

(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2002 - 541836

(P2002 - 541836A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(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 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 3/10	4 B 0 2 4
38/43		29/00	4 B 0 5 0
45/00		35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 3/10		37/02	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全104数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 612430(P2000 - 612430)

(86) (22)出願日 平成12年4月20日(2000.4.20)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月17日(2001.10.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/10882

(87)国際公開番号 W000/63351

(87)国際公開日 平成12年10月26日(2000.10.26)

(31)優先権主張番号 60/130,383

(32)優先日 平成11年4月21日(1999.4.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミックス・インコーポレ
イテッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パ
ロアルト・ポータードライブ 3160

(72)発明者 ラル、ブリーティ
アメリカ合衆国カリフォルニア州95054・サ
ンタクララ・ラスドライブ 2382

(72)発明者 ユエ、ヘンリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サ
ニーベイル・ルイスアベニュー 826

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 炭水化物修飾酵素

(57)【要約】

本発明は、ヒト炭水化物修飾酵素 (CME) と、CME
を同定及びコードするポリヌクレオチドとを提供する。
本発明はまた、発現ベクター及び宿主細胞、抗体、アゴ
ニスト、アンタゴニストを提供する。更に、本発明は、
CMEの発現に関連する疾患の診断方法、治療方法及び
予防方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、

a) SEQ ID NO:1乃至SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO:1 - 5) からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、

b) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、

c) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、

d) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする単離されたポリペプチド。

【請求項2】 SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択された請求項1の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 請求項1のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択された請求項3の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項3のポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項5の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項7】 請求項5の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

【請求項8】 請求項1のポリペプチドを作製する方法であって、

a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件の下で、請求項1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、

b) そのように発現したポリペプチドを回収するステップとを含むことを特徴とする請求項1のポリペプチドの作製方法。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項10】 単離されたポリヌクレオチドであって、

- a) SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、
- b) SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列と、
- c) 前記a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、
- d) 前記b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、
- e) 前記a) - d)のRNA等価物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項11】 請求項10のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項10のポリヌクレオチド配列を有するサンプル内の標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

a) 前記サンプル内の前記標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも16個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルとをハイブリダイズするステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドとによってハイブリダイゼーション複合体が形成される条件の下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該ステップと、

b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在の有無を検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項13】 前記プローブが少なくとも30個の連続するヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項15】 有効量の請求項1のポリペプチド及び医薬的に容認できる賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項16】 機能的CME（炭水化物修飾酵素である精製されたポリペ

プチド)の発現の低下に関連する疾患やその症状の治療方法であって、請求項15の医薬品組成物をそのような治療が必要な患者に投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項17】 請求項1のポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

- a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、
- b) 前記サンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項17のスクリーニング方法によって同定されたアゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項19】 機能的CMEの発現の低下に関連する疾患やその症状の治療方法であって、請求項18の医薬品組成物をそのような治療が必要な患者に投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項20】 請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

- a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、
- b) 前記サンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項20のスクリーニング方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項22】 機能的CMEの過剰な発現に関連する疾患やその症状の治療方法であって、請求項21の医薬品組成物をそのような治療が必要な患者に投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項23】 請求項4の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現量を効果的に変化させる化合物をスクリーニングする方法であって、

- a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、
- b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の技術分野)**

本発明は、炭水化物修飾酵素 (carbohydrate-modifying enzyme) の核酸配列及びアミノ酸配列、並びにこれらの配列を用いた炭水化物代謝異常及び自己免疫異常/炎症異常、癌の診断及び治療、予防に関連する。

【0002】**(発明の背景)**

糖、サッカリド、デンプン若しくはセルロースを含む炭水化物は、多数の水酸基を含むアルデヒド化合物若しくはケトン化合物である。炭水化物代謝の重要性は、血糖値を維持するための感受性の調節系 (sensitive regulatory system) によって実証される。膵臓ホルモンであるインスリンは、細胞によるグルコースの取込み及び貯蔵を増大させ、同じく膵臓ホルモンであるグルカゴンは細胞からのグルコースの放出を増大させる。炭水化物は、哺乳動物細胞において3つの重要な役割を果たす。第1の役割は、貯蔵エネルギー及び燃料、代謝中間体として利用される。炭水化物は解糖プロセスにおいてエネルギーの形態に分解され、後に利用するためにグリコーゲンとして貯蔵される。第2の役割は、糖デオキシリボース及び糖リボースがそれぞれ、DNAの支持構造及びRNAの支持構造の一部を形成する。第3の役割は、分泌経路を進む際、分泌及び膜タンパク質、分泌及び膜脂質に炭水化物修飾がなされる。実際、真核細胞膜の成分の2~10%が、膜糖タンパク質及び膜糖脂質におけるオリゴ糖である。炭水化物のオリゴ糖修飾によって構造上の広範な多様性が生まれる。糖タンパク質及び糖脂質における修飾は、その殆どが細胞膜の細胞外部位にあるため、細胞内の認識に重要である (Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York NY, pp. 298-299, 331-347)。

【0003】

N及びO結合オリゴ糖はタンパク質に輸送され、小胞体 (ER) 内及びゴルジ体内で起こる一連の酵素反応において修飾される。オリゴ糖は、タンパク質のフォールディング中及びその後タンパク質を安定化させ、膜内のタンパク質を方向付け

、タンパク質の可溶性を高め、リソソームターゲティングのシグナルとして作用する。糖脂質はリン酸脂質やコレステロールと共に細胞の膜を形成する。糖脂質の例には、ニューロンのミエリン鞘内の赤血球及びガングリオシド上の血液型抗原が挙げられる (Lodish, H. et al. (1995) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York NY, pp. 612-615)。

【0004】

炭水化物はまた、ポリサッカリドであるグリコサミノグリカン (GAG) を形成する。このポリサッカリドは、2糖の繰り返し構造であって、分枝を持たない直線である。GAGは、1 或いは複数のGAGに付着したコアタンパク質からなる大きな分子プロテオグリカンの一部として、或いは単独で存在する。GAGは、細胞表面及び細胞内、細胞外マトリックスに存在する。GAG hyaluronanは滑液に豊富に存在する (Pitsillides, A.A. et al. (1993) *Int. J. Exp. Pathol.* 74:27-34) 。軟骨などの結合組織の細胞外マトリックスにおけるプロテオグリカンは、荷重関節への負荷の分配に必須である。細胞表面付着プロテオグリカンは、細胞を細胞外マトリックスに固着する。細胞外プロテオグリカン及び細胞表面プロテオグリカンは何れも成長因子に結合し、それらの細胞表面受容体への結合を促進し、それに続くシグナル伝達経路を開始させる (Lodish, 前出、pp. 1139-1142) 。

【0005】

Man₉-マンノシダーゼは、N結合オリゴ糖の初期のプロセッシングに関与する1,2-マンノシダーゼ (グリコシルヒドロラーゼ) である。この酵素は、Man₉-(GlcNac)₂及びMan₅-(GlcNac)₂における1,2-マンノシダーゼ結合の特異的切断を触媒する。多数の1,2-マンノシダーゼが哺乳動物細胞で同定されており、異なるクラスのN-糖タンパク質のプロセッシングには異なる1,2-マンノシダーゼが必要であると思われる。Man₉-マンノシダーゼは、短い細胞質尾部及び1回膜貫通ドメイン、大きな管腔触媒ドメインを有するII型膜タンパク質である。ブタ肝臓Man₉-マンノシダーゼはER及び一過性の小胞 (transient vesicle) に局在するが、ヒト腎臓Man₉-マンノシダーゼはゴルジ体に局在する (Bause, E. et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 217:535-540; Bieberich, E. and E. Bause (1995) *Eur. J. Biochem.* 233:644-649) 。

【0006】

トランスフェラーゼは、炭水化物などの細胞成分の合成及び分解に必須の反応に関与する。例えば、ガラクトース -1, 4-N-アセチルグルコサミンの生成反応を触媒するガラクトシルトランスフェラーゼは、ラクトースの合成にある役割を果たし、また細胞膜の成分として細胞内認識及び/または接着において作用し得る (Masri, K.A. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:657-663)。

【0007】

シンセターゼは、固有の細胞の機能化において重要な役割を果たす炭水化物修飾酵素の別のクラスである。例えば、シアル酸付加複合糖質の合成には、シチジン5'-1リン酸N-アセチルノイラミン酸 (CMP-Neu5Ac) シンセターゼによって触媒される反応であるCMP-Neu5Acの合成が必要である (Munster, A.K. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9140-9145)。細胞表面糖タンパク質及び糖脂質のシアル酸は、様々な組織における固有の構造及び機能に寄与している。

【0008】

グルコシダーゼも炭水化物修飾酵素の別のクラスであり、様々なグルコシドにおけるグルコシド結合の加水分解によって炭水化物からのグルコースの遊離を触媒する。血液学的な異常によって特徴付けられる遺伝性異常症ゴーシェ病I型が、白血球 グルコシダーゼ値のアッセイによって、ヘテロ接合性個体若しくはホモ接合性個体において見出され得る (Raghavan. S.S. et al. (1980) Am. J. Hum. Genet. 32:158-173)。

【0009】

他の幾つかの異常症において炭水化物代謝が変わる。糖尿病の特徴は、血中の糖の異常な上昇 (高血糖症) である。I型糖尿病は、脾臓インスリン分泌細胞の自己免疫に関連した欠損から起こる。II型糖尿病は、インスリン抵抗性及びグルコースに応答するインスリン分泌の障害から起こり、肥満と関連性がある。血中の糖の異常な低下、即ち低血糖症は、薬剤の使用及び炭水化物修飾酵素の遺伝的欠陥、癌、肝臓疾患、腎臓疾患などから起こる (Berkow, R. et al. (1992) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Internet Edition. Section 8, Cha

pter 91, Diabetes Mellitus, Hypoglycemia)。

【0010】

グリコサミノグリカン (GAG) 値の変化は、幾つかの自己免疫疾患と関連性がある。様々なGAGの低下及び上昇の双方が、自己免疫甲状腺疾患及び自己免疫糖尿病の患者に見られる。GAGに対する抗体が、全身性エリテマトーデス及び自己免疫性甲状腺疾患の患者で見出された (Hansen, C. et al. (1996) Clin. Exp. Rheum. 14 (Suppl. 15):S59-S67)。

【0011】

炭水化物代謝は癌と関連性があり、GAG及びプロテオグリカンの発現の低下は、ヒト肺癌と関連性がある (Nackaerts, K. et al. (1997) Int. J. Cancer 74:335-345)。炭水化物決定基であるシアリルルイスA及びシアリルルイスXは、ヒト癌細胞で頻繁に発現する。これらの決定基は、細胞接着分子E-セレクチンのリガンドであり、癌細胞の血管内皮への接着に関与し、癌の血行性転移に寄与する (Kannagi, R. (1997) Glycoconj. 3. 14:577-584)。細胞表面糖タンパク質のN結合炭水化物コア構造の変化は、大腸癌及び脾臓癌につながる (Schwarz, R.E. et al. (1996) Cancer Lett. 107:285-291)。細胞表面糖脂質及び糖タンパク質におけるSda血液型炭水化物構造 (Sda blood group carbohydrate structure) の発現の低下が、胃腸の癌で観察された (Dohi, T. et al. (1996) Int. J. Cancer 67:626-631)。

【0012】

新規の各炭水化物修飾酵素及びそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、炭水化物代謝異常及び自己免疫異常/炎症異常、癌の診断及び治療、予防に有用な新規の組成物を提供することで当分野のニーズに答えることができる。

【0013】

(発明の要約)

本発明は、総称して「CME」、個別にはそれぞれ「CME-1」及び「CME-2」、「CME-3」、「CME-4」、「CME-5」と呼ぶ炭水化物修飾酵素である精製されたポリペプチドを提供する。本発明の一実施態様では、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択された

アミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片を含む単離されたポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1-5のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0014】

更に本発明は、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片をポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:6-10からなる一群から選択される。

【0015】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を提供する。

【0016】

また、本発明は、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片を含むポリペプチド

ドの製造方法を提供する。この方法は、a) このポリペプチドの発現に好適な条件下で、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【0017】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片を含むポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0018】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列、b) SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、c) 前記a) に相補的なポリヌクレオチド配列、またはd) 前記b) に相補的なポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0019】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列、b) SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択されたポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、c) 前記a) に相補的なポリヌクレオチド配列、またはd) 前記b) に相補的なポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有するサンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。この方法は、a) 前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも16個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルをハイブリダイズさせるステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドとでハイブリダイゼーション複合体が形成される

条件の下、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする、該ステップと、b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在の有無を検出し、存在する場合には随意選択でその量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも30個の連続するヌクレオチドを含む。更なる別法では、前記プローブは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0020】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片を含むポリペプチド有効量と好適な医薬用賦形剤とを含む医薬品組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの医薬品組成物を投与することを含む、機能的CMEの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0021】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、b) 前記サンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、前記方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む医薬品組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この医薬品組成物の患者への投与を含む、機能的CMEの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0022】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1-5からなる一群から選択されたアミノ酸配

列、b) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、またはd) SEQ ID NO:1 - 5からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、b) 前記サンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、前記方法によって同定されたアンタゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む医薬品組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この医薬品組成物の患者への投与を含む、機能的CMEの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0023】

更に本発明は、SEQ ID NO:6 - 10からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変えるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0024】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質及び核酸配列、方法について説明する前に、本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更できることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いられたものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理解されたい。

【0025】

本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その(この等)」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」は複数の宿主細胞を含み、その「抗体」は複数の抗体

は含まれ、当業者には周知の等価物なども含まれる。

【0026】

本明細書で用いた全ての科学技術用語は、別の方法で定義されていない限り、本発明の属する技術分野の一般的な技術者が普通に解釈する意味と同じである。本明細書で記述したものと類似、或いは同等の全ての装置及び材料、方法は本発明の実施及びテストに使用できるが、好適な装置及び材料、方法をここに記す。本明細書に記載の全ての文献は、本発明に関連して使用する可能性のある文献に記載された細胞系、プロトコル、試薬、ベクターを記述し開示するために引用した。従来の特許を引用したからと言って、本発明の新規性が損なわれると解釈されるものではない。

【0027】

(定義)

用語「CME」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物)から得られる実質的に精製されたCMEのアミノ酸配列を指す。

【0028】

用語「アゴニスト」は、CMEの生物学的活性を強化したり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、CMEに直接相互作用するか、或いはCMEが関与する生物学的経路の成分と作用して、CMEの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0029】

用語「アレル変異配列」は、CMEをコードする遺伝子の別の形を指す。アレル変異配列は、核酸配列における少なくとも1つの変異によって生じ、変異mRNA若しくは変異ポリペプチドになり、これらの構造や機能は変わる場合もあれば変わらない場合もある。ある遺伝子は、自然発生型のアレル変異配列が存在しないもの、1つ或いは多数存在するものがある。一般にアレル変異配列を生じる変異は、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、或いは置換による。これらの各変異は、単独或いは他の変異と同時に起こり、所定の配列内で一回或いはそれ以上生じる。

【0030】

CMEをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、CMEと同じポリペプチド或いはCMEの機能特性の少なくとも一つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、CMEをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置でのアレル変異配列との不適合或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにCMEをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じCMEと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にCMEの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち極性非荷電側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びチロシンが含まれ得る。

【0031】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が自然発生のタンパク質分子である場合、「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を、記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0032】

用語「増幅」は、核酸配列の複製物を作製することに関連する。一般に増幅は、この技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術によって行われる。

【0033】

用語「アンタゴニスト」は、CMEの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、CMEに直接相互作用するか、或いはCMEが関与する生物

学的経路の成分と作用して、CMEの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0034】

用語「抗体」は、抗原決定基と結合可能なFab及びF(ab')₂、及びそれらの断片、Fv断片などの無傷の分子を指す。CMEポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて産生可能である。動物（例えば、マウス、ラット、若しくはウサギ）を免疫化するのに使用されるポリペプチド或いはオリゴペプチドは、RNAの翻訳から、或いは化学的に合成可能であり、必要に応じて担体タンパク質と結合させることも可能である。ペプチドと化学的に結合した一般に用いられる担体は、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、及びキーホールリンペットヘモニアン（KLH）を含む。次ぎに、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

【0035】

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質或いはタンパク質の断片が、宿主動物を免疫化するのに用いられるとき、このタンパク質の種々の領域は、抗原決定基（タンパク質上の特定の領域或いは三次元構造体）に特異的に結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、抗体と結合するために無傷の抗原（即ち、免疫応答を引き出すために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0036】

本明細書において「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス成分には、DNAと、RNAと、ペプチド核酸（PNA）と、ホスホロチオネートやメチルホスホネート、ベンジルホスホネート（benzylphosphonate）などの変更された背骨連結（backbone linkage）を有するオリゴヌクレオチドと、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などの変更された糖を有するオリゴヌクレオチドと、5-メチルシトシンまたは2'-deoxyuracil、7-deaza-2'-deoxyguanosineなどの変更された塩基を有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アンチセンス分子は、化学合成や転写を含む任意の方法で作製することができる。相補的アンチセンス分子は、一度細胞に導入

されると、細胞によって作られた自然発生の核酸配列と塩基対となって二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「負」または「マイナス」という表現はアンチセンス鎖であり、「正」または「プラス」という表現はセンス鎖である。

【0037】

用語「生物学的に活性」は、自然発生分子の構造的、調節的、或いは生化学的な機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」は、天然或いは組換え体のCME、合成のCMEまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

【0038】

用語「相補的」及び「相補性」は、ポリヌクレオチド同士が自然に結合して塩基対を形成することを指す。例えば、配列「5' A - G - T 3'」が相補的な配列「3' T - C - A 5'」と結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸のみが結合する部分的な場合、或いは一本鎖間に完全な相補性が存在して完全な相補性となる場合もあり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に大きな影響を与える。このことは、核酸鎖間の結合に左右される増幅反応、並びにペプチド核酸(PNA)分子の設計若しくは使用において特に重要である。

【0039】

「所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物」または「所定のアミノ酸配列を含む組成物」は広い意味で、所定のヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この組成物は、乾燥した製剤或いは水溶液を含み得る。CME若しくはCMEの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。ハイブリダイゼーションにおいて、プローブは、塩(例えば、NaCl)及び界面活性剤(例えば、SDS:ドデシル硫酸ナトリウム)、その他の物質(例えば、デンハート液、乾燥ミルク、サケ精子DNAなど)を含む水溶液に展開され得る。

【0040】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにシーケンシングされ

た核酸配列であって、XL-PCR™ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) を用いて 5' 及び / または 3' の方向に伸長されてシークエンシングされた核酸配列、或いは GELVIEW 断片構築システム (GCG, Madison, WI) などのフラグメントの構築のためのコンピュータプログラムを用いて 1 つ或いはそれ以上のインサイト社クローン、及び場合によっては、1 つ以上のパブリックのドメイン EST の重複によって構築された核酸配列を指す。伸長及び重複の両方によって構築されるコンセンサス配列もある。

【0041】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えない置換を指す。即ち、置換によってそのタンパク質の構造や機能が大きくは変わらず、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存される。以下に、あるタンパク質の元のアミノ酸が別のアミノ酸に置換される保存的なアミノ酸置換を示す。

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val

Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

一般に、保存されたアミノ酸置換の場合は、a) 置換された領域のポリペプチドの骨格構造、例えば、シートやヘリックス高次構造、b) 置換された部位の分子の電荷または疎水性、及び/または、c) 側鎖の大半が維持される。

【0042】

用語「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列の変化、或いは1個以上のヌクレオチドが欠如する核酸配列の変化を指す。

【0043】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。ポリヌクレオチド配列の化学修飾には、例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基、或いはアミノ基による水素の置換がある。誘導体ポリヌクレオチドは、自然分子（未修飾の分子）の生物学的或いは免疫学的機能の少なくとも1つを維持するポリペプチドをコードする。誘導体ポリペプチドとは、もとのポリペプチドの生物学的機能、或いは免疫学的機能の少なくとも1つを維持する、グリコシル化、ポリエチレングリコール化、或いは任意の同様のプロセスによって修飾されたポリペプチドのことである。

【0044】

用語「断片」は、CMEまたはCMEをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。「断片」の最大の長さは、親配列から1つのヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さである。例えば、ある断片は、5～1000個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基を含む。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子、またはその他の目的に用いる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さである。断片は、優先的に分子の特定の領域から選択される場合もある。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示された最初の250若しくは500のアミノ酸（或いは

、ポリペプチドの最初の25%または50%)から選択された連続するアミノ酸の所定の長さを含み得る。これらの長さは一例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の任意の長さが、本発明の実施例に含まれ得る。

【0045】

SEQ ID NO:6 - 10のある断片は、例えば、同じゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:6 - 10を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO:6 - 10のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:6 - 10を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:6 - 10の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0046】

SEQ ID NO:1 - 5のある断片は、SEQ ID NO:6 - 10のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1 - 5のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1 - 5を同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1 - 5のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1 - 5を認識する抗体の作製用の免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:1 - 5の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0047】

用語「類似性」は相補性の程度を表す。これには、部分的類似性と完全な類似性とがある。用語「同一性」を「類似性」とも言える。同一の配列と標的の核酸とのハイブリダイゼーションが少なくとも部分的に阻止される部分的に相補的な配列は、「実質的に類似」と呼ばれる。完全に相補的な配列と標的の配列とのハイブリダイゼーションの阻止は、緩いストリンジェントな条件の下、ハイブリダイゼーションアッセイ(サザンブロットニング或いはノーザンブロットニング法、溶液ハイブリダイゼーション等)を用いて検査される。実質的に類似の配列或いはハイブリダイゼーションプローブは、緩いストリンジェントな条件の下、完全に類似(同一)の配列と標的の配列との結合に対して競合して抑制する。これは、緩いストリンジェントな条件の下では非特異的な結合が許容されるというこ

とではなく、緩いストリンジェントな条件では、2つの配列の互いへの結合が特異的（即ち、選択的）に相互作用しなければならぬ。部分的な相補性ともいえない（例えば、30%未満の類似性或いは同一性）第2の標的配列を用いて、非特異的結合が存在しないことの検査が可能である。非特異的結合が存在しない場合は、実質的に類似配列或いはプローブが第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

【0048】

ポリヌクレオチド配列についての用語「パーセントの同一性」又は「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の一致する残基の百分率のことである。このようなアルゴリズムは、標準化され再現できる方法で、2つの配列間のアラインメントを最適化するべく、配列にギャップを挿入して、より意味をもつ2つの配列間の比較を行うことができる。

【0049】

ポリヌクレオチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、分子生物学分析プログラム一式（DNASTAR, Madison WI）である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D.G. 及び P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対のアライメントの場合、デフォルトパラメーターは、Kt uple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。同一性のパーセントは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列の対の「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0050】

別法では、一般に用いられ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式が、NCBI、Bethesda、MD、及びインターネット（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）などから入手できるNational Center for Biotechnology Information (NCB

1) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)によって得られる。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>にアクセスして、対話形式で利用できる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (以下に記載)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメーターと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)でblastnを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定の配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、例えば、ある大きな所定の配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも、20または30、40、50、70、100、200のヌクレオチドの断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

【0051】

高い同一性を示さない核酸配列でも、遺伝子コードの縮重によって類似のアミノ酸配列をコードし得る。縮重を利用して核酸配列を変え、それぞれが実質的に同じタンパク質をコードする様々な核酸配列を作製できることを理解されたい。

【0052】

ポリペプチド配列に用いられる用語「パーセントの同一性」又は「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は周知である。アラインメント方法の中には、保存的なアミノ酸置換を考慮したものもある。詳細に上述したこのような保存的な置換は、一般に、置換部位の電荷や疎水性が保存され、ポリペプチドの構造（従って機能も）が保存される。

【0053】

ポリペプチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN バージョン3.12e配列アラインメントプログラム（上記）に組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。CLUSTAL Vを用いる対方式のポリペプチド配列のアライメントの場合、デフォルトパラメーターは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の同一性のパーセントは、「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0054】

別法では、NCBI BLASTソフトウェア一式が用いられる。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)でblastpを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定のポリペプチド配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、例えば、ある大きな所定のポリペプチド配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも15、20または30、40、50、70、150の残基の断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

【0055】

「ヒト人工染色体（HAC）」は、約6 kb（キロベース）～10 MbのサイズのDNA配列を含み得り、安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の小染色体である。

【0056】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつよりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列が変えられた抗体分子を指す。

【0057】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件の下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高い同一性を有することを意味する。アニーリングが許容される条件の下で、特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成され、洗浄過程の後もハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスの厳密性即ちストリンジェント（stringency）の決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合、即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合が減少する。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によって日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの間は一定であるが、洗浄過

程は、目的のストリンジェントにするためにその最中に条件の変更が可能であり、ハイブリダイゼーション特異性が得られる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68℃で、約6×SSC、約1% (w/v) のSDS、並びに約100 μg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0058】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェントは、洗浄過程を行う際の温度によっても左右される。この洗浄温度は通常、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の熱融点(T_m)より約5~20℃低く選択される。この T_m は、(所定のイオン強度とpHの下) 標的の配列の50%が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーションの条件は、周知であり、Sambrook, J. 他による, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; 特に2巻の9章に記載されている。

【0059】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェントなハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約1%のSDSの存在の下、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65℃、60℃、55℃、42℃の温度で行う。SSCの濃度は、約0.1%のSDSが存在の下、約0.1~2×SSCの範囲である。通常は、遮断剤を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断剤には、例えば、約100~200 μg/mlの変性したサケ精子DNAが含まれる。約35~50%v/vの濃度のホルムアミドなどの有機溶剤が、例えば、RNAとDNAのハイブリダイゼーションなどの特定の場合に用いることができる。これらの洗浄条件の有用な改変は、当業者には周知である。特に高いストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド間の進化における類似性を示唆し得る。このような類似性は、それらのヌクレオチド及びコードされたポリペプチドが類似の役割を果たしていることを強く示唆する。

【0060】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合によって、形成された2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体

は溶液中（例えば、 C_0t または R_0t 分析）で形成されるか、或いは溶液中の1つの核酸配列と固体の支持物（例えば、紙、膜、フィルター、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板）に固定されたもう一つの核酸配列とで形成され得る。

【0061】

用語「挿入」或いは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ追加されるアミノ酸配列或いは核酸配列の変化を指す。

【0062】

「免疫応答」は、炎症性疾患及び外傷、免疫異常、感染症、遺伝病などに関連する症状を指す。これらの症状は、細胞系及び全身防衛系に影響を及ぼすサイトカイン及びケモカイン、別の情報伝達分子などの様々な因子の発現という特徴をもつ。

【0063】

用語「マイクロアレイ」は、基板上に配列されたそれぞれ異なったポリヌクレオチドの配列を指す。

【0064】

マイクロアレイの文脈に用いられる用語「要素」或いは「アレイ要素」は、基板の表面に配列されたハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを指す。

【0065】

用語「変調」は、CMEの活性の変化を指す。例えば、変調によって、CMEのタンパク質活性、或いは結合特性、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

【0066】

用語「核酸」及び「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、或いはそれらの断片を指す。また、一本鎖若しくは二本鎖であって、センス鎖或いはアンチセンス鎖であるゲノム起源若しくは合成起源のDNA或いはRNA、ペプチド核酸（PNA）、任意のDNA様物質、及びRNA様物質を指す。

【0067】

「機能的に結合した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。一般に、機能的に結合したDNA配列は、同じ読み枠内で2つのタンパク質をコードする領域が結合する必要がある場合は、非常に近接或いは連続する。

【0068】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチド骨格に結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子又は抗遺伝子剤を指す。この末端のリシンにより、この組成物が溶解性となる。PNAは、相補的な一本鎖DNAやRNAに優先的に結合して転写物の伸長を止め、ポリエチレングリコール化して細胞における寿命を延ばし得る。

【0069】

「プローブ」とは、同一配列或いはアレル核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、CMEやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸配列のことである。プローブは、検出可能な標識またはレポーター分子が結合され単離されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドである。典型的な標識には、放射性アイソトープ及びリガンド、化学発光試薬、酵素がある。「プライマー」とは、相補的な塩基対を形成して標的のポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーがポリヌクレオチドにアニーリングした後、あるDNAポリメラーゼ酵素によって、標的のDNA一本鎖に沿って伸長される。プライマーの組は、例えば、PCR法における核酸配列の増幅(及び同定)に用いることができる。

【0070】

本発明に用いられるプローブ及びプライマーは、既知の配列の少なくとも15の連続するヌクレオチドを含む。特異性を高めるために、より長いプローブ及びプライマーが用いることも可能である。例えば、開示した核酸配列の連続する少なくとも20または25、30、40、50、60、70、80、90、100、150のヌクレオチドを含む。プローブ及びプライマーは、上記した例より相

当長いものも用いることができ、本明細書の表及び図面、配列表に示された任意の長さのヌクレオチドも用いることができることを理解されたい。

【0071】

プローブ及びプライマーの準備及び使用方法については、例えば、Sambrook, J.他による、1989年、名称「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版の1-3巻(Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)、またはAusubel, F.M.他による、1987年、名称「Current Protocols in Molecular Biology」(Greene Pubi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY)、並びに Innis他による、1990年、名称「PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications」(Academic Press, San Diego CA.)を参照されたい。PCR用のプライマーの組は、例えば、Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)などのそのような目的のためのコンピュータプログラムを用いて、ある既知の配列から引き出すことができる。

【0072】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のプライマー選択用のコンピュータプログラムで選択される。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェアは、それぞれが最大100ヌクレオチドまでのPCR用のプライマーの対の選択、及び32,000塩基までの入力ポリヌクレオチド配列から最大5,000ヌクレオチドまでの大きなポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドの分析に有用である。類似のプライマー選択用プログラムには、能力を拡大する追加の機能が含まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TXより入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択できるため、ゲノムワイドスコープ(genome-wide scope)におけるプライマーの設計に有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MAより入手可能)によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコー

ドは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーのニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム(UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK より入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域或いは最も保存されていない領域のどちらかとハイブリダイズするプライマーを選択することができる。従って、このプログラムは、固有及び保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記した任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法やシーケンシングプライマー、マイクロアレイ要素、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

【0073】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人工の組み合わせは、化学合成によって作られる場合も多いが、前出のSambrook に記載されたような遺伝子工学の技術を用いて核酸の離れたセグメントを人工的に操作する方がより一般的である。この「組換え核酸」には、単に核酸の一部の追加または置換、欠失によって変更された核酸も含む。組換え核酸は、あるプロモーター配列に機能的に結合した核酸配列を含む場合もある。このような組換え核酸は、例えば、ある細胞を形質転換するのに用いられるベクターの一部であり得る。

【0074】

別法では、このような組換え核酸は、この組換え核酸を発現する哺乳動物のワクチン接種に用いると、その哺乳動物の防衛的な免疫応答を誘発する、ワクチンウイルスに基づいたウイルスベクターの一部であり得る。

【0075】

本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0076】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。CMEをコードする核酸若しくはその断片、CME自体を含むと推定されるサンプルには、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在する又は基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織又は組織プリント等も含まれ得る。

【0077】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、結合する分子によって認識される、例えば、抗原決定基つまりエピトープなどのタンパク質の特定の構造の存在によって左右される。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」及び抗体を含む反応液に、エピトープAを含むポリペプチド或いは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

【0078】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%以上除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

【0079】

「置換」とは、一つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドをそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0080】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。この基板には、壁または塹壕、ピン、チャンネル、細孔などの様々な表面形態があり、そこにポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0081】

「形質転換」とは、外来DNAが入り込み受容体細胞を変化させるプロセスのことである。形質転換は、当分野で周知の種々の方法により、自然或いは人工の条件の下で起こり得り、原核宿主細胞若しくは真核宿主細胞の中に外来核酸配列を挿入する任意の周知の方法によって行うことができる。この形質転換の方法は、形質転換される宿主細胞のタイプによって選択される。この方法には、ウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、リポフェクション、及び微粒子照射が含まれるが、これらに限定されるものではない。「形質転換された」細胞には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一時的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

【0082】

本明細書における「遺伝子組換え生物」とは、当分野で周知の遺伝子組換え技術などを用いて、人間が生物の1つ以上の細胞に異種の核酸を導入した任意の生物であり、動物及び植物を含むが、それらに限定されるものではない。微量注入や組換えウイルスに感染させるなどの慎重な遺伝子操作によって、細胞の前駆体に直接或いは間接的に異種核酸を細胞に導入する。「遺伝子操作」とは、典型的な交雑育種や*in vitro*での受精ではなく、組換えDNA分子を導入することである。本発明に従った遺伝子組換え生物には、細菌及びラン藻類、菌類、植物、動物が含まれる。本発明の単離されたDNAは、当分野で周知の、例えば、感染、形質移入、形質転換、トランス接合（transconjugation）などの方法によって、宿主に導入することができる。本発明のDNAをそのような生物に導入する技術は周知であり、前出のSambrook他（1989）に記載されている。

【0083】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメーター設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastnによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定の核酸配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。このような核酸の対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、

95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。ある変異配列は、例えば、「アレル」変異配列(上述)または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、「多型」変異配列と表すことができる。スプライス変異配列は基準分子と同一性が極めて高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの択一的スプライシングによってポリヌクレオチドの数が多くなったり、少なくなったりする。対応するポリペプチドは、基準分子に存在する追加の機能ドメインを有したり、基準分子に存在するドメインが欠落したりし得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。得られるポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多型変異配列は、所定の種と種における特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1ヌクレオチド多型」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団(population)、病態、病態の特徴を表し得る。

【0084】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトパラメーター設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastpによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも40%と決定されたポリペプチド配列のことである。このようなポリペプチドの対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。

【0085】

(発明)

本発明は、新規のヒト炭水化物修飾酵素(CME)及びCMEをコードするポリヌクレオチドの発見に基づいた、炭水化物代謝異常及び自己免疫異常/炎症異常、癌の診断、治療、及び予防におけるそれらの組成物の使用に関する。

【0086】

表1は、CMEをコードする完全長のヌクレオチド配列の構築に用いたインサイト社クローンを示す。列1及び列2はそれぞれ、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号(SEQ ID NO)を示す。列3は、各CMEをコードする核酸が同

定されたIncyteクローンのクローンIDを示し、列4は、それらのクローンが単離されたcDNAライブラリを示す。列5は、Incyteクローン及びそれらに対応するcDNAライブラリを示す。cDNAライブラリが示されていないインサイト社クローンは、プールされたcDNAライブラリに由来する。列5のインサイト社クローンは、各CMEのコンセンサスヌクレオチド配列の構築に用いられ、ハイブリダイゼーション技術における断片として有用である。

【0087】

表2の各列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特性を示す。列1は配列番号 (SEQ ID NO)、列2は各ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の数、列3は潜在的なリン酸化部位、列4は潜在的なグリコシル化部位、列5はシグネチャ (signature) 配列及びモチーフを有するアミノ酸残基、列6は、BLAST分析によって同定された相同配列を示す。列7は、分析方法、場合によってはその分析方法が適用できる検索可能なデータベースを示す。列7の分析方法は、配列相同性及びタンパク質モチーフによって各ポリペプチドを特長つけるために用いられた。

【0088】

表3の列は、CMEをコードするヌクレオチド配列に関連した組織特異性及び疾患、異常症、症状を示している。表3の列1は、ヌクレオチドの配列番号 (SEQ ID NO) を示している。列2は、列1のヌクレオチド配列の断片を示している。これらの断片は、例えば、SEQ ID NO:6-10を同定し、SEQ ID NO:6-10と関連するポリヌクレオチド配列とを区別する、ハイブリダイゼーション若しくは増幅の技術において有用である。これらの断片によってコードされるポリペプチドは、例えば、免疫原性ペプチドとして有用である。列3は、CMEを発現する組織名、及びCMEを発現する全組織におけるその割合を示す。列4は、CMEを発現する組織に関連する疾患若しくは異常症、症状、並びにCMEを発現する全組織におけるそれらの割合を示す。列5は、各cDNAライブラリのサブクローニングに用いたベクターを示す。

【0089】

表4の各列は、CMEをコードするcDNAのクローンが単離されたcDNAライブラリの作製に用いられた組織についての説明である。列1は、ヌクレオチドのSEQ ID

N0を示し、列2はそれらのクローンが単離されたcDNAライブラリを示し、列3は列2のcDNAライブラリに関連する組織の由来及び詳細を示す。

【0090】

本発明はまた、CMEの変異体も含む。好適なCMEの変異体は、CMEの機能的或いは構造的特徴の少なくともどちらか一方を有し、かつCMEアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0091】

本発明はまた、CMEをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、CMEをコードするSEQ ID NO:6-10からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO:6-10のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなるRNA配列等価物を含む。

【0092】

本発明はまた、CMEをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、CMEをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO:6-10からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO:6-10からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列の変異配列を提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、CMEの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードする。

【0093】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るCMEをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したが

って本発明には、可能なコドン選択に基づいた組み合わせの選択によって作り出され得る可能なポリヌクレオチド配列の変異の全てが含まれ得る。これらの組み合わせは、自然発生のCMEのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全ての変異が明確に開示されていると考慮する。

【0094】

CMEをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件の下で、自然発生のCMEのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非自然発生のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを有するCME或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作ることは有利となり得る。特定のコドンが宿主によって利用される頻度に基づいてコドンを選択して、ペプチドの発現が特定の真核細胞又は原核宿主に発生する割合を高めることが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、CME及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、自然発生の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

【0095】

本発明はまた、CME及びその誘導体をコードするDNA配列又はそれらの断片を完全に合成化学によって作り出すことも含む。作製後にこの合成配列を、当分野で良く知られた試薬を用いて、種々の入手可能な発現ベクター及び細胞系の何れの中にも挿入可能である。更に、合成化学を用いて、CMEまたはその任意の断片をコードする配列の中に突然変異を導入することも可能である。

【0096】

更に本発明には、種々のストリンジェント条件の下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:6-10及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; and Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

【0097】

当分野で周知のDNAのシーケンシング方法を用いて、本発明の何れの実施例も実行可能である。この方法には、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech Piscataway NJ)、或いはELONGASE増幅システム(Life Technologies, Gaithersburg MD)にみられるような校正エキソヌクレアーゼとポリメラーゼとの組み合わせなどの酵素が用いられる。好ましくは、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200 Thermal Cycler200 (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800 (Perkin-Elmer) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373或いは377 DNAシーケンシングシステム(Perkin-Elmer)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Molecular Dynamics, Sunnyvale CA)または当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。得られた配列を当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて分析する(例えば、Ausubel, F.M. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853.を参照)。

【0098】

当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、CMEをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節要素などの上流にある配列を検出する。例えば制限部位PCR法を利用する1つの方法では、一般的なプライマー及びネスト化プライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する(例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic 2:318-322*を参照)。逆PCR法を用いる別法では、広範な方向に伸長して環状化した鋳型から未知の配列を増幅するプライマーを用いる。この鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限断片に由来する(例えば、Triglia, T.等 (1988) *Nucleic Acids Res 16:8186*を参照)。キャプチャPCR法を用いる第3の方法は、ヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む(例えば、Lagerstrom, M.他 (1991) *PCR Methods Applic 1:111-119*を参照)。この方法では、多数の制限酵素による消化及びライゲ

- ションを用いて、PCRを行う前に未知の配列の領域の中に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、当分野で周知の別の方法を用いて未知の配列を得ることも可能である。(例えば、Parker, J.D. 他 (1991)Nucleic Acids Res. 19:3055-3060を参照)。更に、PCR、ネスト化プライマー、PROMOTERFINDERライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いれば、ゲノムDNA内の歩行が可能である。この方法ではライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を探すのに有用である。全てのPCR法をベースにした方法では、プライマーは、市販のOLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムなどを用いて、長さが22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上、約68~72の温度で鋳型に対してアニーリングするよう設計される。

【0099】

完全長のcDNAをスクリーニングする場合は、大きなcDNAを含むようにサイズが選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、オリゴd(T)ライブラリが完全な長さのcDNAを産生できない場合は、遺伝子の5'領域を有する配列を含むものが多いランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリが有用である。ゲノムライブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0100】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のヌクレオチド配列のサイズの分析、または確認が可能である。詳しくは、キャピラリーシーケンシングには、電気泳動による分離のための流動性ポリマー、及び4つの異なったヌクレオチドに特異的なレーザーで活性化される蛍光色素、放出された波長の検出に利用するCCDカメラを使用することが可能である。出力/光強度は、適切なソフトウェア(例えば、GENOTYPER及びSEQUENCE NAVIGATOR、Perkin-Elmer)を用いて電気信号に変換され、サンプルのローディングからコンピュータ分析までのプロセス及び電子データ表示がコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しない場合もあるDNAの小片のシーケンシングに特に適している。

【0101】

本発明の別の実施例では、CMEをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を組換えDNA分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にCME、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列が作られ得り、これらの配列をCMEのクローン化及び発現に利用可能である。

【0102】

種々の目的でCMEをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。ランダムな断片によるDNAの混合や遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドのPCR再組み立てを用いて、ヌクレオチド配列の組換えが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド媒介性定方向突然変異誘発を利用して、新しい制限部位を生成する突然変異の導入、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライスバリエーションの作製等が可能である。

【0103】

本発明のヌクレオチドを、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; 米国特許第5,837,458号; Chang, C.-C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他 (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャフリング技術を用いてシャフリングして、CMEの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのCMEの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャフリングは、PCR法による遺伝子断片の組換えで遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。次に、このライブラリを、目的の特性を有する遺伝子変異体を同定するために選択或いはスクリーニングする。これらの好ましい変異体をプールし、DNAシャフリング及び選択/スクリーニングを繰り返す。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムな位置に変異がある1つの遺伝子の断片を、目的の特性が最適化するまで、組換え及びスクリーニング、シャフリングを実施することもでき

る。別法では、所定の遺伝子の断片を、同じ或いは異なった種の同じ遺伝子ファミリーの相同な遺伝子の断片で組換え、それによってプロトコルに従った調節可能な方法で、多数の自然発生遺伝子の遺伝子多様性を最大にすることができる。

【0104】

別の実施例によれば、CMEをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である(例えば、Caruthers, M.H.等(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:215-223; 及びHorn, T.他(1980) Nucl. Acid s Res. Symp. Ser.225-232を参照)。別法として、化学的方法を用いてCME自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、ペプチド合成は種々の固相技術を用いて実行可能である(例えば、Roberge, J.Y.等(1995) Science 269:202-204を参照)。また、合成の自動化は例えばABI 431Aペプチドシンセサイザ(Perkin Elmer)を用いて達成し得る。更にCMEのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、変異体ポリペプチドを作ることが可能である。

【0105】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィー(例えば、Chiez, R.M. 及び F.Z. Regnier (1990)Methods Enzymol. 182:392-421を参照)を用いて実質的に精製可能である。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸分析或いはシークエンシングにより確認することができる(例えば、Creighton, T. (1983) Protei ns, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York, NYを参照)

。

【0106】

生物学的に活性なCMEを発現させるために、CMEをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含む。これらの要素には、ベクター及びCMEをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このような要素は、その長さ及び特異性が様々

である。特定の開始シグナルによって、CMEをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドン及びコザック配列などの近傍の配列が含まれる。CMEをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれなければならない。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、自然及び合成の様々なものから得ることが可能である。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。(例えば、Scharf, D. 他 (1994) Results Probl. Cell Differ. 201 - 18-162.を参照)。

【0107】

当業者に周知の方法を用いて、CMEをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節要素を含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及び Ausubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章及び13章1 - 4章を参照)。

【0108】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、CMEをコードする配列の保持及び発現が可能である。これらには、限定するものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌や、ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR 3 2 2 プラスミド)で形質転換された植物細胞系や、動物細胞系などが含まれる。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0109】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、CMEをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて選択可能である。例えば、CMEをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT 1 プラスミド(GIBCO BRL)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にCMEをコードする配列をライゲーションするとlacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクターを用いて、クローニングされた配列の *in vitro*での転写、ジデオキシンスクリーニング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失を作り出すことが可能である。(例えば、Van Heeke, G.及びS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のCMEが必要な場合は、CMEの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力に発現を誘発するT5またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターを使用できる。

【0110】

CMEの発現に酵母の発現系の使用が可能である。因子やアルコールオキシダーゼやPGHプロモーターなどの構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多種のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、上記のAusubel.; 及びBitter, G.A. 他 (1987) Methods Enzymol.153:51-794; Scorer, C. A. 他 (1994) Bio/Technology 121 - 181-184.を参照)

植物系もCMEの発現に使用可能である。CMEをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV (Takamatsu, N.等 (1987) EMBO J 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて促進される。これらの作製物は、直接のDNA形質転換或いは病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞の中に導入可能である。

(例えば、The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill NY, pp.191-196を参照)。

【0111】

哺乳動物細胞では、多種のウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物/翻訳複合体にCMEをコードする配列を結合し得る。ウイルスのゲノムの非必須のE1またはE3領域への挿入により、感染した宿主細胞にCMEを発現する生ウイルスを得ることが可能である(Logan, J. 及びShenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659を参照)。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させることが可能である。タンパク質を高レベルで発現させるために、SV40またはEBVを基にしたベクターを用いることが可能である。

【0112】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドで発現しそれに含まれているものより大きなDNAの断片を供給可能である。治療のために約6 kb ~ 10 MbのHACsを作製し、従来の輸送方法(リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル)で供給する。(例えば、Harrington, J.J. 他(1997) Nat Genet.15:345-355.を参照)。

【0113】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞におけるCMEの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、CMEをコードする配列を株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。ベクターの導入の後、細胞を選択培地に移す前に、強化培地で約1 ~ 2日の間増殖させる。選択マーカーの目的は選択的な媒介物に対する抵抗性を与えるとともに、その存在により導入された配列をうまく発現する細胞の増殖及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に好適な組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0114】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収することが可能である。選択系には、以下のものに限定はしないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれtk^r又はapr^r細胞において使用される。(例えば、Wigler, M. 他 (1977) Cell 11:223-232; 及びLowy, I. 他(1980) Cell 22:817-823を参照)。また代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を選択のベースとして用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、als或いはpatはクロルスルフロン (cCMEsulfuron)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (phosphinotricin acetyltransferase) に対する耐性を与える(例えば、Wigler, M. 他. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. 他(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14を参照)。さらに選択に利用できる遺伝子、例えば、代謝のために細胞が必要なものを変えるtrpB及びhisDが文献に記載されている(例えば、Hartman, S.C.及びR.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51を参照)。アミノシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質GUS、ルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリンなどの可視マーカーが用いられる。緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Clontech, Palo Alto, CA)も使用できる。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(例えば、Rhodes, C.A.他 (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131を参照)。

【0115】

マーカー遺伝子の発現の存在 / 不在によって目的の遺伝子の存在が示されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、CMEをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、CMEをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定可能である。または、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がCMEをコードする配列と一列に配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子

の発現は、通常タンデム遺伝子の発現も示す。

【0116】

一般に、CMEをコードする核酸配列を含み、CMEを発現する宿主細胞は、当業者
に周知の種々の方法を用いて特定することが可能である。これらの方法には、DN
A - DNA或いはDNA - RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク
質の検出及び/または数量化のための膜系、溶液ベース、或いはチップベースの
技術を含むタンパク質生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、こ
れらに限定されるものではない。

【0117】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるCM
Eの発現の検出及び計測のための免疫学的な方法は、当分野で周知である。この
ような技法には、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ (ELISA)、ラジオ
イムノアッセイ (RIA)、蛍光標示式細胞分取器 (FACS) などがある。CME上の2
つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノク
ローナルベースイムノアッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が
好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及び
その他のアッセイは、当分野では十分に知られている。(例えば、Hampton, R.
他.(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual. APS Press, St Paul,
MN, Sect. IV; Coligan, J. E. 他 Current Protocols in Immunology, Greene P
ub. Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及びPound, J.D. (19
90) Immunochemical Protocols, Humans Press, Totowa NJ)。

【0118】

種々の標識技術及び結合技術が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイお
よびアミノ酸アッセイに用いられ得る。CMEをコードするポリヌクレオチドに関
連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或い
はPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション
、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別
法として、CMEをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブを生成
するためのベクターにクローニングすることも可能である。当分野では周知であ

り市販されているこのようなベクターを、T7, T3, またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドの追加によって、*in vitro*でのRNAプロンプの合成に用いることができる。これらの方法は、例えば、Amersham Pharmacia Biotech及びPromega (Madison WI)、U.S. Biochemical Corp (Cleveland OH) が市販する種々のキットを用いて行うことができる。容易な検出のために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、コファクター、インヒビター、磁気粒子、及び放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤などが含まれる。

【0119】

CMEをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件の下で培養される。形質転換された細胞から産生されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用されるその配列及び/またはそのベクターによる。CMEをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過するCMEの分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

【0120】

更に、挿入した配列の発現調節能力または発現したタンパク質を所望の形にプロセッシングする能力によって宿主細胞株が選択される。このようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化 (lipidation)、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない。タンパク質の「prepro」または「pro」形を切断する翻訳後のプロセッシングを利用して、標的タンパク質、折りたたみ及び/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための特定の細胞装置及び特徴のある機構をもつ種類の宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38) がAmerican Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, MD) より入手可能であり、外来のタンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするために選択される。

【0121】

本発明の別の実施例では、CMEをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列

に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラCMEタンパク質が、CMEの活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分が、市販の親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。このような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシン(Trx)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、6-His、FLAG、c-mc、赤血球凝集素(HA)が含まれるが、これらに限定されるものではない。GST及びMBP、Trx、CBP、6-Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物(phenylarsine oxide)、カルモジュリン、金属キレート樹脂のそれぞれで同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c-mc、及び赤血球凝集素(HA)によって、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた融合タンパク質の免疫親和性の精製ができる。また、CMEをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、CMEが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現と精製の方法は、Ausubel. (1995、前出 ch 10).に記載されている。市販されている様々なキットを用いて、融合タンパク質の発現及び精製を促進できる。

【0122】

本発明の別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系(Promega)を用いてin vitroで放射能標識したCMEの合成が可能である。これらの系は、T7またはT3、SP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質をコードする配列の転写と翻訳をつなげる。翻訳は、例えば、³⁵Sメチオニンである放射能標識されたアミノ酸前駆体の存在の下で起こる。

【0123】

CMEの断片は、組換え生成物だけでなく固相技術を用いて直接的なペプチド合成によって作製され得る(例えば、前出のCreighton, pp. 55-60.を参照)。タンパク質の合成は、手動或いは自動で行われ得る。自動合成は、例えばABI 431Aペプチドシンセサイザ(Perkin Elmer)を用いて行うことが可能である。CMEの種々の断片は別々に合成して、次ぎに結合させて完全長分子を作製する。

【0124】

(治療)

CMEのある領域と炭水化物修飾酵素のある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、CMEの発現は、心血管、発達、胃腸、造血/免疫、生殖、及び泌尿器組織に密接に関連する。従って、CMEは、炭水化物代謝異常及び自己免疫異常/炎症異常、癌においてある役割を果たすと考えられる。CMEの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、CMEの発現または活性を低下させることが望ましい。また、CMEの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、CMEの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0125】

従って、一実施例において、CMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にCMEまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には炭水化物代謝異常が含まれ、その中には糖尿病及びインスリン依存性糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、低血糖症、グルカゴノーマ、ガラクトース血症、遺伝性果糖不耐症、フルクトースジホスファターゼ欠損症、肥満症、先天性II型異常造血性貧血、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、ガラクトースエピメラーゼ欠損症、糖原病、リソソーム蓄積症、フルクトース尿症、ペントース尿症、先天性ピルビン酸代謝異常症が含まれ、また自己免疫異常/炎症異常が含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身

性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環と、ウイルス感染症及び細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれ、また癌が含まれ、その中には腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌などがあり、詳しくは副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、及び子宮の癌が含まれる。

【0126】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むCMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、CMEまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

【0127】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むCMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたCMEを含む医薬品組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

【0128】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むCMEの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、CMEの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0129】

更なる実施例では、CMEの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にCMEのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した炭水化物代謝異常及び自己免疫異常/炎症異常、癌が含まれる。一実施態様では、CMEと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはCMEを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング或いは運搬機構として間接的に用いられ得る。

【0130】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むCMEの発現

または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、CMEをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【0131】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補的な配列、ベクターを別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。当業者は、従来の医薬原理にしたがって併用療法で用いる好適な治療薬を選択可能である。治療薬との組み合わせにより、上に列記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法を用いて少ない量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能であり、広範囲な副作用の可能性を低減し得る。

【0132】

CMEのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたCMEを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてCMEと特異的に結合するものを同定が可能である。CMEの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Fabフラグメント、及びFab発現ライブラリによって作られたフラグメントが含まれる。但し、これらに限定されるものではない。治療用には、中和抗体（即ち、二量体の形成を阻害するもの）が特に好ましい。

【0133】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、CMEまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。このようなアジュバントにはフロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバント、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、及びジニトロフェノールなどの界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG (bacilli Calmette-Guerin) 及びCorynebacterium parvum

が特に好ましい。

【0134】

CMEに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド或いはペプチド、またはそれらの断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましく、小さな自然発生の分子の全アミノ酸配列も含む。CMEアミノ酸の短いストレッチは、KLHなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0135】

CMEに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されるものではない(例えば、Kohler, G. 等. (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, D. 等. (1985) *J. Immunol. Methods* 81-8-42; Cote, R.J. 等. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; Cole, S.P. 等. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120を参照)。

【0136】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えば、Morrison, S.L.他. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81-4851-4855; Neuberger, M.S.他. (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda, S.等. (1985) *Nature* 314:452,454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、CME特異性一本鎖抗体を生成する。関連する特異性を備えるが別のイデオタイプの組成の抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから鎖混合によって生成することもできる(例えば、Burton D.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11120-3を参照)。

【0137】

抗体は、リンパ球集団の中の *in vivo* 産生を誘発することによって、または免疫グロブリンライブラリのスクリーニング又は文献に示されているような、高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、産生することもできる（例えば、Orlandi, R. 他. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837; Winter, G. 他. (1991) Nature 349:293-299を参照）。

【0138】

CMEに対する特異的な結合部位を含む抗体も産生することができる。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(ab')に断片と、F(ab')に断片のジスルフィド架橋を減じることによって生成されるFab断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。別法では、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性とモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な同定が可能となる（例えば、Huse, W.D. 等. (1989) Science 254:1275-1281を参照）。

【0139】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定する。隔離された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、CMEとその特異性抗体との間の複合体調整の計測が含まれる。二つの非干渉性CMEエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0140】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、CMEに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下でCME抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除して得られる値である。多数のCMEエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体医薬の K_a は、CMEに対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のCMEエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体医薬の K_a は、親

和性の真の測定値を表す。Ka値が $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ の高親和性抗体医薬は、CME抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。Ka値が $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$ の低親和性抗体医薬は、CMEが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製 (immunopurification) 及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0141】

ある下流での適用におけるこのような医薬品の品質及び適性を調べるために、ポリクローナル抗体医薬の抗体価及び結合活性を更に評価する。例えば、少なくとも $1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ の特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10 \text{ mg/ml}$ の特異的な抗体を含むポリクローナル抗体医薬は一般に、CME抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。様々な適用例における抗体の特異性及び抗体価、結合活性、抗体の品質や使用法の指針は一般に入手可能である。(例えば、Catty, 前出, 及びColigan 他、前出を参照)。

【0142】

本発明の別の実施例では、CMEをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片または相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施形態では、CMEをコードするポリヌクレオチドの相補配列がmRNAの転写を阻止するのに好適である場合、これを使用することができる。特に細胞は、CMEをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列で形質転換することもできる。したがって、相補的分子または断片は、CMEの活性の調節、または遺伝子機能の調節のために使用することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、CMEをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である。

【0143】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペス又はワクシニア、又は様々な細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的の器官、組

織又は細胞集団に運ぶこともできる。当業者に周知の方法を用いてCMEをコードポリヌクレオチドと相補的な核酸配列を発現するベクターを作製することができる(例えば、前出のSambrook 他、及び前出のAusubel 他によるものを参照)。

【0144】

CMEをコードする遺伝子は、CMEをコードするポリヌクレオチド又はその断片を高いレベルで発現する発現ベクターで、細胞又は組織を形質転換することによって止めることができる。このような作製物を用いて翻訳できないセンス又はアンチセンス配列を細胞の中に導入することができる。DNAの中に組み入れられない場合でも、このようなベクターは内在性のヌクレアーゼによって機能が損なわれるまでmRNA分子を転写し続ける。非複製ベクターでも一過性の発現を一ヶ月以上に亘って続け、好適な複製要素がベクター系の一部である場合はさらに長く持続し得る。

【0145】

上記した通り、遺伝子の発現は、CMEをコードする遺伝子の制御5'または調節領域に対する相補的な配列またはアンチセンス分子(DNA或いはRNA、PNA)を設計することによって調節することができる。例えば開始部位から約-10から約+10までの転写開始部位に由来するオリゴヌクレオチドを用いることが可能である。同様に、「三重らせん」と塩基対合法を用いて阻止することができる。三重らせん構造は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がるのを阻止するため有用である。三重式DNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている(例えば、Gee, J.E. 等. (1994) In: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NYを参照)。相補的な配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するように設計できる。

【0146】

酵素性RNA分子であるリボザイムは、RNAの特異的切断を触媒するために用いることができる。リボザイム作用の機構には、相補的な標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションが含まれ、ヌクレオチド鎖切断が続く。

例えば、CMEをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。

【0147】

任意の潜在的RNA標的内の特異的なリボザイム切断部位が、後続の配列GUA、GUU、及びGUCを含むリボザイム切断部位に対して、標的分子をスキャンニングすることによって初めに同定される。一度同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15個から20個のリボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドの機能を不全にする二次的な構造の特徴について評価することが可能である。候補標的の適合性も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの容易性をテストすることによって評価することが可能である。

【0148】

本発明の相補的なリボ核酸分子及びリボザイムは、当分野で周知の方法を用いて、核酸分子の合成のために作製することができる。これらの方法には、固相ホスホラミダイト化合物などのオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法が含まれる。別法では、RNA分子がin vitro及びin vivoでCMEをコードするDNA配列の転写によって生成され得る、このようなDNA配列はT7またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモータを用いて、種々のベクターの中に組み入れることが可能である。別法では、相補的なRNAを構成的または誘導的に合成するこれらのcDNA作製物は、細胞株、細胞、または組織の中に導入することができる。

【0149】

RNA分子を修飾することによって、細胞内の安定性を高め、半減期を長くすることができる。可能な修飾には、分子の5'及び/または3'端部でのフランキング配列の追加、または分子のバックボーン内でのホスホジエステラーゼ結合よりむしろホスホチオネート又は2' Oメチルの使用が含まれる、がこれらに限定されるものではない。PNAの生成に固有のこの概念は、内在性のエンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンのアセチル -、メチル -、チオ -、及び同様の修飾形態だけでなく、イノシン、キューエオシン (queosine)、及びワイプトシン (wybutosine) など

の従来のものでない塩基を含めることによって、これらの分子の全体に拡大することができる。

【0150】

ベクターを細胞又は組織に導入する多数の方法が利用でき、*in vivo*、*in vitro*、及び*ex vivo*での使用に等しく適している。*ex vivo*での治療の場合、患者から採取された肝細胞の中にベクターを導入して、自家移植で同じ患者に戻すためにクローニング増殖される。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる運搬は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる（例えば、Goldman, C.K. 他. (1997) Nature Biotechnology 15:462-66:を参照）。

【0151】

上記したいかなる治療方法も、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ及びサルなどの哺乳動物を含む、治療が必要な全ての被験者に適用できる。

【0152】

本発明の別の実施例は、上記した全ての治療効果のために、医学上認められる担体と共に医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような医薬品組成物は、CME、CMEの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、又はCMEのインヒビターなどからなる。この組成物は、単体で、或いは安定剤などの1種類以上の別の薬剤と共に、無菌の生体適合性医薬品担体に投与することができる。このような医薬品担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、及び水などが含まれるがこれらに限定されるものではない。この組成物は、単独或いは薬物又はホルモンなどの別の薬剤と共に投与することができる。

【0153】

本発明に用いられる医薬品組成物は、様々な経路を用いて投与するが可能である。この経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下、または直腸が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0154】

活性処方成分に加えて、これらの医薬品組成物には、活性化合物を医薬的に使

用可能な薬剤にするのを容易にする、医薬品添加物及び補助剤を含む好適な薬学的に認められる担体が含まれ得る。製剤及び投与についての詳しい技術については、最新版のRemington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, PA)に記載されている。

【0155】

経口投与用の医薬品組成物が、経口投与に好適な投与量において当分野で周知の薬学的に許容される担体を用いて、製剤することができる。このような担体により、医薬品組成物が患者が摂取するために、錠剤、丸薬、糖衣剤、カプセル、液体、ゲル状、シロップ剤、泥状物、懸濁液として製剤される。

【0156】

経口用に用いられる医薬品は、活性化合物と固体の薬品添加物とを混合し、得られた顆粒の混合物を処理して、(所望に応じてすりつぶした後)タブレット或いは糖衣錠コア(dragee cores)にする。好適な医薬品添加物とは、ラクトース、スクロース、マンニトール、又はソルビトールを含む糖類、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ、又はその他の植物からのでんぷん、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、又はカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース、アラビアゴム及びトラガカントゴムを含むゴム、ゼラチン及びコラーゲンなどのタンパク質などの炭水化物又はタンパク質賦形剤である。必要に応じて、例えば、架橋結合したポリビニルピロリドン、かんてん、アルギン酸、またはその塩であるアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤または可溶化剤が加えられる。

【0157】

糖衣錠コアは、濃縮糖溶剤などの好適なコーティングと共に用いられる。このような濃縮糖溶剤には、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポルゲル(carbopol gel)、ポリエチレングリコール、及び/または二酸化チタン、ラッカー溶剤、及び好適な有機溶媒または混合溶剤などが含まれ得る。染料または色素が、製品の識別又は活性化合物の量、即ち薬用量を示すため、錠剤または糖衣錠に加えられる。

【0158】

経口用に用いられる医薬品製剤には、ゼラチンから作られたプッシュ-フィット型のカプセル、グリセロールまたはソルビトールなどのコーティングとゼラチンからなる封入されたカプセルが含まれる。プッシュ-フィット型のカプセルには、ラクトース又はスターチなどの賦形剤や結合材、タルク又はステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、所望に応じて安定剤と混合された活性処方成分が含まれる。ソフトカプセルでは、活性化合物が、安定剤と共に或いは安定剤なしで、脂肪油、溶液、またはポリエチレングリコール溶液などの好適な溶液に溶解或いは懸濁され得る。

【0159】

非経口投与用に好適な医薬品剤が、水溶液で製剤されるが、ハンス液、リンガー液、生理緩衝食塩水などの生理学的に適合性のある緩衝剤が好ましい。水性懸濁注射液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランなどの懸濁液の粘性を高める物質を含み得る。更に、活性化合物の懸濁液は、好適な油性注入懸濁液として製剤され得る。好適な親水性溶液または媒体には、ごま油などの脂肪油、オレイン酸エチル、トリグリセリド又はリボソームなどの合成脂肪酸が含まれる。非脂質ポリカチオンアミノポリマーが、運搬目的で使用される。随意選択により、懸濁液は高濃度の溶液が可能となるよう化合物の溶解性を高める好適な安定剤または薬剤を含み得る。

【0160】

局部または鼻腔投与のために、特定の障壁に浸透する好適な浸透剤が製剤に用いられる。このような浸透剤は当業者には周知である。

【0161】

本発明の医薬品組成物は、当分野で周知の方法、例えば従来混合、溶解、顆粒化、糖衣化、溶離(levigating)、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥処理を用いて製造され得る。

【0162】

医薬品組成物は塩類として製剤され、限定されないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等の多くの酸と共に形成可能である。塩分は対応する遊離塩基系よりも、水溶剤または他のプロトン溶剤に溶けやすい。別の薬

剤の形態には、1 mM~50 mMヒスチジン、0.1%~2%スクロース、及び2%~7%マンニトールの幾つか或いは全てを含み、pHの範囲が4.5~5.5であり、使用前に緩衝剤と結合する凍結乾燥粉末を用いることができる。

【0163】

医薬品組成物が調合された後、それらは適当な箱に詰められ、指定した症状の薬としてラベルが貼られる。CMEの投与のため、このようなラベルには、量、頻度、及び投与の方法が含まれるであろう。

【0164】

本発明に用いる好適な医薬品組成物には、目的を達成するため、効果的な量の活性処方成分を含む組成物が含まれる。当業者は、自身の能力で十分に効果的な服用量を決めることができる。

【0165】

どのような組成物であっても、治療に効果的な薬用量は、初めは、例えば腫瘍細胞の腫瘍細胞アッセイで、或いは動物モデルのどちらかで推定することができる。通常、動物モデルには、マウス、ウサギ、イヌ、又はブタなどが用いられる。動物モデルはまた、好適な濃縮範囲及び投与の経路を決めるのに用いることができる。このような治療をもとに、ヒトへの有益な薬用量及び投与経路を決定することができる。

【0166】

医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえばCME又はその断片、CMEの抗体、CMEのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。薬用有効度及び毒性は、たとえば、ED₅₀（服用に対して集団の50%に医薬的效果がある）またはLD₅₀（服用に対して集団の50%に致命的である）統計を計算するなど、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって決定することができる。毒性効果と治療効果との薬用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀と示すことができる。高い治療指数を示す医薬品組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータが、ヒトへの適用のために、薬用量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる薬用量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含む血中

濃度の範囲であることが望ましい。薬用量は、用いられる投与形態及び患者の感受性、投与の経路によって、この範囲内で様々である。

【0167】

正確な薬用量は、治療が必要な患者に関する要素を考慮して、実務者によって決められるであろう。薬用量及び投与は、効果的なレベルの活性成分を与えるため或いは所望の効果を維持するために調節される。薬用量の要素として考慮されるものには、疾患の重症度、患者の一般的な健康状態、年齢、体重、及び患者の性別、投与の時間及び頻度、併用する薬剤、反応感受性、及び治療に対する応答が含まれる。作用器官が長い医薬品組成物は、三日か四日に一度、一週間に一度、二週間に一度、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって左右され、投与され得る。

【0168】

通常の薬用量は投与の経路によって異なるが、約0.1~100,000 µgまでの最大約1グラムまでである。特定の薬用量及び運搬の方法に関するガイダンスは文献に記載されており、一般に当分野の実務者はそれを利用することができる。当業者は、タンパク質またはインヒビターとは異なったヌクレオチドの製剤を利用するであろう。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの運搬は、特定の細胞、状態、位置などに対して特異的であろう。

【0169】

(診断)

別の実施例では、CMEに特異的に結合する抗体が、CMEの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはCMEやCMEのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイに用いられる。診断に有用な抗体は、治療のところで記載した方法と同じ方法で製剤される。CMEの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからCMEを検出する方法が含まれる。これらの抗体は、修飾をして或いはしないで使用され、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化され得る。当分野で周知の種々のレポーター分子が用いられるが、その内の幾つかは上記した。

【0170】

CMEを測定するためのELISA, RIA, 及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのCMEの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なCMEの発現の値は、複合体の形成に適した条件の下、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞とCMEに対する抗体とを結合させることによって決定する。標準的な複合体形成の量は、測光法 (photometric) などの種々の方法で定量され得る。被験者のCMEの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。基準値と被験者との間の偏差が、診断の指標となる。

【0171】

別の実施例によれば、CMEをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用いられるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的なRNA及びDNA分子、及びPNAが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るCMEを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、CMEの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のCME値の調節を監視する。

【0172】

ある実施形態では、CMEまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、CMEをコードする核酸配列を同定することが可能である。例えば5'調節領域である高度に特異的な領域か、例えば保存されたモチーフであるやや特異性の低い領域から作られているかのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントは、プローブがCMEをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いはアレルや関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

【0173】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、CMEをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:6-10の配列

、或いはCME遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0174】

CMEをコードするDNAに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、CME及びCME誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。このようなベクターは市販されており、当業者には周知であり、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられる。ハイブリダイゼーションプローブは、例えば³²P或いは³⁵Sなどの放射性核種、或いはアビジン/ビオチン (biotin) 結合系によってプローブに結合されたアルカリホスファターゼなどの酵素標識等の種々のレポーターの集団によって標識され得る。

【0175】

CMEをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、CMEの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には炭水化物代謝異常が含まれ、その中には糖尿病及びインスリン依存性糖尿病、インスリン非依存性糖尿病、低血糖症、グルカゴノーマ、ガラクトース血症、遺伝性果糖不耐症、フルクトースジホスファターゼ欠損症、肥満症、先天性II型異常造血性貧血、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、ガラクトースエピメラーゼ欠損症、糖原病、リソソーム蓄積症、フルクトース尿症、ペントース尿症、先天性ピルビン酸代謝異常症が含まれ、また自己免疫異常/炎症異常が含まれ、その中には後天性免疫不全症候群 (AIDS) 及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様

関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環と、ウイルス感染症及び細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれ、また癌が含まれ、その中には腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌などがあり、詳しくは副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、及び子宮の癌が含まれる。CMEをコードするポリヌクレオチド配列は、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック(dipstick)、ピン(pin)、ELISA式アッセイ、及び変異CMEの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。このような質的或いは量的方法は、当分野では周知である。

【0176】

ある実施態様では、CMEをコードするヌクレオチド配列は、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて有用であろう。CMEをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適な培養期間の後、サンプルを洗浄し、シグナルを定量して基準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと比べて著しく変わっている場合は、サンプル内のCMEをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイを用いて、動物実験、臨床試験、或いは個人の患者の治療を監視における、特定の治療効果を推定することが可能である。

【0177】

CMEの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、正常あるいは標準的な発現の概要が確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、CMEをコードする配列或いはその断片とを結合させること

により達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。基準値と被験者の値との偏差を用いて罹患しているかどうかを決定する。

【0178】

疾患の存在が確定され、治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返して、被験者における発現のレベルが正常な患者に示される値に近づき始めたかどうかを推定することが可能である。繰り返し行ったアッセイの結果を、数日から数ヶ月の期間の治療の効果を見るのに用いることができる。

【0179】

癌では、個体からの生体組織における異常な量の転写物が、疾患の発生の素因を示し、また実際に臨床的症状が出る前に疾患を検出する方法を提供することが可能である。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法或いは積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または進行を防ぐことが可能となる。

【0180】

CMEをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。このようなオリゴマーは、化学的な合成、酵素を用いた生成、或いは *in vitro* で生成され得る。オリゴマーは、好ましくはCMEをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはCMEをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件の下、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジエントな条件の下、近縁のDNA或いはRNA配列の検出及び/または定量のため用いることが可能である。

【0181】

CMEの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification)、及び標準的な

曲線に結果が加えられたものが含まれる（例えば、Melby, P.C.等(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44 ; Duplaa, C.等(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照）。多数のサンプルの定量速度は、目的のオリゴマーが種々の希釈液に含まれ、分光光度法或いは非色応答によって定量が迅速なハイスルーブット型のアッセイを用いることで加速された。

【0182】

別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはそれより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いる。マイクロアレイを用いて、同時に極めて多くの遺伝子の発現レベルを監視し、遺伝子の変異、突然変異及び多形性を識別する。この情報は、遺伝子機能の決定、疾患の遺伝的根拠の解釈、疾患の診断、及び治療薬剤の活性の監視及び開発に有用である。

【0183】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して使用し、分析する。（例えば、Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号;Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweiler 他(1995) PCT出願番号W095/251116; Shalon, D.他 (1995) PCT出願番号W095/35505; Heller, R.A. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; 及び Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号を参照)

本発明の別の実施例ではまた、CMEをコードする核酸配列を用いて、自然発生のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを生成することが可能である。この配列は、以下のものに対してマッピングされる。特定の染色体、染色体の特定領域または人工生成の染色体、例えば、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、細菌P1生成物或いは単一染色体cDNAライブラリである。（例えば、Harrington, 1.3. 他 (1997) Nat Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 5 - 87-134, 及びTrask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154を参照)

in situ蛍光ハイブリダイゼーション（FISH）は、他の物理的染色体マッピング技術及び遺伝マップデータと相関するであろう（例えば、Heinz-Ulrich, 他によ

る(1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968.を参照)。遺伝子マップデータの例は、種々の科学誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のワールドワイドウェブのサイトで見付けることができる。物理的な染色体マップ上のCMEをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関係するDNAの領域を決定するのに役立つ。本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者と、保有者、及び感染した者との遺伝子配列における違いを検出することもある。

【0184】

染色体標本のin situハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子マップを拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上での遺伝子の配置により、たとえ特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていなくても、関連するマーカーが明らかになることが多い。新規の配列を、物理的なマッピングによって、染色体アームに割り付けることもできる。このことは、位置クローニング或いは別の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患の研究をしている研究者にとって、価値ある情報である。疾患或いは症候群の位置が、例えば血管拡張性失調症の11q22-23などの特定の遺伝子領域に遺伝子結合によって大まかに決定されると、その領域に対するどの配列マッピングも、さらなる調査のための関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表す(例えば、Gatti, R.A.他による(1988) Nature 336:577-580を参照)。また、目的の本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、即ち感染者の間の、転位置、反転などによる染色体位置の違いを検出することもある。

【0185】

本発明の別の実施例では、CME、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。このようなスクリーニングに用いる断片は、溶液に遊離、固体支持物に固定、細胞の表面上に保持、或いは細胞内に存在する。CMEと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【0186】

薬剤スクリーニングに用いる別の方法は、目的のタンパク質に対して、好適な結合親和性を有する化合物のスクリーニング処理能力を高めるために用いられる（例えば、Geysen,他による(1984) PCT出願番号 WO84/03564を参照）。この方法では、相当な数の異なる小さな試験用化合物が、プラスチックピン或いは他の基板の上に合成される。試験用化合物は、CME、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、結合されたCMEが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたCMEはまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いて、ペプチドを捕らえ、固体支持物に固定することもできる。

【0187】

別の実施例では、CMEと結合可能な中和抗体がCMEと結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体が、CMEと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【0188】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にCMEをコードするヌクレオチド配列を用いて、限定はされないが、現在知られているトリプレット暗号及び特異的な塩基対相互作用などのヌクレオチド配列の特性に依存する新しい技術を提供することができる。

【0189】

当分野の技術者であれば、更なる説明がなくても前述の説明だけで最大限に本発明を利用できるであろう。したがって、以下に記載する特定の好適な実施例は、例示目的であって本発明を限定するものではない。

【0190】

前述した及び以下に記載した全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願通し番号60/130,383に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0191】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

RNAは、Clontech社から購入、或いは表4に列記した組織から単離した。まず、この組織の一部をホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解する一方、この組織の別の一部をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIZOL (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの単相溶液などの好適な変性剤の混合液に溶解した。この溶解物を塩化セシウムにおいて遠心分離またはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムのどちらかとエタノール、或いは別の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

【0192】

RNAの純度を高めるためにRNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNA分解酵素でRNAを処理する。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子(Promega)またはOLIGOTEXラテックス粒子(QIAGEN, Valencia CA)、OLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いてポリ(A+) RNAを単離した。別法では、POLY(A)PURE mRNA精製キット(Ambion, Austin TX)などの別のRNA単離キットを用いて組織溶解物から直接単離した。

【0193】

ある場合には、Stratagene社にRNAを提供し、Stratagene社が対応するcDNAライブラリを作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERScript プラスミドシステム(Life Technologies)を用いて当分野で周知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, ユニット5.1-6.6を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに結合させてから、好適な1つの制限酵素或いは複数の制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S 1000または SEPHAROSE CL2B、SEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、アガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。PBLUEScriptプラスミド(Stratagene)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)、pcDNA2.1プラスミド(Invitrogen Carlsbad CA)、pINCYプラスミド(Incyt

e Pharmaceuticals, Palo Alto CA)などの好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位にcDNAを結合させた。この組換えプラスミドを、Stratagene社のXL1-Blue, XL1-BlueMRF、SOLR、またはLife Technologies社のDH5 またはDH10B、ELECTROMAX DH 10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に導入し組み込んだ。

【0194】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム(Stratagene)或いは細胞溶解を利用して、in vivo切除によって宿主細胞からプラスミドを回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、及びAGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、REAL Prep 96プラスミドキットの内の少なくとも1つを用いてプラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4℃で保管した。

【0195】

別法では、ハイスループットの直接結合PCR法によって宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した。(Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程を単一反応混合液で行った。サンプルを処理してから384-ウェルプレートに移して保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナー(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光定量的に測定した。

【0196】

3 シークエンシング及び分析

cDNAのシークエンシング反応は、標準的な方法で、或いはABI CATALYST 800 (Perkin-Elmer) thermal cyclerまたはPTC-200 thermal cycler (MJ Research)とHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムとの組み合わせなどのハイスループット装置で行った。cDNAのシークエンシング反応の準備には、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)などのABIシークエンシングキットに含まれる試薬を用いた

。cDNAのシーケンシング反応の電気泳動的な分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Molecular Dynamics)、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シーケンシングシステム(Perkin-Elmer)、当分野で周知のその他の配列解析システムを用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例の5に記載した方法で配列を伸長した。

【0197】

cDNAのシーケンシングから得たポリヌクレオチド配列の構築及び解析は、当分野の技術者に周知のアルゴリズムを利用したソフトウェアを組合せて行った。表5は、利用したツール、ソフトウェア、アルゴリズム、それらの説明、引用文献、閾値パラメーターの概要を示す。表5の列1は用いたツール及びプログラム、アルゴリズム、列2はそれらの簡単な説明、列3は引用することで本明細書の一部とした引用文献、列4の記載部分は2つの配列の一致度の評価に用いたスコア及び確率値、他のパラメータを示す(確率値が高ければ高いほど配列間の相同性が高くなる)。配列の解析には、MACDNASIS PROソフトウェア(Hitachi Software Engineering, S. San Francisco CA)及びLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いた。

【0198】

ポリヌクレオチド配列の確証は、BLAST及び動的計画法、ジヌクレオチド最近接分析に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター及びリンカー、ポリA配列を取り除き、あいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムを用いて、公共のデータベースであるGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースやBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAMなどのデータベースから選択した配列に対してこれらの配列を問合わせて注釈を得た。Phred及びPhrap、Consedに基づいたプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列の中にこれらの配列を構築して、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムでオープンリーディングフレームのためにスクリーニングした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳

して対応する完全長のアミノ酸配列を引き出し、GenBankデータベース(上記)及びSwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPrositeなどのデータベース、またはPFAMなどの隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたタンパク質ファミリーデータベースに対して問い合わせこれら完全長の配列を分析した。HMMは、確率を利用して遺伝子ファミリーのコンセンサス一次構造を解析する(例えば、Edy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365を参照)。

【0199】

完全長のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:6-10からのポリヌクレオチド配列の断片の同定にも使用できる。約20~4000個までのヌクレオチドの断片はハイブリダイゼーション及び増幅に有用であり、上記の発明で説明した。

【0200】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されている膜への標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを伴う(例えば、Sambrook, 前出, 7章; 及び Ausubel, F.M. 他, 前出, 4章及び16章を参照)。

【0201】

BLASTに用いる類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals) のようなヌクレオチドデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この分析は多くの膜系ハイブリダイゼーションより非常に速度が速い。さらにコンピュータ検索の感度を変更して、任意の特定の一致が、厳密な一致或いは相同的一致の何れかとして分類されるかを確定することができる。検索の基準は、

$$(\% \text{配列同一性} \times \% \text{最大BLASTスコア}) / 100$$

として定義される積スコアである。積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列一致の長さの両方を考慮する。例えば、積スコア40の場合、その一致は1~2%誤差の範囲内で正確であり、70ではその一致は正確であろう。類似分子は通常、15~40の範囲の積スコアを示す分子を選択することにより同定されるが

、それより低いスコアでも関連した分子が同定される場合もある。

【0202】

ノーザン分析の結果は、CMEをコードする転写物が発生したライブラリの分布割合として報告される。分析には、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリの分類も含まれる。器官/組織のカテゴリーには、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血/免疫、筋骨格、神経、生殖、泌尿器が含まれる。疾患のカテゴリーには、癌、炎症、外傷、細胞増殖、神経、貯留(pool ed)が含まれる。カテゴリー別に、目的の配列を発現するライブラリの数を数えて、それを全ての範囲のライブラリの数で除した。各組織に特異的に発現する割合(パーセント)と各疾患で発現する割合を表3に示した。

【0203】

5 CMEをコードするポリヌクレオチドの伸長

SEQ ID NO:6 - 10の完全長の核酸配列は、完全長分子の好適な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてその完全長分子の好適な断片を伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences) 或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68~72の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを伸長した。

【0204】

選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要な場合、若しくは望ましい場合は、追加或いはネスト化プライマーの組を設計する。

【0205】

当分野で既知の方法を利用したPCR法で高い忠実度で増幅した。PCRはPTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.)用いて96ウェルブロックプレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と

- メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素(Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメーターで増幅を行った。

ステップ1	94	で3分間
ステップ2	94	で15秒
ステップ3	60	で1分間
ステップ4	68	で2分間
ステップ5	ステップ2、3、及び4を20回繰り返す	
ステップ6	68	で5分間
ステップ7	4	で保管

別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメーターで増幅を行った。

ステップ1	94	で3分間
ステップ2	94	で15秒
ステップ3	57	で1分間
ステップ4	68	で2分間
ステップ5	ステップ2、3、及び4を20回繰り返す	
ステップ6	68	で5分間
ステップ7	4	で保管。

【0206】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5µlの希釈していないPCR産物に溶解した100µlのPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート(Coming Costar, Acton MA)の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンして、サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量化する。反応混合物の5~10µlのアリコットを1%のアガロースミニゲル上での電気泳動によって解析し、何れの反応物が配列を伸長することに成功したかを決定する。

【0207】

伸長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJIコレラウィルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)で消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結する前に音波処理またはせん断を行った。ショットガンシーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上に分離して断片を切断し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。T4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて伸長したクローンをpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の延び出しを処理してコンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37℃で一晩培養した。

【0208】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。

- ステップ1 94℃で3分間
- ステップ2 94℃で15秒
- ステップ3 60℃で1分間
- ステップ4 72℃で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す
- ステップ6 72℃で5分間
- ステップ7 4℃で保管。

上記したようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量化した。DNA回収率の悪いサンプルは、上記した条件で再び増幅した。サンプルを20%のジメチルサルホサイド(dimethylsulphoxide)(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC DIRECTキット(Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)を用いてシーケンシングした。

。

【0209】

同様に上述の手順で、SEQ ID NO:6 - 10のヌクレオチド配列を利用し、この伸長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適な遺伝子ライブラリを用いて5調節配列を得た。

【0210】

6 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

SEQ ID NO:6 - 10から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記すが、より大きなcDNAフラグメントの場合でも基本的に同じ手順を用いる。オリゴヌクレオチドを、OLIGO4.06ソフトウェア (National Bioscience) のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、50pmolの各オリゴマーと、250 μ Ciの[³²P]アデノシン三リン酸 (Amersham, Chicago, IL) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを組み合わせて用いることにより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、SEPHADEX G-25超精細排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。毎分10⁷カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、次のエンドヌクレアーゼ、Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、XbaI或いはPvu II (DuPont NEN) の1つを用いて切断したヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において用いる。

【0211】

各切断物からのDNAを、0.7%アガロースゲル上で分画して、ナイロン製メンブラン (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に転写する。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くため、例えば、最大0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件の下、プロットを順次室温にて洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー或いは別のイメージ化手段で視覚化して比較する。

【0212】

7 マイクロアレイ

化学結合方法及びインクジェット装置を用いて、基板の表面上でアレイ要素を

合成することが可能である（例えば、上記Baldeschweilerを参照）。ドットプロット法またはスロットプロット法に類似したアレイを利用し、要素を熱、UV、機械的または化学的結合方法を用いて基板の表面に配置し結合させる。典型的なアレイは、手作業または利用可能な方法や機械を用いて作製することができ、任意の適正な数の要素を含み得る。ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイズしていないプローブを取り除き、スキャナーを用いて蛍光のレベル及びパターンを決定する。スキャンした画像を分析して、マイクロアレイ上で要素にハイブリダイズする各プローブの相補性の程度及び相対的な量 / 発現レベルを調べることが可能である。

【0213】

完全長のcDNA、発現遺伝子配列断片（EST）、或いはそれらの断片が、マイクロアレイの要素となり得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片を、LASERGEN Eソフトウェア（DNASTAR）などの当分野で周知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。本発明の核酸配列の1つに対応する完全長のcDNA、EST、或いはそれらの断片、或いは本発明に関連するcDNAライブラリから任意に選択されたcDNAを、ガラススライドなどの好適な基板に整列する。cDNAは、例えばUV交差結合（UV cross-linking）を利用してスライドに固定してから、熱処理及び化学処理を施し、最後に乾燥させる（例えば、Schena, M. 他. (1995) Science 270:467-470; 及び Shalon, D. 他. (1996) Genome Res. 6:639-645を参照）。蛍光プローブを準備して、基板上の要素にハイブリダイゼーションするために用いる。上記した方法でこの基板を分析する。

【0214】

8 相補的ポリヌクレオチド

CMEをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、自然発生のCMEの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15～約30個の塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、より小さな或いはより大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア（National Biosciences）及びCMEのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独

特な5 配列から相補的なオリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがCMEをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0215】

9 CMEの発現

CMEの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でCMEが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節要素に関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとCMEを発現する。真核細胞でのCMEの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多面性ウイルス(AcMNPV)を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、CMEをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモータによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda (Sf9)昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(例えば、Engelhard, E. K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.を参照)。

【0216】

殆どの発現系では、CMEが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの

精製が素早く1回で行うことができる。Schistosoma japonicumからの26キロダルトンの酵素GSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で固定されたグルタチオンで融合タンパク質の精製が可能となる(Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でCMEからタンパク質的に切断できる。アミノ酸8個のペプチドであるFLAGで、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)で精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したCMEを直接用いて以下のアッセイを行うことができる。

【0217】

1.0 CMEの活性の実証

CMEのガラクトシルトランスフェラーゼの活性は、放射性アッセイにおいて、ガラクトースのUDP-ガラクトースからGlcNAc終結オリゴ糖鎖への移行を測定して決定する(Hennet, T. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:58-65)。CMEのアリコットを、14 μ lのアッセイ保存溶液(180 mMカコジル酸ナトリウム、pH 6.5、1 mg/mlのウシ血清アルブミン、0.26 mM UDP-ガラクトース、2 μ lのUDP-[³H]ガラクトース)及び1 μ lのMnCl₂ (500mM)、2.5 μ lのGlcNAc 0-(CH₂)₈-CO₂Me (ジメチルスルホキシドにおいて37 mg/ml)で、37 °Cで60分間インキュベートする。1mlの水を加えて反応を消光してC 18 Sep-Pak カートリッジ (Waters)に移し、反応しなかったUDP-[³H]ガラクトースを除去するために5mlの水で2回洗浄する。水で洗浄中も[³H]ガラクトシル化GlcNAc 0-(CH₂)₈-CO₂Meはカラムに結合したままであり、それを5mlのメタノールで希釈する。希釈した溶液における放射能を液体シンチレーションカウンタで測定し、その測定量がCMEガラクトシルトランスフェラーゼの活性に比例する。

【0218】

CMEのマンノシダーゼ活性は、マンノースをMan₉(GlcNAc)₂オリゴ糖から遊離させる能力から測定する(Schweden, J. et al. (1986) Eur. J. Biochem. 157:563-570)。200 mM リン酸緩衝液、pH 6.5、1%のTriton X-100において、CMEを最

終容量30 μ lの[^{14}C](Man₉)(GlcNAc)₂と37 で60分間混合する($2\sim 3\times 10^3$ cpm)。30 μ lの氷酢酸を追加してこの反応を終了させる。2-プロパノール/酢酸/水(容量比:29/4/9)においてペーパークロマトグラフィーで分析した遊離 [^{14}C]マンノースの量が開始サンプルのCMEの活性に比例する。

【0219】

1.1 機能的アッセイ

CMEの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのCMEをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを、cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。このようなベクターには、pCMV SPORTTM (Life Technologies.)及びpCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを含んでいる。5~10 μ gの組換えベクターを、例えば内皮由来か造血由来のヒト細胞株にリポソーム製剤或いは電気穿孔法によって一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1~2 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とを区別できる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。このような標識タンパク質には、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、及びCD64またはCD64-GFP融合タンパク質が含まれる。レーザー光学に基づいた技術を利用した自動流動細胞計測法(FCM)を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。また、FCMで、先行した或いは同時の細胞死の現象を診断する蛍光分子の取り込みを検出して計量する。これらの現象には、プロピジウムヨウ化物でのDNAの染色によって計測される核DNA内容物の変化と、プロモデオキシウリジンの取り込み量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節と、特異的な抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内のタンパク質の発現の変化と、蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とが含まれる。流動細胞計測法は、Ormerod, M. G.による(1994) Flow Cytometry Oxford, New York, N.Y.に記載されている。

【0220】

遺伝子発現におけるCMEの影響は、CMEをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存された領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。CME及び目的の他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0221】

1.2 CMEに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE ; 例えば、Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 1816 - 3088-495を参照)または他の精製技術で実質的に精製されたCMEを用いて、標準的なプロトコルでウサギを免疫化して抗体を作り出す。

【0222】

別法では、CMEアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C末端付近の、或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で周知である(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

【0223】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのABI 431Aペプチドシンセサイザ(Perkin-Elmer)を用いてfmoc法のケミストリにより合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によりKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel, 1995を参照)。フロイントの完全アジュバントにおいてオリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得ら

れた抗血清の抗ペプチド活性及び抗CME活性を検査するには、ペプチドまたはCMEを基板に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0224】

1.3 特異的抗体を用いる自然発生CMEの精製

自然発生CME或いは組換えCMEを、CMEに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) のような活性化クロマトグラフィ用レジンと抗CME抗体とを共有結合させることにより形成する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従って、ブロックし洗浄する。

【0225】

CMEを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、CMEを優先的に吸着できる条件で(例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで)そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とCMEとの結合を切るような条件で(例えば、pH 2~3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピックイオンで)溶出させ、CMEを回収する。

【0226】

1.4 CMEと相互作用する分子の同定

CME又は生物学的に活性なその断片を、¹²⁵I ボルトンハンター試薬(例えば、Bolton A.E.及びW.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529を参照)で標識する。マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識したCMEと共にインキュベートし、洗浄して、標識したCME複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なCME濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したCMEの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0227】

別法では、CMEと相互作用する分子を、Fields, S.及びO. Song(1989, Nature 340:245-246)に記載の酵母2-ハイブリッドシステム(yeast two-hybrid system)やMATCHMAKERシステム(Clontech)などの2-ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて分析する。

【0228】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行うことができるであろう。特定の好適実施例に基づいて本発明を説明したが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学或いは関連する分野の専門家には明らかな、本明細書に記載の本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲に含まれる。

【0229】

(表の簡単な説明)

表1は、CMEをコードする完全長の配列を作り出すために用いた、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号(SEQ ID NO)、クローン識別番号、cDNAライブラリ、及びcDNA断片を示す。

【0230】

表2は、潜在モチーフ及び相同配列を含む各ポリペプチド配列の特徴、並びにCMEの解析に用いた方法、アルゴリズム、及び検索可能なデータベースを示す。

【0231】

表3は、各核酸配列の選択された断片と、ノーザン分析によって決定された各核酸配列の組織特異的発現パターンと、これらの組織に関連した疾患、異常症及び症状と、各DNAがクローニングされたベクターとを示す。

【0232】

表4は、CMEをコードするcDNAクローンを単離したcDNAライブラリの作製に用いた組織を示す。

【0233】

表5は、CMEの分析に用いたツール、プログラム、及びアルゴリズム、並びにその説明、引用文献、閾値パラメーターを示す。

【表1】

表 1

ポリベプチド SEQ ID NO:	ヌクレオチド SEQ ID NO:	クローンID	ライブラリ	断片
1	6	000422	U937NOT01	000422H1 (U937NOT01), 458113F1 (KERANOT01), 1271685F1 (TESTTUT02), 1725667T6 (PROSNOT14), 1752778H1 (LIVRTUT01), 2459639H1 (THYRNOT08), 2622986H1 (KERANOT02)
2	7	983984	TONGTUT01	715334R6 (PROSTUT01), 983984H1 (TONGTUT01), 983984R1 (TONGTUT01), 983984X301D1 (TONGTUT01), 3168253F6 (BRSTNOT18)
3	8	2210054	SINTFET03	077799R1 (SYNORAB01), 856950R1 (NGANNOT01), 1558537F1 (SPLANOT04), 1654114F6 (PROSTUT08), 2210054H1 (SINTFET03), 3387285H1 (LUNGSTUT17), 4559124H1 (KERATXT01)
4	9	2618358	GBLANOT01	1634052F6 (COLNNOT19), 1634052T6 (COLNNOT19), 2618358H1 (GBLANOT01), 2618358X300D1 (GBLANOT01), 2618358X303D1 (GBLANOT01), 2618358X313D1 (GBLANOT01), 2673370F6 (KIDNNOT19), 4072754H1 (KIDNNOT26)
5	10	2912330	KIDNTUT15	089378H1 (LIVRNOT01), 2531411H1 (GBLANOT02), 2912330H1 (KIDNTUT15), SZAF00178F1, SZAF00234F1, SZAF00054F1, SZAF00080F1

【表 2】

表2-1

SEQ ID NO:	アミノ酸残基数	潜在リン酸化部位	潜在グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列	識別	分析方法
1	434	S113 T92 T121 S317 S346 S376 S325 S336 S348 Y212 Y229	N214 N429	シグナルペプチド: M1-G67 β-ケトアシルシンターゼ活性部位: G385-V402	CMP-N- アセチルノイラミン酸 シンターゼ (g3413320)	HMM BLAST SPScan MOTIFS
2	302	S207 T36 S61 T183 T120 T165 T185 T200 T278 S298 Y148 Y263	N135	膜貫通ドメイン: L7-W27 シグナルペプチド: M1-S18 シアリルトランスフェラーゼファミリー: R74-S128, N203-P248	α2,6-シアリル トランスフェラーゼ (g1280387)	HMM BLAST SPScan BLOCKS-PFAM
3	578	S28 S49 T77 S114 S228 S259 T291 T388 S404 T412 S452 S133 T243 T412 T433 S507 T564	N90 N112 N289 N450	シグナルペプチド: M1-G21 グリコシルヒドロラーゼファミリー: M42-P62, S75-G89, N112-H130, P163-V182, G254-L271, V311-G327, P368-L392, S427-I447	マンノシル- オリゴ糖 α-1,2- マンノシンターゼ (g3875740)	HMM BLAST SPScan PRINTS

【表3】

表 2 - 2

SEQ ID NO.	アミノ酸残基数	潜在リン酸化部位	潜在グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列	識別	分析方法
4	461	T49 T118 T144 T154 S228 S230 T282 T388 S410 S444 S268 S275 T302 S331 T379 S422 Y339	N38	グリコシルヒドロラーゼファミリー (BLOCKS) : M1-W24, G46-G79, N85-L119, I361-D372, D339-G426, R439-Y448 グリコシルヒドロラーゼファミリー (PFAM) : G2-L461 グリコシルヒドロラーゼファミリー (PRINTS) : T292-I306, I361-P369, D378-F389, K400-W417, R424-A436	サイトソル βグルコシダーゼ (g177770)	BLAST BLOCKS PFAM PRINTS
5	529	T41 T82 T84 T118 S143 T206 T245 S298 T316 T421 S437 S2 T71 S132 S171 T522 Y236	N315 N520	膜貫通ドメイン : I494-F514 シグナルペプチド : M1-G21 UDP-glucuronosyl 及 UDP- グルコシルトランスフェラーゼ (MOTIFS) : W356-Q400 UDP-glucuronosyl 及 UDP- グルコシルトランスフェラーゼ (ProfileScan) : N378-T419 UDP-グルコシルトランスフェラーゼ (BLOCKS) : S34-L56, C127-P167, P190-N213, I255-G282, F295-P344, N350-P394, H449-H448 UDP-glucuronosyl 及 UDP- グルコシルトランスフェラーゼ (PFAM) : G24-K527	UDP-glucuronosyl トランスフェラーゼ (g3135025)	HMM BLAST SPScan MOTIFS ProfileScan BLOCKS PFAM

【表 4】

表3

ヌクレオチド SEQ ID NO	ヌクレオチドの 有用な断片範囲	発現組織 (割合)	疾患若しくは病状 (割合)	ベクター
6	187-227	胃腸 (0.214) 生殖 (0.205) 神経 (0.162)	癌及び細胞増殖 (0.598) 炎症 (0.225)	PBLUESCRIPT
7	145-195	生殖 (0.360) 心血管 (0.200) 胃腸 (0.120) 造血/免疫 (0.120)	癌及び細胞増殖 (0.485) 炎症 (0.273)	PSPORT1
8	487-527	造血/免疫 (0.200) 生殖 (0.185) 神経 (0.169)	癌及び細胞増殖 (0.500) 炎症 (0.308)	PINCY
9	596-636	胃腸 (0.643) 泌尿器 (0.286) 神経 (0.071)	癌及び細胞増殖 (0.500) 炎症 (0.429)	PINCY
10	1543-1583	胃腸 (0.529) 泌尿器 (0.235) 免疫 (0.118)	癌及び細胞増殖 (0.556) 炎症 (0.278)	PINCY

【表5】

ヌクレオチド SEQ ID NO:	ライブラリ	ライブラリの説明
6	U937NOT01	このライブラリは、U937 単球様細胞系から単離した RNA を用いて、Stratagene 社 (STR937207) で作製された。この細胞系 (ATCC CRL1593) は、びまん性組織球性リンパ腫の 37 歳の白人男性の胸水から得た悪性細胞から確立した。
7	TONGTUT01	このライブラリは、36 歳の白人男性の舌半切除術の際に採取した舌腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、再発性の浸潤性グレード 2 の扁平上皮癌を示していた。
8	SINTFET03	このライブラリは、妊娠 20 週目で死亡した白人の女胎児の小腸組織から単離した RNA を用いて作製した。
9	GBLANOT01	このライブラリは、53 歳白人女性の胆嚢摘出の際に採取した病変胆嚢組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、軽度の慢性胆嚢炎及び約 150 個の混合石を伴った胆石症を示していた。家族歴には、良性高血圧症があった。
10	KIDNTUT15	このライブラリは、65 歳の白人男性の診査開腹及び腎尿管切除術の際に採取した左腎臓腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、左腎臓上葉内のグレード 1 の腎細胞癌を示していた。既往症には、腹皮悪性黒色腫、結腸の良性新生物、脳血管疾患、膈ヘルニアがあった。家族歴には、心筋梗塞及びアテローム硬化性冠動脈疾患、脳血管疾患、前立腺癌があった。

【表 6】

【表 7】

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder は、アミノ酸または核酸配列の比較及び注釈付け (annotation) に有用である。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool は、アミノ酸及び核酸配列の配列類似性検索に有用であり、blastp 及び blastn、blastx、tblastn、tblastx の 5 つのファンクションがある。	Aitschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Aitschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10 以下
FASTA	Pearson 及び Lipman アルゴリズムは、問合わせの配列と同種の配列群との類似性を検索する。FASTA は、fasta 及び ifasta、fastx、tfastx、ssearch の少なくとも 5 つのファンクションを含む。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.06E-6 構築された ESTs: fasta 同一性=95%以上、一致長さ=200 塩基以上、fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100 以上
BLIMPS	BLOCKS IMPROVED Searcher は、BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列に対して、ある配列の一致性を調べ、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィンガープリント領域を探索する。	Henikoff, S and J.G. Henikoff, Nucl. Acid Res., 19:6565-72, 1991. J.C.; Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	スコア=1000 以上 スコア/強度=0.75 以上 該当する場合は、確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM などのタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたデータベースに対して問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	スコア=10-50 ビット、各タンパク質ファミリーによって異なる。

【配列表】

表 5 - 2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター関連値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造及び配列のモチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	ノーマライズされた質のスコアに対する Prosite モチーフに対する GCG 指定 "HIGH" 値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び確率で自動配列決定機のトレースを調べる塩基読出しアルゴリズムである。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプレメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phrap Revised Assembly プログラムであって、配列相同性の検索及び DNA 配列の構築に有用である。	Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120 以上 一致長さ=56 以上
Consed	Phrap で構築したものの表示及び編集をす るためのグラフィックツールである。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリクス解析プログラムである。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10: 1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5 以上
Motifs	Prosite で定義された配列と一致したパターンについてアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他、前出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.
 LAL, Preeti
 YUE, Henry
 TANG, Y. Tom
 HILLMAN, Jennifer L.
 BAUGHN, Mariah R.
 YANG, Junming

<120> CARBOHYDRATE-MODIFYING ENZYMES

<130> PF-0687 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/130,383
 <151> 1999-04-21

<160> 10

<170> PERL Program

<210> 1
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 000422CD1

<400> 1
 Met Asp Ser Val Glu Lys Gly Ala Ala Thr Ser Val Ser Asn Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Arg Pro Ser Arg Gly Arg Pro Pro Lys Leu Gln Arg Asn
 20 25 30
 Ser Arg Gly Gly Gln Gly Arg Gly Val Glu Lys Pro Pro His Leu
 35 40 45
 Ala Ala Leu Ile Leu Ala Arg Gly Gly Ser Lys Gly Ile Pro Leu
 50 55 60
 Lys Asn Ile Lys His Leu Ala Gly Val Pro Leu Ile Gly Trp Val
 65 70 75
 Leu Arg Ala Ala Leu Asp Ser Gly Ala Phe Gln Ser Val Trp Val
 80 85 90
 Ser Thr Asp His Asp Glu Ile Glu Asn Val Ala Lys Gln Phe Gly
 95 100 105
 Ala Gln Val His Arg Arg Ser Ser Glu Val Ser Lys Asp Ser Ser
 110 115 120
 Thr Ser Leu Asp Ala Ile Ile Glu Phe Leu Asn Tyr His Asn Glu
 125 130 135
 Val Asp Ile Val Gly Asn Ile Gln Ala Thr Ser Pro Cys Leu His
 140 145 150
 Pro Thr Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Met Ile Arg Glu Glu Gly
 155 160 165
 Tyr Asp Ser Val Phe Ser Val Val Arg Arg His Gln Phe Arg Trp
 170 175 180
 Ser Glu Ile Gln Lys Gly Val Arg Glu Val Thr Glu Pro Leu Asn
 185 190 195
 Leu Asn Pro Ala Lys Arg Pro Arg Arg Gln Asp Trp Asp Gly Glu

```

200
Leu Tyr Glu Asn Gly Ser Phe Tyr Phe Ala Lys Arg His Leu Ile
215
Glu Met Gly Tyr Leu Gln Gly Gly Lys Met Ala Tyr Tyr Glu Met
230
Arg Ala Glu His Ser Val Asp Ile Asp Val Asp Ile Asp Trp Pro
245
Ile Ala Glu Gln Arg Val Leu Arg Tyr Gly Tyr Phe Gly Lys Glu
260
Lys Leu Lys Glu Ile Lys Leu Leu Val Cys Asn Ile Asp Gly Cys
275
Leu Thr Asn Gly His Ile Tyr Val Ser Gly Asp Gln Lys Glu Ile
290
Ile Ser Tyr Asp Val Lys Asp Ala Ile Gly Ile Ser Leu Leu Lys
305
Lys Ser Gly Ile Glu Val Arg Leu Ile Ser Glu Arg Ala Cys Ser
320
Lys Gln Thr Leu Ser Ser Leu Lys Leu Asp Cys Lys Met Glu Val
335
Ser Val Ser Asp Lys Leu Ala Val Val Asp Glu Trp Arg Lys Glu
350
Met Gly Leu Cys Trp Lys Glu Val Ala Tyr Leu Gly Asn Glu Val
365
Ser Asp Glu Glu Cys Leu Lys Arg Val Gly Leu Ser Gly Ala Pro
380
Ala Asp Ala Cys Ser Thr Ala Gln Lys Ala Val Gly Tyr Ile Cys
395
Lys Cys Asn Gly Gly Arg Gly Ala Ile Arg Glu Phe Ala Glu His
410
Ile Cys Leu Leu Met Glu Lys Val Asn Asn Ser Cys Gln Lys
425
205
220
235
250
265
280
295
310
325
340
355
370
385
400
415
430

```

```

<210> 2
<211> 302
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 983984CD1

```

```

<400> 2
Met Lys Ala Pro Gly Arg Leu Val Leu Ile Ile Leu Cys Ser Val
1 5 10 15
Val Phe Ser Ala Val Tyr Ile Leu Leu Cys Cys Trp Ala Gly Leu
20 25 30
Pro Leu Cys Leu Ala Thr Cys Leu Asp His His Phe Pro Thr Gly
35 40 45
Ser Arg Pro Thr Val Pro Gly Pro Leu His Phe Ser Gly Tyr Ser
50 55 60
Ser Val Pro Asp Gly Lys Pro Leu Val Arg Glu Pro Cys Arg Ser
65 70 75
Cys Ala Val Val Ser Ser Ser Gly Gln Met Leu Gly Ser Gly Leu
80 85 90
Gly Ala Glu Ile Asp Ser Ala Glu Cys Val Phe Arg Met Asn Gln
95 100 105
Ala Pro Thr Val Gly Phe Glu Ala Asp Val Gly Gln Arg Ser Thr
110 115 120
Leu Arg Val Val Ser His Thr Ser Val Pro Leu Leu Leu Arg Asn
125 130 135
Tyr Ser His Tyr Phe Gln Lys Ala Arg Asp Thr Leu Tyr Met Val

```

140 145 150
 Trp Gly Gln Gly Arg His Met Asp Arg Val Leu Gly Gly Arg Thr
 155 160 165
 Tyr Arg Thr Leu Leu Gln Leu Thr Arg Met Tyr Pro Gly Leu Gln
 170 175 180
 Val Tyr Thr Phe Thr Glu Arg Met Met Ala Tyr Cys Asp Gln Ile
 185 190 195
 Phe Gln Asp Glu Thr Gly Lys Asn Arg Arg Gln Ser Gly Ser Phe
 200 205 210
 Leu Ser Thr Gly Trp Phe Thr Met Ile Leu Ala Leu Glu Leu Cys
 215 220 225
 Glu Glu Ile Val Val Tyr Gly Met Val Ser Asp Ser Tyr Cys Arg
 230 235 240
 Glu Lys Ser His Pro Ser Val Pro Tyr His Tyr Phe Glu Lys Gly
 245 250 255
 Arg Leu Asp Glu Cys Gln Met Tyr Leu Ala His Glu Gln Ala Pro
 260 265 270
 Arg Ser Ala His Arg Phe Ile Thr Glu Lys Ala Val Phe Ser Arg
 275 280 285
 Trp Ala Lys Lys Arg Pro Ile Val Phe Ala His Pro Ser Trp Arg
 290 295 300
 Thr Glu

<210> 3
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2210054CD1

<400> 3
 Met Pro Phe Arg Leu Leu Ile Pro Leu Gly Leu Leu Cys Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Gln His His Gly Ala Pro Gly Pro Asp Gly Ser Ala Pro
 20 25 30
 Asp Pro Ala His Tyr Arg Glu Arg Val Lys Ala Met Phe Tyr His
 35 40 45
 Ala Tyr Asp Ser Tyr Leu Glu Asn Ala Phe Pro Phe Asp Glu Leu
 50 55 60
 Arg Pro Leu Thr Cys Asp Gly His Asp Thr Trp Gly Ser Phe Ser
 65 70 75
 Leu Thr Leu Ile Asp Ala Leu Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asn
 80 85 90
 Val Ser Glu Phe Gln Arg Val Val Glu Val Leu Gln Asp Ser Val
 95 100 105
 Asp Phe Asp Ile Asp Val Asn Ala Ser Val Phe Glu Thr Asn Ile
 110 115 120
 Arg Val Val Gly Gly Leu Leu Ser Ala His Leu Leu Ser Lys Lys
 125 130 135
 Ala Gly Val Glu Val Glu Ala Gly Trp Pro Cys Ser Gly Pro Leu
 140 145 150
 Leu Arg Met Ala Glu Glu Ala Ala Arg Lys Leu Leu Pro Ala Phe
 155 160 165
 Gln Thr Pro Thr Gly Met Pro Tyr Gly Thr Val Asn Leu Leu His
 170 175 180
 Gly Val Asn Pro Gly Glu Thr Pro Val Thr Cys Thr Ala Gly Ile
 185 190 195
 Gly Thr Phe Ile Val Glu Phe Ala Thr Leu Ser Ser Leu Thr Gly
 200 205 210

Asp Pro Val Phe Glu Asp Val Ala Arg Val Ala Leu Met Arg Leu
 215 220 225
 Trp Glu Ser Arg Ser Asp Ile Gly Leu Val Gly Asn His Ile Asp
 230 235 240
 Val Leu Thr Gly Lys Trp Val Ala Gln Asp Ala Gly Ile Gly Ala
 245 250 255
 Gly Val Asp Ser Tyr Phe Glu Tyr Leu Val Lys Gly Ala Ile Leu
 260 265 270
 Leu Gln Asp Lys Lys Leu Met Ala Met Phe Leu Glu Tyr Asn Lys
 275 280 285
 Ala Ile Arg Asn Tyr Thr Arg Phe Asp Asp Trp Tyr Leu Trp Val
 290 295 300
 Gln Met Tyr Lys Gly Thr Val Ser Met Pro Val Phe Gln Ser Leu
 305 310 315
 Glu Ala Tyr Trp Pro Gly Leu Gln Ser Leu Ile Gly Asp Ile Asp
 320 325 330
 Asn Ala Met Arg Thr Phe Leu Asn Tyr Tyr Thr Val Trp Lys Gln
 335 340 345
 Phe Gly Gly Leu Pro Glu Phe Tyr Asn Ile Pro Gln Gly Tyr Thr
 350 355 360
 Val Glu Lys Arg Glu Gly Tyr Pro Leu Arg Pro Glu Leu Ile Glu
 365 370 375
 Ser Ala Met Tyr Leu Tyr Arg Ala Thr Gly Asp Pro Thr Leu Leu
 380 385 390
 Glu Leu Gly Arg Asp Ala Val Glu Ser Ile Glu Lys Ile Ser Lys
 395 400 405
 Val Glu Cys Gly Phe Ala Thr Ile Lys Asp Leu Arg Asp His Lys
 410 415 420
 Leu Asp Asn Arg Met Glu Ser Phe Phe Leu Ala Glu Thr Val Lys
 425 430 435
 Tyr Leu Tyr Leu Leu Phe Asp Pro Thr Asn Phe Ile His Asn Asn
 440 445 450
 Gly Ser Thr Phe Asp Thr Val Ile Thr Pro Tyr Gly Glu Cys Ile
 455 460 465
 Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Ile Phe Asn Thr Glu Ala His Pro Ile
 470 475 480
 Asp Pro Ala Ala Leu His Cys Cys Gln Arg Leu Lys Glu Glu Gln
 485 490 495
 Trp Glu Val Glu Asp Leu Met Arg Glu Phe Tyr Ser Leu Lys Arg
 500 505 510
 Ser Arg Ser Lys Phe Gln Lys Asn Thr Val Ser Ser Gly Pro Trp
 515 520 525
 Glu Pro Pro Ala Arg Pro Gly Thr Leu Phe Ser Pro Glu Asn His
 530 535 540
 Asp Gln Ala Arg Glu Arg Lys Pro Ala Lys Gln Lys Val Pro Leu
 545 550 555
 Leu Ser Cys Pro Ser Gln Pro Phe Thr Ser Lys Leu Ala Leu Leu
 560 565 570
 Gly Gln Val Phe Leu Asp Ser Ser
 575

<210> 4

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2618358CD1

<400> 4

Met	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Trp	Asp
1				5					10					15
Ala	Asp	Gly	Lys	Gly	Pro	Cys	Val	Trp	Asp	Thr	Phe	Thr	His	Gln
				20					25					30
Gly	Gly	Glu	Arg	Val	Phe	Lys	Asn	Gln	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Cys
				35					40					45
Gly	Ser	Tyr	Thr	Leu	Trp	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Cys	Ile	Lys	Gln
				50					55					60
Leu	Gly	Leu	Thr	His	Tyr	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser	Trp	Ser	Arg	Leu
				65					70					75
Leu	Pro	Asp	Gly	Thr	Thr	Gly	Phe	Ile	Asn	Gln	Lys	Gly	Ile	Asp
				80					85					90
Tyr	Tyr	Asn	Lys	Ile	Ile	Asp	Asp	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Val	Thr
				95					100					105
Pro	Ile	Val	Thr	Leu	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	Leu	Glu
				110					115					120
Asp	Gln	Gly	Gly	Trp	Leu	Ser	Glu	Ala	Ile	Ile	Glu	Ser	Phe	Asp
				125					130					135
Lys	Tyr	Ala	Gln	Phe	Cys	Phe	Ser	Thr	Phe	Gly	Asp	Arg	Val	Lys
				140					145					150
Gln	Trp	Ile	Thr	Ile	Asn	Glu	Ala	Asn	Val	Leu	Ser	Val	Met	Ser
				155					160					165
Tyr	Asp	Leu	Gly	Met	Phe	Pro	Pro	Gly	Ile	Pro	His	Phe	Gly	Thr
				170					175					180
Gly	Gly	Tyr	Gln	Ala	Ala	His	Asn	Leu	Ile	Lys	Ala	His	Ala	Arg
				185					190					195
Ser	Trp	His	Ser	Tyr	Asp	Ser	Leu	Phe	Arg	Lys	Lys	Gln	Lys	Gly
				200					205					210
Met	Val	Ser	Leu	Ser	Leu	Phe	Ala	Val	Trp	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp
				215					220					225
Pro	Asn	Ser	Val	Ser	Asp	Gln	Glu	Ala	Ala	Lys	Arg	Ala	Ile	Thr
				230					235					240
Phe	His	Leu	Asp	Leu	Phe	Ala	Lys	Pro	Ile	Phe	Ile	Asp	Gly	Asp
				245					250					255
Tyr	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Ser	Gln	Ile	Ala	Ser	Met	Ser	Gln	Lys
				260					265					270
Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	Leu	Pro	Glu	Phe	Thr	Glu	Glu	Glu
				275					280					285
Lys	Lys	Met	Ile	Lys	Gly	Thr	Ala	Asp	Phe	Phe	Ala	Val	Gln	Tyr
				290					295					300
Tyr	Thr	Thr	Arg	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gln	Glu	Asn	Lys	Lys	Gly	Glu
				305					310					315
Leu	Gly	Ile	Leu	Gln	Asp	Ala	Glu	Ile	Glu	Phe	Phe	Pro	Asp	Pro
				320					325					330
Ser	Trp	Lys	Asn	Val	Asp	Trp	Ile	Tyr	Val	Val	Pro	Trp	Gly	Val
				335					340					345
Cys	Lys	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asn	Asn	Pro	Val
				350					355					360
Ile	Tyr	Ile	Thr	Glu	Asn	Gly	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Pro	Ala	Pro
				365					370					375
Leu	Asp	Asp	Thr	Gln	Arg	Trp	Glu	Tyr	Phe	Arg	Gln	Thr	Phe	Gln
				380					385					390
Glu	Leu	Phe	Lys	Ala	Ile	Gln	Leu	Asp	Lys	Val	Asn	Leu	Gln	Val
				395					400					405
Tyr	Cys	Ala	Trp	Ser	Leu	Leu	Asp	Asn	Phe	Glu	Trp	Asn	Gln	Gly
				410					415					420
Tyr	Ser	Ser	Arg	Phe	Gly	Leu	Phe	His	Val	Asp	Phe	Glu	Asp	Pro
				425					430					435
Ala	Arg	Pro	Arg	Val	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ala	Lys
				440					445					450
Ile	Ile	Arg	Asn	Asn	Gly	Leu	Glu	Ala	His	Leu				
				455					460					

<210> 5
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2912330CD1

 <400> 5
 Met Ser Met Lys Trp Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ile Gln Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Cys Gly Lys Val Leu Val Trp Pro
 20 25 30
 Thr Glu Phe Ser His Trp Met Asn Ile Lys Thr Ile Leu Asp Glu
 35 40 45
 Leu Val Gln Arg Gly His Glu Val Thr Val Leu Ala Ser Ser Ala
 50 55 60
 Ser Ile Ser Phe Asp Pro Asn Ser Pro Ser Thr Leu Lys Phe Glu
 65 70 75
 Val Tyr Pro Val Ser Leu Thr Lys Thr Glu Phe Glu Asp Ile Ile
 80 85 90
 Lys Gln Leu Val Lys Arg Trp Ala Glu Leu Pro Lys Asp Thr Phe
 95 100 105
 Trp Ser Tyr Phe Ser Gln Val Gln Glu Ile Met Trp Thr Phe Asn
 110 115 120
 Asp Ile Leu Arg Lys Phe Cys Lys Asp Ile Val Ser Asn Lys Lys
 125 130 135
 Leu Met Lys Lys Leu Gln Glu Ser Arg Phe Asp Val Val Leu Ala
 140 145 150
 Asp Ala Val Phe Pro Phe Gly Glu Leu Leu Ala Glu Leu Leu Lys
 155 160 165
 Ile Pro Phe Val Tyr Ser Leu Arg Phe Ser Pro Gly Tyr Ala Ile
 170 175 180
 Glu Lys His Ser Gly Gly Leu Leu Phe Pro Pro Ser Tyr Val Pro
 185 190 195
 Val Val Met Ser Glu Leu Ser Asp Gln Met Thr Phe Ile Glu Arg
 200 205 210
 Val Lys Asn Met Ile Tyr Val Leu Tyr Phe Glu Phe Trp Phe Gln
 215 220 225
 Ile Phe Asp Met Lys Lys Trp Asp Gln Phe Tyr Ser Glu Val Leu
 230 235 240
 Gly Arg Pro Thr Thr Leu Ser Glu Thr Met Ala Lys Ala Asp Ile
 245 250 255
 Trp Leu Ile Arg Asn Tyr Trp Asp Phe Gln Phe Pro His Pro Leu
 260 265 270
 Leu Pro Asn Val Glu Phe Val Gly Gly Leu His Cys Lys Pro Ala
 275 280 285
 Lys Pro Leu Pro Lys Glu Met Glu Glu Phe Val Gln Ser Ser Gly
 290 295 300
 Glu Asn Gly Val Val Val Phe Ser Leu Gly Ser Met Val Ser Asn
 305 310 315
 Thr Ser Glu Glu Arg Ala Asn Val Ile Ala Ser Ala Leu Ala Lys
 320 325 330
 Ile Pro Gln Lys Val Leu Trp Arg Phe Asp Gly Asn Lys Pro Asp
 335 340 345
 Thr Leu Gly Leu Asn Thr Arg Leu Tyr Lys Trp Ile Pro Gln Asn
 350 355 360
 Asp Leu Leu Gly His Pro Lys Thr Lys Ala Phe Ile Thr His Gly
 365 370 375
 Gly Met Asn Gly Ile Tyr Glu Ala Ile Tyr His Gly Val Pro Met

Val Gly Val Pro	380	385	390
Ile Phe Gly Asp Gln	Leu Asp Asn Ile Ala His		
395	400	405	
Met Lys Ala Lys	Gly Ala Ala Val Glu	Ile Asn Phe Lys Thr Met	
410	415	420	
Thr Ser Glu Asp	Leu Leu Arg Ala Leu	Arg Thr Val Ile Thr Asp	
425	430	435	
Ser Ser Tyr Lys	Glu Asn Ala Met Arg	Leu Ser Arg Ile His His	
440	445	450	
Asp Gln Pro Val	Lys Pro Leu Asp Arg	Ala Val Phe Trp Ile Glu	
455	460	465	
Phe Val Met Arg	His Lys Gly Ala Lys	His Leu Arg Ser Ala Ala	
470	475	480	
His Asp Leu Thr	Trp Phe Gln His Tyr	Ser Ile Asp Val Ile Gly	
485	490	495	
Phe Leu Leu Thr	Cys Val Ala Thr Ala	Ile Phe Leu Phe Thr Lys	
500	505	510	
Cys Phe Leu Phe	Ser Cys Gln Lys Phe	Asn Lys Thr Arg Lys Ile	
515	520	525	
Glu Lys Arg Glu			

<210> 6
 <211> 1772
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 000422CB1

<400> 6
 cggcgggcac tgccaggcgg ggatcggggc gcgcccagct gaggtggtga gggactagct 60
 cccggatgtg gagaagctgg ggagaaggcg tgggaggaag atggactcgg tggagaaggg 120
 ggccgccacc tccgtctcca acccgcgggg gcgaccgtcc cggggccggc cgccgaagct 180
 gcagcgaac tctcgcggcg gccaggggcg aggtgtggag aagccccgc acctggcagc 240
 cctaattctg gcccggggag gcagcaaagg catccccctg aagaacatta agcacctggc 300
 gggggtcccg ctcatgtgct gggctctgcg tgcggccctg gattcagggg ccttccagag 360
 tgtatgggtt tcgacagacc atgatgaaat tgagaatgtg gccaaacaat ttggtgcaca 420
 agttcatcga agaagttctg aagtttcaaa agacagctct acctcactag atgccatcat 480
 agaatttctt aattatcata atgaggttga cattgttaga aatattcaag ctacttctcc 540
 atgtttacat cctactgatc ttcaaaaagt tgcagaaatg attcgagaag aaggatatga 600
 ttctgttttc tctgtttgta gacgccatca gtttcgatgg agtgaaattc agaaaggagt 660
 tcgtgaagtg accgaacctc tgaatttaaa tccagctaaa cggcctcgtc gacaagactg 720
 ggatggagaa ttatatgaaa atggctcatt ttattttgct aaaagacatt tgatagagat 780
 gggttacttg caggggtgaa aatggcata ctatgaaatg cgagctgaac atagtgtgga 840
 tatagatgtg gatattgatt ggccatttgc agagcaaaga gtattaagat atggctattt 900
 tggcaaagag aagcttaagg aaataaaact tttggtttgc aatattgatg gatgtctcac 960
 caatggccac atttatgtat caggagacca aaaagaaata atatcttatg atgtaaaaga 1020
 tgctattggg ataagtttat taaagaaaag tggatattgag gtgaggctaa tctcagaaag 1080
 ggccgtgtca aagcagacgc tgtcttcttt aaaactggat tgcaaaatgg aagtcagtgt 1140
 atcagacaag ctagcagttg tagatgaatg gagaaaagaa atgggctgtg gctggaaaga 1200
 agtggcatat cttggaaatg aagtgtctga tgaagagtgc ttgaagagag tgggcctaag 1260
 tggcgctcct gctgatgcct gttctactgc ccagaaggct gttggataca tttgcaaatg 1320
 taatgggtggc cgtgggtgcca tccgagaatt tgcagagcac atttgcctac taatggaaaa 1380
 ggttaataat tcatgccaaa aatagaaatt agcgtaatat tgagaaaaaa atgatacagc 1440
 cttcttcagc cagtttgctt ttatttttga ttaagttaat tccatgttgt aatgttacag 1500
 agagtgtgat ttggtttgtg atatatatat attgtgctct acttttctct ttacgcaaga 1560
 taattattta gagactgatt acagtctttc tcagattttt agtaaagtca agtaagaaca 1620
 tcatcaaagt tcactttgta ttgtaccctg taaaactgtg tgtttgtgtg ctttcaaaga 1680
 tgttgggatt ttatttatct ggggacagtg tgtatggtaa gacatgcctt tctattaata 1740
 aaactacatt tctcaaactt gaaaaaaaaa aa 1772

<210> 7
 <211> 1416
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> 1398
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 983984CB1

<400> 7
 tctggccgcg cggatcagct tccagcccag tcggcccggc cggggggcca tggagctccg 60
 agcggcggat cgcgagcctc ctgcgaacc cagcctgcac gcccggttag cattcggccg 120
 ggagatgctg cagtggaaac tggaaaggcg gtgaaaaacc tacgtcctgc cctcggcccg 180
 cctctccatt cgtccccggg gtagagaggt gcccggtccc cacccttcc cagccccagc 240
 cctggagaca gcagccccta gactactgag ggacagcgac agcatgaagg ctccgggtcg 300
 gctcgtgctc atcatcctgt gctccgtggt ttctctgcc gtctacatcc tctgtgctg 360
 ctgggcccgg ctgcccctct gctggcccac ctgacctggac caccacttcc ccacaggtc 420
 caggcccact gtgcccggac cctgcactt cagtggatat agcagtgtgc cagatgggaa 480
 gccgctggtc cgcgagcctt gccgcagctg tgccgtggtg tccagctccg gccaaatgct 540
 gggctcaggg ctgggtgctg agatcgacag tgccaggtgc gtgttccgca tgaaccaggc 600
 gccacccgtg ggctttgagg cggatgtggg ccagcgcagc accctgctg tctctcaca 660
 cacaagcgtg ccgctgctgc tgcgcaacta ttacactac ttccagaagg ccgagacac 720
 gctctacatg gtgtggggcc agggcaggca catggaccgg gtgctcggcg gccgcacctc 780
 ccgcaagctg ctgcagctca ccaggatgta ccccgccctg caggtgtaca ccttcacgga 840
 gcccaatgat gcctactgag accagatctt ccaggacgag acgggcaaga accggaggca 900
 gtcgggctcc ttctcagca ccggctggtt caccatgatc ctccgctgg agctgtgtga 960
 ggagatcgtg gtctatggga tggtcagcga cagctactgc agggagaaga gccacccctc 1020
 agtgccctac cactactttg agaagggccg gctagatgag tgtcagatgt acctggcaca 1080
 cgtgcaggcg ccccgaaagg cccaccgctt catcactgag aaggcggctt tctccgctg 1140
 ggccaagaag agggccatcg tgttcgccc tccgtcctgg aggactgagt agcttccgctc 1200
 gtcttgccag ccgccatgcc gttgcccagg cctccgggat gtcccattcc aagccatcac 1260
 actccacaaa aacatttaac ttatggttcc tgccctctgc cagtgctgg gtggacctaa 1320
 aggttccttc ccacccatt ctggccgaca tttggagcca tctcaggcct ccactccctg 1380
 agtaattcat ggcatttngg gggctcacc acctac 1416

<210> 8
 <211> 1889
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2210054CB1

<400> 8
 gacgtagcgg aagaaaccgc agcagctccc aggatgaact gggtgcagtg gctgctgctg 60
 ctgcgggggc gctgagagga cagcagctct atgcctttcc ggctgctcat cccgctcggc 120
 ctctgtgctg cgtgctgccc tcagcaccat ggtgcgcoag gteccgacgg ctccgcgcca 180
 gatcccgcgc actacagggg gcgagtcagg gccatgttct accacgccta cgacagctac 240
 ctggagaatg cctttccctt cgatgagctg cgacctctca cctgtgacgg gcacgacacc 300
 tggggcagtt ttctctgac tctaattgat gcaactggaca ccttgctgat tttggggaat 360
 gtctcagaat tccaaagagt ggttgaagtg ctccaggaca gcgtggactt tgatattgat 420
 gtgaacgcct ctgtgtttga aacaaacatt cgagtggtag gaggactcct gtctgctcat 480
 ctgctctcca agaaggctgg ggtggaagta gaggctggat gccctgttc cgggcctctc 540
 ctgagaatgg ctgaggaggc ggcccgaaaa ctctcccag cctttcagac cccactggc 600

```

atgccatag gaacagtgaa cttacttcat ggcgtgaacc caggagagac cctgtcacc 660
tgtacggcag ggattgggac cttcattggt gaatttgcca ccctgagcag cctcactggt 720
gaccgggtgt tcgaagatgt ggcagagtg gctttgatgc gcctctggga gagccggta 780
gatatcgggc tggctggcaa ccacattgat gtgtcactg gcaagtgggt ggcccaggac 840
gcaggeatcg gggctggcgt ggactcctac tttgagtact tgggtgaaag agccatcctg 900
cttcaggata agaagctcat ggccatgttc cttagagtata acaaagccat ccggaactac 960
accgcttctg atgactggta cctgtgggtt cagatgtaca aggggactgt gtccatgcc 1020
gtcttccagt ccttggaggc ctactggcct ggtcttcaga gcctcattgg agacattgac 1080
aatgccatga ggaccttct caactactac actgtatgga agcagtttg ggggctcccg 1140
gaattctaca acattcctca gggatacaca gtggagaagc gagagggcta cccacttccg 1200
ccagaactta ttgaaagcgc aatgtacctc taccgtgcc cgggggatcc caccctccta 1260
gaactcggaa gagatgctgt ggaatccatt gaaaaaatca gcaagtgga gtgctggatt 1320
gcaacaatca aagatctgcg agaccacaag ctggacaacc gcatggagtc gtcttctctg 1380
ccgagactg ttgaaatcct ctactcctg tttgaccctc ccaacttcat ccacaacaa 1440
gggtccacct tcgacacggt gatcaccctc tatggggagt gcatcctggg ggtgggggg 1500
tacatcttca acacagaagc tcaccctcct gacctgccc cctgtcactg ctgccagagg 1560
ctgaaggaag agcagtggga ggtggaggac ttgatgaggg aattctactc tctcaaacgg 1620
agcaggtcga aatttcagaa aaacactggt agttcggggc catgggaacc tccagcaagg 1680
ccaggaacac tcttctcacc agaaaacat gaccaggcaa gggagaggaa gcctgcaaaa 1740
cagaaggctc cacttctcag ctgcccagct cagcccttca cctccaagtt ggcatctactg 1800
ggacaggttt tcctagactc ctcataacca ctggataatt tttttatttt tatttttttg 1860
aggctaaact ataataaatt gcttttgg 1889

```

<210> 9

<211> 2135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2618358CB1

<400> 9

```

ctctctggc caaagggtgc tctgcttctg gcagctgaag atcccagtag acagcttctt 60
aaaccatggc tttccctgca ggatttggat gggcggcagc actgcagctt atcaagtaga 120
aggaggctgg gatcgagatg gaaaggccc ttgtgtctgg gacacattta ctcatcagg 180
aggagagaga gttttcaaga accagactgg cgatgtagct tgtggcagct acactctgtg 240
ggaggaagat ttgaaatgta tcaaacagct tggattgact cattaccgct tctctctttc 300
ctggtcacgt ctgttacctg atgggacgac aggtttcatc aaccagaaaag gaattgatta 360
ttacaacaag atcatcgatg atttgttaaa aaatgggggt actccatttg tgacctcta 420
ccactttgat ttgcctcaga ctttagaaga ccaaggagggt tggttgtcag aggcaatcat 480
tgaatccttt gacaaatag ctcagttttg cttcagtagc tttggggatc gtgtcaagca 540
gtggatcacc ataaatgaag ctaatgttct ttctgtgatg tcatatgact taggtatggt 600
tctccgggt atccctcact ttgggactgg aggttatcag gcagctcata atttgattaa 660
ggctcatgcc agatcctggc acagctatga ttcttattt cgaaaaaagc agaaaggat 720
gggtctctta tcactttttg cggctctggt ggaaccagca gatcccaact cagtgtctga 780
ccaggaagct gctaaaagag ccatcacttt ccatctggat ttatttgcta aaccatatt 840
catcgatggg gattatctg aagtgttcaa gtctcagatt gcctccatga gtcaaaaagc 900
aggctatcca tcatcgaggc ttccagaatt cactgaagaa gagaagaaaa tgatcaagg 960
cactgctgat tttttgctg tgcaatatta tacaactcgc ttaatcaagt accaggagaa 1020
caagaaagga gaactaggta ttctccagga tgcggaaatt gaatttttc cagatccatc 1080
ttgaaaaaat gtggattgga tctacgtggt accatgggga gtatgtaaac tactgaaata 1140
tattaaggat aratataata accctgtaat ttacatcact gagaatgggt tccccagag 1200
tgaccagcgc cctcttgatg aactcaacg ctgggagtat tcagacaaa catttcagga 1260
actgttcaaa gctatccaac ttgataaagt caatcttcaa gtatatttg catggtctct 1320
tctggataac tttgagtgga accagggata cagcagccgg tttggtctct tccacgttga 1380
tttgaagac ccagctagac ccgagctcc ttacacatcg gccaaagaa atgccaagat 1440
catccgaaac aatggccttg aagcacatct gtaggcaaga tggctgagaa atacaggaga 1500
ggcgtctgct tttgaaaggt aaatctgctt tgggtgatgat ctttcaggca atctcaactt 1560
acttctttaa tcaacattta atatcaatgg atctgtgatt aaaaggtctg aatatgtaaa 1620
gcctcgtgaa gtatttaata atggccttta tttgtatttg gatcaatgag gtttttaaaa 1680

```

```

aaaatggaag agaaaaccac taaccttgat tttgtattg caaaatcaga tagacctgga 1740
aacataaaat taaatcctta gacatttttc tagaaaaaaa tgcaaagttt ataaagatga 1800
tacaaccatg atttgcaact gtaacaggag accatttatt ataagcgtac ctgtttgtga 1860
acttaattat tctgattcca taagctgttt ttgcttaggt gatccactgc catgtgatcc 1920
ataatttttc tacataaaaa atcaaagtta aaagtcacat tatacagtta tgcattcatt 1980
tcaacaaaaat agtgaattga taatctactt gtaatatata tcggcccata ttttgtgtgt 2040
ttggacaagt acatctccct tttgcctaata gaacttttga aaaataataa aataatagaa 2100
taattagac tttgaatggc aaaaaaaaaa aaaaaa 2135

```

```

<210> 10
<211> 1650
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2912330CB1

```

```

<400> 10
agcaactgga aaacaagcat tgcattgcat caggatgtct atgaaatgga cttcagctct 60
tctcctgata cagctgagct gttactttag ctctgggagt tgtggaaagg tgctgggtgtg 120
gcccacagaa ttcagccact ggatgaatat aaagacaatc ctggatgaac ttgtccagag 180
aggctcatgag gtgactgtat tggcatcttc agcttccatt tctttcgatc ccaacagccc 240
atctactctt aaatttgaag tttatcctgt atctttaact aaaactgagt ttgaggatat 300
tatcaagcag ctggttaaga gatgggcaga acttccaaaa gacacatttt ggtcatattt 360
ttcacaagta caagaaatca tgtggacatt taatgacata cttagaaagt tctgtaagga 420
tatagtttca aataagaaac ttatgaagaa actacaggag tcaagatttg atgttgttct 480
tgcagatget gttttcccct ttggtgagct gctggcogag ttacttaaaa taccctttgt 540
ctacagctc cgcttctctc ctggctacgc aattgaaaag catagtggag gacttctgtt 600
ccctccttc tatgtgcctg ttgttatgtc agaactaagt gaccaaatga ctttcataga 660
gagggtaaaa aatatgatct atgtgcttta ttttgaattt tggttccaaa tatttgacat 720
gaagaagtgg gatcagttct acagtgaagt tctaggaaga cccactacgt tatctgagac 780
aatggcaaaa gctgacatat ggcttattcg aaactactgg gattttcaat ttctcacc 840
actcttacca aatgttgagt tcgttggagg actccactgc aaacctgcca aaccctacc 900
gaaggaaatg gaagagtttg tccagagctc tggagaaaat ggtgttgttg tgtttctct 960
ggggtcagatg gtcagtaaca cgtcagaaga aagggccaat gtaattgcat cagcccttgc 1020
caagatccca caaaaggttc tbtggagatt tgatgggaat aaaccagata ctttaggact 1080
caatactcgg ctgtacaagt ggatacccca gaatgatctt cttggtcatc ccaaacc 1140
agcttttatc actcatggtg gaatgaatgg gatctatgaa gctatttacc atgggggtccc 1200
tatggtggga gtcccataat ttggtgatca gcttgataac atagctcaca tgaaggccaa 1260
aggagcagct gtgaaataa acttcaaaac tatgacaagc gaagatttac tgagggcttt 1320
gagaacagtc attaccgatt cctcttataa agagaatgct atgagattat caagaattca 1380
ccatgatcaa cctgtaaagc ccttagatcg agcagtcttc tggatcgagt ttgtcatcg 1440
ccacaaagga gccaaagcacc tgcgatcagc tgcccagatg ctcacctggt tccagcacta 1500
ctctatagat gtgattgggt tctgtctgac ctgtgtggca actgctatat tctgtttcac 1560
aaaatgtttt ttattttcct gtcaaaaatt taataaaaact agaaagatag aaaagaggga 1620
atagatcttt ccaaattcaa gaaagacctg 1650

```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/10882
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/00 C12N15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MÜNSTER ANJA-K ET AL: "Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: A nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 16, 4 August 1998 (1998-08-04), pages 9140-9145, XP002153786 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-11,14
A	W0 94 25061 A (GLYKO INC) 10 November 1994 (1994-11-10) abstract examples 1,3,5	1-23
--- -/-- ---		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 November 2000		Date of mailing of the international search report 05. 3. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Panzica, G

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 00/10882

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 07573 A (GENZYME CORP) 12 July 1990 (1990-07-12) abstract page 4, line 7 - line 12 ---	1-23
A	WO 94 14472 A (WICKS IAN ;CARSON DENNIS A (US); UNIV CALIFORNIA (US)) 7 July 1994 (1994-07-07) abstract examples ---	1-23
A	WO 94 23070 A (NEW YORK BLOOD CENTER INC) 13 October 1994 (1994-10-13) examples ---	1-23
A	EP 0 893 506 A (SEIKAGAKU KOGYO CO LTD) 27 January 1999 (1999-01-27) the whole document ---	1-23
A	EP 0 737 745 A (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RE) 16 October 1996 (1996-10-16) abstract page 21, line 5 - line 12 examples ---	1-23
A	NEHES V L ET AL: "HUMAN LYSOSOMAL ALPHA-MANNOSIDASE: ISOLATION AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE FULL-LENGTH CDNA1" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,US,ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, vol. 200, no. 1, 15 April 1994 (1994-04-15), pages 239-245, XP000647751 ISSN: 0006-291X the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/10882**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 16, 19 and 22 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
1-23 (in part)

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-23 (in part)

An isolated polypeptide comprising an aminoacid sequence as set forth in Sel.Id.No.1, encoded by the nucleic acid sequence as set forth in Seq.Id.No.6

2. Claims: 1-23 (in part)

An isolated polypeptide comprising an aminoacid sequence as set forth in Sel.Id.No.2, encoded by the nucleic acid sequence as set forth in Seq.Id.No.7.

3. Claims: 1-23 (in part)

An isolated polypeptide comprising an aminoacid sequence as set forth in Sel.Id.No.3, encoded by the nucleic acid sequence as set forth in Seq.Id.No.8.

4. Claims: 1-23 (in part)

An isolated polypeptide comprising an aminoacid sequence as set forth in Sel.Id.No.4, encoded by the nucleic acid sequence as set forth in Seq.Id.No.9.

5. Claims: 1-23 (in part)

An isolated polypeptide comprising an aminoacid sequence as set forth in Sel.Id.No.5, encoded by the nucleic acid sequence as set forth in Seq.Id.No.10.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/10882

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9425061	A	10-11-1994	NONE
WO 9007573	A	12-07-1990	AT 138686 T 15-06-1996 CA 2005709 A 23-06-1990 DE 68926569 D 04-07-1996 DE 68926569 T 26-09-1996 EP 0401362 A 12-12-1990 ES 2093642 T 01-01-1997 JP 2893481 B 24-05-1999 US 5549892 A 27-08-1996 US 5236838 A 17-08-1993
WO 9414472	A	07-07-1994	NONE
WO 9423070	A	13-10-1994	AU 688310 B 12-03-1998 AU 6417594 A 24-10-1994 CA 2159083 A 13-10-1994 EP 0694081 A 31-01-1996 JP 8508406 T 10-09-1996
EP 0893506	A	27-01-1999	US 6162908 A 19-12-2000 WO 9738113 A 16-10-1997
EP 0737745	A	16-10-1996	JP 2895739 B 24-05-1999 JP 7255472 A 09-10-1995 JP 2854803 B 10-02-1999 JP 7289254 A 07-11-1995 US 5854042 A 29-12-1998 WO 9518217 A 06-07-1995 JP 2839232 B 16-12-1998 JP 7227280 A 29-08-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 P	29/00	C 0 7 K	16/40	4 C 0 8 4
	35/00	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
	37/02		1/19	
C 0 7 K	16/40		1/21	
C 1 2 N	1/15		9/24	
	1/19	C 1 2 Q	1/68	A
	1/21	G 0 1 N	33/15	Z
	5/10		33/50	Z
	9/24		33/53	M
C 1 2 Q	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/15		33/68	
	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	
	33/68		37/48	

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

- (72)発明者 タング、ワイ・トム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95054・
 サンノゼ・ランウィックコート 4230
- (72)発明者 ヒルマン、ジェニファー・エル
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94040・
 マウンテンビュー・#12・モンロードライ
 ブ 230
- (72)発明者 ボーゲン、マライア・アール
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・
 サンレアンドロ・サンティアゴロード
 14244
- (72)発明者 ヤング、ジュンミング
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95129・
 サンノゼ・バークレーン 7125

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA26 AA34 AA35 AA40
BB20 CB01 DA12 DA13 DA14
DA36 DA77 DA78 FB02
4B024 AA01 AA11 BA12 CA03 DA02
DA06 EA02 EA04 FA02 GA11
HA12 HA15
4B050 CC03 DD07 LL01 LL03
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ44 QR08
QR42 QR56 QS25 QS34 QX07
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01
BA02 CA31 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA02
BA08 BA22 BA23 CA53 CA56
DC01 NA14 ZB082 ZB262
ZC192 ZC352
4H045 AA11 CA40 DA75 EA20 EA50
FA72

专利名称(译)	碳水化合物修饰酶		
公开(公告)号	JP2002541836A	公开(公告)日	2002-12-10
申请号	JP2000612430	申请日	2000-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ラルプリーティ ユエヘンリー タングワイトム ヒルマンジェニファーエル ボーグンマライアアール ヤングジュンミン		
发明人	ラル、プリーティ ユエ、ヘンリー タング、ワイトム ヒルマン、ジェニファー・エル ボーグン、マライア・アール ヤング、ジュンミン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/43 A61K45/00 A61P3/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/10 C12N9/12 C12N9/24 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 C07K2319/00 C12N9/1051 C12N9/1081 C12N9/1241 C12N9/2402 C12Y204/01017 C12Y207/07043 C12Y302/01021 C12Y302/01113 Y02A50/471		
FI分类号	A61K45/00 A61P3/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/24 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/68 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 A61K37/48		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/DA78 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA12 4B024/CA03 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ44 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX07 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DC01 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C084/ZC192 4C084/ZC352 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	60/130383 1999-04-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码CME的人碳水化合物修饰酶 (CME) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体和宿主细胞， 抗体， 激动剂， 拮抗剂。 此外， 本发明提供了一种用于诊断， 治疗和预防与CME表达有关的疾病的方法。

