

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 530109

(P2003 - 530109A)

(43)公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 48/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 2 4
48/00		C 0 7 K 1/22	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00		14/485	4 B 0 6 4
C 0 7 K 1/22		16/22	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 71数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 575177(P2001 - 575177)

(86) (22)出願日 平成13年4月9日(2001.4.9)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月7日(2002.10.7)

(86)国際出願番号 PCT/FR01/01078

(87)国際公開番号 W001/077323

(87)国際公開日 平成13年10月18日(2001.10.18)

(31)優先権主張番号 00/04517

(32)優先日 平成12年4月7日(2000.4.7)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ
サントゥ エ ドゥ ラ ルシエルシェ
メディカル(イーエヌエスエーエールエム
)
フランス国,エフ - 75013 パリ,リュ ドゥ
トルビア,101

(72)発明者 ビルンボーム,ダニエル
フランス国,エフ - 13009 マルセイユ,ラ
クロワ デュ シュド,リュ パルダシニ
,9

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エルピンをコードする遺伝子及びその診断及び治療的使用

(57)【要約】

本発明は、特に癌の進行に関与するERBB2/HER

- 2 受容体の細胞内部分と相互作用する、エルピンと称

するタンパク質 (ERBB2相互作用タンパク質) をコ

ードする新規遺伝子、新規ヌクレオチド配列及び同定さ

れたアミノ酸の診断及び治療使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2又は4、残基1212～1280が欠失した配列番号2の配列、及び配列番号7の配列のフラグメントのアミノ酸1211～1212間への挿入を有する配列番号2の配列、から成る群から選択されたアミノ酸の配列を含んで成る、エルピンと呼ばれる単離されたポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸。

【請求項3】 配列番号1、配列番号3、ヌクレオチド3957～4163の欠失を有する配列番号1の配列、及び配列番号6のフラグメントのヌクレオチド3956～3957間への挿入を有する配列番号1の配列、から成る群から選択された配列を含んで成る請求項2記載の核酸。

【請求項4】 配列番号5、及び配列番号5のヌクレオチド2347～2535を含んで成る配列、から成る群から選択された単離された核酸配列を含んで成る単離された核酸。

【請求項5】 a) - 配列番号2の残基1～501；

- 配列番号2の残基1279～1371；

- 配列番号2の残基502～1278；

- 配列番号2の残基914～1371；

- 配列番号2の残基1212～1280；

- 配列番号4の残基296～334；

b) - 配列番号7の配列；

c) - ロイシンへのヒスチジン1347の突然変異を有する配列番号2の配列；

- メチオニンへのロイシン1291及びイソロイシンへのフェニルアラニン1293の突然変異を有する配列番号2の配列；

- チロシンへのヒスチジン1347及びアスパラギン酸へのグリシン1348の突然変異を有する配列番号2の配列；及び

- アスパラギンへのトレオニン1316及びセリンへのアルギニン1317の突然変異を有する配列番号2の配列；

から成る群から選択された配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項6】 請求項5記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸。

【請求項7】 請求項2, 3, 4又は6のいずれか1項記載の核酸を含むクローニング及び/又は発現ベクター。

【請求項8】 請求項7記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項9】 請求項2, 3, 4又は6のいずれか1項記載の核酸配列又はその相補的配列と、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で特異的にハイブリダイズする、少なくとも15個のヌクレオチドを含んで成るプローブ又はプライマーを得るためへの請求項2, 3, 4又は6のいずれか1項記載の核酸の使用。

【請求項10】 その配列が配列番号8及び9から成る群から選択されるプローブ。

【請求項11】 その配列が配列番号10~20から成る群から選択されるプライマー。

【請求項12】 組換えポリペプチドの生成方法であって、請求項2, 3, 4又は6のいずれか1項記載の核酸を含むベクターを宿主細胞中にトランスファーし、この細胞を請求項1又は5記載のポリペプチド又は請求項4記載の核酸配列によりコードされるポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養することを含んで成る方法。

【請求項13】 腫瘍、又は腫瘍を進行せしめる素因のインビトロ診断方法であって、

a 1) 請求項2, 3, 4又は6のいずれか1項記載の配列を含んで成る、エルビン遺伝子又はその転写体のすべて又は一部の増幅を可能にする特定のオリゴヌクレオチドの存在下にDNA又はRNAを含む生物学的検体を置き；

b 1) 前記DNA又はRNAを増幅し；

c 1) 前記増幅の生成物を検出し；

d 1) 得られる前記増幅生成物と対照検体により得れるそれらの生成物とを比較し、そしてこの手段において、腫瘍を進行せしめる素因を示す、エルビン遺伝子又はその転写体における可能な異形を検出し；又は

a 2) 請求項 2, 3, 4 又は 6 のいずれか 1 項記載の配列を含んで成る、エルビン遺伝子の転写体のすべて又は一部の増幅を可能にする特定のオリゴヌクレオチドの存在下に、患者からの疑わしい細胞のサンプルを採取することにより得られた、mRNAを含む生物学的検体を置き；

b 2) 前記転写体を増幅し；

c 2) 前記増幅生成物を検出し、そして定量化し；

正常な対照に対してのエルビン転写体の量の変化が腫瘍又は腫瘍の進行の素因を示すことから成る段階を含んで成る方法。

【請求項 14】 請求項 1 又は 5 記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

【請求項 15】 生物学的検体における請求項 1 又は 5 記載のポリペプチドの検出又は精製のためへの請求項14記載の少なくとも 1 つの抗体の使用。

【請求項 16】 腫瘍、又は腫瘍を進行せしめる素因のインビトロ診断方法であって、請求項 1 又は 5 記載のポリペプチドに対して向けられた少なくとも 1 つの抗体と、患者から採取された疑わしい細胞のサンプルから得られた生物学的検体とを、請求項 1 又は 5 記載のポリペプチドと前記抗体又は複数の抗体との間での特定の免疫学的複合体の形成を可能にする条件下で接触せしめ、そして形成され得る特定の免疫学的複合体を検出及び/又は定量化することを含んで成る方法。

【請求項 17】 支持体上にできる限り固定された、請求項14記載の少なくとも 1 つの抗体；

請求項 1 又は 5 記載のポリペプチドと前記抗体との間での特異的抗原/抗体複合体の形成を示すための手段、及び/又は

それらの複合体の定量化のための手段

を含んで成るキット。

【請求項 18】 請求項 2, 3, 4 もしくは 6 のいずれか 1 項記載の核酸、請求項 2, 3, 4 もしくは 6 のいずれか 1 項記載の核酸のアンチセンス核酸、又は請求項 1 もしくは 5 記載のポリペプチド、及び医薬的に許容できるブーケルを含んで成る医薬組成物。

【請求項19】 腫瘍の処理のために意図された薬剤の製造のためへの請求項2, 3, 4又は6のいずれか1項記載の核酸又は請求項1又は5記載のポリペプチドの使用。

【請求項20】 請求項1記載のポリペプチドをコードする遺伝子が無効にされている、非ヒトトランスジェニック動物を得るための方法。

【請求項21】 請求項20記載の方法により得られることができる非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項22】 エルビン及びERBB2受容体の結合を阻害するか又は活性化する分子のスクリーニング方法であって、

- 試験されるべき分子と、

(i) 請求項1記載のポリペプチドを固定することができる、ERBB2/HER2受容体又はそのフラグメントである第1の結合パートナー、及び

(ii) ERBB2/HER2受容体を固定することができる、請求項1記載のポリペプチド又はそのフラグメントである第2の結合パートナーとを接触せしめ、ここで前記第1及び/又は第2の結合パートナーが、検出されるような手段で、必要に応じラベルされ；

- 前記結合パートナー間の相互作用の阻害又は活性化を、試験されるべき前記分子により評価する；

ことを含んで成る方法。

【請求項23】 エルビタンパク質とERBB2/HER2受容体との間の相互作用を高めるか又は低める、エルビンの変異体又はERBB2/HER2の変異体の同定方法であって、

- 請求項1又は5記載のポリペプチドに対して突然変異を行い、そして前記ポリペプチドとERBB2/HER2受容体との相互作用に対するこの突然変異の効果を評価し；又は

- ERBB2/HER2受容体に対して突然変異を行い、そして前記受容体と請求項1又は5記載のポリペプチドとの相互作用に対するこの突然変異の効果を評価することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、受容体ERBB2/HER2と相互作用するエルビン (Erbin) と称するタンパク質をコードする新規遺伝子に関する。

【0002】

ERBB2/HER2は、種々のヒト器官、例えば肝臓、腎臓及び乳房に影響を及ぼす癌（上皮癌）に関係するEGF受容体のファミリーに属する、チロシンキナーゼ活性を有する受容体である（Rossなど、1999; Klapperなど、2000）。この関係は、多くのインビトロ研究が示して来たように、受容体の（チロシンキナーゼと呼ばれる）の酵素活性及びその細胞内シグナル化に直接的に連結される。遺伝子ERBB2は、乳癌の約30%で増幅し、そして患者の生存性に関して、良好でない予後の要因を構成する。受容体が腫瘍細胞上で過剰発現され、そしてそれが悪化された酵素活性を有する事実は、ヒト治療において強烈な興味を引き起こす。2種のアプローチが、この受容体を標的化するために、及びヒトにおけるその腫瘍形成を減じるために、現在使用されている。

【0003】

第1のアプローチは、過剰のERBB2/HER2及び従って、乳癌に使用されるHerceptin（商標）又はTrastuzumab（商標）（GENENTECHにより市販されている）と呼ばれるモノクローナル抗体による腫瘍の増殖の阻止から成る。しかしながら、この薬剤は、試験された女性の半分におてのみ効果的であった。第2野アプローチは、受容体の酵素活性のインヒビターの使用である。このアプローチを用いる投薬は、現在、市場に提供されていない。従って、受容体の活性及び/又は腫瘍におけるその発現を調節できる他の手段の必要性である。

【0004】

本発明者は、受容体の細胞内部分に固定するタンパク質をコードし、ERBB2の特定の新規アダプターを構成し、そしてその非細胞局在化に包含される新規遺伝子を正確に同定することそ管理して来た。この新規タンパク質は、“ERBB2相互作用タンパク質”のためのエルビンと呼ばれて来た。

配列番号1の配列が読み取り枠（ORF）に対応するヒトにおけるエルビン遺伝

子のcDNAを表す配列の列挙がこれに関して添付されている。このORF（配列番号1上のヌクレオチド324～4436）は、配列が配列番号2で表される1371個のアミノ酸タンパク質をコードする。

【0005】

次の3種の領域がタンパク質に定義されている：

- LRRモチーフを含むアミノ末端領域（残基1～501）；
- PDZドメインを含んで成るカルボキシ末端領域（残基1279～1371）；
- 中央領域（残基502～1278）。これは、他のタンパク質においては保持されないエルビンの特定の領域であり、その機能は、エルビンの機能又はその局在化に関係する酵素活性（ホスファターゼ、キナーゼ、等）を伴って又はそれを伴わないで他のタンパク質を固定することである。

【0006】

このタンパク質フラグメント又はこのフラグメントを含んで成るポリペプチドはまた、本発明の一部を形成する。会合は、構成的であり、又はエルビンの後トランスダクション修飾（リン酸化）により調節され得る。この領域の主要配列に関しては、シトソールタンパク質のドメインSH3又はWWIは、残基971～977、残基1100～1105、残基1115～1121上に同定され得る。このタンパク質フラグメント、又はそれらのフラグメントを含んで成るペプチド又はポリペプチドはまた、本発明の一部を形成する。

【0007】

添付される配列の列挙はまた、マウスにおけるエルビン遺伝子のcDNAのフラグメントを含んで成り（配列番号3）、このコード部分（配列番号3のヌクレオチド1～1485）は、配列番号4により表される、495個のアミノ酸の不完全タンパク質をコードする。

このマウスペプチド配列は、ヒトエルビンのペプチド配列に対して相同であり（配列番号2のヒト配列の残基914～1371間で、タンパク質又はヌクレオチドで80%以上の同一性）、但し、マウス配列に対して特異的である配列番号4の残基296～334のペプチド（配列番号3上のヌクレオチド889～1006に対応する）を除く。それらの特定のネズミフラグメントもまた、本発明の一部を形成する。

【0008】

配列番号5の配列は、マウスエルビンの一部のゲノム配列を含んで成る。それは、エルビンの第1のエキソン（ヒト配列と94%の同一性を有し、そしてヒト配列に対して100%同一である、配列番号4上のマウスエルビンの残基1～63をコードする、配列番号5上のヌクレオチド2347～2535）を含む。配列番号5上のヌクレオチド2347～2535を含んで成る配列を含む単離された核酸はまた、本発明の一部を形成する。

配列番号6の配列は、変異体においてその読み取り枠を保持する、ヒトエルビン（配列番号1）のヌクレオチド3956と3957との間に挿入されることが見出されているヌクレオチド配列である。

【0009】

配列番号6の配列は、配列番号2のアミノ酸1211と1212の間に挿入される配列番号7のペプチドをコードする。

配列番号8の配列は、エルビンのヒト配列の5'側におけるプローブ（配列番号1のヌクレオチド74～750）であり、そして配列番号9の配列はその3'側におけるプローブ（配列番号1のヌクレオチド4240～4600）である。

【0010】

配列番号10～20の配列は、次の表に従って、PCRによりヒトエルビンのcDNAを増殖するための有用なトリガーである：

配列番号	配列番号1条のヌクレオチドの対応
10	136～166
11	174～205
12	327～350
13	2788～2809
14	2812～2840
15	2892～2922
16	2933～3036
17	3199～3230
18	3339～3371

19 4458 ~ 4486

20 4490 ~ 4518

【0011】

配列番号21の配列は、ERBB2の最後の9個のカルボキシ末端アミノ酸を表す。

従って、本発明の目的は、配列番号1, 3又は5の配列を含んで成る単離された核酸である。これはまた、下記のように定義される相同配列もまた包含することが理解される：

- i) 配列番号1, 3又は5の配列の少なくとも70%に対して類似する配列；
- ii) 配列番号1, 3又は5の配列、又はその相補的配列と、緊縮ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする配列；又は
- ii) 前で定義されたように、エルビンと呼ばれるポリペプチドをコードする配列。

【0012】

好ましくは、本発明の相同ヌクレオチド配列は、配列番号1, 3又は5の配列の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、又は少なくとも90%に類似する。

好ましい態様においては、そのような相同ヌクレオチド配列は、配列番号1, 3又は5の配列の相補的配列に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする。パラメーターは、対合した鎖の50%が分離する温度 (T_m) に依存する緊縮性の条件を定義する。

【0013】

30個以上の塩基を含んで成る配列に関しては、 T_m は次の関係により定義される： $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G + C) + 16.6 \text{ Log} (\text{カチオンの濃度}) - 0.63 (\%ホルムアミド) - (600/\text{塩基の数})$ (Sambrookなど, 1989)。

30個の以下の長さの配列に関しては、 T_m は次の関係により定義される： $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$ 。

特定配列がハイブリダイズしない緊縮性の適切な条件においては、ハイブリダイゼーション温度は好ましくは、 T_m より5 ~ 10 低く、そして使用されるハイブリダイゼーション緩衝液は好ましくは高いイオン力の溶液、例えば溶液6 × SSC

である。

【0014】

上記で使用される用語“類似する配列”とは、比較されるヌクレオチド間での完全な類似性又は同一性を言及するだけでなく、また類似性として定義される不完全な類似性も言及する。核酸配列における類似性についてのこの調査は、例えばプリン及びピリミジンを区別する。

従って、配列番号1, 3又は5で表されるORFに対して相同のヌクレオチド配列は、1又は複数の塩基の突然変異、挿入、欠失又は置換により、又は下記に定義されるようにエルビンの生物学的活性を有するポリペプチドをコードする限り、遺伝子コードの縮重により、配列番号1, 3又は5の配列とは異なるいずれかのヌクレオチド配列を包含する。

【0015】

そのような相同配列の中には、エンビンをコードするヒト以外の哺乳類、好ましくは霊長類、ウシ、羊又はブタ、もしくはさらに嚙歯動物の遺伝子の配列、及びその対立遺伝子変異体が包含される。

本発明はまた、配列番号2又は4のアミノ酸配列を含んで成る、エルビンと呼ばれる単離されたポリペプチドにも関する。これはまた、下記のように定義される相同配列を包含することが理解される：

- i) 配列番号2又は4の配列の少なくとも70%に対して類似する配列；
- ii) 前に定義されるような相同核酸配列によりコードされる配列、いわゆる、配列番号2又は4の配列又はその相補的配列と、緊縮ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸配列。

【0016】

ここで、上記で使用される用語“類似する配列”とは、比較されるアミノ酸間での完全な類似性又は同一性のみならず、また類似性として定義される非完全類似性も言及する。ポリペプチド配列における類似性についてのこの調査は、同じ類似のアミノ酸の置換、例えば荷電されていない側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン及びチロシン）によるアミノ酸の置換、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン及びヒスチジン）によるアミノ酸の置換、酸

性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）によるアミノ酸の置換、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、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、トリプトファン又はシステイン）によるアミノ酸の置換である保存性置換を説明する。

【0017】

従って、より一般的には、“アミノ酸の相同配列”とは、アミノ酸又は減じられた数のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入により、特にそれらの修飾がエルビンの生物学的活性を有意に損傷しないような位置での非天然のアミノ酸又は偽アミノ酸による天然のアミノ酸の置換により、配列番号2又は4の配列とは異なるアミノ酸のいずれかの配列を意味することが理解される。

好ましくは、そのようなアミノ酸の相同配列は、配列番号2又は4の配列の少なくとも85%、好ましくは少なくとも95%に類似する。

【0018】

相同性は、一般的に、配列分析ソフトウェア（例えば、Genetics Computer Group, University Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705のSequence Analysis Software Package）を用いて決定される。類似するアミノ酸配列は、最大の程度の相同性（すなわち、上記で定義されるような同一性又は類似性）を得るために整列される。このためには、配列中に人工的にギャップを導入すると必要である。最適な一列整列が達成されると、相同性の程度は、比較される2種の配列のアミノ酸が同一であるすべての位置を、すべての数の位置に対して記録することによって確立される。

【0019】

“エルビンの生物学的活性”とは、ERBB2/HER2受容体の細胞内部分上に固定するその能力、及びそれがシグナルのトランスダクションに関係することができる場合、基底外側上皮に対して受容体を標的化するその能力を言及する。

本発明はまた、エルビンの変異体、例えば次の2種の変異体にも関する：

- 読み取り枠を保持する、ヌクレオチド3957～4153の欠失を有する、配列番号1の配列を含んで成る“1302”と称する変異体、この変異体によりコードされるタンパク質は、残基1212～1280から欠失された配列番号2の配列を配列として有

する。配列番号2のアミノ酸1212~1280の配列を含んで成る単離されたポリペプチドもまた、本発明の一部を形成する。

【0020】

- 配列番号7のポリペプチドをコードする配列番号6のフラグメントのこの配列のヌクレオチド3956と3957との間に挿入を有する配列番号1の配列を含んで成る“1419”と称する変異体。

本明細書における配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号2のアミノ酸の配列に関するすべての参照は、それらの変異体に拡張する。

本発明はまた、配列番号7の配列のペプチド、及びこのペプチドをコードする核酸、例えば配列番号6の配列の核酸にも関する。

【0021】

本発明のポリペプチドは、当業者に良く知られているすべての方法により合成され得る。本発明のポリペプチドは例えば、合成化学の技法、例えば純度、抗原特異性、所望しない第2の生成物の不在及び生成のその容易さのために好都合であるMerryfield型の合成により合成され得る。

組換えタンパク質はまた、配列番号1又は3の配列又はその相同配列を含んで成る核酸を含むベクターが、その対応するポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養される宿主細胞中にトランスファーされる方法により生成され得る。

次に、生成されるタンパク質が回収され、そして精製され得る。

【0022】

使用される精製方法は当業者に知られている。得られる組換えポリペプチドは、個々に又は組合して使用される方法、例えば分別、クロマトグラフィー方法、特定のモノクローナル又はポリクローナル抗体の助けを伴った免疫親和性の技法、等の方法により、培養培地の上清液からの溶解物及び細胞抽出物から精製され得る。

エンピンをコードする興味する核酸配列は、発現ベクター中に挿入され、ここでそれは、その発現の調節を可能にする要素、例えば転写の特定のプロモーター、活性化因子及び/又はターミネーターに操作態様で結合される。

【0023】

ヌクレオチド配列の発現を制御するシグナル（プロモーター、活性化因子、ターミネーター配列、等）が、使用される細胞宿主の機能として選択される。この目的のためには、本発明のヌクレオチド配列は、選択された宿主内での自律複製を有するベクター、又は選択された宿主と統合するベクター中に挿入され得る。いくつかのベクターは、当業者により現在使用される方法に従って調製され得、そしてそれに起因するクローンが標準の方法、例えばエレクトロポレーション、又はリン酸カルシウムによる沈殿により、適切な宿主中に導入され得る。

本発明に従って定義されるヌクレオチド配列を含む、上記のようなクローニング及び/又は発現ベクターはまた、本発明の一部を形成する。

【0024】

本発明はまた、それらの発現ベクターにより、一時的又は安定した態様でトランスフェクトされた宿主細胞にも関する。それらの細胞は、上記で定義されたようなベクター中に挿入されたヌクレオチド配列の宿主細胞、原核生物又は真核生物中への導入、次にトランスフェクトされたヌクレオチド配列の複製及び/又は発現を可能にする条件下での前記細胞の培養により得られる。

宿主細胞の例は特に、哺乳類の細胞、例えば細胞COS - 7, 293, MDCK, 昆虫細胞、例えば細胞SF9、細菌細胞、例えばE. コリ及び酵母株の細胞、例えばL40及びY90を包含する。

【0025】

本発明のヌクレオチド配列は、人工的起源のものであっても又はそうでなくても良い。それらは、配列番号1, 3, 5又は6の配列に基づいて開発されたプローブにより、配列のバンクをスクリーニングすることにより得られるDNA又はRNA配列であり得る。そのようなバンクは、当業者に知られている分子生物学の従来の技法により調製され得る。

本発明のヌクレオチド配列はまた、化学合成により、又はさらに、バンクのスクローニングにより得られる配列の化学的又は酵素的修飾を包含する混合された方法により調製され得る。

【0026】

本発明のヌクレオチド配列は、本発明の配列番号1, 3, 5又は6の配列、又

はその相補的鎖と特異的にハイブリダイズするプローブ又はプライマーの生成を可能にする。適切なハイブリダイゼーション条件は、好ましくは、前に定義されたような緊縮条件下で、当業者により通常使用される温度及びイオン強度の条件に対応する。それらのプローブは、ハイブリダイゼーション実験による、特に、生物学的検体における本発明のポリペプチドの特定の転写体の“現場”ハイブリダイゼーションによる検出のための、又は多型現象、突然変異又は良好でないスプライシングに起因する異常型合成又は遺伝子異常を示すためのインビトロ診断手段として使用され得る。

【0027】

プローブとして有用である本発明の核酸は、最少15個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも20個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100個のヌクレオチドを有する。

プライマーとして有用である核酸は、少なくとも15個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも18個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも40個のヌクレオチドを有する。

より正確には、本発明は、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1の核酸配列又はその相補体の1つに対して特異的にハイブリダイズする、少なくとも15個のヌクレオチドを有する核酸に関する。

【0028】

配列番号8、又は9の配列から成る核酸は、例えばプローブとして使用され得る。

配列番号1のヌクレオチド1～750からの核酸のフラグメント、及び配列番号1のヌクレオチド4240～6412からの核酸のフラグメントをプローブとして使用することも可能である。

配列番号10～20の配列から成る核酸を、増幅のために（例えば、PCRにより）、プライマーとして使用することがまた可能である。

本発明のプローブ又はプライマーは好ましくは、それらの使用前、ラベルされる。このためには、種々の技法、例えば蛍光、放射能、化学ルミネセント又は酵素ラベリング技法は、当業者の範囲内である。

【0029】

それらのオリゴヌクレオチドが、エルビン遺伝子のレベルで、突然変異又はゲノム修飾の検出のために使用されるインビトロでの診断方法は、本発明に包含される。

当業者は、生物学的検体に含まれるDNAを分析し、そして遺伝子疾患を診断するための標準の方法を良く知っている。遺伝子型分析のための多くの方法が入手できる (Antonarakisなど, 1989; Cooperなど, 1991)。

【0030】

DGGE方法 (変性グラジエントゲル電気分解)、SSCP方法 (一本鎖コンホメーション多形現象) 又はDHPLC方法 (変性高性能液体クロマトグラフィー; Kuklinなど, 1997; Huberなど, 1995) は好ましくは、エルビン遺伝子における異形を検出するために使用され得る。そのような方法に続いて、好ましくは直接的な配列決定が伴う。RT-PCR方法は、転写体のレベルでの1又はいくつかのエキシソンの損失、又は隠れた部位の活性化による異常型スプライシングを引き起こすスプライシング突然変異の結果を示すことを可能にするので、エルビンの転写体における異形を検出するために都合良く使用され得る。この方法に続いて、また好ましくは、直接的な配列決定が伴う。DNAチップを用いての最も最近開発された方法はまた、エルビン遺伝子における異形を検出するためにも使用され得る (Bellisなど, 1997)。

【0031】

エルビン遺伝子のクローニング、及び腫瘍の進行を担当する種々の突然変異の同定は、直接的な診断の認識を可能にする。従って、本発明は、転写体における配列番号1, 3, 5又は6の核酸配列を含んで成るものとして定義される、エルビン遺伝子における異形の検出について前で定義されるような少なくとも1つの核酸の使用に関する。

従って、本発明は、腫瘍、又は腫瘍の進行の素因をインビトロ診断するための方法に関して、ここで前記方法は、

【0032】

- 配列番号1, 3, 5又は6の配列を含んで成るよう定義される、エルビン遺

伝子又はその転写体のすべて又は一部の増幅を可能にする特定のオリゴヌクレオチドの存在下にDNA又はRNAを含む生物学的検体を置き；

- 前記DNA又はRNAを増幅し；
- 前記増幅の生成物を検出し；
- 得られる前記増幅生成物と対照検体により得れるそれらの生成物とを比較し、そしてこの手段において、腫瘍を進行せしめる素因を示す、エルビン遺伝子又はその転写体における可能な異形を検出することから成る。

問題の生物学的検体は特に血液、又は患者から採取される組織のフラグメントであり得る。

【0033】

エルビンの発現は癌細胞上に見出されるので、患者から採取された疑わしい組織サンプルからのこのタンパク質の発現を評価する方法がまた特に、病理解剖学における診断試験において好都合である。

それらの方法は、エルビンをコードするmRNA、又はタンパク質エルビン自体を検出することを目的とすることができる。

【0034】

第1の態様によれば、本発明は、腫瘍、又は腫瘍の進行の素因をインビトロ診断するための方法に関し、ここで前記方法は、

- 配列番号1、3、5又は6の配列を含んで成るよう定義される、エルビン遺伝子の転写体のすべて又は一部の増幅を可能にする特定のオリゴヌクレオチドの存在下に、患者からの疑わしい細胞のサンプルを採取することにより得られた、mRNAを含む生物学的検体を置き；

- 前記転写体を増幅し；
- 前記増幅生成物を検出し、そして定量化し；

正常な対照に対してのエルビン転写体の量の変化が腫瘍又は腫瘍の進行の素因を示すことから成る。

【0035】

第2の態様によれば、本発明は、生物学的サンプルにおけるエルビンの発現速度の検出又は測定のためのインビトロ方法に関し、ここで前記方法は、エウビン

に対して指図された少なくとも1つの抗体と、患者から採取された疑わしい細胞のサンプルから得られた生物学的検体とを、エルビンと前記抗体又は複数の抗体との間での特定の免疫学的複合体の可能な形成、及び形成され得る特定の免疫学的複合体の検出及び/又は定量化を可能にする条件下で接触せしめることを含んで成る。

【0036】

本発明は、より特定には、患者の採取された疑わしい細胞のサンプルから得られた生物学的検体上での腫瘍又は腫瘍の進行の素因のインビトロ検出のための上記方法の実施に関する。

正常とは異なる量でのエルビタンパク質又は遺伝子の転写体の存在は、例えば腫瘍の攻撃性に関して、多かれ少なかれ、重度の予後に相互関係している。

本発明はまた、前に定義されたようなポリペプチドエルビンに対して、又はその特定のフラグメント、例えば配列番号2の配列の残基502~1278間に定義されるフラグメントに対して、又は好都合には、配列番号2の配列の残基914~1371間に定義されるフラグメントに対して向けられた抗体にも関する。

【0037】

それらは、モノクローナル抗体又はそのフラグメント、キメラ抗体、特にヒト適合された又は免疫接合された抗体であり得る。

ポリクローナル抗体は、通常の操作方法に従って、ポリペプチドに対して免疫化された動物の血清から得られる。

【0038】

本発明の1つの態様によれば、反応性残基の介在を通してタンパク質又はもう1つのペプチドに結合され得る、上記で定義されるような適切なペプチドフラグメントを抗原として使用することは可能である。ウサギが、Benoitなど、(1982)により記載される方法に従って、1mgのペプチド抗原により免疫化される。週4度の間隔で、動物は、200 μ gの抗原の注射により処理され、そして10~14日後、採血される。3度目の注射の後、抗血清が、クロラミン-T方法により調製された、ヨウ素により放射性標識された抗原生ペプチドに結合するその能力を決定するために試験され、そして次に、カルボキシメチルセルロース(CMC)イオン交

換カラムクロマトグラフィーにより精製される。次に、抗体分子が哺乳類から集められ、そして当業者に知られている方法、例えばIgG画分を得るためにDEAE Sephadexを用いて、所望する濃度が達成されるまで、単離される。

【0039】

ポリクローナル血清の特異性を高めるために、抗体は、固相上での免疫化ポリペプチドを用いて、免疫親和性クロマトグラフィーにより精製され得る。前記抗体は、固相において免疫学的複合体を形成するために、抗体分子とポリペプチドとの免疫反応を引き起こすのに十分な期間、固相上で免疫化ポリペプチドと接触せしめられる。

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein (1975) により記載されるハイブリドーマ培養の従来の方法に従って得られる。

【0040】

本発明の抗体又は抗体フラグメントは例えば、キメラ抗体、ヒト適合化された抗体、フラグメントFab及びF(ab')₂であり得る。それらはまた、免疫接合体又はラベルされた抗体の形で提供され得る。

本発明の抗体は、特にモノクローナル抗体は、特に、特定の組織の断片の免疫組織化学による、例えば免疫蛍光、金ラベリング、イムノペルオキシダーゼによる分析のために使用され得る。

【0041】

このようにして生成される抗体は好都合には、エルビンの発現が観察されるべきであるいずれかの状況下で使用され得る。

本発明は、より一般的には、生物学的検体における、前で定義されたようなポリペプチドの検出又は精製への、このようにして生成された少なくとも1つの抗体の使用に関する。

【0042】

本発明はまた、

- 支持体上にできる限り固定された、エルビンに対する少なくとも1つの抗体
- ;
- エルビンと前記抗体との間での特定の抗原/抗体複合体の形成を示すための

手段、及び/又はそれらの複合体の定量化のための手段を含んで成る、この方法を実施するためのキットにも関する。

【0043】

本発明はまた、エルビン遺伝子が無効にされているトランスジェニック非ヒト動物、好ましくはマウスを得るための方法にも関する。この方法により得られる動物はまた、本発明の一部を形成する。この遺伝子に関して“ノックアウト”と称するそのような動物は、腫瘍を制御するか、又は他方では、ある分子の細胞毒性を評価するために、腫瘍候補体を進行せしめる感受性を研究するための有用なモデルである。

【0044】

本発明のポリペプチド又はこのポリペプチドをコードする核酸は、例えば修飾されたエルビンの発現が観察される腫瘍の処理のための、及び野生型エルビンの活性を回復せしめることが要求されるそれらの処理のための医薬として有用である。それらは、癌を包含するいずれかのタイプの腫瘍であるが、しかしまた、脳に影響を与える腫瘍でもあり得る。

本発明はまた、前に定義されたようなポリペプチド、又は前記ポリペプチドをコードする核酸、及び医薬的に許容できるビークルを含んで成る医薬組成物に関する。

【0045】

少なくとも1つのポリペプチドを含む本発明の医薬組成物の投与の形態、薬量学及び生薬形は、当業者により有用な態様で、特に、患者に適合される治療処理の確立を一般的に考慮しての基準、例えば患者の年齢又は体重、患者の一般的な状態の重症度、処理の耐性及び観察される二次効果に従って決定され得る。

概して、約0.1 μ g～約1mgの治療的又は予防的に有効な量が、ヒト成人に投与され得る。

【0046】

本発明はまた、エルビンをコードする、前で定義されたような核酸及び医薬的に許容できるビークルを含んで成る医薬組成物に関し、前記組成物は、遺伝子療法への使用のために意図される。好ましくは、ベクター、一般的にウィルスベク

ター（例えば、アデノウィルス又はレトロウィルス）中に挿入される核酸は、標的細胞経のトランスファーのための好ましいいずれかのビークル、例えばアニオン性リポソーム、カチオン性脂質、微粒子、例えば金微粒子、沈殿剤、例えばリン酸カルシウム、又はトランスフェクションを促進するいずれか他の剤も有さない裸形で投与され得る。この場合、ポリヌクレオチドが、ビークルの存在又は不在下で、生理学的に許容できる溶液、例えば無菌溶液、又は無菌緩衝溶液に単純に希釈され得る。

【0047】

他方では、本発明の核酸は、トランスフェクションを促進する剤により結合され得る。それは、中でも、(i)細胞透過性を変性する化学薬品、例えばブピバカインにより結合され；(ii)たぶん、トランスフェクションを促進する補充物質の存在下で、リポソームに封入され；又は(iii)カチオン性脂質、又はシリカ、金又はタングステンの微粒子により結合され得る。

本発明の核酸構造体が微粒子をおおう場合、それらの後者は、“遺伝子ガン”技法(W094/24263号)を用いて、経皮内又は表皮内経路により注入され得る。

【0048】

薬剤として使用されるべき量は、特に、核酸構造体自体、この核酸が投与される個人、製剤の投与の態様及び型、及び病理学に依存する。概して、約0.1 μ g～約1mg、好ましくは約1 μ g～約800 μ g、より好ましくは約25 μ g～約250 μ gの治療的又は予防的有効量が、ヒト成人に投与され得る。

本発明の核酸構造体は、いずれかの従来投与経路、例えば特に、非経口投与され得る。投与経路の選択は、特に選択される製剤に依存する。関連する腫瘍の部位で標的化された投与が特に好都合である。

最終的に、本発明は、有効量の、前で定義されたようなエルビンポリペプチド、又はこのポリペプチドをコードする核酸が、治療処理に必要な患者に、遺伝子療法の骨格内で投与さえる治療処理方法に関する。

【0049】

関与する患者は一般的にヒトであるが、しかしその適用は、適切な場合、いずれの哺乳類にも拡張され得る。

本発明のもう1つの観点は、ERBB2/HER2受容体が関与する癌性腫瘍に関し、ここで前記受容体の過剰発現がしばしば観察される。中でも、それらの腫瘍は、より特定には、例えば肝臓、腎臓又は結腸に影響を及ぼす癌（上皮癌）を包含する。

次に、1つの方法は、受容体を非局在化するために、エルビンと受容体との間の相互作用を阻害することであり得る。

もう1つの方法は、例えばエルビン遺伝子の裸RNAの転写を妨げられるアンチセンスオリゴヌクレオチドにより、生来のエルビンの発現を阻止することから成る。

【0050】

従って、本発明はまた、エルビン及びERBB2受容体の結合を阻害するそのような分子をスクリーニングするための方法にも関し、ここで前記方法は、試験されるべき分子と、

(i) エルビンを固定することができる、ERBB2/HER2受容体又はそのフラグメントである第1の結合パートナー、及び

(ii) 前記受容体に固定することができる、エルビン又はそのフラグメントである第2の結合パートナーとを接触せしめ、ここで前記第1及び/又は第2の結合パートナーは、検出されるような手段で、ラベルされ、そして

前記結合パートナー間の相互作用の阻害を、試験されるべき前記分子により評価することを含んで成る。

【0051】

例えばELISA又はIRMA型のそれらの競争結合試験を行うためには、エルビンに固定するERBB2/HER2受容体のフラグメントが使用される。このフラグメントは、受容体の9個の最後のC-末端アミノ酸、すなわち配列番号21により表される配列EYLGLDVPVを少なくとも含んで成る。他方では、受容体に固定する組換えエルビン又はそのフラグメント、すなわちエルビンのPDZドメインを含んで成るフラグメントを使用することが可能である。

【0052】

それらの結合パートナーの1つ又は他のパートナーは、検出できる態様、すな

わち当業者に良く知られているタンパク質をラベリングするための手段でラベルされる。これは、有用な免疫蛍光インジケータである染色蛍光色素を形成するために、変性を伴わないで、タンパク質に化学的に結合する蛍光ラベリング剤であり得る。ラベリング剤はまた、ペルオキシダーゼ (HRP) 又はグルコースオキシダーゼのような酵素であり得る。放射性要素もまた、ラベリング剤として使用され得る。

【0053】

好ましい態様においては、ビオチン、グルタチオン - s - トランスフェラーゼ、ポリヒスチジンのタイプのタンパク質に融合されるか又は結合されるタンパク質 (好ましくは、エルビン) が使用され得る。

結合パートナー (好ましくは、受容体) の1つの又は他のパートナーは、固相 (膜、ビーズ、プラスチック、等) 上に都合良く固定され得る。

従って、結合パートナー間の相互作用は、酵素試験、蛍光又はオートラジオグラフィにより示される。

【0054】

次に、この方法により選択される阻害性を有する分子は、哺乳類の細胞において又は生成されるERBB1/HER2受容体の沈殿の試験にゆだねられ得る。受容体は、エルビンのPDZドメインを含んで成る組換えタンパク質により細胞溶解物から沈殿せめられ、そしてウェスタンブロット又はもう1つの十分に感受性の方法により表される。

エルビン - 受容体相互作用の阻害活性が確認されている分子は、受容体の非局在化を誘発するそれらの能力を評価するために、分極化された上皮細胞に対して試験されるよう維持される。

【0055】

他方では、酵母における三重 - ハイブリッド試験がこの目的のために行なわれ得る (Zhang J. など, 1995)。

このようにしてスクリーンされた分子は、受容体を非局在化し、そしてそれを不活性化するために、腫瘍細胞におけるエルビンとERBB2との間の相互作用を阻害することから成る抗癌治療方法において卓越した候補体を表す。

逆に言えば、エルビン - 受容体相互作用が正常な対照に対して低められるよう、個々が変更されたエルビタンパク質又は突然変異誘発されたERBB2受容体を発現する場合、この相互作用の活性化因子を調査することが好都合である。

【0056】

最終的に、上記インヒビターのスクリーニング方法のモデルに基づいて、又は三重 - ハイブリッド技法により容易に実施され得る、エルビン及びERBB2受容体の結合を活性化する分子のスクリーニングするための方法が提案される。

本発明はまた、このタンパク質とERBB2との間の相互作用を高めるか又は低めるエルビンの変異体の同定方法にも関し、ここで突然変異はエルビンに対してもたらされ、そしてエルビンとERBB2受容体の相互作用に対するこの突然変異の効果が評価される。

【0057】

突然変異誘発は、当業者に知られている技法に従って、偶然に標的化されるか、又は達成され得る。突然変異の効果の評価は、ERBB2の沈殿の試験又は二重 - ハイブリッド試験により、又はさらに発現バンクにより達成され得る。

この後者の技法においては、突然変異誘発されたPDZドメインが、培養ボックス上に拡張されたファージ又は細菌により発現される。ニトロセルロース型の膜上への生成されるタンパク質のトランスファーの後、放射能、ビオチニル化又は他の方法によりラベルされたERBB2のペプチドが前記膜と共にインキュベートされる。相互作用を破壊し、そしてペプチドをもはや固定しない変異体が採取され、そしてヌクレオチド配列が導入される突然変異を知るために分析される。

【0058】

本発明はまた、このタンパク質のPDZドメインとERBB2との間の相互作用を高めるか又は低めるエルビンの変異体にも関する。

ロイシンへのヒスチジン（位置1347）の突然変異（変異体HL）、又はメチオニンへの残基ロイシン（位置1291）及びイソロイシンへのフェニルアラニン（位置1293）の突然変異（変異体MI）は特に、エルビンのPDZドメインとERBB2との間の相互作用の上昇を引き起こす。

【0059】

他方では、チロシンへのヒスチジン（位置1347）及びアスパラギン酸へのグリシン（位置1348）の突然変異（変異体YD）、又はアスパラギンへのトレオニン（位置1316）及びセリンへのアルギニン（位置1317）の突然変異（変異体NS）は、エルビンのPDZドメインとERBB2との間の相互作用の低下を引き起こす。

本発明はまた、エルビンとの相互作用を阻害するか又は高めるERBB2受容体の変異体の同定方法にも関し、ここで前記ERBB2受容体の突然変異がもたらされ、そしてエルビンとのこの受容体の相互作用に対するこの突然変異の効果が評価される。ヒトERBB2受容体の配列は、例えばEMBLデータベースにアクセスできる（アクセス番号X03363）。

【0060】

酵母における二重 - ハイブリッド試験はこの目的のために特に適切であり得る。

この突然変異は、ERBB2の最後の9個のカルボキシ末端アミノ酸に導入されている（ペプチドEYLGLDVPV）（配列番号21）。ペプチドにおける下線を引かれているアミノ酸の1つのアミノ酸のアラニンへの変化は、エルビンのPDZドメインとの相互作用を阻害する。

この方法により同定され得るERBB2の変異体はまた、本発明の一部を形成する。

【0061】

本発明者は、より特定には、配列番号21の位置5（L）及び6（D）上で突然変異誘発されたERBB2の変異体はエルビンを結合できないが、しかし他のタンパク質、例えばPICK1の他のPDZドメインを結合できることを決定した。

それらの変異体は、スクリーニング方法においてエルビンのPDZドメインの相互作用を阻害する分子を識別するために特に有用である。

エルビン又はERBB2受容体のそれらの変異体は、エルビンとERBB2受容体との間の相互作用を阻害するか又は活性化する他の化合物をスクリーニングするための試験に使用され得る。それらはまた、それらの突然変異誘発された形、又はそれらの突然変異誘発された形をコードする核酸の投与により治療の骨格内で開発され得る。

【0062】

特に、エルビン - ERBB2相互作用を活性化する形は、変更されたエルビントタンパク質又は突然変異誘発されたERBB2受容体を発現する個人において有用であり、そしてエルビン - 受容体相互作用が正常な対照に対して低められる薬剤として開発され得る。

逆に言えば、エルビン - ERBB2相互作用を阻害する形は、例えば受容体の過剰発現の場合、薬剤として有用である。

【0063】

実施例

例1. エルビン、すなわちERBB2受容体と相互作用するPDZドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子のクローニング

ERBB受容体は、それらが局在する基底外側上皮の支質からのそれらのリガンドを受ける (Klapperなど, 2000)。ERBB受容体のカルボキシ - 末端ペプチド配列の分析は、ERBB2受容体が、ヒト、マウス、ウズラ及びイヌ間に保存されるPDZドメインに結合するための部位を含むことを示した (Songyangなど, 1997)。

次に本発明者は、GAL4 DNA (“ GAL-BD ”) への結合ドメインにより融合されるERBB2の最後の9個のアミノ酸により、二重 - ハイブリッドシステムを用いて、マウス腎臓cDNAのライブラリーをスクリーンした。

【0064】

二重 - ハイブリッド法

ERBB2の最後の9個のアミノ酸を、LEO2を担持するベクターpc97を用いて、サブユニットGAL4 - BDに融合した。選択マーカーとしてマーカーTrp1を担持するベクターpc86にクローン化された、オリゴdT配列により感作されたマウス胚腎臓cDNA群を、酢酸リチウムによるプロトコールに従って、ベイトGAL4 - BD - ERBB2及び酵母Y190株を用いてスクリーンした。約 10^6 個の形質転換体TRP LEU を、一次スクリーニングの間、トリプトファン、ロイシン及びヒスチジンを欠失し、そして10mMの3 - アミノトリアゾール (3AT) を含む培地を含む寒天プレート上で選択した。 - ガラクトシダーゼ活性を、二次のスクリーニングの間、フィルター上に酵母を移すことによって試験した。

【0065】

回収の後、選択されたクローンのDNAを用いて、対照ペプチドに融合されるGAL2 - BD - ERBB2又はGAL4 - BDを含む酵母Y190を形質転換した。

他の態様においては、ERBB2、突然変異誘発されたERBB2（変異体VA:ERBB2のC - 末端のバリン残基、すなわちPDZドメインでの相互作用のための決定的残基がアラニンに突然変異誘発されている変異体）及びERBB4の最後の15個のアミノ酸を、Trp1を担持するベクターpBTM116を用いて、タンパク質LexAに融合した。エルピンのPDZドメインを、Leuを担持するベクターpACT2によりコードされる領域GAL4 - ADに融合した。相互作用を、L40の酵母株において達成した。

【0066】

タンパク質に関連する方法

細胞を、冷リン酸緩衝溶液PBSにより2度、洗浄し、そして1mMのPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）、10µg/mlのアプロチニン及び10µg/mlのロイペプチンにより補充された溶解緩衝液（50mMのHEPES, pH7.5、10%のグリセロール、150mMのNaCl、1%のTriton X-100、1.5mMのMgCl₂、1mMのEGTA）に溶解した。細胞がEGFにより刺激されると、200µMの最終濃度のオルトバナジン酸ナトリウムを、前記溶解緩衝液に添加した。16000gでの20分間の遠心分離の後、溶解物中のタンパク質含有率を、Bio - Radからのタンパク質量決定キットを用いて標準化した。

【0067】

免疫沈殿に関しては、溶解物を、抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。A - アガロースタンパク質を添加し、そしてビーズに結合される免疫複合体を、1時間後に回収し、HNTG緩衝液（50mMのHEPES, pH7.5、10%のグリセロール、150mMのNaCl、0.1%のTriton X-100）により3度、洗浄し、試験緩衝液1Xにおいて煮沸し、そしてSDS - PAGEにより分離した。抗 - ウサギHRP抗体又は抗 - マウス抗体の助けを伴って、化学ルミネセンス方法を用いてのニトロセルロース上でのトランスファー及びイムノブロットを、Borgなど、1996により記載のようにして行った。

【0068】

“Far Western”として知られている試験に関しては、膜を、周囲温度で2時間、プロテインキナーゼA、及び5%での脱脂乳TBSにより希釈された³²P ATPにより標識された可溶性GST融合タンパク質、1mMのDTT (10⁶cpm/ml)と共にインキュベートした。TBS - 0.1%のTriton X-100緩衝液及びTBS緩衝液によりすすいだ後、結合されたGSTを、オートラジオグラフィーにより示した。細胞トランスフェクション、GSTの生成及びGSTの結合用量決定を、前に記載したようにして行った (Borgなど、1996)。

【0069】

分別された溶解物を、次の通りにして調製した：細胞を、1mMのPMSF、10µg/mlのアプロトニン及び10µg/mlのロイペクチンにより補充された低張緩衝液 (10mMのトリス - Cl [pH7.4]、0.2mMのMgCl₂、5mMのKCl) に溶解した。その溶解を、冷ホモナイザー (ピストンB) における20回の通過により完結した。サッカロースを、細胞質画分と呼ばれる均質物に添加した。沈殿物を、細胞質画分の体積に等しい体積の溶解緩衝液 (例えば、上記に記載されている) に再懸濁した。氷上での30分後、不溶性残骸を、16000g、及び4 での30分間の遠心分離により除去した。得られる上清液は、膜画分と呼ばれた。

【0070】

結果

従って、本発明者は、“ERBB2相互作用タンパク質”についてエルビンと呼ばれる新規タンパク質の最後の457個のアミノ酸をコードする部分cDNAクローンを単離する。GAL - 4 - BD - ERBB2の腎臓バンクから得られたクローンは、ネズミエルビンの残基914~1371を含み、そしてエルビン (914 - 1371) と呼ばれる。GSTとの融合タンパク質を、エルビン (914 - 1371)、エルビン (914 - 1240) 及びエルビン (1240 - 1371) のペプチド配列を用いて生成した。融合体GST - エルビン (1240 - 1371) のタンパク質は、GST - エルビンのPDZドメインとして本明細書において命名されるであろう。

【0071】

Lex Aに融合されるベイト及びGAL4 - BDに融合される捕獲体をコードするベクターにより同時形質転換された酵母Y90の株を、10mMの3ATを含むTrp - Leu - His

培地上に接種した。次の表においては、+の印は、選択培地(-His)上での増殖及び陽性 - ガラクトシダーゼ活性を意味する。

【0072】

【表1】

表1

pACT-エルビン	914-1371		1240-1371	
	Bgal	-His	Bgal	-His
LexA				
ERBB2	+	+	+	+
ERBB2. VA	-	-	-	-
ERBB4	-	-	-	-

【0073】

相互作用は、C - 末端のバリン残基上での突然変異誘発されたERBB2に関して観察されない。エルビンのC - 末端で見出されるPDZドメインは、ERBB2に結合するのに十分である。

【0074】

結合は、EPHB2, MUSK, PDGFR 及びPDGFR に関しては観察されなかった。タンパク質GST - エルビン (914 - 1371) 及びGST - エルビンPDZは、タンパク質の沈殿の“プル - ダウン”試験において、キメラEGF - R/ERBB2 (HER1/2) に結合するが、しかしEGF - Rには結合しない(図1)。受容体ERBBのカルボキシ末端へのエルビンのPDZドメインの直接的な結合を、“Far Western”試験により評価した。放射性標識されたエルビンのPDZドメインは、ペプチドERBB2に結合するが、しかしペプチドEGF - R、ERBB3及びERBB4には結合せず、そしてペプチドLET - 23に対しては弱く結合する(図2)。

【0075】

LIN - 7のPDZドメインはLET - 23のみに結合する。エルビンのPDZドメインは、DENSIN - 180のPDZドメインと強い同一性を有し(71%)、そして配列の整列に従って、タンパク質LIN - 7及びPSD - 95に見出されるクラスIのPDZドメインとは35

%の同一性を有する (Songyangなど、1997 ; Fanningなど、1998)。NOSのクラスIIIのPDZドメインに存在するTyr - Aspモチーフへのエルビンの Bモチーフに存在するHis - Glyモチーフの置換は、ERBB2との相互作用を阻害する。それらの結果は、エルビンのドメインがERBB2と特異的に直接的に相互作用する。

【0076】

ヒトエルビンをコードする十分な長さのcDNAを、製造業者 (Clontech) の推薦に従って、MARATHONキットを用いて、Daudi、すなわちヒトBリンパ球の細胞系からRT - PCRによりクローン化した。3種の骨格における停止コドンまでの読み取り枠は、1371個のアミノ酸のタンパク質をコードする。エルビンは、そのアミノ末端に16個のLRRモチーフ (残基48 - 416) 及び1つの一本鎖C - 末端PDZドメインを含む。LRRとPDZドメイン間の863個のアミノ酸の広い中間領域は、結合部位又はSH3及びWWドメインを表すことができる、プロリンに富んでいる延長部を含む。

【0077】

例2 . エルビン、すなわち新規PDZファミリーのメンバーの特徴化

特定のヒトエルビンプローブは、試験される大部分のヒト及びネズミ組織における7.2kbの転写体の検出を可能にした。この分析は、種々のヒト組織から単離された2 µgのmRNAポリ(A)⁺を用いて、Clontechの“Multiple Tissue”技法の助けを伴って、ノザンプロットにより実施された。エルビンに対する特異的抗体を調製した。

【0078】

抗体の調製

モノクローナル抗体抗 - Mc 9E10 (Oncogene Research Products, Cambridge, MA) を、免疫沈殿及びイムノプロットのために使用した。ウサギ抗 - ERBB2及び抗 - EGF - Rのモノクローナル抗体を、ウサギへのペプチドの注射により得た。モノクローナル抗体408抗 - EGF - Rを、免疫沈殿のために使用した。Upstate Biotechnology (UBI) のモノクローナル抗体 - EGF - R (クローンLA22) を、免疫蛍光のために使用した。

【0079】

ポリクローナル抗体抗 - SHC及びモノクローナル抗体4G10 mAb (抗 - PY)を、UBIから得た。ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合される抗 - ウサギ及び抗 - マウスヤギIgGを、それぞれLaboratorie Jackson及びDakoから購入した。ポリクローナル抗 - エルビンウサギ抗体を、融合タンパク質GST - エルビン (914 - 1371) を注射することによって生成した。抗 - エルビン抗体をまた、アガロース及びニッケルのビーズ (Qiagen) に結合された、ヒスチジンラベルされたエルビン (914 - 1371) との親和性により精製した。

【0080】

エルビンに対するそれらの特異的抗体は、脳、肝臓、腎臓、脾臓、腸及び骨格筋、並びに上皮細胞系Caco - 2 及びMDCKにおいて、ダブレットの形で180kDのタンパク質を検出した (図3)。COS細胞における十分な長さのエルビンのcDNAの発現は、組織及び細胞抽出物において問題の抗体により検出されるタンパク質に対して類似するサイズのタンパク質の生成を可能にした。

【0081】

細胞培養

細胞COS - 1 及びMDCKを、10%ウシ胎児血清 (FCS) により補充され、100U/mlのペニシリン及び100 µg/mlのストレプトマイシン硫酸塩を含むDMEM培地 (ダルベッコ変性イーグル培地) において培養した。Caco - 2 細胞を、20%のFCS及び1%の非必須アミノ酸により補充されたDMEM培地において保持した。すべての細胞トランスフェクションを、製造業者 (Boehringer Mannheim) の推薦に従って、反応体Fugene6を用いて行った。

エルビン、DENSIN - 180、VARTUL, KAA0147及びF26D11.11間の構造相同性は、“LRR及びPDZドメインタンパク質” についてLAPと称する新規PDZファミリーのメンバーとして本発明者にそれらのタンパク質の考慮を導いた。

【0082】

例3. 活性化されたHER1/2受容体とエルビンとの相互作用

エルビンとERBB2受容体との間のインビボ相互作用を、COS細胞における同時免疫沈殿により試験した。

1) HER1/2を、COS - 1 細胞において、エピトープmycに融合されるポリペプチ

ドエルビン、SAP97又はPSD - 95と共に一時的に同時発現した。溶解の後、HER1/2を、抗体抗 - EGF - R (クローン408) により免疫沈殿し、そして結合されたタンパク質を、それぞれ抗 - myc及び抗 - ERBB2抗体により表した。

【0083】

2) HER1/2及びEGF - Rを、COS - 1細胞においてエルビンにより一時的に同時発現した。EGF上での処理の後、細胞を溶解し、そしてタンパク質抽出物のアリコート画分を、SDS - PAGE上に沈着し、電気泳動にゆだね、そしてニトロセルロース膜上に移した。等量のエルビン及び受容体が溶解物に見出された。受容体を抗 - EGF - R抗体により免疫沈殿せしめ、結合されたタンパク質をウェスタンブロットにゆだね、そして抗 - エルビン及び抗 受容体抗体により表した。Her1/2のみがエルビンと相互反応した。対照として、タンパク質p52 SHCを、EGFによる刺激の後、HER1/2及びEGF - Rにより、上昇する態様で免疫沈殿せしめた。

【0084】

3) HER1/2及びEGF - Rを、COS - 1細胞において一時的に発現した。成長因子を含まないか又は200ng/mlのEGFを含む培地による5分間の刺激の後、細胞を溶解し、そしてタンパク質の沈殿の“プル - ダウン” GST試験を、アガロースビーズ上に固定されたGST - SHC PTB又はGST - ERBIN PDZドメインを用いて実施した。沈殿されたタンパク質を、抗 - PY抗体 (より高いスクリーン) を用いて、ウェスタンブロット分析により示した。抗体の脱ハイブリダイゼーションの後、膜を、それぞれ抗 - ERBB2及び抗 - EGF - Rにより表した (抗 - RTK)。リン酸化された受容体はSHC PTBドメインに結合したが、リン酸化されたHER1/2はエルビンのPDZドメインと相互反応しなかった。

【0085】

4) カルボキシ末端バリリン (変異体VA) 又は“キナーゼ死亡” HER1/2、すなわち触媒活性を消耗されたHER1/2 (変異体KA) の突然変異を含むGER1/2を、COS - 1細胞において発現し、そしてGST融合タンパク質との相互作用を、前に記載したようにして試験した。HER1/2におけるVA突然変異は、受容体へのチロシン残基のリン酸化に影響を及ぼさず、そして変異体KAはチロシンに基づいてリン酸化されなかった。予測されるように、変異体HER1/2 KAは、SHC PTBドメインに結合しな

かった(図3d)。他方では、エルビンのPDZドメインが効果的な態様でHER1/2 KAを沈殿せしめるが、しかしHER1/2 VAに関しては、沈殿せしめなかった。全体として、それらの結果は、エルビンのPDZドメインが活性化されていないHER1/2受容体と単独で相互反応することを示す。

【0086】

本発明者は、タンパク質が、COS細胞において、HER1/2と共に、mycによりラベルされたエルビンをインビボで同時発現することによって、同一の態様で挙動したかどうかを驚いた。エルビンにより結合されたHER1/2のプールは、EGFによる刺激の後、チロシンの部位でリン酸化されなかったことが見出された。他方では、SHCタンパク質は、リン酸化された受容体と相互反応した。エルビンは、ERBB2キナーゼのための基質であり、そしてエルビンのリン酸化は、HER1/2 KA受容体の発現の間、見出されなかった。それらのデータは、エルビンが、チロシンに基づいて、リン酸化されていないHER1/2と相互反応し、そしてERBB2キナーゼの基質としてエルビンを同定することを示す。

【0087】

SHC PTC結合部位がERBB2のC-末端で見出されるので、PDZドメイン側の結合部位の上流の2種の残基(Borgなど、1978)、すなわちEGFによる刺激の後、この部位でのSHCタンパク質の補充が、エルビンのPDZドメインの固定を妨げることができた。チロシンのリン酸化は、チロシンのレベルでリン酸化されるペプチドがリン酸化されていないペプチドと同じように効果的にこの相互作用を阻害するので、HER1/2 PDZドメインの相互作用を変更するのに本質的に十分ではない。従って、PDZドメインの相互作用は、シグナル化機構のタンパク質モジュールとの競争により阻害され得る。

【0088】

例4. 上皮細胞におけるERBB2の基底外側局在化は、エルビンとの相互作用の部位に依存する

ERBB2及びエルビンの非細胞局在化のより接近した研究を行うために、本発明者は、両タンパク質を発現するCaco-2系、すなわちヒト結腸癌の細胞系を使用した。

【0089】

Caco - 2細胞の分別は、エルビンが主に、膜画分に存在し、そしてSHCタンパク質が細胞質画分において卓越することを示した。次に、免疫染色を、精製された抗 - エルビン抗体により、分極化されたCaco - 2細胞に対して行った。このためには、Caco - 2細胞をガラスストリップ上に接種し、透過せしめ、そして示される一次抗体により染色し、次に、次のプロトコールに従って、異なった蛍光色素に結合される二次抗体による染色にゆだねた。

【0090】

細胞表面の免疫局在化及びラベリング

免疫染色方法に関しては、MDCK細胞を、集密性の後、3日間、ガラスストリップ上で培養し、そしてLe Bivicなど、1989に記載のようにして、EGF - Rに対するモノクローナル抗体及びgp114 (MDCK細胞の先端マーカー) に対するポリクローナル抗体によりラベルした (Le Bivicなど、1990)。Caco - 2細胞を、完全な分化を確保するために、集密性の後、10日間、ガラスストリップ上で培養し、次に、MDCK細胞と同じ処理にゆだねた。Ag525 (ヒト腸細胞の基底外側マーカー) に対する抗体は、前に記載されている (Le Bivicなど、1988)。ヒト結腸の凍結断片 (0.5 ~ 1 μm) を、これまでに記載のようにして得た (Le Bivicなど、1988)。

【0091】

細胞表面のビオチニル化のために、集密性の後、3日間フィルター上で培養された細胞を、基底外側表面上で、Amershamからの“ ^{35}S - Promix ready vue” (18.5MBq/ml) により一晩ラベルした。細胞を、先端表面又は基底外側表面上で、通常の培地における90分間の追跡を伴って、Sulfo - NHS - LC - ビオチン (Pierce) によりラベルし、そしてEGF - R及びキメラを、Le Bivicなど、1989に記載のようにして、ストレプトアビジンにより免疫沈殿せしめた。検体をSDS - PAGEにより分析し、そして蛍光間接撮影により可視化した。オートラジオグラムを、Bioimage (Ann Arbor, MI) からのIntelligent Quantifierを用いて定量化した。

【0092】

エルビンは、同時局在化がモノクローナル抗体525、すなわち基底外側上皮の

特異的マーカーにより同時染色することによって得られるので、Caco-2の形質膜の基底外側表面上に見出された。

さらに、ERBB2はまた、基底外側性であり、そしてエルビンと共に同時局在化された。ヒト結腸の断片の抗-エルビン抗体による染色は、それらの組織におけるタンパク質の基底外側局在化を確証した。

次に、本発明者は、安定した態様で、EGF-R、HER1/2及びHER1/2 VAを発現するMDCK細胞を生成した。MDCKは、EGF-R及びHER1/2（初期及び変異体）の発現を可能にする構造体によりトランスフェクトされた細胞集団に反して、底レベルの内因性EGF-R及びERBB2受容体を発現した。

【0093】

免疫蛍光実験を、特異的ヒトモノクローナル抗-EGF-R抗体であるLA22により行った。EGF-R及びHER1/2は基底外側表面上に局在し、そしてHER1/2の突然変異誘発（HER1/2.VA）は、HER1/2の基底外側局在化を妨げた。細胞表面のビオチニル化を、トランスフェクト体MDCKの先端及び基底外側表面上で実施し、そして受容体の量を、オートラジオグラフィーにより定量化した。EGF-R及びHER1/2は基底外側の側の83%で局在化し、そして変異体HER1/2.VAはわずか53%であった。従って、エルビンの相互作用の部位の排除が、上皮細胞におけるERBB2の脱分極化を誘発した。

【0094】

例5. “ノック-アウト” マウスの生成

この方法は、エルビンの最初の63個のアミノ酸をコードするエルビン遺伝子からの第1のエキソンを排除し、そしてそれを、ネオマイシン耐性のための遺伝子をコードするカセットにより置換することから成る。翻訳開始コドン及び続く62個のアミノ酸の消出が、機能的エルビタンパク質の発現の損失を引き起こす。

pPNT3型の相同組換えベクターは、ネオマイシン耐性のための遺伝子のカセットによりエルビン遺伝子の配列（エキソン1）を置換する。それは、次のものを含んで成る：

【0095】

- 真核及び原核細胞において2種の認識されるプロモーターを供給された、ネ

オマイシンに対して耐性の遺伝子 (neo^r) ;

- ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) の最小プロモーター、及び単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼをコードする配列により構成されるPGK - TKカセット。PGKプロモーターは通常、ES細胞において活性化され、そして組換えクローンの選択の間、負の選択の実施を可能にする。このカセットは、エルビンの相同性の領域の5'側に配置される。組換えベクターは、エルビンの6kbのゲノム配列、第1エクソンの上流の1.5kbの配列 (5'アーム) 及び第1エクソンの下流の4.5kbの配列 (3'アーム) から構成される。

【0096】

最終組換えベクターは、連続的に次のDNA配列を有する：5'カセットPGK - TK-アーム5'エルビン---neo^r遺伝子---アーム3'エルビン3'。組換えベクターの線状化の後、後者をBS129細胞 (胚幹細胞) 中にエレクトロポレーションによりトランスファーし、そしてトランスフェクトされた細胞を、“Gene targeting: a practical approach”, Edition A. L. Joyner 1993 IRL Pressに記載されるプロトコールに従って、培養培地中へのゲネチシンの添加により選択する。ゲノムが相同組換えの現象を包含するクローンを表すために、ガンシクロビルの逆選択を使用する。クローンは、“Gene targeting: a practical approach”, Editions A.L. Loyer 1993 IRL Press, PCR and Southern Blot, and Fioreなど, Int. Int. J. Dev. Biol. 41: 639-642 (1997) に提案されるプロトコールに従って、確かめられる。

【0097】

選択されたクローンを、妊娠の3.5日で採取されたC57BL/6マウス未分化胚芽細胞中に注入する。未分化胚芽細胞を、2.5日の偽妊娠SWISSマウス中に再移植する。キメラは、それらの柔皮の色彩 (キメラに関しては黒及び褐色) により示される。キメラの雄を、C57BL/6雌により交雑し、そしてアグーチ新生児の尾を採取し、そしてそれらの遺伝子型を、組換えされた対立遺伝子を検出するために、サザンブロットにより分析する。それらの中でもヘテロ接合マウスの交雑は、突然変異の (世代F2) のためのヘテロ接合性変異体の獲得を可能にする (サザンブロットによる確認)。

【0098】

例6. エルビンのPDZドメインの突然変異誘発

エルビンのPDZドメインにおいてもたらされる正確な突然変異は、ERBB2/HER2との相互作用に対して逆の効果を有する。

それらの突然変異の効果を示すために、次の2種の技法を特に使用することができる。組換え融合タンパク質によるERBB2の沈殿物及び酵母における二重ハイブリダイズシステム。

【0099】

固体マトリックスに固定される、野生型又は突然変異誘発された組換え融合タンパク質GST - PDZ ERBINを、ERBB2/HER2を含む細胞溶解物と共にインキュベートする。2時間後、ビーズを洗浄し、そしてその複合体をSDS - PAGEにより分解する。トランスファーの後、ERBB2を、特異的抗体により表す(ウェルターンプロット)。

酵母における二重 - ハイブリッドシステムのために、ベイトを、ERBB2ペプチドに融合されるLEXA - BDにより構成する。捕獲体(プレイ)を、野生型又は突然変異誘発されたエルビンのPDZドメインに融合されるGAL4 - ADにより構成する。

【0100】

それらの2種の試験は同一の結果を付与した: 変異体PDZ YD (チロシンへのヒスチジン1347及びアスパラギン酸へのグリシン(位置1348)の突然変異)及びNS (アスパラギン中へのトレオニン1316の及びセリン中へのアルギニン(位置1317)の突然変異)は、ERBB2受容体に対して低い親和性を有し、そして変異体HL (ロイシン中へのヒスチジン(位置1347)の突然変異)及びMI (メチオニン中へのロイシン1291の及びイソロイシン中へのフェニルアラニン(位置1293)の突然変異)は、ERBB2に対してより高い親和性を有する。

【0101】

参考文献:

- Antonarakis S.E., Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. N Engl J. Med. 320: 153-163 (1989).
- Bellis など, medecine/sciences, 13: 1317-24 (1997).

- Benoit など, PNAS USA, 79, 917-921 (1982).
- Borg など (1996), The phosphotyrosine Interaction Domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein, Molecular and Cellular Biology 16: 6229-6241.
- Borg など (1998), Function of PTB domains. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 228: 23-38.

【 0 1 0 2 】

- Borg など(1998), Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. J. Biol. Chem. 273 (48): 31633-31636.
- Cooper など, Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA, 3rd Edition, Hum Genet., 87: 519-560 (1991).
- Fanning, A.S. & Anderson, J.M. PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 228: 209-233 (1998).
- Huber, C.G. など, Rapid and accurate sizing of DNA fragments by ion-pair chromatography on alkylated nonporous poly (styrenedivinylbenzene) particles. Anal. Chem. 67, 578-585 (1995).

【 0 1 0 3 】

- Klapper など (2000), Biochemical and clinical implications of the ER BB/HER signaling network of growth factor receptors. Adv Cancer Res 77: 25-79.
- Kohler and Milstein, Nature, 256, 495-497 (1975).
- Kuklin, A. など, Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE™ DNA fragment analysis system. Genetic Testing 1, 201-206 (1997/98).
- Le Bivic など (1988) Characterization of a glycoprotein expressed on the basolateral membrane of human intestinal epithelial cells and cultured colonic cell lines. Eur J Cell Biol 46: 113-120.

【0104】

- Le Bivic など (1989) Vectorial targeting of apical and basolateral plasma membrane proteins in a human adenocarcinoma epithelial cell line. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9313-9313.

- Le Bivic など (1990) Vectorial. Targeting of an endogenous apical membrane sialoglycoprotein and uvomorulin in MDCK cells. J Cell Biol 110: 1533-1539.

- Ross など (1999), HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer, Am.J.Clin.Pathol. 112:S53-67.

- Sambrook など, Molecular cloning, a laboratory manual, Spring Harbor Laboratory Press, 9.54-62 (1989).

- Songyang など (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. Science 275: 73-77.

- Zhang など (1996) A yeast three-hybrid-method to clone ternary proteins in complex components. Analytical Biochemistry, 242, 68-72.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、EGF-Rとではなく、ERBB2とのエルビンのPDZドメインの特異的相互作用を示すウェスタンブロットを示す。ニトロセルロース上にトランスファーされた、結合されたタンパク質が、抗-ERBB2及び抗-EGF-R抗体により示されている。溶解物の1/10がゲル上に付加された(全溶解物TL)。GSTのみ又はGST-X11 PDZドメイン(X11)が対照として使用された。使用されるGST-エルビンポリペプチドは、GST-エルビン(914-1371)レーン1、GST-エルビン(914-1240)レーン2及びGST-エルビンレーン3のPDZドメインである。

【図2】

図2は、GSTタンパク質に融合されるEGF-Rに関連する受容体の最後の9固のアミノ酸により形成される融合タンパク質を付加されているSDS-PAGEゲルのニトロセルロース膜上へのトランスファーを示す。³²Pでラベルされた可溶性GST-エルビンのPDZドメイン又は融合タンパク質GST-LIH-7が、前記膜をプローブ

するために使用された。インキュベーションの後、膜は洗浄され、そして結合されたタンパク質がオートラジオグラフィーにより示された。

【図3】

図3は、SDS - PAGE上での電気泳動にゆだねられ、ニトロセルロース上にトランスファーされ、そして精製された抗 - エルビン抗体と接触せしめられた。種々のネズミ組織及び細胞系の全溶解物のウェルターンプロットを示す。エルビンは、矢印のより示される180kDのタンパク質である。

【配列表】

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM

<120> Gène codant pour l'Erbin, protéine qui interagit avec
le récepteur ERBB2/HER-2, et utilisations diagnostiques
et thérapeutiques

<130> BFF 00/0117

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6412

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (324)..(4436)

<400> 1

```

aaagatcttt tttttttttt tttctttttt tttcggcgga gatcctcggt ggggctggga 60
aactcctgca aaactcgaga ccaggaagcc agccccacc ccaaccccca ccaaagccac 120
ctactcttct tctgtgggag gccagtcac atccgctctc acccgagaga gatattcagc 180
tggatccaaa gtgactgatg aaggaagga aatcatgtca agcgaagcct tgaaaaagct 240
gccctgagac ggtgtcccg cgaagaatg ttggctcaat taagaaacat cagggagata 300
aattcaaccc agtgtgtcta aaa atg act aca aaa cga agt ttg ttt gtg cgg 353
                               Met Thr Thr Lys Arg Ser Leu Phe Val Arg
                               1           5           10

ttg gta cca tgt cgc tgt cta cga ggg gaa gag gag act gtc act act 401
Leu Val Pro Cys Arg Cys Leu Arg Gly Glu Glu Glu Thr Val Thr Thr
                               15           20           25

ctt gat tat tct cat tgc agc tta gaa caa gtt ccg aaa gag att ttt 449
Leu Asp Tyr Ser His Cys Ser Leu Glu Gln Val Pro Lys Glu Ile Phe
                               30           35           40

act ttt gaa aaa acc ttg gag gaa ctc tat tta gat gct aat cag att 497
Thr Phe Glu Lys Thr Leu Glu Glu Leu Tyr Leu Asp Ala Asn Gln Ile
                               45           50           55

gaa gag ctt cca aag caa ctt ttt aac tgt cag tct tta cac aag ctg 545
Glu Glu Leu Pro Lys Gln Leu Phe Asn Cys Gln Ser Leu His Lys Leu
                               60           65           70

agt ttg cca gac aat gat tta aca acg tta cca gca tcc att gca aac 593
Ser Leu Pro Asp Asn Asp Leu Thr Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Asn
                               75           80           85           90

```

ctt att aat ctc agg gaa ctg gat gtc agc aag aat gga ata cag gag	641
Leu Ile Asn Leu Arg Glu Leu Asp Val Ser Lys Asn Gly Ile Gln Glu	
95 100 105	
ttt cca gaa aat ata aaa aat tgt aaa gtt ttg aca att gtg gag gcc	689
Phe Pro Glu Asn Ile Lys Asn Cys Lys Val Leu Thr Ile Val Glu Ala	
110 115 120	
agt gta aac cct att tcc aag ctc cct gat gga ttt tct cag ctg tta	737
Ser Val Asn Pro Ile Ser Lys Leu Pro Asp Gly Phe Ser Gln Leu Leu	
125 130 135	
aac cta acc cag ttg tat ctg aat gat gct ttt ctt gag ttc ttg cca	785
Asn Leu Thr Gln Leu Tyr Leu Asn Asp Ala Phe Leu Glu Phe Leu Pro	
140 145 150	
gca aat ttt ggc aga tta act aaa ctc caa ata tta gag ctt aga gaa	833
Ala Asn Phe Gly Arg Leu Thr Lys Leu Gln Ile Leu Glu Leu Arg Glu	
155 160 165 170	
aac cag tta aaa atg ttg cct aaa act atg aat aga ctg acc cag ctg	881
Asn Gln Leu Lys Met Leu Pro Lys Thr Met Asn Arg Leu Thr Gln Leu	
175 180 185	
gaa aga ttg gat ttg gga agt aac gaa ttc acg gaa gtg cct gaa gta	929
Glu Arg Leu Asp Leu Gly Ser Asn Glu Phe Thr Glu Val Pro Glu Val	
190 195 200	
ctt gag caa cta agt gga ttg aaa gag ttt tgg atg gat gct aat aga	977
Leu Glu Gln Leu Ser Gly Leu Lys Glu Phe Trp Met Asp Ala Asn Arg	
205 210 215	
ctg act ttt att cca ggg ttt att ggt agt ttg aaa cag ctc aca tat	1025
Leu Thr Phe Ile Pro Gly Phe Ile Gly Ser Leu Lys Gln Leu Thr Tyr	
220 225 230	
ttg gat gtt tct aaa aat aat att gaa atg gtt gaa gaa gga att tca	1073
Leu Asp Val Ser Lys Asn Asn Ile Glu Met Val Glu Glu Gly Ile Ser	
235 240 245 250	
aca tgt gaa aac ctt caa gac ctc cta tta tca agc aat tca ctt cag	1121
Thr Cys Glu Asn Leu Gln Asp Leu Leu Ser Ser Asn Ser Leu Gln	
255 260 265	
cag ctt cct gag act att ggt tcg ttg aag aat ata aca acg ctt aaa	1169
Gln Leu Pro Glu Thr Ile Gly Ser Leu Lys Asn Ile Thr Thr Leu Lys	
270 275 280	
ata gat gaa aac cag tta atg tat ctg cca gac tct ata gga ggg tta	1217
Ile Asp Glu Asn Gln Leu Met Tyr Leu Pro Asp Ser Ile Gly Gly Leu	
285 290 295	
ata tca gta gaa gaa ctg gat tgt agt ttc aat gag gtt gaa gct ttg	1265
Ile Ser Val Glu Glu Leu Asp Cys Ser Phe Asn Glu Val Glu Ala Leu	
300 305 310	
cct tca tct att ggg cag ctt act aac tta aga act ttt gct gct gat	1313
Pro Ser Ser Ile Gly Gln Leu Thr Asn Leu Arg Thr Phe Ala Ala Asp	
315 320 325 330	

cat aat tac tta cag cag ttg ccc cca gag att gga agc tgg aaa aat	1361
His Asn Tyr Leu Gln Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gly Ser Trp Lys Asn	
335 340 345	
ata act gtg ctg ttt ctc cat tcc aat aaa ctt gag aca ctt cca gag	1409
Ile Thr Val Leu Phe Leu His Ser Asn Lys Leu Glu Thr Leu Pro Glu	
350 355 360	
gaa atg ggt gat atg caa aaa tta aaa gtc att aat tta agt gat aat	1457
Glu Met Gly Asp Met Gln Lys Leu Lys Val Ile Asn Leu Ser Asp Asn	
365 370 375	
aga tta aag aat tta ccc ttt agc ttt aca aag cta cag caa ttg aca	1505
Arg Leu Lys Asn Leu Pro Phe Ser Phe Thr Lys Leu Gln Gln Leu Thr	
380 385 390	
gct atg tgg ctc tca gat aat cag tcc aaa ccc ctg ata cct ctt caa	1553
Ala Met Trp Leu Ser Asp Asn Gln Ser Lys Pro Leu Ile Pro Leu Gln	
395 400 405 410	
aaa gaa act gat tca gag acc cag aaa atg gtg ctt acc aac tac atg	1601
Lys Glu Thr Asp Ser Glu Thr Gln Lys Met Val Leu Thr Asn Tyr Met	
415 420 425	
ttc cct caa cag cca agg act gag gat gtt atg ttt ata tca gat aat	1649
Phe Pro Gln Gln Pro Arg Thr Glu Asp Val Met Phe Ile Ser Asp Asn	
430 435 440	
gaa agt ttt aac cct tca ttg tgg gag gaa cag agg aaa cag cgg gct	1697
Glu Ser Phe Asn Pro Ser Leu Trp Glu Glu Gln Arg Lys Gln Arg Ala	
445 450 455	
caa gtt gca ttt gaa tgt gat gaa gac aaa gat gaa agg gag gca cct	1745
Gln Val Ala Phe Glu Cys Asp Glu Asp Lys Asp Glu Arg Glu Ala Pro	
460 465 470	
ccc agg gag gga aat tta aaa aga tat cca aca cca tac cca gat gag	1793
Pro Arg Glu Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Pro Thr Pro Tyr Pro Asp Glu	
475 480 485 490	
ctt aag aat atg gtc aaa act gtt caa acc att gta cat aga tta aaa	1841
Leu Lys Asn Met Val Lys Thr Val Gln Thr Ile Val His Arg Leu Lys	
495 500 505	
gat gaa gag acc aat gaa gac tca gga aga gat ttg aaa cca cat gaa	1889
Asp Glu Glu Thr Asn Glu Asp Ser Gly Arg Asp Leu Lys Pro His Glu	
510 515 520	
gat caa caa gat ata aat aaa gat gtg ggt gtg aag acc tca gaa agt	1937
Asp Gln Gln Asp Ile Asn Lys Asp Val Gly Val Lys Thr Ser Glu Ser	
525 530 535	
act act aca gta aaa agc aaa gtt gat gaa aga gaa aaa tat atg ata	1985
Thr Thr Thr Val Lys Ser Lys Val Asp Glu Arg Glu Lys Tyr Met Ile	
540 545 550	
gga aac tct gta cag aag atc agt gaa cct gaa gct gag att agt cct	2033
Gly Asn Ser Val Gln Lys Ile Ser Glu Pro Glu Ala Glu Ile Ser Pro	
555 560 565 570	

ggg agt tta cca gtg act gca aat atg aaa gcc tct gag aac ttg aag	2081
Gly Ser Leu Pro Val Thr Ala Asn Met Lys Ala Ser Glu Asn Leu Lys	
575 580 585	
cat att gtt aac cat gat gat gtt ttt gag gaa tct gaa gaa ctt tct	2129
His Ile Val Asn His Asp Asp Val Phe Glu Glu Ser Glu Glu Leu Ser	
590 595 600	
tct gat gaa gag atg aaa atg gcg gag atg cga cca cca tta att gaa	2177
Ser Asp Glu Glu Met Lys Met Ala Glu Met Arg Pro Pro Leu Ile Glu	
605 610 615	
acc tct att aac cag cca aaa gtc gta gca ctt agt aat aac aaa aaa	2225
Thr Ser Ile Asn Gln Pro Lys Val Val Ala Leu Ser Asn Asn Lys Lys	
620 625 630	
gat gat aca aag gaa aca gat tct tta tca gat gaa gtt aca cac aat	2273
Asp Asp Thr Lys Glu Thr Asp Ser Leu Ser Asp Glu Val Thr His Asn	
635 640 645 650	
agc aat cag aat aac agc aat tgt tct tct cca tct cgg atg tct gat	2321
Ser Asn Gln Asn Asn Ser Asn Cys Ser Ser Pro Ser Arg Met Ser Asp	
655 660 665	
tca gtt tct ctt aat act gat agt agt caa gac acc tca ctc tgc tct	2369
Ser Val Ser Leu Asn Thr Asp Ser Ser Gln Asp Thr Ser Leu Cys Ser	
670 675 680	
cca gtg aaa caa act cat att gat att aat tcc aaa atc agg caa gaa	2417
Pro Val Lys Gln Thr His Ile Asp Ile Asn Ser Lys Ile Arg Gln Glu	
685 690 695	
gat gaa aat ttt aac agc ctt tta caa aat gga gat att tta aac agt	2465
Asp Glu Asn Phe Asn Ser Leu Leu Gln Asn Gly Asp Ile Leu Asn Ser	
700 705 710	
tca aca gag gaa aag ttc aaa gct cat gat aaa aaa gat ttt aac tta	2513
Ser Thr Glu Glu Lys Phe Lys Ala His Asp Lys Lys Asp Phe Asn Leu	
715 720 725 730	
cct gaa tat gat ttg aat gtt gaa gag cga tta gtt cta att gag aaa	2561
Pro Glu Tyr Asp Leu Asn Val Glu Glu Arg Leu Val Leu Ile Glu Lys	
735 740 745	
agt gtt gac tca aca gcc aca gct gat gac act cac aaa tta gat cat	2609
Ser Val Asp Ser Thr Ala Thr Ala Asp Asp Thr His Lys Leu Asp His	
750 755 760	
atc aat atg aat ctt aat aaa ctt ata act aat gat aca ttt caa cca	2657
Ile Asn Met Asn Leu Asn Lys Leu Ile Thr Asn Asp Thr Phe Gln Pro	
765 770 775	
gag atc atg gaa aga tca aaa aca cag gat att gtg ctt gga aca agc	2705
Glu Ile Met Glu Arg Ser Lys Thr Gln Asp Ile Val Leu Gly Thr Ser	
780 785 790	
ttt tta agc att aat tct aaa gag gaa act gag cac ttg gaa aat gga	2753
Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Glu His Leu Glu Asn Gly	
795 800 805 810	

aac aag tat cct aat ttg gaa tcc gta aat aag gta aat gga cat tct	2801
Asn Lys Tyr Pro Asn Leu Glu Ser Val Asn Lys Val Asn Gly His Ser	
815 820 825	
gag gaa act tcc cag tct cct aat agg act gaa cca cat gac agt gat	2849
Glu Glu Thr Ser Gln Ser Pro Asn Arg Thr Glu Pro His Asp Ser Asp	
830 835 840	
tgt tct gtt gac tta ggt att tcc aaa agc act gaa gat ctc tcc cct	2897
Cys Ser Val Asp Leu Gly Ile Ser Lys Ser Thr Glu Asp Leu Ser Pro	
845 850 855	
cag aaa agt ggt cca gtt gga tct gtt gtg aaa tct cat agc ata act	2945
Gln Lys Ser Gly Pro Val Gly Ser Val Val Lys Ser His Ser Ile Thr	
860 865 870	
aat atg gag att gga ggg cta aaa atc tat gat att ctt agt gat aat	2993
Asn Met Glu Ile Gly Gly Leu Lys Ile Tyr Asp Ile Leu Ser Asp Asn	
875 880 885 890	
gga cct cag cag cca agt aca acc gtt aaa atc aca tct gct gtt gat	3041
Gly Pro Gln Gln Pro Ser Thr Thr Val Lys Ile Thr Ser Ala Val Asp	
895 900 905	
gga aaa aat ata gtc agg agc aag tct gcc aca ctg ttg tat gat caa	3089
Gly Lys Asn Ile Val Arg Ser Lys Ser Ala Thr Leu Leu Tyr Asp Gln	
910 915 920	
cca ttg cag gta ttt act ggt tct tcc tca tct tct gat tta ata tca	3137
Pro Leu Gln Val Phe Thr Gly Ser Ser Ser Ser Ser Asp Leu Ile Ser	
925 930 935	
gga aca aag gca att ttc aag ttt gat tca aat cat aat ccc gaa gag	3185
Gly Thr Lys Ala Ile Phe Lys Phe Asp Ser Asn His Asn Pro Glu Glu	
940 945 950	
cca aat ata ata aga ggc ccc aca agt ggc cca caa tct gca cct caa	3233
Pro Asn Ile Ile Arg Gly Pro Thr Ser Gly Pro Gln Ser Ala Pro Gln	
955 960 965 970	
ata tat ggt cct cca cag tat aat atc caa tac agt agc agt gct gca	3281
Ile Tyr Gly Pro Pro Gln Tyr Asn Ile Gln Tyr Ser Ser Ser Ala Ala	
975 980 985	
gtc aaa gac act ttg tgg cac tcc aaa caa aat ccc caa ata gac cat	3329
Val Lys Asp Thr Leu Trp His Ser Lys Gln Asn Pro Gln Ile Asp His	
990 995 1000	
gcc agt ttt cct cct cag ctc ctt cct aga tca gag agc aca gaa aat	3377
Ala Ser Phe Pro Pro Gln Leu Leu Pro Arg Ser Glu Ser Thr Glu Asn	
1005 1010 1015	
caa agt tat gct aaa cat tct gcc aat atg aat ttc tct aat cat aac	3425
Gln Ser Tyr Ala Lys His Ser Ala Asn Met Asn Phe Ser Asn His Asn	
1020 1025 1030	
aat gtt cga gct aat act gca tac cat tta cat cag aga ctt ggc cca	3473
Asn Val Arg Ala Asn Thr Ala Tyr His Leu His Gln Arg Leu Gly Pro	
1035 1040 1045 1050	

gca aga cat ggg gaa atg tgg gcc atc tca cca aac gac cga ctt att	3521
Ala Arg His Gly Glu Met Trp Ala Ile Ser Pro Asn Asp Arg Leu Ile	
1055 1060 1065	
cct gca gta act cga agt aca atc cag cga caa agt agt gtg tcc tcc	3569
Pro Ala Val Thr Arg Ser Thr Ile Gln Arg Gln Ser Ser Val Ser Ser	
1070 1075 1080	
aca gcc tct gta aat ctt ggt gat cca ggc tct aca agg cgg gct cag	3617
Thr Ala Ser Val Asn Leu Gly Asp Pro Gly Ser Thr Arg Arg Ala Gln	
1085 1090 1095	
att cct gaa gga gat tat tta tca tac aga gag ttc cac tca gcg gga	3665
Ile Pro Glu Gly Asp Tyr Leu Ser Tyr Arg Glu Phe His Ser Ala Gly	
1100 1105 1110	
aga act cct cca atg atg cca gga tca cag aga ccc ctt tct gca cga	3713
Arg Thr Pro Pro Met Met Pro Gly Ser Gln Arg Pro Leu Ser Ala Arg	
1115 1120 1125 1130	
aca tac agc ata gat ggt cca aat gca tca aga cct cag agt gct cga	3761
Thr Tyr Ser Ile Asp Gly Pro Asn Ala Ser Arg Pro Gln Ser Ala Arg	
1135 1140 1145	
ccc tct att aat gaa ata cca gag aga act atg tca gtt agt gat ttc	3809
Pro Ser Ile Asn Glu Ile Pro Glu Arg Thr Met Ser Val Ser Asp Phe	
1150 1155 1160	
aat tat tca cgg act agt cct tca aaa aga cca aat gca agg gtt ggt	3857
Asn Tyr Ser Arg Thr Ser Pro Ser Lys Arg Pro Asn Ala Arg Val Gly	
1165 1170 1175	
tct gag cat tct tta tta gat cct cca gga aaa agt aaa gtt cct cgt	3905
Ser Glu His Ser Leu Leu Asp Pro Pro Gly Lys Ser Lys Val Pro Arg	
1180 1185 1190	
gac tgg aga gaa caa gta ctt cga cat att gaa gcc aaa aag tta gaa	3953
Asp Trp Arg Glu Gln Val Leu Arg His Ile Glu Ala Lys Lys Leu Glu	
1195 1200 1205 1210	
aag atg cct ttg agt aat gga cag atg ggc cag cct ctc agg cct cag	4001
Lys Met Pro Leu Ser Asn Gly Gln Met Gly Gln Pro Leu Arg Pro Gln	
1215 1220 1225	
gca aat tat agt caa ata cat cac ccc cct cag gca tct gtg gca agg	4049
Ala Asn Tyr Ser Gln Ile His His Pro Pro Gln Ala Ser Val Ala Arg	
1230 1235 1240	
cat ccc tct aga gaa caa cta att gat tac ttg atg ctg aaa gtg gcc	4097
His Pro Ser Arg Glu Gln Leu Ile Asp Tyr Leu Met Leu Lys Val Ala	
1245 1250 1255	
cac cag cct cca tat aca cag ccc cat tgt tct cct aga caa ggc cat	4145
His Gln Pro Pro Tyr Thr Gln Pro His Cys Ser Pro Arg Gln Gly His	
1260 1265 1270	
gaa ctg gca aaa caa gag att cga gtg agg gtt gaa aag gat cca gaa	4193
Glu Leu Ala Lys Gln Glu Ile Arg Val Arg Val Glu Lys Asp Pro Glu	
1275 1280 1285 1290	

ctt gga ttt agc ata tca ggt ggt gtc ggg ggt aga gga aac cca ttc 4241
 Leu Gly Phe Ser Ile Ser Gly Gly Val Gly Gly Arg Gly Asn Pro Phe
 1295 1300 1305

aga cct gat gat gat ggt ata ttt gta aca agg gta caa cct gaa gga 4289
 Arg Pro Asp Asp Asp Gly Ile Phe Val Thr Arg Val Gln Pro Glu Gly
 1310 1315 1320

cca gca tca aaa tta ctg cag cca ggt gat aaa att att cag gct aat 4337
 Pro Ala Ser Lys Leu Leu Gln Pro Gly Asp Lys Ile Ile Gln Ala Asn
 1325 1330 1335

ggc tac agt ttt ata aat att gaa cat gga caa gca gtg tcc ttg cta 4385
 Gly Tyr Ser Phe Ile Asn Ile Glu His Gly Gln Ala Val Ser Leu Leu
 1340 1345 1350

aaa act ttc cag aat aca gtt gaa ctc atc att gta cga gaa gtt tcc 4433
 Lys Thr Phe Gln Asn Thr Val Glu Leu Ile Ile Val Arg Glu Val Ser
 1355 1360 1365 1370

tca taagcactgt ggacaaaaaa agcggggaag acagcaagat ttattggaag 4486
 Ser

atacttacag gggaaattaa tattttgact atttttatat ataaagaaga actcaaaaaa 4546

ttatgttcaa atttgtacat taatgaaata atggataaag gagactgttg aattcatacc 4606

atataaaact tgtaggttt ttaaacatag caatcaaggc taaaaaaca aacctgtgtt 4666

gtttttgtat agattgtagg tttatttttg gatttcatat acatgactga actgtgtgca 4726

aggcaatagt tagccttgat tttagcccag agacagatgg cagagctatc tctctcatag 4786

cttttatgcc cttattttta ttcaactggt attaatggtt ttctcctgaa actacttttt 4846

ttgatgtggg caagagattt gaagtgttgg cttttgctat gtgcatattg aattgaagag 4906

tgagtaggtg aagggtgtgc tgggtgggtc actttccaag gccagactaa aacagttatt 4966

ttctataaaa atctggaagc aaagaatggg gatggggaga gctacgtggt agtatgtttt 5026

tattaggaga ataatgcaat aaaatatgta atgtcttttt tataaagcaa aaaagacaat 5086

aattgcattt atgagctcgg caggatctgt tcttgtcata gccattgact atacatttgc 5146

tactggtgat tcagttttta attttttagt cacaggaaat ttttaactct actgtagatg 5206

catgtccatg cattttctgt gttatggaaa tccactgatt tttttttttt tttcaaatgg 5266

tggacttgc aatctgtttt ataattagtg ctccatttaa atctaattta taatttttat 5326

ttttaagcagc aaatgaaaca aaaatggcca gttttaagat tgtgttgccct gtaacacaaa 5386

atgttacgaa ggtttaggaa agcctctttg atttttgttt ggcccttgcct tggcccttgg 5446

taaagtaaaa ggaaacagta cacttgagc taggaaacca aagcaagctt tgtgaaactg 5506

gcacagtgat agagaattgc tgtggagagt tatagagcaa agggatgggt ccttgaggcc 5566

tggcagtggtg taaaggtggtt caaataaagg gctgtttcta caggtaacat taaatgtgaa 5626
 ctcaacactt ccagagtctt taaaggggtt ctatgtgtat cagtgtgaata gtgttttacc 5686
 accaactgcc tttctttggtt cctagttact gtaacaaata tttgatgata gaggtttatt 5746
 aattttggtt atccagacca ttaattttat ttgtttttgt ctatgtaato aaataaaatt 5806
 tgagtaacat gtaatggtaa ggattaatgc atggttatctt ggaccagaaa aaagtgccat 5866
 agaagaccaa taactgttta gttgaggcta gtctggaacc tttcattaga gcaatatttg 5926
 gttattgac ttcattttta tttactaaga aatgcaattt gggaattttt aatctgttat 5986
 gctttgttta tcaaccttga ttttaattaa gacttttata agactagctt aaaacaccaa 6046
 ccaacattat ttttgcaaaa gtgagttgga ctcaacttcc attcttgcta gtcagagtaa 6106
 gtaggcagca cttttaaaaa tatgtgaact caaatattgc acttctttca agatgtttatc 6166
 aattggttat tgtactgtat agttttaata attttgattg aaacccttta acaactcttt 6226
 gtaaatttta actcatttta gttgattttc agtactatctt acataggaat tgatttttat 6286
 ggatatagta gaagaaatgt gctgtatctt gataaaatcc acttattgta tgtgtgttgt 6346
 aatctaaaaa aaaaaagaat gacaaacagc ttctttaaga caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 6406
 aaatat 6412

<210> 2

<211> 1371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Thr Lys Arg Ser Leu Phe Val Arg Leu Val Pro Cys Arg Cys
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Glu Glu Glu Thr Val Thr Thr Leu Asp Tyr Ser His Cys
 20 25 30
 Ser Leu Glu Gln Val Pro Lys Glu Ile Phe Thr Phe Glu Lys Thr Leu
 35 40 45
 Glu Glu Leu Tyr Leu Asp Ala Asn Gln Ile Glu Glu Leu Pro Lys Gln
 50 55 60
 Leu Phe Asn Cys Gln Ser Leu His Lys Leu Ser Leu Pro Asp Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Thr Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Asn Leu Ile Asn Leu Arg Glu
 85 90 95
 Leu Asp Val Ser Lys Asn Gly Ile Gln Glu Phe Pro Glu Asn Ile Lys
 100 105 110
 Asn Cys Lys Val Leu Thr Ile Val Glu Ala Ser Val Asn Pro Ile Ser
 115 120 125

Lys Leu Pro Asp Gly Phe Ser Gln Leu Leu Asn Leu Thr Gln Leu Tyr
 130 135 140
 Leu Asn Asp Ala Phe Leu Glu Phe Leu Pro Ala Asn Phe Gly Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Lys Leu Gln Ile Leu Glu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Lys Met Leu
 165 170 175
 Pro Lys Thr Met Asn Arg Leu Thr Gln Leu Glu Arg Leu Asp Leu Gly
 180 185 190
 Ser Asn Glu Phe Thr Glu Val Pro Glu Val Leu Glu Gln Leu Ser Gly
 195 200 205
 Leu Lys Glu Phe Trp Met Asp Ala Asn Arg Leu Thr Phe Ile Pro Gly
 210 215 220
 Phe Ile Gly Ser Leu Lys Gln Leu Thr Tyr Leu Asp Val Ser Lys Asn
 225 230 235 240
 Asn Ile Glu Met Val Glu Glu Gly Ile Ser Thr Cys Glu Asn Leu Gln
 245 250 255
 Asp Leu Leu Leu Ser Ser Asn Ser Leu Gln Gln Leu Pro Glu Thr Ile
 260 265 270
 Gly Ser Leu Lys Asn Ile Thr Thr Leu Lys Ile Asp Glu Asn Gln Leu
 275 280 285
 Met Tyr Leu Pro Asp Ser Ile Gly Gly Leu Ile Ser Val Glu Glu Leu
 290 295 300
 Asp Cys Ser Phe Asn Glu Val Glu Ala Leu Pro Ser Ser Ile Gly Gln
 305 310 315 320
 Leu Thr Asn Leu Arg Thr Phe Ala Ala Asp His Asn Tyr Leu Gln Gln
 325 330 335
 Leu Pro Pro Glu Ile Gly Ser Trp Lys Asn Ile Thr Val Leu Phe Leu
 340 345 350
 His Ser Asn Lys Leu Glu Thr Leu Pro Glu Glu Met Gly Asp Met Gln
 355 360 365
 Lys Leu Lys Val Ile Asn Leu Ser Asp Asn Arg Leu Lys Asn Leu Pro
 370 375 380
 Phe Ser Phe Thr Lys Leu Gln Gln Leu Thr Ala Met Trp Leu Ser Asp
 385 390 395 400
 Asn Gln Ser Lys Pro Leu Ile Pro Leu Gln Lys Glu Thr Asp Ser Glu
 405 410 415
 Thr Gln Lys Met Val Leu Thr Asn Tyr Met Phe Pro Gln Gln Pro Arg
 420 425 430
 Thr Glu Asp Val Met Phe Ile Ser Asp Asn Glu Ser Phe Asn Pro Ser
 435 440 445

Leu Trp Glu Glu Gln Arg Lys Gln Arg Ala Gln Val Ala Phe Glu Cys
 450 455 460
 Asp Glu Asp Lys Asp Glu Arg Glu Ala Pro Pro Arg Glu Gly Asn Leu
 465 470 475 480
 Lys Arg Tyr Pro Thr Pro Tyr Pro Asp Glu Leu Lys Asn Met Val Lys
 485 490 495
 Thr Val Gln Thr Ile Val His Arg Leu Lys Asp Glu Glu Thr Asn Glu
 500 505 510
 Asp Ser Gly Arg Asp Leu Lys Pro His Glu Asp Gln Gln Asp Ile Asn
 515 520 525
 Lys Asp Val Gly Val Lys Thr Ser Glu Ser Thr Thr Thr Val Lys Ser
 530 535 540
 Lys Val Asp Glu Arg Glu Lys Tyr Met Ile Gly Asn Ser Val Gln Lys
 545 550 555 560
 Ile Ser Glu Pro Glu Ala Glu Ile Ser Pro Gly Ser Leu Pro Val Thr
 565 570 575
 Ala Asn Met Lys Ala Ser Glu Asn Leu Lys His Ile Val Asn His Asp
 580 585 590
 Asp Val Phe Glu Glu Ser Glu Glu Leu Ser Ser Asp Glu Glu Met Lys
 595 600 605
 Met Ala Glu Met Arg Pro Pro Leu Ile Glu Thr Ser Ile Asn Gln Pro
 610 615 620
 Lys Val Val Ala Leu Ser Asn Asn Lys Lys Asp Asp Thr Lys Glu Thr
 625 630 635 640
 Asp Ser Leu Ser Asp Glu Val Thr His Asn Ser Asn Gln Asn Asn Ser
 645 650 655
 Asn Cys Ser Ser Pro Ser Arg Met Ser Asp Ser Val Ser Leu Asn Thr
 660 665 670
 Asp Ser Ser Gln Asp Thr Ser Leu Cys Ser Pro Val Lys Gln Thr His
 675 680 685
 Ile Asp Ile Asn Ser Lys Ile Arg Gln Glu Asp Glu Asn Phe Asn Ser
 690 695 700
 Leu Leu Gln Asn Gly Asp Ile Leu Asn Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe
 705 710 715 720
 Lys Ala His Asp Lys Lys Asp Phe Asn Leu Pro Glu Tyr Asp Leu Asn
 725 730 735
 Val Glu Glu Arg Leu Val Leu Ile Glu Lys Ser Val Asp Ser Thr Ala
 740 745 750
 Thr Ala Asp Asp Thr His Lys Leu Asp His Ile Asn Met Asn Leu Asn
 755 760 765

Lys Leu Ile Thr Asn Asp Thr Phe Gln Pro Glu Ile Met Glu Arg Ser
 770 775 780

Lys Thr Gln Asp Ile Val Leu Gly Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser
 785 790 795 800

Lys Glu Glu Thr Glu His Leu Glu Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn Leu
 805 810 815

Glu Ser Val Asn Lys Val Asn Gly His Ser Glu Glu Thr Ser Gln Ser
 820 825 830

Pro Asn Arg Thr Glu Pro His Asp Ser Asp Cys Ser Val Asp Leu Gly
 835 840 845

Ile Ser Lys Ser Thr Glu Asp Leu Ser Pro Gln Lys Ser Gly Pro Val
 850 855 860

Gly Ser Val Val Lys Ser His Ser Ile Thr Asn Met Glu Ile Gly Gly
 865 870 875 880

Leu Lys Ile Tyr Asp Ile Leu Ser Asp Asn Gly Pro Gln Gln Pro Ser
 885 890 895

Thr Thr Val Lys Ile Thr Ser Ala Val Asp Gly Lys Asn Ile Val Arg
 900 905 910

Ser Lys Ser Ala Thr Leu Leu Tyr Asp Gln Pro Leu Gln Val Phe Thr
 915 920 925

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Asp Leu Ile Ser Gly Thr Lys Ala Ile Phe
 930 935 940

Lys Phe Asp Ser Asn His Asn Pro Glu Glu Pro Asn Ile Ile Arg Gly
 945 950 955 960

Pro Thr Ser Gly Pro Gln Ser Ala Pro Gln Ile Tyr Gly Pro Pro Gln
 965 970 975

Tyr Asn Ile Gln Tyr Ser Ser Ser Ala Ala Val Lys Asp Thr Leu Trp
 980 985 990

His Ser Lys Gln Asn Pro Gln Ile Asp His Ala Ser Phe Pro Pro Gln
 995 1000 1005

Leu Leu Pro Arg Ser Glu Ser Thr Glu Asn Gln Ser Tyr Ala Lys His
 1010 1015 1020

Ser Ala Asn Met Asn Phe Ser Asn His Asn Asn Val Arg Ala Asn Thr
 1025 1030 1035 1040

Ala Tyr His Leu His Gln Arg Leu Gly Pro Ala Arg His Gly Glu Met
 1045 1050 1055

Trp Ala Ile Ser Pro Asn Asp Arg Leu Ile Pro Ala Val Thr Arg Ser
 1060 1065 1070

Thr Ile Gln Arg Gln Ser Ser Val Ser Ser Thr Ala Ser Val Asn Leu
 1075 1080 1085

Gly Asp Pro Gly Ser Thr Arg Arg Ala Gln Ile Pro Glu Gly Asp Tyr
 1090 1095 1100
 Leu Ser Tyr Arg Glu Phe His Ser Ala Gly Arg Thr Pro Pro Met Met
 105 1110 1115 1120
 Pro Gly Ser Gln Arg Pro Leu Ser Ala Arg Thr Tyr Ser Ile Asp Gly
 1125 1130 1135
 Pro Asn Ala Ser Arg Pro Gln Ser Ala Arg Pro Ser Ile Asn Glu Ile
 1140 1145 1150
 Pro Glu Arg Thr Met Ser Val Ser Asp Phe Asn Tyr Ser Arg Thr Ser
 1155 1160 1165
 Pro Ser Lys Arg Pro Asn Ala Arg Val Gly Ser Glu His Ser Leu Leu
 1170 1175 1180
 Asp Pro Pro Gly Lys Ser Lys Val Pro Arg Asp Trp Arg Glu Gln Val
 185 1190 1195 1200
 Leu Arg His Ile Glu Ala Lys Lys Leu Glu Lys Met Pro Leu Ser Asn
 1205 1210 1215
 Gly Gln Met Gly Gln Pro Leu Arg Pro Gln Ala Asn Tyr Ser Gln Ile
 1220 1225 1230
 His His Pro Pro Gln Ala Ser Val Ala Arg His Pro Ser Arg Glu Gln
 1235 1240 1245
 Leu Ile Asp Tyr Leu Met Leu Lys Val Ala His Gln Pro Pro Tyr Thr
 1250 1255 1260
 Gln Pro His Cys Ser Pro Arg Gln Gly His Glu Leu Ala Lys Gln Glu
 265 1270 1275 1280
 Ile Arg Val Arg Val Glu Lys Asp Pro Glu Leu Gly Phe Ser Ile Ser
 1285 1290 1295
 Gly Gly Val Gly Gly Arg Gly Asn Pro Phe Arg Pro Asp Asp Gly
 1300 1305 1310
 Ile Phe Val Thr Arg Val Gln Pro Glu Gly Pro Ala Ser Lys Leu Leu
 1315 1320 1325
 Gln Pro Gly Asp Lys Ile Ile Gln Ala Asn Gly Tyr Ser Phe Ile Asn
 1330 1335 1340
 Ile Glu His Gly Gln Ala Val Ser Leu Leu Lys Thr Phe Gln Asn Thr
 345 1350 1355 1360
 Val Glu Leu Ile Ile Val Arg Glu Val Ser Ser
 1365 1370

<210> 3
 <211> 1647
 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1485)

<400> 3

```

gcg tcc ggc aag tct gcc aca ctg ctg tat gat cag ccc ctg cag gtg   48
Ala Ser Gly Lys Ser Ala Thr Leu Leu Tyr Asp Gln Pro Leu Gln Val
   1                               5                               10                               15

ttc act gct gcc tcc tca tct tct gag tta ctg tca ggt aca aag gca   96
Phe Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Glu Leu Leu Ser Gly Thr Lys Ala
                               20                               25                               30

gtt ttc aag ttt gat tca aat cac aac cct gaa gag cca gat ata ata  144
Val Phe Lys Phe Asp Ser Asn His Asn Pro Glu Glu Pro Asp Ile Ile
                               35                               40                               45

aga gct gcc aca gta tct ggc cca cag tct aca cct cac ctg tat ggt  192
Arg Ala Ala Thr Val Ser Gly Pro Gln Ser Thr Pro His Leu Tyr Gly
   50                               55                               60

ccc cca caa tat aat gtc cag tac agt ggc agt gct aca gtg aaa gac  240
Pro Pro Gln Tyr Asn Val Gln Tyr Ser Gly Ser Ala Thr Val Lys Asp
   65                               70                               75                               80

acc ttg tgg cac cct aaa cag aat cca caa ata gat cct gtc agt ttt  288
Thr Leu Trp His Pro Lys Gln Asn Pro Gln Ile Asp Pro Val Ser Phe
                               85                               90                               95

cct cct cag cgc ctt cca aga tct gag agt gca gaa aat cac agt tat  336
Pro Pro Gln Arg Leu Pro Arg Ser Glu Ser Ala Glu Asn His Ser Tyr
                               100                              105                              110

gca aag cat tct gcc aac atg aat ttc tct aac cat aac aat gtt aga  384
Ala Lys His Ser Ala Asn Met Asn Phe Ser Asn His Asn Asn Val Arg
                               115                              120                              125

gcc aat act gga tac cac tta caa cag aga ctt gcc cca gcc agg cat  432
Ala Asn Thr Gly Tyr His Leu Gln Gln Arg Leu Ala Pro Ala Arg His
   130                              135                              140

gga gaa atg tgg gct atc tcc ccg aat gac cga cta gtg cca gca gtc  480
Gly Glu Met Trp Ala Ile Ser Pro Asn Asp Arg Leu Val Pro Ala Val
  145                              150                              155                              160

act cgg act act att cag aga cag agt agc gtg tct tca acg gct tct  528
Thr Arg Thr Thr Ile Gln Arg Gln Ser Ser Val Ser Ser Thr Ala Ser
                               165                              170                              175

gta aat ctc ggt gac ccc aca agg cgt act gaa gga gat tac tta tcg  576
Val Asn Leu Gly Asp Pro Thr Arg Arg Thr Glu Gly Asp Tyr Leu Ser
                               180                              185                              190

tac aga gag tta cat tca atg gga aga act cca gtc atg tca gga tca  624
Tyr Arg Glu Leu His Ser Met Gly Arg Thr Pro Val Met Ser Gly Ser
                               195                              200                              205

cag aga cct ctt tct gca cga gcg tac agc atc gat ggc cca aat aca  672

```

Gln	Arg	Pro	Leu	Ser	Ala	Arg	Ala	Tyr	Ser	Ile	Asp	Gly	Pro	Asn	Thr		
	210					215					220						
tcc	agg	cct	cag	agt	gcc	cgt	ccc	tct	att	aat	gaa	ata	cca	gag	aga	720	
Ser	Arg	Pro	Gln	Ser	Ala	Arg	Pro	Ser	Ile	Asn	Glu	Ile	Pro	Glu	Arg		
225					230				235						240		
act	atg	tca	ggt	agt	gat	ttc	aat	tac	tca	cgg	act	agt	cct	tca	aaa	768	
Thr	Met	Ser	Val	Ser	Asp	Phe	Asn	Tyr	Ser	Arg	Thr	Ser	Pro	Ser	Lys		
				245				250							255		
aga	cca	aat	aca	agg	gtc	ggg	tct	gaa	cat	tct	ctg	tta	gat	cct	cca	816	
Arg	Pro	Asn	Thr	Arg	Val	Gly	Ser	Glu	His	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Pro		
			260					265						270			
gga	aaa	agc	aag	ggt	cct	cat	gac	tgg	cgg	gaa	caa	gta	cta	cga	cac	864	
Gly	Lys	Ser	Lys	Val	Pro	His	Asp	Trp	Arg	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	His		
	275						280					285					
att	gag	gcc	aaa	aag	tta	gaa	aag	cat	ccg	cag	aca	tcc	agt	cca	gga	912	
Ile	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Glu	Lys	His	Pro	Gln	Thr	Ser	Ser	Pro	Gly		
	290					295					300						
gag	tgt	tgc	caa	gat	gat	aga	ttc	atg	tca	gaa	gag	cag	aac	cac	cca	960	
Glu	Cys	Cys	Gln	Asp	Asp	Arg	Phe	Met	Ser	Glu	Glu	Gln	Asn	His	Pro		
305				310						315					320		
tca	ggt	gca	ctt	agt	cac	aga	ggt	ctt	cca	gac	agc	ctg	atg	aaa	atg	1008	
Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	His	Arg	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Leu	Met	Lys	Met		
				325					330						335		
cct	ttg	agt	aat	gga	caa	atg	ggc	cag	cct	ctc	agg	cct	cag	gca	cat	1056	
Pro	Leu	Ser	Asn	Gly	Gln	Met	Gly	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Gln	Ala	His		
			340					345						350			
tat	agt	caa	acc	cat	cac	ccc	cct	cag	gca	tct	gtg	gca	agg	cat	ccc	1104	
Tyr	Ser	Gln	Thr	His	His	Pro	Pro	Gln	Ala	Ser	Val	Ala	Arg	His	Pro		
		355					360						365				
tct	aga	gaa	caa	cta	att	gat	tat	ttg	atg	ctg	aaa	gtg	gcc	cac	cag	1152	
Ser	Arg	Glu	Gln	Leu	Ile	Asp	Tyr	Leu	Met	Leu	Lys	Val	Ala	His	Gln		
	370					375					380						
cct	cca	tat	aca	cat	ccc	cat	tgt	tct	cct	aga	caa	ggc	cat	gaa	ctg	1200	
Pro	Pro	Tyr	Thr	His	Pro	His	Cys	Ser	Pro	Arg	Gln	Gly	His	Glu	Leu		
385					390					395					400		
gca	aag	caa	gag	att	cga	gta	aga	gta	gaa	aag	gat	cca	gaa	ctt	gga	1248	
Ala	Lys	Gln	Glu	Ile	Arg	Val	Arg	Val	Glu	Lys	Asp	Pro	Glu	Leu	Gly		
				405				410							415		
ttt	agc	ata	tca	gga	ggt	gtc	ggc	ggc	aga	gga	aac	cct	ttc	aga	cct	1296	
Phe	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Asn	Pro	Phe	Arg	Pro		
			420				425						430				
gat	gat	gat	ggt	ata	ttt	gta	aca	agg	gta	caa	cct	gaa	gga	cca	gca	1344	
Asp	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Val	Thr	Arg	Val	Gln	Pro	Glu	Gly	Pro	Ala		
		435				440						445					
tca	aaa	tta	cta	cag	cca	gga	gat	aaa	att	att	cag	gct	aat	ggc	tac	1392	

Tyr Arg Glu Leu His Ser Met Gly Arg Thr Pro Val Met Ser Gly Ser
 195 200 205
 Gln Arg Pro Leu Ser Ala Arg Ala Tyr Ser Ile Asp Gly Pro Asn Thr
 210 215 220
 Ser Arg Pro Gln Ser Ala Arg Pro Ser Ile Asn Glu Ile Pro Glu Arg
 225 230 235 240
 Thr Met Ser Val Ser Asp Phe Asn Tyr Ser Arg Thr Ser Pro Ser Lys
 245 250 255
 Arg Pro Asn Thr Arg Val Gly Ser Glu His Ser Leu Leu Asp Pro Pro
 260 265 270
 Gly Lys Ser Lys Val Pro His Asp Trp Arg Glu Gln Val Leu Arg His
 275 280 285
 Ile Glu Ala Lys Lys Leu Glu Lys His Pro Gln Thr Ser Ser Pro Gly
 290 295 300
 Glu Cys Cys Gln Asp Asp Arg Phe Met Ser Glu Glu Gln Asn His Pro
 305 310 315 320
 Ser Gly Ala Leu Ser His Arg Gly Leu Pro Asp Ser Leu Met Lys Met
 325 330 335
 Pro Leu Ser Asn Gly Gln Met Gly Gln Pro Leu Arg Pro Gln Ala His
 340 345 350
 Tyr Ser Gln Thr His His Pro Pro Gln Ala Ser Val Ala Arg His Pro
 355 360 365
 Ser Arg Glu Gln Leu Ile Asp Tyr Leu Met Leu Lys Val Ala His Gln
 370 375 380
 Pro Pro Tyr Thr His Pro His Cys Ser Pro Arg Gln Gly His Glu Leu
 385 390 395 400
 Ala Lys Gln Glu Ile Arg Val Arg Val Glu Lys Asp Pro Glu Leu Gly
 405 410 415
 Phe Ser Ile Ser Gly Gly Val Gly Gly Arg Gly Asn Pro Phe Arg Pro
 420 425 430
 Asp Asp Asp Gly Ile Phe Val Thr Arg Val Gln Pro Glu Gly Pro Ala
 435 440 445
 Ser Lys Leu Leu Gln Pro Gly Asp Lys Ile Ile Gln Ala Asn Gly Tyr
 450 455 460
 Ser Phe Ile Asn Ile Glu His Gly Gln Ala Val Ser Leu Leu Lys Thr
 465 470 475 480
 Phe His Asn Ala Val Asp Leu Ile Ile Val Arg Glu Val Ser Ser
 485 490 495

<210> 5

<211> 3996
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 5

```

gcgggccgagg taggatcagg cttgtagtcc taacttccga ggctgaggca ggaggctcac 60
ttgcctccag gaggccagcc gaggctacat gagaccttgt ctcaaacaaa caaacaaaca 120
aacaaacaga gtaagtaaag aaaaatctga atttagtctg acatttgaat tactcttttt 180
gtagcctttg tccacaaaag ttttgagtgt gcatgctatg tggcttccca gaacaaatca 240
catatttaat actccttttc tctattaatt gtcctggtat aattttgat ccatttgctc 300
tgtgaagaca aattattaga aactttcaat ttttcaatat catatccaaa atacagtgtc 360
tttcagatta catacattag gtaataacat cccataccat tcattatatt tctaaactca 420
gaatggtttc tgggaaatgc attttttaaa aagccatatic atccaggttc ttatacaccg 480
tcactgaaca cttatttgtt cagacgtgtt tgttaatgta tggtagtga gaatcgtagt 540
ttgaatcact gaagtaattc tatgcaattg aactttctat aatgatggga atattatgta 600
atggttgacc cactttggta tccttagtag ggaataagga aatgacattt taaatttat 660
ttgatttaac cttaataatta agcatgtata tctactggct accataccgg acatcaggta 720
gcaggttatc ttattagtat acaacgataa gcttaatecc tttttatcag ttacattcct 780
tattgaatga attgtttatt cctgggtgga aatgtgcat ttttataaac attaagtttt 840
tataaacaca aagttttcct ctaaaatctt tatctagaaa taagcataka aaaaaagaga 900
atagaattct tactctgtgt gtgtgatcgg attctaacc aggacaagcc atacatggctc 960
atgtgtcat tgcctcagat gaaaacatcg ggtgtttcac ttactagatt tttaaaaaat 1020
ctttaaatag tgtataaata gacctattga tactaggttt tgaggatcta gttcaaatgt 1080
atattatatt ctttttcaaa aatctgtttt atgagtctgt gtagttctaa aaaagcaact 1140
cttaagtacc atgttaaaga tctttatttt tgactgttgt ttgtagttaa gaaaatctgg 1200
ttctctatgg aagcagtagg atattctcta aaaaattgta atgaagataa agaaaatatt 1260
tataaacatt atccaaagag ctacagcata gtgcctgatg attgagtaaa gtcagtgtag 1320
aacagttgt actgggttgg ctgaagtatc gttaagtggg aagcagagcc ttttagtgcca 1380
cattgtatcc tgaggtaagg aaaaaccaat gttgggtgta tacactttac ttaaacattc 1440
gcattttgtt cataaatgat tattctttta agtaattaga gtatttaaag tattgccttg 1500
ctgatttttt gttactttct tatattttat goctgaggtc ttactgattt aactctggct 1560
taatgotgtt taaaagtatt gtttctgtac ctaaggcaag aattatattc atgtacaaag 1620
aattactaac caattgggta tcattctcat tttcttaagt aatttccactg ctagtttact 1680
cttagcctag ttagaattta tacacaactt cttaataaaa ctggccttgt gaatttttat 1740
taattcaaag ttggctttct ctccctgtta actgagagac tgtattttaa gtgagtttat 1800
gcataataaa tcttaaacaa cttagaacct ataagctagt attagattaa aacaaaatta 1860
tacttggagt agatgggact tttcatgtag gagaatcata agaaagttaa atgtggttga 1920
tctctgatga acggttgaga agacctgaaa atgtctgcac agtcatttcc tattcagaaa 1980
tgcacagtca gggtcttgac taagagacag aactcttagt tggaaattag aggaaaacct 2040
ttactgttt ttaacagcta agcagacttc acaacgcata gttttataaa aacgtaggga 2100
tattttgttt tgtgttgtat tcttggattg ttttgtaaag taccagagag cctgagttta 2160
atltgaagtc cagttagactg tcaactgttg atattaatag gctcagttgg gtgtatgtgg 2220
tggtaggagt atgtttgtc tgtggcatgt ggaattgtgc tgtatggacg gtcatttgtt 2280
ggaaaagtgt ttgttatatt atatgcattc tgatttgttt ttatgttcat gctgcagcat 2340
ttaaaatga ctacaaaacg aagtttgttt gtgctgttgg taccatgtcg ctgtctacga 2400
ggagaagagg agacagtcac tactctagat tattctcatt gcagcttggg acaagtctcc 2460
aaagagatbt tcaccttga aaaaacttta gaggagctct atttagatgc taatcagatt 2520
gaagagcttc caaaggatag ttaatactat caagaattat attaggtaat gtctatgcat 2580
agcagtttat attcttataat tgtttatata atgtgttctt gtttattggg ttagtcttac 2640
tghtaagcaca attcaaatg atgtagaact ttgttcaagt tgtttaaagta cttgtgtgga 2700
taattgaatt ttatttttac ttataacaat taaaatagat aatcagataa tatgacttct 2760
ggaaccatta gatttaacca gactaagaaa agtgaactct tactgtaatt tctataagca 2820
ctttatattg attgctaaca ttgttacttc cattgtaca gcttttatgg ttctgtaact 2880
tcttagaggt gggattctgc tgttttccat tttgtatgga attgatttgg agacagtga 2940
tctctgaagt ctagtacaa ctggtagggg acagattgct gctgtgacgt tctttctcag 3000
attgccactg tgtttattat tgttatttta gtaagctctt ttttctctta tctgtgtttg 3060
ttttcctgtg batgaaaagg ttgcagtgc tttaaattgt ttattacagt ctgtatccct 3120
ctgaatggca gacagggctc tacctttag actagactgt cctcaactct cagagatctg 3180
cctgcccttg ctttccaagg ctgtggttga aggtgtacac caccttgctc tttgaagctg 3240
taaatggaga cttgaaattg atggcttaaa aacaagttta gactttggca tgggtgtacc 3300

```

```

taatgagaa agatttctag ttcaaggcca gtctgaccta cacagtgggt tctgtcatgg 3360
cctggatcat atatataatc agaccttggg ttcaaaacct cctgaccatg gtcacgaatg 3420
aacaattttaa tatgcattac cagaattctg aaaaataaac tgtaatgttg actatgagat 3480
ttagacgaca aaattataga atacttagaa tttctgatga aaaagaaatc gtgtaaatgt 3540
gcagtgtgta ggataaacta aaaaactggt tatctgaaat tcacatttaa ttgggtgtct 3600
cgtaattaat ccagcaaccc taactgaaat gtaacaggta atatatcttg ttgcatatag 3660
actttattta atgaaatagt tgttttcaat atttatgttt gtgaacatc tgaatgacag 3720
tattcaaaag catttgaaag ccaactgctgt cctaggtaat gaagttttac aaaactttat 3780
tgagacagga tctcactttg tgatctagac aaacttcaaa cttcattgca atcctcctgc 3840
ctcagcttc cagatctggg gattataggc tgagccacta tgctgtggtt attcttaata 3900
atgtggagaa gtctagaact tttctatttg tgcacagtaa aggtcttcag tttaacatgg 3960
atttgtgaat cacacctgat gcctgcgatt gtagtg 3996

```

```

<210> 6
<211> 144
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 6
agcatgctgt caaggtcctt taattccaat tttactactg taagcagttt tcaactgtggc 60
agctctaggg atctgcatgg cagccagggc agtcttgctt tgagtgttgc agacagaaga 120
ggttctgggt ggcacatttt tcga 144

```

```

<210> 7
<211> 48
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 7
Ser Met Leu Ser Arg Ser Phe Asn Ser Asn Phe Thr Thr Val Ser Ser
  1                5                10                15
Phe His Cys Gly Ser Ser Arg Asp Leu His Gly Ser Gln Gly Ser Leu
                20                25                30
Ala Leu Ser Val Ala Asp Arg Arg Gly Ser Gly Gly His Ile Phe Arg
  35                40                45

```

```

<210> 8
<211> 676
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 8
ctcgagacca ggaagccagc ccgcacccca acccccacca aagccaacta ctcttcttct 60
gtgggaggcc agtccacatc cgctctcacc cgagagagat attcagctgg atccaaagtg 120
actgatgaag ggaaggaaat catgtcaagc gaagccttga aaaagctgcc ctgagacggg 180
gtcccgcoga aagaatgttg gctcaattaa gaaacatcag ggagataaat tcaaccagtg 240
gtgtctaaaa atgactacaa aacgaagttt gtttgtgctg ttgggtaccat gtcgctgtct 300
acgaggggaa gaggagactg tcaactactct tgattattct cattgcagct tagaacaagt 360
tccgaaagag atttttactt ttgaaaaaac cttggaggaa ctctatttag atgctaata 420
gattgaagag cttccaaagc aactttttta ctgtcagctt ttacacaagc tgagtttggc 480
agacaatgat ttaacaacgt taccagcatc cattgcaaac cttattaatc toaggggaact 540

```

ggatgtcagc aagaatggaa tacaggagtt tccagaaaat ataaaaaatt gtaaagtttt 600
gacaattgtg gaggccagtg taaaccctat ttccaagctc cctgatggat tttctcagct 660
gttaaacccta acccag 676

<210> 9
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
ccattcagac ctgatgatga tggatatttt gtaacaaggg tacaacctga aggaccagca 60
tcaaaattac tgcagccagg tgataaaatt attcaggcta atggctacag ttttataaat 120
attgaacatg gacaagcagt gtccttgcta aaaactttcc agaatacagt tgaactcatc 180
attgtacgag aagtttcctc ataagcactg tggacaaaaa aagcggggaa gacagcaaga 240
tttattggaa gatacttaca ggggaaatta atattttgac tatttttata tataaagaag 300
aactcaaaaa attatgttca aatttgtaca ttaatgaaat aatggataaa ggagactggt 360
gaattc 366

<210> 10
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
gggaggccag tccacatccg ctctcaccgg a 31

<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
atcagctgg atccaaagtg actgatgaag gg 32

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
actacaaaac gaagtttgtg 20

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 13
gtttctcag aatgtccatt ta 22

<210> 14
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14 atgtgggtca gtcctattag gagactggg	29
<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 15 cagatccaac tggaccactt ttctgagggg	30
<210> 16 <211> 44 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 16 cagcagatgt gattttaacg gttgtacttg gctgctgagg tcca	44
<210> 17 <211> 31 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 17 gaggccccac aagtggccca caatctgcac c	31
<210> 18 <211> 33 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 18 cctcctcagc tccttcctag atcagagagc aca	33
<210> 19 <211> 29 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 19 cttccaataa atcttgctgt cttccccgc	29
<210> 20 <211> 29 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 20 atagtcaaaa tattaatttc ccctgtaag	29
<210> 21	

<211> 9
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

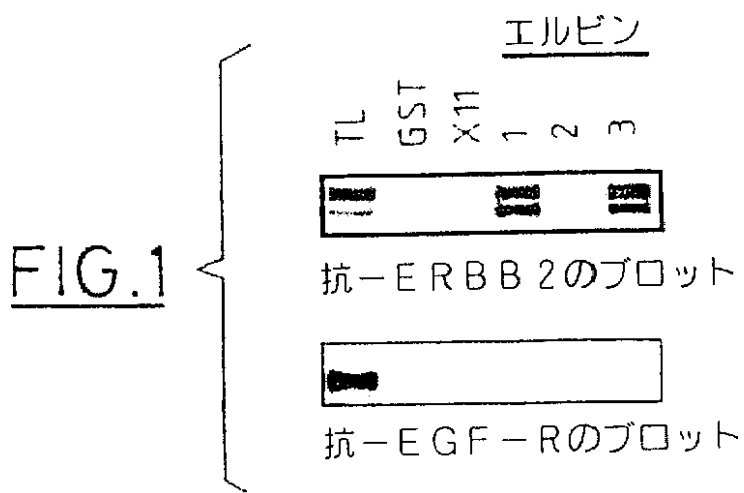
<220>
<223> Description de la séquence artificielle : extrémité C-terminale
de ERBB2/HER2

<400> 21
Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1 5

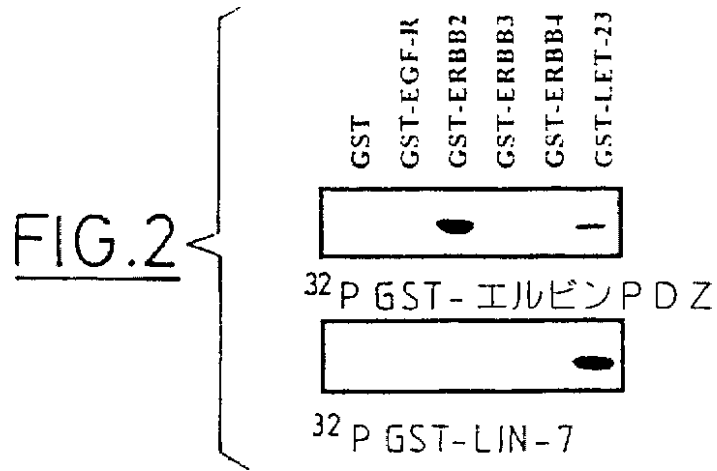
1

21

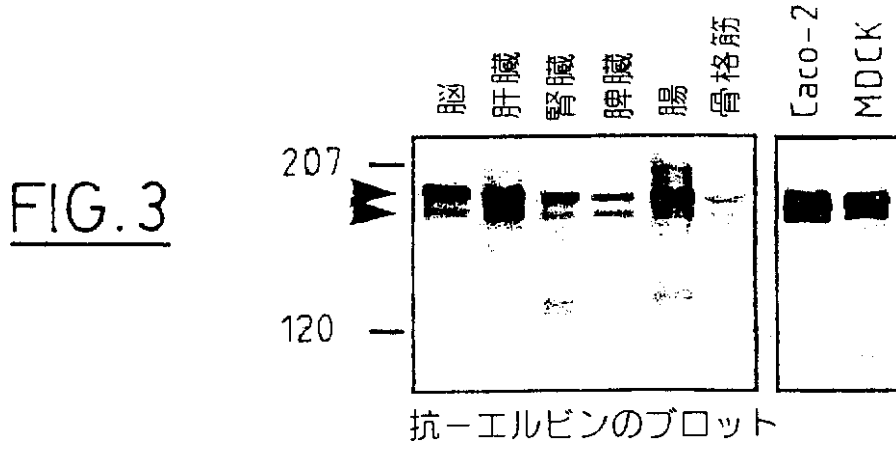
【図1】



【図2】



【図3】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年6月18日(2002.6.18)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 配列番号2又は4、残基1212~1280が欠失した配列番号2の配列、及び配列番号7の配列のフラグメントのアミノ酸1211~1212間への挿入を有する配列番号2の配列、から成る群から選択されたアミノ酸の配列を含んで成る、エルピンと呼ばれる単離されたポリペプチド。

【**請求項2**】 請求項1記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸。

【**請求項3**】 配列番号1、配列番号3、ヌクレオチド3957~4163の欠失を有する配列番号1の配列、及び配列番号6のフラグメントのヌクレオチド3956~3957間への挿入を有する配列番号1の配列、から成る群から選択された配列を含んで成る請求項2記載の核酸。

【**請求項4**】 配列番号5、及び配列番号5のヌクレオチド2347~2535を含んで成る配列、から成る群から選択された単離された核酸配列を含んで成る単離された核酸。

【**請求項5**】 a) - 配列番号2の残基1~501;

- 配列番号4の残基296~334;

b) - 配列番号7の配列;

c) - ロイシンへのヒスチジン1347の突然変異を有する配列番号2の配列;

- メチオニンへのロイシン1291及びイソロイシンへのフェニルアラニン1293の突然変異を有する配列番号2の配列;

- チロシンへのヒスチジン1347及びアスパラギン酸へのグリシン1348の突然変異を有する配列番号2の配列; 及び

- アスパラギンへのトレオニン1316及びセリンへのアルギニン1317の突然変異を有する配列番号2の配列；

から成る群から選択された配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項6】 - 配列番号2の残基1279～1371；

- 配列番号2の残基502～1278；

- 配列番号2の残基914～1371；

- 配列番号2の残基1212～1280；

から成る群から選択された配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項7】 請求項5又は6記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸。

【請求項8】 請求項2，3，4又は7のいずれか1項記載の核酸を含むクローニング及び/又は発現ベクター。

【請求項9】 請求項8記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項10】 請求項2，3，4又は7のいずれか1項記載の核酸配列又はその相補的配列と、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で特異的にハイブリダイズする、少なくとも15個のヌクレオチドを含んで成るプローブ又はプライマーを得るためへの請求項2，3，4又は7のいずれか1項記載の核酸の使用。

【請求項11】 その配列が配列番号8及び9から成る群から選択されるプローブ。

【請求項12】 その配列が配列番号10～20から成る群から選択されるプライマー。

【請求項13】 組換えポリペプチドの生成方法であって、請求項2，3，4又は7のいずれか1項記載の核酸を含むベクターを宿主細胞中にトランスフェーシ、この細胞を請求項1又は5記載のポリペプチド又は請求項4記載の核酸配列によりコードされるポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養することを含んで成る方法。

【請求項14】 腫瘍、又は腫瘍を進行せしめる素因のインビトロ診断方法であって、

a 1) 請求項 2, 3, 4 又は 7 のいずれか 1 項記載の配列を含んで成る、エルビン遺伝子又はその転写体のすべて又は一部の増幅を可能にする特定のオリゴヌクレオチドの存在下にDNA又はRNAを含む生物学的検体を置き;

b 1) 前記DNA又はRNAを増幅し;

c 1) 前記増幅の生成物を検出し;

d 1) 得られる前記増幅生成物と対照検体により得れるそれらの生成物とを比較し、そしてこの手段において、腫瘍を進行せしめる素因を示す、エルビン遺伝子又はその転写体における可能な異形を検出し; 又は

a 2) 請求項 2, 3, 4 又は 6 のいずれか 1 項記載の配列を含んで成る、エルビン遺伝子の転写体のすべて又は一部の増幅を可能にする特定のオリゴヌクレオチドの存在下に、患者からの疑わしい細胞のサンプルを採取することにより得られた、mRNAを含む生物学的検体を置き;

b 2) 前記転写体を増幅し;

c 2) 前記増幅生成物を検出し、そして定量化し;

正常な対照に対してのエルビン転写体の量の変化が腫瘍又は腫瘍の進行の素因を示すことから成る段階を含んで成る方法。

【請求項 15】 請求項 1, 5 又は 6 記載のポリペプチドに対して向けられた抗体。

【請求項 16】 生物学的検体における請求項 1 又は 5 記載のポリペプチドの検出又は精製のためへの請求項 15 記載の少なくとも 1 つの抗体の使用。

【請求項 17】 腫瘍、又は腫瘍を進行せしめる素因のインビトロ診断方法であって、請求項 1, 5 又は 6 記載のポリペプチドに対して向けられた少なくとも 1 つの抗体と、患者から採取された疑わしい細胞のサンプルから得られた生物学的検体とを、請求項 1, 5 又は 6 記載のポリペプチドと前記抗体又は複数の抗体との間での特定の免疫学的複合体の形成を可能にする条件下で接触せしめ、そして形成され得る特定の免疫学的複合体を検出及び/又は定量することを含んで成る方法。

【請求項 18】 支持体上にできる限り固定された、請求項14記載の少なくとも 1 つの抗体;

請求項1, 5又は6記載のポリペプチドと前記抗体との間での特異的抗原/抗体複合体の形成を示すための手段、及び/又はそれらの複合体の定量化のための手段を含んで成るキット。

【請求項19】 請求項2, 3, 4もしくは7のいずれか1項記載の核酸、請求項2, 3, 4もしくは7のいずれか1項記載の核酸のアンチセンス核酸、又は請求項1, 5もしくは6記載のポリペプチド、及び医薬的に許容できるビークルを含んで成る医薬組成物。

【請求項20】 腫瘍の処理のために意図された薬剤の製造のためへの請求項2, 3, 4もしくは7のいずれか1項記載の核酸又は請求項1, 5もしくは6記載のポリペプチドの使用。

【請求項21】 請求項1記載のポリペプチドをコードする遺伝子が無効にされている、非ヒトトランスジェニック動物を得るための方法。

【請求項22】 請求項21記載の方法により得られることができる非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項23】 エルビン及びERBB2受容体の結合を阻害するか又は活性化する分子のスクリーニング方法であって、

- 試験されるべき分子と、

(i) 請求項1記載のポリペプチドを固定することができる、ERBB2/HER2受容体又はそのフラグメントである第1の結合パートナー、及び

(ii) ERBB2/HER2受容体を固定することができる、請求項1記載のポリペプチド又はそのフラグメントである第2の結合パートナーとを接触せしめ、ここで前記第1及び/又は第2の結合パートナーが、検出されるような手段で、必要に応じラベルされ；

- 前記結合パートナー間の相互作用の阻害又は活性化を、試験されるべき前記分子により評価する；

ことを含んで成る方法。

【請求項24】 エルビントタンパク質とERBB2/HER2受容体との間の相互作用を高めるか又は低める、エルビンの変異体又はERBB2/HER2の変異体の同定方法で

あって、

- 請求項1, 5又は6記載のポリペプチドに対して突然変異を行い、そして前記ポリペプチドとERBB2/HER2受容体との相互作用に対するこの突然変異の効果を評価し;又は

- ERBB2/HER2受容体に対して突然変異を行い、そして前記受容体と請求項1, 5又は6記載のポリペプチドとの相互作用に対するこの突然変異の効果を評価することを特徴とする方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FR 01/01078
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER CIB 7 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/53 A61K48/00 A61K38/17 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CIB 7 C07K C12N C12Q G01N A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGASE T ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XV. THE COMPLETE SEQUENCES OF 100 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, vol. 6, no. 5, 29 octobre 1999 (1999-10-29), pages 337-345. XP000865804 ISSN: 1340-2838 tables 2,3 -& DATABASE EMBL [in line] EBI; ACC. NO.: AB033051, 11 novembre 1999 (1999-11-11) OHARA ET AL.: "Homo sapiens mRNA for KIAA1225 protein, partial cds" XP002156166 abstract -/--	1-12,14, 15,17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 14 August 2001		Date of mailing of the international search report 17.08.2001
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/01078

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>--- DATABASE EMBL [in line] EBI; ACC.NO.: AI428736, 16 March 1999(1999-03-16) MARRA ET AL.: "The WashU-NCI mouse EST project 1999" XP002156167 abstract</p>	1-9,12, 14,15,17
X	<p>--- WO 98 55512 A (HUYLEBROECK DANNY ;VERSCHUEREN KRISTIN (BE); VLAAMS INTERUNIV INST) 10 December 1998(1998-12-10)</p>	1-9,12, 14,15,17
A	<p>SEQ ID NO:18 page 25 -page 29; claims 1,2,12,22</p>	22,23
X	<p>--- WO 99 04265 A (SAHIN UGUR ;TURECI OZLEM (DE); PFREUNDSCHUH MICHAEL (DE); GOUT IVA) 28 January 1999(1999-01-28) SEQ ID NO:445 claims 1-117</p>	1-3,5-19
A	<p>--- US 6 037 134 A (MARGOLIS BENJAMIN LEWIS) 14 March 2000(2000-03-14) column 2, line 3 - line 23 claims 1-10; figures 4,7</p>	1-23
A	<p>--- SONGYANG Z ET AL: "RECOGNITION OF UNIQUE CARBOXYL-TERMINAL MOTIFS BY DISTINCT PDZ DOMAINS" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 275, 3 January 1997 (1997-01-01), pages 73-77, XP000887129 ISSN: 0036-8075 abstract; tables 1,2</p>	1-23
P,X	<p>--- BORG ET AL.: "ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor" NATURE CELL BIOLOGY, vol. 2, July 2000(2000-07), pages 407-414, XP002156165 the whole document</p> <p>-----</p>	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01078

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9855512 A	10-12-1998	AU 8623798 A EP 0994945 A	21-12-1998 26-04-2000
WO 9904265 A	28-01-1999	US 6218521 B US 6043084 A AU 8571598 A EP 0996857 A	17-04-2001 28-03-2000 10-02-1999 03-05-2000
US 6037134 A	14-03-2000	AU 1980995 A WO 9524205 A US 6001583 A	25-09-1995 14-09-1995 14-12-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)	
C 0 7 K	14/485	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 4
	16/22		1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
C 1 2 Q	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	
(71)出願人	ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ ティ・オブ・ミシガン THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHI GAN アメリカ合衆国48108ミシガン州アナーバ ー、サウス・ステイト・ストリート3003 番、ウルバリン・タワー、ルーム2071、 テクノロジー・マネージメント・オフィス			
(72)発明者	ビルンボーム, ダニエル フランス国, エフ - 13009 マルセイユ, ラ クロワ デュ シュド, リュ パルダ シニ, 9			
(72)発明者	ボルグ, ジャン - ポール フランス国, エフ - 13005 マルセイユ, ブルバール シャープ, 177			
(72)発明者	マルゴリス, ベン アメリカ合衆国, ミシガン 48104, アン アーバー, ニューキャッスル ロード 3060			

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
4B024 AA01 AA12 BA01 CA04 DA02
DA05 DA06 DA11 DA12 EA02
EA04 GA11 HA12
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ53 QR08
QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
4B064 AG13 CA02 CA05 CA06 CA10
CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X
AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA22
MA55 NA14 ZB261 ZC781
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA20 DA75 EA28 EA51
FA72 FA74

专利名称(译)	编码Elvin的基因及其诊断和治疗用途		
公开(公告)号	JP2003530109A	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001575177	申请日	2001-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院 密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉Santu等德拉Rusherushe医疗 (E NS ER强麦EM) 密歇根大学董事会		
[标]发明人	ビルンボームダニエル ボルグジャンポール マルゴリスベン		
发明人	ビルンボーム,ダニエル ボルグ,ジャン-ポール マルゴリス,ベン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K1/22 C07K14/485 C07K14/705 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/705 A61K38/00 A61K48/00		
FI分类号	A61K48/00 A61P35/00 C07K1/22 C07K14/485 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02. C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA01 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG13 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA22 4C084/MA55 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC781 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA20 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000004517 2000-04-07 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码基因的新基因，新核苷酸序列和新核苷酸序列，所述蛋白被称为ervin (ERBB2相互作用蛋白)，其与特别参与癌症进展的ERBB2 / HER-2受体的细胞内部分相互作用。它涉及氨基酸的诊断和治疗用途。

表1

pACT-エルビン	914-1371		1240-1371	
	Bgal	-His	Bgal	-His
ERBB2	+	+	+	+
ERBB2. VA	-	-	-	-
ERBB4	-	-	-	-