスフェクションによる短いヘアピンRNAを発現するプラスミドの送達は、より長期の試験でRNA干渉の分析を可能にした点において成功している(Brummelkampら、2002;Elbashirら、2001)。さらに、より近年の進歩は、レンチウイルスなどのウイルス送達法を使用して初代ヒト細胞において、短いヘアピンRNAの形でのsiRNA分子の発現を可能にしている(Leeら、2004;Rubinsonら、2003)。

【0291】

J-破骨細胞形成に対するノックダウン効果の測定

ヒト候補遺伝子用のスクリーニング法を開発するために、RNA干渉を適合させてshRNAをヒト破骨細胞前駆体細胞に送達し、その結果候補遺伝子の発現を減衰させることができた。したがってこの手法は、わずかに発現したこれらの遺伝子を含む細胞における破骨細胞の分化を実施させて、存在する場合このプロセスにおけるそれらの要件を決定することができるはずである。

【0292】

この目的のため、市販のレンチウイルスshRNA送達系(Invitrogen、Burlington、ON)を使用して、特異的shRNAをヒト破骨細胞前駆体細胞に導入した。使用した技法は、他に言及しない限り製造者により記載されたのと同様であった。この実施例では、今まで試験した2つの候補遺伝子、配列番号1(AB0326)および配列番号2(AB0369)に関して得た結果を表す。これら2つの遺伝子の両方によってコードされるタンパク質は、機能未知の。配列番号1および配列番号2を特異的に標的化するために使用したshRNA配列は、それぞれ5'-CAGGCCAGGAGTCCAATT-3'(配列番号42)および5'-TCCCGTCTTTGGGTCAAAA-3'(配列番号43)であった。簡単に言うと、shRNAの発現用の鋳型をレンチウイルス発現ベクターにクローニングし、293FT細胞においてウイルス構造タンパク質用の発現ベクターでコトランスフェクトした。2日後、レンチウイルスを含む上清を回収し-80℃で保存した。Cambrex(East Rutherford, NJ)から購入したヒト破骨細胞前駆体を24ウェルプレートに接種し、マクロファージコロニー刺激因子を含む完全培地中で培養し、3日間接着させた。PBSで洗浄した後、対照として細菌lacZ遺伝子に特異的なshRNA(IacZshRNA)または配列番号1(AB0326shRNA)または配列番号2(AB0369shRNA)を含むいずれかのレンチウイルス粒子の20MOI(感染多重度)で細胞を感染させた。24時間後、感染した細胞は5~8日間100ng/mlのRANKリガンドを含む同じ培地で処理して、前駆体細胞からの破骨細胞の分化を可能にした。成熟状態の破骨細胞はホルムアルデヒドで固定し、以下のようにTRAP発現用に染色した:細胞はPBSで洗浄し、10%ホルムアルデヒド中に1時間固定した。二回のPBS洗浄後、PBS中で洗浄する前に5分間、0.2%TritonX-100を溶かしたPBS中に細胞をわずかに浸透させた。染色は0.01%のNaphtol AS-MXホスフェート、0.06%のFast Red Violet、50mMの酒石酸ナトリウム、100mMの酢酸ナトリウム、pH5.2中で37℃において20~25分間実施した。染色した細胞は光学顕微鏡によって見ることができ写真撮影した(倍率:40倍)。多核破骨細胞の数の有意な減少を、lacZshRNA(図35AおよびB;上図)感染させた前駆体細胞と比較して、AB0326shRNA(図35A;下図)およびAB0369shRNA(図35B;下図)で感染させた前駆体細胞から観察した。したがって、両方の場合共、各レンチウイルスshRNA(それぞれ配列番号42および43)(表4)は、破骨細胞形成を乱した。これらの結果は、配列番号1(AB0326)および配列番号2(AB0369)をコードする遺伝子の発現が、破骨細胞の分化に必要とされることを明らかに示した。

【0293】

前に記載した実験と類似の実験を、他の配列(配列番号3~配列番号33、配列番号85または配列番号86)に実施する。

【0294】

K-RAW264.7モデルを使用した破骨細胞形成におけるAB0326(配列番号35)のマウスオルソログの生物学的検証

同定した標的を使用してヒト破骨細胞の分化および活性を減衰させることができる治療用分子を発見するための、薬剤スクリーニングアッセイを開発するための手段として、他の破骨細胞分化モデルに変更することが必要であった。RAW264.7(RAW)破骨細胞前駆体細胞系は、ネズミの破骨細胞形成モデルとして当技術分野でよく知られている。しかしながら、RAW細胞を一過的にトランスフェクトすることが困難であるため、RAW細胞中でshRNAを構成的に発現させる手法として、安定したトランスフェクションを使用した。これによって、同定したヒト標的のマウスオルソログに特異的な特定のshRNAの存在下で、破骨細胞分化などの長期の試験を実施することが可能であった。

【0295】

RAW細胞はAmerican Type Culture Collection(Manassass, VA)から購入し、10%ウシ胎児血清および抗生物質を含む高グルコースDMEM中に保った。細胞は最大10~12代まで二週間に一回継代培養した。破骨細胞分化の実験用に、RAW細胞を 4×10^3 個の細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに接種し、24時間平板培養した。高グルコースDMEM、10%チャコール処理ウシ胎児血清(Hyclone、Logan、UTから入手)、0.05%BSA、抗生物質、10ng/mlのマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、および100ng/mlのRANKリガンドにおいて分化を誘導した。第3日にプレートに再供給し、破骨細胞は第4日までに明らかに目に見える状態になった。典型的には細胞は、他に示さない限り第4日または第5日にTRAPで染色した。

【0296】

shRNA発現カセットをRAW細胞の染色体に取り込ませるために、pSilencer2.0プラスミド(配列番号47)をAmbion(Austin, TX)から購入し、配列特異的オリゴヌクレオチドを製造者により推奨されたのと同様に連結させた。2つのshRNA発現プラスミド設計し、AB0326(配列番号35)遺伝子発現のマウスオルソログを減衰させるために使用した配列は、5'-GCGCCGCGGATCGTCAACA-3'(配列番号44)および5'-ACACGTGCACGGCGGCCAA-3'(配列番号45)であった。如何なる哺乳動物遺伝子とも知られている相同性を有しておらずスクランブルshRNA配列を含む、Ambionにより供給されたプラスミドも、これらの実験中に陰性対照として含めた。RAW細胞を 5×10^5 個の細胞/ウエルの密度で6ウェルプレートに接種し、プロトコル中に記載されたのと同様にFugene6(Roche, Laval, QC)を使用して1 μ gの各プラスミドでトランスフェクトした。2 μ g/mlのピューロマイシンを含む培地において安定したトランスフェクタントを選択した後、細胞系を増殖させ、破骨細胞形成に関してRANKリガンドの存在下で試験した。

10

【0297】

安定的にトランスフェクトした細胞系はRAW-0326.1、RAW-0326.2およびRAW-ctlと表した。三連の96ウェルプレート中に、ウェル当たり4000個の細胞を接種し、100ng/mlのRANKリガンドで処理した。4日後、破骨細胞をTRAP発現に関して染色し、光学顕微鏡によって見ることができた(それぞれ左図および右図中に示したように、倍率は40倍および100倍であった)。

【0298】

20

RAW-0326.2系に関する代表的な結果を図36中に示す。RAW-0326.2細胞系は、スクランブルshRNAを含む細胞系と比較して(図36;上図)有意に少ない破骨細胞を生成した(図36;下図)。RAW-0326.1細胞系は、AB0326のマウスオルソログの減衰も示したが、顕著ではなかった(データ示さず)。したがって、配列番号42および43に関して観察したのと同様に、マウスオルソログに対するsiRNA(配列番号44および45)(表4)は、マウスモデルと同様に破骨細胞の分化を表現型に関して乱すようである。これらの結果は、レンチウイルスshRNA送達系を使用してヒト破骨細胞前駆体細胞において得た結果(セクションJ)と組合せて、ヒトとマウスの両方において、AB0326遺伝子産物は破骨細胞形成に明らかに必要とされることを実証する。

【0299】

30

L-破骨細胞形成の阻害剤をスクリーニングするための、RAW264.6細胞における配列番号1(AB0326)に関する機能的相補性アッセイ

破骨細胞の分化を減衰することが可能である小分子を発見するための配列番号1(AB0326)に基づくスクリーニングアッセイを確立するために、ヒトAB0326をコードするcDNAをRAW-0326.2細胞系中に導入した。したがって、ヒトAB0326がRAW264.7細胞におけるマウスオルソログと同じ機能的役割を果たす場合、それはRAW-0326.2細胞系の破骨細胞形成能力を取り戻すはずである。

【0300】

この作業を実施するために、pd2-hAB0326と呼ばれるヒトAB0326の完全長cDNAをコードする真核生物発現ベクターで、RAW-0326.2細胞系をトランスフェクトした。この発現ベクター(pd2;配列番号47)は市販のベクター、pd2-EGFP-N1(Clontech, Mountain View, CA)から改変し、この場合EGFP遺伝子をヒトAB0326のcDNAの完全長コード配列と交換した。AB0326遺伝子の発現は強力なCMVプロモーターによって誘導した。安定したトランスフェクタントは抗生物質、G418を使用して選択した。これは、ヒトAB0326遺伝子産物を発現しAB0326のマウスオルソログが発現抑制されたRAW-0326.2細胞系をもたらした。対照として、AB0326shRNA活性を補うはずがないpd2空ベクターで、RAW-0326.2細胞をトランスフェクトした。さらに、pd2空ベクターをRAW264.7細胞にトランスフェクトして、他の対照として働かせた。細胞の安定した集団を選択した後、ウェル当たり4000個の細胞を96ウェルプレート中に接種し、100ng/mlのRANKリガンドで4日間処理した。ホルムアルデヒドを用いた固定後、TRAP、破骨細胞特異的マーカー遺伝子に関して細胞を染色した。図37中に示すよう

40

50

に、空pd2ベクターでトランスフェクトしたRAW-0326.2細胞は、RANKリガンドの存在下では破骨細胞を形成することができず(中央図)、マウスAB0326shRNAはさらにこれらの細胞におけるAB0326遺伝子の発現を抑制することができることが示される。逆に、ヒトAB0326(pd2-hAB0326)でトランスフェクトした細胞は救済され、したがってRANKリガンドに応答して破骨細胞により効率良く分化する(右図)。空ベクター(pd2)を含むRAW264.7細胞が、RANKリガンドの存在下で破骨細胞の形成に悪影響を与えることはなかった(左図)。これらの結果によって、AB0326のマウスおよびヒトオルソログは、破骨細胞の分化において機能的に保存されることを確認する。

【0301】

この特定の型の細胞系アッセイは、ヒトAB0326と結合しその機能を阻害することができる化合物をスクリーニングするための基盤として今や働くことができる。化合物ライブラリーをこの「救済」細胞系に施用して、AB0326を阻害することができる分子(小分子薬剤、ペプチド、または抗体)を同定することができた。TRAPの発現の低下によって測定した破骨細胞分化の任意の低下が、ヒトAB0326活性の低下を示し得る。このアッセイは、RAW細胞における適切な破骨細胞分化に必要とされる任意の遺伝子に適用可能である。任意のヒト遺伝子用の相補性アッセイを開発することができ、薬剤スクリーニングの基盤として使用することができる。

【0302】

前に記載した実験と類似の実験を、他の配列(配列番号3～配列番号33、あるいは配列番号85または配列番号86)に実施する。この型のアッセイを使用して、NSEQまたはPSEQの活性または発現を増大または低下(例えば、阻害)することができる分子をスクリーニングすることができる。

【0303】

本発明のNSEQ、その方法、組成物、使用、そのアッセイあるいはその他において、ポリヌクレオチドは個別または集団(集合的)のいずれかで、より詳細には(または以下のいずれかを含むまたはこれらからなってよい)；

【0304】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号85または配列番号86のいずれかの翻訳可能部分；

【0305】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号85または配列番号86の翻訳可能部分と実質的に同一である配列；

【0306】

配列番号1の翻訳可能部分、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号85または配列番号86の転写可能部分の断片と実質的に相補的である配列；

【0307】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、

10

20

30

40

50

配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号85または配列番号86の翻訳可能部分と実質的に同一である配列の断片；

【0308】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号85または配列番号86の翻訳可能部分と実質的に相補的である配列の断片；

10

【0309】

または前述のいずれかを含むライブラリー。

【0310】

本発明のPSEQ、その方法、組成物、使用、キットアッセイあるいはその他において、ポリペプチドは個別または集団(集合的)のいずれかで、より詳細には(または以下のいずれかを含むまたはこれらからなっており)；

【0311】

配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79または配列番号80；

20

【0312】

配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79または配列番号80の断片；

30

【0313】

あるいは配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79または配列番号80の生物活性類似体、変異体または非ヒトオルソログ。

【0314】

当業者は、全ての哺乳動物のオルソログは当技術分野で充分確立した技法を使用して同定および確認することができること、および本開示は決して一種の哺乳動物に限られないことを容易に理解するはずである。本開示の目的の用語「哺乳動物」は、ヒト、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどの家畜および農業用動物、および動物園用動物、スポーツ用動物、またはペット用動物を含めた、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。哺乳動物はヒトであることが好ましい。

40

【0315】

前に論じた実験中の配列は、特許請求し本発明の範囲を決して制限しないNSEQの代表的なものである。破骨細胞形成および破骨細胞機能におけるNSEQの役割の開示は、骨のリモデリングプロセスをよりよく理解するための当技術分野における必要性を満たし、骨のリ

50

モデリングおよび関連障害に関する診断、予後、治療、予防および療法の評価に有用である新しい組成物を提供する。

【0316】

遺伝子操作、分子生物学および薬剤標的開発の分野は、最近20年で大幅に進歩してきている。遺伝子配列および相当するタンパク質配列に関して新たに同定した機能によって、遺伝子配列が関係している障害または病状用の研究ツール、診断ツール、療法および治療を開発するための実社会の適用例において、これらの配列、変異体および誘導体を直接的または間接的に使用することができることは、当業者には容易に明らかであるはずである。

【0317】

本発明をその好ましい実施形態によって本明細書で前に記載してきたが、添付の特許請求の範囲中に定義する本発明の精神および性質から逸脱せずに、本発明を修正することができる。

【0318】

【表 2 A】

表1-破骨細胞において見られた示差的に発現された配列。

ヌクレオチド配列番号	NCBI Unigene番号/ 遺伝子記号/遺 伝子ID	アクセシ ョン番号	ORF ヌクレオチド 位置/ポリペプ チド配列番号	機能
配列番号1	Hs.287692 / CD33L3 / 284266	NM_213602	150-1136 配列番号48を コードする	推定タンパク質LOC2842 66;膜関連機能は未知
配列番号2	Hs.520070 / C6orf82 / 51596	NM_001014 433	104-700 配列番号49を コードする	第6染色体のオープンリー ディングフレーム82;膜関 連機能は未知
配列番号3	Hs.546482 / LOC133308 / 133308	NM_178833	633-2246 配列番号50を コードする	pHの制御におそらく関連 する推定タンパク質LOC1 33308
配列番号4	Hs.135997 / LOC116211 / 116211	NM_138461	112-741 配列番号51を コードする	膜貫通4L6ファミリーメン バー19;機能は未知
配列番号5	Hs.558655 / LOC151194 / 151194	NM_145280	172-82 配列番号52を コードする	推定タンパク質LOC15119 4
配列番号6	/ 6374	NM_002994	119-463 配列番号53を コードする	ケモカイン(C-X-Cモチー フ)リガンド5前駆体;ケモ カイン活性
配列番号7	Hs.495960 / ATP6AP2 / 10159	NM_005765	103-1155 配列番号54を コードする	ATPase、H ⁺ 輸送、リソ ソームアクセサリタン パク質2;受容体活性
配列番号8	Hs.42400 / USP12 / 219333	NM_182488	259-1371 配列番号55を コードする	ユビキチン特異的プロテ アーゼ12様1;システイン 型エンドペプチダーゼ活 性
配列番号9	Hs.164853 / UBE2E1 / 7324	NM_003341	175-756 配列番号56を コードする	ユビキチン結合酵素E2E1 イソ型1;リガーゼ活性
配列番号10	Hs.433278 / EBPL / 84650	NM_032565	53-673 配列番号57を コードする	エモパミル結合関連タン パク質、 $\Delta 8$ - $\Delta 7$;膜に不可 欠

10

20

30

40

【表 2 B】

ヌクレオチド配列番号	NCBI Unigene番号/ 遺伝子記号/遺伝子ID	アクセッション番号	ORF ヌクレオチド位置/ポリペプチド配列番号	機能
配列番号11	Hs.106015 / DDEF1 / 50807	NM_018482	29-3418 配列番号58をコードする	発生および分化促進因子1;膜
配列番号12	Hs.517265 / SLAMF7 / 57823	NM_021181	16-1023 配列番号59をコードする	SLAMファミリーのメンバー7;受容体活性
配列番号13	Hs.470804 / UBE2E3 / 10477	NM_006357	385-1008 配列番号60をコードする	ユビキチン結合酵素E2E3;リガーゼ活性
配列番号14	Hs.278959 / GAL / 51083	NM_015973	177-548 配列番号61をコードする	ガラニンプレプロタンパク質;神経ペプチドホルモンの活性
配列番号15	NM_032569 / N-PAC / 84656	NM_032569	19-1680 配列番号62をコードする	サイトカイン様核因子n-pac;3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ様
配列番号16	Hs.248472 / ITGAX / 3687	NM_000887	68-3559 配列番号63をコードする	インテグリン α X前駆体;細胞マトリクス接着
配列番号17	Hs.156727 / ANKH / 1827	NM_054027	321-1799 配列番号64をコードする	癒着、進行性ホモログ;骨石灰化の制御
配列番号18	Hs.477155 / ATP6V1A / 523	NM_001690	67-1920 配列番号65をコードする	ATPase、H ⁺ 輸送、リソソーム70kD、V1サブユニットA、イソ型1;プロトン輸送;ヒドロラーゼ活性
配列番号19	Hs.445386 / FLJ10874 / 55248	NM_018252	139-1191 配列番号66をコードする	推定タンパク質LOC55248
配列番号20	Hs.467662 / ITGB1BP1 / 9270	NM_004763	170-772 配列番号67をコードする	インテグリン細胞質ドメイン関連タンパク質1;細胞接着
配列番号21	Hs.408236 / TXNL5 / 84817	NM_032731	77-448 配列番号68をコードする	テオレドキシン様5;機能は未知

10

20

30

40

【表 2 C】

ヌクレオチド配列番号	NCBI Unigene番号/ 遺伝子記号/遺 伝子ID	アクセシ ョン番号	ORF ヌクレオチド 位置/ポリペプ チド配列番号	機能
配列番号22	Hs.236516 / CLECSF9 / 26253	NM_014358	152-811 配列番号69を コードする	C型レクチン、スーパー ファミリーメンバー9;膜に不 可欠
配列番号23	Hs.56294 / RAB33A / 9363	NM_004794	265-978 配列番号70を コードする	RAS関連タンパク質Rab-3 3A;低分子量GTPase介在 シグナル変換
配列番号24	Hs.282326 / DSCR1 / 1827	NM_004414	73-831 配列番号71を コードする	カルシプレシン1イソ型a; カルシニューリンAと相互 作用しカルシニューリン 依存性シグナル伝達経路 を阻害する
配列番号25	Hs.520794 / YKT6 / 10652	NM_006555	158-754 配列番号72を コードする	SNAREタンパク質Ykt6;分 泌区画間の小胞輸送
配列番号26	Hs.509765 / ACTN1 / 87	NM_001102	184-2862 配列番号73を コードする	α -アクチニン1;細胞骨格 の構成成分;カルシウムイ オン結合
配列番号27	Hs.113823 / CLPX / 10845	NM_006660	73-1974 配列番号74を コードする	ClpXカゼイン溶解性プロ テアーゼXホモログ;タン パク質分解のエネルギー 依存性調節因子
配列番号28	Hs.155097 / CA2 / 760	NM_000067	66-848 配列番号75を コードする	炭酸脱水酵素II;炭酸脱水酵 素活性
配列番号29	Hs.520714 / SNX10 / 29887	NM_013322	216-821 配列番号76を コードする	ソーティングネキシン10; 機能は未知
配列番号30	Hs.525061 / TDRD3 / 81550	NM_030794	258-2213 配列番号77を コードする	tudorドメイン含有3;核酸 結合
配列番号31	Hs.275775 / SEPP1 / 6414	NM_005410	101-1246 配列番号78を コードする	セレノプロテインP;防御 と関係がある細胞外空間

10

20

30

40

【表 2 D】

ヌクレオチド配列番号	NCBI Unigene番号/ 遺伝子記号/遺 伝子ID	アクセシ ョン番号	ORF ヌクレオチド 位置/ポリペプ チド配列番号	機能
配列番号32	Hs.518138 / KIAA0040 / 9674	NM_014656	921-1382 配列番号79を コードする	KIAA0040;新規のタンパ ク質
配列番号33	Hs.368912 / DPP4 / 1803	NM_001935	562-2862 配列番号80を コードする	ジペプチジルペプチダー ゼIV;アミノペプチダーゼ 活性
配列番号34	Hs.304682 / CST3 / 1471	NM_000099	76-516 配列番号81を コードする	システインプロテアーゼ 阻害剤活性
配列番号85	なし / なし / なし	AL357873	新規	新規
配列番号86		AL645465 /BQ182670	新規	新規

10

20

【0319】

【表 3】

表2は、成熟段階のヒト破骨細胞サンプルからクローニングした配列番号1および配列番号2のコンセンサス配列を示す。

配列識別	ORFヌクレオチド 位置	ポリペプチド配列 番号
配列番号83	1-987	配列番号48
配列番号84	1-471	配列番号49

30

【0320】

【表 4】

表3-AB0326に関するマウスオルソログの一覧表

配列識別	NCBI Unigene クラスター	アクセッション 番号	ORFヌクレオチ ド位置	ポリペプチド 配列番号
配列番号35	なし /LOC620235 / 620235	XM_884636	122-1102 / 神経細胞接着分 子と類似2/未知 の機能	配列番号82

40

【0321】

【表 5】

表4-プラスミドおよびshRNAオリゴヌクレオチドの他の配列識別の一覧表

配列識別	名称	記載事項
配列番号36	p14	STAR用ベクター
配列番号37	p17+	STAR用ベクター
配列番号38	pCATRMAN	STAR用ベクター
配列番号39	p20	STAR用ベクター
配列番号40	OGS 77	STARp14ベクターに使用したプライマー
配列番号41	OGS 302	STARp17+ベクターに使用したプライマー
配列番号42	ヒト0326.1	配列番号1のsiRNA配列
配列番号43	ヒト0369.1	配列番号2のshRNA配列
配列番号44	マウス0326.1	配列番号35のshRNA配列
配列番号45	マウス0326.2	配列番号35のshRNA配列
配列番号46		pSilencer2.0ベクター
配列番号47		pd2ベクター

10

【 0 3 2 2 】

【表 6-1】

NucleotideSequence
(5'-3')

SEQIDNO.:1

TCGGCTCCGGCAGAGCCACAGGGACCTGCAGATCTGAGTGCCCTGCCACCCCGCCCGCTTCTTCCCGCCACACAGCCCTGGCA
GGGCTTCACTGGGAGGTGGCGAGAACGGGTCTGCCCTGGGGTGTTCAGATGCTCAGCATGGAATAGTCCATCTGGCTGCTGG
CCTGCTTGGCTGGGTTCTCCGACAGGCTCATTTGTGAGAACTAAATAGATACTACGGAGAACTTGCTCTCAACACAGAGGTGCACA
GCTGCCACGGCAGCGCTGCTTCATATGAGTGCCACCGAGGTGAGCGCGAGGCGAGGCGAGTGTCTGCCCTGCACCTTCA
CGACCCGACCGCCACTACGACGGCCGTACGGCCATCTGGCGCGCGGGGAGCCCTATGCGGGCCCGCAGGTGTTCCGCTGG
CTGGCGCGGGGCGAGCGAGCTCTGCCAGCGGCTGAGCTGCACGGCCCTTCGCGCTGCTGGGCAACCCCGCCGACGAC
TCTGCTGGCGGTGAGCGCTCGCTGCTGACGACCGCGGCTACTTCTGCGCTGAGATTCCGCGGCGACGTCCATGACCGCT
ACGAGAGCCGACCGGCTCGGCTGACGCTGACAGCGCGCGCGGATGCTCAACATCTCGGTGCTGCGCAGTCCGGCTCAGCCT
TCGCGCGCTGTGCACTGCGAGGGAGACCGCGCGCGCTCGCTGGTCCGGCCCGCTGGGCAACAGCTTGCGCAGCCGCTG
GGAGCCCGCTGAGGGTACGGCCACTAGTGAACCGCCGAACTGCCCGCACTGACCAATGACGCGCGCTTACAGCTGAGCGCGCA
ACAGCTGGCGCTCCGAGCGCAGCTGTACTGTTCGCTTCCATGCGCGCAGCGGGGCTCGACGGTCCGCTTCCGCTGGCGG
CTCTCGCTTCAAGCGCTGCTGCTGCTGGGTTCTGGCTCGCGCTGCGCGCTGCGCGCGCTCGACGGTCCGCTTCCGCTGGCGG
CCGACCAAGTGTCCAGGCGCGAGTCCCAATTATGAAATTTAGCAGATGAACCCCGGAGCCCGACCGACCATGCTGCTCAC
GTGAGGAGTCTTCACTACACATTCATTTACGACTGTAAAGACAAAGGCCAGTGCAGGCTTGGCTGGCAGACGACGCTCT
GGTCTCGGCGACCTTGGCAGCCCGAGCTGGGTGGCTCTCCCTGCTCAGGTCAAGACCTGCTCAAGGAGGCTCATCTGGCT
CTATGTGACCAACCAATTCGGAGCTCCCTGATATTTTTCGACGATTTGCTAAATGTGATACGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
AGAGAGAGAGAGAGAGTACAGCATTAGCTTGAAGCTGAACTTCCAGANAATGTTCCCTTGCCCTTCTTACCTTAGAACACCTGCT
TATAGTAAGCAGACAGGAACTGTGTAATAAAAAA

ORF3

SEQIDNO.:18

MEKSIWLLACLAWVLP TGSFVET
KIDTTENILANTEVHSSPAQRWEM
QVPEVSAEAGDAAVLPCTFTHP
HRHYDGLTATWAGEPYAGPQV
FRCAARGSELCTALSIGHGFR
LLGNPRNDLSIRVERLALADDR
RYFCRVEFAGDVHRYESRHRGVR
LHVTAPRIVNISVLPSPHAFR
ALCTAEGEPPPALAWSGPALGNS
LAAVRSPREGHGLVTRIELPALT
HDGRYTCANSLGRSEASVYLF
RFGHSGASTVALLGLGALFKAL
LLGLVLARAARRRPEHLDTPDT
PPRSQAQESNYENLSQNPSPSP
ATMCSIP

【表 6 - 2】

97

SEQIDNO.: 2	SEQIDNO.: 49
ACGCAACGGGCGTGCATTTCGGGCGACGCTCTGCAGATCGGGTAGTCGATTGGTCAAGTCTCCATGGCTCCTTCTATCAGGAG GTGGGCAACCGGCCATGATAGGGTCGGGATGGCTGGCTCTGGAGGCGCAGGTGGTCTTCTTCTACTGTACATGTTGCGCGCT GTTTCTAATCACGTCGCTGCCACCCAGGCTCTCTGCTCTCTGCTCTTGTGTGGATGCGCGCGCTGCTGCTGCGCCCTCCGCTT TTTGTGCTACCCCGAGTCTTGTGACCATGGCTCTGGAAGCCCTCCGACCCAGCCCTGCGCCCTCGGATTCGGCTCTGGCTA CGTTCCGGCTCGGCTCTCTGAGCCCTTGTACTTGCCCAACGAGAAAGGTGCGCCAGGAGATCGCCAGGCGCTGTTGGGAGAGCG CTTAGCAGCTGGTCAACCTTCATCCCTCAGATTACATCATCTATGATGGAAGGAGATCGAGGAGACAGTGAAGTGTGAT GATGATTAAACCCAAAGTTCTTGTGCTCCAGCTTTCAGAGATTTTGTGCTGTCACCCCTTACGAGTGGCCGAGGTAATTGC ATTGCTGTGGAACAGGGGAACTTTCCGTACCTGCGAGTGGTGGCCAGCTCACAGAGTCACTTCTGACTCTATCAGATCCTGCC ATGATGAGCCCTGTCTCTGCTCATCATGAAGATCCCGCGATACCTTCAACGCTTCTGACTTCCAGGTGATGAGTGGCCCCCAATA AATCCCTCTTTGGGCTCTCTGCGCAAAAAA	MIGSLAGSGGAGGSPSTVTWCA LFSNHVAATQASLLLSFVWMPAL LPVASRLLLLPRVLLTMASGSP TQSPASDSSGXYVPGSVSAFV TCFNEKVAKEIARAVVEKRLAAC VNLIPOITSIYENWKIEEDSEV LMMLKTQSSLVPALIDFVRSVHP YEVAEVIALPVEQGNFPYLOWVR QVTESVSDSITVLP

10

20

30

40

【表 6 - 3】

SEQIDNO.: 3	SEQIDNO.: 50
CGGTGTCGTGTCATCTCGGGAAGACTCGGCGCCCTGGGTCCGGCTCTCTGGGTAACTTTCGGGAAGCTTTCGGGAGCTCGCT GGTCTCGGCCCCAGAAAGCTCGGAGCCCGCCAGGAGGATAGCAGCTGAAGACCGCGCGGTGCCCTCGAGGCCCGCGGACGT GGGCCCATGGTTCGGCTGGCGCACCTTTCGGGGGAGCCACGCGCACCAGCAGCTCGACCGGTGCTACCCCGCCCGCCGAC CTEAAACCGGCGGAGGACACAGGGGTCGCGTCCGCGCCCCGAGCAACCCATGCTTACTCCGAGCTGCTACCCGCGCCCGGAC GTCGGAGCTCCCTCGCGGGTTCGCCAGGCGGTTCGTGCGAAGAGCGGCGGACCTACACGCGGTCCGCGCCCTGAGACCGCTTT ATCTGAGCTCAACGAGCCTCCCGCTCGAGCTGGGAAGATGCGGGAATCGGGAACCCACAGCGCGGTGCTAGACCGGCTCCGC CGCTCCCCACAGCCCTTCTCTAATGCTTCAGAGGAGCTTGGTCGACTTCGCGGAGCTGCCAGATCTGCTCTCTCTCTCTCTCTG TGTATCTTCTTAATATAAATAATGGGGATGAAGATAAAGAAATACATATGAAGATAGATCAACATCCACAGGAATGAATACA CGCCCTCCATGATCAGAGCAGAGGAGACAGTTATGAGCTCAAGGTATAGATGCAAAATGAACCAACAGAGGAAGATATC TTTTGAAGAGCAGTGAATAAGCTACAGAAACACCAACTGAACCAATACAGCTACAGAGCTGAGACATGATGCTGCTGCTGCTG CACATGCTTACTGACAGGCTCATACAAATGTTACCATATGTTCTTCTGCTGGCTGATGTTGCTCAATTTACTGCGCAGTCAAT GTCTTCTGGAGGAACCTAATTTGGAATATAATCTTATTTCTATGTCGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTACATGCTCCACTGCTCTCTCTCTG AGATCAAGCACAAGTGGCTTCTCTCTCTGAGAGCATAGCCCTGCTATATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CCTGAAGAGTTAAAGGCGTTGTTGTAAGACCTGCTCATGGGTCCCTGATTTGTTGAGGCGGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG ACCTGCTGGGTTTACCAATGGCAATGGGANTTTAATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TCCCTTTGAGGAGGAGCTATGCTGTTGAGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TCATGCTTCAACACATGCTTGGGCAATGCTTTCATTCAGTACTTCCAGCTTCTGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TTGGTGTGGCACTGGTCTG TGGCTTCTCTGAGGCTG TCTTTTGGACTAATTTGACTACATTTCTGATGGTGTGTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CAGTATGATACGAATTTGACTACATTTCTGATGGTGTGTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GGCTTCCAAAGGCCACAGTTGAGGCTG ATGGAATGGATGTGTTGACAGTGGCAATTTTGTCCATCTCTCATCACAGCCCAATTTGGAAGTCTGCTTATTTGCTTACTGCTG GGCTTCTGAGAAAGTTGAACATCAAAATAAAGATGAGAGAGTTCAGGAGAGAGCTTCTGTCAGATTTAGAGGTGAAGAGAGAG TGCTGAACATTAATTTAGAAAGCTGCTACTTTTTCAGATGCTATTTGAATATGTAATGTTTAAAGCTTAAATGTAATAGAAC AAAAGTGTAGCTGCTTCTTTTAAACAGCATTTTGTAGCCCTTGTCTTCTTCCATGCTGGGTGCTAATGATTTCTATATCTCCCA AAAAAAAA	MGDEDKRITYEDSEFPSTGMNTP SMHQAQOETVMKLGIDANEPT EGSILLKSSEKLOETPTENHV QRLQMLACPPHGLLDRVTINVT IIVLLWAVVWSITGSECLPGML FGIILFYCALIGKLLGLKLP TTBPLPSLLGMLLAGFLIRNIPV INDNVQIKHWSSSLRSIALSII IIVRAGLGLDSKALKKLGVCVRL SMGFCIVEACTSALLAHXLLGLP WQWGFILGFVLGAVSPAVVPSM LLLQGGYGVGKGVPTLLMAAGS FDDILAITGFNTCLGIAFSTGST VENVLGVLVVIIVGATGSLVGF FIOYFPRSDDKLVCKRTFLVLG LSVLAVFSSVHFPGSGGLCYL VMAFLAGMWTSEKAEVEKLIIV AWDIFQPLFLGLIGAEVSIASLR PETVGLCVATVGIIVLIRILITF LMVCFAGFNKKEKIFISFAWLPK ATVQAAIGSVALDTRSHGEKQL EDYGMVLTVAFLSILLITAPIGS LLIGLGRLLQKVEHQNKDESV QGETSVQV

10

20

30

40

99

40

100

40

101

40

102

[illegible]

40

103

40

104

40

【表 6 - 1 1】

[illegible]

10

20

30

40

【表 6 - 1 2】

107

AGTCTTTTCCCGAGGGGAAGTTATGTTCTGCAATAGTGTGTCCTTATTTTACGTGTTGAACAGCAATGCTATTATTTT
TTTATTGCTAGAACTTCAACATGTTGTATAGGAATCCCTGTAGTGGCCACTAGTTAAATGCCGAATTCCTCATCTGGATGTTACCATCA
AACATCAGTACACTTGTCTCATTTCCACATGTGTTTAATGTGACAGTTTTTCAGTACTGTATGTGTTAAATTTCTACTTTTTTAAATATT
AAATTCCTTTTAAATAAACATATATCTCAGTTGATCCC

10

20

30

40

108

40

109

40

【表 6-15】

110

[illegible]

10

20

30

40

【表 6 - 1 6】

111

ATGAGCAATTCTTAGGCTCAGCTCTTGATACGGAACCGAGTGTCTTCACTCCAGCCAGCATCATGGTCTTCGGTGTCTTCCCGGGCCC
GGGGTCTGTGGGAGGGAAGAGAACTGGGCCTGACCTACCTGAACTGACCTGGCCCTCGAGGTGGGTCTGGGACATCTCTAGAGGCC
TACATTTGTCTTGGATAGGGACCGGGGGGCTTGGATGTTGCAAAANAAGTTACCCAGGGATGTCAGTTTTTTTATCCCTC
TGCAATGGGTGGATTTCCAAATCATATTTGCAAGAAGGCCAGCATTTACGATGCAATATGTAATTATATATAGGGTGGCCCA
CACTAGGGGGGGTCTTCCCCCTACACAGCTTTGGCCCTTTCAGAGNTTAGAACTGGGTAGAGGATGCGAGAAGCGAGTGG
GGGAGGCAGGGAAGATGCTGTGCGGTTTGTAGCACAGTTCAFTTCACTGGGATTTTGAAGCATTTCTGTCTGAAACACAAAGCCTG
TTCTAGTCTTGGCCGAACACACTGGGGGTGGGGCGGGGGAAGATGGGTATGAAACCGGTTAGTCAATTTTGTCTTAATTTGTT
GACAAATCTGTAAAGTTCTTTTATGAATATTTCTGTTAAGCTATTTCACTTTCTTTTGAATCTTCCCTTTTAAGGAGAAAA
TGTGACACTTGTGAAAAAGCTTGTAAAGAAAGCCCTCCCTTTTCTTTTAACTTTAATGCAATCTAGGTAATTAAGTTGT
GAATTTTATTTTGTCTTTGTTTAAATGAACATTTGTCTTTCAGATAGGATTTGTGATPATGTTTAAATGGCAAAAACAAAA
TGATTTGTGCAATTAAACAAGCTACTGCAAGAAATAATAAAACACTTCTTGGTAAACACAAAAAATAAAAAA

10

20

30

40

【表 6 — 1 7】

112

[illegible]

10

20

30

40

【表 6 - 1 8】

113

[illegible]

10

20

30

40

114

40

【表 6 - 20】

115

CAGACCTGCGCATGACTTTTCCTGAAGGCTTGCTTTTCCCTCGCCTTTCCTGAAGGTGCGCATTAGAGCGAGTCACATGAGCATC
 CTAAGTTTGCAATTTAGTTTACAGTGAACTGAAGCTTTAAGCTCAATCCAGCATTCCTAAATGCCAGGTTGCTGTAGGGTAACCTTTT
 GAAGTAGATATATACCTGGTCTGCTATCCTTAGTCATTAACCTGCGGTACAGGTAATGAGAAATGTACTACGGTACTTCCCTCCC
 ACACCATACGATAAAGCAAGACATTTTATAACGATACCAAGTCACTATGTGGTCCCTCGAATAAAGCATTCGAAATCCCATGCA
 GTGCAGTATATTTTCTAAGTTTGGAAAGCAGGTTTTCCTTTAAATAATTAAGACACGGTTCACTAAATGNTTTAGTCAGA
 ATTCTAGACGTGAAGAACCTTAAACAAAATAATTTTAAAGATATAATATATGCTGTATATGTTATGTAATTTATTTTAGGCTAT
 AATAATTTTCCCATTTTCCATTAARUTGCTCTTAATACAAATACGGTGAATGCTGTGCTCAACATACCTGCAATTTTGA
 ACGTATTGTATCAATGAACATTTGACCTTATTGGCAGCAGTTTATATAAGTCCGTCAATTTGCAATTTGAATGTAAGGCTCAGTAAATG
 ACAGAACTATTTTCAATTAATGGGTAACTGGGGAATAAATGGGTCACTGGGTAGGNAAGTGCANAGCTGGAAAGGCAAAAATGA
 GAAGAAAAGGCAGGCCCTTTGTGTCTACCGTTTTCAGTGTGTGTGATCATATTTCTTCCTCACAGCAAAAGAAATGCAAGGCCA
 TGGCTGTCTTCTCAGAGTGGCTTTCTCCATTAATACATATAGTACTGAAATAATTAAGTTGCAATAGCTGCTTTTGCAGTGGTT
 TTAATGTTAGCTGTGAACATGCCAGGTTGCAATTCACATTCCTGGSHACCCAGTGTGATGGGTGTGCCACGTGGGGCATGTCCCT
 TCAGAGGCAGATCTGAGAAATTAATAAAATCTCAATGTATCAGCTTTTAAAGGACHTTACTAGAAATTAACAGTATTTT
 TTAACATGTGTGACTTTCACTCTCTGGGGTTGGAGCTTAAGATCCAACTGAGAAAGCAGCCCGGGCATGGTGGCTCATGCCCTGT
 AATCCCAACACTTGGGAGGCCAAGGAGGGTGGATCACCTTAAGGTTGAGAGCTTGGAGACCATGGCTGGCCACATGGCAAAACCCCTGT
 CTCTACTAAACATATAAATTAGCTGGGGTGGTAGCATACTGTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCCAGAGAAATTTGC
 TTGATCCTGGGAGGCAGAGGTTGTAGTGAGCCGAGATCGGCCCATCGCACTCCAGCTTGGGTGACAAAGAGCAAAACTCCATCTC

10

20

30

40

【表 6 - 2 1】

116

SEQIDNO.:18

GACAGCCTCTGGCTCGGTGGTACAGTCTCTGCACCTCGCGCCGCCAGCAGCAGTAAACTAACATTAATGGATTTTTCGAAGCTACCC
AAGATATCTCGATGAGATAPAGAAGACACATTTGGSTATGTCATCGGGTCTCAGAGCCTTGCGTTACAGCCTGTGACATGGCGGCT
GCAAGCCTATGATGAGCTGGTGGAGAGTGGGCGCAGACGCAATGGTTGGAGAGATTAATCGATTGGAGGAGCATGGCTACTACTATG
GTGATCAAGAAACTCTGGGTGCTGGTGGAGACTCTGTACTTCCAGACTGTAATACCCCTCTCTGTAGAGCTTGGCTCTGGCAAT
ATGGGAGCCATTTTGAATGATTAACAAAGACCTTTGTGCGATATCAGCAGTCAAGCCAAAGCATCTACATCCCCAGAGGAGTAAAC
GTGTCTGCTTAGCAGAGATACAAATGGGACTTTACCTTGCBAACAACTTAGGGTTGTGTGTCATATCACTGGCGGAGACATTT
TATGGAAATGTCAGTCAGAACTCGCTTATCAACACAAATCACTGTATCCCCACGAAACGAGGAACGTGAACTGTACATTTGCTCCA
CCTGGGAATATGATACCTCTGATGTGTCTGGAGCTTGAATTTGMAAGGTGTAAGGAGGAGTTCCACATGGTGAAGTATGGCCCT
GTACGTCAAGTTCGACTGTCTGAGAAAGCTGCCGCCAATCACTCTGTGTGACTGGCCAGAGTCTCTGATGCCCTTTTCTCCG
TGTGTCCAGGGAGGAACCTACTGCTATCTCCCTGGAGCCTTTGGCTGTGGAAAGACAGTGAATCAACAGTCTCTATCCAGTATATTAAC
AGTGAATGAATCTATGTAGATGTGTGAAAGAGGAATGATGTCTGAAGCTCTCCGGGACTTCCAGAGCTCACATTCAGAC
GTTGATGGTAAAGTAGAGTCAATATGAAGAGGACAGCTTTGGTAGCCATACCTCCAAATATGCCCTGTGTAGAGAAAGCCTCT
ATTTATCTAGGAATCACACTGTAGAGTACTTCCGTGACATGGGCTATCATGTGATATGATGGCTGACTACTCTTAGATGGGCT
GAGGCCCTTAGAGAAATCTCTGCTGTGTAGCTGAATATGCTGACAGATAGTGGATATCAGACCTATCTGTGGCGGCTCTGGCCCTCG
TTTTATGAACGACAGCGAGGTGAATGTCTTGGAAATCTTGAAAGAGAGGAGGTGCGACTATGTAGGAGCAGTTTCTCCACCT
GCTGGTGAATTTTGTGATCCAGTTACATCTGCCACTCTGACCTACAGCAGTATATGCTGCTGTGATGATATAGATAAGAACTAGCTCAACCT
AAGCATTTCCCTCTGTGCTCATCTGCTCATCTGACCTACAGCAGTATATGCTGCTGTGATGATATATGACAAACACTTCAACAG
TTCGTTCCCTCTGAGGACGAGCTAAGGAATTTCTGCAGGAAGAGAGACCTGGCAGAAATTTGTACAGCTTGTGGGAAAGGCTTCT
TTGGAGAAACAGATAAATCACTCTGAGGTAGCAAACTTATCAAGATGATTTCTCTACAAACAAATGGATATACTCTCTATGAC
AGGTTCTGCCCATTTCTACAGCAGTAGGATGCTGTCAACATGATGCAATTTATGATATGGCTCGTAGAGCTGTGTGAACCACT
GCCAGAGTGCATAAATACATGTTGCATTAATGCTGAGCAATGGGAGACATCTCTATTAACATTTCCCTCCATGAATTTCAAG
GATCTACATGAAGATGGTAGCAAGATCAAAAGGCACTTCTTGAAGACATGACAACTTCTTGAAGATGCAAGTCCGTAGCTTGAA
GATTACAGCCCTTGAAGATTAACACTGTGATTTCTCTCTCAGCAGCTCTCTATGTGATATTTTCTGAAATTTCTCATCTCAAA
CCCTTGTCTCTTATGTGCGCTTGAAGCTTAGCCTATGTGTGTTATTTGTTTCCCTGTTTCTGTTTGGTAGGTCTTATATAAA
CAAAATCTCTTGTCTAGTTGTGGAAGGCCCTCTCTCTCTTATCTGAGAGTGTGAATATAGTAAATATACATCTCTGTTAC
ACTACTGAACCTGTATGAGGAGTATGACCTCTTGTCTCTAGGTGTACCTCTCTCTCATCTCTATTAATTTGAACAGGACTTA
CTGATGTACTCTCTTGTGAGTGAATTTGGAATGGAGGCCAGGTTCTATPACTTTTGAACAGGTACTTGTGGAATGACTCAAT
TCTATGTGTTAGTCACTGTGGCAGTTAGCATTTCCCGCAGTATAAATCAGGATGTTTGTGAGAAATTTTAAATTTTCAAAACATATGAT
ATGTTTCAATATGATCACTCTCCCGCAGTATTTTGTGAGAAACCATTTGGGAGCTATACTCTTTTATTTTAT
TATTTTATTTTATTTTATTTTGTGGGAGGAGTGTCTCTTGTGCTCCAGGCTGTGAGTGCAATGGCGTGTCTTGGCTCA

SEQIDNO.:19

MDPSKLPKILDEDKESTFGYVHG
VSGPVATACIDMAGAAATVELRVG
HSELVGEIIRLEQMATIQVYEE
HSELVGEIPVLRGTGRPLSVLQGP
GIMGAIFDGIQRFPLSDISSQTSQ
IYIPRGNVNSALSRLDKWDFTEP
KNLVRGSHITGGDIYGVISENSL
IKKKIMLPFRNRGVTWYIAPPGN
YDTSVLELEFEFGVKEXFTMVQ
VWPEVQVRPVTEKLEPANHPLLTG
QRVLDAIFPCVQGGTATLPGAFG
CGKTVLSQSLSKYNSDVIYVQ
CGERNEMSEVLDPPELTMEVD
GKVESIMKRTALVANTSNMPVAA
REASITGTITLSEYFRDMGYHVS
MMADJSTRWAEALREISGRLEAM
PADSGYPAYLCAARLASFYERAGR
VKCLGNPERGESVSIYGAIVSPGG
GDFSDPVTSATLGIQVFWFGLDK
KLAQRKHFPNSNWLISYSKYMRA
LDEYVHFFTEFVPLRTRKXELL
QSEEDLAEIVQLVGKASLAEIDK
ITILEVAKLIDKODFLOQNGYTPYD
RCPFFYKTVGMLSNMIAFYDMAR
RAVETTAQSDNKITWSLIREHMG
DILYKLSMKFPKPLKDGEXAKIK
SDYQALLDQNAFRLSLED

10

20

30

40

【表 6 - 2 2】

117

CTGCAGCCCTCCCGGTTCAAGTATCTCTGCTCAGCCCTCCGAGTAGCTGGATACAGGCAATGCTCCACATGCCCCA
 GCTAATTTTGTATTTTAGTAGAAACGGGTTTACCATATTTGGTCAAGCTGGTCTGCACTCCAGACCTCAGGTGATCCGCCACC
 TCGGCTCCCAAACCTGCTGGGATACAGGCTGAGCCACCGGCTCCGCCAGGACTATACCTCTTTTAAATAGACATTTGTGGGG
 CTCACRAATATATGAATACCTCTTAAAGAGAGAAAAAATCAGCGGCTCAAACTAGAGCAACATTTCTTATTAAAG
 CATAGTTTATTTTCTACATAGAAATAATTTAATATCAAGGACTATTACATCTTCACTACTAGGAAGTTCTTTTAAATGACACATTAA
 ACAATCACTGAAAACCTGATCCACATCAACCCCTGTTTATTTCTTAAACAUCCTTGGAAAGCTTAAAGTCTGAGAAATCATGTGGCA
 AGTGTGATGGGCGAGTAAATACAGAGAGAGATGTTTAGTAGCAATTAAAGGCTGTTTGACCTTTAAGGACAGCTGGCTGTAGTG
 ATTCCTGGGGCCAGAGTGGCATTTATGTTTACAAATAATGACATATGTCACATGTTTGCAATGTTTGTGCTTGTGAATTTTGTG
 AACAGCCAGTTGACCAATCATAGAAAGTATTACTTTCTTTTCAATGTTTGTGTTTCACTGGCTTAAAGAGTTTCTCAGAAATATCTA
 TGGCCACAGCAGCATACAGTTTCCATCCTTAATAGGAATGAATTAATTTTGTATCTACTGATAACAGAACTCTGGTCAATGA
 AAAATCATTTTATCCGCTTTTAAAGTATATGTTTAAATAATTAATTTATGCTGCTGATATGCAACAGCTCTCAGAGCAACAGT
 TTCCCATTAATCTCTTTGACCAATAGGCTGGCAACGTTGCTTCTTTGGGAAGAGGAAAGGGTGTGTGAACATGGCTAACAT
 CTTCAATACCCAAATTTGTGATAGCAATAAATAAAGTATTATTTATGCTCAGTATATTTATTTAAATTTTGTAGGTAAATGCTTA
 TCTCTTGGTCTATTAAGGAAGAGCAATCAGTAGGAATTCAGGATAGTTTGTGTTTAAATCTTCAGATTTACATGTTTACAGT
 GGCCTCTATTGAGGAAGGTATTCTTCATACAACCTTGTGTTTAACTTTGAGAACATTCAGAGAAATTAAGCAATGGTTTGTGAG
 ATACGACTTGATGGCTGTTTAAACAGTTTGTGCTTCCAAAGTGGCTACTCAAGAGGCCCTTAGACTGGTAGAAATTAAGGATTT
 TCAAAAACCTTCTATTCCTTTTAAACCTACAGCAAACTAGGATTTGATAGCAATGAATGGTATGATGAAGAAAGTTTGACCAA
 ATTTGTTTTTTTGTGTTGTTGTTTGAATTTGAATCATTCTTATTCCTTTAAGAAATGTTTATGTAAGATGTGAGATGCT
 AGCGAACCTTGTCTCAGATATTCAATGTAAGTCTTCCCTTCACTGTTACAGAGTTTTCAGATCGGTCACTGATGATGTTATTTCTTT
 AGTAAGAATGTTTAAATACATGATCTTTTAAAGATGATGACGTTCTGTTATTTATGCTGCTGTTGCTGCTGCTTAAAGTGGGC
 CAAATTAAACAGTTTCTATGTTATTTTCCAGTGTGATGATCTCAGACTGTTTGAATAATTTCCCTTCCATCTCCTGAATACGAAT
 AGAAGAGGCCATATATTTGCTCTCTTATCCTTGAGATTTTCACTACCTTTTANGTTAAAGTTGTGTATTAATTTGTTAAATCTGTGAA
 AGAATAAAAAGTGGATTAAATTAATAAAAAA

10

20

30

40

118

40

119

40

120

SEQIDNO. : 22

TGGAGCTGAACCTCTTAAAGACAAAGTGTTTATCTTTCAAGATTCAATCTCCTCCTGAATCTTACCAACAACAAAACACTCCTGAGGAGA
AAGAPAGAGAGGAGGAGAGAGAAATAGAGAGAGAGAGAGAAATCAAAAAACCAAGAGAGAGAGAGAGAAATGAATTCATCTTAATCATCTGTA
AACCAATATGACAGAGAGAGAGATGCTTCTCTCCCAAATGCTTTATGAGGACGTGTCTGAGATCCCACTCTTAATTTCTCAGTGGCTG
TTTCACTCACAGATGTGTCTGACATTTTCGCACTCTTTCAAACCTGTATGAGAGAAAGATTTTCAGCTACCTCAGAAATTTCTCAGAGAGCT
CTCTCTGCTACAATATGATCAGGTTCAGTCAAGAAATGTTGTCTCAATGAACTGGGAATATTTTCAATCCAGCTGCTACTTCTTTTC
TACTGACACCAATTTCTGCGCGTTAAGTTTAAAGAACTGCTCAGCCATGGGGGCTCACCTGGGTGTTTATCAACTCAGAGGAGGAGCA
GGAATTCCTTTCTACAGAAACCTTAAATATGAGAGAGTTTATTTATGGAATGTCTCAGACCAGGTTGTCGAGGGTTCAGTGGCAATGGGT
GGACGGCACACCTTTGACAAAGTCTCTGAGCTCTGGGATGTAGGGGCGCCAACTAATAGTACTACCTGGAGGAGCTGTGCCACCAAT
GAGAGACTCTTTCAAACCCAGGCAAAATTTGGAATGATGTAACCTGTTTCTCAATATTTTTCGGATTTGTGAAATGTTAGTAAATATAA
TCTTTTGAACAAAGGAATCTCTTTAAGAACAGAGGCACTCAACTCAATTTTCTCAATTTTCTGATTTGTGAAATGTTAGTAAATATAA
CCGCCCCACACGAGAAATTTGTGCGCTGAACCTTCAAAGGAGACTTCAATAGTATTTGTACTCTGATATAAATATAAATAAATGATGTTT
AAATGTTAATATTCAGTTACTGGCTGAAGTGCAATTTCTCTACTAGTTAGTCTCAGGCTCTTCCAGAAATTTTCAAAAGCAATTC
ATACCTTTTGCTACATTTGGCTCAATTTTGTAGTTTCTGTAAGAAAGTACAGGACACAGGAGCCAAAGACAGAGCTCTAGCAAAAGAGGG
GATTTTGAAGGTGCTCTTCAAATCTCTGATATCCGGGCTCTGTAGAGGCTCTCTCTTCTTCTAGCTTCTGACAGTCTGTCTTC
TCTTCTTGGTTTATACCGTTCTTATCTCTGCCCCAAGCATATATCTGCTCTTTACTCCCTGTATATAATGATAGAGAGCTTCTTCA
AGTCATGAAACTTATTTCTGCTCAGAAATACCGGTGTGGCTTTCTGGCTACAGGCTCCACTGCACCTTCTTAGGAAAGGCAATGCC
AGCCATGAGCTTCAAACAGGCTGTAAACCAAGTCCACCTGAGCTCTTGGGCTCTCTTGTCTGCCCTTATTTCAATGCACTGAATGGA
TCTCACAGAAATTTGTATCTATTGCTCAGCTAGGACCCGAGTCCAAATGTCATTTATTTCTAAGCGAATTCATCTCCACACTTTC
CTGTCTCAGGCCATCCATTAATTTCTTAACTTTTATTTTATTTTCTGAGCTTTCGGGGTACATGTTTAAAGGCTTTTATATAGGTAAACTCATG
TCGTGAGGTTTGTGTACAGATATTTATCAACCCAGGATTTATTTCCCTTTTATGAGTATGAAATTTATTTTTCGGGCTCTCTCCCTCTCT
CCTACCTTCCGCTCAGTAGATCTCAGGTCTGTATTTCCCTTTTATGAGTATGAAATTTCTCATCATTTAGTCTCCCACTTATAA
GTGAGCAATGCTAGTATTTGTTTCTGTCTCCCATGTTTCTGTTAAGGATATGGTTTTCAGTCTTACGATGTTCCCAACAAAGACAT
AATTTCTTTTATGAGGCTGTAGTATTTCCATGAGTATCTATGATCAATTTCTCTATCCAAATCTATGTTGAGTCTCATTATAGA
TTGATTTCCATGTTTGTGCTATTTGGAATAGTGCTGCAATGAACTTCTGTGTGATGTCTTTAUGGTAGAAAGATTTATATTTCTC
TGAGTATGATCCAGTAATAGCCUATTCATTTATTTGCAATAAATTTCTACCAATAC

SEQIDNO. : 69

MNSSKSEITQCTERGCESSQMFL
WTVAGIPILFLSACFTTRCVVTF
RIFOTCDEKKFQLPBNFTLSCT
NYGSGSVKNCCLPLNWEYFOSSCY
FFSTDTLSWALSLSKNCSSAMGAHL
VWINSQEEQEFLSYKKPKMREFF
IGLSDQVVEGQWOWVDGTPLTKS
LSFWDVGEPPNLTATLEDCAIWRD
SSNPRQNWADVTCFLNYFRICEM
VGINPLNKGXSL

40

【表 6 - 2 6】

SEQIDNO.: 23	SEQIDNO.: 70
CCTCCTCTCCCTGGCTTTTGTGTGTGTGCTCCGAGCTGCAAGGAGGGTGGCTGGAGGAGGAGGGGGCCCGAGTGAGAGGC ACCCCTTTACGCGCGCGCGCACACAGGTCGCGCGCAC GAGCTGCTCGCTCGAGCGCACAGAGTGGAGCTTCTTTGTGTGAGCTTCTCAAGGGGGGTGGGGGCCCCGGTTCCGGTCCCGGG GAGATGGCGCAGCCCATCTCGGGCCATGGGAGCTGCGCCGCTCGGCGCTTGGCTGGCTTCCCTGGAGTCCGACTCGTCCGCTG GACCACTACGTGCGAGATTGCGATCTTCAAAATAATCGTGTGGGACTCCACGTGGGCGAGACTGCTCCGCTTCCGCTTCTGC GGGGTACCTTCCAGACAGACTGAAGCCACCATCGGCGTGGACTTCAGGGGAGAGACCGTGGAAATCGAGGGCGAGAGATCAAG GTTCAGGTGTGGGACACAGCAGGTGAGGAGACGTTTCCGCAAAAGCATGGTCCGAGCATTAACCGCAACGTAATGCGTGGTCTTC GTCTATGACGTCAACAGATGACATCTTTCAACCACTCAAAATGTGGATCCAGAAATGCAATGGGCAATGCTGTGCCCTCCACTAGTC CCCAAAGTGTGTGGGCAACAGTGTGACTTGAGGGAACAGATCCAGGTGCCCTCCAACTTAGCCCTGAATTTGTGATGCCAC AACATGCTCTTGTGGAGACATCGGCCAAGGACCCCAAGAGAGGCCAGAACGTGGAGTCGATTTTCATGTGCTTGGCTTGGCGATTG AAGGCCCAGAAATCCCTGCTGTATCGTGATGCTGAGAGGCGAGGGAAGGTGCAAAACGTGAGTTCCCAAGGAGCTAACAGT AAAACCTTCCTGCTCTTGTGAAACCAACGATATAATAACAAGATAAATATCACTGGAGTTTCTTCCCTTTTCTGTGCTT GCATAATGCTGACACCTGCTTGTTCATACAAATTGATATCAAAATATAAATTTGTATGATTAAATAAATAAATAAATAAATAA	MAQPILGHSLOPASAAAGLASDE LDSSLDQVQIRIRFKLIVIGDSN VGKTCLEFRFCGGTFPDKTEATI GVDFREKTVEIEGEEKIKVQWDT AGQERFRKSMVEHYRNHVVVF VYDVTKMTSFTNLKMWIQECNGH AVPFLVPKVLVGNKCDLREQIV PSNLALKFADAHNMILLFETSAKD PKESQNVESIFMCLACRLKAQKS LLYRDAERQQCKVKQKLEFPQBAN SKTSCPC

122

40

123

40

124

40

125

[illegible]

40

40

127

40

【表 6-3-3】

[illegible]

129

[illegible]

40

130

SEQIDNO.:32

CCGGGGCCCTACACGCCAGACCTGGCTCGGGGTGGAGTGCAGAGGCAACCAAAAGGAAACCCACACACCTCCCTCCAGGGCCCGGGGG
GCTGTACAGACGGGCGACCAACGAGAGATTCCCTGGGCCCTGCAGGAAGCCCTTCGCGGAGCCCAAGATTTGTTCCCAATTTGGAGA
TGAAGAACTGAGACTCAAGACGAGCTGATGACCTTCCCAAGGACACATGAACTGGCGGGTGTATCAGATCTGATTCACACAGG
CGGTGTTTCAGGCATTGTTTACTACGTTGAACCTGACCTCCAGGAAGACAGTTCGGCGGAGATCCCTTCACACCGCAAGCAAGAA
GTAACTGTGAAGAGGCTCCCAAGCTGGCTGGCCATTTCGTCTGT
TGAAGAGGAAATAATTACAAGTGGTCAAGTTGCAATCTTTTGTAGCCCAAGGACCTGCTGTAAAGCGGAGAGGGTTCCTGTGGCCCTA
ATCTAGCCCAAGCACCATGAGAGAAATCAGTGGCTTTCTTCAGCTCTATCTGGGACACCATCTGTGACCAACACCAAGAGGACATCTAC
AACACCATCTGCTGGGAGTCTCTGGGCTTGCCACTCTTGTGTATCATCACACTCTCTTCTATCTGTGTCCATTGTCTGTGGAGC
CTGCTCAACCCAGCTTCAGATGGAGAGAGACCATCACTGCTGT
GCTTAGGCTCTCTCTEACACACACACACATTTTCAGAACCCCTGTAAATATGTACTATGTCCATGTCCACAGAGTAATCTACTCAAC
CHAGGAACAACTCAGACTAGTGTCCAGTGGAGGACGTCCTCCAGGACCAAGTGGHCAATTTCTTGGATATCTGTCTTGGCAGCTA
TGTTGTCATAGCAATGCTCTTACTGCAGACCCAGGACATGCTCTCCACCTGTCTCTGGCATACCCCATGCAACAGCACAAAGAAC
ATTATTCATACATCTCAATATGGTTCCCAAGTGTGTGCATGCGTATACACACACACACACATTCAGGTAGCAGGTACCTGTGG
GCAAGTATTTCTGCTCATCAANAGTTCATTGGCTATGTACTTTGTGTGAGGGAAGTACATTAATCTACAGTCAAAAATGTCTCATG
TTACAGATGACATGCTTCTATTCTTAATCTACACATAAATCTTTACTGGAAGTACTCTAATATTGACATTTCCAGCAACCTGCTAC
AGTCCCAACCTTGTGTGTCTTGTATACAGACACACCAAGTTTCTGTGCTGTGACCTGTGACCCCTCACCTGTGCCAAGATGTTTAAAGTGA
TGGTTCAAAATTCATTGAAGCTTTCTTGTACTCATGACAAAGTCCGCTCTCATTTGCCACTGAGAGGTGTTAATGTGATFCCA
AGACCTCTGTGTGAACATTAACCCCGCAACCATCCTCAGCAAGTGCCCTTCTCCAGCAAGAACAGAGCTCTTGGTGGTGAATG
CTAGAAATATGAGGAGCCCTCACTTAATATGTCAGTGGACGTGCAATGTGTGTAATGTGTGCAATGTGTACAGATGAGNAAGGTTGAGGAG
ATGTCAACCTGAGCTAGETATCTCTATATAACCAAGTTTCAGCAGAGGAACTGTACATGTACATCATGTCAGTCTCTCAGAGAA
GGCAACACTGGBAGTGTCAWAAGCTTGTGATGTGTGTCAGGCTATGSCACAGTGGGATGCGAGGTTACAGAGTTTAAATGA
GTAGGATGAAGCTAPAAAGAGGTTTATTATTATTATATTGAAGCTCAGGCAAGTCTTCCCAAGTGTCTTCCCGAGTGTCTTCTCTTAAAGTGA
GTGGTTACTGTTGGATATGTGATGTGTGTTAAGGTTAGCTTGTATATGCTGAGAGACACATGTAGGTGACACATGTGCTTGGAGTATGTGAGG
GCCCACTAAATTGCTGCAATGGATGAATTTGGGTGTTTAAATGCTGAGAGACACATGTAGGTGGAAGCAGAGTTTATCCACTTATAGGATG
ACATGTAAATTAGATFCCACAGTGAAGCTGAGGAGGCTTTCCCGCCAGAGTGAAGTTGGGAAGCAGAGTTTATCCACTTATAGGATG
AAGCTGTGTTATTTTATTGTATTGTGACTGTATTAACAGATGGACAAATTCATCTCTTGGGAGCAAGTCTCTCTAGAGTTTA
TTTTCAATATGCTGGGACGCTCTCTTGAATAATTTTTCCCAAGGAAGCTATTCTACACAGTGGCAAAATTTGCTATCTAATTAATRAAT
GTAGCTAAAGACTATGATATTTATGTAGTACGCAAAAGACTAAATTTCTATAGATGTCAATAAAGGAAGATATATTTCTTATTTGCTCACTTG

40

131

[illegible]

40

【表 6-37】

[illegible]

10

20

30

40

133

40

134

40

135

TTTTCCAGTCAAGAGTTGTAATAAGAGCGCCAGATGAATTCTTAATACGACTCACTATAGGAGAGAGAGACACCTGGATAGGTTCC
CGTGGCGCGCGCATCGCTCGAGCGAATCTGAGAACTTCAGGCTCTGGGCAACGTTGTTGTTATTTGCTGTCTCTCATCATTTTGGC
AAGAATATCACTCTCTCAGGTCGAGGCTGCCTATCTAGAAGGTGGTGTGGCCAAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGAT
CTTTTCCCTCTCCGCAAAAATTATGAGGACATCATGAAGCCCTTENGACATCTGACTTTTGTCTTAATAAAGGAATTTATTTTCATT
GCAAAAAAAAABGCGCGCTAACTATAGTTGTCATGAGCCGCTCGAGACCGCTAGCTTTCGCTAATCATGCTCATAGCTGTTCTCTGCTGCT
GAAATTGTTATCCGCTCACAAATCTCACACABCATATAGAGCGCGGAAGCATTAAGTTGTAAGCTTCGCGGTGCCTAATGATGACGAGCTAAC
TCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCTCCGCTTTTCAGTCCGGAACCTGTCTGNGCGAGCTGCACTTAATGAATCGGCCAAACGCGCGG
GGAGAGCGGTTTTCGTTATTTGGGCGCTTCTCCGCTTCTCTGCTCACTGACTGCTGCTGCTCGTCTGTTTCGGCTGCGCGAGCGGTAT
CAGCTCACTCAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGAATAACGACGAAGAACAATGTGACGAACAAGCGCAGCAAAAGG
CCAGGAACCTGAAPAAAGCGCGCTGCTGTCGTTTCTTCCATAGGCTTCGCGCCCTCCAGCGCATCAACAAATTCAGAGCTCAAGTC
ACAGGTTGGGAAACCGACAGGAATATAAGATPACCAAGCGTTTCCCTGGAAGCTTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTTCCGACCTGTC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCTCCCTGCGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGTATCTCAGTTCCGCTG
AGTCTGTTCCGCTCCAAAGCTGGGCTGTGTGACAGAACCCCGCTTCAGCGCCGAGCGCTGCGCTTATCCGGTACTATCGTCTTGAGT
CCAACCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGSCAGACGCCACTGTGTAAACAGGATTAGCAGGCGAGGTATGTATGCGGCTGCTACAG
AGTCTTGAAGTGGTGGCTTACTACGGCTACACTAGAGGACAGTATTTGGTATCTTCGCTCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
AAAGAGTTGTTAGCTCTTGATCCGCGCAAAACAACCCGCTGTGTAGCGCTGTTTGTGTTGTCAGACAGCTTACGCGCGAGAA
AAABAGGACTCTCAAGAGATCTTTGATCTTTTCTCACTCGGSETGTGAGCTCAGTGAACGHAACCTCAGCTTAAAGGATTTTGCTCA
TGAGATATCAAAAGGATCTTCACCTAGATCTCTTTAAATATAAATGAAGTTTAAATCAATTAAGTATATATGATGATGAATTA
GGTCTGACAGTTTACAAATGCTTATCAGTAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCAATCTAGTGTGCTGACTCTCCCG
TCGTGTAGATTAACATAGTACGGGAGGCTTACCATCTGCGCCAGTGTCTGCANTGATACCGGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
ATTTATCAGCAATAAACACGCGCAGCGGAAGGCGCGAGAGTGTCTCTCAACTTTATCCGCTCTCATCTAGTCTCTATTAAT
GTTGCTCGGAGAGCTAGATGATGTTAGTTTCGCTTCAATAGTTTGGCCAAAGTTTGGCTTGCATCTCCTCAGGCACTGTGTGTGTCAGCT
CGTCTTTGTTAGTGGCTTCACTCAGTCTCGGTTCCCAACAGCGGATGATCATGATCCCATCTGTTGTGCAAAAAGACGGTTA
CTGTCTCTCGCTCCGATCTGTCAGAACTTAAGTTGCGCGCAGGTATTATCTACTCATGTTATGSCAGCACTGCATATTTCTTTA
CTGTGATGCCATCCGTAAAGATCTTTCTGTGACTGTGTGAGTACTCAACCAAGTCACTTCGAGAAATAGTGTATGCGCGCAGCGAGTT
GCTCTTTCGCGCGCTCHATAAGGGAATATACCGCGGCHACATAGCAAACTTTAAAACCTGCTCATCATGGAATAACGTTCTCTCGGGGC
GAABAACCTCTCAGGAATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGTGCAACCCAACTGATCTTCAGCMCTTTTACTTT
TTCACACAGCTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCGCGCAAAAANGGAATAAGGCGHACATATTTGAAATGTTTGAATAATA
TACTCTTCTCTTTTCAATATATTGAAGCATTAATGCGGTTATGCTCTCATGAGCGGTACATATTTGAAATGTTTGAATAATA
AACAATAAGGTTCCGCGACATTTCCCGGAAATGACCGCACCTTCGCTGTGAAGAACCATTAATTAATCATGACATTAACCTATATPA
ATACGCGGTATACAGAGGCTCTTCTGCTCGCGCTTTTGGTGTATGACGTGHAACCTCTGACATAGCAGCTCCCGAGAGCGGTCA
CAGCTGTCTGTARGCGGATGCGGAGAGCAACAGACCTCTCAGGCGCTCAGCGGCTTGGCGGGTGTCTGCGGCTTGGCTTAAC

40

136

[illegible]

40

【表 6 - 4 2】

137

CAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAGGGAATAGGGGACACCGGAATGTTGAATACTCATACT CTTCCCTTTTCAATATTATGAAGCATTATCAGGGTATTGCTCTATGAGCGGATCATATTTGATGATTTAGAAAAATTAACA AATAGGGGTTCCGGGCACTTCCCGGAAAGTGCACATTTGCTCTATGAGAAACCTATTATATCATGACATTAACTTATATAAATAG GCGTATCAGAGAGCCCTTTCGTTCTCGCGGTTTCGGTATGACGCTGTAACCTTACACATGACATGCTCCGGGAGCGGTCAAGC TTGTCTGTAAAGCGGANTGCCGGAGCAGCAAGCCCTCAGGGCGGTTCAGCGGCTGTTGGCGGCTGCTGGGCTTAACTATGCT GGCAATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAATAACCGACAGATGCTGTAAGAGAAATACCGCATCAAGCG CCATTCCCAATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCGGATCGGTGCGGCTCTTCTGCTATTACCCAGCTGCGCGAAAGGGGATG TGCTCAAGCGCATTAAGTTGGGTAAAGCCAGGG	TTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGCGCCAGTGAATTTCTAATAAGACTCACTATAGGAGATGGAGAAATAATCACTGGACG CGTGGCGGCGCATTAATAATGCGGCGCTAGCTCGAGTGAATAAGCGGATGAATGGCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAAATCA TGCTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACAACAATACAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCCTGG GGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCAATTAATTGGGTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCAT TBAATGATCGGCCAACGCGCGGGAGAGCGGTTTGGTATTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTGCTGCTGCGCTCGGTC GTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCGGTAAATACGCTTATCCACAGAAATCAGGGGATACCGCAGGAAAGAACATG TGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCGCGGTGCTGGCGTTTCCATAGGCTCCGCTCCGCTGAGGAGCAT CACAAATATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGGACAGGACTATAAGATACAGGCGTTTCCCTTGGAGCTCCCTCGT CGCTCTCTGTTCCGACCTCGCGCTTACCGGATACCTGTCGCGCTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGC TTAGGTAATCTCAGTTGCTGAGTGGTCTGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCAAGAACCCCGCTTACGCCAGCCGCTGGGCTTAA TCCGGTAATATCGTCTTGAATCCACCGGTAAGACAGACTTATCCGCTACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATAGCAGAGCG AGGTATGTAAGCGGCTACAGAGTTCTTGAATGCTGGTGGCTAACTACGGCTACTAGAGAGACAGTATTTGGTATCTCGCTCTG CTEAAGCCAGTTACCTTCGAAAGAGTTGGTGTCTTGTATCCGCAACAAACCAACCGCTGTAGCGGTGTTTGTGTTGCTG AAGCAGAGATTACCGGCAAGAAAGGATCTCAAGAGATCTTCTGATCTTCTTCAAGGCTCTGAGCTCAGTGGAAACGAAAC TCAGGTTAAGGATTTTGGTCTATGAGATTATCAAAAGGATCTTCACTAGATCTTCTTAAATTAATAAAGTAAAGTTTAAATCAATC TAAAGTATATAGTAACCTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACCCTATCTCAGCGGATCTGTCTATTTCTGTTCA TCCATAGTTGCTGACTCCCGTCTGTGTAGTAACTACGATAAGGAGGCTTACCATCTGSCCCAGTCTGCAATGATACCGCGA GACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAACAGCCAGCGGGAAGCTAGAGTAAAGTTCGCGGTTTGGCAACGTTGTGCGCATTTGCT GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAAGTTCGCGGTTTCCCAACGATCAAGCGGAGTTACATGATCCGCC ACAGGCAATCGTGTGTACGCTCTGTCGTTGGTATGGCTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGCGGAGTTACATGATCCGCC ATGTTGTGCAAAAGCGGTAGCTCTTCCGCTCTCCGATGTTGTCAGAAAGTAAAGTGGCGGCTATCACTCATGTTATG GCAGCACTGCATATTCTCTTACTGTCAATGCCATCCGTAAGATGCTTCTGTGATGCTGAGTACTAACCCAGTCAATTTCTGAGAA TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCGGCTGCAATAAGGATAATACCGCGGCAATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATC
---	---

SEQIDNO.: 38

10

20

30

40

【表 6-4-3】

138

[illegible]

10

20

30

40

【表 6 - 4 4】

139

GTGCTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGAGGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAG CTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAAGAGTAAGTTGGCGCAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGECATATTCCTCTTAC TETCATGCCATCCGTAGATGCTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGGCGGACCGAGTTG CTCCTGCCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGACTTTAAAGTGTCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTGGGGGG AAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGTCCAGTTCAGTTAAACCCACTCTGTCACCCCACTGATCTTCAGCACTCTTTTACTTT CACCGCTGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAGGCAAAATGCCCCAAAGGGAATAGGGCGACACCGGAATGTTGAATACTCAT ACTCTTCCCTTTTCAATATTTGAAGCAATTTATCAGGTTATTGTCTCATGAGGGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAATAA ACAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACCTATATAAAA TAGCGGTATCACAGGCCCCCTTTCGTCTCGGCGTTTCGGTGAGAGCGGTGAACCTCTGACACATGCACTCCCGGAGACGGTTCAC AGCTGTCTGTAAGCGGATGCCCCGAGCAGACAGCCCGTCAGGCGCGTCAAGCGGTGTGGCGGTGTGGGGTGGCTTAACTA TCGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCCACCATATGCGGTGTAATACCGCACAGATCGGTAGGAGAAAATACCGCATCAG GCGCCATTGCCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCGGATCGGTGCGGGCTCTTTCCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG ATGTGCTGCAAGGCGATTAGTTGGGTAAAGCCAGGG	
SEQIDNO.: 40	AATTTAATACGACTCACTATAGSGAGACGAGAGCACCTGGATAGGTT
SEQIDNO.: 41	GCCTGCACCAACAGTTACA
SEQIDNO.: 42	CAGGCCAGGAGTCCAAAT
SEQIDNO.: 43	TCCCGTCTTTGGTCAAA
SEQIDNO.: 44	GCGCCGGGATCGTCAACA
SEQIDNO.: 45	ACACGTGCACGGGGCCAA

10

20

30

40

141

AGATCCAGTTCGATGTAAACCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCCACGCGCTTTCTGGTGAGCAAAAACA
GGAGGSCAAAATGCGCAAAAAGGGAATPAGGCGACACGGAATGTGAATATCATATCTTCTCTTTTTCATATATATTATGAAGC
ATTATTCAGGGTTATTGTCTCATAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAATAAACAATAAGGSGTTCCGCGSCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTATTGGTGTGAAAAGTCCCAAGCTCCCAAGCAGGAGATGATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTTCAGCAA
CCAGGTGTGAAAAGTCCCAAGGCTCCCAAGCAGGAGAAATATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTTCAGCAACCAATAGTCCCGCCC
TTAATCTCCGCCATCCCGGCCCTAACTTCGCCCASTCCGCCATCTCCGCCCCATGCTCCGCCCATAGCTGACTAATTTTATTTATGTCAGGAG
CCGAGGCGCGCTCGGCCCTCTGAGCTATTCAGAAAGTAGTAGGAGGCTTTTGAAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAGATGACTGCTTGA
TCCCTGTACAGTGCGGCCGACACGACGGTCCGCCACCATCCCTGACCCCGCTGACCCCTCACAAGGAGACGACCTTCCATGA
CCGAGTACAAAGCCACGCTGCGCTCGCCACCCCGGACGAGCTCCCGGGCGGTACGACCTCGCGCGCGGTTTGCCTGCACTTACC
CCGCGCAGCGGCCACACCTCGACCCCGACCGCCACATCGAGCGGGTACCGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCTCGGGCTCG
ACATCGGCAGAGTGTGGTTCGGGACACCGCGCGCTCGGGTGCCTGAGACACCGCGAGAGCGTCAAGAGCGGGGCGGTGTCTG
CCAGATTCGGCCCGGACATGCCCGAGTTGAGCGGTTCCCGCTGCGCGGACGACAGATGGAAGGCTTCTTGGCGCGGCACCGCG
CCAAAGAGCCCGCGGTGTTCTTGBACACCGTTCGGCTCTCGCCCGACCAAGGCAAGGCTCTGGGACGCGCGCTGCTGCTCCCG
EAGTGGAGGCGCGGAGCGCGCGGGTGCCTCTCTGAGACCTTCGCGCCCGCACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCT
TCACCTCACCGCCGAGCTCGAGTGCAGAGGACCGGACCTGCTGACATGACCCGCAAGCCCGGTCCTGACGCTCCGCCACCG
ACCGCAGCGCCCGACCGAAAGGACGACGACCTTCCAGTCCGACACCGACCCCGGGCGGCCCGCGCACCGCGCACCGCC
CCCGCAGCGCCACCGACTTAGACATATATCAGCCATACCACTTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTC
CCCCCTGAACCTGAAACATAAATGAATGCATATGTGTGTAACTTGTATTATGTCAGCTTATATAGTTACAAATAAAGCAATAGC
ATCACAAATTTCACAATAAAGCAATTTTTCACCTGCAATCTAGAAAACCAATATATATCTGACATTAACCTATAAAAATATAGCGCTA
CCAGCGAGGCGCTTTCGTC

40

142

[illegible]

40

143

[illegible]

40

144

SEQ ID NO. : 84	Identical SEQ ID NO. : 49	to
ATGCGCGCGTCTGCTGTGGCCCTCCCGCCTTTGTGTGCTACCCGAGTCTTGCTGACCATGGCCCTCTGGAAAGCCCTCCGACCCAG CCCTCGCGGCGCTCGGANTCCGGCTCTGGCTACGTTCCGGGCTCGGTCTTGACGCTTTGTTACTTGGCCCCAACGABAGGTGCGC AAGAGAGATCCGACGGCGGTGTGAGAAAGCGCTAGCGCTCGCTCRACCTCATCCCTCAGATTACATCCATCTATGAGTGGAAA GGGAAAGATCCAGGAAGACAGTGAAGTGTGATGATGATTAAGCCCAAGTTCCCTGGTCCGAGCTTTACAGAGATTTGTTCTGTTCT GTGCACCCCTACGAAAGTGGCCGAGTAATTGTCATTGCTGCTGGAAACAGGGGAATTTCCGTACCTGCTGAGTGGTGGCCAGGTACAA GAGTCAGTTTCTGACTCTATCACAGTCCCTGCCAAGA	MGGSLAGSGAGGPGSPSTVWCA LFSNHVAAQTQASLILLSFVWMPAL LPVASRLILLLPRVLJLTWASGSP TOPSPASDSGSEYVPGSVSAAFV TCNEKVAKEIARAVVEKRLAAC VNLIQITSIYEWKGIKIEEDSEV LMMIKTQSSLLVPALTD FVRSVHP YEVAEVIALLFVEQGNFPYQLQWVR QVTSVSDSIITVLP	
SEQ ID NO. 85:		
CATGTGCCAACAAATGCAAGGTTTGCTCATATNTATACATTTGCCATGTGTGTGCTGCACCCATTAATCTGTCATTTAGCATTAGGTA TATTTCTTAATGCTATCCCTCCCTCCCTCCACCCCAACAGTCCCGCTGGTGTGATGTCCCAAAATTTTTTTTCTCAT CANCATTAATCNCATAAACAAACATTTGAATGAAACAAACATGAGGATCTGCTATATTTGAAAATAAAATAATATAATACAAA TTTTAAAAATACAGTGTACAACTATTTACATAGAAATTTACATGTATGAGTATTGANGTAACTAGAGTTGATTTAAAGGAGG GNGTCCAAACTTTTGGCTTCCTGGGCCACACTGGGAANAATGTCTTGGGGCTACCCATAAAATACATCACTAAACAATAGCTGATAAC GA		
SEQ ID NO. 86		
GCTGATTTACAGAGTTTCCCTTATAATATTCAATGTCCTATTTCAATAACAGCAACAACTACAAAGAAACAGGAAAGTATGGT CTACTCACAGA		

(参考文献)

40

PATENTS:

U.S. Patent No. 5,712,127 Malek et al., January 27, 1998

U.S. Patent No. 6,498,024, Malek et al., December 24, 2002

U.S. Patent Application No. 11/000,958 filed on December 2, 2003 published under No. US 2005/0153333A1 on July 14, 2005 and entitled "Selective Terminal Tagging of Nucleic Acids"

US Patent 6,617,434 Duffy, September 9, 2003

US Patent 6,451,555 Duffy, September 17, 2002

10

OTHER REFERENCES:

1. Frost H.M., 1964 Dynamics of Bone Remodeling. In: Bone Biodynamics, Little and Brown, Boston, MA, USA pp.315;
2. Baron, R., Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements, In: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Fifth Edition 2003, American Society for Bone and Mineral Research, Washington DC, pp.1-8;
3. Jilka, R. L. et al., "Increased Osteoclast Development After Estrogen Loss: Mediation by Interleukin-6", Science 257: 88-91 (1992).
4. Poli, V. et al., "Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion", EMBO J 13: 1189-1196 (1994).
5. Srivastava, S. et al., "Estrogen Blocks M-CSF Gene Expression and Osteoclast Formation by Regulating Phosphorylation of Egr-1 and Its Interaction with Sp-1", J Clin Invest 102: 1850-1859 (1998).
6. de Vernejoul, M. C., "Dynamics of Bone Remodeling: Biochemical and Pathophysiological Basis", Eur J Clin Chem Clin Biochem 34: 729-734 (1996).
7. Netzel-Arnett, S., J. D. Hooper, et al. (2003). "Membrane anchored serine

20

30

proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer." *Cancer Metastasis Rev* 22(2-3): 237-58.

8. Shan, J., L. Yuan, et al. (2002). "TSP50, a possible protease in human testes, is activated in breast cancer epithelial cells." *CancerRes* 62(1): 290-4.
9. Yuan, L., J. Shan, et al. (1999). "Isolation of a novel gene, TSP50, by a hypomethylated DNA fragment in human breast cancer." *Cancer Res* 59(13): 3215-21. 10
10. Nishi, T. and M. Forgacs (2002). "The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2): 94-103.
11. Nishi, T., S. Kawasaki-Nishi, et al. (2003). "Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms." *J Biol Chem* 278(47): 46396-402.
12. Morello, R., L. Tonachini, et al. (1999). "cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of Crtap encoding the mouse cartilage associated protein." *Matrix Biol* 18(3): 319-24. 20
13. Tonachini, L., R. Morello, et al. (1999). "cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of the gene encoding human cartilage associated protein (CRTAP)." *Cytogenet Cell Genet* 87(3-4): 191-4.
14. Kawai, J., A. Shinagawa, et al. (2001). "Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection." *Nature* 409(6821): 685-90.
15. Strausberg, R. L., E. A. Feingold, et al. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16899-903. 30
16. Janssen, E., M. Zhu, et al. (2003). "LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation." *Nat Immunol* 4(2): 117-23.
17. Kawaida, R., T. Ohtsuka, et al. (2003). "Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of the AP-1 family of transcription factor, mediates osteoclast differentiation induced by RANKL." *J Exp Med* 197(8): 1029-35.
18. Agrawal, N., P. V. Dasaradhi, et al. (2003). "RNA interference: biology, mechanism, and applications." *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4): 657-85. 40

19. Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418(6894): 244-51.
20. Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* 296(5567): 550-3.
21. Elbashir, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-8.
22. Lee, J. S., Z. Hmama, et al. (2004). "Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. Silencing of the p110alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol and bacterial lipopolysaccharide." *J Biol Chem* 279(10): 9379-88. 10
23. Robinson, D. A., C. P. Dillon, et al. (2003). "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference." *Nat Genet* 33(3): 401-6.
24. Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." *Nature* 423(6937): 337-42. 20
25. Gee et al. In: Huber and Carr (1994) *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco N.Y., pp. 163-177.
26. Smith, A. N., F. Jouret, et al. (2005). "Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone." *J Am Soc Nephrol* 16(5): 1245-56
27. Smith, A. N., J. Skaug, et al. (2000). "Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing." *Nat Genet* 26(1): 71-5. 30
28. Stehberger, P. A., N. Schulz, et al. (2003). "Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis." *J Am Soc Nephrol* 14(12): 3027-38.
29. Malkin I, Dahm S, Suk A, Kobylansky E, Toliat M, Ruf N, Livshits G, Nurnberg P Association of ANKH gene polymorphisms with radiographic hand bone size and geometry in a Chuvasha population. *Bone*. 2005 Feb;36(2):365-73. 40

30. McMahon C, Will A, Hu P, Shah GN, Sly WS, Smith OP. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):1947-50.
31. Biskobing DM, Fan D. Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int*. 2000 Aug;67(2):178-83.
32. Brage M, Abrahamson M, Lindstrom V, Grubb A, Lerner UH. Different cysteine proteinases involved in bone resorption and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int*. 2005 Jun;76(6):439-47. Epub 2005 May 19.

10

【図面の簡単な説明】

【 0 3 2 3 】

【図 1】 STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号1に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

20

【図 2】 STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号2に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

【図 3】 STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号3に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

30

【図 4】 STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号4に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

【図 5】 STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号5に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

40

【図 6】 STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号6に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは

50

は発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図7】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号7に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図8】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号8に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図9】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号9に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図10】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号10に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図11】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号11に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図12】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号12に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図13】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号13に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図14】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号14に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図15】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号15に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

10

20

30

40

50

示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図16】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号16に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

10

【図17】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号17に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図18】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号18に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

20

【図19】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号19に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図20】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号20に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

30

【図21】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号21に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

40

【図22】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号22に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図23】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号23に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのそ

50

の上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図24】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号24に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図25】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号25に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図26】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号26に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図27】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号27に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図28】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号28に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図29】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号29に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図30】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号30に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図31】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号31に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは

10

20

30

40

50

いは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図32】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号32に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図33】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号33に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図34】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号34に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A~F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A~F2~4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A~H5~6およびA~G7~8)。

【図35】shRNAを使用して配列番号1(AB0326)および配列番号2(AB0369)の内因的発現を減衰させることによる、破骨細胞形成に対するノックダウン効果を示す図である。多核破骨細胞の数の有意な減少を、lacZshRNA(図35AおよびB;上図)で影響を与えた前駆体細胞と比較して、AB0326shRNA(図35A;下図)およびAB0369shRNA(図1B;下図)で影響を与えた前駆体細胞から観察した。これらの結果は、配列番号1(AB0326)および配列番号2(AB0369)をコードする遺伝子の発現が、破骨細胞の分化に必要とされることを明らかに示した。

【図36】shRNA-0326.2(配列番号45)を使用したRAW264.7モデルにおける、AB0326(配列番号35)に関するマウスオルソログの破骨細胞形成に対するノックダウン効果を示す図である。RAW-0326.2細胞系は、スクランブルshRNAを含む細胞系と比較して(図36;上図)有意に少ない破骨細胞を生成した(図36;下図)。この結果は、レンチウイルスshRNA送達系を使用してヒト破骨細胞前駆体細胞において得た結果と組合せて、ヒトとマウスの両方において、AB0326遺伝子産物は破骨細胞形成に明らかに必要とされることを実証する。

【図37】破骨細胞形成の阻害剤をスクリーニングするための、RAW-0326.2細胞における配列番号1(AB0326)に関する機能的相補性アッセイの結果を示す図である。空pd2ベクターでトランスフェクトしたRAW-0326.2細胞は、RANKリガンドの存在下では破骨細胞を形成することができず(中央図)、マウスAB0326shRNAはさらにこれらの細胞におけるAB0326遺伝子の発現を阻害することができることが示される。逆に、ヒトAB0326(pd2-hAB0326)のcDNAでトランスフェクトした細胞は救済され、したがってRANKリガンドに応答して破骨細胞により効率良く分化する(右図)。空ベクター(pd2)を含む野生型RAW264.7細胞が、RANKリガンドの存在下で破骨細胞の形成に悪影響を与えることはなく(左図)、pd2による影響は除外した。したがって、この相補性アッセイを使用して、ヒトAB0326ポリペプチドの阻害剤をスクリーニングすることができる。

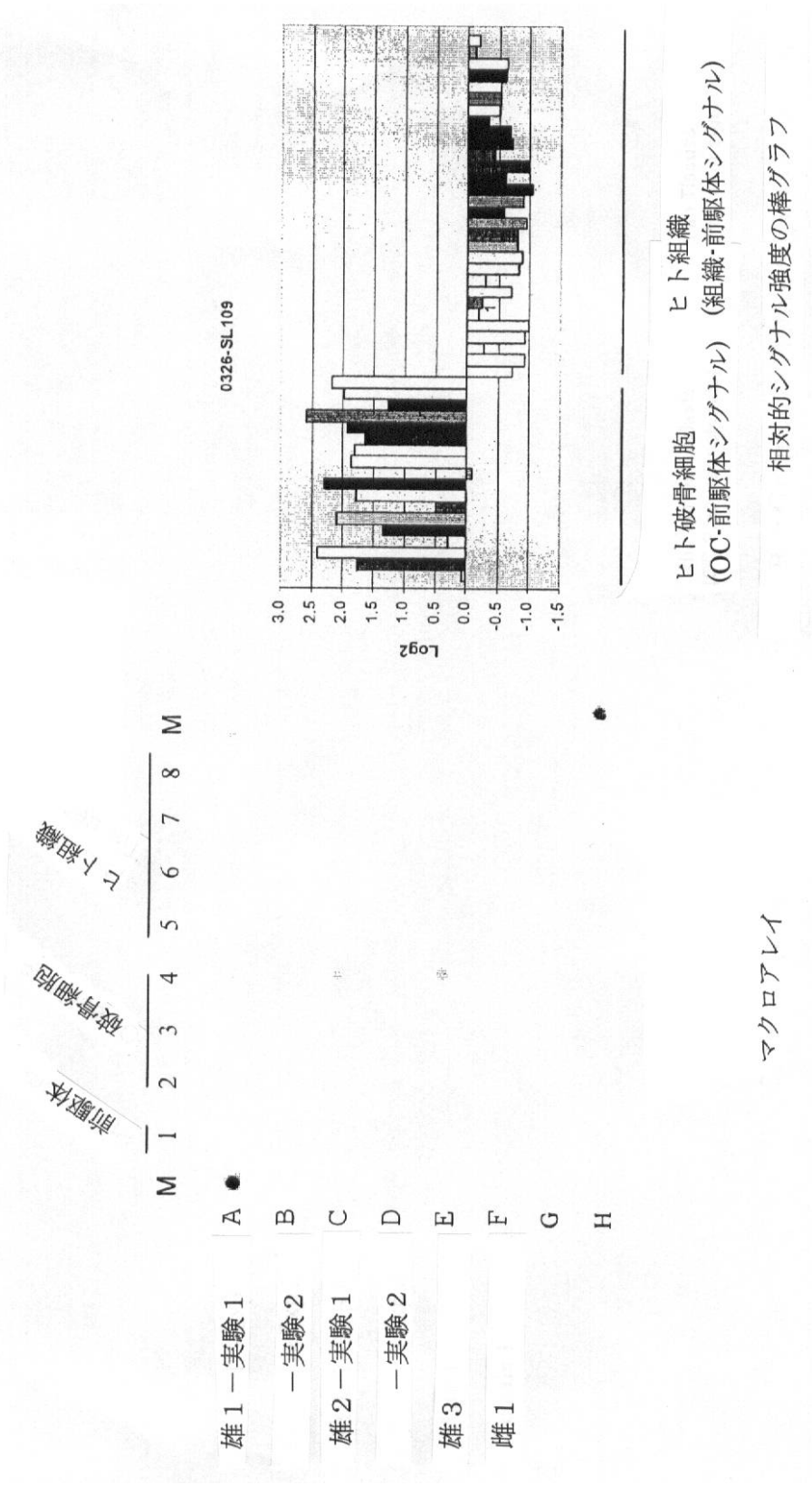
【図38】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号85に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。マクロアレイをヒト前駆体細胞(A~F1)、および分化中間段階および4人のヒトドナーの成熟破骨細胞(A~F2~4)、および30の異なる正常ヒト組織(副腎、肝臓、肺、卵巣、骨格筋、心臓、頸部、甲状腺、乳房、胎盤、副腎皮質、腎臓、大静脈、卵管、膵臓、精巣、空腸、大動脈、食道、前立腺、胃、脾臓、回腸、気管、脳、結腸、胸腺、小腸、膀胱および十二指腸(A~H5~6およびA~G7~8))由来のRAMP増幅RNAを使用して調製した。配列番号85を表すSTARクローンを³²Pで標識し、マクロアレイとハイブリダイズさせた。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を

確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

【図39】STARで選択した破骨細胞特異的ヒト配列番号86に関する示差的発現のデータを示す、マクロアレイハイブリダイゼーションの結果およびシグナル強度の定量化の図である。マクロアレイをヒト前駆体細胞(A～F1)、および分化中間段階および4人のヒトドナーの成熟破骨細胞(A～F2～4)、および30の異なる正常ヒト組織(副腎、肝臓、肺、卵巣、骨格筋、心臓、頸部、甲状腺、乳房、胎盤、副腎皮質、腎臓、大静脈、卵管、膵臓、精巣、空腸、大動脈、食道、前立腺、胃、脾臓、回腸、気管、脳、結腸、胸腺、小腸、膀胱および十二指腸(A～H5～6およびA～G7～8))由来のRAMP増幅RNAを使用して調製した。配列番号86を表すSTARクローンを³²Pで標識し、マクロアレイとハイブリダイズさせた。得られたハイブリダイゼーションの結果によって、全ヒト破骨細胞サンプル中でのその上方制御を確認し、前駆体(A～F1)と比較してより成熟状態の破骨細胞(A～F2～4)中では一般に高い発現であり、全てまたは大部分の正常組織では発現がほとんどないか、あるいは発現が全くない(A～H5～6およびA～G7～8)。

【図 1】

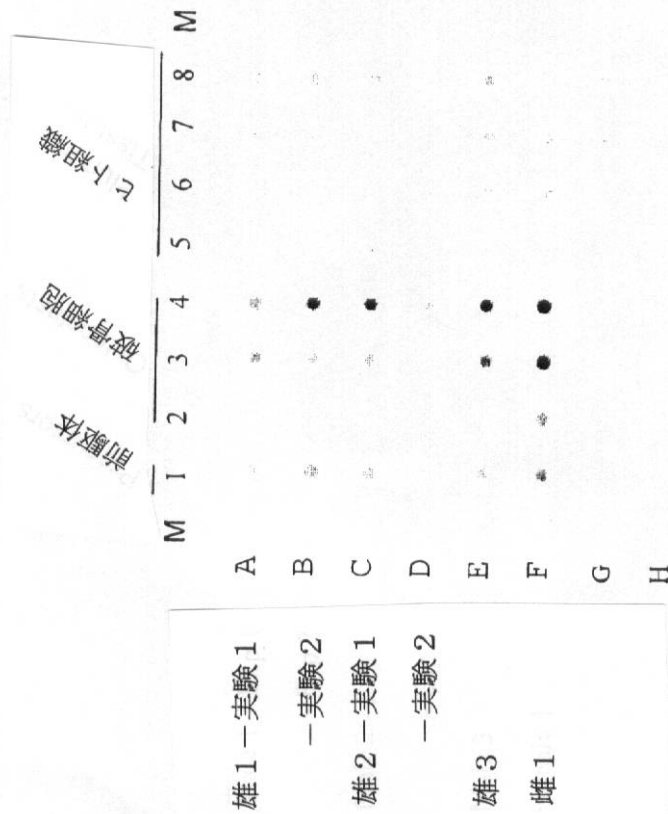
Fig.1
ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 1)



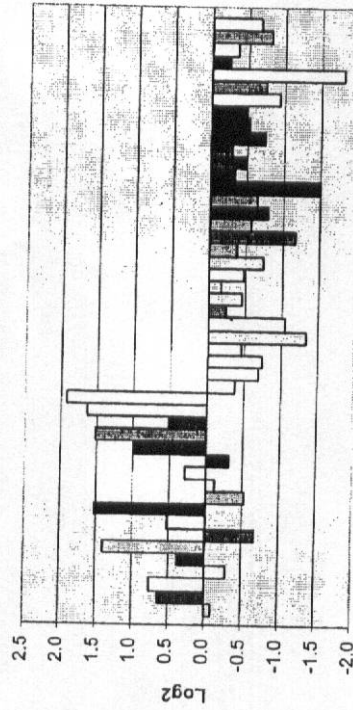
【図 2】

Fig.2

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 2)



0369-SL91-1



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織・前駆体シグナル)

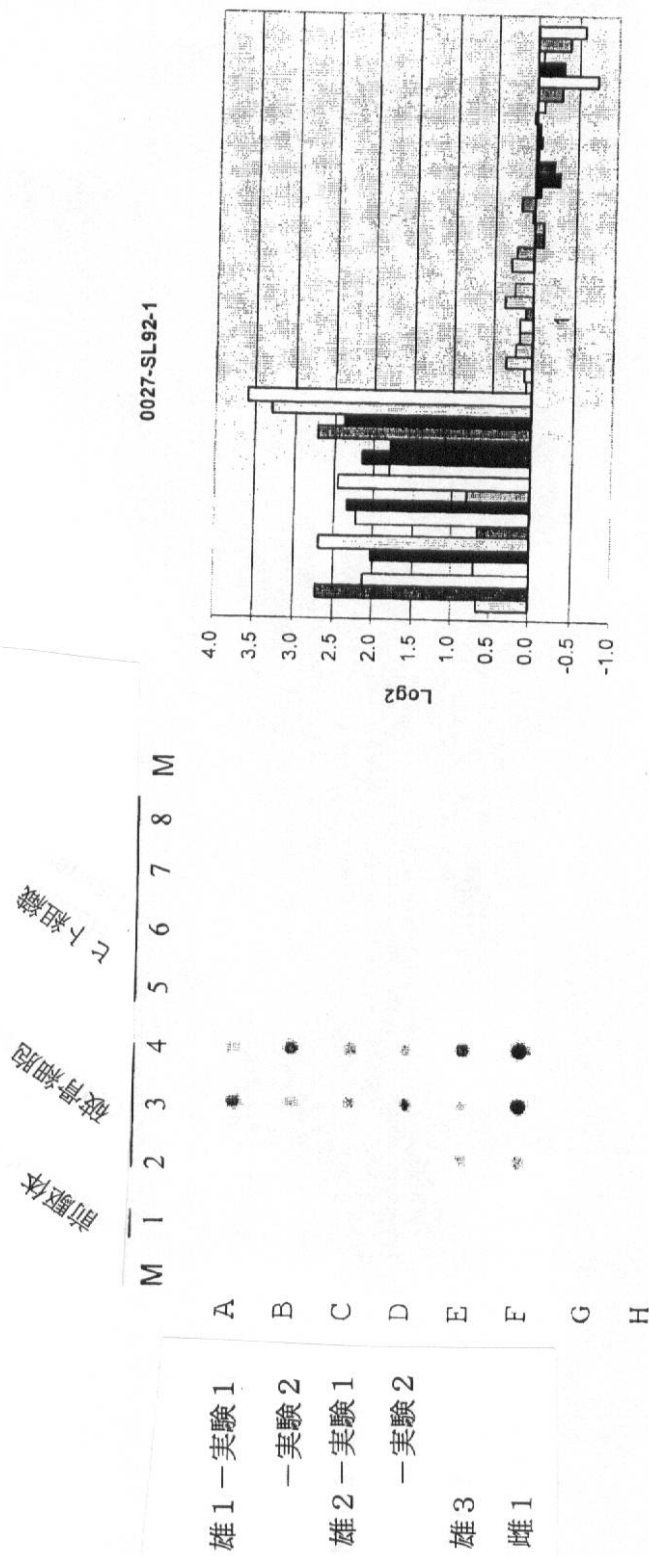
マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 3】

Fig. 3

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 3)



【図 4】

Fig. 4

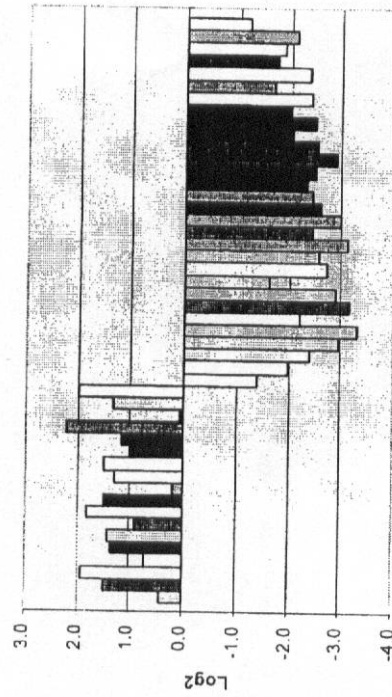
ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 4)

前駆体 破骨細胞 ヒト組織
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

雄 1 - 実験 1
- 実験 2
雄 2 - 実験 1
- 実験 2
雄 3
雌 1

A B C D E F G H

0199-SL85-2



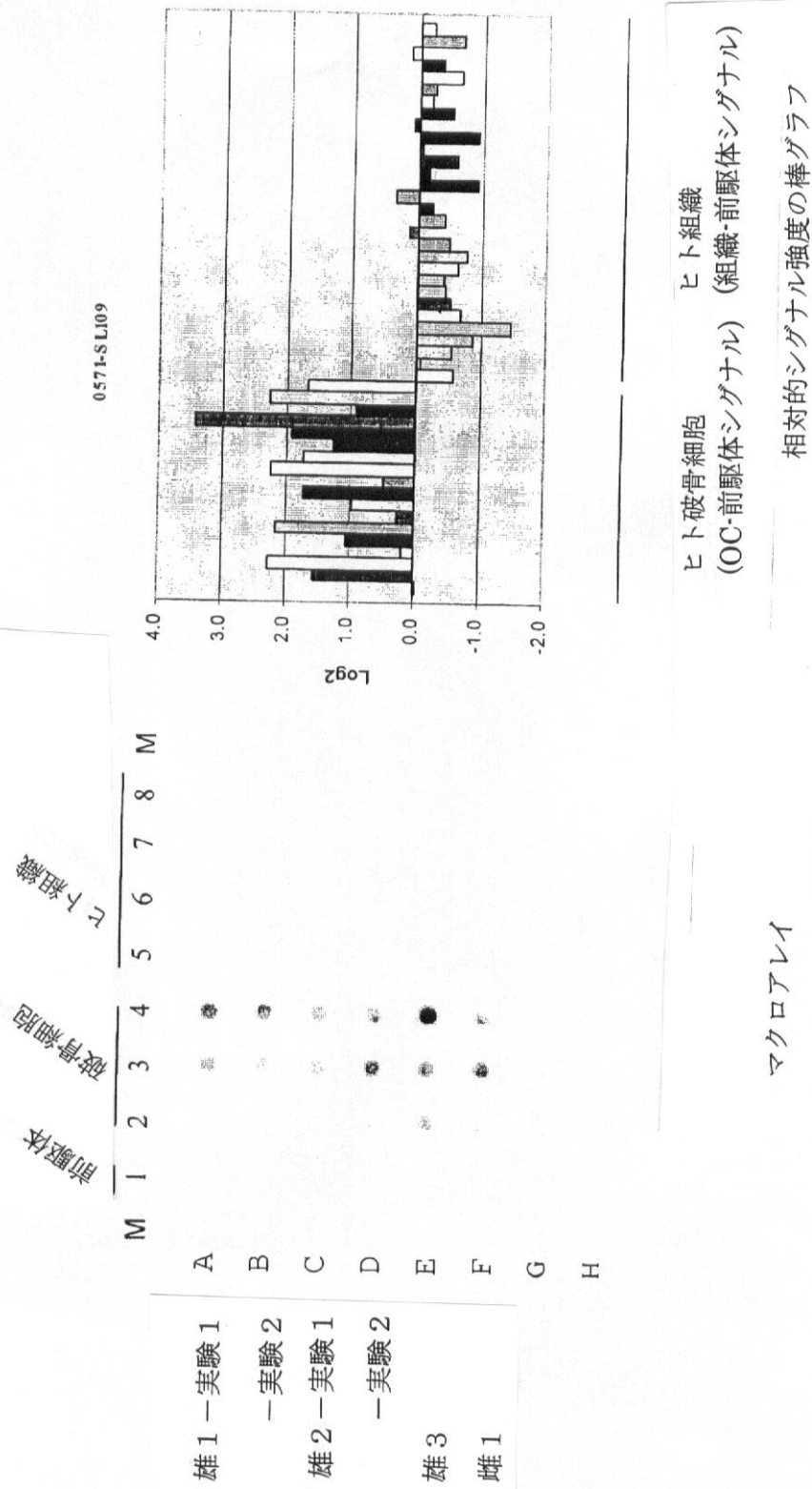
ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC-前駆体シグナル) (組織・前駆体シグナル)

マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

Fig. 5

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号: 5)



【図 6】

Fig. 6

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 6)

前駆体 破骨細胞 ヒト組織

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

雄1-実験1

-実験2

雄2-実験1

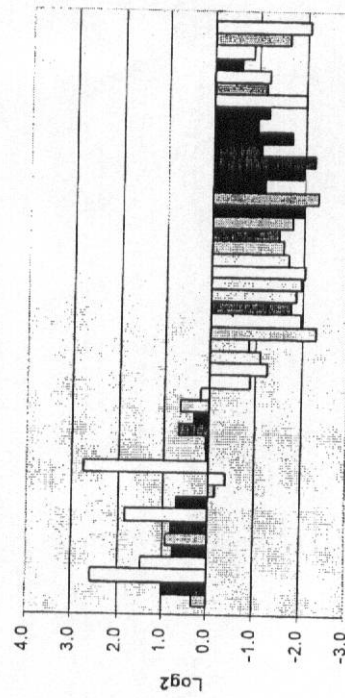
-実験2

雄3

雌1

A B C D E F G H

0210-SL86-1



ヒト破骨細胞
(OC・前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織・前駆体シグナル)

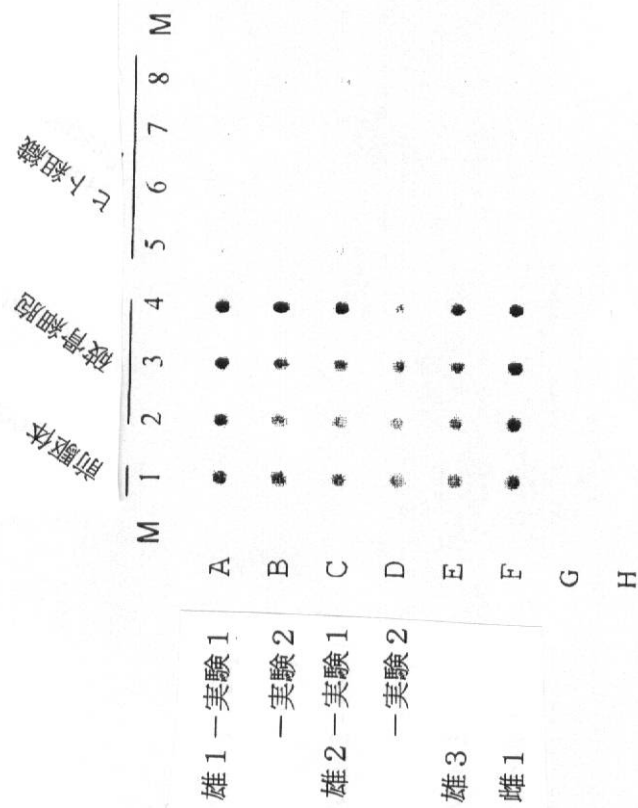
マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

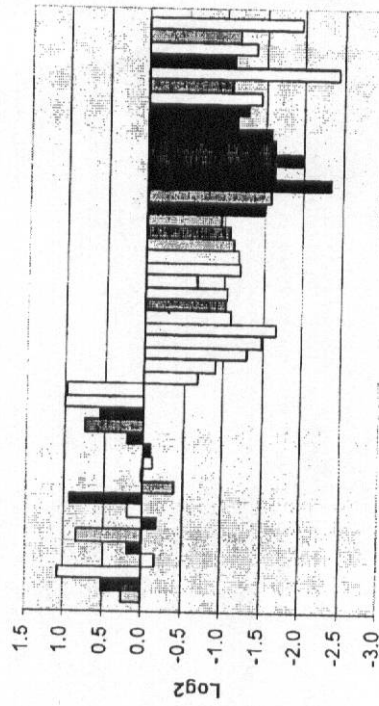
【図 7】

Fig. 7

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 7)



0238-SL92-1



ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC-前駆体シグナル) (組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

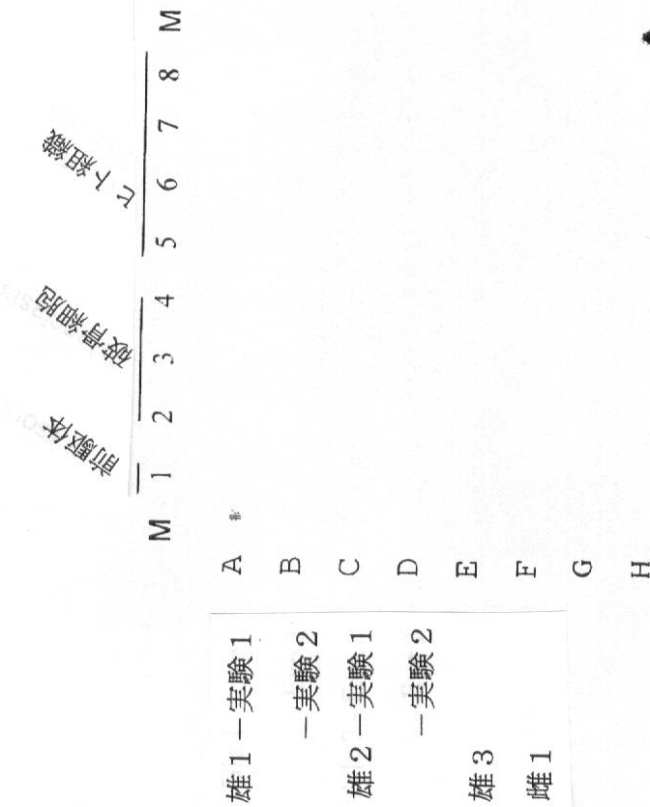
相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 8】

Fig. 8

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 8)



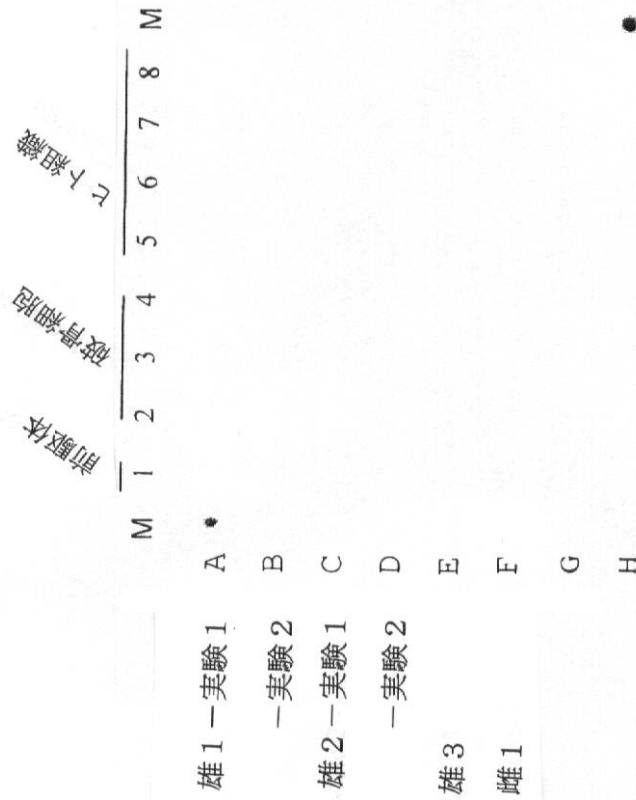
ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC-前駆体シグナル) (組織・前駆体シグナル)

マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

Fig. 9

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 9)



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 10】

Fig. 10

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 10)

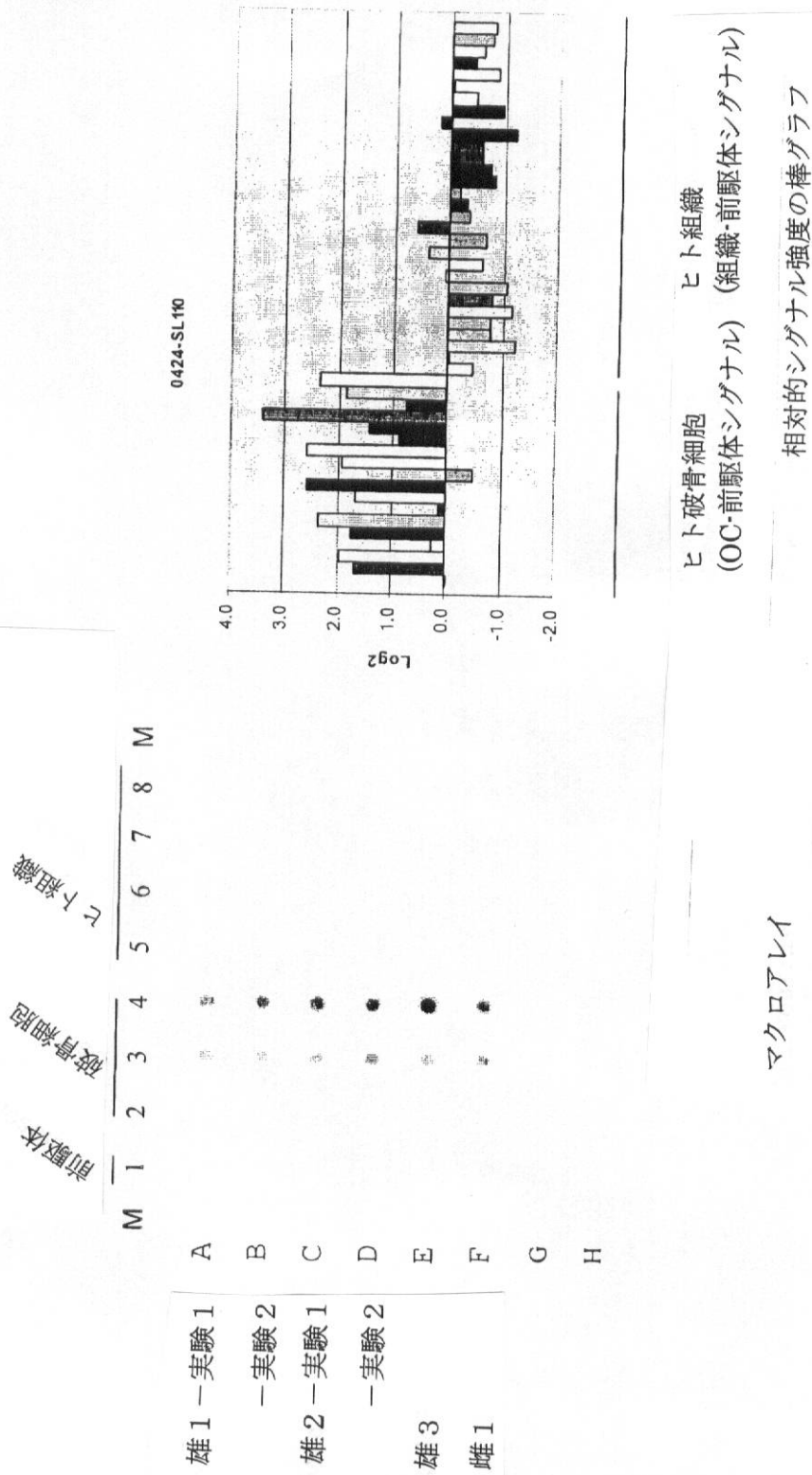
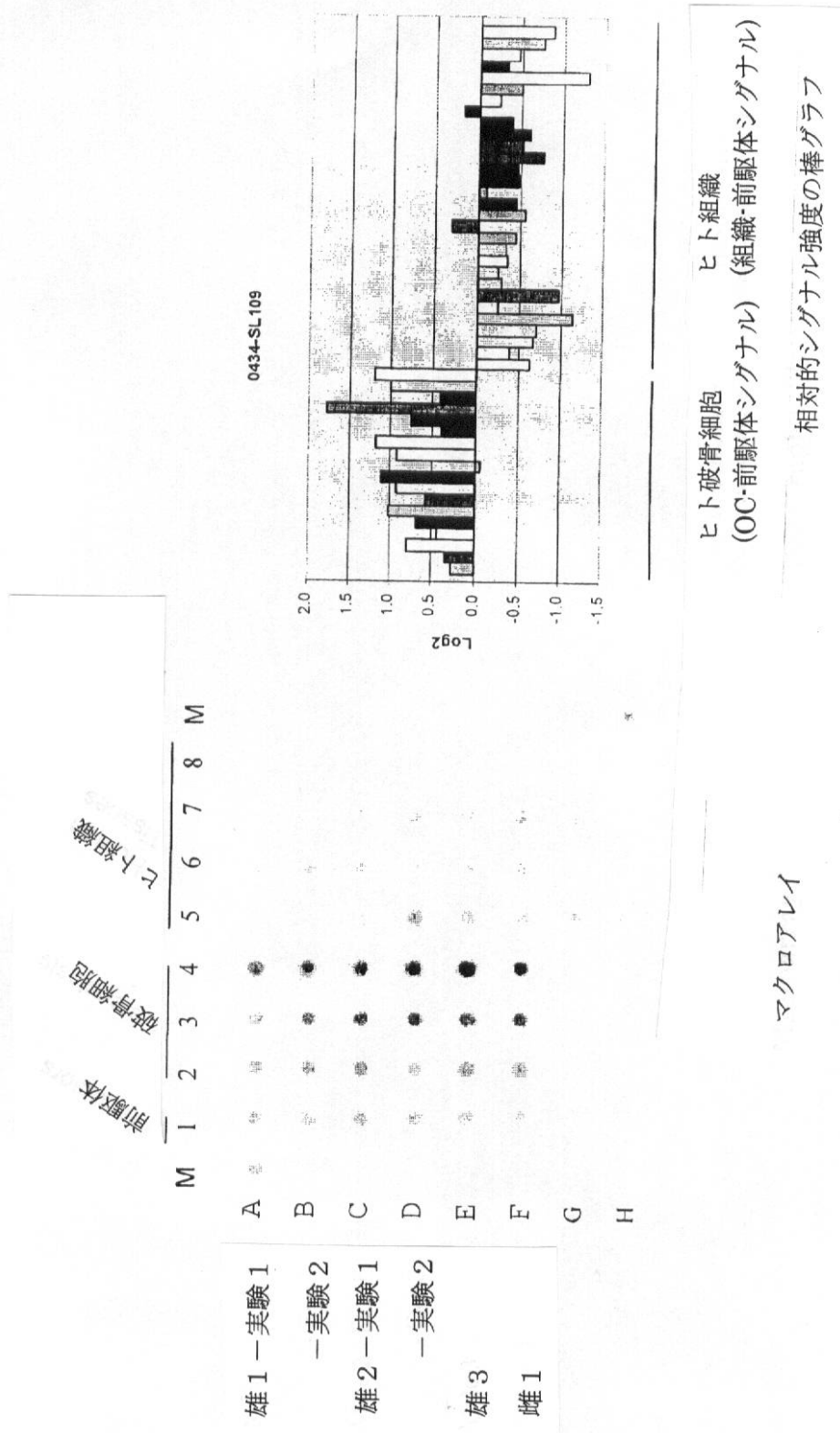


Fig. 11

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 11)

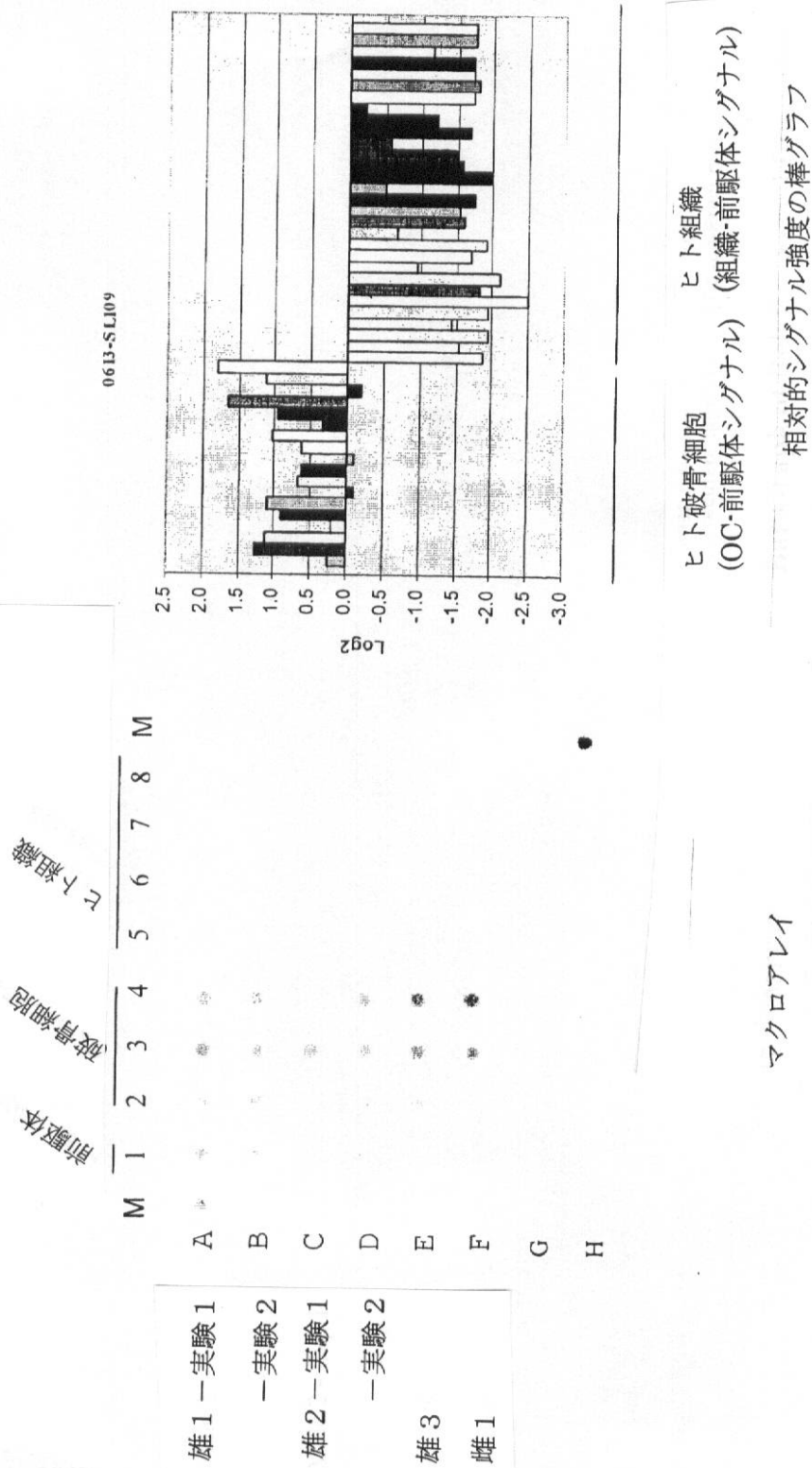


【図 12】

Fig. 12

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号12)

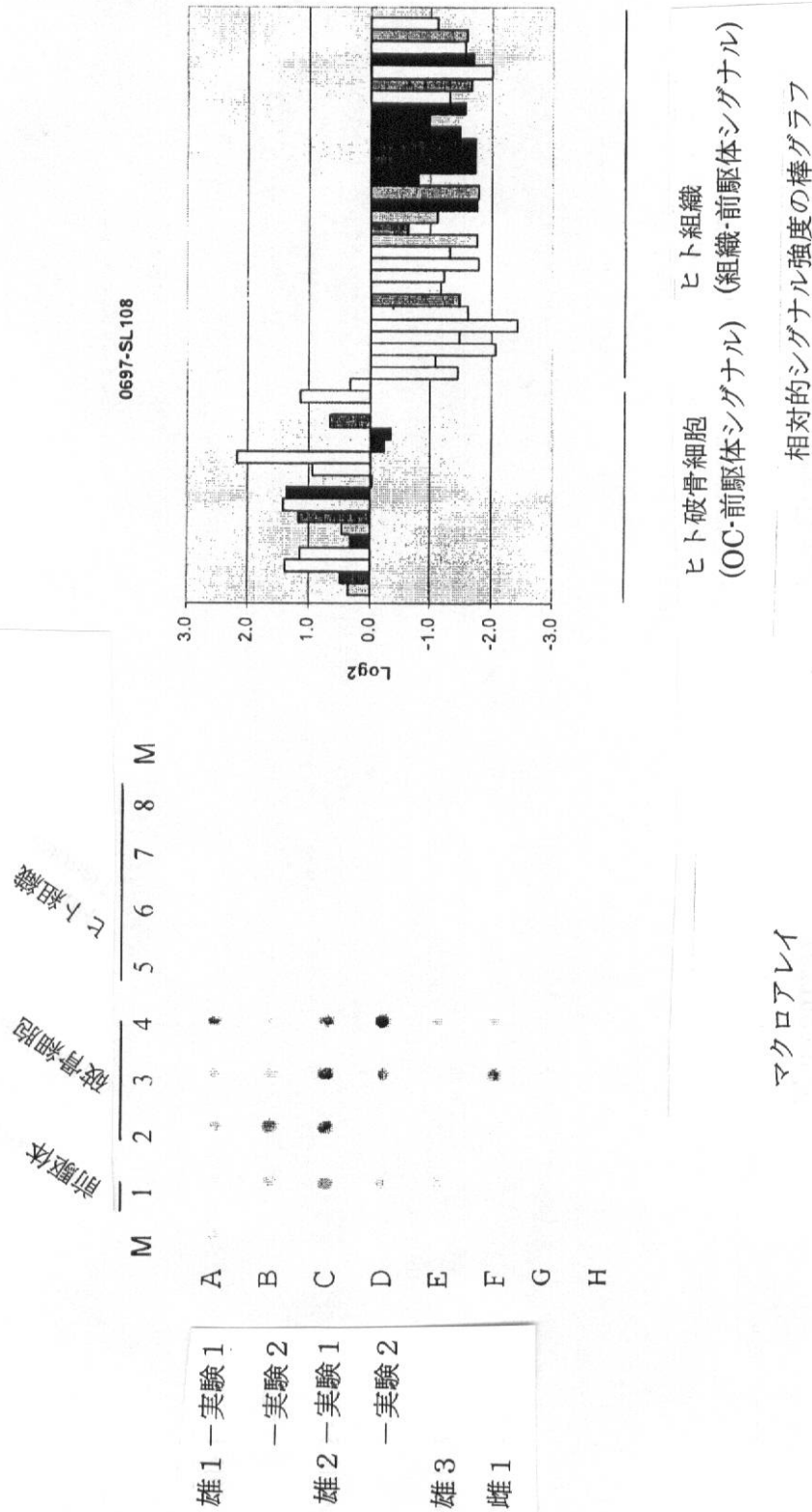


【図 13】

Fig. 13

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 13)

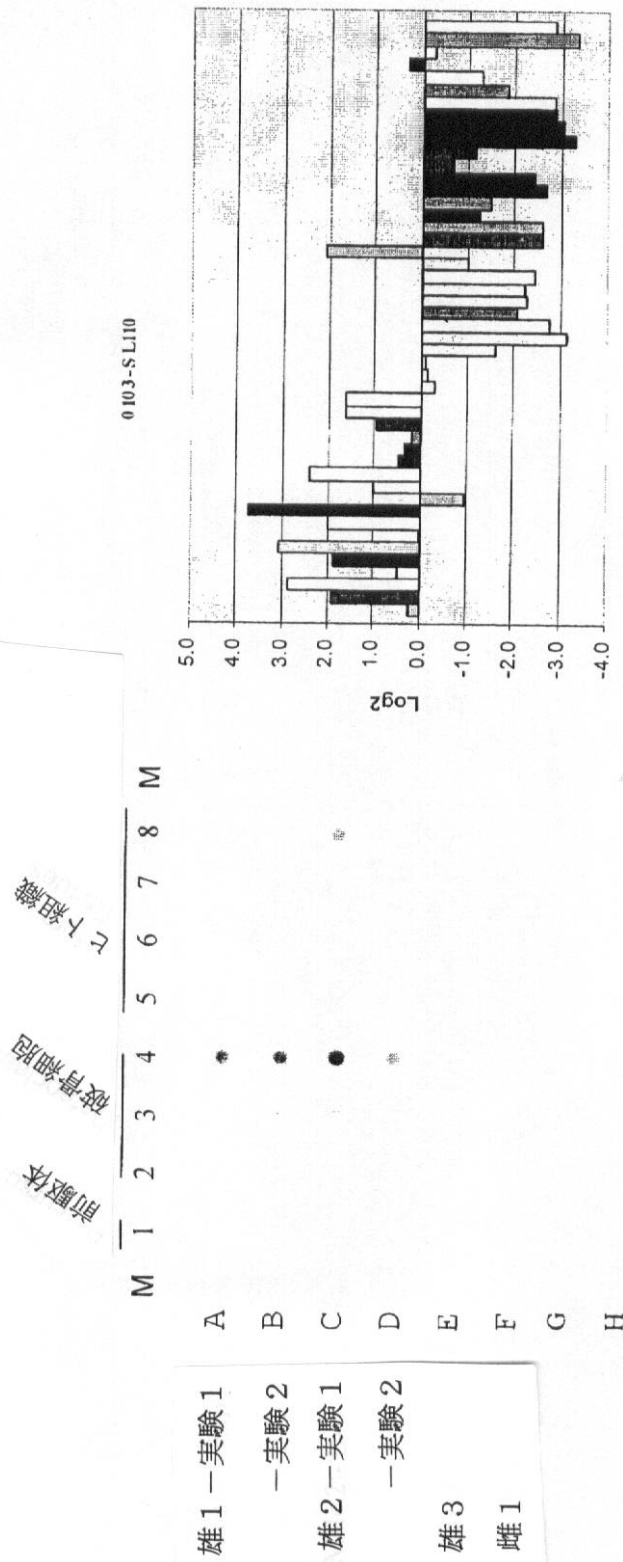


【図 14】

Fig. 14

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号14)



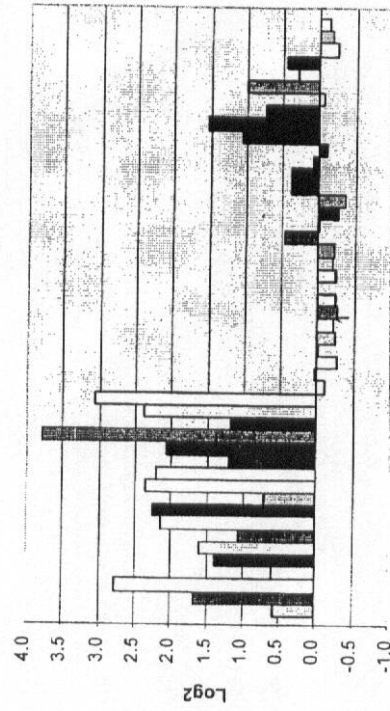
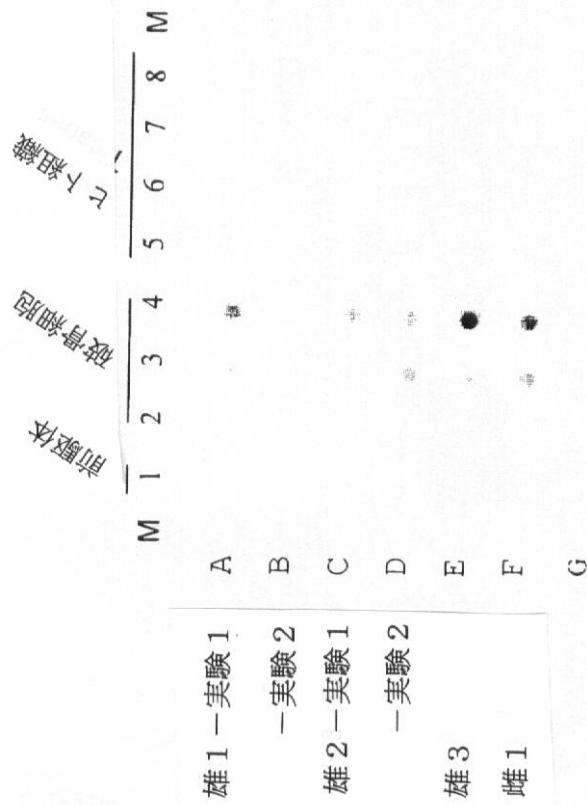
マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 15】

Fig. 15

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 15)



ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC-前駆体シグナル) (組織・前駆体シグナル)

マクロアレイ

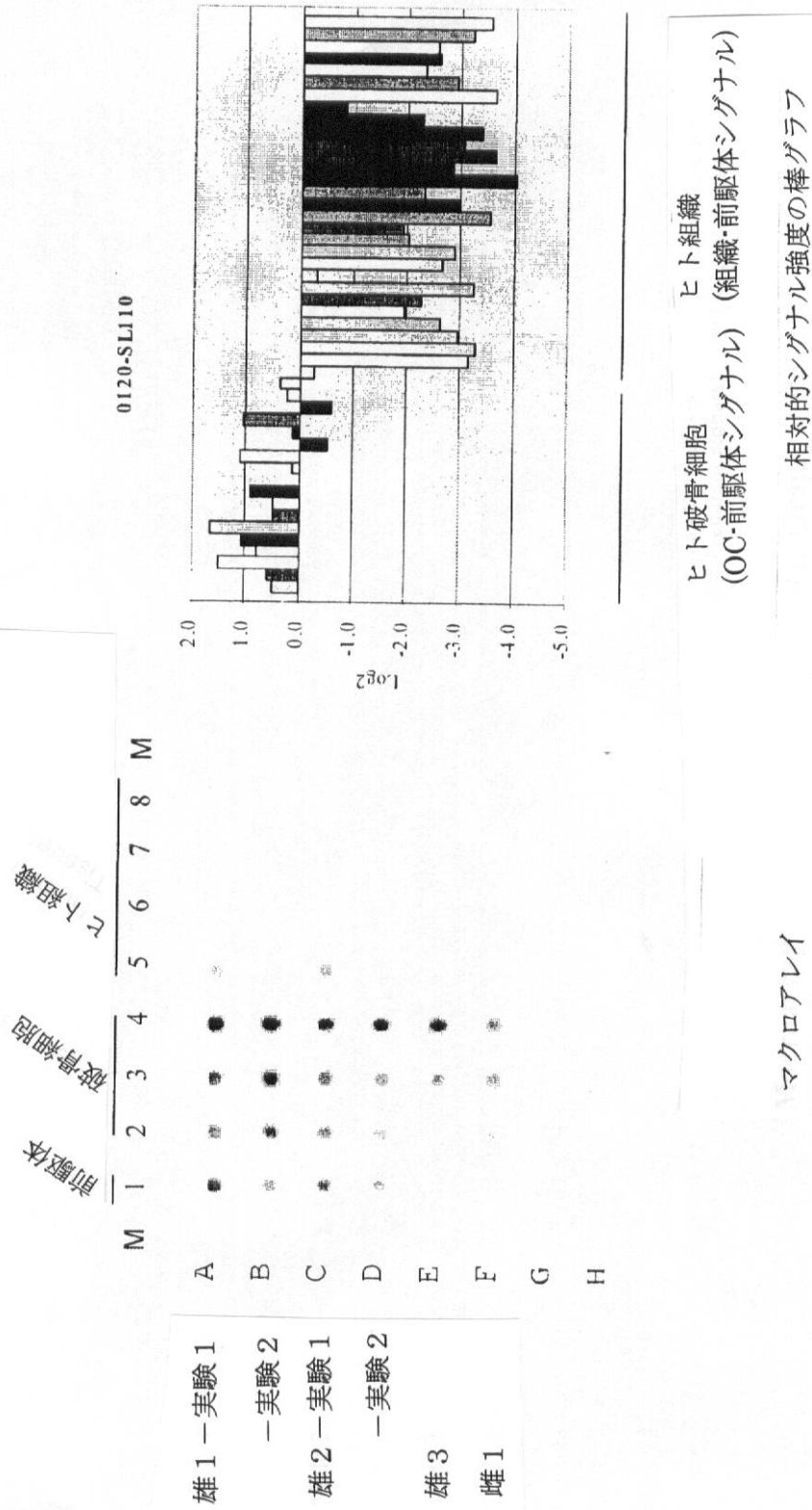
相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 16】

Fig. 16

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 16)

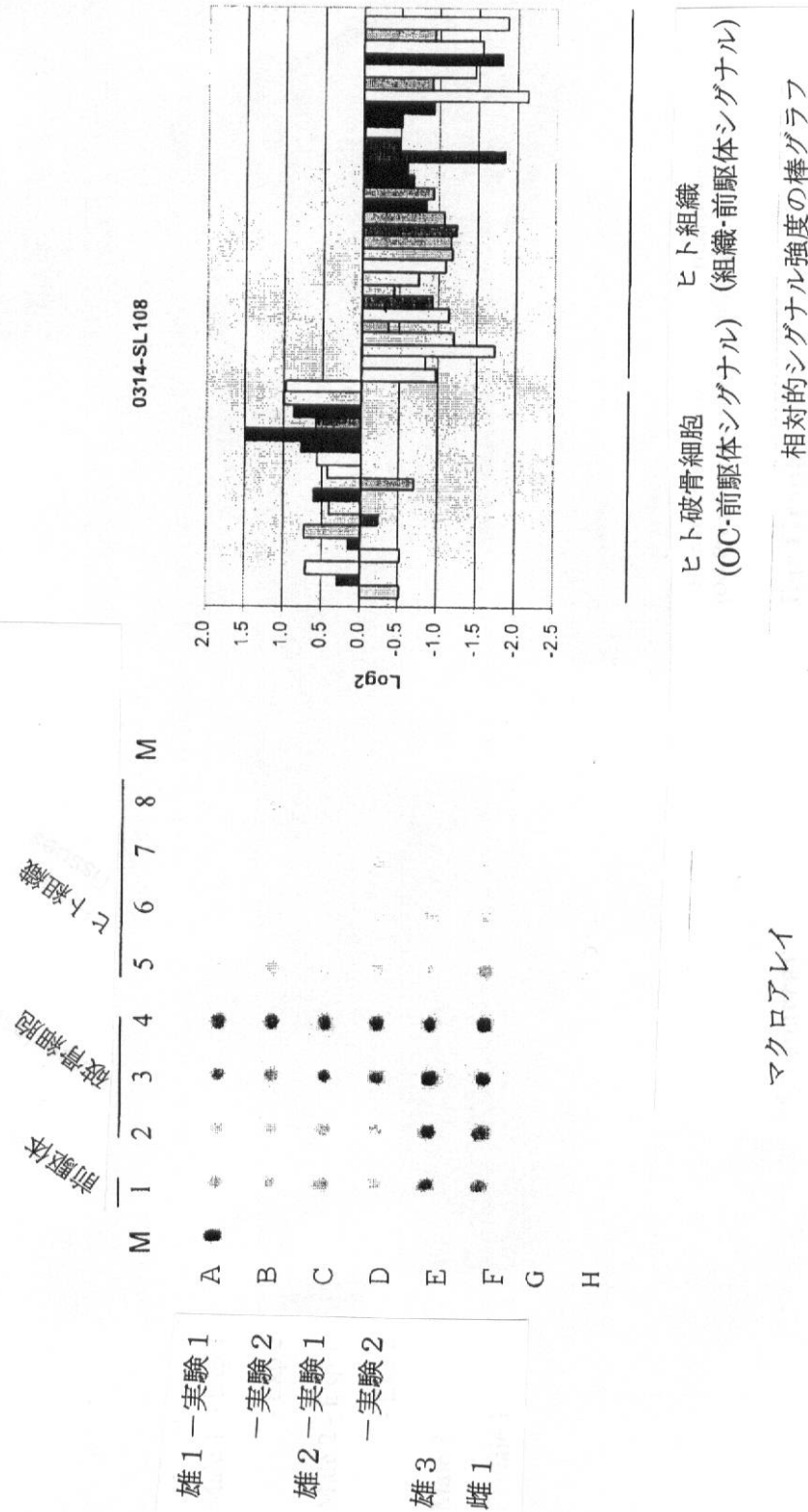


【図 17】

Fig. 17

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

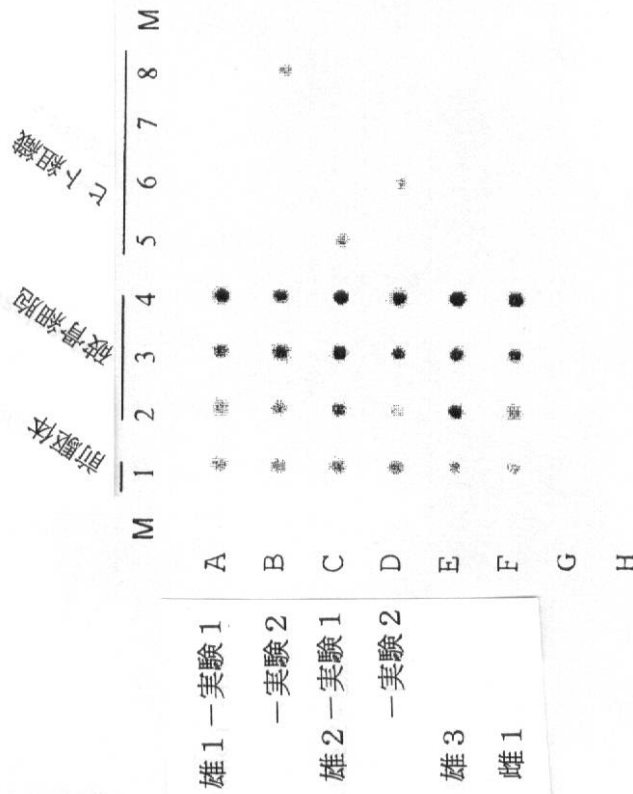
(配列番号 17)



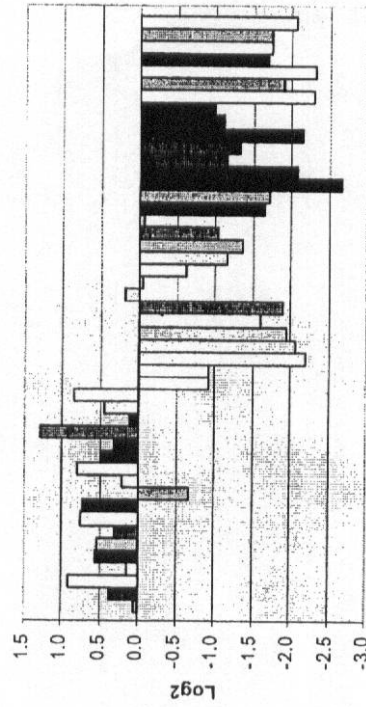
【図 18】

Fig. 18

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号18)



0421-SL110



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 19】

Fig. 19

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号19)

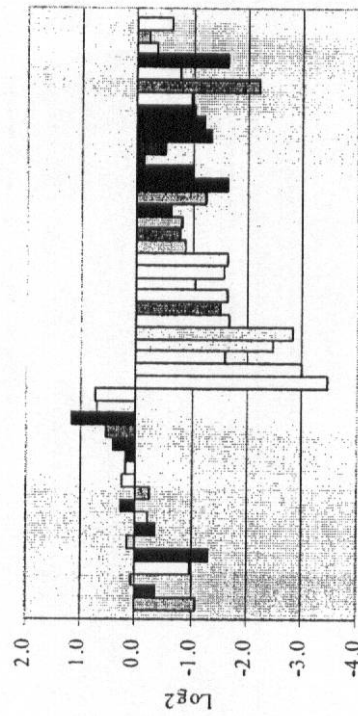
前駆体
破骨細胞
ヒト組織

1 2 3 4 5 6 7 8 M

雄 1 - 実験 1
- 実験 2
雄 2 - 実験 1
- 実験 2
雄 3
雌 1

A B C D E F G H

0619-SL110



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)
ヒト組織
(組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

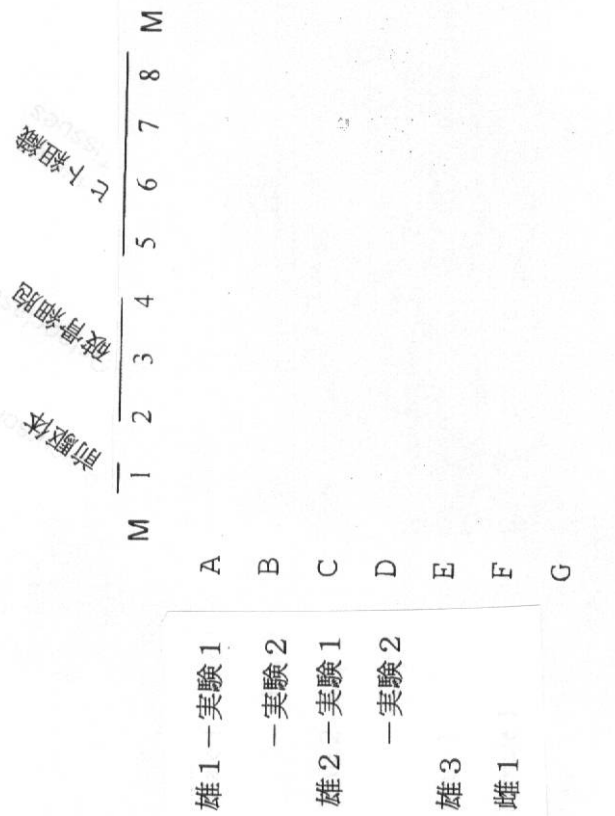
相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 20】

Fig. 20

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 20)



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

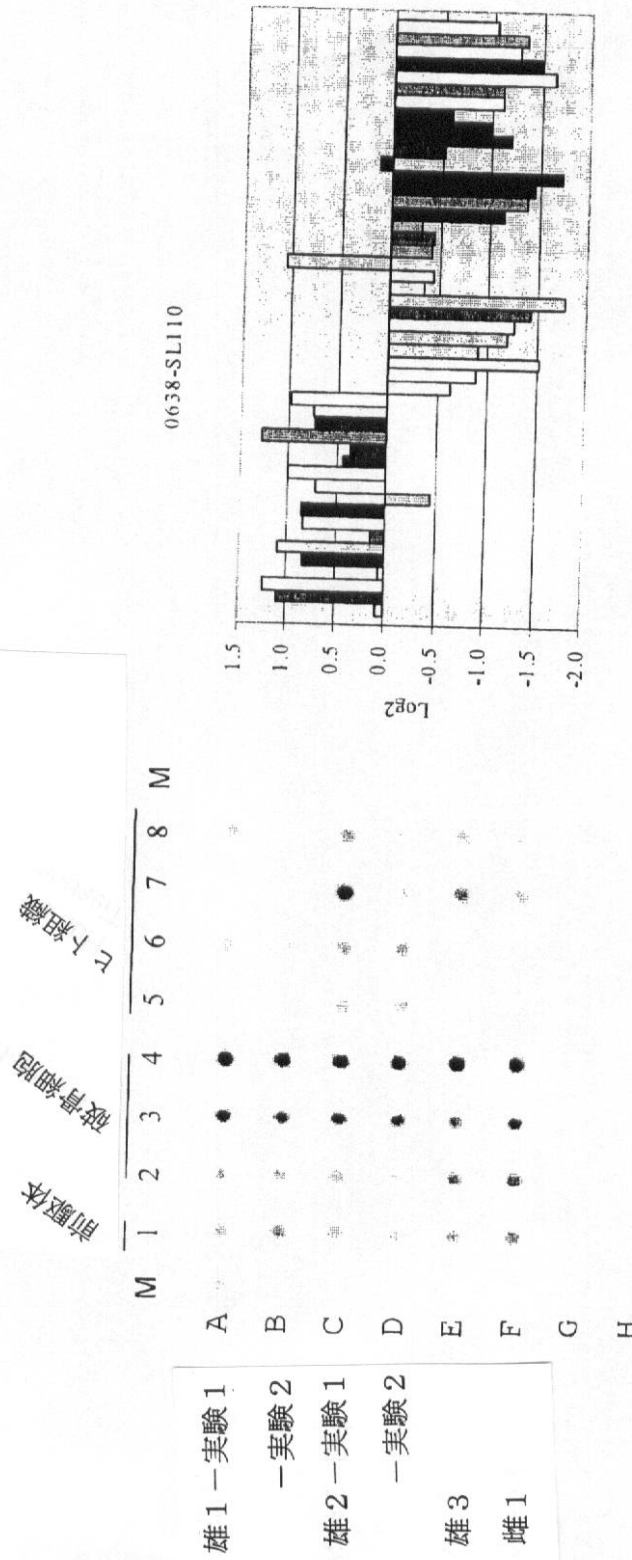
相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 21】

Fig. 21

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 21)



マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 22】

Fig. 22

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

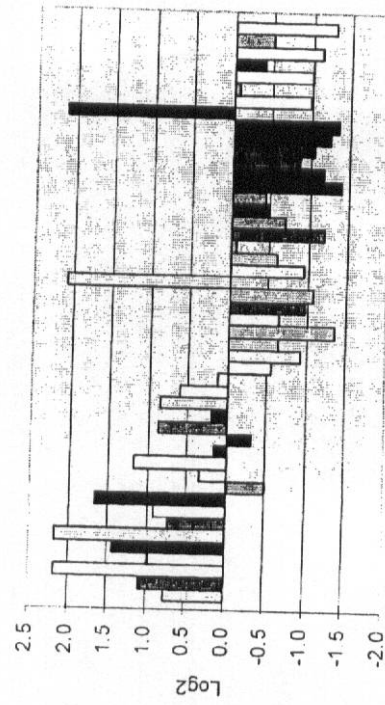
(配列番号 22)

前駆体
破骨細胞
ヒト組織

雄1-実験1
-実験2
雄2-実験1
-実験2
雄3
雌1

A B C D E F G H

0902-SL110



ヒト破骨細胞
(OC・前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織・前駆体シグナル)

相対的シグナル強度の棒グラフ

マクロアレイ

Fig. 23

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 23)

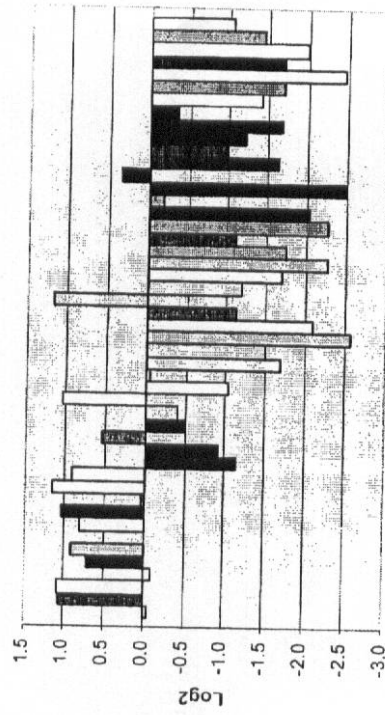
前駆体
破骨細胞
ヒト組織

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

雄 1 - 実験 1
- 実験 2
雄 2 - 実験 1
- 実験 2
雄 3
雌 1

A B C D E F G H

0103-SL109



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 24】

Fig. 24

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 24)

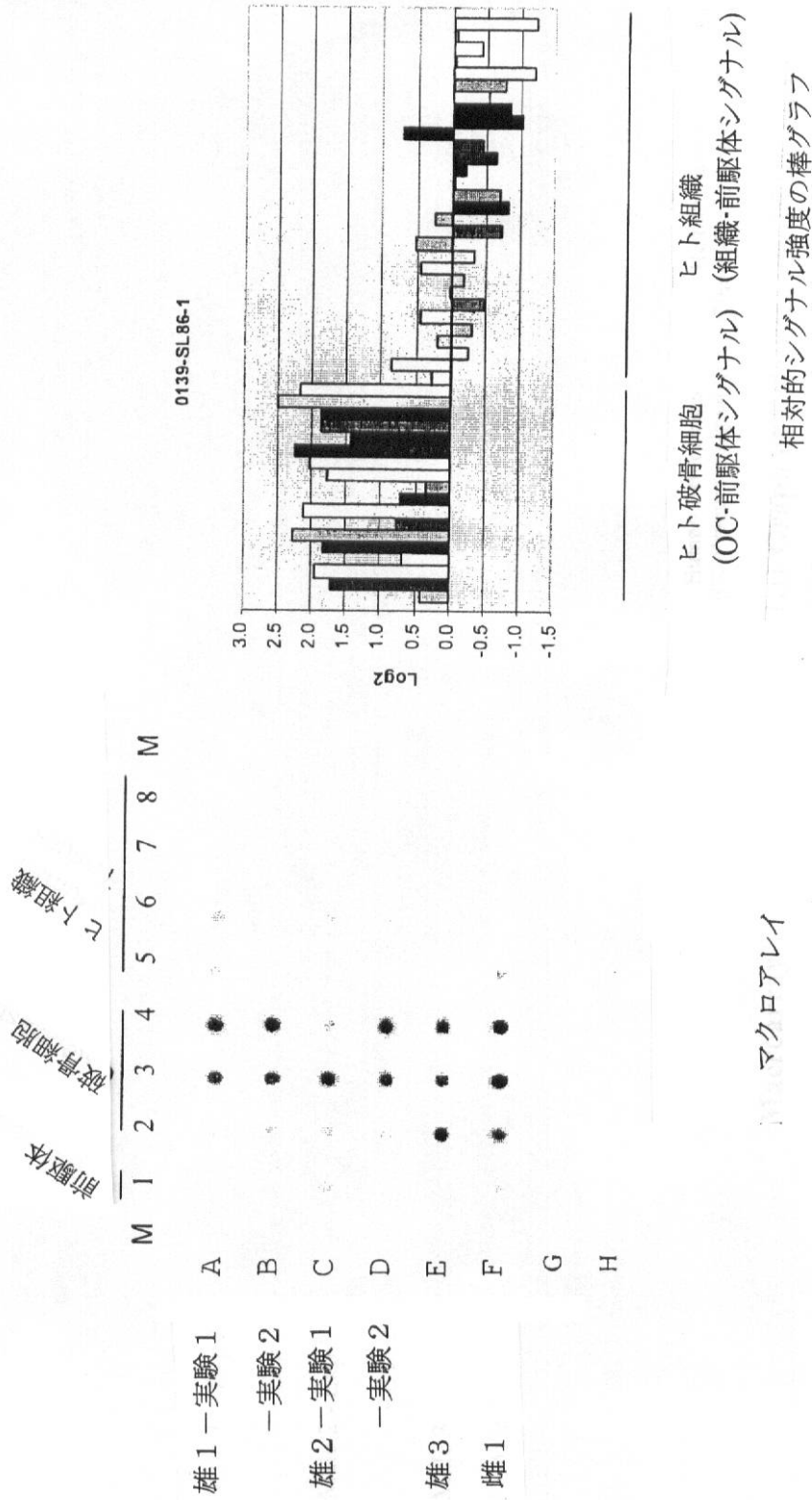


Fig. 25

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

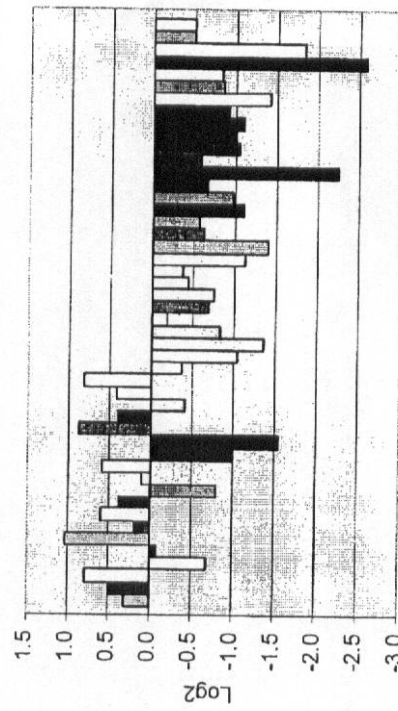
(配列番号 25)

前駆体
破骨細胞
ヒト組織

1 2 3 4 5 6 7 8 M

雄1-実験1 A
-実験2 B
雄2-実験1 C
-実験2 D
雄3 E
雌1 F
G
H

0636-SL110



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織

(組織-前駆体シグナル)

マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 26】

Fig. 26

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 26)

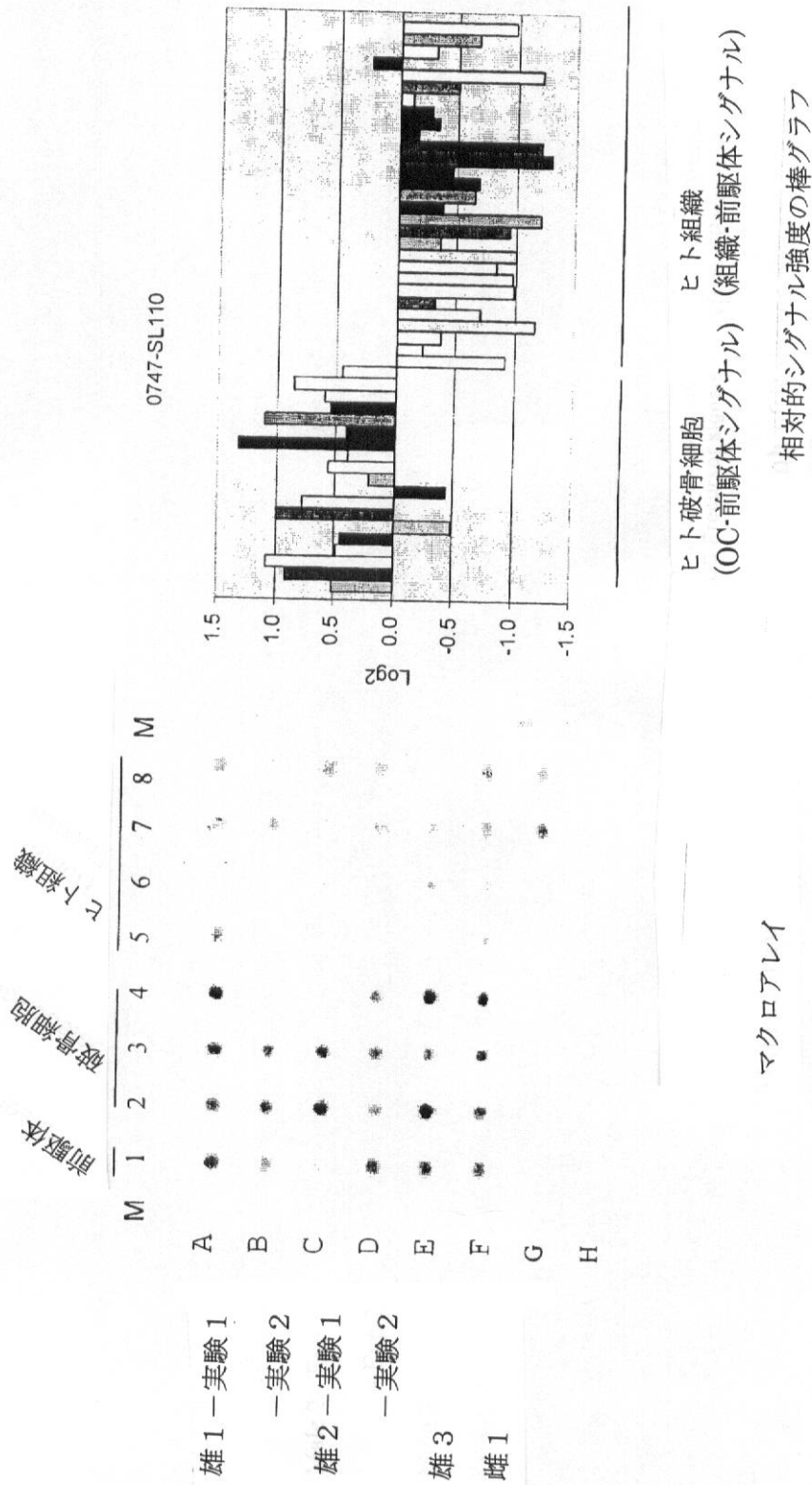


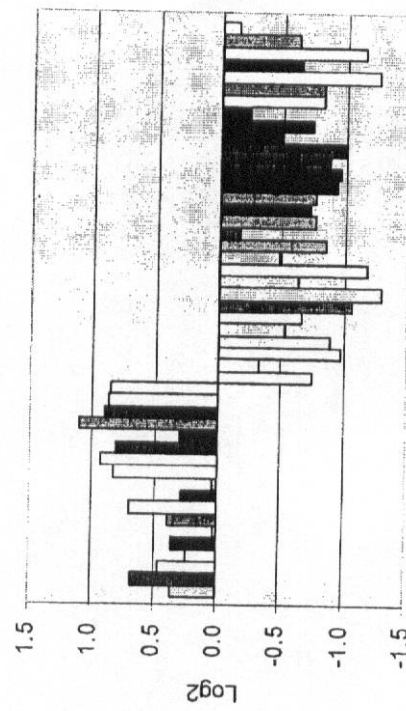
Fig. 27

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 27)

前駆体 破骨細胞 ヒト組織
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

雄 1 - 実験 1 A ●
- 実験 2 B
雄 2 - 実験 1 C
- 実験 2 D
雄 3 E
雌 1 F
G
H

0763-SL110



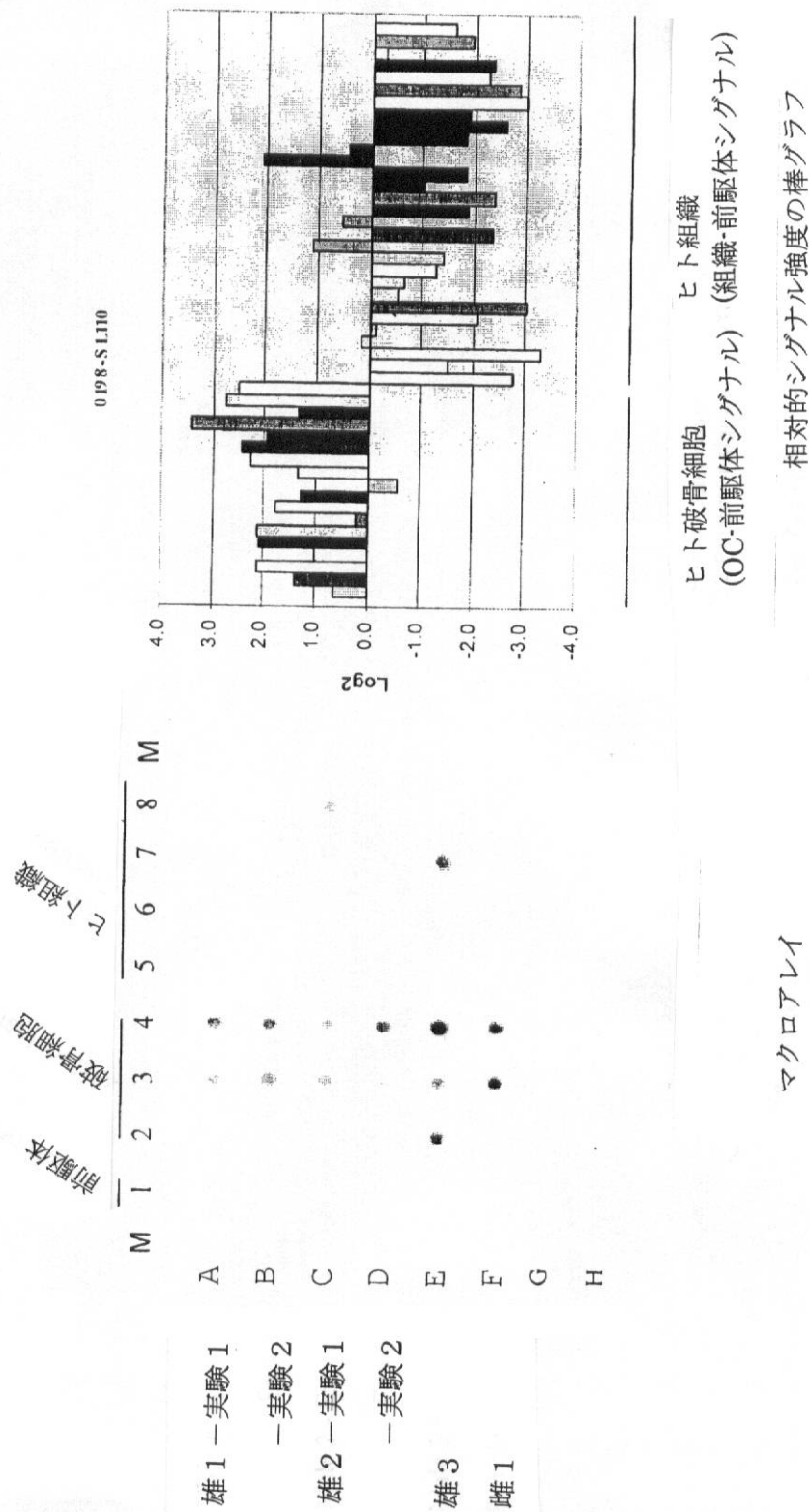
ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC-前駆体シグナル) (組織-前駆体シグナル)
相対的シグナル強度の棒グラフ

マクロアレイ

【図 28】

Fig. 28

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 28)

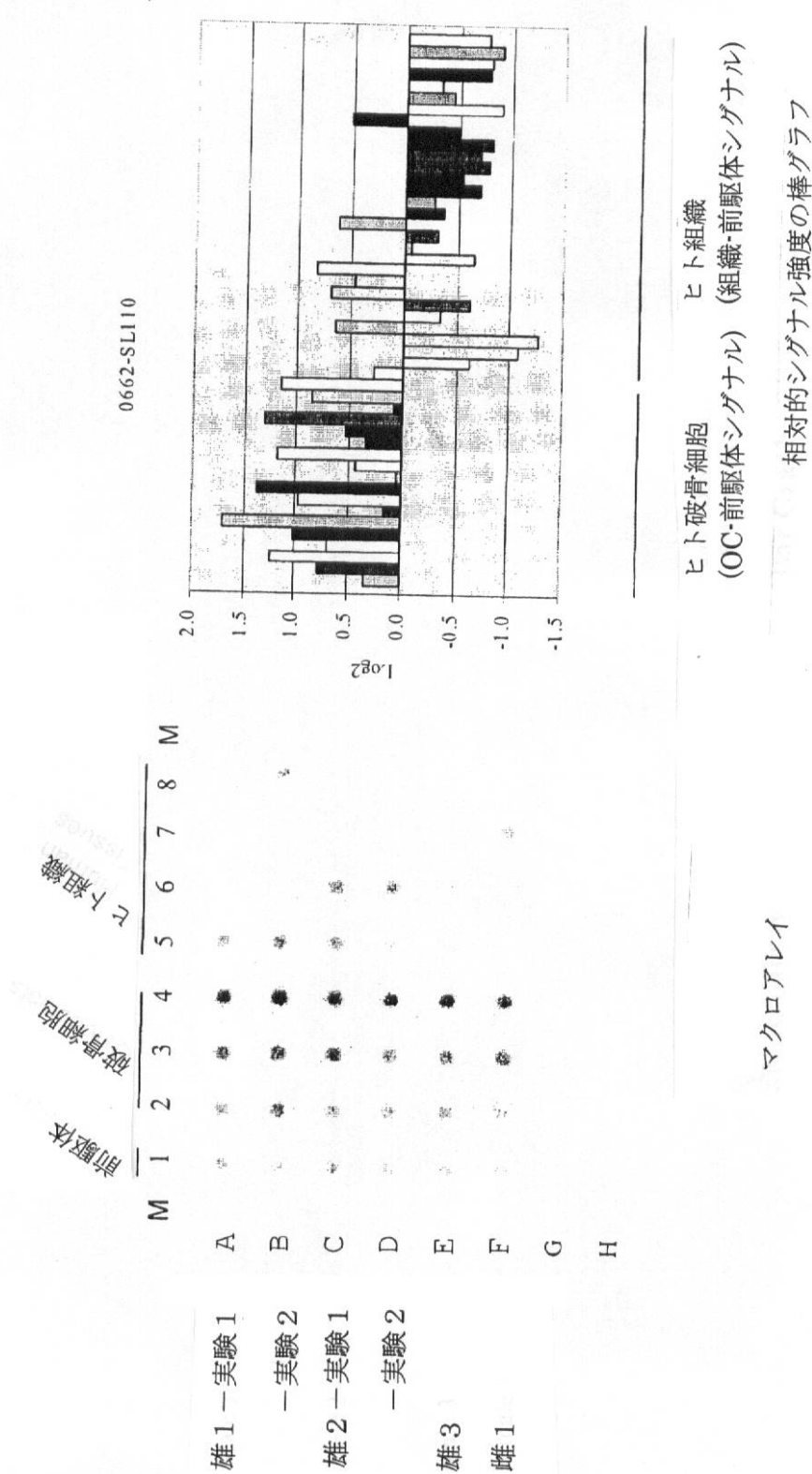


【図 29】

Fig. 29

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 29)

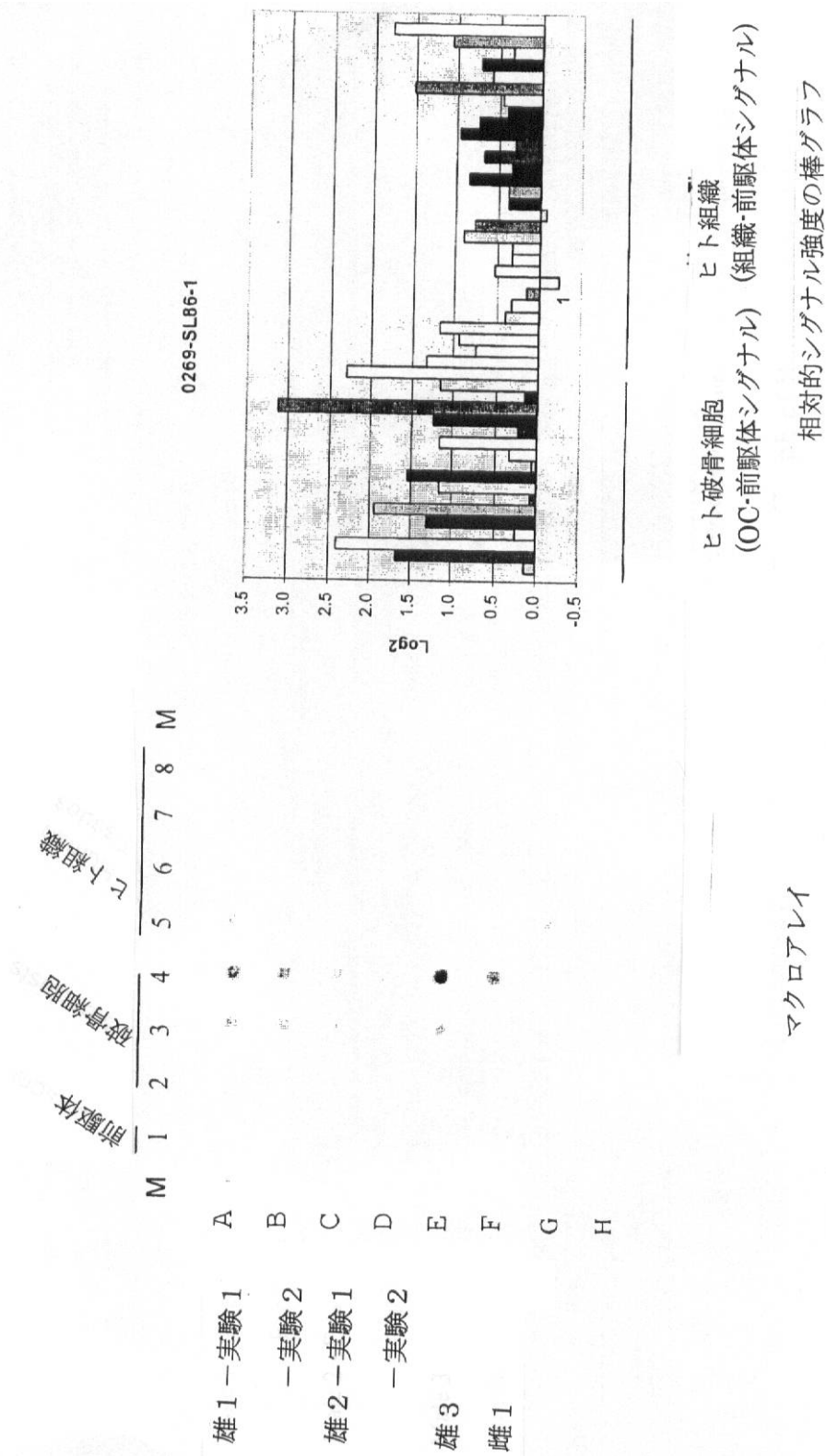


【図 30】

Fig. 30

ヒト破骨細胞のマクロアレイ

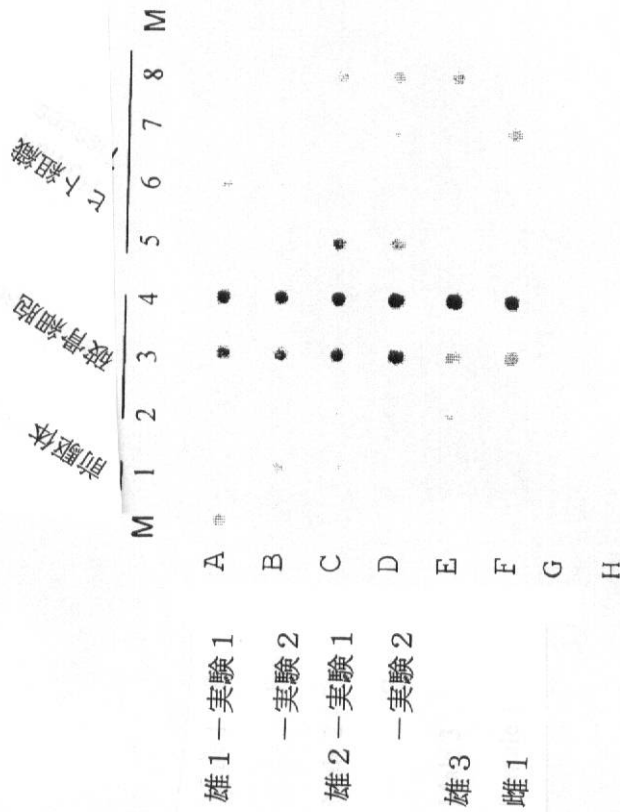
(配列番号 30)



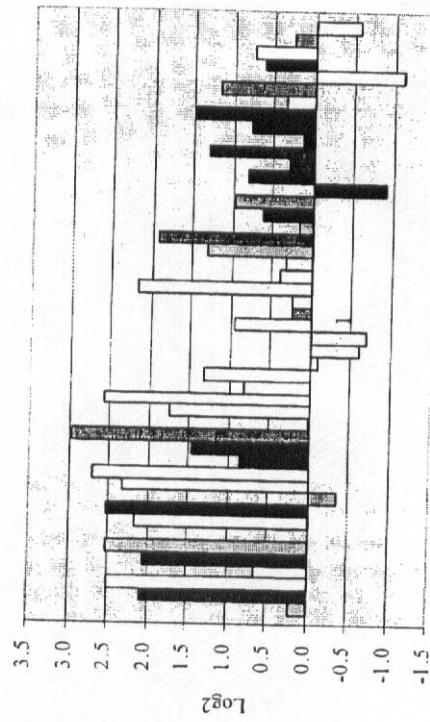
【図 31】

Fig. 31

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 31)



0685-SL110



ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC-前駆体シグナル) (組織-前駆体シグナル)
相対的シグナル強度の棒グラフ

マクロアレイ

ヒト破骨細胞のマクロアレイ (配列番号 32)

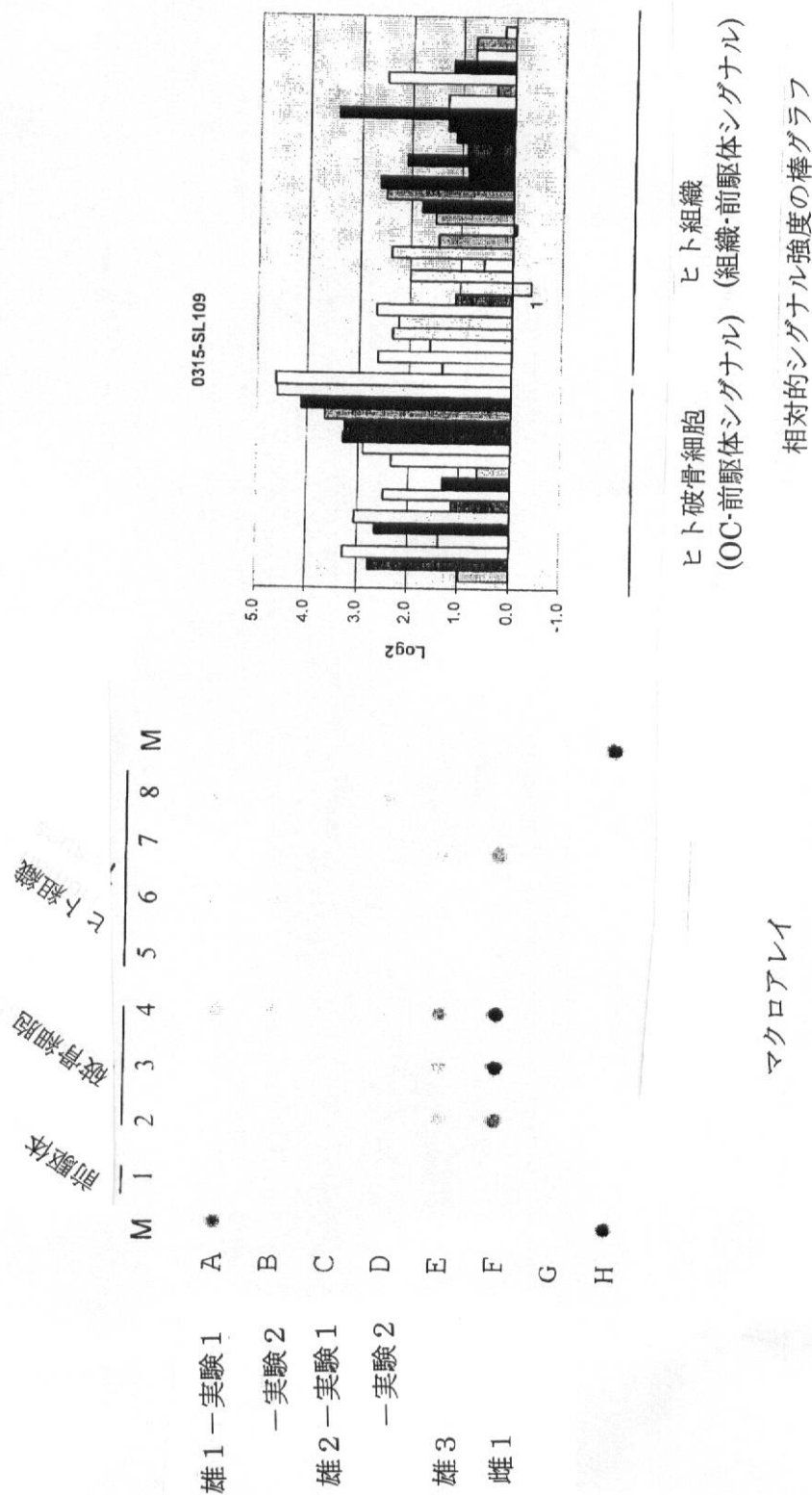
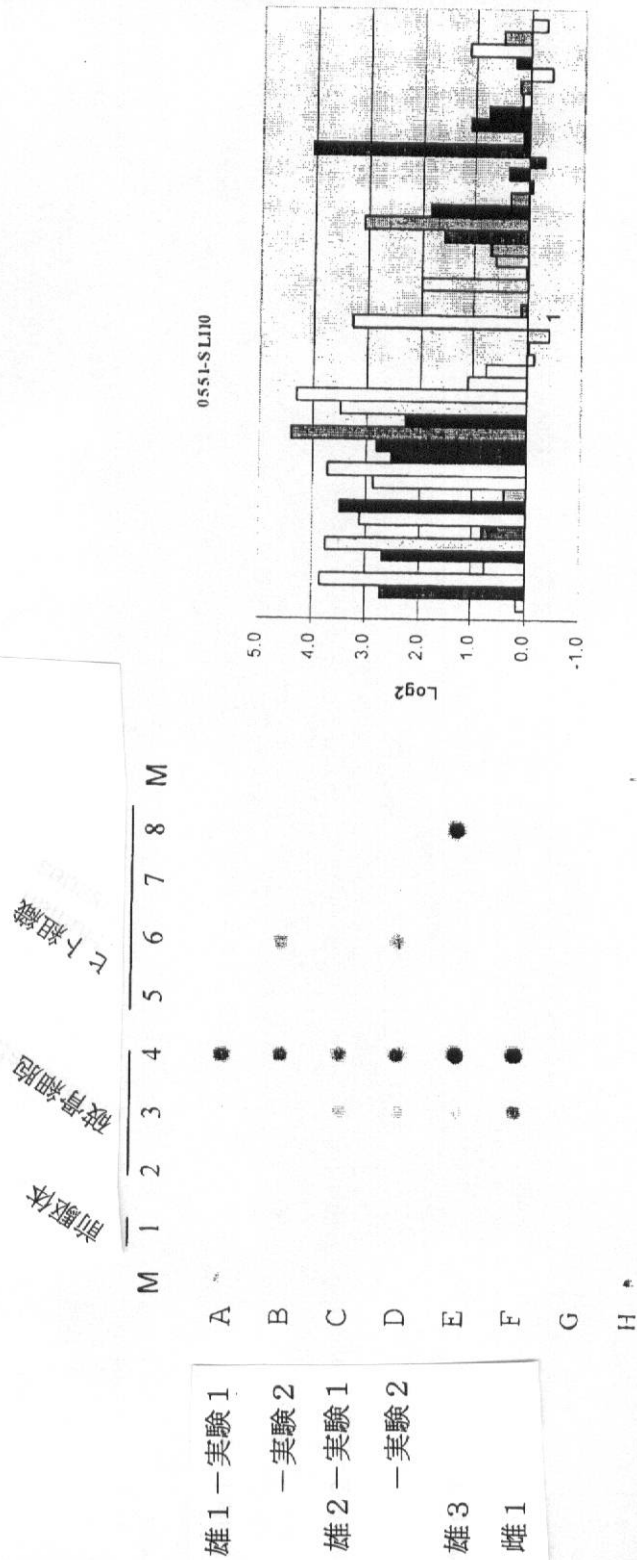


Fig.33

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 33)



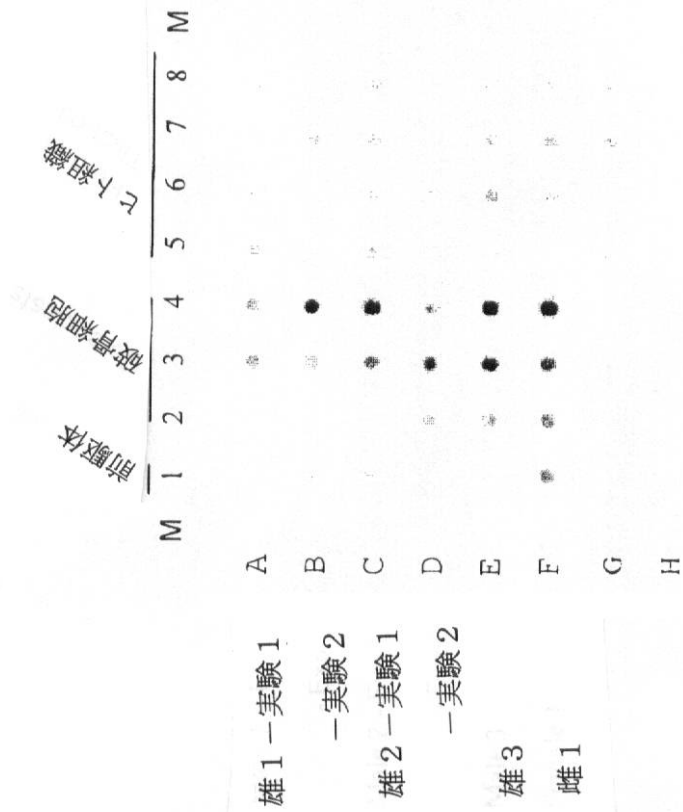
マクロアレイ

ヒト破骨細胞 (OC-前駆体シグナル)
ヒト組織 (組織-前駆体シグナル)

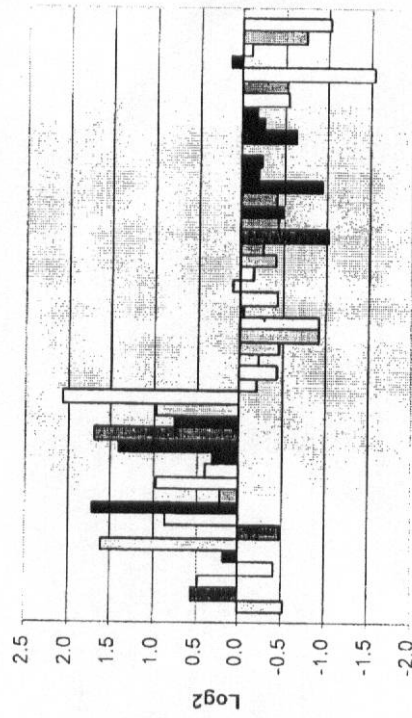
相対的シグナル強度の棒グラフ

Fig. 34

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 34)



0017-SL92-1



ヒト破骨細胞 ヒト組織
(OC・前駆体シグナル) (組織・前駆体シグナル)

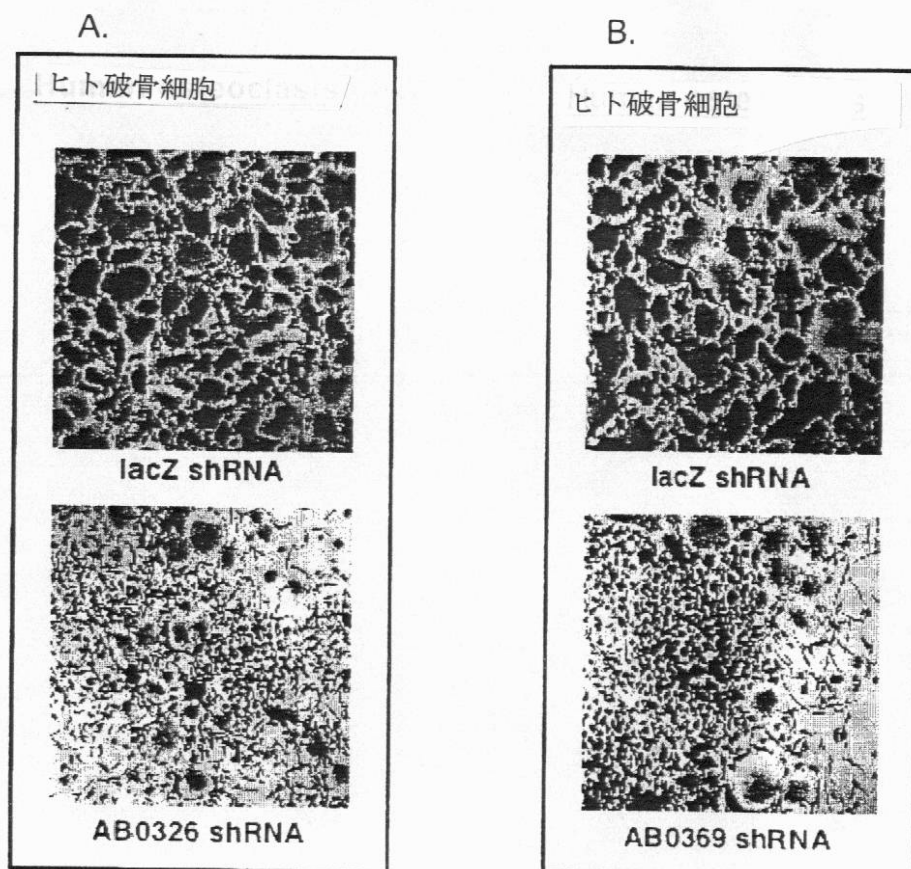
マクロアレイ

相対的シグナル強度の棒グラフ

【図 3 5】

Fig. 35

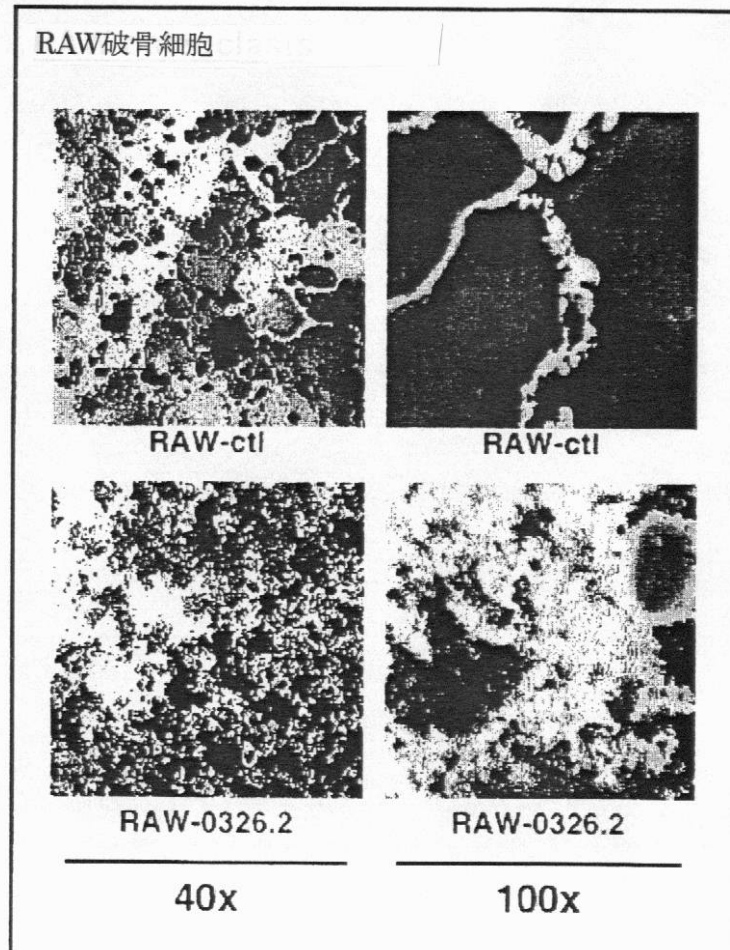
AB0326およびAB0369はヒト破骨細胞の
分化に必要とされる



【図 36】

Fig. 36

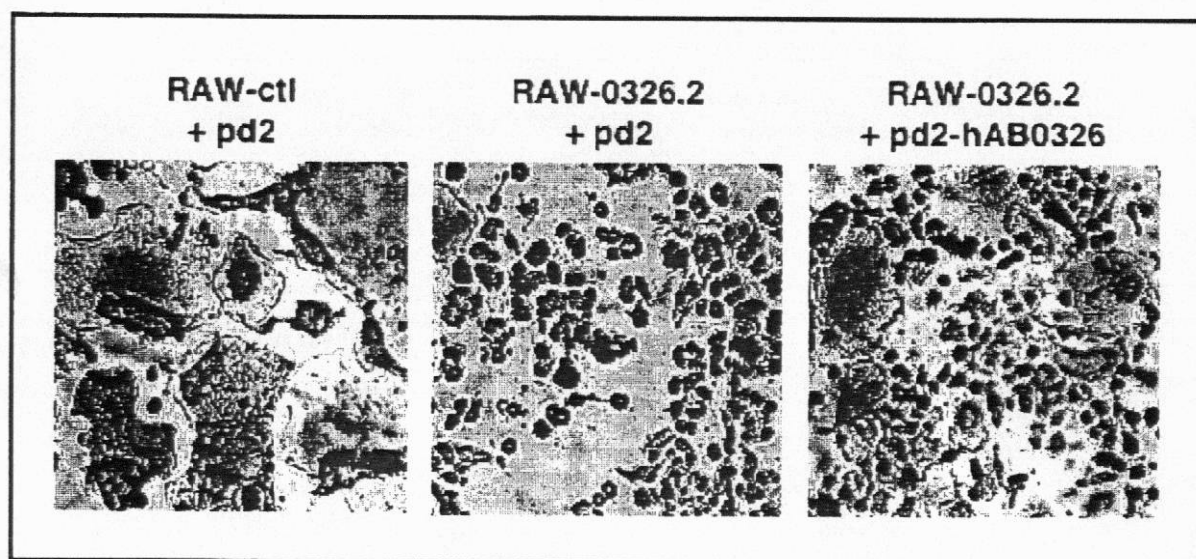
RAW264.7モデルにおける、AB0326(配列番号35)に関する
マウスオルソログの破骨細胞形成に対するノックダウン効果



【図 37】

Fig. 37

破骨細胞形成の阻害剤をスクリーニングするための、RAW-0326.2細胞における
配列番号1(AB0326)に関する機能的相補性アッセイ

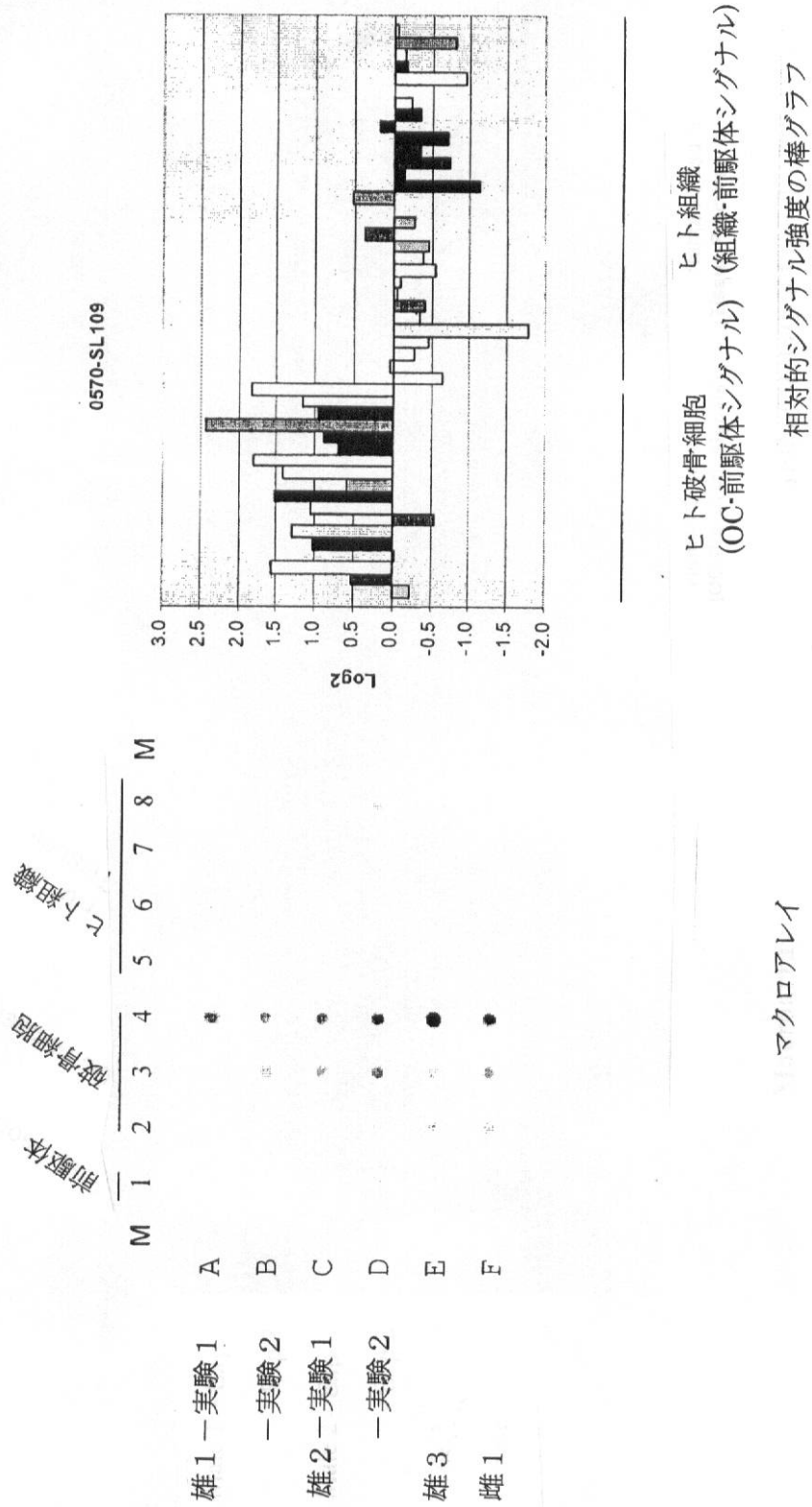


【図 38】

Fig. 38

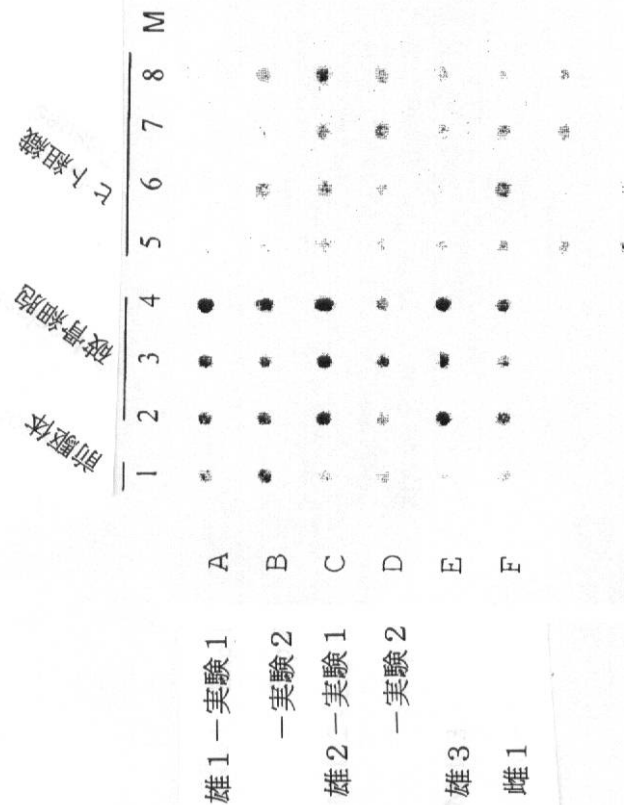
ヒト破骨細胞のマクロアレイ

(配列番号 85)

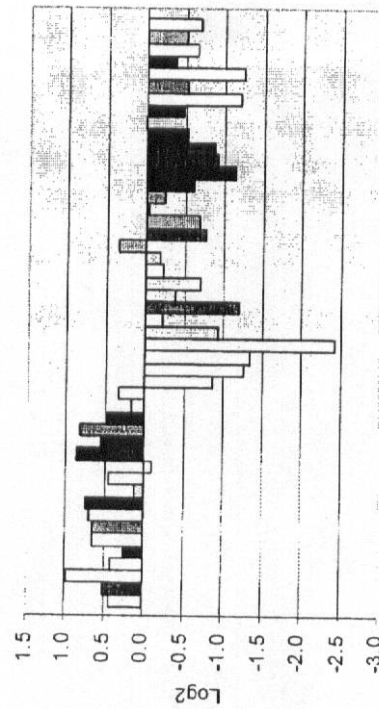


【図 39】

Fig. 39

ヒト破骨細胞のマクロアレイ
(配列番号 86)

0766-SL84-1



ヒト破骨細胞
(OC-前駆体シグナル)

ヒト組織
(組織-前駆体シグナル)

相対的シグナル強度の棒グラフ

マクロアレイ

【配列表】

2009525730000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年12月13日(2007.12.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される、骨疾患の治療または診断における使用、あるいは破骨細胞の分化の調節における使用のための単離ポリヌクレオチドであって、

- a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、
 - b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、
 - c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、
 - f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および
 - g) a)～f)のいずれか1つの断片
- からなる群から選択される1種を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記実質的に同一であるポリヌクレオチドが配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの変異体である、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記実質的に同一であるポリヌクレオチドが単離した非ヒトオルソログである、請求項1または2に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記非ヒトオルソログが配列番号35を含む、請求項3に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記断片が、配列番号1～33、85または86のいずれか1つの核酸配列と実質的に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記断片が配列番号42～45のいずれか1つからなる群から選択される、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

RNA分子である、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

DNA分子である、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項7または8のいずれか一項に記載のDNAまたはRNA分子を含むベクター。

【請求項 10】

発現ベクターである、請求項9に記載のベクター。

【請求項 11】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現されるポリヌクレオチド配列のライブラリーであって、

- a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、
- b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、
- c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、
- d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、

e)a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、
f)a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および
g)a)～f)のいずれか1つの断片
からなる群から選択される少なくとも1種を含むライブラリー。

【請求項 1 2】

請求項11に記載のポリヌクレオチドのライブラリーを含む発現ライブラリーであって、
前記ポリヌクレオチドのそれぞれが発現ベクター内に含まれる発現ライブラリー。

【請求項 1 3】

請求項11に記載のポリヌクレオチド配列のライブラリーを含むアレイ。

【請求項 1 4】

骨疾患を予防するための医薬組成物であって、

a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム
を含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレ
オチド、

d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレ
オチド、

e)a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f)a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g)a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される単離ポリヌクレオチドと、薬剤として許容される担体
を含む医薬組成物。

【請求項 1 5】

それを必要とする哺乳動物における骨疾患を予防するための方法であって、請求項1に
記載の単離ポリヌクレオチドまたは請求項14に記載の医薬組成物を前記哺乳動物に投与す
るステップを含む方法。

【請求項 1 6】

前記哺乳動物が、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機
能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ
症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チュー
マー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症
候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節
炎症、歯周病、くる病、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストーシスなどの骨硬化症障
害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害からなる群か
ら選択される状態に罹患している、請求項15に記載の方法。

【請求項 1 7】

骨疾患を治療するための医薬品を調製するための、

a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム
を含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレ
オチド、

d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレ
オチド、

e)a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f)a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g)a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される単離ポリヌクレオチドの使用。

【請求項 1 8】

- a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、
 - b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、
 - c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、
 - f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および
 - g) a)～f)のいずれか1つの断片
- からなる群から選択される単離ポリヌクレオチドと、薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 19】

- 骨疾患の診断における、
- a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、
 - b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、
 - c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、
 - e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、
 - f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、
 - g) a)～f)のいずれか1つの断片および、
 - h) a)～g)のいずれか1つを含むライブラリー
- からなる群から選択される少なくとも1つのポリヌクレオチドの使用。

【請求項 20】

骨リモデリングと関連がある状態を診断するためのキットであって、配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つと実質的に相補的である少なくとも1つの配列、配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム、およびそれら断片を含むキット。

【請求項 21】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される、骨疾患の治療または診断における使用、あるいは破骨細胞の分化の調節における使用のための単離ポリペプチド配列であって、単離ポリペプチドが、

- a) 配列番号48～80のいずれか1つ、
 - b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、
 - c) a)またはb)のいずれか1つの生物活性断片、
 - d) a)またはb)のいずれか1つの生物活性類似体
- からなる群から選択される配列を含む、単離ポリペプチド配列。

【請求項 22】

前記生物活性類似体が、前記配列中に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、請求項21に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 23】

- a) 配列番号48～80のいずれか1つ、
- b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、
- c) a)またはb)のいずれか1つの生物活性断片、
- d) a)またはb)のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む単離ポリペプチドおよび薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 24】

骨疾患を治療するための医薬品を調製するための、

a) 配列番号48～80のいずれか1つ、

b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、

c) a) または b) のいずれか1つの生物活性断片、

d) a) または b) のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む単離ポリペプチドの使用。

【請求項 25】

それを必要とする個体における骨疾患を治療するための方法であって、配列番号48～80または配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの活性または発現を妨害することができる化合物を投与するステップを含む方法。

【請求項 26】

前記哺乳動物が、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、バジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストーシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害からなる群から選択される状態に罹患している、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

配列番号48～80または配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの機能を損なうことができる阻害化合物を同定するための方法であって、前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させるステップ、および前記ポリペプチドの機能を測定するステップを含み、それにより前記ポリペプチドの破骨細胞の分化を促進する能力の低下によって適切な阻害化合物が明確に同定される方法。

【請求項 28】

前記破骨細胞の分化が誘導される、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記細胞が前記ポリペプチドを自然に発現しない、また自然に発現されるポリペプチド類似体の発現が抑制される、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

外因性型の請求項1から8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項21もしくは22のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現する細胞。

【請求項 31】

骨細胞である、請求項30に記載の細胞。

【請求項 32】

破骨細胞である、請求項31に記載の細胞。

【請求項 33】

配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド配列を含むポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片と特異的に結合することができる、単離または精製抗体。

【請求項 34】

配列番号85または86によってコードされているポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片と特異的に結合することができる抗体を産生するハイブリ

ドーマ細胞。

【請求項 35】

請求項33に記載の抗体を含む組成物。

【請求項 36】

配列番号85または86によってコードされているポリペプチド、または前記ポリペプチドの少なくとも6アミノ酸の断片の免疫原性断片で非ヒト動物を免疫処置するステップを含む、抗体を作製する方法。

【請求項 37】

ポリペプチドと特異的に結合する抗体を検出するための、

a) 配列番号48～80のいずれか1つ、

b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、

c) a) または b) のいずれか1つの生物活性断片、

d) a) または b) のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む単離ポリペプチドの使用。

【請求項 38】

請求項21または22に記載の少なくとも1つのポリペプチドと特異的に結合する抗体を検出するためのイムノアッセイであって、

a) 哺乳動物由来の生物体液サンプルのサンプルを前記ポリペプチドと接触させるステップ、および

b) 前記サンプル中のポリペプチドと抗体の免疫複合体の形成を検出するステップを含むイムノアッセイ。

【請求項 39】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現されるポリヌクレオチド配列のライブラリーであって、

配列番号85または配列番号86のいずれか一つ1つと、

a) 配列番号1～配列番号33のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、

e) a)～d) のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e) のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g) a)～f) のいずれか1つの断片

からなる群から選択される少なくとも1種を含むライブラリー。

【請求項 40】

請求項39に記載のポリヌクレオチドのライブラリーを含む発現ライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドのそれぞれが発現ベクター内に含まれる発現ライブラリー。

【請求項 41】

請求項39に記載のポリヌクレオチド配列のライブラリーを含むアレイ。

【請求項 42】

それを必要とする哺乳動物における破骨細胞の分化を調節するための方法であって、請求項18に記載の医薬組成物を前記哺乳動物に投与するステップを含む方法。

【請求項 43】

前記哺乳動物が、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、バジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストーシスなどの骨硬化症障

害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害からなる群から選択される状態に罹患している、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 4】

破骨細胞の分化を調節するための医薬品を調製するための、

a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、

e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g) a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される単離ポリヌクレオチドの使用。

【請求項 4 5】

破骨細胞の分化と関連がある状態を診断するためのキットであって、配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つと実質的に相補的である少なくとも1つの配列、配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム、およびそれら断片を含むキット。

【請求項 4 6】

破骨細胞の分化を調節するための医薬品を調製するための、

a) 配列番号48～80のいずれか1つ、

b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、

c) a) または b) のいずれか1つの生物活性断片、

d) a) または b) のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む単離ポリペプチドの使用。

【請求項 4 7】

それを必要とする個体における破骨細胞の分化を調節するための方法であって、配列番号48～80または配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの活性または発現を妨害することができる化合物を投与するステップを含む方法。

【請求項 4 8】

前記哺乳動物が、骨粗しょう症、骨減少症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺中毒症、全身性肥満細胞症、成人型低ホスファターゼ症、副腎皮質機能亢進症、骨形成不全症、パジェット病、クッシング病/症候群、チューマー症候群、ゴーシェ病、エーラーズ-ダンロス症候群、マルファン症候群、メンケス症候群、ファンコニー症候群、多発性骨髄腫、高カルシウム血症、低カルシウム血症、関節炎症、歯周病、くる病、繊維形成不全症骨、ピクノディスオストローシスなどの骨硬化症障害、およびマクロファージ媒介性炎症プロセスによって引き起こされる障害からなる群から選択される状態に罹患している、請求項47に記載の方法。

【請求項 4 9】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される単離ポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド

、

d) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド

e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g) a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される1種を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 50】

前記実質的に同一であるポリヌクレオチドが配列番号85または配列番号86のいずれか1つの変異体である、請求項49に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 51】

前記実質的に同一であるポリヌクレオチドが単離した非ヒトオルソログである、請求項49または50に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 52】

前記断片が、配列番号85または配列番号86のいずれか1つの核酸配列と実質的に相補的である少なくとも10ヌクレオチドの配列を含む、請求項49に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 53】

RNA分子である、請求項49から52のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 54】

DNA分子である、請求項49から52のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 55】

請求項53または54のいずれか一項に記載のDNAまたはRNA分子を含むベクター。

【請求項 56】

発現ベクターである、請求項55に記載のベクター。

【請求項 57】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現されるポリヌクレオチド配列のライブラリーであって、

a) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド

d) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド

e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g) a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される少なくとも1種を含むライブラリー。

【請求項 58】

請求項55に記載のポリヌクレオチドのライブラリーを含む発現ライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドのそれぞれが発現ベクター内に含まれる発現ライブラリー。

【請求項 59】

請求項55に記載のポリヌクレオチド配列のライブラリーを含むアレイ。

【請求項 60】

a) 請求項49に記載の単離ポリヌクレオチドおよび

b) 薬剤として許容される担体
を含む医薬組成物。

【請求項 61】

破骨細胞の分化を調節するための医薬組成物であって、

a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレーム

を含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、

e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g) a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択される単離ポリヌクレオチドと、薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項62】

未分化破骨前駆細胞と比較して分化破骨細胞において示差的に発現される単離ポリペプチド配列であって、単離ポリペプチドが、

a) 配列番号85または配列番号86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド

、

b) a)の生物活性断片、

c) a)の生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む、単離ポリペプチド配列。

【請求項63】

前記生物活性類似体が、前記配列中に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、請求項62に記載の単離ポリペプチド。

【請求項64】

請求項60または61のいずれか一項に記載のポリペプチドおよび薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項65】

配列番号48～80または配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの発現を損なうことができる阻害化合物を同定するための方法であって、前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させるステップ、および前記ポリペプチドの発現を測定するステップを含み、それにより前記ポリペプチドの発現の低下によって適切な阻害化合物が明確に同定される方法。

【請求項66】

a) 配列番号48～80のいずれか1つ、

b) 配列番号1～33、配列番号85または86のいずれか1つによってコードされているポリペプチド、

c) a)またはb)のいずれか1つの生物活性断片、

d) a)またはb)のいずれか1つの生物活性類似体

からなる群から選択される配列を含む、単離ポリペプチド配列と、薬剤として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項67】

a) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つを含むポリヌクレオチド、

b) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、

c) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの転写可能部分を含むポリヌクレオチド、

d) 配列番号1～配列番号33、85または86のいずれか1つの翻訳可能部分を含むポリヌクレオチド、

e) a)～d)のいずれか1つと実質的に同一である配列を含むポリヌクレオチド、

f) a)～e)のいずれか1つと実質的に相補的である配列を含むポリヌクレオチド、および

g) a)～f)のいずれか1つの断片

からなる群から選択されるポリヌクレオチドの発現を低下するsiRNAまたはshRNA分子。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2007/000210
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 15/60</i> (2006.01), <i>A61K 31/7088</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61K 38/19</i> (2006.01), <i>A61K 38/22</i> (2006.01), <i>A61K 38/43</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) 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: <i>C12N 15/60</i> (2006.01), <i>A61K 31/7088</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61K 38/19</i> (2006.01), <i>A61K 38/22</i> (2006.01), <i>A61K 38/43</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Database: GenomeQuest, Delphion, Canadian Patent Database Key words: bone, remod*, osteo*, osteoclast		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAWABATA et al. Accession No. AK172835, NCBI nucleotide database [online], 6 May 2004, [retrieved on 2007-05-02]. Retrieved from Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=47077862	1-13, 18, 21-23, 27-41
X	BRANDENBERGER R et al. Accession No. NM_001014433. NCBI nucleotide database [online], 5 April 2005, [retrieved on 2007-05-02]. Retrieved from Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=62198240	1-13, 18, 21-23, 27-41
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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		Date of mailing of the international search report
9 May 2007 (09-05-2007)		30 May 2007 (30-05-2007)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer X. Ma 819- 997-4527

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2007/000210

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☒ Claim Nos. : 15, 16, 25 and 26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 15, 16, 25 and 26 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search under Rule 39(iv) of the PCT. Regardless, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in the claims.
2. ☒ Claim Nos. : 1-3, 5-41 (all 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 extra sheet
3. ☐ Claim Nos. :
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. 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 :

See extra sheet

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 claim 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 claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2007/000210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Accession No. XM_884636, NCBI nucleotide database [online], 1 December 2005, [retrieved on 2007-05-02]. Retrieved from Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=94405068	1-13, 18, 21-23, 27-41
A	ISHIDA N. et al. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis <i>in vitro</i> and elucidation of NFAT2 as a key regulator. J Bio. Chem. 25 October 2002, vol. 277, no. 43, pp. 41147-41156, ISSN: 0021-9258	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2007/000210**Continuation of Box No. II:**

Claims 1-3 and 5-41 encompass subject matter with insufficient disclosure and do not comply with Articles 5 and 6 of the PCT. Since most of the claimed polynucleotides (SEQ ID NOs: 1-33) are known in the prior art (see pages 70-80 and 89-93 of this application and citations listed in this International Search Report), the underlying inventive concept in this application appears to be the use of the polynucleotides represented by SEQ ID NOs: 1 to 33, 35, 85 and 86 and their respective polypeptides in the diagnosis and treatment of bone diseases. However, this application fails to provide adequate support for the proposed use. This application only shows that SEQ ID NOs: 1, 2 and 35 are required in osteoclast differentiation. This observation cannot lead to the conclusion that SEQ ID NOs: 1, 2 and 35 are related to bone diseases and are further useful in diagnosis and treatment of bone diseases, because the relation between the polynucleotides and bone disorders has not been established in this application. Furthermore, as polynucleotides represented by SEQ ID NOs: 1 to 33, 35, 85 and 86 are structurally distinct, the requirement of SEQ ID NOs: 1, 2 and 35 in osteoclast differentiation cannot readily apply to other polynucleotides. In the present case, the application so lacks sufficient disclosure that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for the parts of the application which appear to have support for being involved in osteoclast differentiation, namely SEQ ID NOs: 1, 2 and 35, and their encoded polypeptides.

Continuation of Box No. III:

Polynucleotides represented by SEQ ID NOs: 1 to 33 and their encoded polypeptides are known in the prior art as disclosed on pages 70-80 and 89-93 of this application (also see the citations in this International Search Report). Furthermore, polynucleotides represented by SEQ ID NOs: 1 to 33, 35, 85 and 86 are structurally and functionally distinct. The observation that these polynucleotides exhibit an up-regulated expression in differentiated osteoclasts cannot be considered as a special technical feature to unite these polynucleotides as one invention, because differentially up-regulated gene expression during osteoclast cell differentiation by microarray analyses was known in the prior art (see the reference to ISHIDA N. et al. in this International Search Report). In addition, this application does not provide adequate support that all these polynucleotides are linked with bone remodeling and bone diseases. Therefore, claims 1-41 do not comply with Rule 13 of the PCT, because there is no special technical feature to link these polynucleotides as a whole to make a contribution over the prior art. Each polynucleotide with its corresponding polypeptide and method of use thereof is considered as one invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2007/000210

(Continuation from page 4, field A. Classification of subject matter and field B. minimum documentaion searched)

A61K 38/44 (2006.01), *A61K 38/46* (2006.01), *A61K 38/48* (2006.01), *A61K 38/51* (2006.01),
A61K 38/53 (2006.01), *A61K 39/395* (2006.01), *A61K 48/00* (2006.01), *A61P 19/08* (2006.01),
C07K 14/47 (2006.01), *C07K 14/52* (2006.01), *C07K 14/575* (2006.01), *C07K 16/18* (2006.01),
C07K 16/24 (2006.01), *C07K 16/26* (2006.01), *C07K 16/28* (2006.01), *C07K 16/40* (2006.01),
C12N 15/12 (2006.01), *C12N 15/16* (2006.01), *C12N 15/19* (2006.01), *C12N 15/52* (2006.01),
C12N 15/53 (2006.01), *C12N 15/55* (2006.01), *C12N 15/57* (2006.01), *C12N 15/63* (2006.01),
C12N 5/10 (2006.01), *C12N 5/16* (2006.01), *C12N 9/00* (2006.01), *C12N 9/02* (2006.01),
C12N 9/14 (2006.01), *C12N 9/64* (2006.01), *C12N 9/88* (2006.01), *C12P 21/08* (2006.01),
C12Q 1/00 (2006.01), *C12Q 1/68* (2006.01), *C40B 40/02* (2006.01), *C40B 40/08* (2006.01),
G01N 33/53 (2006.01), *G01N 33/566* (2006.01)

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 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 5/18 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/18	
A 6 1 P 5/24 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/24	
A 6 1 P 5/38 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/38	
A 6 1 P 3/14 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/14	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	J
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 4 0 B 30/04	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 ロイ・ラビンドラノース・スークナナン
カナダ・ケベック・H 9 W・6 G 5・ビーコンズフィールド・リュ・ジェイムズ・ショウ・3 2 2

(72)発明者 ジル・ベルナール・トランブレ
カナダ・ケベック・J 5 R・6 N 8・ラ・プレリ・ドゥニズールメストル・ストリート・1 0 0

(72)発明者 マリオ・フィリヨン
カナダ・ケベック・J 4 J・4 M 8・ロングイユ・メープル・ストリート・7 3 9

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 CB13 DA36 FB03 FB04
4B024 AA01 AA11 BA43 CA04 CA20 DA02 DA06 EA02 EA04 GA11
HA17

4B029	AA07	AA23	BB20	CC03						
4B063	QA01	QA19	QQ52	QR08	QR55	QR62	QS25	QS33	QS34	
4B064	AG27	CC24	DA01							
4B065	AA26X	AA91X	AA93Y	AB01	AB04	AC14	BA02	CA24	CA44	CA46
4C084	AA02	AA07	AA13	BA03	NA14	ZA67	ZA81	ZA96	ZA97	ZB11
	ZB21	ZB26	ZC03	ZC06	ZC20	ZC21				
4C085	AA14	CC21	DD88							
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA67	ZA81	ZA96
	ZA97	ZB11	ZB21	ZB26	ZC03	ZC06	ZC20	ZC21		
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	DA76	EA20	EA50	FA74		

专利名称(译)	与骨重建过程相关的多核苷酸和多肽序列		
公开(公告)号	JP2009525730A	公开(公告)日	2009-07-16
申请号	JP2008553592	申请日	2007-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	第一三共株式会社		
申请(专利权)人(译)	阿莱西亚生物治疗公司		
[标]发明人	ロイラビンドラノーススークナナン ジルベルナルトランブレ マリオフィリヨン		
发明人	ロイ・ラビンドラノース・スークナナン ジル・ベルナルト・ランブレ マリオ・フィリヨン		
IPC分类号	C12N15/09 C40B40/06 C12M1/00 C12Q1/68 C07K14/47 C12N5/10 C07K16/18 C12N15/02 A61P19/08 A61K31/7088 A61K48/00 A61P19/10 A61P5/18 A61P5/14 A61P5/24 A61P43/00 A61P5/38 A61P13/12 A61P35/00 A61P3/14 A61P19/02 A61P29/00 A61K38/00 A61K39/395 A61K31/713 A61K31/7105 A61K31/711 G01N37/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C40B30/04 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/02 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/14 A61P5/14 A61P5/18 A61P5/24 A61P5/38 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/08 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 A61K47/6803 C07K14/51 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/5044 G01N2500/00 G01N2800/10 G01N2800/108 A61K39/39533 C07K14/47 C07K16/18 C07K2317/54 C07K2317/55 C12N15/113 C12N2310/11 C12N2310/12 C12N2310/14		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C40B40/06 C12M1/00.A C12N15/00.F C12Q1/68.A C07K14/47 C12N5/00.B C07K16/18 C12N15/00.C A61P19/08 A61K31/7088 A61K48/00 A61P19/10 A61P5/18 A61P5/14 A61P5/24 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P5/38 A61P13/12 A61P35/00 A61P3/14 A61P19/02 A61P29/00 A61K37/02 A61K39/395.J A61K31/713 A61K31/7105 A61K31/711 G01N37/00.102 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C40B30/04 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB13 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA03 4C084/NA14 4C084/ZA67 4C084/ZA81 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZB11 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZC03 4C084/ZC06 4C084/ZC20 4C084/ZC21 4C085/AA14 4C085/CC21 4C085/DD88 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA67 4C086/ZA81 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC03 4C086/ZC06 4C086/ZC20 4C086/ZC21 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	60/772585 2006-02-13 US 60/816858 2006-06-28 US		
其他公开文献	JP5173838B2 JP2009525730A5		

摘要(译)

本发明部分涉及参与骨重建过程的独特和新鉴定的遗传多核苷酸，多核苷酸和相应多肽的变体和衍生物，多核苷酸，多肽，变体和衍生物的使用，以及用于改善的方法和组合物。由骨重建障碍引起的症状。特别公开了分离和鉴定涉及破骨细胞活性的多核苷酸多肽变体和衍生物，鉴定其鉴定的多核苷酸作为治疗靶标的潜力以及多核苷酸，多肽，变体和衍生物用于改善疾病状态和研究目的的用途。。

