

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 135077

(P2003 - 135077A)

(43)公開日 平成15年5月13日 (2003.5.13)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
		39/395	E 4 B 0 2 9
A 6 1 K 31/7088			T 4 B 0 6 3
38/00		45/00	4 C 0 8 4
39/395		48/00	4 C 0 8 5

審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 65数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 206477(P2002 - 206477)

(22)出願日 平成14年7月16日(2002.7.16)

(31)優先権主張番号 09/907,479

(32)優先日 平成13年7月17日(2001.7.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 300058891

バイエル コーポレーション

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02

032 イースト ウォルポール コウニー

ストリート 333

(72)発明者 アストル ジョン エイチ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0278

0, トーントン, ショート ストリート

42

(74)代理人 100090941

弁理士 藤野 清也 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ヒト遺伝子および遺伝子発現産物

(57)【要約】 (修正有)

【課題】新規ヒト遺伝子、これらの遺伝子によって発現されるタンパク質、およびこれらのタンパク質の変異体の提供。

【解決手段】 特定の配列、またはこれに相補的な配列を含むヌクレオチド配列を含む核酸、特定の配列、またはこれに相補的な配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズするのに十分な特定の核酸配列の領域を含むプローブ/プライマーを提供することにより達成される。本発明はまた、本発明のプローブ、アンチセンス構築物および抗体を含む上記遺伝子ならびにタンパク質に関連する診断アッセイおよび治療薬を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーであって、該オリゴヌクレオチドは、配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸とストリンジент条件下にてハイブリダイズするのに、十分な配列番号1、3、5または7の核酸配列の領域を含むプローブ/プライマー。

【請求項2】 実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーであって、該オリゴヌクレオチドは、配列番号1、3、5、または7の配列とハイブリダイズするのに、十分な配列番号1、3、5または7の配列に実質的に相補的な核酸配列の領域を含むプローブ/プライマー。

【請求項3】 前記プローブ/プライマーは、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列から選択される配列の少なくとも8個の連続ヌクレオチド領域を含む、請求項1または2に記載のプローブ/プライマー。

【請求項4】 固体支持体に結合された請求項1または2に記載の複数のプローブ/プライマーを含むアレイ。

【請求項5】 検出可能な標識をさらに含む、請求項1または2に記載のプローブ/プライマー。

【請求項6】 前記標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素および酵素補因子からなる群から選択される、請求項5に記載のプローブ/プライマー。

【請求項7】 配列番号2、4、6、または8から選択される配列を含むポリペプチドに免疫反応性を示す抗体。

【請求項8】 配列番号1、3、5、または7から選択される核酸配列によりコードされる配列を含むポリペプチドに免疫反応性を示す抗体。

【請求項9】 アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁体であって、配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸と、ストリンジент条件下にてハイブリダイズするのに十分な配列番号1、3、5、または7の核酸配列の領域を含む類縁体。

【請求項10】 アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁体であって、配列番号1、3、5、または7の配列とハイブリダイズするのに、十分な配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸配列の領域を含む類縁体。

【請求項11】 前記類縁体は、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列から選択され、ヌクレアゼによる切断に耐性である配列の少なくとも8個の連続ヌクレオチド領域を含む、請求項9または10に記載の類縁体。

【請求項12】 患者から単離した細胞試料中の、配列番号1、3、5、または7の核酸にストリンジент条件下にてハイブリダイズする核酸レベルを測定するための、請求項5に記載のプローブ/プライマーを含む、形

質転換細胞の表現型を決定するための試験キット。

【請求項13】 配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のいずれか1つによりコードされるタンパク質に特異的な抗体を含む、形質転換細胞の表現型を決定するための試験キット。

【請求項14】 配列番号1、3、5、または7の少なくとも1つの核酸配列の差次的発現を、正常細胞と比較して検出することを含む、細胞の表現型を確定する方法であって、核酸は少なくとも0.5倍差次的に発現される方法。

【請求項15】 試料中の細胞の表現型を決定する方法であって；(a)配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のいずれか1つの少なくとも8個の連続ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む核酸プローブを準備すること、(b)癌であると疑われる細胞を含有する、患者からの第1の試料を準備すること、(c)実質的に非癌性である細胞を含有する、患者からの第2の試料を準備すること、(d)該第1および第2の試料各々と、ストリンジент条件下にて該核酸プローブを接触させること、および(e)(b)該第2の細胞試料のmRNAとのプローブのハイブリダイゼーションの量と、(a)該第1の細胞試料のmRNAとのプローブのハイブリダイゼーションの量を比較することを含み、患者からの試料中の細胞の表現型を決定する方法であって、第1の試料のmRNAとプローブとのハイブリダイゼーションの量と第2の試料のmRNAとプローブとのハイブリダイゼーションの量とを比較する工程を含み、第2の試料のハイブリダイゼーションの量と比較した第1の試料のmRNAのハイブリダイゼーションの量における少なくとも約0.5倍の差異が、第1の試料中の細胞の表現型を表わす、細胞の表現型を決定する方法。

【請求項16】 配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つを含む核酸によってコードされる少なくとも1つのタンパク質の、正常細胞と比較した、差次的発現を検出することを含み、該タンパク質は、少なくとも約0.5倍差次的に発現される、細胞の表現型を決定する方法。

【請求項17】 タンパク質の前記差次的発現は、イムノアッセイにて検出される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 配列番号1、3、5、または7のうちの1つに、ストリンジент条件下にてハイブリダイズする核酸の、細胞における存在または非存在を確認する方法であって、請求項5に記載のプローブと該細胞を接触させることを含む方法。

【請求項19】 配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つを含む核酸によりコードされるポリペプチドの、細胞における存在または非存在を確認方法であって、細胞と請求項7に記載の抗体とを接触させ、該ポリペプチドとの該抗体の反応を

検出することを含み、検出される該ポリペプチドの存在または量が、癌の存在を示す方法。

【請求項20】 配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つにおける突然変異を検出する方法であって、

- (a) 患者から試料を収集すること、
- (b) 該試料を、核酸のハイブリダイゼーションおよび増幅が起こるような条件下にて、配列番号1、3、5、または7の核酸配列に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させること、および

(c) 正常試料の増幅産物と、増幅産物の存在、非存在、または量を比較することを含む、方法。

【請求項21】 配列番号1、3、5、または7の1つまたはそれ以上の少なくとも8個の連続核酸から構成される核酸配列を含むプローブを用いて癌を検出する方法であって、

- (a) 患者から試料を収集すること、
- (b) 該試料を、核酸のハイブリダイゼーションおよび増幅が起こるような条件下にて、配列番号1、3、5、または7の核酸配列に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させること、および
- (c) 正常細胞の増幅産物と、増幅産物の存在、非存在、または量を比較することを含む、方法。

【請求項22】 前記癌は結腸癌である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 患者試料において癌を検出する方法であって、該試料と、配列番号2、4、6、または8の1つまたはそれ以上の少なくとも一部を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドに、抗体を接触させることと、該ポリペプチドとの該抗体の反応を検出することを含み、検出される該ポリペプチドの存在または量が、癌の存在を示す方法。

【請求項24】 前記癌は結腸癌である、請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は核酸の配列およびそれによりコードされたタンパク質、ならびにそれら核酸の配列に由来するプローブ、コードタンパク質に対する抗体、および癌細胞、特に結腸癌細胞を検出する診断方法を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】結腸直腸癌は悪性腫瘍性疾患である。西側世界、特に米国においては結腸直腸癌の発生率が高い。この型の腫瘍はリンパチャネル及び血管チャネルを通じて転移することが多い。多くの結腸直腸癌患者がこの病気のために最終的には死亡する。実際、米国だけでも年間62、000人が結腸直腸癌で死亡している。

【0003】しかしながら、早期に診断がなされれば、癌組織を外科的に除去することで結腸癌を有効に治療す

ることができる。結腸直腸癌は結腸直腸の上皮に生じ、典型的には発生の初期段階においては血管新生が広範囲でない(それ故、侵襲的でない)。結腸直腸癌は結腸または直腸の上皮管壁細胞の単一の変異細胞のクローン性増殖の結果生じると考えられている。高度に血管新生がなされ、侵襲的かつ究極に転移性の、全身に蔓延する癌への移行は通常10年以上を要する。侵襲前に癌が検出されれば、癌組織を外科手術により除去することが有効な治療となる。しかしながら、結腸直腸癌は痛みや、黒色タール状便のような臨床症状が発現したときのみ検出されることが多い。一般に、そのような症状は疾患がはっきり確定したときにのみ、多くの場合、転移が起きた後に現れ、癌組織を外科的に切除した後でも、患者の予後は思わしくない。従って、結腸直腸癌を早期に検出することが罹患率を顕著に低減する上で重要である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】内視鏡検査のような侵襲的診断方法は癌の可能性のあるポリープのようなものの成長を直接目視により同定し、除去し、生検を行うことを可能にする。内視鏡検査は費用が高み、不快であり、本質的に危険を孕んでいるため、集団をスクリーニングして結腸直腸癌に罹患した者を同定するための実用的なツールではない。大便サンプルを結腸直腸癌または前癌状態の存在を示す特徴について非侵襲的に分析することは早期診断の代案として好ましいが、既知の診断方法にはこの目的を信頼性をもって達成するものはない。早期に結腸癌を診断するための信頼性があり、非侵襲的かつ精確な技法があれば多くの人命が救われるであろう。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は核酸配列およびそれによりコードされているタンパク質、ならびにそれら核酸配列に由来するプローブ、コードされたタンパク質に対する抗体、および癌細胞、特に結腸癌細胞を検出するための診断方法を提供する。本明細書に開示した配列は結腸癌細胞系統および/または結腸癌組織から得られたサンプルにおいて差次的に発現されることが見出されている。

【0006】一実施形態において、本発明は配列番号

1、3、5または7に示す配列、あるいはそれらに相補的な配列を含むヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。この配列はさらにこのヌクレオチド配列に操作可能に結合されてこれを発現ベクターとして使用するのに適したヌクレオチド配列にする転写調節配列を含んでいてもよい。他の実施形態において、この核酸は原核細胞または真核細胞内で複製可能な発現ベクター内に含まれていてもよい。関連する実施形態において、本発明はこの発現ベクターでトランスフェクションした宿主細胞を提供する。

【0007】一実施形態では、本発明は配列番号1、

3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。この配列は、さらにこのヌクレオチド配列に操作可能に結合されてこれを発現ベクターとして使用するのに適したヌクレオチド配列にする転写調節配列を含んでいてもよい。別の実施形態において、この核酸は原核細胞または真核細胞内で複製可能な発現ベクター内に含まれていてもよい。関連する実施形態において、本発明はこの発現ベクターでトランスフェクションした宿主細胞を提供する。

【0008】別の実施形態において、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列を含む核酸配列を含む核酸の導入遺伝子をその細胞に導入したトランスジェニック動物を提供する。別の実施形態において、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列を含む配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸配列を含む核酸の導入遺伝子を有するトランスジェニック動物を提供する。この導入遺伝子は核酸の発現レベル、核酸のmRNA転写物の安定性、またはこの核酸のコード産物の活性を修飾する。

【0009】さらに別の実施形態において、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列、あるいは相補的な配列のうちの一つの少なくとも約8個、少なくとも約12個、少なくとも約15個、少なくとも約25個、または少なくとも約40個の連続ヌクレオチドないし完全長まで、あるいは上記配列をその断片とする遺伝子の完全長までに相当する単離された実質的に純粋な核酸を提供する。別の実施形態において、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列またはそれらに相補的な配列のうちの一つの少なくとも約8個、少なくとも約12個、少なくとも約15個、少なくとも約25個、または少なくとも約40個の連続ヌクレオチドないし完全長まで、あるいは上記配列をその断片とする遺伝子の完全長までに相当する核酸プローブにストリンジェント条件下でハイブリダイズする実質的に純粋な核酸を提供する。本発明はまた配列番号1、3、5または7に示す配列またはそれらに相補的な配列のうちの一つの少なくとも約8個、少なくとも約12個、少なくとも約25個、または少なくとも約40個の連続ヌクレオチドないし完全長までを含み、ヌクレアーゼ、好ましくは内因性エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによる切断に対して抵抗性のアンチセンス・オリゴヌクレオチド類縁体を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号1、3、5または7またはそれらに相補的な配列の一つの少なくとも約12個、少なくとも約25個、ストリンジェント条件下でハイブリダイズし、ヌクレアーゼ、好ましくは内因性エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによる切断に対して抵抗性のアンチセンス・オリゴヌクレオチド類縁体を提供する。

【0010】別の実施形態において、本発明は実質的に

精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーであって、このオリゴヌクレオチドが配列番号1、3、5または7に示す配列に実質的に相補的な核酸とハイブリダイズするのに十分な配列番号1、3、5または7に示す核酸配列の領域を含み、かつ配列番号1、3、5または7に示す配列から選択されるセンスまたはアンチセンス配列の少なくとも約8個、少なくとも約12個、少なくとも約15個、少なくとも約25個、または少なくとも約40個の連続ヌクレオチドを含むヌクレオチド配列の領域、ないし配列番号1、3、5もしくは7に示す配列またはそれらに相補的な配列の一つの完全長までを含むものを提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーであって、このオリゴヌクレオチドが配列番号1、3、5または7に示す配列とハイブリダイズするのに十分な、配列番号1、3、5または7に示す配列に相補的な核酸配列の領域を含むプローブ/プライマーを提供する。好ましい実施形態では、このプローブは標的核酸と選択的にハイブリダイズする。別の実施形態では、このプローブは標識基をそれに結合して検出可能にしたものであってもよい。この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、および酵素補因子から選ぶことができる。本発明はさらに少なくとも約10個、少なくとも約25個、少なくとも約50個または少なくとも約100個の異なる上述のようなプローブを固体支持体上に結合したアレイを提供する。

【0011】本明細書中で用いられているように、「ハイブリダイズするのに十分な」という用語は2つの核酸配列同士の間での相補性の程度を含め、これら2つの配列のアニーリングをストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で可能とするのに十分な条件をいう。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は当業者にはよく知られており、多数の科学教本および実験室用マニュアルに記載されている（例えば、Maniatis et al., 1982 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Inc.参照）。2つの配列が十分にハイブリダイズするか否かに影響を与える他の条件としてはG/C含有率、融点および配列長がある。「ハイブリダイズするのに十分な」配列は少なくとも8個ヌクレオチド長であり、かつG/C含有率が約50%以下であることが好ましい。

【0012】さらに別の実施形態では、本発明は正常細胞に関して、配列番号1、3、5または7に示す配列のうち少なくとも一つの核酸が少なくとも約0.5倍、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍、または少なくとも約50倍差次的に発現する、差次的発現を検出することを含む細胞の表現型を決定する方法に関する。さらに別の態様では、本発明は正常細胞に関して、配列番号1、3、5または7に示す配列の一つとストリンジェント条件下でハイブリダイズする少なくとも1種の核酸が少な

くとも約0.5倍、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍、または少なくとも約50倍差次的に発現する、差次的発現を検出することを含む細胞の表現型を決定する方法に関する。

【0013】別の態様では、本発明は対象核酸によりコードされたポリペプチドを提供する。一実施形態において、これらポリペプチドは配列番号2、4、6または8に示す配列あるいはその断片を含む。別の実施形態では、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされたアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその断片に関する。これら断片は例えば本ポリペプチドの少なくとも約10個、少なくとも約20個、少なくとも約30個または少なくとも約40個のアミノ酸を含んでいてもよい。

【0014】さらに、配列番号2、4、6または8に示す配列を含むポリペプチドあるいはその断片に特異的に結合する抗体が提供される。他の実施形態では、本発明は配列番号1、3、5または7に示すヌクレオチド配列またはそれらに相補的な配列を含む核酸によりコードされたアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその断片に結合する抗体に関する。本発明の抗体により結合された断片は例えば本ポリペプチドの少なくとも約10個、少なくとも約20個、少なくとも約30個または少なくとも約40個のアミノ酸を含んでいてもよい。

【0015】さらに別の態様では、本発明は診断方法を提供する。一実施形態において、本発明は、配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列に示すうちの一つの少なくとも約8個、少なくとも約12個、少なくとも約15個、少なくとも約25個、または少なくとも約40個の連続ヌクレオチド、あるいは上記配列をその断片とする遺伝子の完全長までのヌクレオチド配列を含む核酸プローブを準備し、患者から細胞のサンプルを得、および実質的にそのすべてが非癌性の細胞である第2のサンプルを準備し、この核酸プローブをストリンジェント条件下で上記第1および第2の細胞サンプルのそれぞれのmRNAと接触させることおよび、(a)第1の細胞サンプルのmRNAとプローブとのハイブリダイゼーション量を、(b)第2の細胞サンプルのmRNAとプローブとのハイブリダイゼーション量を比較することにより、患者の細胞の表現型の決定する方法であって、第1の細胞サンプルのmRNAのハイブリダイゼーションの量を第2の細胞サンプルのmRNAのハイブリダイゼーションの量に比較して、差異が少なくとも約0.5倍、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍、またはこれらなし少なくとも約50倍である差異が第1の細胞サンプル中の細胞の表現型を示す、患者の細胞の表現型を決定方法に関する。表現型を決定すると云う用語は、遺伝子型を決定することを含むものとして本明細書において使用する。

【0016】別の実施形態では、本発明は上述のようなプローブ/プライマーを含む、患者から単離された細胞のサンプル中の配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列の核酸を含む核酸のレベルを測定するための、形質転換された(すなわち悪性)細胞を同定するための試験キットを提供する。いくつかの実施形態では、このキットはさらにこのキットを使用する際の指示(インストラクション)、細胞、検出可能なタグまたは標識を懸濁または固定するための組成物、核酸をハイブリッドサイズし易くするための組成物、細胞を溶解するための組成物、あるいは核酸を精製するための組成物を含んでいてもよい。

【0017】別の実施形態では、本発明は正常細胞に関して配列番号2、4、6または8に示す少なくとも一つのタンパク質の差次的発現を検出することを含む細胞の表現型を決定する方法であって、このタンパク質が少なくとも約0.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約20倍または少なくとも約50倍差次的に発現される方法に関する。一実施態様では、このタンパク質のレベルは免疫測定法により検出される。

【0018】本発明はさらに、細胞を上述のようなプローブと接触させることを含む、細胞における配列番号1、3、5または7の配列あるいはそれに相補的な配列の一つを含む核酸の存在または不存在を確認する方法に関する。本発明はさらに、細胞を上述のような抗体と接触させることを含む、細胞における配列番号2、4、6または8に示す対象ポリペプチドの存在または不存在を確認する方法を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、患者から細胞のサンプルを集め、このサンプル細胞から核酸を単離し、この核酸サンプルを配列番号1、3、5または7に示す核酸配列に、核酸のハイブリダイゼーションと増幅が起きる条件下で、特異的にハイブリダイズする1種以上のプライマーと接触させ、増幅生成物の存在、不存在または大きさを正常細胞の増幅生成物と比較することを含む、配列番号1、3、5または7の配列またはそれに相補的な配列を含む遺伝子における異常変異(例えば、核酸の欠失、挿入または置換)または異常メチル化の存在を確認する方法を提供する。

【0019】一実施形態において、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列のいずれか一つを含む核酸によりコードされたタンパク質に特異的な抗体を含む、形質転換された(すなわち悪性)細胞を同定するための試験キットを提供する。いくつかの実施形態では、このキットはさらに、このキットを使用する際の指示(インストラクション)、細胞、検出可能なタグまたは標識を懸濁または固定するための組成物、ポリペプチドを抗体に結合し易くするための組成物、細胞を溶解するための組成物、あるいはポリペプチドを精製するための組成物を含んでいてもよい。

【0020】別の態様では、本発明は対象核酸を含む薬学的組成物を提供する。一実施形態では、配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列のうちの一つを含む核酸の細胞内における発現レベルを変更する薬剤の同定が、細胞を提供することと、この細胞を試験薬剤で処理することと、配列番号1、3、5または7に示す配列またはそれらに相補的な配列の核酸のその細胞内における発現レベルを測定することと、この処理細胞における核酸の発現レベルを未処理細胞におけるその核酸の発現レベルと比較することにより行われ、ここで、未処理細胞における核酸の発現レベルと比較した処理細胞における核酸の発現レベルの変化が、細胞内における核酸の発現レベルを変更する薬剤を表わす。本発明はさらにこの方法により同定された薬剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0021】別の実施形態では、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列の一つを含むヌクレオチド配列を有する核酸によりコードされたポリペプチド、または配列番号2、4、6または8に示す配列を有する核酸によりコードされたポリペプチドのいずれかを含む薬学的組成物を提供する。一実施形態において、本発明は配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列のうちの一つとストリンジェント条件下でハイブリダイズする配列を含む核酸を含む薬学的組成物に関する。本発明において有用な薬学的組成物はさらに配列番号2、4、6または8に示すアミノ酸配列あるいはその断片を含む融合タンパク質、抗体または抗体断片を含んでいてもよい。

#### 【0022】

【発明の実施の形態】本発明は配列番号1、3、5または7に示す完全長cDNA配列あるいはそれに相補的な配列を有する核酸、およびこれらの配列に対応する遺伝子、ならびにこれらの核酸および遺伝子によりコードされたポリペプチドおよびタンパク質およびそれらの部分に関する。

【0023】本発明はさらに配列番号1、3、5または7に示すcDNA配列にそれぞれ相補的なmRNAによりコードされ、配列番号2、4、6または8に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むが、それらに限定されないポリペプチド配列に関する。

【0024】配列番号2、4、6または8に示すポリペプチド(類)あるいはタンパク質(類)の変異体であるポリペプチド(類)およびタンパク質(類)も本発明の範囲内に含まれる。これらの変異体は野生型タンパク質と、野生型タンパク質の生物活性を向上、追加または低減する1個以上のアミノ酸置換を有する点で異なる。いったんアミノ酸の変化が選択されると、その変異体をコードする核酸が本発明によって構築される。そのような核酸は、配列番号1、3、5または7の変異体であり、これらも本発明の範囲内に含まれる。

【0025】以下の詳細な説明は、本核酸に対応するcDNAおよびヒト遺伝子の取得または作製方法、これら核酸および関連する遺伝子の発現方法、これら遺伝子の構造モチーフの同定方法、核酸に対応する遺伝子によりコードされたタンパク質の機能の同定方法、マッピングおよび組織プロファイリングにおけるプローブとしての核酸の使用法、抗体産生における対応するポリペプチドおよびタンパク質の使用法、および治療および診断目的の核酸、ポリペプチドおよびタンパク質の使用法を開示するものである。

【0026】従って、ある態様において本発明は、腫瘍組織、特に結腸癌細胞系統において差次的に発現される核酸、そのような核酸によりコードされるポリペプチド類、これらのポリペプチドと免疫反応し得る抗体、およびそのような組成物の製剤に関する。さらに、本発明は、例えば対象核酸の異常発現を伴う障害を検出および治療するための診断用および治療用分析方法、試薬および組成物を提供する。

#### 【0027】I. 一般

本発明は、一部、ヒトの腫瘍、特に固形腫瘍、例えば乳癌または結腸癌のような癌腫(カルシノーマ)および肉腫(サルコーマ)に存在する癌性細胞を同定および/または分類するための新規な方法に関する。この方法は癌細胞系統および/または癌組織において、正常な結腸細胞のような関連する正常細胞に比べて、差次的に発現される遺伝子を用いることにより、特定の遺伝子の発現のアップレギュレーションおよび/またはダウンレギュレーション、すなわち、腫瘍発生に連携している事象(イベント)、により腫瘍細胞を同定または分類する。

【0028】オンコジーン(発癌遺伝子)のような特定の遺伝子のアップレギュレーション、すなわち発現の増加は悪性成長を促進する作用をする。腫瘍抑制遺伝子のような遺伝子のダウンレギュレーション、すなわち発現の低減も悪性成長を促進する。従って、いずれの型の遺伝子の発現の変化も、患者が癌、例えば結腸癌を発症またはこれに罹患しているおそれがあるか否かを決定する診断指標となる可能性がある。

【0029】従って、一態様において、本発明はまた、ヒトの腫瘍細胞、例えば結腸癌細胞に対する核酸マーカーのようなバイオマーカーを提供する。本発明はまた、これらの核酸マーカーによりコードされたタンパク質を提供する。本発明はまた、かかる癌細胞の治療および結腸癌細胞のような癌性状態の治療に有効な薬剤の同定方法を提供する。従前の方法とは異なり、本発明は発生の初期段階における癌細胞を同定するための手段を提供し、そのため前悪性の細胞をそれらが人体中に蔓延する前に同定することができる。これにより疑わしい癌性状態を早期に検出することが可能となり、それらの癌性状態の治療を、癌性細胞が人体中に蔓延する前に、または不可逆的癌性状態の発生前に治療することが可能にな

る。

【0030】II. 定義

便宜上、本明細書、実施例および特許請求の範囲において使用されている特定の用語および句の意味を以下に説明する。

【0031】本発明の核酸について用いる「異常な発現」という用語は、その核酸の発現レベルが健康な組織におけるその核酸の発現レベルと異なるか、または健康な対象者に存在するポリペプチドの活性と異なることをいう。ポリペプチドの活性は、その活性が天然の対応物の活性よりも強いという理由で異常であってもよい。あるいはまた、その活性は、天然の対応物の活性に対して活性が弱または活性がないという理由で異常であってもよい。異常な活性はまた活性の変化であってもよい。例えば、異常なポリペプチドは異なる標的ペプチドと相互作用するものであってもよい。細胞はその遺伝子の過剰発現または過少発現のため遺伝子の異常発現レベルを有することがある。

【0032】本明細書において使用する「アゴニスト」（作動薬）という用語は、タンパク質の生物活性を模倣またはアップレギュレーションする（例えば、高めるまたは補強する）薬剤を意味する。アゴニストは野生型タンパク質の少なくとも一つの生物活性を有する野生型タンパク質またはその誘導体であってもよい。アゴニストはまた遺伝子の発現をアップレギュレーションするかまたはタンパク質の少なくとも一つの生物活性を向上する化合物であってもよい。アゴニストはまたポリペプチドと他の分子、例えば標的ペプチドまたは核酸との相互作用を向上させる化合物であってもよい。

【0033】「対立遺伝子」という用語は本明細書において「対立遺伝子変異体(allelic variant)」と互換的に用いられるが、これは遺伝子又はその部分の択一的形態をいう。対立遺伝子は相同染色体上の同一の遺伝子座または位置を占める。対象が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有する場合、この対象はその遺伝子についてホモ接合であるといわれる。対象が遺伝子の異なる2つの対立遺伝子を有する場合、この対象はその遺伝子についてヘテロ接合であるといわれる。特定の遺伝子の対立遺伝子は、相互に単一のヌクレオチドまたはいくつかのヌクレオチドが異なっているにもかかわらず、ヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を含んでいてもよい。遺伝子の対立遺伝子はまた変異を含む遺伝子の形態であってもよい。

【0034】「遺伝子の多型領域の対立遺伝子変異体」という用語は、他の個体における遺伝子の当該領域に見出されるいくつかのヌクレオチド配列のうちの一つを有する遺伝子の領域をいう。

【0035】本明細書において使用する「アンタゴニスト」という用語はタンパク質の少なくとも一つの生物活性をダウンレギュレーションする（例えば、抑制または

阻害する）薬剤を意味する。アンタゴニストはタンパク質と他の分子、例えば、標的ペプチドまたは酵素基質との間の相互作用を阻害または低減する化合物であってもよい。アンタゴニストはまた、遺伝子の発現をダウンレギュレーションするかまたは発現されたタンパク質の存在量を減少させる化合物であってもよい。

【0036】本明細書において使用する「抗体」という用語は、例えば任意のアイソタイプの全抗体（IgG、IgA、IgM、IgE等）を含むものであり、それらの断片、および一本鎖の抗体を含み、これらはまた脊椎動物、例えば哺乳類のタンパク質と特異的に反応し得る。抗体は通常の技術を用いて断片化することができ、断片は全抗体について上述したのと同様に、効用についてスクリーニングすることができる。従って、この用語は抗体分子のタンパク質分解により切断または組換えにより調製された部分であって、特定のタンパク質と選択的に反応する能力を有する部分のセグメントを含む。そのようなタンパク質分解および/または組換え断片の非限定的な例としては、ペプチド・リンカーにより接合されたV[L]および/またはV[H]ドメインを含有するFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、および一本鎖抗体(scFv)が挙げられる。これらのscFvは共有結合的または非共有結合的に結合して2つ以上の結合部位を有する抗体を形成してもよい。本発明はポリクローナル、モノクローナル、その他の精製された抗体調整品および組換え抗体を含む。

【0037】「アポトーシス」の現象はよく知られており、プログラムされた細胞の死として説明することができる。知られているように、アポトーシスは、細胞が毒性物質またはその他の外部作用により殺された結果、細胞が死亡する際の現象である「壊死」とは対照的である。アポトーシスは染色質の濃縮、膜の小泡形成(blebbing)およびDNAの断片化を伴い、これらはすべて一般に顕微鏡検査の際に視認可能である。

【0038】核酸の異常発現「に関連する」または「を特徴とする」疾患、障害、または状態は、対象者における核酸の発現の異常なレベルにより引き起こされる、その寄与による、またはそれを原因とする疾患、障害、または状態をいう。

【0039】本明細書において使用するように「ポリペプチドの生理活性断片」という用語は、完全長ポリペプチドの断片のことをいい、野生型ポリペプチドの活性を特異的に作動する（模倣する）かまたは拮抗する（阻害する）ものをいう。この生物活性断片は少なくとも1種の他の分子、例えば、完全長タンパク質が結合し得るタンパク質、小分子、またはDNAと相互作用する能力を有する断片であるのが好ましい。

【0040】「生物学的活性(biological activity)」、「生物活性(bioactivity)」、「活性(activity)」または「生物学的機能(biological function)」は

互換的に用いられ、本明細書においては、(天然のまたは変性されたコンフォメーションにおける)ポリペプチド、または任意のその部分配列により直接的または間接的に奏されるエフェクターまたは抗原機能を意味する。生物学的活性としては、ポリペプチドへの結合、他のタンパク質または分子への結合、DNA結合タンパク質としての活性、転写レギュレーターとしての活性、損傷したDNAを結合する能力等が挙げられる。生物活性は、対象ポリペプチドに直接影響を与えることにより調節することができる。あるいはまた、生物活性はポリペプチドのレベルを調節することにより、例えば相当する遺伝子の発現を調節することにより変更することができる。

【0041】「バイオマーカー」という用語は、生物分子、例えば、核酸、ペプチド、ホルモン等のことをいい、その存在または濃度を病態のような既知の状態で検出または相関させることができるものをいう。

【0042】「細胞」、「宿主細胞」または「組換え宿主細胞」は本明細書においては互換的に使用される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的子孫をもいう用語である。突然変異または環境の影響のいずれかにより後の世代に生じることのある特定の変更のために、そのような子孫は実際上、親細胞とは同一でないことがあるが、これらも依然として本明細書において用いられている用語の範囲内に含まれる。

【0043】「キメラポリペプチド」または「融合ポリペプチド」は、対象ポリペプチドの一つをコードする第1のアミノ酸配列と、対象ポリペプチドの任意のドメインとは異種であり、実質的に相同でないドメイン(例えばポリペプチド部分)を定義する第2のアミノ酸配列との融合物である。キメラ・ポリペプチドは第1のポリペプチドをも発現する生物中(異なるポリペプチド中ではあるが)に見出される異種ドメインを提供してもよく、または多様な生物によって発現される「種間」、「遺伝子間」等のポリペプチドの融合構造であってもよい。一般に、融合ポリペプチドは一般式  $(X)_n - (Y)_m - (Z)_n$  (式中、Yは対象ポリペプチドの一部を表し、XおよびZはそれぞれ独立に存在しないか、または生物中に見出される天然の配列に関係していないか、もしくは対象配列に連続するポリペプチド鎖として見出されないアミノ酸配列を表し、mは1以上の整数であり、各nは独立に0または1以上の整数を表す(nおよびmは5または10以下であるのが好ましい。))

【0044】「送達複合体」はターゲティング手段(例えば、核酸、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの標的細胞表面に対する高親和性結合および/または標的細胞による細胞または核への取り込みの増加を生じる分子)を意味する。ターゲティング手段の例としてはステロール類(例えば、コレステロール)、脂質類(例えば、カチオン性脂質、ヴィロソーム(virosome)、または

リポソーム)、ウイルス類(例えば、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス、およびレトロウイルス)、または標的細胞特異的結合剤類(例えば、標的細胞特異的受容体により認識されるリガンド類)が挙げられる。好ましい複合体はin vivoで充分安定で標的細胞による内在化に先立って顕著に見られる脱共役を顕著に防止する。しかしながら、この複合体は細胞内で適当な条件下で切断可能であるため、核酸、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは機能的な形態で解放される。

【0045】よく知られているように、遺伝子または特定のポリペプチドは個体のゲノム内で単一コピーまたは多数のコピーとして存在していることがある。そのような複製遺伝子は同一であってもよく、またはヌクレオチド置換、付加または欠失を含むが、全体が実質的に同じ活性を有するポリペプチドを依然としてコードする修飾を有しているものであってもよい。「ポリペプチドをコードするDNA配列」という用語はこのように特定の個体内の1種以上の遺伝子をいうことがある。さらに、個々の生物間にヌクレオチド配列におけるいくつかの差異が存在することがあり、これら是对立遺伝子と呼ばれる。このような対立遺伝子の差異はコードされたポリペプチドのアミノ酸配列に差異を生じさせる、または生じさせないことがあり得るが、依然として同じ生物学的活性を持つポリペプチドをコードする。

【0046】「均等(equivalent)」という用語は機能的に同等のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むものと了解される。均等なヌクレオチド配列は対立遺伝子変異体のように、1個以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失があることで異なる配列を含み、従って、遺伝コードの縮重により配列番号1、3、5または7に示す核酸のヌクレオチド配列と異なる配列を含む。

【0047】本明細書において使用されているように、「遺伝子」、「組換え遺伝子」および「遺伝子構築物」という用語は、オープンリーディングフレームに関連する本発明の核酸をいい、エキソンおよび(任意に)イントロン配列の両方を含む。

【0048】「組換え遺伝子」はポリペプチドをコードし、エキソン配列を含む核酸をいうが、例えば、同類のまたは同類ではない染色体遺伝子に由来するイントロン配列を任意的に含んでもよい。「イントロン」という用語は所与の遺伝子に存在するタンパク質に翻訳されないDNA配列をいい、一般にエキソン同士の間に見出される。

【0049】細胞の「成長」または「成長状態」という用語は細胞の分化状態のみならず増殖状態をいう。従って、この用語は細胞の分化状態、例えば、未分化、部分的分化、または完全分化だけでなく、細胞が、例えば、G0、G1、G2、前期、中期または終期にある細胞周期の相をいう。限定するつもりはないが、細胞の分化は

通常細胞の増殖率の低下を伴う。

【0050】「相同性」、「同一性」および「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列の類似性をいい、同一性はより厳密な比較である。相同性および同一性はそれぞれ、比較のために整列してもよい各配列中の位置を比較することにより決定することができる。比較された配列中の位置が同じ塩基またはアミノ酸により占められているときは、これらの分子はその位置において同一である。核酸配列間の相同性、類似性または同一性の程度は、これらの核酸配列により共有されている位置における同一またはマッチするヌクレオチドの数の関数である。アミノ酸配列の同一性の程度は、これらのアミノ酸配列により共有されている位置における同一アミノ酸の数の関数である。アミノ酸配列の相同性または類似性の程度は、これらのアミノ酸配列により共有されている位置における、つまり構造的に関連しているアミノ酸の数の関数である。「未関連」または「非相同」配列は、本発明の配列の一つと40%未満の同一性、好ましくは25%未満の同一性しか持たない。

【0051】「%同一」という用語は2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間の配列の同一性をいう。同一性は比較のために整列してもよい各配列中の位置を比較することにより決定することができる。比較された配列中の均等な位置が同じ塩基またはアミノ酸により占められているときは、これらの分子はその位置において同一であり、均等な部位が同じまたは類似のアミノ酸残基（例えば、立体的および/または電子的性質が類似）により占められているときは、これらの分子はその位置において相同（類似）であるということができる。相同性、類似性または同一性の百分率表示は、比較された配列により共有されている位置における同一または類似のアミノ酸の数の関数をいう。FASTA、BLAST、またはENTREZをはじめとする種々の整列アルゴリズムおよび/またはプログラムを使用することができる。FASTAとBLASTはGCG配列分析パッケージ（米国ウィスコンシン州マジソン市、ウィスコンシン大学）の一部として入手可能であり、例えばデフォルト設定で使用することができる。ENTREZは米国メリーランド州ベセスダ市、国立衛生図書館、国立医学研究室、国立バイオテクノロジー情報センターを通して入手可能である。一実施形態において、2つの配列の%同一性はGCGプログラムによりギャップ重み(gap weight)を、例えば1、すなわち2つの配列間で各アミノ酸のギャップが単一のアミノ酸またはヌクレオチドのミスマッチであるとみなして重み付けして、決定することができる。

【0052】整列のための他の技術は、Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & C

o., San Diego, California, USAに記載されている。配列にギャップを許容する整列プログラムを用いて配列を整列するのが好ましい。Smith-Watermanは配列の整列にギャップを許容するアルゴリズムの一つのタイプである。Meth. Mol. 70-187 (1997)を参照されたい。また、NeedlemanおよびWunsch整列方法を用いるGAPプログラムを用いて配列を整列することができる。別の検索戦略としては、MASPARコンピュータ上で動作するMPSRCHソフトウェアを用いる。MPSRCHはSmith-Watermanアルゴリズムを使用して超大型並列コンピュータ上で配列の得点を計算する。このアプローチは遠く隔たって関連している対を拾い上げる能力を改善し、かつ小さなギャップやヌクレオチド配列のエラーに対して特に寛容である。核酸にコードされたアミノ酸配列を用いてタンパク質およびDNAデータベースの両方を検索することができる。

【0053】個々の配列のデータベースは、Methods in Enzymology, ed. Doolittleに記載されている。データベースとしてはGenbank、EMBL、および日本DNAデータベース(DDBJ)が挙げられる。

【0054】好ましい核酸は、配列番号1、3、5または7の一つに示された配列の核酸配列に対して少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%同一、さらに好ましくは少なくとも約90%、それよりさらに好ましくは約95%同一である配列を有する。配列番号1、3、5または7の一つにより表された核酸配列と少なくとも約90%、さらに好ましくは約95%、およびもっとも好ましくは少なくとも約98~99%同一である核酸も、もちろん本発明の範囲内である。好適な実施形態では、この核酸は哺乳動物起源である。

【0055】本明細書において使用する「相互作用」という用語は、天然に存在しているタンパク質-タンパク質、タンパク質-核酸、核酸-核酸、およびタンパク質-小分子または核酸-小分子間の相互作用のような、分子間の検出可能な相互作用（例えば、生化学的相互作用）を含む。

【0056】本明細書においてDNAまたはRNAのような核酸について使用する「単離された」という用語は、巨大分子の天然の供給源に存在する他のDNAまたはRNAから個々に分離された分子をいう。本明細書で使用するこの「単離された」という用語はまた、組換えDNA技術により生産されたときは実質的に純粋な、すなわち細胞物質、ウイルス物質または培地を含まない核酸またはペプチド、また化学合成されたときは化学的前駆体または他の化学物質を含まない核酸またはペプチドをいう。さらに、「単離された核酸」は、天然には断片としては存在せず、自然状態では見出されない実質的に純粋なおよび/または精製された核酸断片を含む。「単離された」という用語は本明細書においてはまた他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドをいい、実質的に精製されたポリペプチドと組換えポリペプチドの両

方を含むものとして使用する。

【0057】本明細書において使用する「調節される」および「差次的に調節された」という用語は、アップレギュレーション（すなわち、活性化または刺激（例えば、作動または増強することによる））およびダウンレギュレーション（すなわち、阻害または抑制（例えば、拮抗、減少または阻害することによる））の両方を用いるものとして使用する。

【0058】「突然変異遺伝子」という用語は、突然変異した遺伝子を有する対象の表現型を、この突然変異した遺伝子を持たない対象と比較して変化させる能力を有する遺伝子の対立遺伝子形態をいう。対象が変化した表現型を持つこの突然変異に対してホモ接合でなければならないときは、この突然変異は劣性といわれる。対象の遺伝子型を変化させるのに突然変異した遺伝子の1コピーで充分であるならば、この突然変異は優性であるといわれる。対象が1コピーの突然変異した遺伝子を持ち、しかもホモ接合の表現型とヘテロ接合対象（その遺伝子について）の表現型との中間である表現型を持つならば、この突然変異は共優性(co-dominant)といわれる。

【0059】添付の配列表中に現れる「N」という記号は対応するヌクレオチドの正体が未知であることを示す。「N」は従って必ずしも任意のヌクレオチド、例えばA、T、CまたはGを用いた置換を許容していると解釈されるべきではなく、むしろ正体が確定されなかったヌクレオチドの位置を保持するものとして解釈されるべきである。

【0060】本発明の「非ヒト動物」は齧歯類、非ヒト霊長類、羊、犬、牛、のような哺乳類、鶏、両生類、爬虫類等を含む。好ましい非ヒト動物はラットおよびマウスを含む齧歯科から選ばれ、最も好ましくはマウスであるが、Xenopus属のメンバーなどのトランスジェニック両生類、およびトランスジェニックニワトリも例えば胚発生および組織形成に影響を与えることができる薬剤を理解し同定するための重要なツールを提供することができる。「キメラ動物」という用語は本明細書において、組換え遺伝子が発現される動物、または動物の細胞全部ではないがかなりの細胞において組換え遺伝子が見出される動物をいう。「組織特異的キメラ動物」という用語は組換え遺伝子の一つが、ある組織では存在しおよび/または発現または分断されるが、他の組織ではそうではないことを示す。

【0061】本明細書において使用されているように、「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)およびしかるべき場合にはリボ核酸(RNA)のようなポリヌクレオチド類をいう。この用語はまた、均等物として、ヌクレオチド類縁体から作成されたRNAまたはDNAの類縁体および記載された実施形態に適用可能なように、一本鎖(センスまたはアンチセンス)および二本鎖ポリヌクレオチドを含むのものとして了解されるべき

である。EST、染色体、cDNA、mRNAおよびrRNAは核酸として言及される分子の代表例である。

【0062】「配列番号xに示すヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列」という用語は、配列番号xを有する核酸鎖の相補的鎖のヌクレオチド配列をいう。

「相補的な鎖」という用語は本明細書において「相補体」と互換的に使用されている。核酸ストランドの相補体はコード鎖または非コード鎖の相補体であることができる。

【0063】「多型性」という用語は、一つの遺伝子またはその部分（例えば、対立遺伝子変異体）の二つ以上の形が共存していることをいう。少なくとも2つの異なる形態の遺伝子の部分、すなわち2つの異なるヌクレオチド配列が存在する遺伝子の部分、は「遺伝子の多型領域」という。多型性領域は単一のヌクレオチドであってもよく、その正体は異なる対立遺伝子で異なる。多型性領域はまた数ヌクレオチドの長さのものであってもよい。

【0064】「多型遺伝子」は少なくとも一つの多型性領域を有する遺伝子をいう。

【0065】本明細書において使用されているように、「プロモーター」という用語は当該プロモーターに操作可能に結合された選定されたDNA配列の発現を調節するDNA配列を意味し、細胞内でこの選定されたDNA配列の発現を行う。この用語は「組織特異的」プロモーター、すなわちこの選定されたDNA配列の発現を特定の細胞（例えば特定の組織の細胞）内でのみ行うプロモーターを包含する。この用語はまたいわゆる「漏出性(leaky)」プロモーターをも含む。このプロモーターは、主に一つの組織において選定されたDNAの発現を調節するが、他の組織でも発現させる。この用語はまた、非組織特異的プロモーターおよび構成的に発現されるまたは誘導することができる（すなわち発現レベルが制御できる）プロモーターを包含する。

【0066】「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は、本明細書において遺伝子産物に言及する場合は互換的に用いられる。

【0067】「組換えタンパク質」という用語は、組換えDNA技法により生産される本発明のポリペプチドをいい、一般にポリペプチドをコードするDNAが適当な発現ベクターに挿入され、このベクターが今度は宿主細胞を形質転換するのに用いられてヘテロ接合タンパク質を生成する。さらに、組換え遺伝子に関して、「から得られる(derived from)」という句は、「組換えタンパク質」の意味の範囲内において、天然のポリペプチドのアミノ酸配列、または天然に存在する形態のポリペプチドの置換および欠失(切断(truncation)を含む)を含む突然変異により生成された、天然のポリペプチドのアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。

【0068】本明細書において使用する「小分子」は、分子量が約5kD未満であり、もっとも好ましくは約4kD未満である組成物を意味する。小分子は核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド類似体、炭水化物、脂質、またはその他の有機（炭素含有）分子または無機分子であってもよい。多くの製薬会社は、化学的および/または生物学的混合物、多くの場合真菌、細菌、または藻類抽出物の膨大なライブラリーを保有し、これらを本発明のアクセシビリティでスクリーニングして生物活性を調整する化合物を特定することができる。

【0069】本明細書において使用されているように、「特異的にハイブリダイズする」または「特異的に検出する」という用語は、本発明の核酸分子が、配列番号1、3、5または7に示す配列あるいはそれらに相補的な配列、あるいはそれらの天然に存在する突然変異体の任意の一つに示された核酸の、例えば約6個、12個、15個、20個、30個、50個、100個、150個、200個、300個、350個、400個、500個、750個または1、000個の連続ヌクレオチドの少なくとも一部とハイブリダイズして、異なるタンパク質をコードする細胞性核酸（例えばmRNAまたは染色体DNA）に対するバックグラウンドハイブリダイゼーションを約15%未満、好ましくは約10%未満、さらに好ましくは約5%未満とする能力をいう。好適な実施形態では、オリゴヌクレオチド・プローブは特定の核酸だけを検出し、例えば類似または関連する核酸類またはそれらの相補体とは実質的にハイブリダイズしない。

【0070】「転写調節配列」は、本明細書を通して、開始シグナル、エンハンサーおよびプロモーターなど、それらが操作可能に結合しているタンパク質をコードする配列の転写を誘導または制御するDNA配列を指称するために用いられる総称である。好適な実施形態では、一つの遺伝子の転写は、発現が意図する細胞型における組換え遺伝子の発現を制御するプロモーター配列（または他の転写調節配列）の制御下にある。同様に、この組換え遺伝子は、天然に存在する型のポリペプチドの転写を制御する配列と同じかまたはそれとは異なる転写調節配列の支配下に置くこともできることがわかる。

【0071】本明細書において使用されているように、「トランスフェクション」という用語は、核酸を例えば発現ベクターを介して核酸媒介遺伝子移入により宿主細胞内に導入することを意味する。本明細書において使用されているように、「形質転換」は、細胞が外来DNAまたはRNAを細胞に取り込んだ結果、細胞の遺伝子型が変化する過程をいい、例えば形質転換された細胞は組換えられた形態のポリペプチドを発現するか、または導入された遺伝子からのアンチセンス発現の場合は、標的遺伝子の発現を混乱させる。

【0072】本明細書において使用されているように、「導入遺伝子」という用語は、細胞内に導入された核酸

配列（またはそのアンチセンス転写物）を意味する。導入遺伝子は部分的にまたは完全に非相同、すなわちそれを導入したトランスジェニック動物または細胞に対して異種であってもよく、または、それを導入したトランスジェニック動物または細胞の内在遺伝子に対して相同であってもよいが、その動物のゲノム内に、それが挿入された細胞のゲノムが変化する（例えば、天然の遺伝子の位置とは異なる位置に挿入されるかまたはその挿入の結果ノックアウトが起きる）ように挿入される方法で設計されているか、または挿入されている。導入遺伝子はまた細胞内にエピソームの形で存在していてもよい。導入遺伝子は、1つ以上の転写調節配列および選定された核酸の発現を最適にするのに必要とされることがある任意の他の核酸、例えばイントロンを含んでいてもよい。

【0073】「トランスジェニック動物」は任意の動物、好ましくは非ヒト哺乳動物、鳥類または両生類であって、当該動物の細胞の1個以上が人間の介入により、例えば、当技術においてよく知られている遺伝子導入技法により導入された非相同核酸を含有するものをいう。この核酸は、慎重な遺伝子操作により、例えば、マイクロインジェクションにより、または組換えウイルスに感染させることにより、細胞の前駆体内に導入することで、直接的にまたは間接的に細胞内に導入される。遺伝子操作という用語は、古典的な交雑またはin vitro増殖を含まず、組換えDNA分子の導入に関する。この分子は染色体内で組込まれるか、または染色体外で複製するDNAであってもよい。ここに説明する典型的なトランスジェニック動物において、導入遺伝子は細胞に、対象ポリペプチドの一つの組換え形態、例えば、アゴニスト的またはアンタゴニスト形態のいずれかを発現させる。しかしながら、例えば、下記のFLPまたはCRE組換え酵素依存性構築物のような、組換え遺伝子が沈黙しているトランスジェニック動物も意図されている。さらに、「トランスジェニック動物」はまた、組換えおよびアンチセンス技法の両方を含む人間の介入により1つ以上の遺伝子の破壊が起こされた組換え動物をも含む。

【0074】本明細書において使用する「治療する」という用語は、状態または疾患の少なくとも1つの症状を改善するだけでなく治癒することを包含する。

【0075】「ベクター」という用語は、それに結合している他の核酸を輸送する能力を有する核酸分子をいう。好適なベクターの一つのタイプはエピソーム、すなわち、染色体外複製能力を有する核酸である。好適なベクターは、それらに結合している核酸の自己複製および/または発現をする能力を有するものである。それらに操作可能に結合している遺伝子の発現を指令する能力を有するベクターは、本明細書においては「発現ベクター」という。一般に、組換えDNA技法において有用な発現ベクターは「プラスミド」の形をしていることが多い。ここで、「プラスミド」は一般に、ベクターの形に

においては染色体に結合されていない、円形の二本鎖DNAループをいう。本明細書においては、プラスミドはベクターのもっとも普通に用いられる形であることから「プラスミド」および「ベクター」は互換的に用いられている。しかしながら、本発明は均等な機能を発揮し、以下に述べるように当技術において知られている他の形の発現ベクターをも含むものである。

【0076】「野生型対立遺伝子」という用語は、対象中に2つのコピーが存在するときに、野生型表現型を生じる遺伝子の対立遺伝子をいう。特定の遺伝子にはいく10つかの異なる野生型対立遺伝子が存在し得るが、これは遺伝子における特定のヌクレオチドの変化が、ヌクレオチドの変化した遺伝子を2つのコピー有する対象の表現型に影響を与えないことがあることによる。

【0077】III. 本発明の核酸

下記のように、本発明の一態様は、単離核酸、変異体および/またはかかる核酸の均等物に関する。

【0078】配列番号1、3、5、または7、それらに相補的な配列、あるいは配列番号1、3、5、または7の配列に特異的にハイブリダイズする配列のような本発10明の核酸は、腫瘍細胞、例えば結腸癌由来細胞系において、(正常組織、例えば正常結腸組織および/または正常非結腸組織における発現レベルを比較して)差次的に発現されて同定された。いくつかのある実施形態では、対象核酸は、少なくとも約0.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約20倍、または少なくとも約50倍差次的に発現される。好ましい核酸としては、結腸癌組織および結腸癌細胞系の両方において差次的に発現されて同定される配列細胞が挙げられる。好ましい実施形態では、本発明の核酸は、腫瘍細胞、特30に結腸癌組織および/または結腸癌由来細胞系においてアップレギュレートされる。別の実施形態では、本発明の核酸は、腫瘍細胞、特に結腸癌組織および/または結腸癌由来細胞系においてダウンレギュレートされる。

【0079】異常増殖細胞における、癌遺伝子のようなアップレギュレートされる遺伝子、または腫瘍抑制剤のようなダウンレギュレートされる遺伝子は、診断または治療技法の対象となり得る。例えば、cdc2遺伝子のアップレギュレーションは有糸分裂を誘発する。有糸分裂不活性剤であるmyt1遺伝子の過剰発現は、cdc2の活性を負の方向に調節する。したがって、異常増殖は、cdc2をアップレギュレートすることか、またはmyt1をダウンレギュレートすることにより誘発され得る。同様に、p53およびRbのような腫瘍抑制剤のダウンレギュレーションは、腫瘍発生に関与している。

【0080】本発明のさらなる他の好ましい核酸は、配列番号1、3、5、または7のうちの1つによりコードされるポリペプチドの少なくとも一部を含むポリペプチドをコードする。例えば、プローブ/プライマーまたは50

アンチセンス分子としての使用に好ましい核酸分子(すなわち、非コード核酸分子)は、配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸とハイブリダイズするのに十分な配列番号1、3、5、または7の核酸配列の領域を含んでいる。プローブ/プライマーとしての使用に好ましい核酸分子は、配列番号1、3、5、または7の配列とハイブリダイズするのに十分な配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸配列の領域をさらに含んでいる。プローブ/プライマーとして使用するための本発明の核酸配列は、好ましくは、少なくとも約12、20、30、50、60、70、80、90、または100塩基対長から完全遺伝子長までである。コード核酸分子は、例えば、約50、60、70、80、90、または100塩基対から完全遺伝子長まで含んでいることがある。

【0081】本発明の別の態様は、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つによって表される核酸配列に、低、中または高ストリンジент条件下にてハイブリダイズする核酸を提供する。DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジент条件(例えば、約45にて6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、続いて50にて2.0×SSCの洗浄)は、当業者に既知であるか、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-12.3.6にて見出すことができる。例えば、洗浄工程における塩濃度は、50での約2.0×SSCの低ストリンジентから50での約0.2×SSCの高ストリンジентまでから選択され得る。さらに、洗浄工程での温度は、室温(約22)での低ストリンジент条件から、約65での高ストリンジент条件まで高めることができる。温度および塩の両方を変化させてもよく、あるいは温度または塩濃度の一方を一定にして、他の変数を変化させてもよい。好ましい実施形態では、本発明の核酸は、中程度のストリンジент条件下にて(例えば、約2.0×SSCおよび約40にて)、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つに結合するであろう。特に好ましい実施形態では、本発明の核酸は、高ストリンジент条件下にて、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つに結合するであろう。

【0082】一実施形態では、本発明は、室温で6×SSCの低ストリンジент条件下にてハイブリダイズし、続いて室温で2×SSCでの洗浄される核酸を提供する。

【0083】別の実施形態では、本発明は、約65で2×SSCの高ストリンジент条件下にてハイブリダイズし、続いて約65での0.2×SSCでの洗浄される核酸を提供する。

【0084】遺伝子コードの縮重に起因して、配列番号

1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの一つにて示されるヌクレオチド配列と異なる配列を有する核酸もまた、本発明の範囲内である。かかる核酸は、機能的に等価なペプチド（すなわち、等価な、または類似の生物学的活性を有するペプチド）をコードするが、遺伝子コードの縮重に起因して、配列表に示す配列とは配列の点で異なる。例えば、アミノ酸の多くは、2つ以上のトリプレットにより表わされる。同じアミノ酸を特定するコドン、またはシノニム（例えば、CAUおよびCACはそれぞれヒスチジンをコードする）は、ポリペプチドのアミノ酸配列に影響を及ぼさない「静(silent)」突然変異をもたらす。しかしながら、対象ポリペプチドのアミノ酸配列における変化を引き起こすDNA配列多型性が、哺乳動物間に存在するであろうことが予想される。当業者は、ポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードする核酸の一つまたはそれ以上のヌクレチド（例えば、ヌクレオチドの約3～5%以下）におけるこれらの変異が、天然の対立遺伝子変異に起因して、所定の種の個体間に存在し得ることを理解されるであろう。

【0085】配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列の核酸によってコードされるタンパク質のスプライシング変異体、あるいはかかるタンパク質の天然同族体をコードする核酸もまた、本発明の範囲内である。かかる同族体は、本明細書中にてさらに記載するように、ハイブリダイゼーションまたはPCRによりクローニングされ得る。

【0086】ポリヌクレオチド配列はまた、対象ポリペプチドのための、リーダー配列、例えば天然のリーダー配列または異種リーダー配列をコードしてもよい。例えば、所望のDNA配列は、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を助けるDNA配列（例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）と同じリーディングフレームにて融合されてもよい。リーダー配列を有するタンパク質は、プレタンパク質であり、宿主細胞により切断されるリーダー配列を有して、タンパク質の成熟体を形成することができる。

【0087】本発明のポリヌクレオチドはまた、フレーム中で、マーカー配列（本明細書中にて「タグペプチド」をコードする「タグ配列」とも云う）に融合されることができ、本発明のマーキングおよび/または精製を可能にする。好ましい実施形態では、マーカー配列は、例えばPQE-9ベクターによって供給されるヘキサヒスチジンである。多数の他のタグペプチドは、市販されている。他の頻繁に用いられるタグとしては、c-mycからの10残基配列を含むmyc-エピトープ（例えば、Ellison et al. (1991) J Biol Chem 266:21150-21157）、pFLAG系(International Biotechnologies, Inc.)、pEZZタンパク質A系(Pharmacia, NJ)、お

よびヘモフィルスインフルエンザ菌赤血球凝集素タンパク質の16アミノ酸部分が挙げられる。さらに、タグポリペプチドと特異的に相互作用する試薬（例えば、抗体）が入手可能であるか、あるいは調製され得るか、または同定され得る限り、いずれのポリペプチドもタグとして使用され得る。

【0088】下記する例により示されるように、核酸は、多数の真核細胞のいずれかに存在するmRNAから得ることができ、例えば好ましくは、後生動物細胞、より好ましくは脊椎動物細胞、さらに好ましくは哺乳動物細胞から得られる。本発明の核酸は、成体および胚のゲノムDNAの両方から得ることもまた可能であるはずである。例えば、遺伝子は、当業者に一般的に既知のプロトコルに従って、cDNAまたはゲノムライブラリーからクローニングされ得る。cDNAは、細胞（例えば、胚細胞を含む、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞）からの全mRNAを単離することにより得ることができる。次に、二本鎖cDNAは、全mRNAから調製することができ、続いて多数の既知の技法のいずれか一つを用いて、適切なプラスミドまたはバクテリオファージに挿入することができる。遺伝子はまた、本発明により提供されるヌクレオチド配列情報に従って、確立されたポリメラーゼ連鎖反応技法を用いてクローニングすることができる。

【0089】本発明は、この生物学的材料から得られる核酸のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを、本発明の範囲内に包含し、ここで、核酸は、配列番号1、3、5、または7の少なくとも一つの配列の少なくとも15個の隣接ヌクレオチドと、ストリンジェント条件（65度での少なくとも約4×SSC、または42度での少なくとも4×SSC、例えば、参照により本明細書に援用される米国特許第5,707,829号を参照）下にてハイブリダイズする。このことにより、配列番号1、3、5、または7の少なくとも15個の隣接ヌクレオチドをプローブとして用いる場合、プローブは、相補的配列を含む（生物学的材料の）遺伝子またはmRNAと優先的にハイブリダイズし、選択プローブに特有にハイブリダイズする生物学的材料の核酸の同定および回収を可能にするであろう。配列番号1、3、5、または7の2つ以上からのプローブは、それらが得られたcDNAが1つのmRNAに対応する場合、同じ遺伝子またはmRNAとハイブリダイズするであろう。16個以上のヌクレオチドのプローブを用いることができるが、15個のヌクレオチドは、特有の同定に十分な配列である。

【0090】別の実施形態では、核酸は、正常結腸特定組織から調製されるライブラリーから単離される。核酸配列ライブラリーを生産およびプローブするための技法は、例えば、Sambrook et al, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(New York, Cold Spring Harbor

Laboratory, 1989)に記載されている。cDNAは、配列番号1、3、5、または7からの配列に基づくプライマーを用いることにより調製され得る。一実施形態では、cDNAライブラリーは、ポリアデニル化mRNAからのみ作製することができる。よって、ポリ-T-プライマーを用いて、mRNAからcDNAを調製することができる。配列番号1、3、5、または7の整列は、関連ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの同定という結果を生じ得る。本明細書中に開示するポリヌクレオチドのいくつかは、検索手順中にマスキングを受けた繰り返し領域を含有する。繰り返し領域に関する情報は、以下に記載する。

【0091】配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列を有するポリヌクレオチド構築物は、合成的に生成することができる。あるいは、非常に多くのオリゴデオキシリボヌクレオチドからの遺伝子および全プラスミドの単一工程構築は、Stemmer et al., Gene (Amsterdam) (1995) 164 (i): 49-53により記載されている。この方法では、構築PCR (非常に多くのオリゴデオキシリボヌクレオチド (oligos) からの長いDNA配列の合成) が記載されている。この方法は、DNAシャフリング (Stemmer, Nature (1994) 370:389-391) に由来し、DNAリガーゼに依存せず、DNAポリメラーゼに依存して、構築過程中に、さらに長いDNA断片を形成する。例えば、TEM-1ベータ-ラクタマーゼをコードする遺伝子 (bla) を含有する 1.1 kb断片は、各40ヌクレオチド (nt) 長の56oligosの全量から単一反応にて構築され得る。合成遺伝子は、唯一の選択マーカーとしてテトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc-R) を含有するベクター中でPCR増幅されて、クローニングされ得る。アンピシリン (Ap) 選択に依存することなく、Tc-Rコロニーの76%がAp-Rであり、このアプローチを、いかなる遺伝子の迅速かつ費用効率が高い合成のための一般方法にしている。

【0092】IV. 当該技術で認識されている方法を用いた新規遺伝子の機能的および構造的モチーフの同定核酸、cDNA、または完全遺伝子のヌクレオチド配列\*

クエリー配列	A	S	N	P	E	R	T	M	I	P	V	T	R	V	G	L	I	R	Y	M
別個の配列	Y	M	M	T	E	Y	L	A	I	P	V		R	V	G	L	P	R	Y	M
	1				5				10											15

【0099】整列の領域は、アミノ酸9から始まり、アミノ酸19で終わる。クエリー配列の全長は、20アミノ酸である。整列領域長のパーセントは、11/20または55%である。

【0100】配列同一性パーセントは、クエリー配列および別個の配列間のアミノ酸マッチの数を数えて、マッチの全数を最強整列の領域に見られる別個の配列の残基数で除算することにより計算される。上記の例に関し

\*の翻訳は、別個の既知の配列とともに整列され得る。別個の配列との類似性は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの活性を測定するのに使用することができる。例えば、ケモカイン配列との類似性を示す配列は、ケモカイン活性を示し得る。また、2つ以上の別個の配列との類似性を示す配列は、別個の配列の一方または両方に特徴的である活性を示すことがある。

【0093】最も近い隣接物のポリヌクレオチド配列の完全長配列および断片は、核酸の完全長配列を同定して、単離するためのプローブおよびプライマーとして使用することができる。最も近い隣接物は、核酸の完全長配列のためのライブラリーを構築するために使用されるべき組織または細胞型を指し示すことができる。

【0094】典型的に、核酸は、すべての6つのフレームにて翻訳され、別個の配列との最良の整列を確定する。配列表にて、本明細書中に開示する配列は、5'から3'配向であり、3つのフレームでの翻訳は、十分である (実施例に記載するように、少数の例外はある)。これらのアミノ酸配列は、一般的にクエリー配列と称され、個々の配列とともに整列されるであろう。

【0095】核酸配列は、上記に開示する方法のいずれかにより、公知の遺伝子と比較することができる。別個およびクエリー配列の整列の結果は、3つのカテゴリー：高い類似性、弱い類似性、および類似性なしに分けることができる。高い類似性から弱い類似性までの別個の整列の結果は、ポリペプチド活性および/または構造を決定するための基礎を提供する。

【0096】個々の結果を類別するためのパラメータとしては、最強の整列が見られる整列領域長のパーセント、配列同一性パーセント、およびp値が挙げられる。

【0097】整列領域長のパーセントは、最強の整列の領域にて見られる別個配列の残基数の数を数えることにより計算される。この数は、クエリー配列の全残基数で除算して、パーセントが得られる。例を以下に示す：

【0098】  
【化1】

て、同一性パーセントは、10マッチを11個のアミノ酸で除算したものであるか、または約90.9%であろう。

【0101】P値は、整列が偶然に生じた確率である。単一整列に関して、p値は、Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2264 (1990)、およびKarlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: (1993)に従って計算することができる。同じクエリー配列を用いた複数整列

のp値は、Altschul et al., Genet. 6:119 (1994)に記載される発見的アプローチを用いて計算することができる。BLASTプログラムのような整列プログラムにより、p値を計算することができる。

【0102】配列が整列する領域の境界は、上述のDoolittle, Methods in Enzymology、BLASTまたはFASTAプログラムに従って、あるいは配列同一性が最も高い範囲を決定することにより、確定することができる。

【0103】同一性または類似性を確定するために考えるべき別の要素は、類似性または同一性の位置である。強力な局所配列は、配列長が短い場合でさえも類似性を示す。クエリー配列長全体に散在する配列同一性はまた、クエリーおよびプロフィール配列間の類似性を示すことができる。

#### 【0104】高い類似性

高い類似性とみなされるべき整列結果に関して、整列領域長のパーセントは、典型的には、全クエリー配列長の少なくとも約55%、より典型的には少なくとも約58%、さらに典型的にはクエリー配列の全残基長の少なくとも約60%である。通常は、整列領域の長さのパーセントは、約62%程度、より通常的には約64%程度、さらに通常的には約66%程度であり得る。

【0105】さらに、高い類似性に関して、整列領域は典型的には少なくとも約75%、より典型的には少なくとも約78%、さらに典型的には少なくとも約80%の配列同一性を示す。通常、配列同一性パーセントは、約82%程度、より通常的には約84%程度、さらに通常的には約86%程度であり得る。

【0106】p値は、これらの方法と併用される。高い類似性が見られる場合、クエリー配列は、p値が約 $10^{-2}$ 以下、より通常的には約 $10^{-3}$ 以下、さらに通常的には約 $10^{-4}$ 以下である場合にプロフィール配列と高い類似性を有するとみなされる。より典型的には、p値は、高い類似性とみなされるべきクエリー配列に関して、約 $10^{-5}$ 以下、より典型的には約 $10^{-10}$ 以下、さらに典型的には約 $10^{-1}$ 程度かそれ以下である。

#### 【0107】弱い類似性

弱いとみなされる整列結果に関して、整列領域長の最小パーセントも、整列の最小長も存在しない。弱い類似性のより良い表示は、整列の領域が、典型的には少なくとも約15個、より典型的には少なくとも約20個、さらに典型的には少なくとも約25個のアミノ酸残基長である場合にみなされる。通常は、整列領域長は、約30個程度、より通常的には約40個程度、さらに通常的には約60個程度のアミノ酸残基であり得る。

【0108】さらに、弱い類似性に関して、整列の領域は、典型的に、少なくとも約35%、より典型的には少なくとも約40%、さらに典型的には少なくとも約45%の配列同一性を示す。通常は、配列同一性パーセント

は、約50%程度、より通常的には約55%程度、さらに通常的には約60%程度であり得る。

【0109】低い類似性が見られる場合、クエリー配列は、p値が、通常約 $10^{-2}$ 以下、より通常的には約 $10^{-3}$ 以下、さらに通常的には約 $10^{-4}$ 以下である場合にプロフィール配列と弱い類似性を有するとみなされる。より典型的には、弱い類似性とみなされるクエリー配列に関して、p値は約 $10^{-5}$ 程度、より通常的には約 $10^{-10}$ 程度かそれ以下、さらに通常的には約 $10^{-15}$ 程度かそれ以下である。

【0110】配列同一性により確定される類似性  
配列同一性そのものを用いて、別個の配列に対するクエリー配列の類似性を確定し、配列の活性を示すことができる。かかる整列は、好ましくは、ギャップが配列を整列することを可能にする。典型的に、全クエリー配列にわたる配列同一性が、少なくとも約15%、より典型的には少なくとも約20%、さらに典型的には少なくとも約25%、よりいっそう典型的には少なくとも約50%である場合に、クエリー配列は、プロフィール配列に関連する。類似性の尺度としての配列同一性そのものは、クエリー配列が、通常的には少なくとも80残基、より通常的には90残基、さらに通常的には少なくとも95アミノ酸残基長である場合に最も有用である。より典型的には、クエリー配列が、好ましくは100残基長、より好ましくは120残基長、さらに好ましくは150アミノ酸残基長である場合に配列同一性のみに基づいて、類似性を断定することができる。

#### 【0111】プロフィール配列および複数整列配列を用いた整列からの活性測定

核酸の翻訳は、タンパク質ファミリーまたは共通モチーフを規定するアミノ酸プロフィールとともに整列され得る。また、核酸の翻訳は、タンパク質ファミリーまたはモチーフの成員のポリペプチド配列を含む複数配列整列(MSA)に整列され得る。プロフィール配列またはMSAとの類似性または同一性を用いて、核酸または相当するcDNAもしくは遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性を確定することができる。例えば、ケモカインプロフィールまたはMSAとの同一性または類似性を示す配列は、ケモカイン活性を示し得る。

【0112】プロフィールは、(1)ファミリーに属する成員のアミノ酸配列の整列であるMSAを創出し、(2)整列の統計的表示を構築することにより、手作業で設計することができる。かかる方法は、例えば、Birney et al., Nucl. Acid Res. 25(14): 2730-2739 (1997)に記載されている。

【0113】いくつかのタンパク質ファミリーおよびモチーフのMSAは、公的に入手可能である。例えば、これらとしては、547種のファミリーおよびモチーフのMSAが挙げられる。これらのMSAはまた、Sonhammer et al., Proteins 28: 405-420 (1997)に記載されて

いる。他の供給源はまた、ワールドワイドウェブにて入手可能である。これらのMSAの簡単な説明は、Pascarella et al., Prot. Eng. 9(3): 249-251 (1996)に報告されている。

【0114】MSAからプロフィールを形成するための技法は、上述のSonnhammer et al., 上述のBirney et al. およびMethods in Enzymology, vol. 266: 「高分子配列分析用コンピュータ方式(Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis)」, 1996, ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USAに記載されている。

【0115】クエリー配列とタンパク質ファミリーまたはモチーフ間の類似性は、(a)プロフィールに対してクエリー配列を比較すること、および/または(b)ファミリーまたはモチーフの成員とともにクエリー配列を整理することにより決定することができる。

【0116】典型的に、Searchwiseのようなプログラムを用いて、プロフィールとしても既知の複数整理の統計学的表示と、クエリー配列を比較することができる。このプログラムは、上述のBirney et al.に記載されている。配列およびプロフィールを比較するための他の技法は、上述のSonnhammer et al., および上述のDoolittleに記載されている。

【0117】次に、Feng et al., J. Mol. Evol. 25:351-360 (1987)およびHiggins et al., CABIOS 5:151-153 (1989)により記載される方法を用いて、MSAとしても既知のファミリーまたはモチーフの成員とともにクエリー配列を整理させることができる。PILEUPのようなコンピュータプログラムを使用することができる。以下のFeng et al.を参照されたい。

【0118】以下の要素：(1)クエリー配列に見られる保存残基の数、(2)クエリー配列に見られる保存残基の割合、(3)フレームシフトの数、および(4)保存残基間の間隔を用いて、クエリー配列およびプロフィールまたはMSA間の類似性が存在するかどうかを決定する。

【0119】配列を翻訳し、かつ整理するいくつかの整理プログラムは、ヌクレオチド配列を翻訳する際に、任意数のフレームシフトを行って、最良の整理を生じることができる。整理を生じるのに必要なフレームシフトがより少ないほど、クエリーおよびプロフィールまたはMSA間の類似性あるいは同一性がより強力である。例えば、フレームシフトを起こさないことによって生じた弱い類似性は、2つのフレームシフトから生じた強い類似性よりも、クエリー配列の活性または構造をより良く示すことができる。

【0120】好ましくは、整理中に、3つ以下のフレームシフト、より好ましくは2つ以下のフレームシフト、さらに好ましくは1つ以下のフレームシフトが見られ、

よりいっそう好ましくは、クエリーおよびプロフィールまたはMSAの整理中にフレームシフトは見られない。

【0121】保存残基は、ファミリーもしくはモチーフの成員のすべてまたはいくつかでの特定位置にて見られるアミノ酸である。例えば、最もよく知られるケモカインは、4つの保存システインを含有する。あるいは、ある種類のアミノ酸のみが、ファミリーの成員のすべてまたはいくつかでの特定位置にて見られる場合に、位置は保存されているとみなされる。例えば、N末端位置は、リシン、アルギニンまたはヒスチジンのような正に荷電したアミノ酸を含有することができる。

【0122】典型的に、一つの種類のアミノ酸または単一アミノ酸が、すべての種類の成員の少なくとも約40%、より典型的には少なくとも約50%、さらに典型的には少なくとも約60%で、特定位置にて見られる場合に、ポリペプチド残基は保存されている。通常は、一つの種類のアミノ酸または単一アミノ酸が、ファミリーまたはモチーフの成員の少なくとも約70%、より通常的には少なくとも約80%、さらに通常的には少なくとも約90%、より一層通常的には少なくとも約95%で見られる場合に、残基は保存されている。

【0123】3つの非関連アミノ酸、より通常的には2つの非関連アミノ酸が、成員のいくつかまたはすべてにおける特定位置にて見られる場合に、残基は保存されているとみなされる。非関連アミノ酸が、すべての種類の成員の少なくとも約40%、より典型的には少なくとも約50%、さらに典型的には少なくとも約60%で、特定位置にて見られる場合に、これらの残基は保存されている。通常、アミノ酸の一種または単一アミノ酸が、ファミリーまたはモチーフの成員の少なくとも約70%、より通常的には、少なくとも約80%、さらに通常的には少なくとも約90%、よりいっそう通常的には少なくとも約95%で見られる場合に、残基は保存されている。

【0124】クエリー配列が、少なくとも約25%、より通常的には少なくとも約30%、さらに通常的には少なくとも約40%のプロフィールまたはMSAの保存残基を含む場合には、クエリー配列は、プロフィールまたはMSAに対する類似性を有する。典型的に、クエリー配列が、少なくとも約45%、より典型的には少なくとも約50%、さらに典型的には少なくとも約55%のプロフィールまたはMSAの保存残基を含む場合には、クエリー配列は、プロフィール配列またはMSAに対するより強力な類似性を有する。

【0125】V. プローブおよびプライマー  
腫瘍細胞、特に結腸癌細胞系および組織からの遺伝子のクローニングから確定されるヌクレオチド配列は、他の細胞型における(例えば、他の組織由来の)同族体、ならびに他の哺乳動物生体由来の同族体を同定および/またはクローニングするために設計されるプローブおよび

プライマーの生成をさらに可能にするであろう。プローブ/プライマーとして有用なヌクレオチド配列としては、配列番号1、3、5、もしくは7に記載の配列、またはそれらに相補的な配列、あるいは配列番号1、3、5、もしくは7のすべてまたは一部に、ストリンジェント条件下にてハイブリダイズする配列のすべてまたは一部を挙げることができる。例えば、本発明はまた、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーを提供し、ここでオリゴヌクレオチドは、少なくとも約8個、好ましくは約12個、好ましくは約15個、好ましくは約25個、より好ましくは約40個の連続ヌクレオチドから完全長の、配列番号1、3、5、もしくは7、またはそれらに相補的な配列、あるいはそれらの天然に存在する突然変異体からなる群から選択されるセンスまたはアンチセンス配列に、ストリンジェント条件下にてハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。例えば、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列に表される核酸に基づくプライマーは、その配列の同族体をクローニングするためのPCR反応にて使用することができる。

【0126】さらなる別の実施形態では、本発明は、少なくとも約8個、好ましくは約12個、好ましくは約15個、好ましくは約25個、より好ましくは約40個の連続配列から完全長の、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらの天然に存在する突然変異体からなる群から選択されるセンスまたはアンチセンス配列に、中程度のストリンジェント条件下にてハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むプローブ/プライマーを提供する。

【0127】特に、これらのプローブは、本発明の野生型遺伝子において突然変異を検出する方法を提供するので有用である。本発明の野生型遺伝子に相補的であり、突然変異体遺伝子とミスマッチを形成し得る核酸プローブを提供し、酵素的または化学的切断により、あるいは電気泳動移動度におけるシフトにより検出することが可能である。同様に、対象配列に基づくプローブを用いて、例えば、予後または診断アッセイにて使用するための、同一または同種タンパク質をコードする転写体またはゲノム配列を検出することが可能である。好ましい実施形態では、プローブは、それらに結合され、検出可能な標識基をさらに含み、例えば、標識基は、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、および酵素補因子から選択される。

【0128】開示する核酸を含む完全長cDNA分子は、以下のようにして得られる。少なくとも約8個、好ましくは約12個、好ましくは約15個、好ましくは約25個、より好ましくは約40個のヌクレオチドから完全長の、配列番号1、3、5、または7に表される配列、あるいはそれらに相補的な配列を含む対象核酸またはそれらの一部を、米国特許第5,654,173号、

「分泌タンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチド」新規ヒト遺伝子および遺伝子発現産物(参照により本明細書に援用される)に記載されるようなプローブ設計方法、クローニング方法、およびクローン選択技法を用いてcDNAライブラリーの成員をハイブリダイズして検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いてもよい。cDNAライブラリーは、正常組織または腫瘍組織のような選択された組織から、あるいは例えば薬剤で処理した哺乳動物の組織から作製されてもよい。好ましくは、核酸およびcDNAの両方が発現遺伝子を表すので、組織は、核酸を生成するのに用いられるものと同じである。最も好ましくは、cDNAはライブラリーは、本明細書中で実施例にて記載する生物学的材料から作製される。あるいは、多くのcDNAライブラリーは、市販されている(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 1989))。ライブラリー構築に関する細胞型の選択は、核酸関連遺伝子によりコードされるタンパク質の同一性がわかった後に行われてもよい。このことは、どの組織および細胞型が関連遺伝子を発現する可能性が高く、それによりcDNAを生成するためのmRNAを含有しているかを示すであろう。

【0129】核酸より大きく、好ましくは自然(native)メッセージの全配列を含有するライブラリーの成員を得ることができる。全cDNAが得られたことを確認するために、RNA保護実験を以下のようにして行うことができる。mRNAへの完全長cDNAのハイブリダイゼーションは、RNAアーゼ分解からRNAを保護できる。cDNAが完全長でない場合、ハイブリダイズされていないmRNAの部分は、RNAアーゼによる分解を受ける。このことは、当該技術にて既知のように、ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動移動度における変化により、あるいは放出されるモノリボヌクレオチドの検出により、アッセイされ得る(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 1989))。部分的cDNAの末端にさらなる配列5'を付加するために、5'RACE(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc. 1990))を実施してもよい。

【0130】ゲノムDNAは、完全長cDNAの単離に類似した様式で、核酸を用いて単離し得る。簡単に言うと、核酸またはそれらの一部を、ゲノムDNAライブラリーに対するプローブとして用いることができる。好ましくは、ライブラリーは、核酸を生成するのに用いた細胞型から得られる。最も好ましくは、ゲノムDNAは、本明細書中で実施例にて記載する生物学的材料から得られる。かかるライブラリーは、Sambrook et al., 9.4-9.30に詳述されるように、P1またはYACのようなゲ

ノムの大きなセグメントを運搬するのに適切なベクター中であってもよい。さらに、ゲノム配列は、ヒトBACライブラリーから単離することができ、それは例えば、Research Genetics, Inc., Huntville, Alabama, USAから市販されている。付加する5'または3'配列を得るために、ゲノムDNAの隣接または重複断片が単離されるように、Sambrook et al.に記載されるように、染色体歩行(chromosome walking)を実施してもよい。これらは、当該技術にて既知であるように、制限消化酵素およびDNAリガーゼを用いて、マッピングされ、統合され

【0131】本発明の核酸を用いて、cDNAライブラリーを構築してプローブするための古典的な方法およびPCR法の両方を用いて、対応する完全長遺伝子を単離することができる。いずれかの方法を用いて、好ましくは、多数の細胞型にてノーザンブロットを行い、どの細胞系が最速で当該遺伝子を発現するかを決定してもよい。

【0132】cDNAライブラリーを構築するための古典的な方法は、上述のSambrook et al.に記載されている。これらの方法を用いて、cDNAは、mRNAから生産され、ウイルスまたは発現ベクターに挿入することができる。典型的に、ポリ(A)尾を含むmRNAライブラリーは、ポリ(T)プライマーを用いて生産され得る。同様に、cDNAライブラリーは、プライマーとして本配列を用いて生産することができる。

【0133】PCR法を用いて、所望の挿入物を含むcDNAライブラリーの成員を増幅することができる。この場合には、所望の挿入物は、本核酸に対応する完全長cDNAからの配列を含有してもよい。かかるPCR法は、遺伝子トラップ、およびRACE方法を含む。

【0134】遺伝子トラップは、ベクター中にcDNAライブラリーの成員の挿入を引き起こすことがある。ついで、ベクターを変性させて、一本鎖分子を生産できる。次に、ピオチン化オリゴのような基質結合プローブを用いて、当該cDNA挿入物をトラップし得る。ピオチン化プローブは、アビジン結合固体基質に連結することができる。PCR法を用いて、トラップしたcDNAを増幅することができる。完全長遺伝子に対応する配列をトラップするために、標識プローブ配列は、本発明の核酸、例えば配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列に基づいてもよい。ランダムプライマーまたはライブラリーベクターに特異的なプライマーを用いて、トラップしたcDNAを増幅することができる。かかる遺伝子トラップ技法は、PCT国際公開第95/04745号(Gruber et al.)および米国特許第5,500,356号(Gruber et al.)に記載されている。遺伝子トラップ実験を行うためのキットは、例えばLife Technologies, Gaithersburg, Maryland, USAから市販されている。

【0135】「cDNA末端の迅速増幅」、即ちRACEは、多数の異なるRNAからのcDNAを増幅するPCR法である。cDNAは、オリゴヌクレオチドリンカーに連結され、2つのプライマーを用いるPCR法により増幅することができる。1つのプライマーは、本核酸からの配列に基づくものでよく、完全長配列が望ましい。第2のプライマーは、オリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズする配列を含み、cDNAを増幅する。この方法の説明は、PCT国際公開公報第97/19110号に報告されている。

【0136】RACEの好ましい実施形態では、共通プライマーは、cDNA末端に連結される任意のアダプター配列にアニールするように設計することができる(Apte and Siebert, Biotechniques 15:890-893, 1993; Edwards et al., Nuc. Acids Res. 19:5227-5232, 1991)。単一遺伝子特異的RACEプライマーが、共通プライマーと対をなすと、単一遺伝子特異的プライマーと共通プライマー間で配列の優先的増幅が起こる。RACEにおいて使用するために修飾された市販cDNAプールが入手可能である。

【0137】PCRに基づいた別の方法は、cDNA配列に関する特定の知識なしで、アンカー末端を用いて、完全長cDNAライブラリーを生成する。この方法は、ロックドッキングプライマー(I-VI)を使用し、ここで1つのプライマーであるポリTV(IIII)は、第1の鎖を作り出す真核性mRNAのポリA尾に固着し、第2のプライマーであるポリGH(IV-VI)は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)により付加されるポリC尾上へ固着する。この方法は、PCT国際公開公報第96/40998号に記載されている。

【0138】遺伝子のプロモーター領域は、RNAポリメラーゼIIのための開始部位に対して5'に一般に位置する。何百ものプロモーター領域は、「TATA」ボックス(TATTAまたはTATAAのような配列)を含み、突然変異に対して感受性が高い。プロモーター領域は、遺伝子のコード領域からのプライマーを用いて、5'RACEを行うことにより得ることができる。あるいは、cDNAは、ゲノム配列のためのプローブとして使用することができ、コード領域に対する5'領域は、「歩行(walking up)」により同定される。

【0139】遺伝子が、高度に発現するか、または差別的に発現する場合、遺伝子からのプロモーターは、異種遺伝子のための調節構築物において有用であり得る。

【0140】いったん完全長cDNAまたは遺伝子が得られると、変異体をコードするDNAを、部位特異的突然変異誘発により調製することができ、それはSambrook 15.3-15.63に詳述されている。置換されるべきコドンまたはヌクレオチドの選択により、本明細書での開示に基づいて、変質タンパク質構造および/または機能を達

成するためにアミノ酸を任意に変化させることが可能である。

【0141】生物学的材料からDNAまたはRNAを得るための他の方法として、本発明の1つ以上の核酸の配列を有するヌクレオチドを含む核酸を合成することができる。したがって、本発明は、核酸分子の複製および発現を含む、1つまたはそれ以上の生物学的操作に適した、約8個のヌクレオチド(配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つにより表される核酸に、ストリンジェント条件下にてハイブリダイズするか、またはそれと少なくとも80%同一である、少なくとも12個の連続ヌクレオチドに相当する)から、最大長までの長さに及ぶ核酸分子を包含する。本発明は、(a)完全遺伝子サイズを有し、かつ配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの少なくとも1つを含む核酸、(b)操作可能に連結され、融合タンパク質を発現させる少なくとも1つの付加的遺伝子をさらに含む(a)の核酸、(c)(a)または(b)を含む発現ベクター、(d)(a)または(b)を含むプラスミド、および(e)(a)または(b)を含む組換えウイルス粒子を含むが、これらに限定されない。(a)の構築は、下記パートIVに記載するように達成することができる。

【0142】本発明の核酸配列は、限定されるものでなく、A、T、G、および/またはC(DNAに関して)、ならびにA、U、C、および/またはG(RNAに関して)、あるいはイノシンおよびプソイドウリジンを含むそれらの修飾塩基のいかなる配列であってもよい。配列の選択は、所望の機能に依存し、所望のコード領域、所望のイントロン様領域、および所望の調節領域により決められる。

【0143】VI. 本発明の核酸を運搬するベクター  
本発明はさらに、宿主細胞で遺伝子を発現するために使用できるプラスミドおよびベクターを提供する。宿主細胞は、どのような原核細胞または真核細胞であってもよい。したがって、タンパク質のすべてまたは選択した部分をコードする、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のいずれかが1つに由来するヌクレオチド配列を用いて、微生物または真核細胞のプロセスを介してポリペプチドの組換え体を産生することができる。発現ベクターのような遺伝子構築物へのポリヌクレオチド配列の連結、および真核性(酵母、トリ、昆虫または哺乳動物)または原核性(細菌細胞)宿主への形質転換またはトランスフェクションは、当該技術にて既知の標準的手法である。

【0144】細胞において核酸の発現を可能にするベクターを、発現ベクターと称する。典型的に、発現ベクターは、少なくとも1つの転写調節配列に操作可能に連結された核酸を含有する。調節配列は、当該技術分野で認識されており、対象核酸の発現を誘導するように選択さ

れる。転写調節配列は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego CA (1990)に記載されている。一実施形態では、発現ベクターは、対象ポリペプチドのアゴニスト活性を有するペプチドをコードする組換え遺伝子、または対象ポリペプチドのアンタゴニスト形態であるペプチドをコードする組換え遺伝子を含む。

【0145】プラスミドの選択は、増殖が望ましい細胞の型、および増殖の目的によって決められる。いくつかのベクターは、大量の所望のDNA配列を増幅して、製造するのに有用である。別のベクターは、培養における細胞の発現に適している。さらに別のベクターは、完全な動物またはヒトにおける細胞の移入または発現に適している。適切なベクターの選択は、当業者に十分可能である。多くのかかるベクターが市販されている。核酸または完全長遺伝子は、典型的にはベクターにおける切断制限酵素部位へのDNAリガーゼ結合を用いてベクターに挿入される。あるいは、所望のヌクレオチド配列は、in vivoでの相同組換えにより挿入することができる。典型的にこれは、所望のヌクレオチド配列のフランク上にて、ベクターに相同性の領域を結合することにより成し遂げられる。相同性の領域は、ヌクレオチド配列の一部の両方を含むプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により付加される。

【0146】核酸または完全長遺伝子は、所望の発現特性が適切に得られるように調節配列に連結される。これらには、プロモーター(センス鎖の5'末端またはアンチセンス鎖の3'末端に結合される)、エンハンサー、ターミネーター、オペレーター、リプレッサー、およびインデューサーが含まれることがある。プロモーターは、調節することができるか、または構造的なものである。状況によっては、組織特異的、または発達段階特異的プロモーターのような条件付きで活性なプロモーターを使用することが望ましい場合もある。これらは、ベクターへの連結のための上述の技法を用いて、所望のヌクレオチド配列に連結される。当該技術で既知のいずれの技法を使用してもよい。

【0147】上述の宿主細胞、あるいは他の適切な宿主細胞または微生物のいずれかで、本発明のポリヌクレオチドまたは核酸を複製および/または発現させる場合、得られる複製核酸、RNA、発現タンパク質またはポリペプチドは、宿主細胞または微生物の産物として本発明の範囲内である。この産物は、当該技術にて既知の適切な手段により回収する。

【0148】一旦、核酸に相当する遺伝子が同定されると、その発現は、遺伝子が自然である細胞において調節され得る。例えば、細胞の内因性遺伝子は、米国特許第5,641,670号の「タンパク質産生およびタンパク質輸送(Protein Production and Protein Deliver

y)」に開示されるような外因性調節配列によって調節され得る。

【0149】多数のベクターが、酵母における組換えタンパク質の発現のために存在する(例えば、参照により本明細書に援用されるBroach et al (1983) in Experimental Manipulation of Gene Expression, ed. M. Inouye, Academic Press, p.83を参照)。さらに、アンピシリンのような薬剤耐性マーカーを使用することができる。実例の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つで表される核酸の1つをサブクローニングすることにより生成される発現ベクターを組換え的に利用して生産される。

【0150】好ましい哺乳動物発現ベクターは、細菌におけるベクターの増殖を容易にするための原核性配列、および真核細胞において発現される1つ以上の真核性転写ユニットの両方を含有する。プラスミドの調製および宿主微生物の形質転換に用いる様々な方法は当該技術にて公知である。原核細胞および真核細胞両方のための他の適切な発現系、ならびに一般的な組換え手法に関しては、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., by Sambrook, Fritsch and Maniatis (ColdSpring Harbor Laboratory Press: 1989) Chapters 16 and 17を参照されたい。

【0151】遺伝子、例えば切断型突然変異体のような遺伝子一部のみを発現することが望ましい場合、発現されるべき所望の配列を含有するオリゴヌクレオチド断片に、開始コドン(ATG)の付加を必要とすることがある。N末端位置でのメチオニンを、酵素メチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)の使用により酵素的に切断できることは、当該技術にて既知である。MAPは、大腸菌(Ben-Bassat et al., (1987) J. Bacteriol. 169:751-757)およびネズミチフス菌からクローニングされ、そのin vitro 活性は、組換えタンパク質に関して実証された(Miller et al., (1987) PNAS 84:2718-1722)。したがって、N末端メチオニンの除去は、望ましい場合には、MAPを産生する宿主(例えば、大腸菌またはCM89またはサッカロミセス・セレビシエ)においてポリペプチドをin vivo にて発現することによって、あるいは精製MAPをin vitro で使用することにより(例えば、上述のMiller et al.の手法)達成できる。

【0152】さらに、本発明の核酸構築物はまた、アンチセンス核酸のような核酸を送達するための遺伝子治療プロトコルの一部として使用することができる。したがって、本発明の別の態様は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたin vivoまたはin vitroでのトランスフェクションのための発現ベクターを特徴とする。

【0153】高度に細胞型特異的なプロモーターおよび増幅プロモーター要素の制御下にて、アンチセンスオリゴヌクレオチドのような導入遺伝子を提供する核酸分子

および構築物は、ベクター中に組み込んで、ヒトを含むあらゆる哺乳動物に投与できる。多くのかかるベクターは市販されており、さらにはほかの適切なベクターは、容易に調製することができ、当業者に明らかである。ベクターの正確な設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、および/または発現されるのに望ましいタンパク質の型のような要因に依存する。適切なベクターは、真核細胞における発現に適したプラスミドまたはウイルスベクター中に所望の構築物を連結することにより生産することができる(例えば、Broach, et al., Experimental Manipulation of Gene Expression, ed. M. Inouye (Academic Press, 1983) p.83; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. Sambrook, et al. (ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapter 16 and 17(それらの全体は、参照することにより本明細書に援用される)を参照)。

【0154】使用することができるベクターの例としては、pBR322、pUCまたはCo1E1のようなプラスミド、アデノウイルス、シンドビスウイルス、シミアンウイルス40、サイトメガロウイルス、ならびにマウス肉腫ウイルス、マウス乳腺癌ウイルス、モロニーマウス白血病ウイルスおよびラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。サルモネラ種、エルシニア・エンテロコリチカ、赤痢菌種、コレラ菌、放線菌株BCG、およびリステリア菌のような細菌ベクターを使用することができる。MCおよびMC1のようなミニ染色体、バクテリオファージ、コスミド(ファージのcos部位が挿入されたプラスミド)およびレプリコン(非依存性染色体外複製が可能である遺伝要素)も使用することができる。

【0155】上述のベクターは、限定するものではないが、ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子、ネオマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシンおよびストレプトマイシン耐性に対する耐性を付与する遺伝子を含む、これらの1つまたはそれ以上の選択可能マーカーをコードする配列をさらに含むことができる。標的細胞のゲノムへの組み込みを改良するために(望ましい場合)、レトロウイルスベクターを使用することができ、長い末端反復(LTR)配列を、発現構築物の片側に付加することができる(例えば、Vile, et al., Virology 214: 307-313 (1995)(その全体は、参照することにより本明細書に援用される)を参照)。

【0156】高度に細胞型特異的なプロモーターの制御下で、本発明のヌクレオチド配列を含む核酸構築物の送達は、経口または鼻腔内投与、生物学的衝撃銃(Ballistic gun)(「遺伝子銃」)を用いた注射を含む、筋肉内、皮内、腹腔内または皮下注射を含む、当該技術にて既知のあらゆる手段によるものであってよい。治療目的のための核酸の投与は、治療効率を達成するのに必要と

する所望の任意の間隔にて繰り返すことができる。さらなる構成成分をベクターに付加して、標的細胞へのその選択送達を改善し、非標的細胞へのその送達を抑制することができる。使用することができるアプローチの例としては、Peng and Russell, *Cur. Opin. Biotech.* 10: 454-457 (1999) (その全体は、参照することにより本明細書に援用される)に記載されるように、宿主域拡張、侵入増強、および宿主域制限が挙げられ得る。

【0157】ウイルス移入方法のほかに、非ウイルス性方法もまた、対象核酸、例えば配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のうちの1つによって表される配列を、動物組織内に導入するために使用することができる。遺伝子移入のたいていの非ウイルス性方法は、高分子の取り込みおよび細胞内輸送のために哺乳動物細胞によって使用される一般的機構に依存する。好ましい実施形態では、本発明の非ウイルス性ターゲティング手段は、標的細胞による対象核酸の取り込みのためのエンドサイトーシス経路に依存する。この型の典型的なターゲティング手段としては、リポソーム送達系、ポリリシン結合体、および人工ウイルスエンベロープが挙げられる。

【0158】配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のいずれかの核酸、相当するcDNA、あるいは完全長遺伝子を用いて、部分的または完全な遺伝子産物を発現させることができる。適切な核酸構築物は、例えば、Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York)に記載されるように標準的な組換えDNA技術を用いて、United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) Guidelines for Recombinantに記載される現時の規制の下で精製される。

#### 【0159】DNA研究

核酸によりコードされるポリペプチドは、例えば、細菌、酵母、昆虫、両性動物系および哺乳動物系を含むあらゆる発現系において発現されてもよい。

#### 【0160】細菌

細菌における発現系としては、Chang et al., *Nature* (1978) 275:615、Goeddel et al., *Nature* (1979) 281:5、Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* (1980) 8:405 7、欧州特許第0,036,776号、米国特許第4,551,433号、DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1983) 80:2125、およびSiebenlist et al., *Cell* (1980) 20:269に記載されるものが挙げられる。

#### 【0161】酵母

酵母における発現系としては、Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1978) 75:1929、Ito et al., *J. Bacteriol.* (1983) 153:163、Kurtz et al., *Mol. Cell Biol.* (1986) 6:142、Kunze et al., *J. Basic Micro*

*biol.* (1985) 25: 141、Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* (1986) 132:3459、Roggenkamp et al., *Mol. Gen. Genet.* (1986) 202:302、Das et al., *J. Bacteriol.* (1984) 158:1165、De Louvencourt et al., *J. Bacteriol.* (1983) 154:737、Van den Berget al., *Bio/Technology* (1990) 8:135、Kunze et al., *J. Basic Microbiol.* (1985) 25:141、Cregg et al., *Mol. Cell Biol.* (1985) 5:3376、米国特許第4,837,148号および第4,929,555号、Beach and Nurse, *Nature* (1981) 300:706、Davidow et al., *Curr. Genet.* (1985) 10:380、Gaillardin et al., *Curr. Genet.* (1985) 10:49、Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 112:284289、Tilburn et al., *Gene* (1983) 26:205221、Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:14701474、Kelly and Hynes, *EMBO J.* (1985) 4:475479、欧州特許第0,224,234号、および国際公開第91/003577号に記載されるものが挙げられる。

#### 【0162】昆虫細胞

昆虫における異種遺伝子の発現は、米国特許第4,745,051号、Friesen et al., (1986), *The Molecular Biology Of Baculoviruses* (W. Doerfler, ed.)における「バキュロウイルス遺伝子発現の調節(The Regulation of Baculovirus Gene Expression)」、欧州特許第0,127,839号、欧州特許第0,155,476号、およびVlak et al., *J.Gen.Virol.* (1988) 69:76576、Milleret al., *Ann.Rev.Microbiol.* (1988) 42:177、Carbonell et al., *Gene* (1988) 73:409、Maeda et al., *Nature* (1985) 315:592594、Lebacqz Verheyden et al., *Mol.Cell.Biol.* (1988) 8:3129、Smith et al., *Proc.Natl.Acad. Sci.(USA)* (1985) 82:8404、Miyajima et al., *Gene* (1987) 58:273、およびMartin et al., *DNA* (1988) 7:99に記載されるように達成される。非常に多くのバキュロウイルス株および変異株ならびに対応する宿主由来の許容性昆虫宿主細胞は、Luckow et al., *Bio/Technology* (1988) 6:4755、Miller et al., *Generic Engineering* (Setlow, J.K. et al., eds.), Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277279、およびMaeda et al., *Nature*, (1985) 315:592-594に記載されている。

#### 【0163】哺乳類細胞

哺乳動物発現は、Dijkema et al., *EMBO J.* (1985) 4:761、Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:6777、Boshart et al., *Cell* (1985) 41:521および米国特許第4,399,216号に記載されるように達成される。哺乳動物発現の他の特徴は、Ham and Wallace, *Meth. Enz.* (1979) 58:44、Barnes and Sato, *Anal. Biochem.* (1980) 102:255、米国特許第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号、国際公開第90/103430号、国際公開第87/00195号、

および米国再発行第30,985号に記載されるように助長される。

#### 【0164】VII. 治療用核酸構築物

本発明の一態様は、アンチセンス治療における、単離核酸、例えば、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列の使用に関する。本明細書で使用するアンチセンス治療とは、細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAと、細胞条件下にて特異的にハイブリダイズする(例えば、結合する)オリゴヌクレオチド分子またはそれらの誘導体の投与あるいはその場での(in situ)生成によりその遺伝子の転写および/または翻訳を抑制することを指す。結合は、従来型塩基対の相補性によってでもよく、あるいは例えばDNA二重鎖に結合する場合には、二重らせんの主溝での特異的相互作用によってでもよい。一般に、アンチセンス治療は、当該技術にて一般的に用いられる技術の範囲を指し、オリゴヌクレオチド配列に対する特異的結合に依存するあらゆる治療を含む。

【0165】本発明のアンチセンス構築物は、例えば、細胞にて転写される場合、細胞mRNAの少なくとも一部分に相補的であるRNAを生産する発現プラスミドとして送達され得る。あるいは、アンチセンス構築物は、ex vivoにて生成され、細胞中に導入される場合に、対象核酸のmRNAおよび/またはゲノム配列とハイブリダイズすることにより、発現の抑制を引き起こすオリゴヌクレオチドプローブである。かかるオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、内因性ヌクレアーゼ、例えば、エキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼに耐性である修飾オリゴヌクレオチドであり、したがって、in vivoにて安定である。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての使用のための典型的な核酸分子は、DNAのホスホラミデート、ホスホリボチオエート、およびメチルホスホネート類縁体である(米国特許第5,176,996号、第5,264,564号および第5,256,775号も参照)。さらに、アンチセンス治療において有用なオリゴマーを構築するための一般的なアプローチは、例えば、Van der Kroet et al. (1988) Bio Techniques 6:958-976、およびStein et al. (1988) Cancer Res 48:2659-2668により概説されている。アンチセンスDNAに関して、転写開始部位由来のオリゴデオキシリボヌクレオチド(例えば、所定のヌクレオチド配列の-10~+10領域)が好ましい。

【0166】アンチセンスアプローチは、mRNAに相補的なオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNA)の設計を伴う。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNA転写物に結合し、翻訳を防止するであろう。絶対的相補性は、好ましいが、必要というわけではない。したがって、二重鎖アンチセンス核酸の場合には、二重鎖DNAの一本鎖が試験されてもよく、または三重鎖形成をア

ッセイしてもよい。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さに依存するであろう。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それはRNAとのより多くの塩基ミスマッチを含有し、安定な二重鎖(または場合によっては、三重鎖)はそれでも形成し得る。当業者は、ハイブリダイズ複合体の融点を測定する標準的な手法を用いて、ミスマッチの耐用度を確認することができる。

【0167】mRNAの5'末端、例えばAUG開始コドンを含むまでの5'非翻訳配列、に相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳を抑制する際に最も効率的に作用するはずである。しかしながら、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列は、同様にmRNAの翻訳を抑制する際に効果的であることが最近わかった(Wagner, R. 1994. Nature 372:333)。したがって、遺伝子の5'または3'非翻訳、非コード領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性mRNAの翻訳を抑制するためのアンチセンスアプローチにおいて使用されるはずである。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的に、より効率の悪い翻訳のインヒビターであるが、本発明によれば、使用することも可能である。対象mRNAの5'、3'またはコード領域にハイブリダイズするように設計されようとそうでなかつと、アンチセンス核酸は、少なくとも6個のヌクレオチド長であるべきであり、かつ、好ましくは約100個未満、より好ましくは約50個、25個、17個または10個未満のヌクレオチド長である。

【0168】標的配列の選択に関係なく、遺伝子発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドの能力を定量化するため、アンチセンスオリゴヌクレオチドの能力を定量化するin vitroでの研究が、まず行われることが好ましい。これらの研究は、オリゴヌクレオチドのアンチセンス遺伝子抑制と非特異的生物学的効果とを区別する対照を利用することが好ましい。これらの研究は、標的RNAまたはタンパク質のレベルを、内部対照RNAまたはタンパク質のレベルと比較することもまた好ましい。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られる結果を、対照オリゴヌクレオチドを用いて得られる結果と比較することが想定される。対照オリゴヌクレオチドは、試験オリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであること、また、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、標的配列への特異的ハイブリダイゼーションを防止するのに必要とする量以上はアンチセンス配列と異なることが好ましい。

【0169】オリゴヌクレオチドは、DNAもしくはRNAまたはキメラ混合物もしくは誘導体、あるいはそれらの修飾型、一本鎖または二本鎖であることがある。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸

バックボーンにて、例えば分子、ハイブリダイゼーション等の安定性を改良するために修飾されることがある。オリゴヌクレオチドはまた、ペプチドのような他の追加基（例えば、宿主細胞受容体をターゲティングするために）、あるいは細胞膜の横断輸送を容易にする薬剤（例えば、Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556、Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652、1988年12月15日に公開されたPCT国際公開公報第88/09810号を参照）、または血液脳関門（例えば、1988年4月25日に公開されたPCT国際公開公報第89/10134号を参照）、ハイブリダイゼーション誘発切断剤（例えば、Krol et al., 1988, Bio Techniques 6:958-976を参照）もしくはインターカレート剤（例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照）を含むことがある。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤等に結合されることがある。

【0170】アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシトリエチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノエチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリンを含むがこれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの修飾塩基部分を含んでもよい。

【0171】アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースを含むが、これらに限定されない群から選択される少なくとも1つの修飾糖部分を含んでもよい。

【0172】アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、中性ペプチド様バックボーンを含有することもできる。かかる分子は、ペプチド核酸(PNA)オリゴマーと呼ばれ、Peny-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670、およびEglom et al. (1993) Nature 365:566に記載されている。PNAオリゴマーの1つの利点は、DNAの中性バックボーンに起因する、培地のイオン強度に本質的に関係なく、相補的DNAに結合するそれらの能力である。さらに別の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホラミデート、ホスホラジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタールまたはそれらの類縁体からなる群から選択される少なくとも1つの修飾ホスフェートバックボーンを含む。

【0173】さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、a-アノマーオリゴヌクレオチドである。a-アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、ここで、通常のn-ユニットと対照的に、鎖は、互いに平行している(Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-12148)、またはキメラRNA-DNA類縁体(Jnoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330)である。

【0174】本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術において既知の標準的方法により、例えば自動DNA合成機(Biosearch, Applied Biosystems等から市販されているような)を用いて合成してもよい。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Stein et al.の方法(1988, Nucl. Acids Res. 16:3209)により合成してもよく、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御された孔ガラスポリマー支持体の使用(Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451)等により合成することができる。

【0175】コード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが使用され得ると同時に、転写非翻訳領域領域、および開始メチオニンを含む領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

【0176】アンチセンス分子は、in vivoにて標的核酸を発現する細胞に送達することができる。アンチセンスDNAまたはRNAを細胞に送達するために多くの方法が開発されてきた。例えば、アンチセンス分子を、組織部位に直接的に注入することができるし、あるいは所望の細胞を標的にするように設計される修飾アンチセンス分子(例えば、標的細胞表面上にて発現する受容体もしくは抗原を特異的に結合するペプチドまたは抗体に連結されるアンチセンス)を全身投与することができる。

【0177】しかしながら、内因性mRNAに関する翻

訳を抑制するのに十分なアンチセンスの細胞内濃度を達成することは、多くの場合困難である。したがって、好ましいアプローチは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが強力なpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれている組換えDNA構築物を利用する。患者において標的細胞をトランスフェクトするためのかかる構築物の使用は、内因性転写物と相補的塩基対を形成し、それにより標的mRNAの翻訳を防止するであろう、十分量の一本鎖RNAの転写という結果を生じるであろう。例えば、ベクターを、細胞に取り込まれるように *in vivo* にて導入することができ、アンチセンスRNAの転写を誘導する。かかるベクターは、当該技術において標準的である組換えDNA技術方法によって構築することができる。ベクターは、所望のアンチセンスRNAを生産するように転写され得る限り、エピソームのままであり得るか、または染色体性に統合されるようになり得る。かかるベクターは、プラスミド、ウイルス性、または哺乳動物細胞における複製および発現のために当該技術で既知の他のものであってもよい。アンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞において作用するための当該技術にて既知のどのようなプロモーターによるものであってもよい。かかるプロモーターは、誘発性または構造的であり得る。かかるプロモーターとしては、限定するものではないが、SV40初期プロモーター領域(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列中に含有されるプロモーター(Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42)等が挙げられる。組織部位、例えば脈絡叢または視床下部に直接導入され得る組換えDNA構築物を調製するために、いかなる型のプラスミド、コスミド、YACまたはウイルスベクターを用いることもできる。あるいは、所望の組織を選択的に感染するウイルスベクターを用いることができ(例えば、脳に関してはヘルペスウイルスベクターを用いることができる)、その場合には、投与は別の経路によって(例えば全身的に)行うことができる。

【0178】本発明の別の態様では、標的mRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子を用いて、標的mRNAの翻訳および標的タンパク質の発現を防止することができる(例えば、1990年10月4日に公開されたPCT国際公開公報第90/11364号、Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225および米国特許第5,093,246号を参照)。部位特異的認識配列にてmRNAを切断するリボザイムは標的mRNAを破壊するために使用できるが、ハンマーヘッドリボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッドリボ

ザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成するフランキング領域が指示する位置にてmRNAを切断する。唯一の要件は、標的mRNAが以下の2塩基配列、5'-UG-3'を有することである。ハンマーヘッドリボザイムの構築および産生は、当該技術にて既知であり、Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591により完全に記載されている。好ましくは、リボザイムは、切断認識部位が標的mRNAの5'末端付近に位置するように、すなわち、効率を高めて、非機能性mRNA転写物の細胞内蓄積を最低限にするように操作される。

【0179】本発明のリボザイムはまた、テトラヒメナ・サーモフィラ(Tetrahymena Thermophila)にて天然に存在し(IVS、またはL-19IVS RNAとして既知)、Thomas Cechおよび共同研究者により広範に記載されている(Zaug, et al., 1984, Science, 224:574-578、Zaug and Cech, 1986, Science, 231:470-475、Zaug, et al., 1986, Nature, 324:429-433、University Patents Inc.による公開国際特許出願国際公開WO第88/04300号、Been and Cech, 1986, Cell, 47:207-216)ものようなRNAエンドリボヌクレアーゼ(これ以降、「チェック型リボザイム」)をも含む。チェック型リボザイムは、標的RNA配列にハイブリダイズする8塩基対活性部位を有し、その後には標的RNAの切断が起こる。本発明は、標的遺伝子内に存在する8塩基対活性部位配列を標的とするチェック型リボザイムを包含する。

【0180】アンチセンスアプローチと同様に、リボザイムを、修飾オリゴヌクレオチド(例えば、安定性、ターゲティング等を改良するために)から構成することができ、*in vivo*にて標的遺伝子を発現する細胞に送達されるべきである。送達の好ましい方法は、強力な構造的pol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下にてリボザイムを「コードする」DNA構築物を用いることを伴い、したがって、トランスフェクトされた細胞は、内因性メッセージを破壊し、翻訳を抑制するのに十分な量のリボザイムを生産するであろう。リボザイムは、アンチセンス分子と異なり、触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率上要求される。

【0181】本発明のアンチセンスRNA、DNAおよびリボザイム分子は、DNAおよびRNA分子の合成のために当該技術にて既知のあらゆる方法によって調製することができる。これらの方法には、例えば固相ホスホラミダイト化学合成のような当該技術にて既知のオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成するための技法が含まれる。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列の*in vitro*および*in vivo*転写により生成されてもよい。かかるDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターのような適切

なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込む多種多様のベクターに組み込むことができる。あるいは、使用するプロモーターに依存して構造的にまたは誘発的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築物は、細胞系に安定に組み込むことができる。

【0182】さらに、核酸分子に対する様々な既知の修飾が、細胞内安定性および半減期を高める手段として導入されてもよい。考えられ得る修飾としては、分子の5'および/または3'末端へのリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列の付加、あるいはオリゴデオキシリボヌクレオチドバックボーン内でのホスホジエステラーゼ結合というよりはむしろホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0183】VIIII. 本発明のポリペプチド

本発明は、他の細胞タンパク質、特に通常単離しようとするポリペプチドに関連することがある他のシグナル伝達因子および/または転写因子から単離されたポリペプチド、または反対に実質的に含まれない、利用可能な単離ポリペプチドを作製する。本発明の対象ポリペプチドは、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列の核酸によりコードされるポリペプチドを含む。好ましいポリペプチドは、配列番号2、4、6、または8のアミノ酸配列を有するものである。本発明のポリペプチドは、腫瘍細胞、特に結腸癌由来細胞系において(正常細胞、例えば正常結腸組織および非結腸組織に比較して)差次的に調節されるタンパク質を含む。好ましい実施形態では、このポリペプチドは、腫瘍細胞、特に結腸癌由来細胞系において、アップレギュレートされる。他の実施形態では、このポリペプチドは、腫瘍細胞、特に結腸癌由来細胞系においてダウンレギュレートされる。異常増殖細胞において、癌遺伝子のようなアップレギュレートされるタンパク質、または腫瘍抑制剤のようなダウンレギュレートされるタンパク質は、診断または治療技術のための標的となり得る。例えば、cdc2遺伝子のアップレギュレーションは、有糸分裂を誘発する。有糸分裂不活性剤であるmyt1遺伝子の過剰発現は、cdc2の活性を負の方向に調節する。したがって、異常増殖は、cdc2をアップレギュレートし、またはmyt1をダウンレギュレートすることにより誘発されることがある。

【0184】「他の細胞タンパク質(本明細書中では「混入タンパク質」とも称する)を実質的に含まない」または「実質的に純粋または精製調製物」という用語は、混入タンパク質が約20%未満(乾燥重量で)、好ましくは約5%未満であるポリペプチドの調製物を包含すると定義される。対象ポリペプチドの機能性形態は、本明細書中に記載するようなクローニングされた核酸を用いることにより、精製調製物としてはじめて調製され得る。完全長タンパク質、または1つもしくはそれ以上

の特定モチーフおよび/またはドメインに相当する断片、または任意の大きさに相当する断片、例えば、少なくとも約5個、10個、25個、50個、75個、または100個のアミノ酸長の断片は、本発明の範囲内である。

【0185】好ましいポリペプチドは、配列番号1、3、5、または7の核酸配列に相補的なmRNA配列と少なくとも約70%、75%、80%、90%、95%、97%、または98%同一である核酸配列によってコードされるものであり、特に好ましいポリペプチドは、配列番号2、4、6、または8に記載されるものである。

【0186】タンパク質の単離ペプチジル部分は、かかるペプチドをコードする核酸の対応する断片から組換え的に産生されるペプチドをスクリーニングすることにより得ることができる。さらに、断片は、従来のMerrifield固相f-mocまたはt-Boc化学のような当該技術にて既知の技法を用いて化学的に合成することができる。例えば、本発明のポリペプチドは、断片の重複のない所望の長さの断片に随意に分割、または好ましくは所望の長さの重複断片に分割することができる。断片は、産生され(組換え的に、または化学合成により)、試験して、野生型(例えば、「標品」)タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストとして機能することができるペプチジル断片を同定することができる。

【0187】本発明の別の態様は、対象タンパク質の組換え体に関する。上述するように、自然タンパク質のほかに、本発明による好ましい組換えポリペプチドは、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列によってコードされるアミノ酸配列に、少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約80%、さらに好ましくは約85%、よりいっそう好ましくは約90%、さらにいっそう好ましくは約95%同一である核酸によりコードされる。配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列と少なくとも約98~99%同一である核酸によりコードされるポリペプチドもまた、本発明の範囲内である。また、かかるタンパク質の少なくとも一部を含むペプチド断片もまた、本発明に含まれる。

【0188】好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、哺乳動物ポリペプチド、さらに好ましくはヒトポリペプチドである。特に好ましい実施形態では、ポリペプチドは野生型生物活性を保持する。ある翻訳後修飾(例えば、リン酸化等)は、非修飾ポリペプチド鎖に比較して、ポリペプチドの見かけの分子量を増加させることができることを理解されたい。好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号2、4、6、または8の配列を有する。

【0189】本発明はさらに、対象ポリペプチドのうちの1つの組換え体に関する。かかる組換えポリペプチド

は、好ましくは、添付の配列表の野生型（「標品」）ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性のアンタゴニストまたはアゴニストとして機能できるものである。タンパク質のアミノ酸配列に関して「に進化的に関する」という用語は、天然に存在しているアミノ酸配列を有するポリペプチド、および例えばコンビナトリアル突然変異誘発により得られるヒトポリペプチドの変異性変異体の両方を指す。

【0190】一般に、タンパク質の活性（例えば、「生物活性」である）を有する、本明細書中に記載のポリペプチドは、配列番号2、4、6、または8のアミノ酸配列を含み、かつ天然に存在するタンパク質の生物学的/生化学的活性のすべてまたは一部に類似するか、または模倣するポリペプチドと定義される。本発明によれば、ポリペプチドは、タンパク質の天然に存在する形態の特異的アゴニストまたはアンタゴニストである場合に、生物学的活性を有する。

【0191】化合物、例えばタンパク質またはその変異体が、1つ以上の上記の生物学的活性を有するかどうかを確定するためのアッセイは、当該技術において周知である。ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、上記に概略したような活性を有する。

【0192】別の実施形態では、ポリペプチドをコードする配列は、異なるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む融合遺伝子の一部として組み込むことができる。この型の発現系は、ポリペプチドの免疫原性断片を産生するのが望ましい条件下にて有用である（例えば、欧州特許公報第0259149号、ならびにEvanse et al. (1989) Nature 339:385、Huang et al. (1988) J. Virol. 62:3855、およびSchlienger et al., (1992) J. Virol. 66:2を参照）。免疫原性を高めるために融合タンパク質を利用することに加えて、融合タンパク質はまた、タンパク質の発現を促進することができ、および、したがって本発明のポリペプチドの発現に用いることができることは広く認識されている（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. (N.Y. John Wiley & Sons, 1991)を参照）。別の実施形態では、精製リーダー配列、例えば組換えタンパク質の所望の部分のN末端でのポリ(His)/エンテロキナーゼ切断部位配列などをコードする融合遺伝子は、Ni<sup>2+</sup>金属樹脂を用いたアフィニティクロマトグラフィにより、発現融合タンパク質の精製を可能とさせる。次に、精製リーダー配列は、続いてエンテロキナーゼで処理することにより除去され、精製タンパク質を提供し得る（例えば、Hochuli et al. (1987) J. Chromatography 411:177、およびJanknecht et al. PNAS 88:8972を参照）。

【0193】融合遺伝子を作製する技法は、当業者に既知である。本質的に、種々のポリペプチド配列をコードする種々のDNA断片の連結は、連結用平滑末端または

ねじれ型末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化か、適切な付着末端の充填(filling-in)、望ましくない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を用いて、従来の技法に従って行なわれる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来の技法により合成できる。また、核酸断片のPCR増幅は、2つの連続核酸断片間の相補的オーバーハングをもたらずアンカープライマーを用いて実行することができ、続いて2つの連続核酸断片をアニールして、キメラ核酸配列を生成することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons:1992を参照）。

【0194】本発明はさらに、対象ポリペプチドを産生する方法に関する。例えば、対象ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を誘導する核酸ベクターでトランスフェクトした宿主細胞を、ペプチドを発現させるのに適切な条件下にて培養することができる。細胞培養のための適切な培地は、当該技術にて周知である。イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、およびかかるペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性精製を含むタンパク質精製のための当該技術で既知の技法を用いて、組換えポリペプチドを細胞培養培地、宿主細胞、またはその両方から単離することができる。好ましい実施形態では、組換えポリペプチドは、GST融合タンパク質のような、精製を容易にするドメインを含有する融合タンパク質である。

【0195】さらに、ある状況においては、天然に存在する形態のタンパク質の生物活性のサブセットのみを促進または抑制するために、アゴニスト（擬似体）またはアンタゴニストのうちの1つとして限定された能力にて機能する対象ポリペプチドのうちの1つの同族体を提供することは有利であり得ることが一般的に理解されよう。したがって、特定の生物学的効果は、限定された機能を有する同族体で処理することにより、天然に存在する形態の対象タンパク質の生物活性のすべてを対象にするアゴニストまたはアンタゴニストでの処理に比較して少ない副作用で誘発できる。

【0196】対象ポリペプチドの各々の同族体は、別個の点突然変異（複数可）による、または切断によるような突然変異誘発により生成される。例えば、突然変異は、ポリペプチドから得られるポリペプチドの生物活性と実質的に同じもの、または単にそのサブセットを保持する同族体を生じさせる。あるいは、受容体に競合的結合によるような、天然に存在する形態のタンパク質の機能を抑制することが可能なアンタゴニスト形態のポリペプチドを生成することができる。

【0197】本発明の組換えポリペプチドはまた、例えばコピキチン結合またはタンパク質に関連する他の酵素的ターゲティングを改変する突然変異に起因して、タン

パク質分解性切断に耐性であるタンパク質型のような野生型タンパク質の同族体を含む。

【0198】ポリペプチドはまた、化学的に修飾して、グリコシル基、脂質、ホスフェート、アセチルル基等のような他の化学部分との共有結合体または凝集結合体を形成することにより、誘導体を創出できる。タンパク質の共有結合誘導体は、タンパク質のアミノ酸側鎖上の、またはポリペプチドのN末端もしくはC末端にある官能基に、化学的部分を結合することにより調製することができる。

【0199】対象ポリペプチドの構造の修飾は、治療的または予防的効率、安定性（例えば、*ex vivo*での貯蔵安定性およびタンパク質分解性分解に対する耐性）、または翻訳後修飾（例えば、タンパク質のリン酸化パターンを改変するため）を高めるような目的で行うことができる。かかる修飾ペプチドは、天然に存在する形態のタンパク質の少なくとも1つの活性を保持するように、あるいはその特異的アンタゴニストを産生するように設計されると、本明細書中でより詳述するポリペプチドの機能的均等物とみなされる。かかる修飾ペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失、または付加により産生され得る。置換的変異体は、置換保存アミノ酸または置換非保存アミノ酸であってもよい。

【0200】例えば、イソロイシンまたはバリンでのロイシンの、グルタミン酸でのアスパラギン酸の、セリンでのトレオニンの単離置換、または構造的に関連したアミノ酸でのアミノ酸の類似の置換（すなわち、等配電子および/または等電位突然変異）は、得られる分子の生物学的活性に大きな影響を与えないであろうと予期することは合理的である。保存的置換は、側鎖に関連するアミノ酸ファミリー内に起こるものである。遺伝的にコードされるアミノ酸は、4つのファミリー：（1）酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸、（2）塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン、（3）無極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、および（4）非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンに分けることができる。同様の様式で、アミノ酸レパートリーは、（1）酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸、（2）塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン、（3）脂肪族=グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン（ただし、セリンおよびトレオニンは任意に、脂肪族ヒドロキシルとして別に分類される）、（4）芳香族=フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、（5）アミド=アスパラギン、グルタミン、および（6）硫黄含有=システインおよびメチオニンとして分類することができる（例えば、*Biochemistry*, 2 ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman and Co.: 1981）。ペプチドのアミノ酸配列の変化

が、機能的同族体（例えば、得られたポリペプチドが野生型形態に類似するか、または拮抗するという意味で機能性）を生じる結果となるかどうかは、野生型タンパク質に類似する様式で細胞における応答を生じる能力またはかかる応答を競合的に抑制する変異体ペプチドの能力を評価することにより容易に決定することができる。

【0201】1つ以上の置換が起こったポリペプチドは、同様の方法にて容易に試験することができる。変異体は、タンパク質の特定領域の生物学的活性を保持するように設計することができる。非限定的な例では、Osawa et al., 1994, *Biochemistry and Molecular International* 34:1003-1009は、数種の異なる種からのタンパク質のアクチン結合領域について議論している。これらの種のアクチン結合領域は、それらが「同族残基群」の範囲内にあるアミノ酸を有するという事実に基づいて、同族体とみなされる。同族残基は、（一文字アミノ酸記号表示を用いた）以下の群：STAG、ILVMF、HRK、DEQNおよびFYWにより判断される。例えば、S、T、AまたはGは、ある位置にあり得て、機能（この場合アクチン結合）は保持される。

【0202】アミノ酸置換に関するさらなる案内は、タンパク質進化の研究を利用できる。Go et al., 1980, *Int. J. Peptide Protein Res.* 15: 211-224は、接近し易さ(*accessibility*)によって内部または外側としてアミノ酸残基部位を類別した。外側部位に関するより頻繁な置換は、それらの生物機能および、補欠分子族の存在または非存在に関係なく、同族タンパク質ファミリーの8セットにおいて一般的であることが確認された。実際上すべての型のアミノ酸残基は、内部におけるよりも外側上にてより高い変異性を有していた。変異性および極性間の相関関係は、それぞれ内部および外側におけるアミノ酸残基にて観察されなかった。アミノ酸残基は、その極性に依存して、3つの群のうちの1つに類別された：極性(Arg, Lys, His, Gln, Asn, Asp, およびGlu)、弱い極性(Ala, Pro, Gly, Thr, およびSer)、および非極性(Cys, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Tyr, およびTrp)。タンパク質進化中のアミノ酸置換は、非常に保存的であり、それぞれ内部または外側におけるそれらの88%または76%は、3つのうちの同じ群内にあった。群間の置換は、弱い極性残基が、内部における非極性残基によってより頻繁に、かつ外側上の極性残基によってより頻繁に置換されるようなものである。

【0203】Querol et al., 1996, *Prot. Eng.* 9:265-271は、タンパク質の熱安定性を高めるためのアミノ酸置換に関する一般則を提供する。新たなグリコシル化部位は、Olsen and Thomsen, 1991, *J. Gen. Microbiol.* 137:579-585にて論じられるように導入することができる。ジスルフィド架橋の付加は、Perry and Wetzel, 198

4, Science 226:555-557, Pantoliano et al., 1987, Biochemistry 26:2077-2082, Matsumura et al., 1989, Nature 342:291-293, Nishikawa et al., 1990, Protein Eng. 3:443-448, Takagi et al., 1990, J. Biol. Chem., 265:6874-6878, Clarke et al., 1993, Biochemistry 32:4322-4329, およびWakarchuk et al., 1994, Protein Eng. 7:1379-1386により論じられるように導入することができる。

【0204】金属結合部位の付加は、Toma et al., 1991, Biochemistry 30:97-106, およびHaezrebrouck et al., 1993, Protein Eng. 6:643-649にしたがって導入することができる。ループにおけるプロリンによる置換は、Masul et al., 1994, Appl. Env. Microbiol. 60:3579-3584, およびHardy et al., FEBS Lett. 317:89-92にしたがって行われ得る。

【0205】システイン欠失突然変異タンパク質は、本発明の範囲内にある変異体とみなされる。これらの変異体は、システインを他のアミノ酸で置換する方法、および置換の生物学的活性および効果を測定する方法を開示する米国特許第4,959,314号に開示される方法にしたがって構築することができる。かかる方法は、かかる置換(例えば、ジスルフィド結合形成を除去するための)に適切なシステイン残基を有する本発明のタンパク質に適している。

【0206】核酸と相関する遺伝子の同一性および機能を知るために、核酸または対応するアミノ酸配列を、タンパク質ファミリーのプロフィールに対してスクリーニングすることができる。かかるプロフィールは、各ファミリーのタンパク質間の共通する構造モチーフに焦点を置く。公的に利用可能なプロフィールは、上記に記載している。追加する、または代替のプロフィールは、以下に記載する。

【0207】新規な核酸を既知の配列と比較する際、いくつかの整列ツールが利用できる。例として、複数配列整列を創出するPileUpが挙げられ、これはFeng et al., J. Mol. Evol. (1987) 25:351-360に記載されている。別の方法のGAPは、Needleman et al., J. Mol. Biol. (1970) 48:443-453の整列方法を使用する、GAPは、配列の包括的な整列に最適である。第3の方法であるBestFitは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489のローカルホモロジーアルゴリズムを用いて、マッチ数を最大にするようにギャップを挿入することにより機能する。

【0208】かかるプロフィールの例を以下に示す。

#### 【0209】ケモカイン

ケモカインは、リンパ球輸送、炎症性疾患、血管新生、血球新生およびウイルス感染に関与しているタンパク質ファミリーである。例えば、Rollins, Blood (1997) 90(3):909-928, およびWells et al., J. Leuk. Biol. (1997) 61:545-550を参照されたい。米国特許第5,60

5,817号は、胎児脾臓にて発現されるケモカインをコードするDNAを開示している。米国特許第5,656,724号は、ケモカイン様タンパク質および使用方法を開示している。米国特許第5,620,008号は、肝臓により発現されるケモカインをコードするDNAを開示している。

【0210】コードされるケモカインの突然変異体は、未変性ケモカインと比較して、少なくとも1つのアミノ酸の置換、付加、または欠失のあるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。断片は、未変性ケモカインと同じアミノ酸配列を保有し、突然変異体は、アミノおよび/またはカルボキシル末端配列を欠如していることがある。融合は、突然変異体、断片、またはアミノおよび/またはカルボキシル末端アミノ酸伸長をも含む未変性ケモカインである。

【0211】アミノ酸変化の数および型は、重大でなく、かつ、アミノ酸欠失、あるいは未変性ケモカインアミノ酸配列に比較してケモカイン中に組み込まれるアミノ酸伸長の長さまたは数も重大ではない。これらの変異体ポリペプチドのうちの1つをコードするポリヌクレオチドは、少なくとも1つの既知のケモカインと少なくとも約80%のアミノ酸同一性を保持するであろう。好ましくは、これらのポリペプチドは、少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、さらに好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を保持するであろう。さらに、変異体は、未変性ケモカインにより示される少なくとも1つの活性の、少なくとも80%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%を示すであろう。ケモカイン活性としては、未変性ケモカインの免疫学的機能、生物学的機能、受容体結合機能、およびシグナル伝達機能が挙げられる。

#### 【0212】走化性

好中球に関する走化性のためのアッセイは、Walz et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1987) 149:755, Yoshimura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1987) 84:9233, およびSchroder et al., J. Immunol. (1987) 139:3474に、リンパ球に関する走化性のためのアッセイは、Larsen et al., Science (1989) 243:1464, Carr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1994) 91:3652に、腫瘍浸潤性リンパ球に関する走化性のためのアッセイは、Liao et al., J. Exp. Med. (1995) 182:1301に、造血前駆体に関する走化性のためのアッセイは、Aiuti et al., J. Exp. Med. (1997) 185:111に、単球に関する走化性のためのアッセイは、Valente et al., Biochem. (1988) 27:4162に、ナチュラルキラー細胞に関する走化性のためのアッセイは、Loetscher et al., J. Immunol. (1996) 156:322およびAllavena et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:3233に記載されている。

【0213】好酸球を誘引する生物活性を測定するため

のアッセイは、Dahinden et al., J. Exp. Med. (1994) 179:751、Weber et al., J. Immunol. (1995) 154:416、およびNoso et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 200:1470に、樹状細胞を誘引するための生物活性を測定するためのアッセイは、Sozzani et al., J. Immunol. (1995) 155:3292に、好塩基球を誘引するための生物活性を測定するためのアッセイは、Dahinden et al., J. Exp. Med. (1994) 179:751、Alam et al., J. Immunol. (1994) 152:1298、Alam et al., J. Exp. Med. (1992) 176:781に、好中球を活性化するための生物活性を測定するためのアッセイは、Maghazaci et al., Eur. J. Immunol. (1996) 26:315、およびTaub et al., J. Immunol. (1995) 155:3877に記載される。未変性ケモカインは、繊維芽細胞のための分裂促進因子として作用することができ、Mullenbach et al., J. Biol. Chem. (1986) 261:719に記載されるようにアッセイされる。

#### 【0214】受容体結合

未変性ケモカインは、多数の受容体との結合活性を示す。かかる受容体および結合を検出するためのアッセイ 20の説明は、例えば、Murphy et al., Science (1991) 253:1280、Combadiere et al., J. Biol. Chem. (1995) 270:29671、Daugherty et al., J. Exp. Med. (1996) 183:2349、Samson et al., Biochem. (1996)35:3362、Rapport et al., J. Biol. Chem. (1996) 271:17161、Combadiere et al., J. Leukoc. Biol. (1996) 60:147、Baba et al., J. Biol. Chem. (1997)23:14893、Yosida et al., J. Biol. Chem. (1997) 272: 13803、Arvanitakis et al., Nature (1997) 385:347に記載され、多くの他のアッセイが当該技術にて既知である。

#### 【0215】キナーゼ活性化

キナーゼ活性化のためのアッセイは、Yen et al., J. Leukoc. Biol. (1997)61:529、Dubois et al., J. Immunol. (1996) 156:1356、Turner et al., J. Immunol. (1995) 155:2437により記載される。血管新生または細胞増殖の抑制のためのアッセイは、Malone et al., Science (1990) 247:77に記載される。グリコサミノグリカン生産は、未変性ケモカインによって誘発することができ、Castoret al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1983) 80:765に記載されるようにアッセイされる。好塩基 40球からのケモカイン媒介性ヒスタミン放出は、Dahinden et al., J. Exp. Med. (1989) 170:1787、およびWhite et al., Immunol. Lett. (1989) 22:151に記載されるようにアッセイされる。ヘパリン結合は、Luster et al., J. Exp. Med. (1995) 182:219に記載される。

#### 【0216】二量体化活性

ケモカインは、二量体化活性を有することができ、それはBurrows et al., Biochem (1994) 33 12741、およびZhang et al., Mol. Cell. Biol. (1995) 15:4851に従ってアッセイされる。未変性ケモカインは、ウイルスの炎症 50

性応答の役割を果たすことができる。この活性は、Bleul et al., Nature (1996) 382:829、およびOberlin et al., Nature (1996) 382:833に記載されるようにアッセイすることができる。単球のエキソサイトーシスは、未変性ケモカインによって促進することができる。かかる活性のためのアッセイは、Ugucioni et al., Eur. J. Immunol. (1995) 25:64に記載されている。未変性ケモカインはまた、造血幹細胞増殖を抑制することができる。かかる活性を試験する方法は、Graham et al., Nature (1990) 344:442に報告されている。

【0217】デスドメイン(death domain)タンパク質いくつかのタンパク質ファミリーは、デスドメインモチーフを含有する(Feinstein and Kimchi, TIBS Letters (1995) 20:242-244)。いくつかのデスドメイン含有タンパク質は、細胞障害性細胞内シグナル伝達に關与する(Cleveland and Ihle, Cell (1995) 81:479-482, Pan et al., Science (1997) 276:111-113, Duan and Dixit, Nature (1997) 385:86-89、およびChinnaiyan et al., Science (1996) 274:990-992)。米国特許第5, 563, 039号は、TRADD (腫瘍壊死因子受容体 - 1 関連デスドメイン含有タンパク質) と相同のタンパク質、および該タンパク質の機能的特徴を保持する、TRADDの活性ドメインの修飾、ならびにかかるデスドメインを含有するタンパク質の機能を試験するためのアポトーシスアッセイについて記載している。米国特許第5, 658, 883号は、生物学的に活性なTGF - B1ペプチドを開示する。米国特許第5, 674, 734号は、C末端デスドメインおよびN末端キナーゼドメインを含有するタンパク質RIPを開示する。

#### 【0218】白血球抑制因子(LIF)

LIFプロフィールは、CT - I (カルジオトロフィン - 1)、CNTF (毛様体神経栄養因子)、OSM (オンコスタチンM)、およびIL - 6 (インターロイキン - 6) の白血球抑制因子の配列から構築される。このプロフィールは、肝細胞、破骨細胞、神経細胞および心臓単球を含む多くの細胞型に多面発現効果がある分泌サイトカインのファミリーを包含し、かかるタンパク質をコードする付加的された遺伝子を検出するのに使用することができる。これらの分子は、すべて構造的に關連しており、srcのような細胞質チロシンキナーゼによる細胞内シグナル伝達を媒介する共通補助受容体gp130を共有する。

【0219】このファミリーに關連する新規タンパク質はまた、分泌されて、gp130を活性化し、様々な細胞型の発達において機能するようである。したがって、このファミリーの新規成員は、それらが刺激する細胞型の成長または生存因子として開発されるべき候補物であろう。このサイトカインのファミリーに關するより詳細については、Pennica et al., Cytokine and Growth Factor Reviews (1996)7:81-91を参照されたい。米国特許

第5, 420, 247号は、L I F受容体および融合タンパク質を開示する。米国特許第5, 443, 825号は、ヒトL I Pを開示する。

#### 【0220】アンジオポイエチン

アンジオポイエチン-1は、T I E - 2チロシンキナーゼの分泌リガンドであり、それは、正常血管発達に重要な血管新生因子として機能する。アンジオポイエチン-2は、アンジオポイエチン-1の天然アンタゴニストであり、したがって、抗血管新生因子として機能する。これらの2つのタンパク質は、構造的に類似しており、同じ受容体を活性化する(Folkman and D'Amore, Cell (1996) 87:1153-1155, and Davis et al., Cell (1996) 87:1161-1169)。

【0221】アンジオポイエチン分子は、2つのドメイン：コイルドコイル領域およびフィブリノーゲン関連領域から構成される。フィブリノーゲンドメインは、フィコリンおよびテネイシンを含む多くの分子中に見られ、多くの成員とともに構造的に十分規定されている。

#### 【0222】受容体タンパク質 - チロシンキナーゼ

受容体タンパク質 - チロシンキナーゼまたはR P T K は、Lindberg. Annu. Rev. Cell Biol. (1994) 10:251-337に記載されている。

#### 【0223】成長因子：上皮細胞成長因子(E G F)および線維芽細胞成長因子(F G F)

成長因子スーパーファミリーの議論に関しては、Growth Factors: A Practical Approach. Appendix A1 (Ed. M cKay and Leigh, Oxford University Press, NY, 1993) pp.237-243を参照されたい。

【0224】E G FおよびF G Fに関する整列(p r e t t y b o x)を、それぞれ図1および図2に示す。米国特許第4, 444, 760号は、酸性脳線維芽細胞成長因子を開示し、それは、細胞分裂および創傷治癒の促進にて活性である。米国特許第5, 439, 818号は、ヒト組換え塩基性線維芽細胞成長因子をコードするD N Aを開示し、それは創傷治癒にて活性である。米国特許第5, 604, 293号は、組換えヒト塩基性線維芽細胞成長因子を開示し、それは創傷治癒に有用である。米国特許第5, 410, 832号は、脳由来の組換え酸性線維芽細胞成長因子を開示し、それは培養にて中胚葉および神経外胚葉由来細胞のための分裂促進因子として作用し、軟部組織、軟骨組織および筋骨格組織において創傷治癒を促進する。米国特許第5, 387, 673号は、活性を保持するF G Fの生物学的に活性な断片を開示する。

#### 【0225】T N Fファミリーのタンパク質

T N Fファミリーから得られるプロフィールは、以下のT N Fファミリー成員：神経成長因子(N G F)、リンホトキシン、F a sリガンド、腫瘍壊死因子(T N F)、C D 4 0リガンド、T R A I L、o x 4 0リガンド、4 - I B Bリガンド、C D 2 7リガンド、およびC

D 3 0 - リガンドの配列を整列することにより作り出される。このプロフィールは、このファミリーのタンパク質の新たな成員または同族体を構成するタンパク質の配列を同定するように設計されている。

【0226】米国特許第5, 606, 023号は、突然変異体T N Fタンパク質を開示しており、米国特許第5, 597, 899号および米国特許第5, 486, 463号は、T N F突然変異タンパク質を開示しており、米国特許第5, 652, 353号は、T N F突然変異タンパク質をコードするD N Aを開示している。

【0227】T N Fファミリーのタンパク質の成員は、Burrows et al., Biochem. (1994)33: 12741、およびZhang et al., Mol. Cell. Biol. (1995) 154851に記載されるように多量体化することがi n v i t r oでわかっており、またBrowning et al., J. Immunol. (1994) 147:1230. Androlewicz et al., J. Biol. Chem. (1992) 267: 2542、およびCrowe et al., Science (1994) 264:707に記載されるように受容体を結合することがわかっている。

【0228】i n v i v oで、T N Fは、Kriegel et al., Cell (1988) 53:45、およびMohler et al., Nature (1994) 370:218に記載されるように、標的タンパク質をタンパク分解的に切断し、細胞増殖および分化活性を明示する。T細胞または胸腺細胞増殖は、Armitage et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22:447、Current Protocols in Immunology, ed. J.E. Coligan et al., 3.1-3.19、Takai et al., J. Immunol. (1986) 137:3494-3500、Bertagnoli et al., J. Immunol. (1990)145:1706-1712、Bertagnoli et al., J. Immunol. (1991) 133:327-340、Bertagnoli et al., J. Immunol. (1992) 149:3778-3783、およびBowman et al., J. Immunol. (1994) 152:1756-1761に記載されるようにアッセイされる。B細胞増殖およびI g分泌は、Maliszewski, J. Immunol. (1990) 144:3028-3033、およびAssays for B cell Function: In vitro antibody production, Mond and Brunswick, Current Protocols in Immunol., Coligan Ed vol 1 pp 3.8.1-3.8.16、John Wiley and Sons, Tronto 1994、Kebrl et al., Science (1987) 238:1144、およびBoussiotis et al., PNAS USA (1994) 91:7007に記載されるようにアッセイされる。

【0229】他のi n v i v o活性としては、Barrett et al., J. Immunol. (1991) 146:1722、Bjorck et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23:1771、Clark et al., Annu Rev. Immunol. (1991) 9:97、Ranheim et al., J. Exp. Med. (1994) 177:925、Yellin, J. Immunol. (1994) 153:666、およびGruss et al., Blood (1994) 84:2305に記載されるように、細胞表面抗原のアップレギュレーション、共刺激分子のアップレギュレーション、および細胞集合/接着が挙げられる。

【0230】造血細胞およびリンパ球新生細胞の増殖お

よび分化はまた、Johansson et al., Cellular Biology (1995) 15:141-151、Keller et al., Mol. Cell. Biol. (1993) 13:473-486、McClanahan et al., Blood (1993) 81: 2903-2915に記載されるように、胚の分化および造血のためのアッセイを用いて、およびCulture of Hematopoietic Cells, Freshney et al. eds, pp 1-21, 23-29, 139-162, 163-179, and 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, NY, 1994, およびHirajama et al., PNAS USA (1992) 89:5907-5911に記載されるように、幹細胞生存および分化を検出するためのアッセイを用いて、TNFに関してin vivoにて示されている。

【0231】TNFのin vivo活性としてはまた、リンパ球生存およびアポトーシスが挙げられ、Darzynkiewicz et al., Cytometry (1992) 13:795-808、Gorczyca et al., Leukemia (1993) 7:659-670、Itoh et al., Cell (1991) 66:233-243、Zacharduk, J. Immunol. (1990) 145:4037-4045、Zamai et al., Cytometry (1993) 14:891-897、およびGorczyca et al., Int'l Oncol. (1992) 1:639-648に記載されるようにアッセイされる。

【0232】TNFファミリーのいくつかの成員は、細胞表面から切断され、他の成員は膜に結合された状態のままである。TNFの三次元構造は、上述のSprang and Eck, Tumor Necrosis Factorsにて議論されている。

【0233】TNFタンパク質は、膜貫通ドメインを含む。このタンパク質は、Kriegler et al., Cell (1988) 53:45-53、Perez et al., Cell (1990) 63:251-258、およびShaw et al., Cell (1986) 46:659-667に記載されるように、より短い可溶型に切断される。TNFのヒト形態において、膜貫通ドメインは、アミノ酸46~77間にあり、細胞質ドメインは、位置1~45間にある。TNFの三次元モチーフは、2つのプリーツの付いたシートサンドイッチを含む。各シートは、逆平行ストランドから構成され、サンドイッチの反対部位にて互いに面している。ストランドは、Van Ostade et al., Protein Engineering (1994) 7(1):5-22、および上述のSprang et al., Tumor Necrosis Factorsに記載されるように、短いポリペプチドループで結合される。

【0234】シート二次構造に関与するTNFファミリータンパク質の残基は、上述のVan Ostade et al., Protein Engineering (1994) 7(1):5-22、およびSprang et al., Tumor Necrosis Factorsに記載されるように同定された。

【0235】TNF受容体は、米国特許第5,395,760号に開示されている。TNF受容体ファミリーから得られるプロフィールは、Apo1/Fas、TNFRIおよびII、デス受容体<sup>3</sup>(DR3)、CD40、ox40、CD27、およびCD30を含むTNF受容体ファミリーの配列を整理することにより創出される。したがって、このプロフィールは、本発明の核酸から、このタンパク質のファミリーの新たな成員または同族体

を構成するタンパク質配列を同定するように設計される。

【0236】腫瘍壊死因子受容体は、ヒトにて2つの形態：p55TNFRおよびp75TNFRにて存在し、その両方が、リガンドと結合すると細胞内シグナルを提供する。これらの受容体タンパク質の細胞外ドメインは、システインリッチである。受容体のいくつかの形態は切断されて可溶性受容体を形成するが、受容体は、膜に結合された状態のままであり得る。可溶性TNF受容体の調節、診断的価値、予後的価値および治療的価値は、Aderka, Cytokine and Growth Factor Reviews, (1996) 7(3):231-240にて検討されている。

【0237】PDGFファミリー

米国特許第5,326,695号は、血小板由来成長因子アゴニストを開示し、PDGF-Bの生物活性部分はアゴニストとして使用される。米国特許第4,845,075号は、生物学的に活性なB鎖ホモ二量体を開示し、PDGF-B鎖の変異体および誘導体をも含む。米国特許第5,128,321号は、PDGF類縁体および使用方法を開示している。PDGFと同じ生物活性を有するタンパク質が開示されていて、A鎖およびB鎖タンパク質を含む。

【0238】キナーゼ(MKKを含む)ファミリー

米国特許第5,650,501号は、有糸分裂および減数分裂細胞分裂に関連して、セリン/トレオニンキナーゼを開示し、このタンパク質は、そのN末端にキナーゼドメインを、C末端に3PEST領域を有する。米国特許第5,605,825号は、ヒトPAK65、セリンタンパク質キナーゼを開示している。

【0239】先述の検討から、本発明の核酸と比較され得るタンパク質プロフィールの数例が提供される。当業者は、核酸と相関する遺伝子を同定するために、これらおよび他のタンパク質プロフィールを使用することができる。

【0240】IX コード発現産物の機能の測定

リボザイム、アンチセンス構築物、優性ネガティブ突然変異体、および三重鎖形成を用いて、核酸関連遺伝子の発現産物の機能を測定することができる。

【0241】A. リボザイム

トランス切断触媒RNA(リボザイム)は、エンドリボヌクレアーゼ活性を有するRNA分子である。リボザイムは、特定の標的に関して特異的に設計され、標的メッセージは、特異的ヌクレオチド配列を含有しなくてはならない。それらは、細胞RNAの基礎環境にて、部位特異的にいかなるRNA種をも切断するように操作される。切断事象は、mRNAを不安定にし、タンパク質発現を防止する。重要なことは、リボザイムは、in vitroまたはin vivoの状況にて、表現型の影響を検出することにより、その機能を確定する目的で、未知の機能を有する遺伝子の発現を抑制するのに用いることができる。

【0242】1つの一般的に用いられるリボザイムモチーフは、ハンマーヘッドであり、それに関しては、基質配列要件は、最小である。ハンマーヘッドリボザイムの設計は、Usman et al., *Current Opin. Struct. Biol.* (1996) 6:527-533に開示されている。Usmanはまた、リボザイムの治療的使用も検討している。リボザイムはまた、Long et al., *FASEB J.* (1993) 7:25、Symons, *An. Rev. Biochem.* (1992) 61:641、Perrotta et al., *Biochem.* (1992) 31:16-17、Ojwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1992) 89:10802-10806、および米国特許第5,254,678号に記載されるように調製および使用することができる。HIV-IRNAのリボザイム切断は、米国特許第5,144,019号に記載され、リボザイムを用いたRNAの切断方法は、米国特許第5,116,742号に記載され、リボザイムの特異性を増加させる方法は、米国特許第5,225,337号、およびKoizumi et al., *Nucleic Acid Res.* (1989) 17:7059-7071に記載されている。ハンマーヘッド構造におけるリボザイム断片の調製および使用もまた、Koizumi et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17:7059-7071により記載されている。ヘアピン構造におけるリボザイム断片の調製および使用は、Chowrira and Burke, *Nucleic Acids Res.* (1992) 20:2835に記載されている。リボザイムはまた、Daubendiek and Kool, *Nat. Biotechnol.* (1997) 15(3):273-277に記載されるように転写を作用する(roll)ことにより作製され得る。

【0243】リボザイムのハイブリダイズ領域は、Horn and Urdea, *Nucleic Acids Res.* (1989) 17:6959-67に記載されるように、分岐構造として修飾または調製することができる。リボザイムの基本構造はまた、当業者に公知の方法にて化学的に改変してもよく、化学的に合成されたリボザイムは、単量体ユニットで修飾された合成オリゴヌクレオチド誘導体として投与することができる。治療の場合には、Birikh et al., *Eur. J. Biochem.* (1997) 245:1-16に記載されるように、リボザイムのリボソーム媒介性送達は、細胞取り込みを改良する。

【0244】本発明の核酸配列および当該技術にて既知の方法を用いて、リボザイムは、相当するmRNA種を特異的に結合して切断するよう設計される。したがって、リボザイムは、開示する核酸またはそれらの完全長遺伝子によりコードされるタンパク質のいずれかの発現を抑制するための手段を提供する。特異的抑制リボザイムを設計および使用するために、完全長遺伝子は既知である必要はない。未知の機能の核酸またはcDNAの場合には、そのヌクレオチド配列に相当するリボザイムは、標的転写物を切断する際の効力に関して、*in vitro*にて試験することができる。*In vitro*にて切断させるリボザイムは、さらに*in vivo*にて試験される。リボザイムはまた、Birikh et al., *Eur. J. Biochem.* (1997) 245:1-16に記載されるように、疾患用動物モデルを生成

するのに使用することができる。有効なリボザイムを用いて、遺伝子の転写を妨害し、細胞における変化を検出することにより、所定の遺伝子の機能を確定する。遺伝子が疾患における媒介物質であることが見出されている場合、有効なリボザイムは、遺伝子の転写および発現を妨害するための遺伝子治療にて、設計および送達される。

【0245】リボザイムの治療的および機能ゲノム適用は、抑制されるべき遺伝子のコード配列の一部を知ることから始まって進行する。したがって、多くの遺伝子に関して、部分的核酸配列は、有効リボザイムを構築するのに適した配列を提供する。標的切断部位は、標的配列にて選択され、リボザイムは、切断部位に隣接する5'および3'ヌクレオチド配列に基づいて構築される。レトロウイルスベクターは、標的コード配列のmRNAをターゲティングする単量体および多量体ハンマーヘッドリボザイムを発現するように操作する。これらの単量体および多量体リボザイムについて、標的mRNAを切断する能力を、*in vitro*にて試験する。細胞系は、リボザイムを発現するレトロウイルスベクターで安定に形質導入され、形質導入は、ノーザンブロット分析および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により確認される。細胞は、標的mRNAの不活性化に関して、疾患マーカーの発現の低減、または標的mRNAの遺伝子産物の低減のような指標により、スクリーニングされる。

#### 【0246】B. アンチセンス

アンチセンス核酸は、RNAに特異的に結合するよう設計され、DNA複製、逆転写またはメッセンジャーRNA翻訳の停止を伴って、RNA-DNAまたはRNA-RNA-ハイブリッドを形成させる。選択核酸配列に基づいたアンチセンスポリヌクレオチドは、対応する遺伝子の発現を妨げ得る。アンチセンスポリヌクレオチドは典型的に、転写された鎖としてアンチセンス核酸鎖を含有するアンチセンス構築物からの発現により、細胞内に生成される。アンチセンス核酸は、核酸関連mRNAに結合し、および/またはその翻訳を妨げるであろう。対照細胞およびアンチセンス構築物で処理した細胞の発現産物を比較して、核酸に対応する遺伝子のタンパク質産物を検出する。ルーチンな生化学的方法を用いて、タンパク質を単離して、同定する。

【0247】核酸に対応する遺伝子の機能を確定するためのアンチセンス方法の使用のための1つの本義は、アンチセンス治療学の生物学的活性である。様々な癌のアンチセンス治療は、臨床段階にあり、文献にて広く検討されている。Reedは、腫瘍におけるBcl-2遺伝子にて向けられるアンチセンス治療について(腫瘍細胞系におけるBcl-2の遺伝子移入媒介性過剰発現は、多くの型の癌薬剤に対する耐性を与える)概説した(Reed, J.C., *N.C.I.* (1997) 89:988-990)。rasのアンチセンス抑制剤の臨床開発のための潜在性は、Cowser, L.

M., *Anti-Cancer Drug Design* (1997) 12:359-371により検討されている。さらなる重要なアンチセンス標的としては、白血病(Geurtz, A.M., *Anti-Cancer Drug Design* (1997) 12:341-358)、ヒトC-refキナーゼ(Monia, B.P., *Anti-Cancer Drug Design* (1997) 12:327-339)、およびプロテインキナーゼC(McGraw et al., *Anti-Cancer Drug Design* (1997) 12:315-326)が挙げられる。

【0248】アンチセンス治療における広範な背景文献および臨床経験が与えられると、当業者は、さらなる考え得る治療として、本発明の選択核酸を使用することができる。核酸の選択範囲は、癌性細胞のゲノムの「ホットスポット」領域への結合について、核酸をまず試験することにより、絞ることができる。核酸が、「ホットスポット」に結合すると同定される場合には、相当する癌細胞におけるアンチセンス化合物として核酸を試験することが明確に正当化される。

【0249】Ogunbiyi et al., *Gastroenterology* (1997) 113(3):761-766は、結腸癌におけるオーディオロス(audio loss)の予後用途について記載し、Barks et al., *Genes, Chromosomes, and Cancer* (1997) 19(4):278-285は、悪性黒色腫にてFISHにより検出される染色体コピー数の増加について記載し、Nishizake et al., *Genes, Chromosomes, and Cancer* (1997) 19(4):267-272は、原発性乳癌およびそれらの転移における遺伝的改変、ならびに修飾比較ゲノムハイブリダイゼーションを用いた直接比較について記載し、Elo et al., *Cancer Research* (1997) 57(16):3356-3359は、16q24.1-q24.2でのヘテロ接合性の損失が、前立腺癌の転移性および攻撃的挙動に非常に関連があることを開示する。

【0250】C. 優性ネガティブ突然変異  
核酸関連遺伝子の機能を同定するための代替的方法として、優性ネガティブ突然変異は、ホモ多量体として活性化相当するタンパク質を得るために、容易に生成される。突然変異体ペプチドは、(他の対立遺伝子から作製される)野生型ポリペプチドと相互作用し、非機能性多量体を形成する。したがって、突然変異は、基質結合ドメイン、触媒ドメイン、または細胞局在化ドメインに存在する。好ましくは、突然変異体ポリペプチドは、過剰産生されるであろう。かかる効果を有する点突然変異が作製される。さらに、タンパク質の末端への様々な長さの種々ポリペプチドの融合は、優性ネガティブ突然変異体を生じさせる。優性ネガティブ突然変異体を作製するための一般的な戦略を利用できる。Herskowitz, *Nature* (1987) 329:219-222を参照されたい。かかる技法は、機能損失の突然変異を創出するために用いることで、タンパク質の機能を決定するのに有用である。

【0251】D. 三重鎖形成  
内因性遺伝子発現はまた、標的相同組換えを用いて、遺

伝子またはそのプロモーターを不活性化あるいは「ノックアウト」することにより低減させることができる(例えば、Smithies et al., 1985, *Nature* 317:230-234; Thomas & Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-512; Thompson et al., 1989 *Cell* 5:313-321(それらの各々の全体は、参照することにより本明細書に援用される)を参照)。例えば、選択可能マーカーおよび/またはネガティブ選択可能マーカーを用いて、または用いずに、突然変異体、内在性遺伝子(遺伝子のコード領域または調節領域)に相同性であるDNAに隣接される非機能性遺伝子(または完全に未関連のDNA配列)を用いて、*in vivo*にてその遺伝子を発現する細胞をトランスフェクトすることができる。標的相同組換えを介したDNA構築物の挿入は、遺伝子の不活性化という結果を生じる。

【0252】あるいは、内因性遺伝子発現は、標的遺伝子の調節領域(すなわち、遺伝子プロモーターおよび/またはエンハンサー)に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的とすることにより低減され、体内中の標的細胞における遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成することができる(一般に、Helene, C. 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6):569-84, Helene, C., et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27-396, および Maher, L.J., 1992, *Bioassays* 14(12):807-15を参照)。

【0253】転写を抑制するための三重らせん形成にて使用される核酸分子は、好ましくは、一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチドから構成される。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、フーグスティン塩基対規則により三重らせん形成を促進するはずであり、それは一般に二重鎖のうちの1つの鎖状に存在すべきプリンまたはピリミジンのいずれかのかなり大きな伸展を必要とする。ヌクレオチド配列は、ピリミジン系であってもよく、それらは得られる三重らせんの3つの関連鎖を横断してTATおよびCGCトリプレットを生じるであろう。ピリミジンに富んだ分子は、その鎖に対して平行な方向で、二重鎖の一本鎖のプリンに富んだ領域に相補的な塩基を提供する。さらに、例えばG残基の伸展を含むプリンに富んでいる核酸分子が選択されてもよい。これらの分子は、GC対に富んだDNA二重鎖内に三重らせんを形成し、そこで大部分のプリン残基は、標的鎖の一本鎖上に位置され、三重鎖にて3つの鎖を横断してCGCトリプレットを生じるであろう。

【0254】あるいは、三重らせん形成のための標的にされる潜在的配列は、「スイッチバック」と呼ばれる核酸分子を創出することにより、増加させることができる。スイッチバック分子は、二重鎖の第1の一本鎖と、次に他方の一本鎖と塩基対をなすように、5'-3'、3'-5'の交互方式で合成され、二重鎖の一本鎖上に存在するべきプリンまたはピリミジンのかなり大きい伸

展の必要性を無くす。

【0255】本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイムならびに三重らせん分子は、DNAおよびRNA分子の合成のための当該技術にて既知のあらゆる方法によって調製することができる。これらには、例えば固相ホスホラミダイト化学合成のような、オリゴデオキシリボヌクレオチドやオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する既知の技法を含む。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のin vitroおよびin vivo転写により生成される。かかるDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターのような適切なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込む多種多様のベクター中に組み込まれてもよい。あるいは、構造的またはまたは誘発的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築物は、使用するプロモーターに依存して、細胞系に安定に導入することができる。

【0256】さらに、核酸分子への様々な周知の修飾を、細胞内安定性および半減期を高める手段として導入してもよい。考え得る修飾としては、分子の5'および3'末端へのリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列の付加、あるいはオリゴデオキシリボヌクレオチドバックボーン内のホスホジエステラーゼ結合よりむしろホスホチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0257】X. 診断および予後アッセイおよび薬剤スクリーニング方法

本発明は、開示する生物マーカー、すなわち開示する核酸マーカー（配列番号1、3、5、もしくは7、またはそれらに相補的な配列、あるいは1つまたは複数の配列番号1、3、5、または7にハイブリダイズする配列）、および/またはそれらによりコードされる疾患または状態のポリペプチドマーカーを検出することにより、望ましくない細胞増殖に特徴づけられる疾患または病状が進展する危険性が、患者にあるかどうかを決める方法を提供する。

【0258】臨床用途では、ヒト組織試料は、本明細書にて同定される生物マーカーの存在および/または非存在に関してスクリーニングされ得る。かかる試料は、例えば針生検材料コア、外科的切除試料、リンパ節組織または血清を含む、組織試料、全細胞、細胞溶解産物、または単離核酸を含み得る。例えば、これらの方法は、生検材料を得ることを含み、それは低温切片化して、全細胞集団の約80%に腫瘍細胞を高めることにより任意に分取する。ある実施形態では、これらの試料から抽出される核酸は、当該技術にて周知の技法を用いて増幅することができる。検出される選択マーカーレベルを、転移性、非転移性悪性、良性または正常結腸組織試料の統計的に妥当な群と比較する。

【0259】一実施形態では、診断方法は、患者が、開示するマーカーの異常mRNAおよび/またはタンパク質レベルを有するかどうか、ノーザンブロット分析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、in situ ハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウエスタンブロットハイブリダイゼーション、または免疫組織化学などによって、決めることを含む。上記方法によれば、細胞を患者から得、開示する生物マーカー、タンパク質のそれぞれのレベルまたはmRNAレベルを測定して、健全な対象体におけるこれらのマーカーレベルと比較する。生物マーカーポリペプチドまたはmRNAレベルの異常レベルは、おそらく結腸癌のような癌を示すものである。

【0260】したがって、一態様では、本発明は、本明細書中に開示する特有の核酸マーカーに特異的なプローブおよびプライマーを提供する。したがって、核酸プローブは、配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸にハイブリダイズするのに十分な配列番号1、3、5、または7の核酸配列の領域を含む。プローブ/プライマーとしての使用に好ましい核酸分子はさらに、配列番号1、3、5、または7の配列とハイブリダイズするのに十分な配列番号1、3、5、または7の配列に実質的に相補的な核酸配列の領域を含むことができる。さらに、プローブ/プライマーとして有用な核酸配列は、少なくとも約8個のヌクレオチド長、少なくとも約12個のヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約15個のヌクレオチド、より好ましくは約25個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも40個のヌクレオチドから全部またはほぼ全部までの、マーカー核酸配列（この核酸配列は、配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列によって表される）のコード配列の一部に相補的であるコード配列のヌクレオチド配列を含む。

【0261】一実施形態では、上記方法は、核酸プローブを用いて、患者からの組織に癌性細胞の存在を確認することを含む。具体的には、上記方法は、下記：

1. 配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列によって表される核酸配列のコード配列の一部に相補的であって、かつ、結腸癌細胞のような腫瘍細胞において差次的に発現するコード配列の、少なくとも約8個のヌクレオチド長、少なくとも約12個のヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約15個のヌクレオチド、より好ましくは約25個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも40個のヌクレオチドから全部またはほぼ全部までのヌクレオチド配列を含む核酸プローブを提供することと、
2. 癌性細胞を潜在的に含む患者から組織試料を得ることと、
3. 実質的にすべてが非癌性である細胞を含有する第2の組織試料を提供することと、

4. 第1および第2の組織試料各々のRNAと、ストリ  
ンジェント条件下にて核酸プローブを接触させること  
(すなわち、ノーザンブロットまたは *in situ* ハイ  
ブリダイゼーションアッセイにおいて)と、

5. (a) 第1の組織試料のRNAとのプローブのハイ  
ブリダイゼーションの量を、(b) 第2の組織試料のR  
NAとのプローブのハイブリダイゼーションの量を比較  
することを含み、ここで第1の組織試料のRNAとの  
ハイブリダイゼーションの量を第2の組織試料のRNA  
とのハイブリダイゼーションの量と比較して、統計学的  
に有意な差異があるとき、第1の組織試料中の癌性細胞  
の存在を示す。

【0262】一態様では、上記方法は、配列番号1、  
3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列によ  
って表される所定のマーカー核酸配列から得られるプロ  
ーブとの *in situ* ハイブリダイゼーションを含む。こ  
の方法は、癌性、または前癌状態細胞、ならびに標準細  
胞を潜在的に含有する所定の型の組織試料と、標識化ハ  
イブリダイゼーションプローブを接触させることと、プ  
ローブが、同じ組織型の他の細胞を標識する程度と有意  
に異なる程度(例えば、少なくとも0.5倍分、少なく  
とも2倍分、少なくとも5倍分、少なくとも20倍分、  
または少なくとも50倍分)に所定の組織型のかなりの  
数の細胞を標識するかどうかを確認することを含む。

【0263】所定のヒト組織からの試験細胞の表現型  
が、例えば、細胞が(a)正常、あるいは(b)癌性ま  
たは前癌状態であるかどうかを確認する方法であって、  
試験細胞のmRNAを、配列番号1、3、5、または  
7、あるいはそれらに相補的な配列によって表される核  
酸配列のコード配列の一部に相補的であり、かつ、所定  
の組織型の正常細胞と比較して腫瘍細胞において差次的  
に発現される配列の少なくとも約8個のヌクレオチド  
長、好ましくは約12個、好ましくは約15個、好まし  
くは約25個、より好ましくは少なくとも40個のヌク  
レオチド長全部またはほぼ全部までの核酸プローブと接  
触させること、およびmRNAへのプローブのハイブリ  
ダイゼーションの概算量を測定することにより、その組  
織型の正常細胞のmRNAに見られる量よりも多いか、  
または少ないハイブリダイゼーションの量が、試験細胞  
が癌性または前癌状態であることを示す方法もまた本発  
明の範囲内である。

【0264】あるいは、上記診断アッセイは、マーカー  
核酸配列(この核酸配列は、配列番号1、3、5、また  
は7、あるいはそれらに相補的な配列により表される)  
によりコードされるタンパク質産物を検出するための抗  
体を用いて行うことができる。好ましくは、タンパク質  
産物は、配列番号2、4、6、または8の配列の1つ以  
上の配列を有するものである。したがって、一実施形態  
では、アッセイは、試験細胞のタンパク質を、配列番号  
1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列

により表される核酸の遺伝子産物に特異的な抗体と接触  
させること、マーカー核酸配列は、試験細胞と同じ組織  
型の正常細胞における所定の対照レベルにて発現される  
ものであること、抗体および試験細胞のタンパク質によ  
り免疫複合体形成の概算量を測定することを含み、こ  
で試験細胞のタンパク質と形成された免疫複合体の量  
が、同じ組織型の正常細胞と比較して統計学的に有意な  
差異があるとき、試験細胞が癌性または前癌状態である  
ことを示す。

【0265】別のかかる方法は、配列番号1、3、5、  
または7、あるいはそれらに相補的な配列により表され  
るマーカー核酸配列の遺伝子産物に特異的な抗体を提供  
する工程、この遺伝子産物は、同じ組織型の非癌性組織  
における遺伝子産物レベルよりも多いまたは少ないレベ  
ルで、所定の組織型(例えば、結腸組織)の癌性組織に  
存在する; 所定の組織型の組織の第1の試料を患者から  
得る工程、試料は癌性細胞を含む可能性がある; 同じ組  
織型(それは、同じ患者由来または正常対照、(例えば  
別の個体または培養細胞)由来であってもよい)の組織  
の第2の試料を得る工程、この第2の試料は、正常細胞  
を含有し、本質的に癌性細胞を含有しない; 試料中に存  
在する抗体およびマーカー核酸配列産物間で免疫複合体  
形成を可能にする条件下にて、第1および第2の試料の  
タンパク質(これは、溶解されているが分画されていない  
細胞にて、あるいはその場で部分的に精製されてもよ  
い)と、抗体を接触させる工程; 及び(a)第1の試料  
中での免疫複合体の量を、(b)第2の試料中での免疫  
複合体の量と比較する工程とを含み、ここで第1の試料  
における免疫複合体の量が第2の試料における免疫複  
合体形成の量と比較して少ないことが、統計学的に有意に  
差異あるとき、組織の第1の試料における癌性細胞の存  
在を示す。

【0266】本発明はさらに、被験体から得られる細胞  
試料が、異常量のマーカーポリペプチドを有するかどう  
かを確定する方法であって、(a)被験体から細胞試料  
を得ることと、(b)そのようにして得られた試料にお  
けるマーカーペプチドの量を定量的に測定することと、  
(c)そのようにして測定したポリペプチドの量を、既  
知の標準物質と比較して、それにより被験体から得られ  
た細胞試料が、異常量のマーカーポリペプチドを有する  
かどうかを確定することを含む方法を提供する。かかる  
マーカーポリペプチドは、免疫組織化学アッセイ、ドッ  
トブロットアッセイ、ELISA等により検出され得  
る。

【0267】イムノアッセイは、細胞試料におけるタン  
パク質レベルを定量化するのに一般的に用いられ、多く  
の他のイムノアッセイ技法は当該技術にて既知である。  
本発明は、特定のアッセイ手法に限定されず、したがっ  
て同種および異種の方法の両方を含むものである。本発  
明により実施され得る典型的なイムノアッセイとして

は、蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA)、蛍光イムノアッセイ (FIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、免疫比濁アッセイ (NIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、およびラジオイムノアッセイ (RIA) が挙げられる。指標部分、または標識基は、被験体抗体に結合することができ、アッセイ装置および適合性イムノアッセイ手法の利用可能性により多くの場合指示される様々な使用方法の要求に適合するように選択される。上述の様々なイムノアッセイを実施する際に使用されるべき一般的な技法は、当業者に既知である。

【0268】別の実施形態では、患者の生物学的液体 (例えば、血液または尿) 中のコード産物、すなわち、配列番号 1、3、5、または 7、あるいはそれらに相補的な配列によりコードされる産物のレベルは、患者の細胞におけるマーカー核酸配列の発現レベルをモニターする手段として測定することができる。かかる方法は、患者から生物学的液体試料を採取する工程、この試料 (または試料由来のタンパク質) をコードマーカーポリペプチドに特異的抗体と接触させる工程、抗体による免疫複合体形成の量を測定する工程を含み、免疫複合体形成の量は、試料中のマーカーコード産物レベルを示す。この測定は、正常個体から得た対照試料または同じ個人から予めもしくはその後得られた 1 つ以上の試料における同じ抗体による免疫複合体形成の量と比較するとき、特に有益である。

【0269】別の実施形態では、上記方法を使用して、細胞中に存在するマーカーポリペプチドの量を測定することができる。マーカーポリペプチドの量は過剰増殖疾患、例えば結腸癌の進行に相関する可能性がある。マーカーポリペプチドレベルを予測的に使用して、細胞試料が形質転換細胞であるか、または形質転換細胞になりやすい傾向であるかどうかを評価することができる。さらに、本方法を使用して、形質転換されることが知られている細胞の表現型を評価することができ、表現型決定の結果は、特定の治療的処方計画を計画する際に有用である。例えば、試料細胞中の非常に高レベルのマーカーポリペプチドは、結腸癌のような癌の強力な診断および予後マーカーである。マーカーポリペプチドレベルの観察は、例えばより強力な治療の使用に関する決断において利用することができる。

【0270】上述のように、本発明の一態様は、患者から単離される細胞に関して、マーカーポリペプチドレベルが、試料細胞にて有意に低減されるかどうかを測定するための診断アッセイに関する。「有意に低減される」という用語は、細胞が、類似組織源の正常細胞に比べて、マーカーポリペプチドの細胞量が低減している細胞の表現型を指す。例えば、細胞は、正常対照細胞よりも、約 50%、25%、10%、または 5% 少ないマーカーポリペプチドを有することがある。特に、アッセイでは、試験細胞におけるマーカーポリペプチドレベルを

評価し、好ましくは少なくとも 1 つの対照細胞、例えば正常細胞および/または既知の表現型を有する形質転換細胞にて検出されるマーカーポリペプチドと、測定レベルを比較する。

【0271】本発明に特に重要なのは、正常または異常マーカーポリペプチドレベルに関連した細胞数により測定されるように、マーカーポリペプチドレベルを定量化する能力である。次に、特定マーカーポリペプチド表現型を有する細胞の数は、患者の予後と関連するかもしれない。本発明の一実施形態では、病巣のマーカーポリペプチド表現型は、異常的に高/低レベルのマーカーポリペプチドを有することがわかっている生検材料における細胞のパーセントとして測定される。かかる発現は、免疫組織化学アッセイ、ドットプロットアッセイ、ELISA 等により検出される。

【0272】組織試料を用いる場合、免疫組織化学染色を使用して、マーカーポリペプチド表現型を有する細胞の数を測定することができる。かかる染色に関して、組織の複数ブロックを、生検材料または他の組織試料から取り出し、プロテアーゼ K またはペプシンのような薬剤を用いてタンパク質分解性加水分解に供する。ある実施形態では、試料細胞から核分画を単離し、核分画におけるマーカーポリペプチドレベルを検出するのが望ましいことがある。

【0273】組織試料は、ホルマリン、グルタルアルデヒド、メタノール等のような試薬を用いた処理により固定する。次に、マーカーポリペプチドに結合特性を有する抗体、好ましくはモノクローナル抗体とともに試料をインキュベートする。この抗体は、次の結合検出のための標識に結合される。免疫複合体形の形成に十分な時間、試料をインキュベートする。次に、抗体の結合を、この抗体に結合した標識によって検出する。抗体が標識化されていない場合は、例えば、抗マーカーポリペプチド抗体のアイソタイプに特異的な二次標識抗体を使用してもよい。使用することができる標識の例としては、放射性核種、蛍光物質、化学発光物質、酵素等が挙げられる。

【0274】酵素を用いる場合、酵素基質を試料に添加して、着色または蛍光生成物を用意することができる。結合体を使用するために適した酵素の例としては、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、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等が挙げられる。市販されていない場合、かかる抗体-酵素結合体は、当業者に既知の技法により容易に作ることができる。

【0275】一実施形態では、アッセイは、ドットプロットアッセイとして実施される。ドットプロットアッセイは、単一細胞に関連したマーカーポリペプチドの平均量を、既定の細胞数から生じる無細胞抽出物におけるマーカーポリペプチドの量と相関させることにより測定が可能になるので、組織試料が用いられる場合に特有の用

途が見出される。

【0276】同じ型の腫瘍細胞（例えば、胸部および/または結腸腫瘍細胞）は、別個の癌遺伝子の均一に増加した発現、または別個の腫瘍サプレッサー遺伝子の均一に減少した発現を示さないことがあることは、癌文献にて十分に確立されている。また、所定の型の癌細胞間でさえも所定のマーカー遺伝子の発現レベルは変化がある場合があり、単一試験よりむしろ一連の試験における信頼の必要性がさらに重要視される。したがって、一態様では、本発明は、診断試験の信頼性および/または精度を改善するために、多数の本発明のプロープを利用する一連の試験を提供する。

【0277】一実施形態では、本発明はまた、核酸プロープを組織化アレイにおけるDNAチップ上に固定する方法を提供する。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィを含む様々なプロセスにより固体支持体に結合することができる。例えば、チップは、最大250,000個のオリゴヌクレオチドを保持することができる(GeneChip, Affymetrix)。これらの核酸プロープは、配列番号1、3、5、または7により表されるマーカー核酸配列のコード配列の一部に相補的であり、かつ、結腸癌細胞のような腫瘍細胞において差次的に発現される配列の少なくとも約8個のヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約12個長、好ましくは少なくとも約15個長のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約25個長のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも約40個のヌクレオチド長から、全部またはほぼ全部までのヌクレオチド配列を含む。本発明は、単一チップ上に核酸マーカーのアレイを提供することにより、試験の信頼性が高まるので、結腸癌のような様々な癌に関して利用可能な試験に著しく有利になる。

【0278】上記方法は、生検材料を得ることを含み、それは低温切片作製して、全細胞集団の約80%に腫瘍細胞を高めることにより任意に分取する。次に、DNAまたはRNAを抽出し、増幅して、DNAチップを用いて分析し、マーカー核酸配列の存在または非存在を確認する。

【0279】一実施形態では、核酸プロープは、二次元マトリックスまたはアレイにおいて基材上にスポットすることができる。核酸試料を標識化し、続いてプロープにハイブリダイズすることができる。プロープ核酸に結合された標識試料核酸を含む二本鎖核酸は、試料の未結合部分を洗い落とせば、検出することができる。

【0280】プロープ核酸は、ガラス、ニトロセルロース等を含む基材上にスポットされ得る。プロープは、共有結合、または疎水性相互作用のような非特異的相互作用により基材に結合され得る。試料核酸は、放射性標識、フルオロフォア、発色団等を用いて標識化され得る。

【0281】アレイを構築するための技法およびこれら

のアレイを使用する方法が、欧州特許第0799897号、PCT国際公開第97/29212号、PCT国際公開第97127317号、欧州特許第0785280号、PCT国際公開97/02357号、米国特許第5,593,839号、米国特許第5,578,832号、欧州特許第0728520号、米国特許第5,599,695号、欧州特許第0721016号、米国特許第5,556,752号、PCT国際公開第95/22058号、および米国特許第5,631,734号に記載されている。

【0282】さらに、アレイは、遺伝子の差次的発現を検査するために使用することができ、また遺伝子機能を測定するために使用することができる。例えば、核酸配列のいずれかが、正常細胞および癌細胞間で差次的に発現されれば、本核酸配列のアレイを用いて測定することができる。癌細胞における特定のメッセージの高発現によって、それは対応する正常細胞においては観察されないものであり、癌特異的タンパク質の存在を示すことができる。

【0283】さらに別の実施形態では、本発明は、そのポリペプチドが配列番号2、4、6、または8である本発明のマーカーポリペプチドに対して生成する抗体パネルを用いることを意図している。かかる抗体パネルは、結腸癌に対する信頼できる診断プロープとして使用することができる。本発明のアッセイは、細胞（例えば、結腸細胞）を含有する生検材料試料を、1つまたはそれ以上のコード産物に対する抗体のパネルと接触させて、マーカーペプチドの存在または非存在を確認することを含む。

【0284】本発明の診断方法はまた、治療に対する追跡処理としてとして使用することができる。例えば、マーカーポリペプチドレベルを定量することにより、現在のまたはこれまでに用いた癌治療の有効性、ならびに患者の予後におけるこれらの治療の効果を示し得る。

【0285】したがって、本発明は、例えば細胞の腫瘍原性形質転換から生じる増殖性疾患の診断および表現型決定の助けとなるために、マーカーペプチドの獲得および/または損失を検出するために利用可能な診断アッセイおよび試薬を作製する。

【0286】上述の診断アッセイは、同様に予後アッセイとして用いるのに適合するようにすることができる。かかる適用は、腫瘍に進行における特徴的病期に起こる事象に対する本発明のアッセイの感受性を利用する。所定のマーカー遺伝子は、非常に早期の病期に、例えば、ことによると細胞が悪性に不可逆的に発達する前に、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされてもよく、一方で別のマーカー遺伝子は、もっと後期の病期にてのみ特徴的に、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされてもよい。かかる方法は、試験細胞のmRNAを、腫瘍進行の異なる段階での癌性細胞または前癌

状態細胞における異なる特徴的レベルにて発現される所定のマーカー核酸から得られる核酸プローブと接触させる工程と、細胞のmRNAへのプローブのハイブリダイゼーションの概算量を測定する工程を含み、かかる量が、細胞における遺伝子発現レベルを示し、したがって、細胞の腫瘍進行の病期を示す。または、このアッセイは、所定のマーカー核酸の遺伝子産物に特異的な抗体を用いて行い、試験細胞のタンパク質と接触させる。一連のかかる試験は、腫瘍の存在および位置を開示するだけでなく、臨床医が腫瘍の最適な治療様式を選択し、その治療の成功の見込みを予想することを可能にするであらう。

【0287】本発明の方法はまた、腫瘍の臨床経過を追跡するのに使用することができる。例えば、本発明のアッセイは、患者からの組織試料に適用することができる。すなわち、患者の癌治療の後に、別の組織試料を取り出し、試験を繰り返す。治療が成功した場合、癌性または前癌性細胞の特徴的な差次的発現を示すすべての細胞を除去することになるか、または、これら細胞における遺伝子の発現の実質的な増加、おそらく正常レベルに近づくか、もしくは正常レベルを上回る、をもたらす結果となるであらう。

【0288】さらに別の実施形態では、本発明は、患者が、配列番号2、4、6、または8のポリペプチドのいずれか1つの異常活性に関連した疾患、例えば癌（例えば、結腸癌）を発達させる傾向のあるような疾患を発症する危険性があるかどうかを確認する方法を提供し、ここでポリペプチドの異常活性は、(i)マーカーポリペプチドをコードする遺伝子の完全性に影響を及ぼす改変、または(ii)コード核酸の異所性発現(misexpression)の少なくとも1つを特徴とする遺伝的損傷の存在または非存在を検出することを特徴とする。例えば、かかる遺伝的損傷は、(i)核酸配列からの1つ以上のヌクレオチドの欠失、(ii)核酸配列への1つ以上のヌクレオチドの付加、(iii)核酸配列の1つ以上のヌクレオチドの置換、(iv)核酸配列の総染色体再配列、(v)核酸配列のメッセンジャーRNA転写物レベルにおける総変化、(vi)ゲノムDNAのメチル化パターンのような、核酸配列の異常修飾、(vii)遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii)マーカーポリペプチドの非野生型レベル、(ix)遺伝子の対立遺伝子損失、および/または(x)マーカーポリペプチドの不適切な翻訳後修飾の少なくとも1つの存在を確かめることにより検出することができる。

【0289】本発明は、コード核酸配列における損傷を検出するためのアッセイ技法を提供する。これらの方法としては、配列分析、サザンブロットハイブリダイゼーション、制限酵素部位マッピングを含む方法、および分析されるべき核酸およびプローブ間のヌクレオチド対形成の非存在の検出を含む方法が挙げられるが、これらに

限定されない。

【0290】特定疾患または障害（例えば、遺伝的疾患または障害）は、特定の遺伝子の多型領域の特異的対立遺伝子変異体が関与し、それは必ずしも突然変異タンパク質をコードしない。したがって、被験体における遺伝子の多型領域の特異的対立遺伝子変異体の存在は、その被験体を特定疾患または障害を発症しやすくする。遺伝子における多型領域は、個々の集団における遺伝子のヌクレオチド配列を決定することにより同定することができる。多型領域が同定されると、個体の特定集団（例えば、結腸癌のような特定疾患を発症した個体）を研究することにより、特定疾患との関連を確認することができる。多型領域は、遺伝のいかなる領域にも、例えばエキソン（エキソンのコードまたは非コード領域）、イントロンおよびプロモーター領域に見出される。

【0291】典型的な実施形態では、遺伝子またはその天然に存在する突然変異体のセンスもしくはアンチセンス配列、あるいはその対象遺伝子もしくはそれらの天然に存在する突然変異体に本来関連する5'もしくは3'フランキング配列またはイントロン配列に、ハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド配列領域を含む核酸プローブを含む核酸組成物を提供する。細胞の核酸は、ハイブリダイゼーションしやすくされており、プローブを試料の核酸と接触させて、試料核酸へのプローブのハイブリダイゼーションを検出する。かかる技法は、欠失、置換等を含むゲノムまたはmRNAレベルにおける損傷または対立遺伝子変異体を検出するために、ならびにmRNA転写物レベルを測定するために使用することができる。

【0292】好ましい検出方法は、突然変異または多型部位に重複し、突然変異または多型領域の周囲にある約5個、10個、20個、25個、または30個のヌクレオチドを有するプローブを用いる対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションである。本発明の好ましい実施形態では、対立遺伝子変異体に特異的にハイブリダイズすることが可能ないくつかのプローブを固相支持体、例えば、「チップ」に結合させる。オリゴヌクレオチドを含むこれらのチップを用いた突然変異検出分析は、「DNAプローブアレイ」とも称され、例えばCronin et al. (1996) Human Mutation 7:244に記載されている。一実施形態では、チップは、遺伝子の少なくとも1つの多型領域の対立遺伝子変異体すべてを含む。次に、固相支持体を試験核酸と接触させて、特異的プローブへのハイブリダイゼーションを検出する。したがって、1つ以上の遺伝子の多数の対立遺伝子変異体の同一性は、簡単なハイブリダイゼーション実験にて同定することができる。

【0293】ある実施形態では、損傷の検出は、アンカーPCRまたはRACE PCRのようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)（例えば、米国特許第4,683,195号および第4,683,202号を参照）、ある

いはリガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、Landegran et al. (1988) Science 241:1077-1080、Nakazawa et al. (1994) PNAS 91:360-364(そのうちの后者は、遺伝子における点突然変異を検出するのに特に有用であり得る(sec Abravaya et al. (1995) Nuc Acid Res23:675-682))を参照)にて、プローブ/プライマーを利用することを含む。単なる例証の実施形態では、上記方法は、(i)患者から細胞試料を収集する工程と、(ii)試料細胞から核酸(例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方)を単離する工程と、(iii)核酸試料を、核酸が存在すれば、核酸のハイブリダイゼーションおよび増幅が起こるような条件下にて、核酸配列に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと、接触させる工程と、(iv)増幅産物の存在または非存在を検出、または増幅産物の大きさを検出して対照試料と長さを比較する工程とを含む。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載する突然変異を検出するのに使用する技法のいずれかと合わせて、予備増幅工程として使用することが望ましい場合があることが予想される。

【0294】代替的増幅方法としては、自己持続性配列複製(Guatelli, J.C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwoh, D. Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardi, P.M. et al., 1988, Bio/Technology 6:1197)、または任意の他の核酸増幅方法を含み、続いて当業者に周知の技法を用いて増幅分子を検出する。これらの検出スキームは、かかる分子の存在する数が非常に少ない場合に、核酸分子の検出に特に有用である。

【0295】対象アッセイの好ましい実施形態では、試料細胞からの遺伝子における突然変異またはその遺伝子の対立遺伝子変異体は、制限酵素切断パターンにおける改変により同定される。例えば、試料および対照DNAを単離し、増幅し(任意に)、1つまたはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化して、断片長の大きさを、ゲル電気泳動により測定する。さらに、配列特異的リボザイムを使用して(例えば、米国特許第5,498,531号を参照)、リボザイム切断部位の発達または損失による特異的突然変異の存在に関してスコア-することができる。

【0296】本発明の別の態様は、異常増殖を特徴とする細胞の分化および増殖を調節することが可能な薬剤の同定に関する。これに関しては、本発明は、マーカー核酸(配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列)の発現を調節し、および/またはコードポリペプチドの生物活性を改変する、例えば、コードポリペプチドの生物活性を抑制する、化合物を確定するためのアッセイを提供する。

【0297】いくつかのin vivoでの方法を用いて、マーカー核酸(配列番号1、3、5、または7、あるいは

それらに相補的な配列)を調節し、および/またはコードポリペプチドの生物活性を改変する、例えば、コードポリペプチドの生物活性を抑制する、化合物を同定することができる。

【0298】薬剤スクリーニングは、細胞試料に試験化合物を添加して、その効果をモニターすることにより行う。試験化合物が入っていない対照試料もまた、対照としてモニターする。次に、処理および未処理の細胞を、限定するものではないが、顕微鏡分析、生存度試験、複製能力、組織学的検査、細胞に関連した特定RNAまたはポリペプチドレベル、細胞または細胞溶解産物により発現される酵素活性レベル、および他の細胞または化合物と相互作用する細胞の能力を含む、任意の適切な表現型基準により、比較する。処理および未処理の細胞間の差異は、試験化合物に起因する効果を示す。

【0299】試験化合物の所望の効果は、癌関連マーカー核酸配列により与えられたあらゆる表現型における効果を含む。例としては、過剰のmRNAを制限する試験化合物、コードタンパク質の産生を制限する試験化合物、またはタンパク質の機能的効果を制限する試験化合物が挙げられる。試験化合物の効果は、処理および未処理の細胞間の結果を比較する際に明らかであろう。

【0300】したがって、本発明はまた、in vitroにて核酸マーカー(配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列)の発現を抑制する薬剤に関してスクリーニングする方法を包含し、この方法は、薬剤がmRNAの産生を抑制することが可能であるかどうかを確認するために、マーカー核酸mRNAが培養細胞中にて検出可能である細胞または組織を薬剤に曝露することと、曝露された細胞または組織におけるmRNAレベルを測定することとを含み、ここで、細胞系の薬剤への曝露後のmRNAレベルの減少が、マーカー核酸mRNA産生の抑制を示す。

【0301】あるいは、スクリーニング方法は、マーカータンパク質の産生を抑制すると推測される薬剤に対する、マーカータンパク質が培養細胞にて検出可能である細胞または組織をin vitroでスクリーニングすること、および細胞または組織におけるマーカータンパク質レベルを測定することを含み、ここで、細胞または組織の薬剤への曝露後のマーカータンパク質レベルの減少が、マーカータンパク質産生の抑制を示す。

【0302】本発明はまた、マーカー核酸の発現を抑制する薬剤に関するin vivoでのスクリーニング方法を包含し、この方法は、マーカーmRNAまたはタンパク質の産生を抑制すると推測される薬剤に、マーカーmRNAまたはタンパク質が検出可能である腫瘍細胞を有する哺乳動物を曝露することと、曝露された哺乳動物の腫瘍細胞におけるマーカーmRNAまたはタンパク質レベルを測定することを含む。哺乳動物の薬剤への曝露後のマーカーmRNAまたはタンパク質レベルの減少

は、マーカー核酸発現の抑制を示す。

【0303】したがって、本発明は、試験化合物とともに、マーカー核酸（配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列）を発現する細胞をインキュベートすることと、mRNAまたはタンパク質レベルを測定することを含む方法を提供する。本発明はさらに、細胞集団におけるマーカー核酸の発現レベルを定量的に測定する方法、および薬剤が細胞集団におけるマーカー核酸の発現レベルを増加または減少させることが可能かどうかを確認する方法を提供する。薬剤が細胞集団

10 におけるマーカー核酸の発現レベルを増加または減少させることが可能であるかどうかを確認する方法は、  
 (a) 対照および薬剤処理細胞集団から細胞抽出物を調製する工程、(b) 細胞抽出物からマーカーポリペプチドを単離する工程、(c) マーカーポリペプチドおよびこのポリペプチドに特異的な抗体間に形成される免疫複合体の量を定量する（例えば、平行して）することを含む。本発明のマーカーポリペプチドはまた、その生物活性についてアッセイすることにより定量することができる。マーカー核酸発現の増加を誘発する薬剤は、対照細胞

20 にて形成される免疫複合体の量と比較して、試験細胞にて形成される免疫複合体の量を増加させる能力により同定することができる。同様に、マーカー核酸の発現を減少させる薬剤は、対照細胞と比較して、処理細胞抽出物にて形成される免疫複合体の量を減少させる能力により同定することができる。  
 【0304】mRNAレベルは、ノーザンプロットハイブリダイゼーションより測定することができる。mRNAレベルはまた、PCRを含む方法により測定することができる。高処理アッセイに使用することができるmRNA

30 測定する他の感度の高い方法（例えば、DELTA終末点検出を用いる方法、および定量方法）は、例えば、Webb and Hurskainene (1996) Journal of Biomolecular Screening 1:119に記載されている。マーカータンパク質レベルは、配列番号2、4、6、または8のタンパク質産物を特異的に認識する抗体を用いて、免疫沈降または免疫組織化学により測定することができる。

【0305】薬剤スクリーニングアッセイにおいて活性であると同定される薬剤は、細胞増殖活性を阻止するの能力に関して試験される候補物である。これらの薬剤

40 は、細胞、特に結腸細胞の異常増殖を含む障害を治療するのに有用であろう。  
 【0306】様々なアッセイ方式については十分であろうし、本開示を鑑みて、本明細書に特に記載しないものは、それでも当業者に理解されるであろう。例えば、アッセイは、多くの異なる方式で創造することができ、無細胞系（例えば、精製タンパク質または細胞溶解産物）に基づくアッセイ、ならびに無傷細胞を利用する細胞に基づいたアッセイを含む。

【0307】化合物および天然抽出物のライブラリーを

試験する多くの薬剤スクリーニングプログラムでは、所定期間中に調査する化合物数を最大にするために、高処理アッセイが望ましい。精製もしくは半精製タンパク質または溶解産物を用いて得られ得るような無細胞系にて実施される本発明のアッセイは、それらが試験化合物により媒介される分子標的における変化の迅速な展開、および比較的簡単な検出を可能にするように作られ、多くの場合、「一次」スクリーニングとして好ましい。さらに、試験化合物の細胞障害性および/または生物学的利用能の影響は、*in vitro*系にて一般的に無視することができ、それよりもむしろアッセイは、他のタンパク質との結合親和性の変化、または分子標的の酵素特性における変化にて明らかになるような、分子標的に関する薬剤の効果に主として焦点が向けられる。

【0308】A. マッピングおよび組織プロファイリング  
 グローブにおけるグローブとしての核酸の使用

例えば、ヌクレオチド配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列から選択される少なくとも8個の連続ヌクレオチドを含む、上述に記載するポリヌクレオチドプローブは、ヒト染色体の同定および転写レベルの測定を含む様々な目的のために使用される。核酸配列の好ましい領域に関する追加する開示は、添付の表に見出される。

【0309】ヌクレオチドプローブは、例えば放射性標識、蛍光標識、ビオチン化標識、または化学発光標識を用いて標識され、選択した特定標識に適した周知の方法により検出される。中期染色体の調製物に、ヌクレオチドプローブがハイブリダイズするためのプロトコルもまた当該技術にて周知である。ヌクレオチドプローブは、プローブのヌクレオチド配列に相補的である染色体調製物におけるヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするであろう。核酸に特異的にハイブリダイズするプローブは、他の非関連配列を提供された背景ハイブリダイゼーションよりも少なくとも5倍、10倍または20倍高い検出シグナルを提供する。

【0310】非限定的な例では、市販プログラムが、癌のような疾患に一般的に関連する染色体の領域を同定するのに利用できる。本発明の核酸は、これらの領域をプローブするのに使用することができる。例えば、プロファイル検索により、核酸がキナーゼをコードする遺伝子に対応すると同定されると、癌関連染色体領域に結合するその能力は、腫瘍細胞発達/成長の1つまたはそれ以上の段階におけるキナーゼとしてのその役割を示唆するであろう。いくつかの実験が、その役割を解明するのに要されるであろうが、核酸は、癌診断または治療を進展する潜在性を有する特定タンパク質を単離するための新規物質を構成する。

【0311】ヌクレオチドプローブを、核酸に対応する遺伝子の発現を検出するために用いる。例えば、ノーザンプロットでは、mRNAを電気泳動的に分離し、プロ

ープと接触させる。プローブを、特定の大きさのmRNA種にハイブリダイズさせて検出する。ハイブリダイゼーションの量を定量して、例えば特定条件下における発現相対量を測定する。プローブはまた、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅産物を検出するために使用される。反応産物は、プローブにハイブリダイズして、このハイブリッドを検出する。プローブは、発現を検出するための細胞へのin situでのハイブリダイゼーション用に使用される。プローブはまた、配列をハイブリダイズする診断検出用にin vivoにて使用することができる。10 プローブは典型的に、放射性同位体を用いて標識される。発色団、蛍光発色団および酵素のような他の型の検出可能な標識を用いてもよい。

【0312】特定mRNAの発現は、異なる細胞型にて変わることができ、組織特異的であることができる。異なる細胞型におけるmRNAレベルのこの変動は、組織型を決定するために、核酸プローブアッセイとともに利用することができる。例えば、配列番号1、3、5、もしくは7核酸配列またはそれらに相補的な配列と実質的に同一または相補的な核酸プローブを利用したPCR、20 分岐DNAプローブアッセイ、またはプロテイング技法は、標的cDNAもしくはmRNAの存在または非存在を確認することができる。

【0313】ヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイの例は、PCT国際公開公報第92/02526号(Urdea et al.)、および米国特許第5,124,246号(Urdea et al.)に記載されており、その両方が、参照することにより本明細書に援用される。この参照は、サンドイッチヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイの例を記載する。30

【0314】また、少量の標的核酸を検出するための別の手段は、Mullis et al., Met/i.Enzymol. (1987) 15:355-350、米国特許第4,683,195号、および米国特許第4,683,202号(それらのすべてが、参照することにより本明細書に援用される)に記載されるように、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。2つのプライマーポリヌクレオチドは、標的核酸とハイブリダイズして、反応を開始する(prime)するために使用される。プライマーは、配列表のポリヌクレオチドに対して3'および5'内の配列で構成されてもよい。あるいは、プライマーがこれらのポリヌクレオチドに対して3'および5'である場合、そのプライマーは、そのヌクレオチドまたは相補体にハイブリダイズする必要はない。熱安定性ポリメラーゼは、もとの標的核酸を鋳型として用いて、プライマーから標的核酸のコピーを創出する。大量の標的核酸がポリメラーゼにより生成された後に、サザンプロットのような方法によりそれを検出する。サザンプロット法を用いる場合、標識プローブは、配列表または相補体のポリヌクレオチドにハイブリダイズするであろう。40

【0315】さらに、mRNAまたはcDNAは、Sambrook et al., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)に記載される伝統的なプロテイング技法により検出することができる。ポリメラーゼ酵素を用いてmRNAから生成されるmRNAまたはcDNAは、ゲル電気泳動を用いて精製、分離することができる。次にゲル上の核酸を、ニトロセルロースのような固体支持体にプロットする。固体支持体を標識プローブに曝露し、続いて洗浄して、ハイブリダイズしていないプローブを除去する。次に、標識プローブを含有する二重鎖を検出する。典型的に、プローブは、放射能で標識する。

#### 【0316】マッピング

本発明の核酸は、対応する遺伝子が存在する染色体を同定するために使用される。例えば、in situでのハイブリダイゼーション(ISH)、または正常中期の広がりにおけるin situでのハイブリダイゼーションにて蛍光(FISH)を用いることにより、比較ゲノムハイブリダイゼーションは、DNA配列の相対的コピー数における変化の総ゲノム評価を可能にする。Schwartz and Samad, Current Opinions in Biotechnology (1994) 8:70-74、Kallioniemi et al., Seminars in Cancer Biology (1993) 4:41-46、Valdes and Tagle, Methods in Molecular Biology (1997) 68:1、Boultonwood, ed., Human Press, Totowa, NJを参照されたい。

【0317】ヒト中期染色体の調製物は、ヒト主要組織または細胞系から、標準的細胞遺伝学的技法を用いて調製される。配列番号1、3、5、または7、あるいはそれらに相補的な配列のヌクレオチド配列から選択される、少なくとも12個の連続ヌクレオチドを含むヌクレオチドプローブを、対応する染色体を同定するために使用する。ヌクレオチドプローブは、例えば放射性標識、蛍光標識、ビオチン化標識または化学発光標識を用いて標識され、選択した特定標識に適した周知の方法により検出される。ヌクレオチドプローブが、中期染色体の調製物にハイブリダイズするためのプロトコルもまた、当該技術にて既知である。ヌクレオチドプローブは、プローブのヌクレオチド配列に相補的な染色体調製物中のヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするであろう。標的遺伝子に特異的にハイブリダイズするプローブは、非関連のコード配列を提供された背景ハイブリダイゼーションよりも、少なくとも5倍、10倍または20倍高い検出シグナルを提供する。

【0318】核酸配列は、例えば照射ハイブリッドまたは染色体特異的ハイブリッドパネルを用いて、特定の染色体にマッピングされる。Leach et al., Advances in Genetics, (1995) 33: 63-99、Walter et al., Nature Genetics (1994) 7:22-28、Walter and Goodfellow, Trends in Genetics (1992) 9:352を参照されたい。照射ハイブリッドマッピング用パネルは、Research Genetic 50

s, Inc., Huntsville, Alabama, USAから入手可能である。様々なパネルを用いたマーカーのためのデータベースは、<http://F/shgc-www.stanford.edu>および他のロケーションにあるワールドワイドウェブにより入手可能である。統計学的プログラムRHMAPは、一方の程度をもう一方に対する相対的見込みの尺度でもって、照射ハイブリダイゼーションからのデータに基づいたマップを構築するために使用することができ、RHMAPは、<http://www.sph.umich.edu/group/statgen/software>にあるワールドワイドウェブにより入手可能である。

【0319】かかるマッピングは、既知の機能を有する他の遺伝子への近似により、標的遺伝子の機能を同定する際に有用であり得る。特定症候群または疾患マップが同じ染色体に位置する場合に、機能はまた、標的遺伝子のもものとされる。

#### 【0320】組織プロファイリング

本発明の核酸を用いて、所定の試料が得られる組織型を決定することができる。例えば、その発生器官もしくは組織源に特定のマーカーの発現を同定することにより、その器官または組織によって転移性病巣を同定する。核酸が特定組織型においてのみ発現し、転移性病巣がその核酸を発現することが見出される場合、病巣の発生源が同定される。特定核酸の発現は、対応するmRNAまたはタンパク質産物の検出によりアッセイされる。抗体染色のような免疫学的方法は、特定タンパク質産物を検出するのに使用される。ハイブリダイゼーション方法は、限定するものではないが、*in situ*ハイブリダイゼーションおよびノーザンブロットティングを含み、特定mRNA種を検出するのに用いられ得る。

#### 【0321】多型の使用

核酸は、遺伝子の対応領域がヒト集団における多型性である場合には、法医学、遺伝分析、マッピングおよび診断用途にて有用であろう。核酸の特定の多型は、容疑者に由来する試料を同定するか、または試料が容疑者に由来する可能性を除外するために使用することができる。遺伝子における多型を検出する手段は、限定するものではないが、タンパク質多型変異体の電気泳動、制限酵素切断に対する差次的感受性、および対立遺伝子特異的プローブへのハイブリダイゼーションを含むあらゆる手段が使用される。

#### 【0322】B. 抗体を産生するため核酸およびコードポリペプチドの使用

核酸、対応するmRNAもしくはcDNA、または対応する完全遺伝子の発現産物を調製して、実験用途、診断用途および治療用途用の抗体を産生させるために使用する。対応する遺伝子が割り当てられていない核酸に関しては、このことは、対応する遺伝子を同定する補足的な方法を提供する。核酸または関連cDNAは、上述のように発現されて、抗体が調製される。これらの抗体は、コードペプチド上にあるエピトープに特異的であり、細

胞もしくは組織調製物中、または*in vitro*での発現系の無細胞抽出物中の対応する天然タンパク質を沈殿させるか、またはそれに結合することができる。

【0323】抗体を産生するための免疫原は、本発明の核酸によりコードされるポリペプチドをアジュバンドと混合することにより調製される。あるいは、ポリペプチドは、より大きな免疫原性タンパク質に対する融合タンパク質として作製される。ポリペプチドはまた、キーホールリンペットヘモシアニンのような他のより大きな免疫原性タンパク質に共有結合される。免疫原は典型的に、皮内的、皮下的、または筋肉内に投与される。免疫原は、ウサギ、ヒツジ、およびマウスのような実験動物に投与して、抗体を生成させる。任意に、動物脾臓細胞を単離して、ミエローム細胞と融合させて、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを形成させる。かかる方法は、当該技術にて既知である。当該技術にて既知の別の方法によれば、核酸は、筋肉内注射によるように直接投与され、*in vivo*にて発現される。発現タンパク質は、タンパク質の投与に匹敵する抗体の産生を含む様々なタンパク質特異的免疫応答を生成する。

【0324】核酸コードタンパク質およびポリペプチドに特異的なポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製は、当該技術にて既知の標準的方法を用いて作製される。抗体は、配列番号2、4、6、または8のポリペプチドに存在するエピトープに特異的に結合する。典型的に、少なくとも約6個、8個、10個、または12個の連続アミノ酸がエピトープを形成するのに必要とする。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープは、より多くの、例えば少なくとも約15個、25個、または50個のアミノ酸を必要とすることがある。さらに、核酸の短い配列は、既知のタンパク質との交差反応性の潜在性のために、対応する新規タンパク質を同定するための抗体を産生するためのエピトープとしての使用に不適切であり得る。しかしながら、抗体は、特に抗体が既知のタンパク質と本発明の核酸によりコードされる新規ポリペプチドの共通の構造的特徴を同定する場合には、他の目的のために、有用である。

【0325】ウェスタンブロット法または他の免疫化学的アッセイにおいて使用される場合、ヒト核酸コードポリペプチドに特異的に結合する抗体は、他のタンパク質を用いて提供される検出シグナルよりも、少なくとも約5倍、10倍、あるいは20倍高い検出シグナルを提供するはずである。むしろ、核酸コードポリペプチドを特異的に結合する抗体は、免疫化学的アッセイにおいて、他のタンパク質を検出せず、溶液から核酸コードタンパク質を免疫沈降させることができる。

【0326】ヒト集団における核酸コードポリペプチドに対する血清抗体の存在について試験するために、当該技術で既知の方法によって、ヒト抗体の精製を行う。好ましくは、抗体は、核酸コードタンパク質、ポリペプチ

ド、または融合タンパク質が結合するカラムに抗血清を通すことにより、親和性を利用して精製される。その後、結合した抗体は、例えば高塩濃度の緩衝液を用いて、カラムから溶出させることができる。

【0327】上述した抗体に加えて、一本鎖抗体などの遺伝子操作して抗体誘導体が作製される。

【0328】抗体は、当該技術で既知の標準プロトコルを用いて作製することができる(例えば、Antibodies:A Laboratory Manual ed.by Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press:1988)を参照)。マウス、ハムスター、またはウサギなどの哺乳動物は、ペプチドの免疫原性形態(例えば、抗体応答を誘発することが可能な哺乳動物ポリペプチドまたは抗原断片、あるいは上記のような融合タンパク質)を用いて免疫化することができる。

【0329】一態様では、本発明は、対象ポリペプチドが、結腸直腸組織または腫瘍組織、特に、結腸癌組織または結腸癌由来細胞系において、高度に発現されることを示すモノクローナル抗体を含む。従って、一実施形態において、本発明は、特に結腸癌診断材料として、一般の対象ポリペプチドの発現の分析のための診断ツールを提供する。

【0330】タンパク質またはペプチドに対する免疫原性を与える技法は、キャリアへの結合または当該技術で既知の他の技法を包括する。タンパク質の免疫原性部分は、アジュバントの存在下にて、投与することができる。免疫化の進行は、血漿または血清における抗体力価の検出によってモニターすることができる。標準ELISA法または他のイムノアッセイは、抗体のレベルを評価するために、抗原としての免疫原とともに使用することができる。好ましい実施形態において、対象抗体は、哺乳動物のタンパク質の抗原決定基、例えば、配列番号2、4、6、または8、あるいは密接に関連した相同体(例えば、少なくとも90%同一、より好ましくは少なくとも95%同一)のタンパク質の抗原決定基に免疫特異的である。

【0331】ポリペプチドの抗原調製物を用いた動物の免疫化に続いて、抗血清を得ることができる、および所望する場合には、血清から分離されたポリクローナル抗体を得ることができる。モノクローナル抗体を産生するために、抗体産生細胞(リンパ球)を、免疫化された動物から収集し、ミエローマ細胞などの不死化細胞と、標準体細胞融合手法により融合して、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技法は、当該技術において既知であり、例えばハイブリドーマ技法(もとをたどれば、Kohle and Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497により開発された)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4:72)、およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBVハイブリドーマ技法(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 50

Inc. pp.77-96)が挙げられる。ハイブリドーマ細胞は、本発明のポリペプチド、およびかかるハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離されたモノクローナル抗体と特異的に反応性を有する抗体を生産するために免疫化学的にスクリーニングされ得る。

【0332】本明細書において使用される「抗体」という用語は、その断片が対象ポリペプチドの1つと特異的な反応性を有する断片も包括することを意図するものである。抗体を、従来の技術を使用して断片化することができ、その断片は、全抗体に関する上記の方法と同じ方法にて、利用するためにスクリーニングすることができる。例えば、F(ab)<sub>2</sub>断片は、抗体をペプシンで処理することにより生成することができる。得られたF(ab)<sub>2</sub>断片は、ジスルフィド架橋を減らす処理をして、Fab断片を産生することができる。本発明の抗体はさらに、抗体の少なくとも一つのCDR領域によって与えられるポリペプチドに対して親和性を有する二重特異性(bispecific)、一本鎖、ならびにキメラ分子およびヒト化分子をも包含することを意図するものである。好ましい実施形態では、抗体(複数可)は、さらにそれ自体に結合し、検出され得る標識(例えば、標識は放射性同位体、蛍光性化合物、化学発光性化合物、酵素、または酵素補因子であり得る)を含む。

【0333】抗体は、例えば、被験者が異常タンパク質レベルに関連する、結腸癌のような疾患または状態を有しているかどうかを確定すること、あるいは、そのような障害を患っている個体のための所定の治療法の有効性の決めることを可能とすることを目的として、個体におけるタンパク質レベルをモニターするために使用することができる。ポリペプチドのレベルは、血液試料のような体液中の細胞から測定することができる。

【0334】本発明の抗体の他の応用は、gt11、gt18-23、ZAP、およびORF8のような発現ベクター中に構築されるcDNAライブラリーの免疫学的スクリーニングにある。この型のメッセンジャーライブラリーは、正しいリーディングフレームおよび配向にて挿入されたコード配列を有し、融合タンパク質を産生することができる。例えば、gt11は、アミノ末端が-ガラクトシダーゼアミノ酸配列から構成され、カルボキシル末端が外来ペプチドから構成される融合タンパク質を産生するであろう。タンパク質の抗原エピトープ、例えば、特定のタンパク質の他のオルソログ(ortholog)または同一種由来の他のパラログ(paralog)は、例えば抗体と、感染プレートから引き上げられたニトロセルロースフィルターを反応させるように、抗体を用いて検出できる。次に、このアッセイにより検出される陽性のファージを、感染プレートから単離することができる。したがって、相同体の存在は、ヒトからのアイソフォーム(スプライシング変異体を含む)を交替させ得るように、他の動物から検出され、クローニングする

ことができる。

【0335】別の実施形態において、モノクローナル抗体のパネルを使用してもよく、各エピトープの関与する機能は、モノクローナル抗体によって表される。パネルにおけるモノクローナル抗体の結合の損失または攪乱は、タンパク質、したがって対応する遺伝子の突然変異的注目を示すであろう。

#### 【0336】C. 差次的発現

本発明はまた、ヒトにおける異常または患部組織を同定するための方法を提供する。上記のようなタンパク質ファミリーのプロフィールに対応する核酸に関して、組織の選択は、推定される生物学的機能により左右され得る。特定の核酸に対応する遺伝子の発現は、疾患の疑いのある第1の組織とヒトの正常組織である第2の組織との間で比較される。正常組織は、ヒトのあらゆる組織、特に脳、胸腺、精巣、心臓、前立腺、胎盤、脾臓、小腸、骨格筋、膵臓、および結腸の粘膜内層を含むが、それらに限定されない、標的遺伝子を発現する組織である。

【0337】異常または罹患の疑いのある組織は、ヒトの種々な組織型から得ることができるが、好ましくは、同じ組織型から得られる。例えば、腸ポリープまたは他の異常成長は、正常な腸組織と比較されるべきである。2つの組織間の標的遺伝子、mRNA、またはタンパク質の差異、例えば、分子量、アミノ酸またはヌクレオチド配列、あるいは相対存在量の差異は、罹患の疑いのあるヒトの組織における比較される遺伝子、またはそれを調節する遺伝子における変化を示す。

【0338】2つの組織における標的遺伝子は、当該技術で既知のあらゆる方法によって比較される。例えば、2つの遺伝子が配列決定され、罹患の疑いのある組織における遺伝子の配列が、正常組織の遺伝子配列と比較される。2つの組織における、標的組織、またはその一部は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、配列表に示すヌクレオチド配列に基づくヌクレオチドプライマーを用いて増幅される。増幅遺伝子またはその一部は、配列番号1、3、5、または7に示される対応するヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチドプローブにハイブリダイズする。正常ヌクレオチドと比較した罹患の疑いのある組織における標的組織のヌクレオチド配列の差異は、疾患における核酸コードタンパク質の役割を示唆し、治療薬の調製の指標を提供する。

【0339】ヌクレオチドプローブは、様々な方法、例えば、放射性標識、ビオチン化、蛍光による標識、または化学発光タグにより標識され、当該技術で既知の標準的な方法にて検出される。

【0340】あるいは、2つの組織における標的mRNAも比較する。ポリA<sup>+</sup>mRNAは、2つの組織から当該技術で知られているように、単離される。例えば、当業者は、ノーザンブロットおよび配列表に示すヌクレオ

チド配列から選択されるヌクレオチドプローブを用いて、2つの組織間の標的mRNA転写物の大きさまたは量の差異を容易に測定できる。正常細胞における同じ標的mRNAの発現と比較して、罹患の疑いのある組織試料における標的mRNAの発現の増加または減少は、発現タンパク質が疾患の一因であり、また、治療薬の調製の指標を提供することを示唆する。

【0341】タンパク質を分析するあらゆる方法が、似かよった試料からの2つの核酸コードタンパク質を比較するために使用される。2つの組織におけるタンパク質の大きさは、例えば、2つの組織からのタンパク質抽出物のウエスタンブロットにおいて核酸コードタンパク質を検出する本発明の抗体を用いて比較される。発現レベルや組織成分(subcellular)局在化のような他の変化もまた、対応するタンパク質への抗体を用いて、免疫学的に検出することができる。正常組織における同じ核酸コードタンパク質の発現レベルと比較して、罹患の疑いのある組織における核酸コードタンパク質の発現の高いまたは低いレベルは、発現タンパク質が疾患の一因であることを示し、治療薬の調製の別の指標を提供する。

【0342】同様に、罹患の疑いのあるヒト細胞およびヒト正常組織との間の、遺伝子配列または遺伝子発現産物、(例えば、mRNAおよびタンパク質)の比較は、ヒトにおける疾患の進行または寛解を追跡するために用いられる。

【0343】例えば、腫瘍の疑いのある組織における標的遺伝子の発現の増加または減少は、組織における腫瘍細胞の存在を示し得る。正常組織における遺伝子の発現に対する腫瘍組織における標的遺伝子の発現の増加の度合、または時間の経過における腫瘍組織における標的遺伝子の発現の増加量の差異は、当該組織における腫瘍の進行を評価するために、または時間の経過における治療プロトコルに対する腫瘍組織の応答をモニターするために用いられる。

【0344】任意の2つの細胞型(例えば、低および高転移腫瘍細胞系、または、治療薬に曝露された、および曝露されていない組織由来の細胞)の発現パターンを比較することができる。ヒトにおける疾患の遺伝的な素因は、胎児組織における標的遺伝子、mRNA、またはタンパク質を、正常な標的遺伝子、mRNA、またはタンパク質と比較することにより検出される。この用途のために用いられる胎児組織は、羊水、絨毛膜絨毛、血液、およびin vitro受精胚の割球が挙げられるが、それらに限定されない。比較可能な正常標的遺伝子は、任意の組織から得られる。mRNAまたはタンパク質は、標的遺伝子が発現されるヒトの正常組織から得られる。胎児の標的遺伝子またはmRNAのヌクレオチド配列または大きさの変化のような、あるいは胎児の標的タンパク質の分子量、アミノ酸配列、または相対的存在量の変化のような差異は、胎児の標的細胞における生殖細



のポリペプチド、抗体、またはポリヌクレオチドを含むであろう。

【0352】本明細書中において使用されている「治療的に有効な量」という用語は、目的とする疾患または状態を治療、回復、または予防するための、または検出可能な治療または予防効果を示すための治療薬の量をいう。効果は、例えば、化学マーカーまたは抗原レベルによって検出することができる。治療効果には、体温の低下のような身体的な症状における低減も含まれる。対象体に対する的確な有効量は、被験体の大きさおよび健康状態、病状の性質および程度、および投与のために選択される治療法または治療法の組合せによる。従って、前もって正確な有効量を特定することは無意味である。しかしながら、所定の状況における有効量は、ルーチンな実験によって決定することができ、臨床医の判断に委ねられる。

【0353】本発明の目的のために、有効投与量は、投与される個体に、約0.01mg/kg~50mg/kgまたは0.05mg/kg~約10mg/kgのDNA構築物であろう。

【0354】薬学的組成物はまた、薬学的に許容されるキャリアを含有することができる。「薬学的に許容されるキャリア」という用語は、抗体またはポリペプチド、遺伝子のような治療薬、および他の治療薬を投与するためのキャリアを指す。この用語は、組成物を受容する個体に有害な抗体の産生をそれ自身が誘発せず、不都合な毒性を伴わず投与できるあらゆる薬学的キャリアを指す。適切なキャリアは、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸共重合体、および不活性ウイルス粒子のような、大きく、ゆっくり代謝される高分子であってもよい。このようなキャリアは、当該業者において既知である。

【0355】薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等のような鉱酸塩、および、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等の有機酸塩を、本発明において使用することができる。薬学的に許容される賦形剤に関する詳細な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mark Pub.Co., N.J. 1991)が役に立つ。

【0356】治療用組成物における薬学的に許容されるキャリアには、水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体が含まれる。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等のような助剤物質を、このような媒体中に存在させることができる。典型的には、治療用組成物は、液体溶液または懸濁液として注射可能物質として調製される、また注射前の液体媒体中に溶液または懸濁液に適した固体形態として調製される。リポソームは薬学的に許容されるキャリアの定義の範囲に包括される。

【0357】送達方法

処方された後、本発明の核酸組成物は、(1)被験体に直接投与されるか、(2)ex vivoで被験体由来の細胞に送達されるか、(3)組換えタンパク質の発現のためにin vitroで送達され得る。

【0358】組成物の直接的な送達は、一般的には皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内への注入により達成されるか、または組織の間質へ送達されるであろう。組成物はまた、腫瘍または病巣に投与され得る。他の投与の様式として、経口および肺投与、坐薬、および経皮適用、針、および遺伝子銃または皮下噴射器が挙げられる。投薬治療は、単回用量スケジュールまたは複数用量スケジュールであり得る。

【0359】ex vivo送達および形質転換細胞の被験体への再移植のための方法は、当該技術において既知であり、例えば、国際公開公報第93/14778号に記載されている。ex vivo適用において有用な細胞の例として、例えば、幹細胞(特に造血幹細胞)、リンパ細胞、マクロファージ、樹状細胞、または腫瘍細胞が挙げられる。

【0360】一般に、ex vivoおよびin vitro適用のための核酸の送達は、例えば、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリポソーム中への封入、およびDNAの核への直接的なマイクロインジェクションによって達成することができ、これらすべてが当該技術において周知である。

【0361】いったん被験体遺伝子が増殖障害(例えば、新形成、異形成、および過形成)と相関することが見出されると、その障害には、核酸または対応するポリペプチドに基づく治療薬の投与による治療を受け入れやすいであろう。

【0362】アンチセンスポリペプチドの調製について上記で記載している。アンチセンス組成物で治療される新形成としては、子宮頸癌、黒色腫、結腸直腸腺癌、ウィルス腫瘍、網膜芽細胞腫、肉腫、筋肉腫、肺癌腫、慢性骨髄性白血病、前骨髄球性白血病、単球性白血病および骨髄性白血病のような白血病、細網内腫腫のようなリンパ腫を含むが、これらに限定されない。治療用組成物によって治療される増殖障害には、脱水性(anhydric)遺伝性外胚葉性形成異常、先天性肺胞形成異常、頸部上皮性形成異常、線維性骨形成異常、乳房形成異常のような障害が含まれる。例えば、子宮内膜、副腎、乳房、前立腺、あるいは甲状腺の過形成または皮膚の偽上皮腫性増殖のような過形成は、アンチセンス治療用組成物によって治療される。対応する遺伝子における突然変異が関係していない障害においてさえも、核酸関連遺伝子発現のダウンレギュレーションまたは抑制は、治療の適用となり得る。例えば、核酸関連遺伝子発現の減少

は、増強された遺伝子発現が関係する腫瘍の抑制の一助

となり得る。

【0363】アンチセンス組成物の用量および投与手段の両方は、治療用組成物の特質、患者の病状、年齢、および体重、疾患の進行、および他の関連因子に基づいて決定される。本発明の治療用アンチセンス試薬剤の投与としては、注射、経口投与、粒子銃またはカテーテル挿入投与および箇所投与を含む、局所的または全身投与が挙げられる。好ましくは、治療用アンチセンス組成物は、プロモーターおよび核酸のアンチセンス鎖の少なくとも約12個、22個、25個、30個、または35個の連続ヌクレオチドのポリヌクレオチドセグメントを含む発現構築物を含む。発現構築物内では、ポリヌクレオチドセグメントは、プロモーターより下流側に位置し、ポリヌクレオチドセグメントの翻訳はプロモーターから開始される。

【0364】様々な方法が、治療用組成物を体内における特定の部位へ直接投与するために使用される。例えば、小さい転移性病変が見出され、腫瘍のある体内に数箇所の異なる位置に治療用組成物が数回注入される。あるいは、腫瘍を配る動脈が同定され、腫瘍に直接組成物を送達するために、治療用組成物は、そのような動脈に注入される。壊死性中心を有する腫瘍を吸引し、今や空となった腫瘍の中心へ組成物を直接注入する。アンチセンス組成物は、例えば組成物の局所適用により腫瘍表面に直接投与される。X線画像法は、上記の送達方法のいくつかの方法で手助けとなるため使用される。

【0365】アンチセンスポリヌクレオチド、サブゲノムポリヌクレオチド、または特定組織に対する抗体を含有する治療組成物の受容体媒介性標的送達もまた用いられる。受容体媒介性DNA送達技法は、例えば、Findeiss et al., Trends in Biotechnol. (1993) 11:202-205、Chiou et al., (1994) Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed), Wu & Wu, J. Biol. Chem. (1988) 263:621-24、Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542-46、Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87: 3655-59、Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338-42に記載される。好ましくは、本発明の抗体を含有する治療組成物の受容体媒介性標的送達は、特定組織に対する抗体を送達するのに用いられる。

【0366】アンチセンスサブゲノムポリヌクレオチドを含む治療用組成物は、遺伝子治療プロトコルにおいて局所的投与として、約100ng~約200mgのDNAの範囲で投与される。遺伝子治療プロトコルの期間、約500ng~50mg、約1mg~約2mg、約5mg~約500mg、および約20mg~約100mgのDNAもまた使用され得る。アンチセンスサブゲノム核酸の最終的な有効であるための必要な投与量に影響を及ぼす、作用方法や形質転換および発現の有効性のような要素は、考慮すべき事柄である。広範囲の組織にわたっ

てより高い発現が望まれる場合、より多い量のアンチセンスサブゲノム核酸、または投与の連続するプロトコルにおいて再投与されるのと同じ量、あるいは例えば腫瘍部位の異なる隣接または接近した組織部分への数回投与が明白な治療結果をもたらすのに必要であるかもしれない。すべての場合において、臨床試験におけるルーチンな実験によって、最適な治療効果のための特定の範囲が決定されるであろう。遺伝子治療ベクター、特にレトロウイルスベクターのより完全な記述は、米国特許出願第08/869,309号(本明細書に明示的に援用される)および以下の本明細書F. 遺伝子治療に含まれる。

【0367】抗炎症活性を有するポリヌクレオチドまたはタンパク質をコードする遺伝子に関して、適切な使用、用量、および投与に関しては、米国特許第5,654,173号に記載されており、それは参照により本明細書に援用される。治療用薬剤はまた、米国特許第5,654,173号に記載されるように、対象核酸によりコードされるタンパク質およびポリヌクレオチドに対する抗体をも含む。

#### 【0368】F. 遺伝子治療

本発明の治療用核酸は、遺伝子送達ビヒクルにおいて利用することができる。遺伝子送達媒体は、ウイルス起源または非ウイルス起源であってもよい(一般的に、Jolly, Cancer Gene Therapy(1994)1:51-64、Kimura, Human Gene Therapy(1994)5:845-852、Connelly, Human Gene Therapy (1995) 6:185-193、およびKaplit, Nature Genetics(1994)5:148-153を参照)。本発明の治療薬のコード配列を含む構築物の送達のための遺伝子治療ビヒクルは、局所的または全身的に投与することができる。これらの構築物は、ウイルスまたは非ウイルスベクターによるアプローチを利用することができる。このようなコード配列の発現は、内因性哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを用いて誘発させることができる。コード配列の発現は、構造的または調節的であり得る。

【0369】本発明は、所定の選択された核酸分子を運搬または発現するために構築される組換えレトロウイルスを用いることができる。用いることが可能なレトロウイルスベクターとしては、欧州特許第0415731号、国際公開第90/07936号、国際公開第94/03622号、国際公開第93/25698号、国際公開第93/25234号、米国特許第5,219,740号、国際公開第93/11230号、国際公開第93/10218号、Vile and Hart, Cancer Res.(1993) 53:3860-3864、Vile and Hart, Cancer Res. (1993) 53:962-967、Ramet al., Cancer Res. (1993) 53:83-88、Takamiya et al., J. Neurosci. Res.(1992) 33:493-503、Baba et al., J. Neurosurg. (1993) 79:729-735、米国特許第4,777,127号、英国特許第2,200,651号、および欧州特許第0345242に記載されるものが挙げられる。好ましい組換えレトロウ

イルスとしては、国際公開第91/02805号に記載されるものが挙げられる。

【0370】上述のレトロウイルスベクター構築物と共に使用するのに適したパッケージング細胞系は、容易に調製され(PCT国際公開公報第95/30763号および第92/05266号を参照)、組換えベクター粒子を生産するためのプロデューサー細胞系(ベクター細胞系ともいう)を創出するために使用することができる。本発明における特に好ましい実施形態において、パッケージング細胞系は、ヒト(例えば、HT1080細胞)またはミンク親細胞から作製され、それによって、ヒト血清における不活性化状態で生存できる組換えレトロウイルスを産生することができる。

【0371】本発明はまた、遺伝子送達ビヒクルとして機能することができるアルファウイルス系ベクターを用いる。かかるベクターは、多種多様のアルファウイルスから構築することができ、例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林熱ウイルス(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373、ATCC VR1246)、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR1249、ATCC VR-532)が挙げられる。かかるベクター系の代表例としては、米国特許第5,091,309号、第5,217,879号、および第5,185,440号、およびPCT国際公開公報第92/10578号、第94/21792号、第95/27069号、第95/27044号、および第95/07994号に記載されるものが挙げられる。

【0372】本発明の遺伝子送達ビヒクルはまた、アデノ関連性ウイルス(AAV)ベクターのようなパルボウイルスを用いることができる。代表例としては、国際公開第93/09239号、Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828、Mendelson et al., Virology (1988) 166:154-165、およびFlotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617により開示されるAAVベクターが挙げられる。

【0373】アデノウイルスベクターの代表例としては、Berkner, Biotechniques (1988)6:616-627、Rosenfeld et al., Science (1991) 252:431-434、国際公開第93/19191号、Kolls et al., PNAS (1994) 91:215-219、Kass-Eisler et al., PNAS (1993) 90:11498-11502、Guzman et al., Circulation (1993) 88:2838-2848、Guzman et al., Cir. Res. (1993) 73:1202-1207、Zabner et al., Cell (1993) 75:207-216、Li Ct et al., Hum. Gene Ther. (1993) 4:403-409、Cailaud et al., Eur. J Neurosci. (1993) 5:1287-1291、Vincent et al., Nat. Genet. (1993) 5:130-134、Jaffe et al., Nat. Genet. (1992) 1:372-378、およびLevrero et al., Gene (1991) 101:195-202により記載されるものが

挙げられる。本発明に使用可能な典型的なアデノウイルス遺伝子治療ベクターとしては、国際公開第94/12649号、国際公開第93/03769号、国際公開第93/19191号、国際公開第94/28938号、国際公開第95/11984号、および国際公開第95/00655号に記載されるものが挙げられる。Curie I, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147-154に記載されるような不活性化(killed)アデノウイルスに連結されたDNAの投与を用いてもよい。

【0374】他の遺伝子送達ビヒクルおよび方法を用いてもよく、不活性化アデノウイルス単独に連結されまたは連結されていないポリカチオン凝縮DNA(例えば、Curie I, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147-154)、リガンド連結DNA(例えば、Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985-16987を参照)、真核細胞送達ビヒクル細胞(例えば、1994年5月9日に提出された米国特許出願第08/240,030号、および米国特許出願第08/404,796号を参照)、光重合ヒドロゲル材料の堆積、米国特許第5,149,655号に記載されるようなハンドヘルド遺伝子移入パーティクルガン、米国特許第5,206,152号および国際公開第92111033号に記載されるような電離放射線、核電荷中和または細胞膜との融合が挙げられる。さらなるアプローチは、Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411-2418、およびWoffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581-1585に記載されている。

【0375】裸のDNAもまた使用することができる。典型的な裸のDNAの導入方法は、国際公開第90111092号および米国特許第5,580,859号に記載されている。取り込み効率は、生分解性ラテックスビーズを使用して改善することができる。DNA被覆ラテックスビーズは、ビーズによるエンドサイトーシス開始後に、効率よく細胞に輸送される。この方法は、疎水性を高めるビーズの処理によってさらに改善ことができ、それによって、エンドソームの破壊を促進し、DNAを細胞質へ放出する。遺伝子送達ビヒクルとして働くリポソームについては、米国特許第5,422,120号、PCT国際公開第95/13796号、国際公開第94/23697号、および国際公開第91/14445号、ならびに欧州特許第0524968号に記載されている。

【0376】さらに使用に適した非ウイルス送達としては、Woffendin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91(24): 11581-11585に記載されているアプローチのような機械的送達システムが挙げられる。さらに、コード配列およびかかるものの発現産物は、光重合ヒドロゲル材料の沈着により送達され得る。コード配列の送達に使用することのできる遺伝子送達の他の従来方法としては、例えば、米国特許第5,149,655号に記載のハンドヘルドの遺伝子移入粒子銃の使用、米国特許

第5, 206, 152号およびPCT国際公開第92/11033号に記載の移入遺伝子を活性化するための電離放射線の使用が挙げられる。

#### 【0377】G. トランスジェニック動物

本発明の一態様は、1つまたはそれ以上の遺伝子の生物活性が染色体に組み込まれた導入遺伝子によって改変される生殖細胞系および/または体細胞を有するトランスジェニック非ヒト動物に関する。

【0378】好ましい実施形態において、導入遺伝子は、野生型タンパク質の生物機能の少なくとも一部に拮抗する優性ネガティブタンパク質のような突然変異タンパク質をコードする。

【0379】さらに別の好ましいトランスジェニック動物は、導入遺伝子から転写される際に、遺伝子またはそのmRNA転写物とハイブリダイズし、遺伝子の発現を抑制するアンチセンス転写物をコードする導入遺伝子を含む。

【0380】1実施形態において、本発明は、非ヒト動物細胞または動物細胞（ヒトを含む）を癌にかかりやすくさせる、所定の特異的な所望の変化を含む、所望の非ヒト動物または動物細胞を提供する。具体的に本発明は、腫瘍抑制遺伝子の2つの対立遺伝子のうち少なくとも1つは不完全である遺伝的に改変された非ヒト動物（最も好ましくは、マウス）、または培養物中の細胞（非ヒト動物またはヒト）に関する。これらの腫瘍抑制対立遺伝子の少なくとも1つの不活性化することにより、腫瘍誘発または他の増殖もしくは分化障害、あるいは、例えばサイトカインまたは成長因子由来の異常シグナル導入によって特徴付けられる障害に対する高い感受性を動物に生じさせる。遺伝的に改変されたこの型のマウスは、遺伝性癌の有用なモデルとして、および発癌物質の研究の試験動物として利用可能である。本発明は、さらに研究および医療におけるこのような非ヒト動物細胞または動物細胞、およびそれらの子孫の使用に関する。

【0381】さらに、本発明におけるトランスジェニック動物の細胞は他の導入遺伝子（例えば、第2の腫瘍抑制遺伝子または癌遺伝子の生物学的活性を改変させる導入遺伝子）を含み得ると考えられる。例えば、第2導入遺伝子は、p53、p73、DCC、p21<sup>cip1</sup>、p27<sup>kip1</sup>、Rb、MadまたはE2Fのような第2腫瘍抑制遺伝子の生物活性を機能的に崩壊する力を持っている。あるいは、第2導入遺伝子は、ras、mycのような癌遺伝子、cdc25ホスファターゼ、Bcl-2、Bcl-6、形質転換成長因子、neu、int-3、ポリオーマウイルス中型T抗原、SV40大型T抗原、乳頭腫ウイルスE6タンパク質、乳頭腫ウイルスE7タンパク質、CDK4、またはサイクリンD1の調節の過剰発現または損失を引き起こすことができる。

【0382】本発明における好ましいトランスジェニッ

ク非ヒト動物は、遺伝子の1つ以上の対立遺伝子が染色体に組み込まれた導入遺伝子によって崩壊される生殖細胞系および/または体細胞を有し、ここで、導入遺伝子は、トランスジェニック動物の細胞における導入遺伝子の存在を確認するための検出可能なシグナルを提供するマーカー配列を含み、遺伝子の少なくとも一部分を置き換えるか、または遺伝子に挿入されるか、または野生型タンパク質の発現を崩壊させる。

【0383】本発明のさらに別の態様は、機能的に崩壊された内因性遺伝子を有する非ヒト動物および幹細胞を生成させる方法に関する。好ましい実施形態では、上記方法は、下記の工程を含む：

(i)(a) 遺伝子の少なくとも一部を有する組換え領域であって、導入遺伝子と当該遺伝子の組換えを誘導する組換え領域、および(b)細胞における導入遺伝子の存在を確認するための検出可能なシグナルを提供するマーカー配列を含む導入遺伝子構築物を構築する工程、(ii)導入遺伝子を非ヒト動物の幹細胞に移入する工程、(iii)導入遺伝子および遺伝子間の正しく標的された相同組換えを有する幹細胞を選択する工程、(iv)工程(iii)において確認した細胞を非ヒト胚盤胞に転移して、得られたキメラ胚盤胞を非ヒト雌に移植する工程、および(v)正しく標的された組換えを有する内因性遺伝子対立遺伝子を有する子孫を回収する工程。

【0384】本発明のさらに別の態様は、(i)試験薬剤と本発明のトランスジェニック動物に接触させること、および(ii)処理動物由来の試料中の形質転換細胞数を、未処理トランスジェニック動物由来または対照薬剤で処理したトランスジェニック動物由来の試料中の形質転換細胞数と比較することにより、薬剤の発癌性の可能性を評価する方法を提供する。対照薬剤で処理されていない形質転換細胞の数に比較した、処理動物における形質転換細胞の数の差異が、試験化合物の発癌性の可能性を示唆する。

【0385】本発明の別の態様は、試験化合物の抗増殖活性の評価方法を提供する。好ましい実施形態において、上記方法は、本発明のトランスジェニック動物またはそのような動物由来の細胞試料を試験薬剤と接触させることと、トランスジェニック動物由来の検体、または細胞試料における形質転換細胞の数を決定することを含む。試験薬剤の非存在下における形質転換細胞の数と比較した、形質転換細胞の数の統計学的に有意な減少は、試験化合物が潜在的な抗増殖性薬剤であることを示唆する。

【0386】本発明の実施は、別記しない限り、当該技術内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技法を用いるであろう。かかる技法は、文献にて十分に説明されている。例えば、Molecular Cl

oning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)、DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985)、Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed., 1984)、米国特許第4,683,195号(Mullis et al.)、Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984)、Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984)、Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)、Immobilized Cells And Enzyme 10 s (IRL Press, 1986)、B. Perbal, A Practical Guide ToMolecular Cloning (1984)、the treatise, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.)、Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)、Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)、Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwe 20 ll, eds., 1986)、Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照されたい。

【0387】上述するように、本明細書中に記載する配列は、特に結腸癌に関して有用性を示すと考えられる。しかしながら、これらはまた、他の型の癌および他の疾患状態においても有効であり得る。

【0388】本発明について、特に好適な実施形態を記載している下記の実施例を参照して説明する。しかしながら、これらの実施形態は例示的であり、いかなる場合 30 においても本発明を制限するものと解釈されない。

【0389】X I . 実施例

A . 差次的発現配列の同定

ライブラリーの説明

配列番号1、3、5、または7は、下記に記載されるように、DEおよびPAとして指定されるライブラリーから調達された。DEライブラリーは、規格化された結腸癌特異的サブトラクトcDNAライブラリーである。DEライブラリーは、結腸癌において発現される配列に特異的である(近位および遠位のDukes' B, ミクロ 40 サテライト安定(MSS))が、正常結腸組織を含む正常組織においては発現しない。PAライブラリーは、規格化された結腸特異的サブトラクトcDNAライブラリーである。PAライブラリーは、正常結腸において発現される配列に特異的であるが、他の正常組織においては発現しない。

【0390】結腸癌特異的ライブラリーの構築

サブトラクト結腸癌特異的ライブラリーは、結腸、末梢血白血球(PBL)、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓、小腸、骨格筋、および前立腺組織のcDNAから作製され 50

たプールされるドライバー正常cDNAの組み合わせに対して、プールされている近位(proximal)ステージBであるMSSおよび遠位(distal)ステージBであるMSS腫瘍組織cDNAを差し引くことによって作製された。以下のRNA試料は、Origene Technologies, Inc., Rockville, Marylandから得られ、プールドライバーcDNA: #HT-1015正常結腸全RNA、#HT-1005肝臓全RNA、#HT-1004脾臓全RNA、#HT-1009肺全RNA、#HT-1003腎臓全RNA、#HT-1006末梢血白血球全RNA、#HT-前立腺全RNA、#HM-1002心筋ポリA+RNA、#HM-1007腸ポリA+RNA、#HM-1008骨格筋ポリA+RNAを合成するために使用された。第一鎖cDNAは、それぞれRNA1μgを使用して調製された。50体積%の正常結腸第一鎖cDNA反応物および5.56体積%のそれぞれ残存組織の第一鎖cDNA反応物各々を含む第一鎖cDNAのバイアスプールを調製した。それぞれバイアス第一鎖cDNA反応 10 プール1μlを含む8つの個々の増幅反応が18サイクル行われた。8つすべての増幅反応からの二本鎖cDNA産物をプールし、続く差し引きハイブリッド形成法ブトラクティブハイブリダイゼーションでの使用のために精製した。結腸癌特異的サブトラクトライブラリーをDEを称し、このライブラリー由来の個々のクローンは、DEが前に付けられた番号を用いて引用する。

【0391】規格化されたサブトラクトDE結腸癌特異的およびプール正常ヒト組織特異的cDNAライブラリー(上記ドライバーcDNAの構成成分と同じ)は、公開されている手法(Daitchenko et al., 1996 PNAS 93: 6025-6030, Gurskaya et al., 1996 Analytical Biochemistry 240:90-97)に従い、PCR-選択cDNAサブストラクションキットPT1117-1(Clontech Laboratories, Inc.)を用いて生成された。45倍の質量過剰のドライバーcDNA(450ng)を、それぞれサブストラクション実験に用いた。ドライバーcDNAを用いたテスターのサブトラクティブハイブリダイゼーションは、それぞれ約8~12時間毎に2回行なった。サブトラクト癌特異的DEcDNAは、PCR2.1-TOPOPラスミドベクター(Invitrogen Corporation, Carlsbad CA)に連結され、化学的にウルトラコンピテ 20 ント(ultracompetent)Episcurian大腸菌XL10-Gold細胞(Stratagene, La Jolla, CA)に形質転換された。テスターとドライバー試料を入れ替えた逆ライブラリーもまた、構築され、このライブラリーはMDとして称した。

【0392】正常結腸特異的ライブラリーの構築

この正常結腸組織特異的ライブラリーは、ユーザーマニュアル(PT1117-1)の指示に従い、Clontech Laboratories Inc PCR-Select kit, K1804-1を使用して作製された。

【0393】正常サンプル、非癌性サンプル、患者サンプルについてそれぞれ4つの100 $\mu$ lのSMART PCR cDNA増幅反応は、それぞれの第一鎖cDNA反応からの1 $\mu$ lから開始して行われた。各試料は、次のPCR条件：95 C - b秒、68 C 5mmで、9600 Perkin Elmer計器を使用して、18サイクルのみ増幅された。以下に、増幅されたcDNA試料に関するBayer Diagnostic試料識別番号を示す：NPB (-) 27347、NPB (-) 27859、NPB (-) 28147、NPB (-) 28162、NDB (-) 28800、NDB (-) 29243、NDB (-) 29244、およびNDB (-) 42472。これらは、近位ステージB MSSおよび遠位ステージB MSS癌サンプルを提供する同じ患者から得られる正常結腸組織試料であり、上述のDEライブラリーを調製するために使用した。等容量の8つの正常結腸cDNAがプールされた。サブトラクト正常結腸組織特異的ライブラリーは、正常結腸cDNAプールを、末梢血白血球(PBL)、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓、小腸、骨格筋、および前立腺の組織cDNAから作製されプールされたドライバーcDNAの組合せに対して差し引くことにより作製された。以下に、プールされたドライバーcDNAを合成するために使用したRNA試料を示す：#HT-1005肝臓全RNA、#HT-b004脾臓全RNA、#HT-1009肺全RNA、#HT-1003腎臓全RNA、#HT-1006末梢血白血球全RNA、#HT-前立腺全RNA、#HM-1002心筋ポリA+RNA、#HM-1007腸ポリA+RNA、および#HM-b008骨格筋ポリA+RNA。第一鎖cDNAは、RNA1 $\mu$ gを用いて、各々について調製した。続いて、等容量の9つのドライバー組織の第一鎖cDNA反応から構成される、第一鎖cDNAプールの反応を行った。それぞれ1 $\mu$ lの第一鎖cDNA反応プールを含む8個について増幅反応を18サイクル行った。8つすべての増幅反応からの二本鎖cDNA産物はプールされ、続くサブトラクティブハイブリダイゼーションでの使用のために精製された。正常結腸組織特異的サブトラクトライブラリーはPAと称され、このライブラリー由来の個々のクローンは、番号の前にPAが前に付けられた番号を用いて引用する。

【0394】先に列挙したヒト組織から成る、規格化されたサブトラクトPA正常結腸特異的cDNAライブラリーおよびサブトラクト正常ヒト組織特異的cDNAライブラリーは、公開されている手法(Daitchenko et al., 1996 PNAS 93:6025-6030, Gurskaya et al., 1996 Analytical Biochemistry 240:90-97)に従い、Clontech Laboratories, Inc., PCR-Select cDNA subtraction kit, P11117-1を使用して作成された。ライブラリー構築およびクローニングは、上記のように結腸癌特異的ライブラリーについて行った。差次的発現のために

分析された1152クローンのうち、米国同時係属出願第09/385,982号に記載されているように、約69%が差次的に発現した。

【0395】サブトラクトライブラリーを作製するのに用いられたcDNAはRsaI(平均約600塩基対の大きさの断片を生じる4塩基切断制限エンドヌクレアーゼ)で制限されるため、各上記ライブラリーから単離されたそれぞれのESTは、部分的mRNA翻訳物由来の配列を表わす。

#### 【0396】結腸癌における差次的発現の実証

このライブラリーで見出された差次的に発現された配列が結腸癌に特異的であることを実証するために、結腸癌特異的ライブラリー(デラウェア(DE))、および正常組織特異的ライブラリー(メリーランド(MD))から調製されたcDNAを用いてクローンをスクリーニングした。

【0397】cDNAクローンを、von Stein et al. 1997, Nucleic Acids Research 25(13):2598-2602によって開発された手法に従い、公開されている方法(Jin et al., 1997, Biotechniques 23:1083-1086)に従い合成されたプローブを用いて、差次的発現に関して分析した。差次的発現のために分析された1248クローンのうち、米国同時係属出願第09/385,982号に記載されているように、約83%が差次的に発現した。

#### 【0398】差次的に発現したクローンの配列決定および分析

差次的に発現されることが示されたクローンからの挿入断片のヌクレオチド配列は、サンガー配列決定法により、蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドを用いて、T7またはM13プロモーター部位からのシングルパス配列決定によって決定した。配列は、本明細書(XI. 実施例; B. 公共データベース検索結果)に記載の方法に従い分析された。

【0399】それぞれの核酸は、少なくとも部分的mRNA転写物由来の配列を表わす。

【0400】本発明の核酸には、配列番号(添付資料参照)を与えた。核酸配列は、添付の配列表に示す。

【0401】差次的に発現されたクローンを同定するための実験の例を、図、「差次的発現分析」に示す。サブトラクトクローンからの挿入断片を、上述したように、増幅し、電気泳動し、そして膜上にプロットした。上述したように、RSA1切断DEおよびMDのcDNAプローブとゲルをハイブリダイズした。

【0402】図において、個々のクローンには、各レーンの最上部に番号を付与する。すなわち同じクローンが、上側のプロット(「癌プローブ」)および下側のプロット(「正常プローブ」)がともに同じ垂直なレーン上に表わされるように、プロットは、一列に並べられた。「0」と標識されたレーンは、過剰発現しているクローンを示唆し、すなわち、同じレーンにおける下側の

プロット(「正常プローブ」)において観察されるバンドと比較して、上側のプロット(「癌プローブ」)において、より濃い顕著なバンドを示す。「U」と標識されたレーンは、過少発現しているクローンを示唆し、すなわち、同じレーンにおける上側のプロット(「癌プローブ」)において観察されるバンドと比較して、下側のプロット(「正常プローブ」)において、より濃い顕著なバンドを示す。「M」と標識されたレーンは、癌および正常細胞においてわずかに過剰発現しているクローンを示唆する。

【0403】B.公共データベース検索結果  
配列番号1、3、5、または7の完全長cDNA配列は、米国同時係属出願第09/385,982号に記載の部分配列を用いて、GenBankのBLAST2検索により得られた。

【0404】5つの配列すべてを分析した。配列は、まず、マスクしてベクター由来の配列を同定し、つづいてマスクを除去した。残った配列情報を用いて、配列表(配列番号1、3、5、または7)を作成した。これらの配列各々は、先に列挙したデータベースに対するBLAST2検索を遂行するためのクエリー配列として使用された。BLAST2検索は、2つの配列の最適整列を作成するために、ギャップの導入を可能とする点で、従\*

\*来のBlast検索と異なる。BLAST2検索において同定された各完全長配列のGenBank記録を用いて、各cDNAによりコードされるアミノ酸配列を得た。

【0405】当業者は、せいぜいルーチンな実験を用いて、本明細書中に記載した本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、または確認することができるであろう。このような具体的な実施形態および均等物は、上述の特許請求の範囲により包括されるものと意図される。

【0406】すべての特許、公開特許出願、および本明細書に引用した刊行物は、本明細書中に全面的に記載されているように、参照することにより援用される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号1の核酸配列を示す。

【図2】配列番号2のアミノ酸配列を示す。

【図3】配列番号3の核酸配列を示す。

【図4】配列番号4のアミノ酸配列を示す。

【図5】配列番号5の核酸配列を示す。

【図6】配列番号6のアミノ酸配列を示す。

【図7】配列番号7の核酸配列を示す。

【図8】配列番号8のアミノ酸配列を示す。

#### SEQUENCE LISTING

<110> Astle, Jon  
Burgess, Christopher  
Dwivedi, Poornima  
Lewis, Marcia  
Molino, Gary  
Myerow, Susan  
Thiagalingam, Arunthathi  
Catino, Theodore  
<120> Novel Human Genes and Gene Expression Products: II  
<130> 1657/1015B  
<140> 09/907,479  
<141> 2001-07-17  
<150> US 09/385,982  
<151> 1999-08-30  
<150> US 09/328,111  
<151> 1999-06-08  
<150> US 60/098,639  
<151> 1988-08-31  
<150> US 60/117,393  
<151> 1998-01-27  
<160> 8  
<170> PatentIn version 3.0  
<210> 1  
<211> 2646  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
atcagcaaca attaaaatat tcacgtgga tctg  
tagttt aataatggac caacatcaac 60  
atttgaataa aacagcagag tcagcatctt caga  
gaaaaa gaaaacaaga cgctgcaatg 120  
gattcaagat gttcttggca gccctgtcat tcag  
ctatat tgctaaagca ctagggtgaa 180  
tcattatgaa aatttccatc actcaaatag aaag  
gagatt tgacatatcc tcttctcttg 240  
ctggtttaat tgatggaagc ttgaaattg gaaa  
tttgct tgtgattgta ttgtaagtt 300  
actttggatc taaactacac agaccgaagt taat  
tggaat tggttgtctc cttatgggaa 360  
ctggaagtat ttgacatct ttaccacatt tctt  
catggg atattatagg tattctaaag 420  
aaaccatata taatccatca gaaaattcaa catc  
aagttt atcaacctgt ttaattaatc 480  
aaaccttata attcaatgga acatcacctg agat  
agtaga aaaagattgt gtaaaggaat 540

ctgggtcaca catgtggatc tatgtcttca tggg  
gaatat gcttcgtggc ataggggaaa 600  
ccccatagt accattgggg atttcatata ttga  
tgattt tgcaaaagaa ggacattctt 660  
ccttgattt aggtagttg aatgcaatag gaat  
gattgg tccagtcatt ggctttgcac 720  
tgggatctct gtttgctaaa atgtacgtgg atat  
tggata ttagatctg agcactatca 780  
gaataactcc taaggactct cgttgggtg gagc  
ttgggtg gcttggtttc cttgtgtctg 840  
gactattttc cattatttct tccataccat tttt  
tttctt gccgaaaaat ccaaataaac 900  
cacaaaaaga aagaaaaatt tcactatcat tgca  
tgtgct gaaaacaaat gatgatagaa 960  
atcaaacagc taatttgacc aaccaaggaa aaaa  
tgttac caaaaatgtg actggttttt 1020  
tccagtcttt gaaaagcatc cttaccaatc ccct  
gtatgt tataatttctg cttttgacat 1080  
tgttacaagt aagcagcttt attggttctt ttac  
ttacgt ctttaaatat atggagcaac 1140  
agtacgttca gtctgcatct catgctaact tttt  
gttggg aatcataacc atcctacgg 1200  
ttgcaactgg aatgttttta ggaggattta tcat  
taaaaa attcaaattg tctttagtgt 1260  
gaattgcaa attttcattt cttacttcca tgat  
atcctt cttgtttcaa cttctatatt 1320  
tccctctaata ctgcgaaagc aatcagttg ccgg  
cctaac cttgacctat gatggaata 1380

attcagtgcc atctcatgta gatgtaccac tttc  
ttattg caactcagag tgcaattgtg 1440  
atgaaagtca gtgggaacca gtctgtggga acaa  
tggaat aacttacctg tcacctgtc 1500

<211> 702  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Asp Gln His Gln His Leu Asn Lys Thr  
 Ala Glu Ser Ala Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Lys Lys Thr Arg Arg Cys Asn Gly  
 Phe Lys Met Phe Leu Ala  
 20 25 30  
  
 Ala Leu Ser Phe Ser Tyr Ile Ala Lys Ala  
 Leu Gly Gly Ile Ile Met  
 35 40 45  
 Lys Ile Ser Ile Thr Gln Ile Glu Arg Arg  
 Phe Asp Ile Ser Ser Ser  
 50 55 60  
 Leu Ala Gly Leu Ile Asp Gly Ser Phe Glu  
 Ile Gly Asn Leu Leu Val  
 65 70 75 80  
  
 Ile Val Phe Val Ser Tyr Phe Gly Ser Lys  
 Leu His Arg Pro Lys Leu  
 85 90 95  
 Ile Gly Ile Gly Cys Leu Leu Met Gly Thr  
 Gly Ser Ile Leu Thr Ser  
 100 105 110  
 Leu Pro His Phe Phe Met Gly Tyr Tyr Arg  
 Tyr Ser Lys Glu Thr His  
 115 120 125  
 Ile Asn Pro Ser Glu Asn Ser Thr Ser Ser  
 Leu Ser Thr Cys Leu Ile  
 130 135 140  
 Asn Gln Thr Leu Ser Phe Asn Gly Thr Ser  
 Pro Glu Ile Val Glu Lys  
 145 150 155 1  
 60  
 Asp Cys Val Lys Glu Ser Gly Ser His Met  
 Trp Ile Tyr Val Phe Met  
 165 170 175  
 Gly Asn Met Leu Arg Gly Ile Gly Glu Thr  
 Pro Ile Val Pro Leu Gly  
 180 185 190  
  
 Ile Ser Tyr Ile Asp Asp Phe Ala Lys Glu  
 Gly His Ser Ser Leu Tyr  
 195 200 205  
 Leu Gly Ser Leu Asn Ala Ile Gly Met Ile  
 Gly Pro Val Ile Gly Phe  
 210 215 220  
 Ala Leu Gly Ser Leu Phe Ala Lys Met Tyr  
 Val Asp Ile Gly Tyr Val  
 225 230 235 2

Ile Gly Ser Phe Thr Tyr Val Phe Lys Tyr  
 Met Glu Gln Gln Tyr Gly  
 355 360 365  
 Gln Ser Ala Ser His Ala Asn Phe Leu Leu  
 Gly Ile Ile Thr Ile Pro  
 370 375 380  
 Thr Val Ala Thr Gly Met Phe Leu Gly Gly  
 Phe Ile Ile Lys Lys Phe  
 385 390 395 4  
 00  
 Lys Leu Ser Leu Val Gly Ile Ala Lys Phe  
 Ser Phe Leu Thr Ser Met  
 405 410 415  
 Ile Ser Phe Leu Phe Gln Leu Leu Tyr Phe  
 Pro Leu Ile Cys Glu Ser  
 420 425 430  
 Lys Ser Val Ala Gly Leu Thr Leu Thr Tyr  
 Asp Gly Asn Asn Ser Val  
 435 440 445  
 Ala Ser His Val Asp Val Pro Leu Ser Tyr  
 Cys Asn Ser Glu Cys Asn  
 450 455 460  
 Cys Asp Glu Ser Gln Trp Glu Pro Val Cys  
 Gly Asn Asn Gly Ile Thr  
 465 470 475 4  
 80  
 Tyr Leu Ser Pro Cys Leu Ala Gly Cys Lys  
 Ser Ser Ser Gly Ile Lys  
 485 490 495  
  
 Lys His Thr Val Phe Tyr Asn Cys Ser Cys  
 Val Glu Val Thr Gly Leu  
 500 505 510  
 Gln Asn Arg Asn Tyr Ser Ala His Leu Gly  
 Glu Cys Pro Arg Asp Asn  
 515 520 525  
 Thr Cys Thr Arg Lys Phe Phe Ile Tyr Val  
 Ala Ile Gln Val Ile Asn  
 530 535 540  
 Ser Leu Phe Ser Ala Thr Gly Gly Thr Thr  
 Phe Ile Leu Leu Thr Val  
 545 550 555 5  
 60  
 Lys Ile Val Gln Pro Glu Leu Lys Ala Leu  
 Ala Met Gly Phe Gln Ser  
 565 570 575  
 Met Val Ile Arg Thr Leu Gly Gly Ile Leu  
 Ala Pro Ile Tyr Phe Gly  
 580 585 590  
 Ala Leu Ile Asp Lys Thr Cys Met Lys Trp  
 Ser Thr Asn Ser Cys Gly  
 595 600 605  
 Ala Gln Gly Ala Cys Arg Ile Tyr Asn Ser

&lt;400&gt; 3

acaggaggag acagcctccc ggcccgggga ggac  
aagtcg ctgccacctt tggctgccga 60  
cgtgattccc tgggacggtc cgtttcctgc cgtc  
aactgc cggccgagtt gggctcctgt 120  
ggttcaggcc ggctccccct tcttggcttc cctt  
ctcccg ctgggccggt ttatcgggag 180  
gagattgtct tccagggcta gcaattggac tttt  
gatgat gtttgacca gcggcaggaa 240  
tagcaggcaa cgtgatttca aagctgggct cagc  
tcatgt ttcttctctc gtgtaatcgc 300  
aaaaccatt ttggagcagg aattccaatc atgt  
ctgtga tgggtgtgag aaagaagggt 360  
acacggaaat gggagaaact cccaggcagg aaca  
cctttt gctgtgatgg ccgcgtcatg 420

atggcccggc aaaagggcat ttctacctg accc  
ttttcc tcatcctggg gacatgtaca 480  
ctcttcttcg cctttgagtg ccgctacctg gctg  
ttcagc tgtctcctgc catccctgta 540  
tttgcctcca tgctcttctt ttctccatg gcta  
cactgt tgaggaccag cttcagtac 600  
cctggagtga ttccctgggc gctaccagat gaag  
cagctt tcatagaaat ggagatagaa 660  
gctaccaatg gtgcgggtcc gggctaccag cgac  
caccgc ctcttatcaa gaatttccag 720  
ataaacaacc agattgtgaa actgaaatac tgtt  
acacat gcaagatctt ccggcctccc 780  
cgggcctccc attgcagcat ctgtgacaac tgtg  
tggagc gcttcgacca tcaactgccc 840  
tgggtgggga attgtgttgg aaagaggaa tacc  
gctact tctacctctt catcctttct 900  
ctctccctcc tcacaatcta tgccttcgcc ttca  
acatcg tctatgtggc cctcaaatct 960  
ttgaaaattg gcttcttggg gacattgaaa gaaa  
ctcctg gaactgttct agaagtctc 1020  
atttgcttct ttactctctg gtccgtctgt ggac  
tgactg gatttcatac ttctcctgtg 1080  
gctctcaacc agacaaccaa tgaagacatc aaag  
gatcat ggacagggaa gaatcgcgtc 1140  
cagaatccct acagccatgg caatattgtg aaga  
actgct gtgaagtgtc gtgtggcccc 1200  
ttgccccca gtgtgctgga tcgaaggggt attt  
tgccac tggaggaaag tgaagtcga 1260

cctcccagta ctcaagagac cagtagcagc ctct  
tgccac agagcccagc cccacagaa 1320  
cacctgaact caaatgagat gccggaggac agca  
gcactc ccgaagagat gccacctcca 1380  
gagccccag agccaccaca ggaggcagct gaag  
ctgaga agtagcctat ctatggaaga 1440  
gacttttgtt tgtgtttaat tagggctatg agag  
atttca ggtgagaagt taaacctgag 1500

Ser Met Ala Thr Leu Leu Arg Thr Ser Phe			
Ser Asp Pro Gly Val Ile			
	100	105	110
Pro Arg Ala Leu Pro Asp Glu Ala Ala Phe			
Ile Glu Met Glu Ile Glu			
	115	120	125
Ala Thr Asn Gly Ala Val Pro Gly Tyr Gln			
Arg Pro Pro Pro Arg Ile			
	130	135	140
Lys Asn Phe Gln Ile Asn Asn Gln Ile Val			
Lys Leu Lys Tyr Cys Tyr			
145	150	155	1
60			
Thr Cys Lys Ile Phe Arg Pro Pro Arg Ala			
Ser His Cys Ser Ile Cys			
	165	170	175
Asp Asn Cys Val Glu Arg Phe Asp His His			
Cys Pro Trp Val Gly Asn			
	180	185	190
Cys Val Gly Lys Arg Asn Tyr Arg Tyr Phe			
Tyr Leu Phe Ile Leu Ser			
	195	200	205
Leu Ser Leu Leu Thr Ile Tyr Val Phe Ala			
Phe Asn Ile Val Tyr Val			
	210	215	220
Ala Leu Lys Ser Leu Lys Ile Gly Phe Leu			
Glu Thr Leu Lys Glu Thr			
225	230	235	2
40			
Pro Gly Thr Val Leu Glu Val Leu Ile Cys			
Phe Phe Thr Leu Trp Ser			
	245	250	255
Val Val Gly Leu Thr Gly Phe His Thr Phe			
Leu Val Ala Leu Asn Gln			
	260	265	270
Thr Thr Asn Glu Asp Ile Lys Gly Ser Trp			
Thr Gly Lys Asn Arg Val			
	275	280	285
Gln Asn Pro Tyr Ser His Gly Asn Ile Val			
Lys Asn Cys Cys Glu Val			
	290	295	300
Leu Cys Gly Pro Leu Pro Pro Ser Val Leu			
Asp Arg Arg Gly Ile Leu			
305	310	315	3
20			
Pro Leu Glu Glu Ser Gly Ser Arg Pro Pro			
Ser Thr Gln Glu Thr Ser			
	325	330	335
Ser Ser Leu Leu Pro Gln Ser Pro Ala Pro			
Thr Glu His Leu Asn Ser			
	340	345	350
Asn Glu Met Pro Glu Asp Ser Ser Thr Pro			

ataaatccta tgaagccaag ctccgccttc tgag  
cagttt tgatttcttc ctactgatg 480  
ccagaattag gcggtcttta ccctcactca ttgg  
gagaca tttctatcaa agaaagaaag 540  
ttccagtatc tgtaaacctt ctgtccaaga attt  
atcaag agagatcaat gactgtatag 600  
gtggaacggt cttaacatt tctaaaagtg gtic  
ttgcag tgctatacgt attggtcacg 660  
ttggaatgca aattgagcac atcattgaaa acat  
tgttgc tgtcaccaaa ggactttcag 720  
aaaaattgcc agagaagtgg gagagcgtga aact  
cctgtt tgtgaaaact gagaaatcgg 780  
ctgcacttcc catcttttcc tcgtttgtca gcaa  
ttggga tgaagccacc aaaagatctt 840  
tgcttaataa gaagaaaaa gaggcaagga gaaa  
acgaag agaaagaaat ttgaaaaac 900  
aaaaggagag gaagaagaag aggcagcagg ctag  
gaagac tgcatcagtt cttagtaaag 960  
atgatgtggc acctgaaagt ggtgatacta cagt  
gaagaa acctgaatca aagaaggaac 1020  
agaccccaga gcatgggaag aaaaaacgtg gcag  
aggaaa agccaagtt aaagcaacaa 1080  
atgaatccga agacgaaatc ccacagctgg tacc  
aatagg aaagaagact ccagctaag 1140  
aaaaagtaga gattcaaaaa catgccacag gaaa  
gaagtc tccagcaaag agtctaatc 1200  
ccagcacacc tcgtgggaag aaaagaaagg cttt  
gccagc atctgagacc caaaagctg 1260  
cagagtctga gaccccaggg aaaagcccag agaa  
gaagcc aaaaatcaaa gaagaggcag 1320

tgaaggaaaa aagtccttcg ctggggaaaa aaga  
tgcgag acagactcca aaaaagccag 1380  
aggccaagtt tttcaccact cctagtaaat ctgt  
gagaaa agcttccac acccccacaa 1440  
aatggcccaa aaaacccaaa taccacagtc gacc  
taaagt cagtgattca actggaagga 1500  
aacctcaatg ctgcctccag agctttttgg aaat  
actcag atcctggccg cctttgtaac 1560  
cttctctaaa cgtcaggcct ggacttaaaa gatt  
ttttaa aacctccata agtagtccag 1620  
gggcggtggc tcacgcctgt aatcccagca cttt  
gggagg ccgaggcagg cggatcacia 1680  
ggtcaacgag atcgagacca tcctggccaa catg  
tgaaa ccctgtctgt accaaaaata 1740  
caaaaattaa ttggcatgg tggggacac ctgt  
aatccc agctactagg gaggctgagg 1800  
caggagaatt gcttgacct gggaggcggg gggt  
gcagtg agccactgca ctccagcctg 1860  
atgacagagc aagactcagt caaaaataaa taaa  
aataat aaaacctc 1908

<210> 6

<211> 517

Lys Leu Arg Leu Leu Ser Ser Phe Asp Phe  
 Phe Leu Thr Asp Ala Arg  
 145 150 155 1  
 60

Ile Arg Arg Leu Leu Pro Ser Leu Ile Gly  
 Arg His Phe Tyr Gln Arg  
 165 170 175

Lys Lys Val Pro Val Ser Val Asn Leu Leu  
 Ser Lys Asn Leu Ser Arg  
 180 185 190

Glu Ile Asn Asp Cys Ile Gly Gly Thr Val  
 Leu Asn Ile Ser Lys Ser  
 195 200 205

Gly Ser Cys Ser Ala Ile Arg Ile Gly His  
 Val Gly Met Gln Ile Glu  
 210 215 220

His Ile Ile Glu Asn Ile Val Ala Val Thr  
 Lys Gly Leu Ser Glu Lys  
 225 230 235 2

Leu Pro Glu Lys Trp Glu Ser Val Lys Leu  
 Leu Phe Val Lys Thr Glu  
 245 250 255

Lys Ser Ala Ala Leu Pro Ile Phe Ser Ser  
 Phe Val Ser Asn Trp Asp  
 260 265 270

Glu Ala Thr Lys Arg Ser Leu Leu Asn Lys  
 Lys Lys Lys Glu Ala Arg  
 275 280 285

Arg Lys Arg Arg Glu Arg Asn Phe Glu Lys  
 Gln Lys Glu Arg Lys Lys  
 290 295 300

Lys Arg Gln Gln Ala Arg Lys Thr Ala Ser  
 Val Leu Ser Lys Asp Asp  
 305 310 315 3

Val Ala Pro Glu Ser Gly Asp Thr Thr Val  
 Lys Lys Pro Glu Ser Lys  
 325 330 335

Lys Glu Gln Thr Pro Glu His Gly Lys Lys  
 Lys Arg Gly Arg Gly Lys  
 340 345 350

Ala Gln Val Lys Ala Thr Asn Glu Ser Glu  
 Asp Glu Ile Pro Gln Leu  
 355 360 365

Val Pro Ile Gly Lys Lys Thr Pro Ala Asn  
 Glu Lys Val Glu Ile Gln  
 370 375 380

Lys His Ala Thr Gly Lys Lys Ser Pro Ala  
 Lys Ser Pro Asn Pro Ser  
 385 390 395 4

00

<210> 7  
 <211> 634  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 gccagccctc ggaaacgga agtgagcggc gggg  
 tcgact gacggtaacg gggcagagag 60  
 gctgttcgca gagctgcgga agatgaatgc caga  
 ggactt ggatctgagc taaaggacag 120  
 tattccagtt actgaacttt cagcaagtgg acct  
 ttgaa agtcatgata ttcttcgaa 180  
 aggtttttct tgtgtgaaaa atgaacttt gcct  
 agtcat ccccttgaat taccagaaaa 240  
 aaatttccag ctcaaccaag ataaatgaa tttt  
 tccaca ctgagaaaca ttcagggtct 300  
 atttgctccg ctaaaattac agatggaatt caag  
 gcagtg cagcaggttc agcgtcttcc 360

atttctttca agtcaaatac tttcactgga tggt  
 ttgagg ggtaatgatg agactattgg 420  
 atttgaggat attcttaatg atccatcaca aagc  
 gaagtc atgggagagc cacacttgat 480  
 ggtggaatat aaacttggtt tactgtaata gtgt  
 gctgtt catggaaacc gagggctgca 540  
 tcttgtttat agtcatcttt gtactgtaat ttga  
 tgtaca caacattaa agtactgaca 600  
 cctgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa  
 634

<210> 8  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 Met Asn Ala Arg Gly Leu Gly Ser Glu Leu  
 Lys Asp Ser Ile Pro Val  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Leu Ser Ala Ser Gly Pro Phe Glu  
 Ser His Asp Leu Leu Arg  
 20 25 30  
 Lys Gly Phe Ser Cys Val Lys Asn Glu Leu  
 Leu Pro Ser His Pro Leu  
 35 40 45  
 Glu Leu Ser Glu Lys Asn Phe Gln Leu Asn  
 Gln Asp Lys Met Asn Phe 【 8 】

50 55 60  
 Figure 8. SEQ ID NO: 8

MNARGLGSELKDSIPVTELSASGPFESHDLRKGFSVCVNELLP  
 SHPLELSEKNFQLNQDKMNFSTLRNIQGLFAPLKLQMEFKAVQQVQRLPFLSSSNLSL  
 5 DVLRGNDETIGFEDILNDPSQSEVMGEPHLMVEYKLGILL

Met Glu Phe Lys Ala Val Gln Gln Val Gln  
 Arg Leu Pro Phe Leu Ser  
 85 90 95  
 Ser Ser Asn Leu Ser Leu Asp Val Leu Arg

【図1】

Figure 1. SEQ ID NO: 1

```

1 atcagcaaca attaaaatat tcacgtggta tctgtagttt aataatggac caacatcaac
5 61 atttgaataa aaacagcagag tcagcatcct cagagaaaaa gaaaacaaga cgctgcaatg
121 gattcaagat gttcttggca gcocctgcat tcagctatat tgctaaagca ctagggtggaa
181 tcattatgaa aatttccatc actcaaatag aaaggagatt tgacatatcc tcttctcttg
241 ctggtttaat tgatggaagc tttgaaattg gaaatttgct tgtgatgta tttgtaagtt
10 301 actttggatc taaactacac agaccgaagt taattggaat tgggtgtctc cttatgggaa
361 ctggaagtat tttgacatct ttaccacatt tcttcatggg atattatagg tattctaaag
421 aaaccatat taatccatca gaaattcaa catcaagttt atcaacctgt ttaattaatc
481 aaacottatc attcaatgga acatcacctg agatagtaga aaaagattgt gtaaaggaat
541 ctgggtcaca catgtggatc tatgtcttca tggggaatat gcttcgtggc ataggggaaa
601 ccccatagtg accattgggg atttcataca ttgatgattt tgcaaaagaa ggacattcct
15 661 ccttgtatth aggtagtttg aatgcaatag gaatgattgg tccagtcatt ggctttgcac
721 tgggatctct gtttgctaaa atgtacgtgg atattggata tgtagatctg agcactatca
781 gaataactcc taaggactct cgttgggttg gagcttggtg gcttggtttc cttgtgtctg
841 gactatthtc cattatthtc tccataccat ttttttctt gccgaaaaat ccaataaacc
901 cacaaaaaga aagaaaaaht tcaactatcat tgcattgtgt gaaaaaaaat gatgatagaa
20 961 atcaaacagc taatttgacc aaccaaggaa aaaatgttac caaaaattgt actggttttt
1021 tccagtcttt gaaaagcacc cttaccacac ccctgtatgt tatatttctg cttttgacat
1081 tgttacaagt aagcagcttt attgggtctt ttacttacgt ctttaaatat atggagcaac
1141 agtacggtca gtctgcatct catgctaact ttttgtggg aatcataacc attcctacgg
1201 ttgcaactgg aatgttttta ggaggattta tcattaaaaa attcaaatg tctttagttg
25 1261 gaattgcaa attttcatth cttacttcga tgatatoctt cttgtttcaa cttctatatt
1321 tccctctaat ctgcgaaagc aaatcagttg ccggcctaac cttgacctat gatggaaata
1381 attcagtggc atctcatgta gatgtaccac tttcttattg caactcagag tgcaattgtg
1441 atgaaagtca gtgggaacca gtctgtggga acaatggaat aacttacctg tcaccttctc
1501 tagcaggatg caaatcctca agtggatatta aaaagcatac agtgttttat aactgtagtt
30 1561 gtgtggaagt aactggcttc cagaacagaa attactcagc acacttgggt gaatgcccaa
1621 gagataatac ttgtacaagg aaatttttca tctatgttgc aattcaagtc ataaactctt
1681 tgttctctgc aacaggaggt accacattta tcttgttgac tgtgaagatt gttcaacctg
1741 aattgaaagc acttgcaatg ggtttccagt caatggttat aagaacacta ggaggaaattc
1801 tagctccaat atatttttggg gctctgattg ataaaacatg tatgaagtgg tccaccaaca
35 1861 gctgtggagc acaaggagct tgtaggatat ataattccgt attttttggg agggcttact
1921 tgggcttatac tatagcttta agattcccag cacttgtttt atatatggt ttcatttttg
1981 ctatgaagaa aaaatttcaa ggaaaaagata ccaaggcacc ggacaatgaa agaaaagtaa
2041 tggatgaagc aaacttagaa ttcttaataa atggtgaaca ttttgtacct tctgctggaa
40 2101 cagatagtaa aacatgtaat ttggacatgc aagacaatgc tgctgccaac taacattgca
2161 ttgattcatt aagatgttat ttttgaggtg ttccctggct ttcactgaca attccaacat
2221 tctttactta cagtggacca atggataagt ctatgcatct ataataaact ataaaaaatg
2281 ggagtacca tggttaggat atagctatgc ctttatggtt aagattagaa tataatgatcc
2341 ataaaaatth aagtgaagag catggttagt gtgtgatata ataaaaagta atgtttggt
45 2401 agttgtaact gctaataaaa ccagtgacta gaatataagg gaggtaaaaa ggacaagata
2461 gattaatagc ctaaataaag agaaaagcct gatgccttha aaaaatgaaa cactttggat
2521 gtattactta ggccaaaatc tggcctggat ttatgctata atatatattt tcatgttaag
2581 ttgtatatth ttcagaaatt ataaatatta ttaatttaaa attcgaaaaa aaaaaaaaaa
2641 aaaaaa
50

```

【図2】

Figure 2. SEQ ID NO: 2

```

MDQHQLNKTAESASSEKKKTRCNGFKMFLAALSFSYIAKALG
5 GIIMKISITQIERRFDISSLAGLIDGSFEIGNLLVIVFVSYPGSKLHRPKLIGIGCL
LMGTGSILTSPLPHFFMGYYRYSKETHINPSENSTSSLSTCLINQTLSPNGTSPPEIVEK
DCVKESGSHMWIYVFMGNMLRGIGETPIVPLGISYIDDFAKEGHSSLYLGLSNAIGMI
GPVIGFALGSLFAKMYVDIGYVDLSTIRITPKDSRWVGAWWLGFVSGLFSIISIPF
10 NPLYVIFLLLTLLQVSSFIGSFYVFKYMEQQYQGSASHANFLLGIITIPVATGMFL
GGFIKFKKLSLVGIAKFSFLTSMISFLFQLLYFPLICESKSVAGLTLTYDGNNSVAS
HVDVPLSYCNSECNCDESQWEPVCGNNGITYLSPCLAGCKSSSGIKKHTVFYNCSCVE
VTGLQNRNYSAHLGECPRDNTCTRKFFIYVAIQVINSLFSATGGTFFILLTVKIVQPE
LKALAMGFQSMVIRTLGGILAPIYFGALIDKTCMKWSTNSCGAQACRIYNSVFFGRV
YLGLSIALRFPALVLYIVFIFAMKKKQKQKDKASDNERKVMDEANLEFLNNGEHFVP
15 SAGTDSKTCNLDMQDNAAAN

```

## 【図3】

Figure 3. SEQ ID NO: 3

1 acaggaggag acagcctccc ggccccggga ggacaagtgc ctgccacctt tggctgccga  
 5 61 cgtgattccc tgggacggtc cgtttcctgc cgtcaactgc cggccgagtt gggctccctg  
 121 ggttcaggcc ggctccccct tccctggctc ccttctcccg ctgggcccgt ttatcgggag  
 181 gagattgtct tccagggcta gcaattggac ttttgatgat gtttgacca gcgcaggaa  
 241 tagcaggcaa cgtgatttca aagctgggct cagctcatgt ttcttctctc gtgtaatcgc  
 301 aaaaccatt ttggagcagg aattccaatc atgtctgtga tgggtgtgag aaagaagggtg  
 361 acacggaaat gggagaaact cccaggcagg aacacctttt gctgtgatgg ccgcgtcatg  
 10 421 atggccccgc aaaagggcat tttctacctg acccttttcc tcatcctggg gacatgtaca  
 481 ctcttctctc cctttgagtg ccgctacctg gctgttcagc tgtctcctgc catcctctga  
 541 tttgctgcca tgctcttctc tttctccatg gctacactgt tgaggaccag cttcagtgac  
 601 cctggagtga ttccctcggc gctaccagat gaagcagctt tcatagaaat ggagatagaa  
 661 gctaccaatg gtgcggtgcc gggctaccag cgaccaccgc ctctgatcaa gaatttccag  
 15 721 ataaacaacc agattgtgaa actgaaatac tgttacacat gcaagatctt ccggcctccc  
 781 cgggcctccc attgcagcat ctgtgacaac tgtgtggagc gcttcgacca tcaactgccc  
 841 tgggtgggga attgtgttgg aaagaggaac taccgctact tctacctctt catcctttct  
 901 ctctccctcc tcacaatcta tgtctctgcc ttcaacatcg totatgtggc cctcaaatct  
 961 ttgaaaattg gcttcttggg gacattgaaa gaaactcctg gaactgttct agaagtccct  
 20 1021 atttgcctct ttacactctg gtccgctctg ggactgactg gatttcatac tttcctcgtg  
 1081 gctctcaacc agacaaccaa tgaagacatc aaaggatcat ggacagggaa gaatcgcgct  
 1141 cagaatccct acagccatgg caatattgtg aagaactgct gtgaagtgtc gtgtggcccc  
 1201 ttgcccccca gtgtgctgga tcgaaggggt attttgccac tggagaaaag tggagtcga  
 1261 cctcccagta ctcaagagac cagtagcagc ctcttgccac agagcccagc ccccacagaa  
 25 1321 cacctgaact caaatgagat gccggaggac agcagcactc ccgaagagat gccacctcca  
 1381 gagccccag agccaccaca ggaggcagct gaagctgaga agtagcctat ctatggaaga  
 1441 gacttttgtt tgtgtttaat tagggctatg agagatttca ggtgagaagt taaacctgag  
 1501 acagagagca agtaagctgt ccctttttaat tgttttctt tgggtcttag tcaaccagtt  
 1561 gcacactggg cattttcttg gctggcaagc tttttttaa atttgctgaa acttcaaggg  
 30 1621 cagtggccag gaaggatgtt cagttcacct ctggataaac tgggaaaaat ggggtctctt  
 1681 ggggccccgc actgggtt

## 【図4】

Figure 4. SEQ ID NO: 4

5 MFLLSCNRKTHFGAGIPIMSVVVRKKVTRKWEKLPGRNTFCCD  
 GRVMMARQKGFYLTFLILGTCTLFFAFECRYLAVQLSPAIPVFAAMLFLFSMATLL  
 RTSFSDPGVIPRALPDEAAFIEMEIEATNGAVPGYQRPPPRIKNFQINNQIVKLKICY  
 TCKIFRPPRASHCSICDNCVERFDHHCWPVGNVCVGRNRYFYLFILSLSLTIYVFA  
 FNIVYVALKSLKIGFLETLEKTPGTVLEVLICFFTLWSVVGLTGFHTFLVALNQTNE  
 DIKGSWTGKNRVQNPYSHGNIVKNCCEVLCGPLPPSVLDRRGILPLEESGSRPPSTQE  
 TSSLLLPQSPAPTEHLNSNEMPEDSSTPEEMPPPEPPEPPQEAEEAEK

## 【図5】

Figure 5. SEQ ID NO: 5

```

1 acaagatgga ggattcggcc tcggcctcgc tgtcttctgc agccgctact ggaacctcca
5 61 cctcgactcc agcggccccg acagcacgga agcagctgga taaagaacag gttagaaagg
121 cagtggacgc tctottgacg cattgcaagt ccaggaaaa caattatggg ttgcttttga
181 atgagaatga aagttttattt ttaatgggtg tattatggaa aattccaagt aaagaactga
241 gggtcagatt gaccttgccct catagtattc gatcagattc agaagatadc tgtttattta
301 cgaaggatga acccaattca actcctgaaa agacagaaca gttttataga aagcttttaa
361 acaagcatgg aattaaaacc gttttctcaga ttatctccct ccaaactcta aagaaggaa
10 421 ataaatccta tgaagccaag ctccgccttc tgagcagttt tgatttcttc cttactgatg
481 ccagaattag gcggctctta cctcactca ttgggagaca tttctatcaa agaagaagag
541 ttccagatc tgaaacctt ctgtccaaga atttatcaag agagatcaat gactgtatag
601 gtggaacggt cttaaacatt tctaaaagtg gttcttgcat tgctatacgt attggtcacg
661 ttggaatgca aattgagcac atcattgaaa acattgttgc tgtcaccaaa ggaotttcag
15 721 aaaaattgcc agagaagtgg gagagcgtga aactcctggt tgtgaaaact gagaaatcgg
781 ctgcacttcc catcttttcc tcgtttgtca gcaattggga tgaagccacc aaaagatcct
841 tgcttaataa gaagaaaaa gaggcaagga gaaaacgaag agaaagaaat tttgaaaaac
901 aaaaggagag gaagaagaag aggcagcagg ctaggaagac tgcacagatt cttagtaaag
961 atgatgtggc acctgaaagt ggtgatacta cagtgaagaa acctgaatca aagaaggaa
20 1021 agaccccaga gcatgggaag aaaaacgtg gcagaggaaa agcccaggtt aaagcaacaa
1081 atgaatccga agacgaaatc ccacagctgg taccaatagg aaagaagact ccagctaata
1141 aaaaagtaga gattcaaaaa catgccacag gaaagaagtc tccagcaaa agtcctaata
1201 ccagcacacc tcgtgggaag aaaagaaagg ctttgccagc atctgagacc caaaagctg
1261 cagagtctga gaccccagg aaaagcccag agaagaagcc aaaaatcaa gaagaggcag
25 1321 tgaaggaaaa aagtccttcg ctggggaaaa aagatgagag acagactcca aaaagccag
1381 aggccaagtt tttcaccact cctagtaaat ctgtgagaaa agcttccac acccccaaaa
1441 aatggcccaa aaaacccaaa taccccagtc gacctaaagt cagtattca actggaagga
1501 aacctcaatg ctgcctccag agctttttgg aaatactcag atcctggccg cttttgtaac
1561 cttctctaaa cgtcaggcct ggacttaaaa gattttttaa aacctccata agtagtccag
30 1621 gggcgggtgc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggagg ccgaggcagg cggatcacia
1681 ggtcaacgag atcgagacca tcctggccaa catggtgaaa ccctgtctgt accaaaaata
1741 caaaaattaa ttggcatgg tgggtggacac ctgtaatccc agctactagg gaggtgagg
1801 caggagaatt gcttgaacct gggaggcggg ggttgcagtg agccactgca ctccagcctg
1861 atgacagagc aagactcagt caaaaataaa taaaataat aaaacctc

```

## 【図6】

Figure 6. SEQ ID NO: 6

```

MEDSASASLSSAAATGTSTSTPAAPTARKQLDKEQVRKAVDALL
5 THCKSRKNNYGLLLNENESLFLMVVLWKI PSKELRVRLTLPHSIRSDSEDI CLFTKDE
PNSTPEKTEQFYRLLNKHGIKTVSQIISLQTLKKEYKSYEAKLRLSSFDFFLTDAR
IRRLPSLIGRHFYQRKKVPVSVNLLSKNLSREINDCIGGTVLNISKSGSCSAIRIGH
VGMQIEHIIENIVAVTKGLSEKLPEKWESVKLLFVKTEKSAALPIFSSFVSNWDEATK
10 RSLLNKKKKEARRRRERNFQKQKRRKQARKTASVLSKDDVAPESGDTTVKKPE
SKKEQTPEHGKKRGRGKAQVKATNESEDEIPQLVPIGKKT PANEKVEIQKHATGKKS
PAKSPNPSTPRGKKRKALPAETPKAAESETPGKSPEKKPKIKEEAVKEKSPSLGKKD
ARQTPKKPEAKFFTPSKSVRKASHTPKKWPKKPKYPSRPKVSDSTGRKPQCCLQSFL
EILRSWPPL

```

## 【図7】

Figure 7. SEQ ID NO: 7

```

1 gccagccctc ggaaacgcca agtgagcggc ggggtcgact gacggtaacg gggcagagag
5 61 gctgttcgca gagctgcgga agatgaatgc cagaggactt ggatctgagc taaaggacag
121 tattccagtt actgaacttt cagcaagtgg accttttgaa agtcatgac ttcttcggaa
181 aggtttttct tgtgtgaaaa atgaactttt gcctagtcac ccccttgaat tatcagaaaa
241 aaatttccag ctcaaccaag ataaaatgaa tttttccaca ctgagaaaca ttcagggtct
301 atttgctccg ctaaaattac agatggaatt caaggcagtg cagcaggttc agcgtcttcc
10 361 atttctttca agctcaaata tttcactgga tgttttgagg ggtaatgatg agactattgg
421 atttgaggat attcttaatg atccatcaca aagcgaagtc atgggagagc cacacttgat
481 ggtggaatat aaacttggtt tactgttaata gtgtgctggt catggaaacc gagggctgca
541 tcttgtttat agtcatcttt gtactgtaat ttgatgtaca caacatataa agtactgaca
601 cctgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト <sup>8</sup> (参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
45/00		43/00	1 0 5 4 H 0 4 5
48/00		C 0 7 K 16/32	
A 6 1 P 35/00		C 1 2 M 1/00	A
43/00	1 0 5	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 16/32		1/68	A
C 1 2 M 1/00		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/02			M
1/68		33/566	
G 0 1 N 33/53		33/574	Z
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566			F
33/574		A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 バージェス クリストファー シー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02090, ウェストウッド, キャントン  
テラス 97

(72)発明者 モリノ ゲイリー エイ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02056, ノーフォーク, エセックス  
ストリート 3

(72)発明者 カティノ セオドア ジェー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02702, アッテルボロー, ジョー ポ  
ール ドライブ 18

(72)発明者 マイロウ スーザン エイチ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02421, レキシントン, エリソン ロ  
ード 5

(72)発明者 ドウィヴェディ プアナジム  
アメリカ合衆国 カリフォルニア, アラ  
モ, ペップル ドライブ 2054

(72)発明者 シアガリンガム アランザッシ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02420, レキシントン, ウインチェス  
ター ドライブ 26

(72)発明者 リーヴァイス マルシア イー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02025, コヘイセット, ホイールライ  
ト ファーム 67

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA61 CA04  
4B029 AA07 BB20 CC03 FA15  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ41  
QQ79 QQ91 QR48 QR51 QR56  
QR62 QR77 QR82 QS25 QS34  
QS36 QX02 QX07  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17  
BA01 BA08 BA21 BA22 BA23  
CA17 MA01 NA14 ZB212  
ZB262  
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01  
GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16  
MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40  
DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	新的人类基因和基因表达产物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003135077A</a>	公开(公告)日	2003-05-13
申请号	JP2002206477	申请日	2002-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳公司		
[标]发明人	アストルジョンエイチ バージェスクリストファーシー カティノセオドアジェー ドウィヴェディプアナイム リーヴァイスマルシアイー モリノゲイリーエイ マイロウスーザンエイチ シアガリンガムアランザッシ		
发明人	アストル ジョン エイチ. バージェス クリストファー シー. カティノ セオドア ジェー. ドウィヴェディ プアナイム リーヴァイス マルシア イー. モリノ ゲイリー エイ. マイロウ スーザン エイチ. シアガリンガム アランザッシ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/32 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/57419		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K16/32 C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.Z C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.F A61K37/02 A61K38/00 A61K38/01 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA04 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ41 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	09/907479 2001-07-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

