

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 517288

(P2003 - 517288A)

(43)公表日 平成15年5月27日 (2003.5.27)

(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 P 25/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/44		25/02 103	4 B 0 2 4
A 6 1 P 25/00		29/00	4 B 0 5 0
25/02	103	37/02	4 B 0 6 3
29/00		43/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全145数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 620057(P2000 - 620057)

(86)(22)出願日 平成12年5月19日(2000.5.19)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月19日(2001.11.19)

(86)国際出願番号 PCT/US00/13879

(87)国際公開番号 W000/071679

(87)国際公開日 平成12年11月30日(2000.11.30)

(31)優先権主張番号 60/135,049

(32)優先日 平成11年5月20日(1999.5.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/136,740

(32)優先日 平成11年5月27日(1999.5.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミクス・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 ユエ、ヘンリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州94043・サニーバイル・ルイスアベニュー 826

(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95118・サンノゼ・ランウィックコート 4230

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オキシドレダクターゼタンパク質

(57)【要約】

本発明は、ヒトオキシドレダクターゼタンパク質 (OXRD) と、OXRDを同定し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、宿主細胞、抗体、アゴニスト及びアンタゴニストを提供する。更に、本発明は、OXRDの発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)乃至(d)を有する群から選択したアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチド。

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列

(b) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列

(c) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片

(d) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片

【請求項2】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択した請求項1に記載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】 請求項2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5】 配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号16を有する群から選択した請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合し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7】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項8】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項9】 請求項1に記載のポリペプチドを製造する方法であって、

(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを受容する過程とからなり、

前記組換えポリヌクレオチドが、請求項1に記載の前記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したプロモーター配列を有することを特徴とする方法。

【請求項10】 請求項1に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項11】 以下の(a)乃至(d)を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含む実質上単離されたポリヌクレオチド。

(a) 配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列

(b) 配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列

(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド配列

(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド配列

(e) (a)~(d)のRNA等価物

【請求項12】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続した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13】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程とからなり、

前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合

体が形成されるような条件下で、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ことを特徴とする方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを有することを特徴とする医薬品成分。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16に記載の医薬品成分。

【請求項18】 機能性OXRDの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項16に記載の医薬品成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項19に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする医薬品成分。

【請求項21】 機能性OXRDの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項20に記載の医薬品成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、
- (b) 前記サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項22に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする医薬品成分。

【請求項24】 機能性OXRDの過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項23に記載の医薬品成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 適切な条件下で請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、
- (b) 請求項1に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項1に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、
- (b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、
- (c) 試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、

試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする

方法。

【請求項27】 請求項5に記載の配列を有する標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために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す過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、オキシドレダクターゼタンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列に関し、ヒト遺伝子発現、遺伝連鎖及び遺伝変異性の分析及び細胞増殖異常、神経疾患、遺伝障害、平滑筋障害及び自己免疫/炎症障害の診断、治療並びに予防におけるこれらの配列の利用に関する。

【0002】**(発明の背景)**

生物発生及び生分解の多数の経路は、ドナーまたは受容体補助因子の還元または酸化に結合されたオキシドレダクターゼ(デヒドロゲナーゼまたはレダクターゼ)活性を必要とする。潜在的補助因子には、シトクロム、酸素、ジスルフィド、硫酸鉄タンパク質、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドNAD⁺、NADP⁺がある(Newsholme, E.A. and A.R. Leech (1983) *Biochemistry for the Medical Sciences*, John Wiley and Sons, Chichester, U.K., pp. 779-793)。レダクターゼ活性は、同時発生的な補助因子の酸化により、基質と補助因子間の電子の伝達を触媒する。逆脱水素酵素反応は、補助因子の還元及び結果としての基質の酸化を触媒する。オキシドレダクターゼ酵素は、細菌、植物からヒトに及ぶ生物体の全ての細胞において多数の反応を触媒するタンパク質の広範なスーパーファミリーである。このような反応には、糖の代謝、肝臓における或る種の解毒反応及び脂肪酸、アミノ酸、グルココルチコイド、エストロゲン、アンドロゲン、プロスタグランジンの合成または分解がある。異なるファミリーメンバーは、反応が通常触媒されるような方向に従って名前が付けられており、オキシドレダクターゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、またはデヒドロゲナーゼと称し得る。更に、ファミリーメンバーは多くの場合、サイトソル、原形質膜、ミトコンドリアの内膜または外膜及びペルオキシソームを含む別の細胞局在を有する。

【0003】

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは、アセチルCoAのアセチル基のCO₂

への酸化を含めた、サイトゾルとミトコンドリアの両方における非常に多くの酸化還元反応に関与している。通常ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは、酵素にそれほど密接には結合しておらず、補酵素と呼ばれることが多いが、基質として機能し得る。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) 及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADP^+) は、各々 NADH 及び NADPH への可逆還元を受けるが、細胞内で異なる活性を有する。 NADH の主要な役割は、多数の生合成プロセス中の代謝中間体から電子伝達鎖へ電子を伝達することである。 NADPH は、非常に多くの生合成プロセスにおいて還元剤として作用する。

【0004】

短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ (SCAD) は、15%から30%の配列一致性を共有するオキシドレダクターゼのファミリーであり、補酵素結合ドメイン及び基質結合ドメインにおいて優勢に類似性を有している。SCADは、エタノールの解毒における公知の役割に加えて、脂肪酸、ステロイド、幾つかのプロスタグランジンの合成及び分解にも関与しており、従って例えば脂質貯蔵病、ミオパシー、SCAD欠失及び或る種の遺伝病など、種々の疾病に結びつけられる。例えば、レチノールデヒドロゲナーゼは、レチノールをレチン酸の前駆体であるレチナールに変換するようなSCADファミリーのメンバーである (Haeseleer, F. ら (1998) *J. Biol. Chem.* 273:21790-21799)。分化及びアポトーシスの制御因子であるレチン酸は、細胞増殖及び炎症に関与する下方制御遺伝子であることが示されてきた (Chai, X. ら (1995) *J. Biol. Chem.* 270:3900-3904)。更に、レチノールデヒドロゲナーゼは、常染色体劣性型小児期発生重症レチナールジストロフィーなどの遺伝性の眼病に関連していた (Simon, A. ら (1996) *Genomics* 36:424-430)。

【0005】

神経伝達物質の生物発生及び生分解に関与する多くの酵素及びその他の情報伝達分子は、単離されて、短鎖 NAD^+ / NADH 依存性アルコールデヒドロゲナーゼファミリーのメンバーであると同定されていた。神経伝達物質の不活性化は、実験的向神経活性薬物の使用が示しているように、神経系の正確な機能化に絶対不可欠である (Avery, L. and H.R. Horvitz (1990) *J. Exp. Zool.* 253:263-270)。

神経伝達物質代謝経路の後成的または遺伝的欠陥は、パーキンソン病及び先天性筋クローヌスを含む異なる組織における病状のスペクトルの原因となり得る (Mc Cance, K.L. and S.E. Huether (1994) Pathophysiology, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis MO, pp. 402-404 及び Gundlach, A.L. (1990) FASEB J. 4:2761-2766)。

【0006】

ミトコンドリアの電子伝達鎖または呼吸鎖は、ミトコンドリア膜における一連のオキシドレダクターゼ型酵素複合体である。この伝達鎖が原因となって、この酸化作用をATPの合成(酸化リン酸化)に結び付けるのみならず、NADHから複合体内の一連の酸化還元中心(電子キャリア)を介して酸素へ電子を伝達する。ATPは、細胞の多くのエネルギー要求反応を発生させるための1次エネルギー源を供給する。呼吸鎖機能不全は、ハンチントン病、フリードライヒ失調症及びパーキンソン病を含む幾つかの神経変性疾患において同定されていた (Schapira, A.H. (1999) Biochim. Biophys. Acta. 1410:159-170)。

【0007】

呼吸鎖において鍵となる酵素複合体は、NADH依存性ユビキノンオキシドレダクターゼ、コハク酸:ユビキノンオキシドレダクターゼ、シトクロム c_1 -bオキシドレダクターゼ、シトクロムcオキシダーゼ及びATPシンターゼである (Alberts, B.ら (1994) Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York NY, pp. 677-678)。これら複合体は、サイトゾル側に位置するコハク酸:ユビキノンオキシドレダクターゼの例外を有するミトコンドリア膜の内部基質側に設けられる。NADH依存性ユビキノンオキシドレダクターゼは、NADHから電子を受容し、受容した電子をフラビン分子及び幾つかの硫酸鉄中心を介してユビキノンへ通過させることにより、呼吸鎖における第1ステップを開始する。NADPH依存性ユビキノンオキシドレダクターゼは、フラビタンパク質からシトクロムへのミトコンドリアの電子伝達を調節する。電子伝達反応中、ユビキノン10は、ユビキノール10に対するNADPHの存在下では減少する。ユビキノン10は、シトクロム c_1 -bへの電子伝達によるユビキノール10からのシトクロム c_1 -bオキシドレダクターゼにより再生される。これらの反応は、脂質から水相への電子伝達を可能にし、ミ

トコンドリア内膜を横断するようにプロトンを同時にポンプすることを可能にする。

【0008】

NADH依存性ユビキノンオキシドレダクターゼの欠失及び変異発現は、神経変性疾患、ミオパシー及び癌を含む種々のヒトの疾病に関連している (Singer, T.P. ら (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1271:211-219 及び Selvanayagam, P. and S. Rajaraman (1996) *Lab. Invest.* 74:592-599)。更に、ドキソルビシンなどの化学療法薬におけるキノン成分のNADH依存性ユビキノンオキシドレダクターゼ還元は、化学療法薬の抗腫瘍活性及び/または変異原性に寄与すると信じられている (Akman, S.A. ら (1992) *Biochemistry* 31:3500-3506)。

【0009】

オキシドレダクターゼは、ミトコンドリア及びペルオキシソームの脂肪酸代謝経路の成分であり、殆ど全ての真核細胞に見られるような膜で囲まれたオルガネラである。ペルオキシソーム酵素は、ミクロボディーC末端標的シグナルにより、通常はSKL (セリン-リジン-ロイシン) によりペルオキシソームにターゲティングされる。主要酸化経路は飽和及び不飽和脂肪酸を共に分解し、補助経路は不飽和脂肪酸の分解に必要な追加ステップを実行する。ミトコンドリア及びペルオキシソームの酸化酵素の先天性欠失は重病と関連しており、生後まもなく現われて数年以内に死に至らしめるものもある。酸化の欠失は、ライ症候群、ツェルヴェーガー症候群、新生児副腎白質ジストロフィー、小児性レフサム病、アシル-CoAオキシダーゼ欠失及び2官能性タンパク質欠失に関連している (Brown, F.R. ら (1993) *Am. J. Dis. Child.* 147:617-626、Cotran, R.S. ら (1994) *Robbins Pathologic Basis of Disease*, W.B. Saunders Co., Philadelphia PA, p.866)。ペルオキシソームの酸化は、癌性組織において損なわれる。腫瘍性ヒト乳房上皮細胞は正常細胞と同数のペルオキシソームを有するが、脂肪アシル-CoAオキシダーゼ活性は制御組織よりも低い (el Bouhtoury, F. ら (1992) *J. Pathol.* 166:27-35)。ヒト大腸癌腫では、正常な大腸組織よりもペルオキシソームが少なく、正常な組織よりも脂肪アシル-CoAオキシダーゼ及び2官能性酵素 (エノイル-CoAヒドラーゼを含む) の活性が少ない (Cable, S. ら (1992) *Vi*

rchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 62:221-226)。

【0010】

アセチルCoAは、ピルビン酸及び脂肪酸のミトコンドリア代謝において鍵となる中間体である。ピルビン酸は、解糖中にサイトゾルで生成され、ミトコンドリア膜を通過して内部ミトコンドリア基質へ伝達される。ピルビン酸を完全に酸化してCO₂及びH₂Oを形成することによりミトコンドリアを産出し、O₂を最終電子受容体(酸化剤)として利用する。基質に入ってからすぐにピルビン酸はCoAと反応してCO₂及び中間体アセチルCoAを形成し、反応は酵素ピルビン酸デヒドロゲナーゼに触媒される。この反応は高度の発エルゴン反応($G^{\circ} = -8.0 \text{ kcal/mol}$)であり、事実上不可逆反応である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ酵素複合体は、直径が30 nmであり、3つの異なる酵素、幾つかの制御ポリペプチド及び5つの異なる補酵素から構成される60のサブユニットを有する。脂肪酸はまた、ミトコンドリア内で酸化されてアセチルCoAを産出し、放出エネルギーを用いてATP型ADP及びリン酸塩を合成する。真核細胞においては、約20のCH₂基を有する脂肪酸が主としてペルオキシソームで分解され、アセチルCoAに変換される。

【0011】

脂肪酸は、トリアシルグリセロールとして貯蔵され、最初に脂肪細胞中に小滴として貯蔵される。アドレナリンなどのホルモンに反応して、トリアシルグリセロールはサイトゾル中で加水分解され、脂肪酸及びグリセリンを遊離させる。脂肪酸は血液中に放出され、大部分の細胞に吸収及び利用される。脂肪酸は多くの組織の、特に心筋の主要なエネルギー源である。ヒトにおいては、1gのトリアシルグリセリンを酸化してCO₂を生成することにより、1gの水和グリコーゲンを酸化するのと比較して6倍のATPが得られるという事実により、脂肪の酸化はATP源としてグルコースの酸化より量的に重要である。

【0012】

サイトゾルにおいては、遊離脂肪酸はCoAに結合し、AMP及び無機ピロリン酸へのATPの加水分解に結びついたエネルギー性反応においてアシルCoAを形成する。脂肪アシル基は、輸送体タンパク質によって内部ミトコンドリア膜を通過して伝達され、基質側の別のCoA分子に再付着する。ミトコンドリア中のアシルCoAの各

分子が酸化されて、2つの炭素原子により短縮された1分子のアセチルCoA及びアシルCoAを形成する。同時に、NAD⁺及びFADの分子は各々NADH及びFADH₂に還元される。この一連の反応は、全ての炭素原子がアセチルCoAに変換されるまで短縮されたアシルCoA上で繰り返される。

【0013】

アシル-CoAデヒドロゲナーゼ(ACD)は、脂肪酸酸化の第1ステップを触媒する。ACD酵素ファミリーのメンバーは、短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ、中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ及び長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼを含み、高い配列相同性を共有し、個々の基質特異性により区別される(マツバラ, Y. ら(1989) J. Biol. Chem. 264:16321-16331)。ACDファミリーのメンバーの欠損は、有害作用を有することが示されてきた。例えば、短鎖脂肪酸酸化の初期反応を触媒するホモ四量体のミトコンドリアのフラビン酵素である短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼの欠損は、神経筋機能不全に関連する(Corydon, M.J. ら(1997) Mamm. Genome 8(12):922-926等を参照)。長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼまたは超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼの欠失は、ミトコンドリアの脂肪酸酸化異常の原因となる(Hale, D.E. ら(1990) Prog. Clin. Biol. Res. 321:303-311, Bertrand, C. ら(1993) Biochim. Biophys. Acta 1180:327-329)。

【0014】

イソヴァレリルCoAデヒドロゲナーゼ(IVD)は、ロイシン異化に關与するACDファミリーのメンバーである。IVDは、イソヴァレリルCoAからメチルクロトニルへの転換を触媒する。イソヴァレリル酸血症は、NDの欠失に起因する希少な代謝障害である(タナカ, K. ら(1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:236-242)。

【0015】

3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ(3HACD)は、脂肪酸代謝に關与するACDファミリーのメンバーである。3HACDは、真核細胞のミトコンドリア及びペルオキシソームにおいてNADからNADHへの随伴性酸化により3-ヒドロキシアシル-CoAから3-オキソアシル-CoAへの還元を触媒する。ペルオキシソームにおいては、3HACD及びエノイル-CoAヒドラターゼは2官能性酵素と呼ばれる酵素複合体を

形成し、ここでの欠陥はペルオキシソームの2官能性酵素の欠失に関連する。脂肪酸代謝にこの妨害があると、超長鎖脂肪酸が蓄積し、脳、骨及び副腎の発達が乱される。この欠失を持って生まれてきた乳児は、通常6箇月以内に死亡する(Watkins, P. ら (1989) J. Clin. Invest. 83:771-777)。アルツハイマー病の特徴である神経変性は、或る脳領域内での細胞外プラークの発達に關与する。プラークの主なタンパク質成分はペプチドアミロイド (A β) であり、これはアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の幾つかの分解産物の1つである。A β ペプチドに結合することが示されてきた3HACDIは、アルツハイマー病が発症したニューロンに過剰発現する。更に、3HACDIに対する抗体は、アルツハイマー病の細胞培養モデルにおいてA β の中毒作用を阻止することができる (Yan, S. ら. (1997) Nature 389:689-695)。

【0016】

新たなオキシドレダクターゼタンパク質及びそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、ヒト遺伝子発現、遺伝連鎖及び遺伝変異性の分析と、細胞増殖異常、神経疾患、遺伝障害、平滑筋障害及び自己免疫/炎症障害の診断、治療並びに予防とにおいて有用である新たな組成を提供することにより、当該分野における要求を満たす。

【0017】

(発明の概要)

本発明は、集合的には「OXRD」、個別には「OXRD-1」、「OXRD-2」、「OXRD-3」、「OXRD-4」、「OXRD-5」、「OXRD-6」、「OXRD-7」及び「OXRD-8」と呼ばれるような、実質上精製されたポリペプチドであるヒト組織に発現する完全長分子に特徴がある。或る実施態様において本発明は、(a) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む、実質上単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチドを提供

する。

【0018】

また、本発明は（a）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは配列番号1乃至8を有する群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドは配列番号9乃至16を有する群から選択される。

【0019】

本発明は更に、（a）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【0020】

また、本発明は（a）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、（a）組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養す

る過程と、(b) そのように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドは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したプロモーター配列を有する。

【0021】

本発明は更に、(a) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合するような実質上単離された抗体を提供する。

【0022】

本発明は更に、(a) 配列番号9乃至16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b) 配列番号9乃至16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e) (a) ~ (d) のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドを有する。

【0023】

本発明は更に、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。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a) 配列番号9乃至16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b) 配列番号9乃至16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e) (a) ~ (d) のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、(a) サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b) ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場

合にはオプションでその量を検出する過程からなり、プローブと標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む。

【0024】

本発明はまた、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。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a)配列番号9乃至16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b)配列番号9乃至16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド配列、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e)(a)~(d)のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b)標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

【0025】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む医薬品成分を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む。一実施態様では、医薬品成分は配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列を含む。更に本発明は、機能性OXRDの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程を有する方法を提供する。

【0026】

本発明はまた、(a)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列

、(b)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様では、本発明は機能性OXRDの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程を含む方法を提供する。

【0027】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む医薬品成分を提供する。別の実施態様では、機能性OXRDの過剰発現に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程を含む方法を提供する。

【0028】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至8

を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b)試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

【0029】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b)ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c)試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物を標示する。

【0030】

本発明は更に、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、配列番号9乃至16を有する群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、(a)標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b)標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含む。

【0031】

(発明を実施するための形態)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変し得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を

説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

【0032】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。

【0033】

本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

【0034】

定義

「OXRD」は、実質上精製されたOXRDのアミノ酸配列であって、任意の種、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の種から得たもので、任意の天然物、合成物、半合成物或いは組換え物を起源とするものを指す。

【0035】

「アゴニスト」の語は、OXRDの生物学的活性を強化または擬態する分子を指す。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはOXRDと直接相互作用することによって、或いはOXRDが関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによ

て、OXRDの活性を調節する。

【0036】

「対立遺伝子変異体」は、OXRDをコードする遺伝子の別の形態である。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1の突然変異から作製し得る。また、変異RNAまたはポリペプチドからも作製し得る。ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1若しくは数回生じ得る。

【0037】

OXRDをコードする「変異(altered)」核酸配列は、種々のヌクレオチドを欠失、挿入または置換する核酸配列を有し、OXRDと同一またはOXRDの機能的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドを産出する。この定義に含まれるのは、OXRD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或いは検出困難な多型現象と、OXRDをコードするポリヌクレオチド配列のための正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座に占めるような、対立遺伝子変異体に対する不適切或いは不測のハイブリダイゼーションである。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なOXRDとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。計画的アミノ酸置換は、OXRDの生物学的または免疫学的活性が保持される限りにおいて、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性特性の類似性に基づき行い得る。例えば、負に帯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あり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

【0038】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで、「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に会合する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【0039】

「増幅」は、核酸配列の追加複製に関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて行う。

【0040】

「アンタゴニスト」の語は、OXRDの生物学的活性を阻害或いは弱める分子を指す。アンタゴニストとしては、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子またはその他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはOXRDと直接相互作用することによって、或いはOXRDが関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、OXRDの活性を調節する。

【0041】

「抗体」の語は、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えばFa、F(ab')₂及びFv断片を指すが、これらはエピトープの決定基と結合することができる。OXRDポリペプチドを結合する抗体は、無損傷ポリペプチドを用いるか或いは免疫抗原として感心のある小ペプチドを含む断片を用いるかして調製することができる。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、翻訳または化学合成されたRNAに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に接合することも可能である。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0042】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触している分子の領域(即ちエピトープ)を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場

合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または3次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。抗原決定基は、抗体に結合するための無損傷抗原（即ち免疫応答を誘導するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0043】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸（PNA）や、ホスホリチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドがある。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」若しくは「マイナス（-）」の語がアンチセンス鎖を、「正」若しくは「プラス（+）」がセンス鎖を指すことがある。

【0044】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に「免疫学的に活性」は、天然、組換えまたは合成のOXRD、或いはその任意のオリゴペプチドの能力であって、適切な動物または細胞において特定の免疫反応を誘導して特定の抗体と結合し得る能力を指す。

【0045】

「相補(的)」または「相補性」の語は、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドの、塩基対形成による自然結合を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」に結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸が結合しているだけの「部分的」なものであるか、或いは一本鎖分子間に完全な相補性が存在するような「完全」なものであり得る。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著しい影響を与える。このことは、核酸鎖間の結合に依存する増幅反応において、またペプチド核酸 (PNA) 分子の設計及び使用において特に重要である。

【0046】

「所定のポリヌクレオチド配列からなる成分」及び「所定のアミノ酸配列からなる成分」は、概して所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列からなる任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。OXRDまたはOXRD断片をコードするポリヌクレオチドからなる成分は、ハイブリダイゼーションプローブとして利用することができる。このプローブは凍結乾燥状態で保存し得るものであり、糖質等の安定化剤と会合し得る。ハイブリダイゼーションにおいては、塩 (例えばNaCl)、界面活性剤 (例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS) 及びその他の構成エレメント (例えばデンハート液、脱脂粉乳、サケの精子のDNA等) を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

【0047】

「コンセンサス配列」は、不必要な塩基を分離するために再配列し、XL-PCRキット (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用いて5'方向、3'方向のいずれか一方向或いは両方向に伸長させ、更に再配列した核酸配列を指す。或いは、断片アセンブルのコンピュータプログラムを用いて、1若しくは数個のIncyteクローンの、場合によっては1若しくは数個のパブリックドメインESTの、オーバーラップした配列から組み立てた核酸配列を指す。コンピュータプログラムの例としては、GELVIEW断片アセンブルシステム (GCG, Madison WI) が挙げられる。伸長及びアセンブルの両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

【0048】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

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

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば シートや ヘリックス構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

【0049】

「欠失」は、結果的に1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0050】

「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチ

ド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0051】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成することができ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。

【0052】

「断片」は、OXRDまたはOXRDをコードするポリヌクレオチドの固有部分であって、親配列と同一配列であるが親配列よりも長さが短い配列を指す。断片は、画定された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5~1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸(またはポリペプチドの最初の25%または50%)から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

【0053】

配列番号9乃至16の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。この領域は、配列番号9乃至16を特異的に同定するものであり、例えば同一ゲノム中の配列番号9乃至16以外の配列とは異なるものである。配列番号9乃至16の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列から配列番号9乃至16を区別する類似の方法

において有用である。配列番号9乃至16の断片の正確な長さ及び断片に対応する配列番号9乃至16の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0054】

配列番号1乃至8の断片は、配列番号9乃至16の断片によってコードされる。配列番号1乃至8の断片には、配列番号1乃至8を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、配列番号1乃至8の断片は、配列番号1乃至8を特異認識する抗体を産出するための免疫抗原性ペプチドとして有用である。配列番号1乃至8の断片及び断片に対応する配列番号1乃至8の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0055】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、少なくとも1つの翻訳開始コドン（例えばメチオニン）、オープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。「完全長」ポリヌクレオチド配列は、「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0056】

「相同性」の語は、配列類似性即ち2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の配列間で互換可能な配列同一性である。

【0057】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、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た少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0058】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているような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できる。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、一式の分子生物学分析プログラム (DNASTAR, Madison WI) である。CLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153及びHiggins, D.G. ら (1992) CABIOS 8:189-191の文献に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対をなすアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【0059】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している (Altschul, S.F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) から入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn と blastp (後述) 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、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (1999年5月7日) を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

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

一致率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）配列長さと比較して測定し得る。或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片（例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0060】

高度の相同性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

【0061】

ポリペプチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、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た少なくとも2以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【0062】

ポリペプチド配列間の一一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL

Vを用いて、ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL VIは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【0063】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えばポリペプチド配列を2つ1組で比較をする場合、デフォルトパラメータとして設定されたblastpと共に「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を使用してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

一致率は、完全に画定された(例えば特定の配列番号で画定された)ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。一致率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定されたポリペプチド配列から得られた断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70または150の連続した残基の断片)の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0064】

「ヒト人工染色体」(HAC)は直鎖状の小染色体であり、6 kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み、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エレメントが含まれている。

【0065】

「ヒト化抗体」の語は、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列はヒト抗体により近づくように変異させた抗体分子であって、本来の結合能力はそのまま保持しているような抗体分子を指す。

【0066】

「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（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。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリング許容条件は、例えば約6×SSC、約1%（w/v）のSDS及び約100µg/mlの変性サケ精子DNAの存在下で温度68において成立する。

【0067】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特異配列の融点（ T_m ）より約5～20低くなるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%が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条件はよく知られており、Sambrookら（1989）*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

【0068】

本発明の、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに

対する高ストリンジェンシー条件には、約 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び約1%のSDS存在下で約68において1時間の洗浄条件が含まれる。或いは、65、60、55または42の温度で行ってもよい。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$ の範囲で変化し得る。通常は、遮断剤を用いて非特異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 $\mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約35~50%v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【0069】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって2つの核酸配列間に形成された複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る(C_0t または R_0t 解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質)に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0070】

「挿入」及び「付加」の語は、1若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチド配列を各々付加するようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0071】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

【0072】

「免疫抗原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなOXRDのポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。「免疫抗原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法において有用なOXRDの任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。

【0073】

「マイクロアレイ」の語は、基質上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物の構成を指す。

【0074】

「エレメント」または「アレイエレメント」の語は、マイクロアレイの環境において、基質の表面上に配置されたハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを指す。

【0075】

「調節(する)」の語は、OXRDの活性の変化を指す。調節することによって例えば、OXRDのタンパク質活性、結合特性その他の生物学的、機能的または免疫学的特性が増大または低下し得る。

【0076】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語は、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるか或いはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド核酸(PNA)や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

【0077】

「機能的に結合した」は、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。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及ぼす場合には、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。同一のリーディングフレーム内で2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、一般に、機能的に結合したDNA配列は非常に近接するか

、或いは連続し得る。

【0078】

「ペプチド核酸」(PNA)は、アンチセンス分子または抗遺伝子物質であって、リジンを末端とするアミノ酸残基のペプチドバックボーンに結合した、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からなるものを指す。末端のリジンは、成分に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の拡張を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0079】

OXRDの「翻訳後修飾」は、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク分解性分割及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的または生化学的に発生し得る。生化学的修飾は、OXRDの酵素環境に依存し、細胞タイプによって変化し得る。

【0080】

「プローブ」は、OXRD、OXRDの相補配列またはこれらの断片をコードする核酸配列を指し、同一核酸配列、対立遺伝子核酸配列または関連する核酸配列の検出に用いられる。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。

【0081】

「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

【0082】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプロ

ープ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【0083】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. ら, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innisら (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照されたい。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

【0084】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(マサチューセッツ州ケンブリッジのWhitehead Institute/MITゲノム研究センターから一般向けに入手可能)ではユーザ

ーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である。(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。) PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能)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し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

【0085】

「組換え核酸」は天然配列ではない配列であるか或いは人為的に組み合わせなければ離隔しているような配列の2以上のセグメントを人為的に組み合わせで産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばのSambrookらの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠なエレメントであって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【0086】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの不可欠なエレメントであ

って例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。ワクシニアウイルスは組換え核酸が発現する哺乳動物のワクチン接種に用いるもので、哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

【0087】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の未翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の未翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはRNA安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0088】

「レポーター分子」とは、核酸、アミノ酸または抗体を標識するのに用いられる化学的または生化学的成分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

【0089】

DNA配列に関する「RNA等価物」は、発生した窒素塩基チミンが全てウラシルに置換されていることと、糖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースから構成されていることを除いて、参照DNA配列と同一のヌクレオチド線形配列から構成されている。

【0090】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。OXRDをコードする核酸若しくはその断片、またはOXRD自体を含む疑いのあるサンプルは、体液や、細胞から単離された細胞、染色体、細胞小器官または膜からの抽出物や、細胞や、溶解しているか基質に結合しているゲノムDNA、RNAまたはcDNAや、組織や、組織プリント等から構成され得る。

【0091】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成結合成分との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造(例えば抗原決定基即ちエピトープ)であって結合分子が認識するものが存在するか

否かに依存していることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された遊離したA及びその抗体を含む反応において、エピトープA（つまり遊離し、標識されていないA）を含むポリヌクレオチドの存在が、抗体に結合している標識されたAの量を低減させる。

【0092】

「実質上精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合するその他の構成エレメントの少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が遊離しているものを指す。

【0093】

「置換」は、1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドを各々別のアミノ酸またはヌクレオチドに置換することを意味する。

【0094】

「基質」は、任意の好適な固体または半固体の支持体を指すものであって、膜、フィルタ、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁性非磁性ビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0095】

「転写イメージ」は、所与の時間、条件での固有の細胞タイプまたは組織による遺伝子発現の集合的パターンを指す。

【0096】

「形質転換」は、外来性のDNAが宿主細胞に入り込み、宿主細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞

の語には、限られた時間内に挿入されたDNAやRNAを発現するような一時的に形質転換された細胞のみならず、安定的に形質転換された細胞であってその中に挿入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主の染色体の一部として複製可能であるものも含まれる。

【0097】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の有機体であり、限定するものではないが動植物を含み、有機体の1若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いはin vitro受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら(1989)等の参考文献に与えられている。

【0098】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの交互スプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリ

ペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「単一ヌクレオチド多形性」(SNP)を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

【0099】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。ここで、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の相同性を示し得る。

【0100】

発明

本発明は、新規なオキシドレダクターゼタンパク質(OXRD)、OXRDをコードするポリヌクレオチド、並びに、ヒト遺伝子発現、遺伝連鎖及び遺伝変異性の分析及び細胞増殖異常、神経疾患、遺伝障害、平滑筋障害及び自己免疫/炎症障害の診断、治療並びに予防にこれらの配列を利用する方法の発見に基づくものである。

【0101】

表1は、OXRD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Incyteクローンを示す。列1及び列2は、ポリペプチド及びポリヌクレオチドの配列番号(SEQ ID NO)を各々示している。列3はIncyteクローンのクローンIDを示しており、各OXRDをコードする核酸はここで同定されたものである。列4はcDNAライブラリを示しており、列3のクローンはここから単離したものである。列5は、Incyteクローン及びこれに対応するcDNAライブラリを示している。cDNAライブラ

りが示されていないIncyteクローンは、プールされているcDNAライブラリから得られたものである。列5のIncyteクローンをを用いて各OXRDのコンセンサスヌクレオチド配列を構築した。列5のIncyteクローンは、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。

【0102】

表2の列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特性を示している。列1は配列番号 (SEQ ID NO) を、列2は各ポリペプチド中のアミノ酸残基の数を、列3は潜在的リン酸化部位を、列4は潜在的グリコシル化部位を、列5はサイン (signature) 配列及びモチーフを有するアミノ酸残基を、列6はBLAST分析によって同定された相同配列、列7は分析方法と場合によってはその分析方法が利用できる検索可能なデータベースを示している。列7の分析方法を用いて、配列相同性及びタンパク質モチーフから各ポリペプチドの特徴付けを行った。

【0103】

表3の列は、組織特異性と、OXRDをコードするヌクレオチド配列に関係がある疾患、障害または症状とを示している。表3の列1はヌクレオチドの配列番号を、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、例えば配列番号9乃至16を同定し、配列番号9乃至16と関連するポリヌクレオチド配列を区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅の技術において有用である。これらの断片によりコードされるポリヌクレオチドは、例えば免疫抗原性ペプチドとして有用である。列3は、OXRDを発現する組織カテゴリーを組織全体に対するOXRD発現割合として示している。列4は、OXRDを発現する組織に関連する疾患、障害または症状を、OXRDを発現する組織全体に対する割合として示している。列5は、各cDNAライブラリをサブクロニングするために用いたベクターを示している。

【0104】

表4の列では、cDNAライブラリの作製に用いた組織の説明を示している。OXRDをコードするcDNAのクローンはcDNAライブラリから単離したものである。列1は、ヌクレオチドの配列番号を、列2はクローン単離元であるcDNAライブラリを、列3は列2のcDNAライブラリに関連する組織の起源その他の書誌的情報を示して

いる。

【0105】

配列番号10は、278.8～292.7センチモルガン以内の間隔で染色体1にマッピングする。配列番号14は、109.0～123.8センチモルガン以内の間隔で染色体18にマッピングする。この間隔には、神経疾患に関連する遺伝子及びESTも含まれる。

【0106】

本発明には、OXRDの変異体も含まれる。好適なOXRDの変異体のアミノ酸配列は、OXRDアミノ酸配列と少なくとも約80%、約90%、または約95%もの相同性を有し、OXRDの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するような変異体である。

【0107】

本発明には、OXRDをコードするポリヌクレオチドも含まれる。或る例では、OXRDをコードする配列番号9乃至16からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が本発明に含まれている。配列番号9乃至16のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

【0108】

本発明には、OXRDをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。具体的には、そのようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、OXRDをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約80%、約90%、または約95%の相同性を有する。本発明の或る実施態様では、配列番号9乃至16からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも約80%、約90%、または約95%の相同性を有するような配列番号9乃至16からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、OXRDの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

【0109】

当業者であれば、遺伝暗号の縮重の結果、OXRDをコードする多数のポリヌクレオチド配列（既知の遺伝子または天然の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最低限の類似性しか有しないポリヌクレオチド配列もある）を産出し得ることは理解できよう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組合せは、天然のOXRDのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられる。

【0110】

OXRD及びその変異体をコードするヌクレオチド配列は通常、好適に選択されたストリンジェントな条件下で天然のOXRDのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、OXRDまたはその誘導体であって実質上異なるコドンの使用法があるもの、例えば天然に存在しないコドンの封入があるものをコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益であろう。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えることなくOXRD及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質上変更する別の理由には、天然の配列から作製される転写物より好ましい、例えば半減期が長いなどの特性を有するRNA転写物の作製がある。

【0111】

本発明には、OXRD、OXRD誘導体及びこれらの断片をコードするDNA配列又はこれらの断片を完全に合成化学によって作製することも含まれる。作製後、当分野でよく知られている試薬を用いて、この合成配列を任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてOXRDまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘導し得る。

【0112】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド配列、特に配列番号9乃至16で示される配列及びこれらの断片にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列も含まれる（Wahl, G.M. and S.L. Be

rger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel. A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.等を参照)。

【0113】

DNAシーケンシングの方法は当分野でよく知られており、本発明の何れの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、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) を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD) において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Perkin-Elmer) 等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) または当分野でよく知られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(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.等を参照)。

【0114】

OXRDをコードする核酸配列を、部分的ヌクレオチド配列を利用し且つ当分野でよく知られているPCR法をベースにした種々の方法を用いて伸長させ、プロモーター及び調節要素等の上流配列を検出することができる。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッド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方法である (Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic* 2:318-322等を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環

状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限断片から得る (Triglia, T.ら (1988) *Nucleic Acids Res* 16:8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これ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断片をPCR増幅する方法に關与している。(Lagerstrom, M.ら (1991) *PCR Methods Applic* 1:111-119等を参照。)この方法では、PCRを行う前に多重制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている。(Parker, J.D.ら (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinder (商標) イブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、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/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0115】

完全長cDNAをスクリーニングする際は、より大きなcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリは、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。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。

【0116】

市販されている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産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化される蛍光色素と、放出された波長の検出に利用するCCDカメラと

を有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア（Perkin-Elmer社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等）を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセス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ようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

【0117】

本発明の別の実施例では、OXRDをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、適切な宿主細胞内でOXRD、OXRDの断片またはその機能的等価物を発現させるような組換えDNA分子内でクローニングし得る。遺伝暗号固有の宿重に起因して、実質的同一或いは機能的等価のアミノ酸配列をコードするような別のDNA配列を作製してOXRDの発現に利用し得る。

【0118】

種々の目的でOXRDがコードする配列を変えるために、本発明のヌクレオチド配列を当分野で通常知られている方法を用いて組み換えることができる。ここで目的には、限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節がある。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド仲介定方向突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

【0119】

本発明のヌクレオチドは、MolecularBreeding™ (Maxygen Inc., Santa Clara CA. 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.ら (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797、Christians, F.C.ら (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264、Cramer, A.ら (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319に記載)等のDNAシャッフリング技術の対象となり、OXRDの生物学的特性、例えば生物活性、酵素力、或いは他の分子や化合物との結合力等を変更または向上させ得る。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCR仲介再組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセ

スである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。このように、遺伝の多様性は「人為的」品種改良及び急速な分子の進化を経て創生される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を再結合し、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と再結合し、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

【0120】

別の実施例によれば、当分野でよく知られている化学的方法を用いて、OXRDをコードする配列の全部或いは一部を合成し得る (Caruthers, M.H.ら (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser 7:215-223*, Horn, T.ら (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232*等を参照)。或いは、化学的方法を用いてOXRDそれ自体またはその断片を合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる (Creighton, T. (1984) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60, Roberge, J.Y. ら (1995) *Science 269:202-204*等を参照)。自動合成は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OXRDのアミノ酸配列またはその任意の一部は、直接合成する間、または他のタンパク質から得た配列またはその任意の一部と結合する間、或いはその両方を行っている間に変更し、変異型ポリペプチドを生成することが可能である。

【0121】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である (Chiez, R.M.and F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol. 182:392-421*等を参照)。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる (前出のCreighton, pp.28-53等を参照)。

【0122】

生物学的に活性なOXRDを発現させるために、OXRD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とができる。好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で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ベクターである。必要な要素には、ベクター及びOXRD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プロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。固有開始シグナルを用いて、OXRDをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。OXRD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るようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。発現の効率は、用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを包含することによって高めることができる (Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.等を参照)。

【0123】

当業者によく知られている方法を用いて、OXRDをコードする配列と、好適な転写及び翻訳調節要素とを含む発現ベクターを構築することが可能である。この方法には、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ある (Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYの4, 8, 16-17章、Ausubel, F.M. ら. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NYの9, 13, 16章等を参照)。

【0124】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、OXRDをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換

させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、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または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pBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある（前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509、Bitter, G.A.ら (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C.A.ら (1994) *Bio/Technology* 12:18 1-184; Engelhard, E.K.ら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227、Sandig, V.ら (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:1937-1945、タカマツ, N. (1987) *EMBOJ.* 6:307-311、Coruzzi, G.ら (1984) *EMBOJ.* 3:1671-1680、Broglie, R.ら (1984) *Science* 224:838-843、Winter, J.ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105、『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196、Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659、Harrington, J.J.ら (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355等を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクターまたは種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる（Di Nicola, M.ら (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356、Yu, M.ら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344、Builer, R.M.ら (1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P.ら (1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242等を参照)。本発明は、使用する宿主細胞によって限定されるものではない。

【 0 1 2 5 】

細菌系では、OXRD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多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、OXRD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、サブクローニング及び増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT 1 プラスミド (Li

fe Technologies) などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。OXRDをコードする配列の、ベクターの多数のクローニング部位への連結反応によって、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を同定する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は、クローニングされた配列における in vitro 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.等を参照)。多量のOXRDが必要な場合、例えば抗体を生成する場合などには、OXRD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、強力な誘導T5バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【0126】

酵母の発現系を使用してOXRDを生成し得る。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、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を分泌或いは細胞内への保持のいずれかに誘導し、安定した増殖のために外来配列の宿主ゲノムへの組み込みを可能にする (前出のAusubel (1995)、前出のBitter、前出のScorer等を参照)。

【0127】

植物系を使用してOXRDを発現することも可能である。OXRDをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV (タカマツ, N. (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用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモーターによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい (前出のCoruzzi、前出のBroglie、前出のWinter等を参照)。これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。 (『マグローヒル科学技術年鑑』 (The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196等

を参照。)

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、OXRDをコードする配列は、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/翻訳複合体に連結反応され得る。可欠E1またはE3領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でOXRDを発現する感染ウイルスを得ることが可能である。(Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659等を参照。)更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサー等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得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0128】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療目的のために約6 kb ~ 10 MbのHAC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(Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355.等を参照)。

【0129】

長期にわたり哺乳動物系内で組換えタンパク質を生成するためには、細胞株内のOXRDの安定発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内在性発現因子、或いはその両者のウイルス起源を含むものと、同一或いは別のベクター上の選択可能マーカータンパク質とを用いて、OXRDをコードする配列を細胞株に形質転換することが可能である。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1 ~ 2日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長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、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0130】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものでは

ないがこのような選択系には、*tk*⁻単純細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、*apr*⁻細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある (Wigler, M. ら (1977) *Cell* 11:223-232、Lowy, I. ら (1980) *Cell* 22:817-823等を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を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*はクロルスルフロンに対する耐性を、*pat*はホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える (Wigler, M. ら (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. ら (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14 等を参照)。この他の選択可能遺伝子、例えば、代謝のための細胞要求を変える*trpB*及び*hisD*は、文献に記載されている (Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051等を参照)。可視マーカー、例えばアノトシアニン、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 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。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 (Rhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131等を参照)。

【0131】

マーカー遺伝子発現の存在 / 不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、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、OXRDをコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入された場合、OXRDをコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定することが可能である。または単一プロモーター制御下で、OXRDをコードする配列とタンデムにマーカー遺伝子を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。

【0132】

一般に、OXRDをコードする核酸配列を含み且つOXRDを発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定す

るものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、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バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術がある。

【0133】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてOXRDの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。このような技術の例としては、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)、蛍光活性化細胞選別(FACS)などが挙げられる。OXRD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部位モノクローナルベースのイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合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これ以外のアッセイは、当分野で公知である(Hampton, R. ら(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual. APS Press. St Paul. MN, Sect. IV、Coligan, J. E. ら(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York NY、Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ等を参照)。

【0134】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。OXRD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プローブを産出する方法には、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法がある。或いは、OXRDをコードする配列またはその任意の断片を、mRNAプローブを産出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。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemical等から市販され

ている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にする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、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

【0135】

OXRDをコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培地からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下で培養し得る。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。当業者であれば理解し得るように、OXRDをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を透過するOXRDの直接分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計し得る。

【0136】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないが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、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ及び/または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等）は、American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

【0137】

本発明の別の実施例では、OXRDをコードする天然の核酸配列、修飾核酸配列または組換え核酸配列を、上記任意の宿主系において融合タンパク質の翻訳をもたらす異種配列に連結反応させることができる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラOXRDタンパク質は、OXRD活性阻害剤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も、市販されている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。限定されるものではないが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-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質を遺伝子操作し、OXRDが精製後に異種部分から切断され得るように、OXRDコード配列と異種タンパク質配列の間にタンパク質分解切断部位を含めることもできる。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

【0138】

本発明の更に別の実施例では、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、放射能標識したOXRDの合成がin vitroで可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、例えば³⁵Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【0139】

本発明のOXRDまたはその断片を用いて、OXRDに特異結合する化合物をスクリーニングし得る。少なくとも1個から複数個の試験化合物を用いて、OXRDへの特異結合をスクリーニングし得る。試験化合物の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質 (例えば受容体) または小分子が挙げられる。

【0140】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドまたはその断片などのOXRDの天然リガンド、天然の基質、構造的または機能的な擬態性または自然結合パートナーに密接に関連している (Coligan, J.E. ら (1991) Current

Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様にして化合物は、OXRDが結合する天然受容体に関連し得るか或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体の断片に密接に関連し得る。いずれの場合にも、化合物は既知の技術を用いて合理的にデザインし得る。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングは、分泌タンパク質としてまたは細胞膜上のいずれかでOXRDを発現する好適な細胞の生成に関与している。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエまたは大腸菌からの細胞がある。OXRDを発現する細胞またはOXRDを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させ、OXRDまたは化合物のいずれかの結合、刺激または阻害を分析する。

【0141】

アッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに試験結合し得る。ここで、結合は、フルオロフォア、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出される。例えば、アッセイは少なくとも1つの試験化合物を溶液中でOXRDと結合するか固体支持体に固定するかのいずれかのステップ及びOXRDの化合物への結合を検出するステップを有し得る。或いはアッセイは、標識された競争相手の存在下で試験化合物の結合を検出または測定し得る。更にアッセイは、細胞遊離製剤、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実行することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定し得る。

【0142】

本発明またはその断片のOXRDを用いて、OXRDの活性を調整する化合物をスクリーニングし得る。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、或るいは部分的または逆アゴニスト等がある。一実施例においては、OXRDが少なくとも1つの試験化合物と結合しているような、OXRDの活性を許容する条件下でアッセイが実行され、試験化合物存在下でのOXRDの活性が試験化合物不存在下でのOXRDの活性と比較される。試験化合物存在下でのOXRDの活性の変化は、OXRDの活性を調整する化合物を示す。或いは、試験化合物はOXRDの活性に適した条件下で活性に適した条件下でFLFXHTを含むin vitroまたは細胞遊離系と結合し、アッセイが実行される。これらアッセイのいずれかにおいて、OXRDの活性を調整する試験化合物は間接的にそのようにすることができ、試験化合物と直接接触する必要がな

くなる。少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。

【0143】

別の実施例では、OXRDまたはその哺乳類同族体をコードするポリヌクレオチドは、胚幹(ES)細胞において相同的組換えを用いて動物モデル系内で「ノックアウト」される。このような技術は当技術分野において公知であり、ヒト疾病の動物モデルの生成に有用である(米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照)。例えば129/SvJ株化細胞等のマウスES細胞は、初期のマウス胚芽に由来し、培養液中で成長する。ES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子等のマーカー遺伝子により分裂させた対象遺伝子(gene of interest)を含むベクターを用いて形質転換される(neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292)。ベクターは、相同的組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に統合される。或いは、組織特異的または発達段階特異的な様式で対象遺伝子をノックアウトするCre-loxP系を用いて相同的組換えが発生する(Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)。形質転換されたES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系統から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠種雌に外科的に導入し、結果として得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを繁殖させてヘテロ接合性系統またはホモ接合性系統を生成する。このようにして産出した遺伝子導入動物は、潜在的治療薬または毒性薬剤を用いて試験し得る。

【0144】

OXRDをコードするポリヌクレオチドは、ヒト胚盤胞由来のES細胞における *in vitro* でも操作し得る。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞タイプを含む少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。この細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する(Thomson, J.A. ら (1998) Science 282:1145-1147)。

【0145】

OXRDをコードするポリヌクレオチドは、モデルヒト疾病への「ノックイン」ヒト化動物(ブタ)または遺伝子導入動物(マウスまたはラット)も生成し得る。ノックイン技術を用いて、OXRDをコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物

ES細胞に注入し、注入された配列は動物細胞ゲノムに統合する。形質転換された細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子導入子孫または近交系について研究し、強力な医薬品を用いて処理し、ヒトの疾病の治療に関する情報を得る。或いは、OXRDを過剰発現するべく例えばOXRDを乳内に分泌するなどして同系交配させた哺乳動物は、簡便なタンパク質の源としても役立つ（Jann e, J. ら (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4:55-74）。

【0146】

治療

化学的及び構造的類似性、例えば配列及びモチーフとの関連における類似性が、OXRDの領域とオキシドレダクターゼタンパク質間に存在する。更にOXRDの発現は、癌及び細胞増殖に密接に関連している。従ってOXRDは、細胞増殖異常、神経疾患、遺伝障害、平滑筋障害及び自己免疫/炎症障害において或る役割を果たすものと考えられる。OXRDの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、OXRDの発現または活性を低下させることが望ましい。また、OXRD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、OXRDの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0147】

従って、或る実施例において、OXRD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OXRD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として細胞増殖異常も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、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、子宮の癌等が含まれ、また神経疾患も含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン

障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病及びガストマン ストラウスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症 (cerebellar retinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また遺伝障害も含まれ、その中には副腎白質ジストロフィー、アルポート症候群、コロイデレミア、デュシェンヌ - ベッカー型筋ジストロフィー、ダウン症候群、嚢胞性線維症、慢性肉芽腫症、ゴーシェ病、ハンチントン舞踏病、マルファン症候群、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、頻繁骨形成不全 (pseudotumor cerebri)、レフサム症候群、網膜芽腫、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ウェルナー症候群、フォン ウィルブラント病、ウィルムス腫瘍、ツェルヴェーガー症候群、ペルオキシソームアシル CoAオキシダーゼ欠損症、ペルオキシソームチオラーゼ欠損症、ペルオキシソーム2官能性タンパク質欠乏症、ミトコンドリアカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ及びカルニチン欠損症、ミトコンドリア超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、イソ吉草酸血症、ミトコンドリア電子伝達フラボタンパク質及び電子伝達フラボタンパク質：：ユビキノンオキシドレダクターゼ欠損症、ミトコンドリア3官能性タンパク質欠乏症及びミトコンドリア短鎖3-ヒド

ロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ-CoA欠損症が含まれ、また平滑筋障害も含まれ、その中にはアンギナ、アナフィラキシー、不整脈、喘息、心血管ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、片頭痛及び褐色細胞腫と、心筋症、脳症、癲癇、カーンズ セイヤ症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性障害及び眼筋麻痺などを含む筋障害が含まれ、また自己免疫異常症/炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、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、自己免疫多発性内分泌腺障害症(APECED)、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性リンパ球減少症、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、心筋または心膜の炎症、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、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。

【0148】

別の実施例では、OXRD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して、限定するものではないが上記した疾患を含むOXRDの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0149】

更に別の実施例では、実質的に精製されたOXRDを含む医薬品成分を好適な医薬用担体と共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むOXRDの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0150】

更に別の実施例では、OXRDの活性を調節するアゴニストを患者に投与して、限

定するものではないが上記した疾患を含むOXRDの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0151】

更に別の実施例では、患者にOXRDのアンタゴニストを投与して、OXRDの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防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、上記した細胞増殖異常、神経疾患、遺伝障害、平滑筋障害及び自己免疫/炎症障害がある。一実施態様においては、アンタゴニストとして直接的に、或いはOXRDを発現する細胞または組織に薬剤を輸送するターゲティングまたは輸送機構として間接的にOXRDと特異結合する抗体を用いることができる。

【0152】

別の実施例では、OXRDをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むOXRDの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0153】

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、相補配列、またはベクターを、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。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来 of 医薬原理に従ってを選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上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す得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0154】

OXRDのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたOXRDを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、OXRDと特異結合するものを同定することが可能である。OXRDの抗体も、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造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、一本鎖抗体、Fab断片及びFab発現ライ

ブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

【0155】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む種々の宿主は、OXRD、またはOXRDの任意の断片またはオリゴペプチドであって免疫抗原性の特性を有するものを注入することによって免疫化することができる。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。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、ブルニックポリオール、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、ジニトロフェノール等の界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG（カルメット ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム パルヴムが特に好ましい。

【0156】

OXRDに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5のアミノ酸からなり、一般的には少なくとも約10のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。OXRDアミノ酸の短い伸長部は、別のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシニアンの配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0157】

OXRDに対するモノクローナル抗体は、抗体分子を産生する任意の技術を用いて、培地内の連続した細胞株によって作製し得る。限定するものではないがこのような技術には、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ある（Kohler, G. ら. (1975) Nature 256:495-497、Kozbor, D. ら (1985) .J. Immunol. Methods 81:31-42、Cote, R.J. ら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030、Cole, S.P. ら (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120等を参照）。

【0158】

更に、「キメラ抗体」を作製するために開発した技術、例えば好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを用いることが可能である (Morrison, S.L.ら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855、Neuberger, M.S.ら (1984) Nature 312:604-608、タケダ, S.ら (1985) Nature 314:452-454等を参照)。或いは、一本鎖抗体を産生するために説明された技術を適用し、本技術分野で知られている方法を用いて、OXRD特異性一本鎖抗体を産生し得る。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137等を参照)。

【0159】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R.ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837、Winter, G.ら (1991) Nature 349:293-299等を参照)。

【0160】

OXRDのための特異結合部位を有する抗体を産生することもできる。例えば、限定するものではないがこのような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')₂断片と、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を減らすことによって作製されるFab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルFab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる (Huse, W.D.ら (1989) Science 256:1275-1281等を参照)。

【0161】

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ことができる。確立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免疫放射線アッセイまたは競合結合アッセイに対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイ

ムノアッセイは通常、OXRDとその特異性抗体間の複合体形成の計測に關与している。2つの非干渉性OXRDエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、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、競合結合アッセイを利用してもよい(前出のPoundの文献)。

【0162】

ラジオイムノアッセイ技術と共に様々な方法、例えばスキャッチャード分析を用いて、OXRDに対する抗体の親和性を評価する。親和性は結合定数 K_a で表す。 K_a は、平衡状態においてOXRD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た値であると定義する。ポリクローナル抗体は多様なOXRDエピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、OXRD抗体の平均親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は特定のOXRDエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が約 $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの範囲にあるような高親和性抗体試薬は、OXRD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。 K_a 値が約 $10^6 \sim 10^7$ L/molの範囲にあるような低親和性抗体試薬は、OXRD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)。

【0163】

ポリクローナル抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、或る下流の適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/ml、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異抗体を含むポリクローナル抗体試薬は、OXRD抗体複合体を沈殿させる必要がある処理において通常用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。(前出のCattyの文献、同Coliganらの文献等を参照)。

【0164】

本発明の別の実施例では、OXRDをコードするポリヌクレオチド、OXRDの任意の断片または相補配列を治療目的で使用することができる。ある実施形態では、OXRD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にこれを使用し得る。具体的には、OXRDをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列で細胞を形質転換し得る。従って、相補的分子または断片は、OXRD活性を調節するため、または遺伝子機能を調節するために使用し得る。このような技術は既に本技術分野ではよく知られており、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を、OXRDをコードする配列のコード領域または制御領域に延在する様々な位置から設計することが可能である (Agrawal, S., ed. (1996) *Antisense Therapeutics*, Humana Press Inc., Totawa NJ等を参照)。

【0165】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である (Slater, J.E. ら (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475 及び Scanlon, K.J. ら (1995) 9(13):1288-1296.等を参照)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる (Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347等を参照)。その他の遺伝輸送機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他の系が含まれる (Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.ら (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C. ら (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.等を参照)。

【0166】

本発明の別の実施例では、OXRDをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症 (例えばX染色体鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M. ら (200

0) Science 288:669-672) により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損(Blaese, R.M. ら (1995) Science 270:475-480、Bordignon, C. ら (1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J. ら (1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G. ら (1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666、Crystal, R.G. ら. (1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア(thalassamia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損に起因する血友病(Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I.M. and Somia, N. (1997) Nature 389:239-242)を治療し、(ii)条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii)細胞内の寄生虫(例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschla, E. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、*Candida albicans*及び*Paracoccidioides brasiliensis*等の真菌寄生虫、並びに*Plasmodium falciparum*及び*Trypanosoma cruzi*等の原虫寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。OXRDの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を発生させる場合、形質導入した細胞の好適な集団からOXRDを発現することにより、遺伝子欠損に起因する症状の発現を緩和し得る。

【0167】

本発明の更なる実施例では、OXRDをコードする哺乳動物発現ベクターを作製し、これらのベクターを機械的手段によってOXRD欠損細胞に導入することによって、OXRDの欠損による疾患や異常症を治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i)個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii)弾道的金粒子の打ち込み(ballistic gold particle delivery)、(iii)リポソーム仲介形質移入、(iv)受容体仲介遺伝子導入、及び(v)DNAトランスポソンの使用(Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)がある。

【0168】

限定するものではないがOXRDの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、PC DNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA) 及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) がある。OXRDは、(i) 恒常的に活性化プロモーター (例えばサイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK) または アクチン遺伝子)、(ii) 誘導性プロモーター (例えばテトラサイクリン調節性プロモーター (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551、Gossen, M. ら (1995) Science 268:1766-1769、Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、市販のInvitrogen社のT-REXプラスミドに含まれる)、エクジソン誘導性プロモーター (Invitrogen社のプラスミドPVGRXR及びPINDから得られる)、FK506 / ラパマイシン誘導性プロモーターまたはRU486 / ミフェプリストーン誘導性プロモーター (前出のRossi, F.M.V. and H.M. Blau)、または (iii) 正常個体由来の、OXRDをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いて、発現させることができる。

【0169】

市販のリポソーム形質転換キット (例えばInvitrogen社のPerFect Lipid Transfection Kit) を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法 (Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467) 若しくは電気穿孔法 (Neumann, B. ら (1982) EMBO J. 1:841-845) を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳動物の形質移入プロトコルの修飾が必要である。

【0170】

本発明の別の実施例では、OXRDの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i) レトロウイルス末端反復配列 (LTR) プロモーターまたは独立プロモーターの制御下でOXRDをコードするポリヌクレオチドと、(ii) 好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii) 追加レトロウイルス・シス作用性RNA配

列及び効率的なベクターの増殖に必要なコード配列を伴うRev応答性エレメント (RRE) とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター (例えばPFB及びPFBNEO) はStratagene社から市販されており、刊行データ (Riviere, I. ら. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6733-6737) に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞系 (VPCL) において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVg等の乱交雑エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. ら (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. ら (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. ら (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. ら (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号 ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") は、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法について開示しており、これを引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団 (例えばCD4⁺ T細胞) の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. ら. (1997) J. Virol. 71:7020-7029、Bauer, G. ら (1997) Blood 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716、Ranga, U. ら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0171】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の輸送系を用いて、OXRDの発現に関連する1若しくは複数の遺伝子異常を有するような細胞にOXRDをコードするポリヌクレオチドを輸送する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島内に導入するために可変性であることが証明された (Csete, M.E. ら. (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与さ

れた米国特許第5,707,618号 ("Adenovirus vectors for gene therapy") に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. ら (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544 及び Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0172】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の輸送系を用いて、OXRDの発現に関連する1若しくは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にOXRDをコードするポリヌクレオチドを輸送する。HSVが向性を有するような中枢神経系の細胞にOXRDを導入する際には、単純ヘルペスウイルス (HSV) 系のベクターの使用は特に役立つ。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス (HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に輸送するために用いられてきた (Liu, X. ら (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 ("Herpes simplex virus swains for gene transfer") に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. ら (1999) *J. Virol.* 73:519-532 及び Xu, H. ら (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの継代、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【0173】

別法では、ウイルス (正の一本鎖RNAウイルス) ベクターを用いてOXRDをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に輸送する。プロトタイプのウイルスで

あるセムリキ森林熱ウイルス (Semliki Forest Virus, SFV) の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターがSFVゲノムに基づいていることが分かった (Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469)。

ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、酵素活性 (例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ) を有するウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、OXRDに対するコード配列をカプシドコード領域の ウイルスゲノムに導入することにより、ベクター導入細胞において多数のOXRDコードRNAが産生され、高レベルのOXRDが合成される。通常は ウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス (SIN) の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞 (BHK-21) の持続的な感染を確立する能力は、 ウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している (Dryga, S.A. ら. (1997) *Virology* 228 :74-83)。 ウイルスの宿主の範囲が広いことにより、様々な細胞タイプへのOXRDの導入が可能になる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。

ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、 ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及び ウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【0174】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約 - 10 と約 + 10 の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、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開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある (Gee, J.E. ら (1994) in: Huber, B.E.and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, pp.163-177等を参照)。相補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の翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0175】

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的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に参与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、OXRD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。

【0176】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴に対して切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15～20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。

【0177】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相ホスホラミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、HRIPをコードするDNA配列の*in vitro*及び*in vivo*転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に組み入れることが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA産物を、細胞系、細胞または組織内に導入することができる。

【0178】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオネートまたは2' Oメチルを使用し

たりすることが含まれる。この概念は、PNAの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内在性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、及びウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - 及び同様の修飾をしたものに加えて、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイプトシン (wybutosine) 等を包含することによる。

【0179】

本発明の追加実施例は、OXRDをコードするポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を変異し得る。従って、OXRDの発現または活性の増加に関連する疾病の治療においては、OXRDをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有益であり、OXRDの発現または活性の低下に関連する疾病の治療においては、OXRDをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有益であり得る。

【0180】

特異ポリヌクレオチドの変異発現における有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは専売の、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。OXRDをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝され、このように得られる

。サンプルには例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、細胞遊離系または再構成生化学系があり得る。OXRDをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、OXRDをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1若しくは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えばSchizosaccharomyces pombe遺伝子発現系 (Atkins, D. ら (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. ら (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. ら (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性のためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruce, T.W. ら (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. ら (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0181】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、in vivo、in vitro及びex vivoの使用に対して同程度に適している。ex vivo治療の場合、ベクターを患者から採取した肝細胞内に導入し、クローニング増殖して同一患者に自家移植で戻すことができる。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輸送は、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる。(Goldman, C.K. ら (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466.等を参照。)

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル等の哺乳動物を含めて治療が必要な全ての対象に適用できる。

【0182】

本発明の追加実施例は、通常薬剤として許容できる賦形剤で処方される活性成分を有する医薬品成分の投与に関連する。賦形剤には例えば、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な処方が通常知られており、詳細はRemington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA)の最新版に記載されている。このような医薬品成分は、OXRD、OXRDに対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはOXRDインヒビターから構成し得る。

【0183】

本発明に用いられる医薬品成分は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【0184】

肺から投与する医薬品成分は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような医薬品成分は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば伝統的な低分子重量有機薬）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送は当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺輸送が最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした（Patton, J. S. ら, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射なしに投与する点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【0185】

本発明での使用に適した医薬品成分には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する成分が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

【0186】

医薬品成分の特殊形状は、OXRDまたはその断片を含む高分子を直接細胞内輸送するために調製される。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内輸送を促進し得る。或いは、OXRDまたはその断片を

HIV Tat-1タンパク質から陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. ら (1999) Science 285:1569-1572)。

【0187】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。

【0188】

治療上の有効投与量は、症状や容態を回復させるような活性成分量を参考にする。そのような活性成分の例としては、OXRDまたはその断片、OXRDの抗体、OXRDのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターがある。薬用有効度及び毒性は、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、例えばED₅₀ (集団の50%の医薬的有効量) またはLD₅₀ (集団の50%の致死量) を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD₅₀ / ED₅₀ 比として表すことができる。高い治療指数を示すような医薬品成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与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投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀ を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【0189】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長

い医薬品成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

【0190】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び輸送方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常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に対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの輸送は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなる。

【0191】

診断

別の実施例では、OXRDの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはOXRDやOXRDのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤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おいて、OXRDを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。OXRDの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてOXRDを検出する方法が含まれる。抗体は、修飾して或いは修飾しないで使用し、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し得る。多様なレポーター分子が本技術分野で知られており、それらを用いることができる。幾つかのレポーター分子については上記した。

【0192】

OXRDを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が本技術分野において知られており、OXRD発現の修正レベル或いは異常レベルを診断する基準を提供する。複合体の形成に適した条件下でヒト対象等の正常な哺乳動物対象から採取した体液または細胞とOXRDに対する抗体とを結合させることにより、OXRD発現の正常値または標準値が決定される。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。対象内で発現したOXRDの量、制御、検体からの病変サンプルを標準値と比較する。標準値と対象との偏差が疾患を診断するパラメ

ータとなる。

【0193】

別の実施例によれば、OXRDをコードするポリヌクレオチドを診断目的に用いることもできる。用いられることができ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RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。ポリヌクレオチドは、検体におけるOXRDの発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現の検出及び定量に用いることができる。診断アッセイは、OXRDの不在、存在及び過剰発現を測定するために、そして治療インターベンション中にOXRDレベルの調製をモニターするために用いることができる。

【0194】

ある実施形態では、OXRDをコードする核酸配列を同定するために、OXRDまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブとのハイブリダイゼーションを用いることができる。プローブが同定するのはOXRD、突然変異体または関連配列をコードするような、天然に存在する配列のみであるか否かは、プローブの特異性及びハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーによって決定されることになる。ここで、プローブの特異性とは、プローブが高特異領域（例えば5'調節領域）からなるのか、低特異領域（例えば保存されたモチーフ）からなるのかということである。

【0195】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はOXRDをコードする任意の配列と少なくとも50%の相同性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAとすることができ、配列番号56乃至110の配列、或いはOXRD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。

【0196】

OXRDをコードするDNAに対する特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製する方法には、OXRDまたはOXRD誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、mRNAプローブを作製するためのベクターにクローニングする方法が含まれる。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、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得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、 ^{32}P または ^{35}S 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

【0197】

OXRDをコードするポリヌクレオチド配列は、OXRDの発現に係る疾患の診断の為に用い得る。限定するものではないがこのような疾患の例として細胞増殖異常も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、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、子宮の癌等が含まれ、また神経疾患も含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病及びガストマン ストラウスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と

、季節型感情障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また遺伝障害も含まれ、その中には副腎白質ジストロフィー、アルポート症候群、コロイデレミア、デュシェンヌ - ベッカー型筋ジストロフィー、ダウン症候群、嚢胞性線維症、慢性肉芽腫症、ゴーシェ病、ハンチントン舞踏病、マルファン症候群、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、頻繁骨形成不全 (pseudospondylosis)、レフサム症候群、網膜芽腫、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ウェルナー症候群、フォン ウィルブランド病、ウィルムス腫瘍、ツェルヴェーガー症候群、ペルオキシソームアシルCoAオキシダーゼ欠損症、ペルオキシソームチオラーゼ欠損症、ペルオキシソーム2官能性タンパク質欠乏症、ミトコンドリアカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ及びカルニチン欠損症、ミトコンドリア超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、イソ吉草酸血症、ミトコンドリア電子伝達フラボタンパク質及び電子伝達フラボタンパク質：：ユビキノンオキシドレダクターゼ欠損症、ミトコンドリア3官能性タンパク質欠乏症及びミトコンドリア短鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ-CoA欠損症が含まれ、また平滑筋障害も含まれ、その中にはアンギナ、アナフィラキシー、不整脈、喘息、心血管ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、片頭痛及び褐色細胞腫と、心筋症、脳症、癲癇、カーンズ セイヤ症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性障害及び眼筋麻痺などを含む筋障害が含まれ、また自己免疫異常症 / 炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群 (AIDS)、アジソン病、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、自己免疫多発性内分泌腺障害症 (APECED)、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、心筋または心膜の炎症、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、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。OXRDをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットプロット法やその他の膜ベースの技術と、PCR法と、ディップスティック(dipstick)法、ピン及びマルチフォーマットELISA様アッセイと、変異OXRDの発現を検出するために患者から採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおいて使用し得る。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【0198】

或る形態では、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、OXRDをコードするヌクレオチド配列が有用であり得る。OXRDをコードするヌクレオチド配列は標準法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプルのシグナル量が制御サンプルと比べて著しく変化している場合は、サンプル内のOXRDをコードするヌクレオチド配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者の治療をモニターするために用いることもできる。

【0199】

OXRDの発現に関連する疾患の診断基準を提供するために、発現のための正常あるいは標準概要を確立する。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下で、動物或いはヒトの正常な対象から抽出した体液或いは細胞を、OXRDをコードする配列またはその断片と結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対

象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【0200】

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、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得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【0201】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。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または積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【0202】

OXRDをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、PCRの利用に關与し得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いは*in vitro*で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはOXRDをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはOXRDをコードするポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチドの断片を含み、最適条件下で特定の遺伝子や条件を識別するべく利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0203】

或る態様において、OXRDをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて単一ヌクレオチド多形性（SNP）を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、制限酵素切断

法 (SSCP) 及び蛍光SSCP (fSSCP) がある。SSCPでは、OXRDをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を用いたDNAの増幅を行う。DNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPIは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などのハイスループット機器でアンプリマー (amplimer) の検出が可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP, isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々の重畳するDNA断片の配列を比較することにより、多形性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調整及び統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えばハイスループットMASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0204】

OXRDの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification) 及び標準曲線から得た結果の補間もある (Melby, P.C.ら (1993) J. Immunol. Methods, 159:235-244、Duplaa, C.ら (1993) Anal. Biochem. 212:229-236等を参照)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または非色応答によって定量が迅速になるようなハイスループットフォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【0205】

更に別の実施例では、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ことができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、米国特許第5,840,484号のSei Ihamer, J.J. らの"Comparative Gene Transcrip

t Analysis"に記載されており、この引用を以って本明細書の一部となす。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多形性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0206】

別の実施例では、OXRDに特異的な抗体、OXRDまたはその断片をマイクロアレイ上で要素として用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質 - タンパク質相互作用、薬剤 - 標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

【0207】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する (Brennan, T.M. ら (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler らの (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D. らの (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. ら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. らの (1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。該文献は、特別に引用することを以って本明細書の一部となす。

【0208】

本発明の別の実施例では、天然のゲノム配列をマッピングする際に有効なハイブリダイゼーションプローブを産出するため、OXRDをコードする核酸配列を用いることが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることが

でき、或る例では、コード配列全体で非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、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産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. ら (1997) *Nat Genet.* 15:345-355、Price, C.M. (1993) *Blood Rev.* 7:127-134、Trask, B.J. (1991) *Trends Genet.* 7:149-154等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を発生させ得る。

【0209】

蛍光原位ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (前出のHeinz-Ulrich, ら (1995) in Meyers, pp. 965-968.等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上のOXRD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は、その疾患に関係するDNAの領域を画定するのに役立つものであり、従って更に位置クローニングする試みとなり得る。

【0210】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなどの別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を調査する研究者にとって価値がある。疾患または症候群が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対するいかなるマッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる (Gatti, R.A. ら (198

8) Nature 336:577-580等を参照)。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0211】

本発明の別の実施例では、種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、OXRD、OXRDの触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになる。OXRDとテストされる薬剤との結合複合の形成は計測できる。

【0212】

別の薬剤スクリーニング方法は、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を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる (Geysen,らの (1984) PCT出願番号 W084/03564等を参照)。この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。試験用化合物は、OXRD或いはその断片と反応させ、洗浄する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したOXRDを検出する。精製したOXRDはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【0213】

別の実施例では、競合薬スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、OXRDを結合することができる中和抗体が、OXRDを結合するための試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体が、1若しくは数個の抗原決定因子をOXRDと共有するペプチドの存在を検出する。

【0214】

別の実施例では、新規技術が現在知られているヌクレオチド配列の特性 (限定するものではないがトリプレット遺伝暗号及び特異的塩基対の相互作用等を含む) に依存するのであれば、依然として発展すべきいかなる分子生物学技術におい

ても、OXRDをコードするヌクレオチド配列を用いることができる。

【0215】

更に詳細説明をしなくとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0216】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物は、特に言及することをもって本明細書の一部となす。

【0217】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/135,049号及び同第60/136,740号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【0218】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

RNAは、Clontech社から購入し、或いは表4に列記した組織から単離した。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した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの单相溶液であるTRIZOL (Life Technologies) 等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムにおいて遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0219】

RNAの純度を高めるため、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、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Valencia CA) または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、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キッ

ト (Ambion, Austin TX) を用いて組織溶解物からRNAを直接単離した。

【0220】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法を用いて、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSCRIPトプラスミドシステム (Life Technologies) を用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した。(前出のAusubel, 1997, unit 5.1-6.6等を参照。) 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に連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ(300~1000 bp) 選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは、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連結反応させた。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPトプラスミド (Stratagene)、pSPORT1プラスミド (Life Technologies) またはpINCY (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA) 等である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0221】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いたin vivo切除によって、或いは細胞溶解によって、プラスミドを宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミドキットの中から少なくとも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せずに、4で保管した。

【0222】

別法では、ハイスルーブットフォーマットにおいて直接結合PCR法を用い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は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、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)を用いて蛍光分析的に定量した。

【0223】

3 シークエンシング及び分析

cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いはハイスルーブット装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー(Perkin-Elmer)またはPTC-200 サーマルサイクラー(MJ Research)を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併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit(Perkin-Elmer)に与えられた試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Molecular Dynamics)か、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シークエンシングシステム(Perkin-Elmer)か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法(前出のAusubel, 1997, unit 7.7に概説)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例6に記載した方法で配列を伸長させた。

【0224】

cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、当業者によく知られたアルゴリズムを利用するソフトウェアの組合せを用いて構築し、解析した。利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略、適用可能な説明、引用文献、閾値パラ

メータを表5に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表5の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な引用文献であり、全ての文献はそっくりそのまま引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す(スコアが高ければ高いほど2配列間の相同性が高くなる)。配列の解析は、MACDNASIS PROソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA)及びLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて行った。

【0225】

ポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリA配列を除去することにより、またあいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング、及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、BLAST、FASTA及びBLIMPSに基づくプログラムを用いて、プログラム中の注釈を得るべく、公共のデータベース、例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAMの選択に対する配列を問い合わせた。配列はPhred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列に構築し、GenMark、BLAST及びFASTAに基づくプログラムを用いてオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長アミノ酸配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、その後、GenBankデータベース(上記)、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びProsite等のデータベース、PFAM等のHidden Markov Model (HMM) ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長配列を分析した。HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を解析する確率的アプローチである(Eddy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365等を参照)。

【0226】

完全長ポリヌクレオチド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、配列番号9乃至16からのポリヌクレオチド配列の断片を同定するた

めにも使用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅に有用な約20～約4000のヌクレオチドの断片は、上記「発明」の項で説明した。

【0227】

4 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験技術であり、標識されたヌクレオチド配列の、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜へのハイブリダイゼーションに関与している。(前出のSambrook, 7章、同Ausubel. F.M. ら, 4章及び16章等を参照。)

BLASTに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Pharmaceuticals) 等のヌクレオチドデータベースにおいて同一または関連分子を検索する。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも断然速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準はプロダクトスコアであり、次式で定義される。

【0228】

【数1】

$$\frac{(\text{最大 BLAST スコア} \times \text{配列一致率})}{5 \times \text{最小 (長さ(配列1), 長さ(配列2))}}$$

プロダクトスコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。プロダクトスコアは、0～100の規準化された値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアリングセグメント対(HSP)に一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不適性塩基対に-4を割り当てることにより、BLASTスコアを計算する。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより離隔され得る)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアの塩基対を用いてプロダクトスコアを計算する。プロダクトスコアは、断片的重畳とBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えばプロダクトスコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致す

る場合のみ得られる。プロダクトスコア70は、一端が100%一致し、70%重畳しているか、他端が88%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。プロダクトスコア50は、一端が100%一致し、50%重畳しているか、他端が79%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。

【0229】

ノーザン分析の結果は、OXRDをコードする転写物が作出されたライブラリの分布パーセンテージとして報告される。分析は、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリのカテゴリー分類に關与している。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、生殖及び泌尿器がある。疾患/病状のカテゴリーには、癌、炎症、外傷、細胞増殖、神経、貯留(pooled)が含まれる。カテゴリー毎に目的の配列を発現するライブラリ数を数え、それを全カテゴリーのライブラリ数で除した。組織特異発現及び疾患/病状特異発現のパーセント値を表3に示す。

【0230】

5 ポリヌクレオチドをコードするOXRDの染色体マッピング

配列番号9乃至15を配列するために用いたcDNA配列は、BLAST及びその他のスミス ウォーターマンアルゴリズムのインプリメンテーションを用いて、Incyte LIFESEQのデータベース及びパブリックドメインのデータベースから得た配列と比較した。配列番号9乃至16に適合するデータベースから得た配列は、Phrap(表5)等のアセンブリアルゴリズムを用いて隣接する配列及びオーバーラップする配列のクラスタに配列した。スタンフォード・ヒトゲノムセンター(SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所(WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。配列番号10及び配列番号14の遺伝地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として発明の項に記載されている。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に關連して測定する。(センチ

モルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。) cM距離は、配列が各クラスター内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなGenethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。指示された間隔内に位置する公的な配列及びIncyte配列に関連する疾病についても、「発明」の項に報告されている。

【0231】

6 ポリヌクレオチドをコードするOXRDの伸長

配列番号9乃至16の完全長の核酸配列は、完全長分子の適切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該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0232】

配列を伸長するために、選択されたヒトcDNAライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッドセットを設計した。

【0233】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液には、DNA鋳型、各プライマー200 nmolと、 Mg^{2+} 、 $(NH_4)_2SO_4$ 及び β -メルカプトエタノールを含む反応バッファと、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) と、ELONGASE酵素 (Life Technologies) と、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) が含まれていた。プライマ

ー対PCI A、PCI Bに対して用いたパラメータは次の通りである。

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、4を20回繰り返す

ステップ6： 68 で5分間

ステップ7： 4 で保存

プライマー対T7、SK+に対しては、上記パラメータに代えて以下のパラメータを用いた。

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、4を20回繰り返す

ステップ6： 68 で5分間

ステップ7： 4 で保存

1X TEに溶解したPICOGREEN定量試薬(0.25%(v/v) PICOGREEN、Molecular Probes, Eugene OR) 100 μ lと、希釈していないPCR産物0.5 μ lとを不透明な蛍光光度計プレート(Coming Costar, Acton MA)の各穴に分配し、DNAを試薬と結合可能なようにさせることによって各穴内のDNA濃度の測定を行った。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをFluoroskan II (Lab systems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合物のアリコート5~10 μ lを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

【0234】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)への再連結反

応前に音波処理またはせん断した。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で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene)で処理して制限部位の張出部 (overhang)を満たし、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抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニーを選択してLB/2x carb液体培地の384穴プレート内において37℃で一晩培養した。

【0235】

細胞を溶解し、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PCRによってDNAを増幅した。その際用いたパラメータは次の通りである。

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、4を29回繰り返す

ステップ6 : 72℃で5分間

ステップ7 : 4℃で保存

DNAは、上記のPICOGREEN試薬 (Molecular Probes)によって定量した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC energy transfer sequencing primer及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer)を用いてシーケンシングした。

【0236】

同様に、上記手順と、伸長のために設計されたオリゴヌクレオチドと、適切なゲノムライブラリを用いて、5'調節配列を得るべく、配列番号9乃至16のヌ

クレオチド配列が用いられる。

【0237】

7 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

配列番号9乃至16から得たハイブリダイゼーションプローブを利用して、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNA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載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[^{-32}P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 μCi と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を結合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25 超細繊維分子サイズ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。

Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba1またはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノム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、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0238】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40 で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1 \times 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に一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0239】

8 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの連鎖または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷 (インクジェット印刷、前出のBalteschweiler等を参照)、

機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基質は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである (Schena (1999). 前出)。推奨する基質には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線の、化学的または機械的結合手順を用いて基質の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る (Schena, M. ら (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. ら (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31. を参照)。

【0240】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、またはその断片またはオリゴマーは、マイクロアレイのエレメントを構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、レーザGENEソフトウェア (DNASTAR) 等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメントは、生物学的サンプル中でポリヌクレオチドを用いてハイブリダイズされる。生物学的サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに接合される。ハイブリダイゼーション後、生物学的サンプルからハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおいてハイブリダイゼーションを検出する。或いは、レーザ脱着及び質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の度合及び相対存在度は、算定し得る。一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

【0241】

組織または細胞サンプルの準備

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルは、MMLV逆転写酵素、0.05 pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー (21mer)、1 ×

第1鎖バッファ、0.03 unit/ μ lのRNアーゼ阻害因子、500 μ MのdATP、500 μ MのdGTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ MのdCTP-Cy3 (BDS) またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用いてポリ(A)⁺RNA含有の25体積ml内で行う。特異制御ポリ(A)⁺RNAは、370 で2時間インキュベートした後、in vitro転写により非コード酵母ゲノムDNAから合成する。各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、850 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを減成する。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン (1 mg/ml) を用いて析出させたエタノール、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールである。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて乾燥して仕上げ、14 μ lの5 \times SSC / 0.2% SDS中で再懸濁する。

【0242】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを生成する。各アレイエレメントは、クローン化cDNAインサートによりベクター含有細菌性細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRで1~2 ngの初期量から5 μ gより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製される。

【0243】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、処理中及び処理後に大量の蒸留水洗液を用いて0.1%のSDS及びアセトン中で超音波により洗浄する。スライドガラスは、4%フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、蒸留水中で広範囲にわたって洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティング

する。コーティングしたスライドガラスは、110 の天火で硬化させる。

【0244】

米国特許第5,807,522号で説明されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。該特許は、引用を以って本明細書の一部となす。平均濃度が100 ng/ μ lのアレイエレメントDNA 1 μ lを高速ロボット装置により開口キャピラリープリントエレメントに充填する。装置はここで、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルをデポジットする。

【0245】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV架橋剤 (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2% SDSで1度洗浄し、蒸留水で3度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) 中の0.2% カゼイン中において60 で30分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように0.2% SDS及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

【0246】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応は、5 \times SSC, 0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液中のCy3及びCy5標識したcDNA合成生成物を各0.2 μ g含む9 μ lのサンプル混合体を有する。サンプル混合体は、65 まで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して1.8 cm^2 のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水チェンバーに移行させる。チェンバーのコーナーに140 μ lの5 \times SSCを加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 で約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中 (1 \times SSC, 0.1% SDS) において45 で10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中 (0.1 \times SSC) において45 で10分間各々3度洗浄して乾燥させる。

【0247】

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Cy3の励起のためには48

8 nm、Cy3の励起のためには632 nmでスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10 Wレーザ (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20×顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、アレイ上に励起レーザ光を集中させる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御X-Yステージに置き、対物レンズを通過してラスタスキャンする。本実施例で用いた1.8 cm×1.8 cmのアレイは、20 μmの解像度でスキャンした。

【0248】

2つの異なるスキャンのうち、混合ガスマルチラインレーザは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、2つの蛍光体に依りて波長に基づき2つの光電子増倍管検出器 (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) に分割される。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルターを用いて、シグナルをフィルタリングする。用いる蛍光体の最大発光は、Cy3では565 nm、Cy5では650 nmである。装置は両方の蛍光体からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルターを用いて各アレイを通常2度スキャンし、蛍光体1つにつき1度スキャンする。

【0249】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNA制御種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイジング種の重量比1:100,000に相関させる。異なる源 (例えば試験及び制御細胞を表す) からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光体で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、2つの蛍光体を有する較正cDNAの標識サンプルにより較正し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加える。

【0250】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル (A/D) 変換ボード (Analog Devices, Inc., Norwood MA) を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、青色 (低シグナル) から赤色 (高シグナル) までの擬似カラー範囲へのリ

ニア20色変換を用いてシグナル強度がマッピングされたようなイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なる蛍光体を同時に励起及び測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、データは先ず蛍光体と蛍光体の間の光学磁気プリンティング（発光スペクトルの重畳に起因する）に集められる。

【0251】

グリッドは蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム（Incyte）である。

【0252】

9 相補的ポリヌクレオチド

OXRD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配列は、天然のOXRDの発現を検出し、低下させ、または阻害するために用いられる。約15～30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、これより小さな或いは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。Oligo4.0ソフトウェア（National Biosciences）、及びOXRDをコードする配列を用いて、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、OXRDをコードする転写物にリボソームが結合しないように相補的オリゴヌクレオチドをデザインする。

【0253】

1.0 OXRDの発現

OXRDの発現及び精製は、細菌またはウイルスをベースにした発現系を用いて行うことができる。細菌でOXRDを発現するために、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オペレーター調節エレメントに関連する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、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等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 β -Dチオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導されるとOXRDを発現する。真核細胞でのOXRDの発現は、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) を昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に感染させて行う。バキュロウイルスの可欠ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え、或いは転移プラスミドの仲介に關与する細菌仲介遺伝子転移のどちらかによって、OXRD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ー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。(Engelhard, E. K.ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V.ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

【0254】

殆どの発現系では、融合タンパク質としてOXRDを合成するのに例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) またはペプチドエピトープ標識、例えばFLAGや6-Hisを用いる。これらを用いることにより、未精製細胞溶解物から組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を迅速に1ステップで行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GSTの部分を特定の開発部位においてOXRDからタンパク質分解的に切断することが可能である。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いて免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したOXRDを直接用いて実施例11及び15のアクセシを行うことができる。

【0255】

1.1 OXRD活性の実証

ここでは例示の目的で、OXRDの短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ活性を実証するアッセイについて説明する。事実上同一の方法が、基質及び電子受容体の好適な置換を伴う別のタイプのオキシドレダクターゼに用いられる。短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ活性は、基質の存在下でのNADPHからNADPへの酸化により実証される (Kunau, W.H. and P. Dommès (1978) Eur. J. Biochem. 9 1:533-544)。限定するものではないが基質には、オール-トランス-レチナルデヒド及びシス-4-ジエノイル-CoAがある。OXRDは、37℃で10分間、60 μMリン酸カリウム (pH 7.4)、125 μMのNADPH及び0.2 μMのCoA (補酵素A) 中でプレインキュベートする。反応は、好適な基質 (12.5 ~ 150 pM 最終濃度) の追加により開始する。NADPHからNADPへの酸化に起因する340 nmでの反応不存在下の変化は、23℃で分光光度計を用いて測定する。OXRD活性の単位は、1分当たりのNADP形成量 (μモル) で表す。負の対照として、反応欠乏OXRDを用いる。

【0256】

或いは、OXRDの酸化性及び還元性CoAデヒドロゲナーゼ活性は、100 μgのOXRD、基質として200 pmolの[6,7-³H] 17 エストラジオール (または還元の場合には[6,7-³H]エストロン) アセチル-CoA及び補助因子として1 μMのNAD⁺を含有するようなpH 7.8 (pH 6.6) の100 mMのリン酸緩衝液を用いて測定する。反応の産物は、アセトニトリル：水の移動相が1：1 (v/v) であるような逆相 (C18) 高速液体クロマトグラフィーにより分離する (Adamski J. ら (1989) Acta Endocrinol. 121:161-167)。アシルCoAデヒドロゲナーゼ活性は、紫外分光光度計を用いて340 nmでNAD⁺形成をモニターすることにより測定する。ミカエリス-メンテンのKm値は、対応する反応の初速度 (基質の15%以下の転換) から推定する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタンブロット法は、Adamski, J. ら (1992, Biochem. J. 288:375-381) に記載されているように実行する。

【0257】

1.2 機能的アッセイ

OXRD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OXRD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。選り抜きのベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR 3.1プラスミド (Invitrogen) 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有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に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、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。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。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (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。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるDNA染色によって計測される核DNA内容物の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異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におけるタンパク質の発現の変化、及び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ある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY.に記述がある。

【0258】

遺伝子発現におけるOXRDの影響は、OXRDをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのいずれ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) の保存領域と結合する。形質転換細胞と非形質転換細胞は、ヒトIgGまたはCD64に対する抗体 (DYNAL, Lake Success, NY) で覆われた磁気ビ

ーズを用いて有効に分離することができる。mRNAは、本技術分野で公知の方法で細胞から精製することができる。OXRDその他の目的の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析或いはマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0259】

1.3 OXRD特異抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE ; Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182:488-495等を参照) または他の精製技術を用いて実質上精製されたOXRDを用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産出する。

【0260】

或いは、レーザGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてOXRDアミノ酸配列を解析し、免疫抗原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。適切なエピトープ、例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域にあるエピトープの選択については、当分野で公知である (前出のAusubel, 1995, 11章等を参照)。

【0261】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ (Perkin-Elmer) を用いて合成し、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) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫抗原性を高める (前出のAusubel, 1995 等を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-KLM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OXRD活性を検査するには、ペプチドまたはOXRDを基質に結合し、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で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0262】

1.4 特異抗体を用いた天然のOXRDの精製

天然または組換えOXRDを、OXRD特異抗体を用いた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、抗OXRD抗

体を活性化クロマトグラフィー用樹脂、例えばCNBr活性化セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) と共有結合させることにより構築する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【0263】

OXRDを含む培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、OXRDを優先的に吸着する条件下 (例えば洗浄剤が存在する高イオン強度バッファ) でカラムを洗浄する。抗体とOXRDの結合を破壊する条件 (例えばpH 2 ~ 3のバッファ、或いは尿素またはチオシアン酸塩イオン等の高濃度のカオトロップ剤) でカラムを溶出させ、OXRDを回収する。

【0264】

1.5 OXRDと相互作用する分子の同定

OXRDまたは生物学的に活性であるOXRD断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する。(Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539等を参照。) マルチウェルプレートの穴の中に予め配列しておいた候補分子を、標識したOXRDと共にインキュベートして洗浄し、標識したOXRD複合体を有する全ての穴をアッセイする。OXRD濃度を変えて得たデータを用いて、候補分子とのOXRDの数、親和性及び会合の値を計算する。

【0265】

或いは、OXRDと相互作用する分子は、Fields, S. 及び O. Song (1989, Nature 340:245-246) に記載されているような酵母2ハイブリッドシステムを用いて分析するか、またはMATCHMAKERシステム (Clontech) 等の2ハイブリッドシステムに基づく市販のキットを用いて分析する。

【0266】

OXRDはまた、ハイスループット方法で酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2大ライブラリにコードされる遺伝子間の全ての相互作用を決定することができる (Nandabalan, K. ら (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0267】

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い得る。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、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、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【0268】

(表の簡単な説明)

表1は、OXRDをコードする完全長の配列をアセンブルするために用いた、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 (クローンID)、cDNAライブラリ及びcDNA断片を示す。

【0269】

表2は、潜在モチーフと、相同配列と、OXRD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とを含む各ポリペプチド配列の特徴を示す。

【0270】

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、異常症または症状と、各DNAのクローニング先のベクターとを示す。

【0271】

表4は、cDNAライブラリの作製に用いた組織を示す。OXRDをコードするcDNAクローンはここから単離した。

【0272】

表5は、OXRDの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

【表1】

表1

タンパク質 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	9	266711	HNT2NOT01	266711H1 (HNT2NOT01), 2864096H1 (KIDNNOT20), 3000826H1 (TLYMNOT06), 3331978F6 (BRAIFET01), 4318691F6 (BRADDIT02), 4706139H1 (BRAIFET02), 5259849H1 (KIDETXS02)
2	10	1666030	BRSTNOT09	850649T1 (NGANNOT01), 1236418F1 (LUNGFET03), 1318607H1 (BLADNOT04), 1695963F6 (COLNNOT23), 2598924F6 (UTRSNOT10)
3	11	2607950	LJUNGTUT07	462982F1 (LATRNOT01), 721959H1 (SYNOAT01), 1482050H1 (CORPNOT02), 2312835R6 (NGANNOT01), 2607950F6 (LUNGTUT07), 2607950H1 (LUNGTUT07)
4	12	2949481	KIDNFET01	170949H1 (BMARNOR02), 2949481F6 (KIDNFET01), 2949481H1 (KIDNFET01), 2949481T6 (KIDNFET01), 3125669H1 (LUNGTUT12)
5	13	3170236	BRSTNOT18	089691T6 (LIVRNOT01), 1254535F6 (LUNGFET03), 2612207H1 (BRSTTUT13), 3170236F6 (BRSTNOT18), 3170236H1 (BRSTNOT18)
6	14	5216587	BRSTNOT35	817450R6 (OVARTUT01), 1454912F6 (PENTTUT01), 1550848R6 (PROSNOT06), 1550848T6 (PROSNOT06), 2789556F6 (COLNTUT16), 2789556T6 (COLNTUT16), 3327895F6 (HEAONOT04), 5216587H1 (BRSTNOT35), 5273501H1 (OVARDIN02)
7	15	5643770	UTRSTMR01	2488020F6 (LUNGNOT22), 5273353H1 (OVARDIN02), 5643770H1 (UTRSTMR01)
8	16	3580359	293TF3T01	3580359H1 (293TF3T01), 2780720H1 (OVARTUT03), 3083057F6 (BRAIUNT01), 4383927H1 (BRAVUTT02), 258773H1 (HNT2RAT01), 3295636H1 (TLYJJINT01), 2867727H1 (KIDNNOT20), 3589378H1 (293TF5T01), 2052367H1 (LIVRFET02), 3559101H1 (LUNGNOT31), 2806946F6 (BLADTUT08)

【表2】

表2-1

SEQ ID NO:	アミノ酸残基	リン酸化可能部位	グリコシル化可能部位	サイン(signature)配列、モチーフ、ドメイン	相同配列	分析方法
1	244	S3 T51 S94 S235 S61 T114 T193 Y168			男性不妊症タンパク質2 (脂肪酸アシルシグターゼ) (アブラナ) g1491638	BLAST MOTIFS
2	429	S84 S119 S152 T175 S185 S191 T349 S425 S37 T196 T259 T327 T351 Y147 Y371	N171 N215	膜貫通ドメイン: I287-P313	FAD依存型 オキシドレダクターゼ (熱帯熱マラリア原虫) g3845300	BLAST MOTIFS HMM
3	237	T66 T95 T114		短鎖デヒドロゲナターゼサイン: K3-D184	3-オキシアシル-[ACP] レダクターゼ (大腸菌) g1651536	BLAST MOTIFS PFAM BLOCKS PRINTS
4	157	S6 S29 S105		ニトロゲナターゼモリブデン/ 鉄タンパク質ドメイン V41-G92	亜硝酸レダクターゼの サブユニット (枯草菌) g1805401	BLAST MOTIFS PRODOM

表2-2

SEQ ID NO:	アミノ酸残基	リン酸化可能部位	グリコシル化可能部位	サイン(signature)配列、モチーフ、ドメイン	相同配列	分析方法
5	300	S33 S61 S17 T52 T76 S95 S131 T132 S158 S245 S187 S230 T252		シグナルペプチド: M1-L19 短鎖デヒドロゲナーゼサイン: E37-G224	レチナール短鎖 デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ (ヒト) g6318544	BLAST MOTIFS SPScan HMM PFAM BLOCKS PRINTS
6	377	S128 S163 S205 T344 S89 S112 S145 S193 T362 Y17	N75 N80	キノンオキシドレダクターゼサイン: D64-V248 ミクロホテイル-C末端標的シグナル: S380-L382	ARPタンパク質 (NADPHオキシドレダクターゼ) (シロイヌナズナ) g886434	BLAST MOTIFS BLOCKS
7	95	S38 S44 T57 S2 S12	N54 N66	シグナルペプチド: M1-L45	CMP-N-アセチルノイラミン酸 ヒドロキシラーゼ (ヒト) g3800814	BLAST MOTIFS SPScan
8	297	S138 S275 S284 S333 S445 T507 T517 S355 T376 T456	N331 N332 N499 N558	アシル-CoAデヒドロゲナーゼサイン: G483-A542 アシル-CoAデヒドロゲナーゼ ドメイン: PD023761: G52-A256	アシル-CoAデヒドロゲナーゼ に類似 (線虫) g4966270	BLAST HMMER-PFAM MOTIFS BLAST- PRODOM

表3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	核酸配列の有効断片	発現組織 (割合)	疾患または症状 (割合)	ベクター
9	580-624	神経 (0.308) 泌尿器 (0.231) 生殖 (0.154)	細胞増殖 (0.769) 炎症 (0.308)	PBLUESCRIPT
10	173-217	神経 (0.196) 生殖 (0.146) 胃腸 (0.137)	細胞増殖 (0.657) 炎症 (0.343)	pINCY
11	489-533	神経 (0.208) 生殖 (0.208) 心血管 (0.125) 胃腸 (0.125)	細胞増殖 (0.583) 炎症 (0.250)	pINCY
12	236-280	発達 (0.333) 造血/免疫 (0.333) 心血管 (0.167) 生殖 (0.167)	細胞増殖 (0.667) 炎症 (0.333)	pINCY
13	435-479 921-965	生殖 (0.400) 心血管 (0.200) 発達 (0.200) 胃腸 (0.200)	細胞増殖 (0.600) 炎症 (0.200)	pINCY
14	109-153 433-477	神経 (0.240) 胃腸 (0.220) 生殖 (0.200)	細胞増殖 (0.620) 炎症 (0.260)	pINCY
15	197-243	生殖 (0.500) 心血管 (0.250) 筋骨格 (0.250)	細胞増殖 (0.750) 炎症 (0.250)	pINCY
16	837-881	神経 (0.714) 造血/免疫 (0.143)	胎児/細胞株 (0.444) 癌 (0.333)	pINCY

【表5】

表4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	ライブラリ	ライブラリの説明
9	HNT2NOT01	HNT2NOT01 ライブラリは、(関係付けられた神経性前駆体の性状特性を示すようなヒト奇形癌由来の) hNT2 株化細胞から単離した RNA を用いて Stratagene (STR937230) で作製した。
10	BRSTNOT09	BRSTNOT09 ライブラリは、45歳の白人女性から片側拡大単純乳房切除の際に採取した乳房組織から単離した RNA を用いて作製した。関連する腫瘍組織は、病理学的には転移性疾患に陽性である23のリンパ節のうち3つを伴う浸潤性核レド2～3の腺癌を示していた。エストロゲン/プロゲステロン受容体に対する免疫染色は陽性であり、単純な組織は増殖性変化を示していた。患者は、同時に全腹式子宮摘出を受けていた。患者の病歴には、置換なしの僧帽弁の弁形成、リウマチ性閉鎖不全及びリウマチ性心疾患が含まれる。家族歴には、急性心筋梗塞、アテローム硬化性冠状動脈疾患及びII型糖尿病が含まれる。
11	LUNGTUT07	LUNGTUT07 ライブラリは、50歳の白人男性の上葉から部分肺切除の際に採取した肺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、浸潤性核レド4の扁平上皮腺癌を示していた。患者には、喫煙の習慣があった。家族歴には、皮膚癌があった。
12	KIDNFET01	KIDNFET01 ライブラリは、無脳症によって妊娠17週目で死亡した白人の女胎児から採取した腎臓組織から単離された RNA を用いて作製した。

【表6】

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	ライブラリ	ライブラリの説明
1 3	BRSTNOT18	BRSTNOT18 ライブラリは、57歳の白人女性から片側拡大単純乳房切除の際に採取した病変乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。非腫瘍性乳房は、穏やかに増殖する乳房疾患を示していた。多発性炎症性腋窩リンパ節が同定された。患者の病歴には、乳癌及び変形性関節症が含まれる。家族歴には、II型糖尿病、胆嚢癌、乳癌及び慢性リンパ球性白血病が含まれる。
1 4	BRSTNOT35	BRSTNOT35 ライブラリは、46歳の白人女性から両側整備乳房形成の際に採取した乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、両側に正常乳房組織を示していた。患者は、乳房肥大及び頭痛を示していた。患者の病歴には、肥満症、腰痛、緑内障及びアルコール中毒が含まれる。家族歴には、白内障、変形性関節症、子宮癌、良性高血圧症、高脂血症、アルコール性肝硬変、脳血管障害及びII型糖尿病が含まれる。
1 5	UTRSTMR01	UTRSTMR01 ライブラリは、膣式子宮切開術の際に41歳の白人女性から取り除いた子宮筋組織より単離したRNAを用いて作製された。子宮筋層及び子宮頸は平凡なもので、子宮内膜は分泌性であり、子宮内膜ポリープの抑制断片を含んでいた。関連腫瘍組織は、病理学的には子宮平滑筋腫を示していた。家族歴には、腹壁ヘルニア及び良性卵巢新生物が含まれる。
1 6	293TF3T01	293TF201 ライブラリは、血清不足の形質転換胎児株化細胞 (293-EBNA) から単離したRNAを用いて作製した。この細胞は、アデノウイルス 5DNA で形質転換した。

【表7】

表5-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター関連値
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 BLAST	核酸配列を構築するプログラム。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA.	
FASTA	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つのファミリーがある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, 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
	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 tfasta、fastx、tfastx、ssearch の少なくとも5つのファミリーを含む。	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 W. 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、構造的ファミリープリンストン領域を探索する。	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、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。

表5-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメータ-閾値
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 ≥ 特定の 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リメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phrap's 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クラ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.	

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 YUE, Henry
 TANG, Y. Tom
 BAUGHN, Mariah R.
 LU, Dyung Aina M.

<120> OXIDOREDUCTASE PROTEINS

<130> PF-0705 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/135,049; 60/136,740
 <151> 1999-05-20; 1999-05-27

<160> 16

<170> PERL Program

<210> 1
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 266711CD1

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

Ala Glu Tyr Val Val Gln Gln Glu Gly Ala Lys Leu Asn Val Ala
 215 220 225
 Ile Val Arg Pro Ser Ile Val Gly Ala Ser Trp Lys Glu Pro Phe
 230 235 240
 Pro Val Ser Cys

<210> 2
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1666030CD1

<400> 2
 Met Ala Thr Glu Gln Arg Pro Phe His Leu Val Val Phe Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Phe Thr Gly Gln Phe Val Thr Glu Glu Val Ala Arg Glu
 20 25 30
 Gln Val Asp Pro Glu Arg Ser Ser Arg Leu Pro Trp Ala Val Ala
 35 40 45
 Gly Arg Ser Arg Glu Lys Leu Gln Arg Val Leu Glu Lys Ala Ala
 50 55 60
 Leu Lys Leu Gly Arg Pro Thr Leu Ser Ser Glu Val Gly Ile Ile
 65 70 75
 Ile Cys Asp Ile Ala Asn Pro Ala Ser Leu Asp Glu Met Ala Lys
 80 85 90
 Gln Ala Thr Val Val Leu Asn Cys Val Gly Pro Tyr Arg Phe Tyr
 95 100 105
 Gly Glu Pro Val Ile Lys Ala Cys Ile Glu Asn Gly Ala Ser Cys
 110 115 120
 Ile Asp Ile Ser Gly Glu Pro Gln Phe Leu Glu Leu Met Gln Leu
 125 130 135
 Lys Tyr His Glu Lys Ala Ala Asp Lys Gly Val Tyr Ile Ile Gly
 140 145 150
 Ser Ser Gly Phe Asp Ser Ile Pro Ala Asp Leu Gly Val Ile Tyr
 155 160 165
 Thr Arg Asn Lys Met Asn Gly Thr Leu Thr Ala Val Glu Ser Phe
 170 175 180
 Leu Thr Ile His Ser Gly Pro Glu Gly Leu Ser Ile His Asp Gly
 185 190 195
 Thr Trp Lys Ser Ala Ile Tyr Gly Phe Gly Asp Gln Ser Asn Leu
 200 205 210
 Arg Lys Leu Arg Asn Val Ser Asn Leu Lys Pro Val Pro Leu Ile
 215 220 225
 Gly Pro Lys Leu Lys Arg Arg Trp Pro Ile Ser Tyr Cys Arg Glu
 230 235 240
 Leu Lys Gly Tyr Ser Ile Pro Phe Met Gly Ser Asp Val Ser Val
 245 250 255
 Val Arg Arg Thr Gln Arg Tyr Leu Tyr Glu Asn Leu Glu Glu Ser
 260 265 270
 Pro Val Gln Tyr Ala Ala Tyr Val Thr Val Gly Gly Ile Thr Ser
 275 280 285
 Val Ile Lys Leu Met Phe Ala Gly Leu Phe Phe Leu Phe Phe Val
 290 295 300
 Arg Phe Gly Ile Gly Arg Gln Leu Leu Ile Lys Phe Pro Trp Phe
 305 310 315
 Phe Ser Phe Gly Tyr Phe Ser Lys Gln Gly Pro Thr Gln Lys Gln
 320 325 330

Ile Asp Ala Ala Ser Phe Thr Leu Thr Phe Phe Gly Gln Gly Tyr
 335 340 345
 Ser Gln Gly Thr Gly Thr Asp Lys Asn Lys Pro Asn Ile Lys Ile
 350 355 360
 Cys Thr Gln Val Lys Gly Pro Glu Ala Gly Tyr Val Ala Thr Pro
 365 370 375
 Ile Ala Met Val Gln Ala Ala Met Thr Leu Leu Ser Asp Ala Ser
 380 385 390
 His Leu Pro Lys Ala Gly Gly Val Phe Thr Pro Gly Ala Ala Phe
 395 400 405
 Ser Lys Thr Lys Leu Ile Asp Arg Leu Asn Lys His Gly Ile Glu
 410 415 420
 Phe Ser Val Ile Ser Ser Ser Glu Val
 425

<210> 3
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2607950CD1

<400> 3
 Met Asp Lys Val Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly
 1 5 10 15
 Arg Ala Val Ala Gln Leu Met Ala Arg Lys Gly Tyr Arg Leu Ala
 20 25 30
 Val Ile Ala Arg Asn Leu Glu Gly Ala Lys Ala Ala Ala Gly Asp
 35 40 45
 Leu Gly Gly Asp His Leu Ala Phe Ser Cys Asp Val Ala Lys Glu
 50 55 60
 His Asp Val Gln Asn Thr Phe Glu Glu Met Glu Lys His Leu Gly
 65 70 75
 Arg Val Asn Phe Leu Val Asn Ala Ala Gly Ile Asn Arg Asp Gly
 80 85 90
 Leu Leu Val Arg Thr Lys Thr Glu Asp Met Val Ser Gln Leu His
 95 100 105
 Thr Asn Leu Leu Gly Ser Met Leu Thr Cys Lys Ala Ala Met Arg
 110 115 120
 Thr Met Ile Gln Gln Gln Gly Gly Ser Ile Val Asn Val Gly Ser
 125 130 135
 Ile Val Gly Leu Lys Gly Asn Ser Gly Gln Ser Val Tyr Ser Ala
 140 145 150
 Ser Lys Gly Gly Leu Val Gly Phe Ser Arg Ala Leu Ala Lys Glu
 155 160 165
 Val Ala Arg Lys Lys Ile Arg Val Asn Val Val Ala Pro Gly Phe
 170 175 180
 Val His Thr Asp Met Thr Lys Asp Leu Lys Glu Glu His Leu Lys
 185 190 195
 Lys Asn Ile Pro Leu Gly Arg Phe Gly Glu Thr Ile Glu Val Ala
 200 205 210
 His Ala Val Val Phe Leu Leu Glu Ser Pro Tyr Ile Thr Gly His
 215 220 225
 Val Leu Val Val Asp Gly Gly Leu Gln Leu Ile Leu
 230 235

<210> 4

<211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2949481CD1

<400> 4
 Met Asn Leu Asp Gly Ser Ala Gln Asp Pro Glu Lys Arg Glu Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Cys Val Gly Arg Glu Asp Asp Ile Lys Lys Ser Glu
 20 25 30
 Arg Met Thr Ala Val Val His Asp Arg Glu Val Val Ile Phe Tyr
 35 40 45
 His Lys Gly Glu Tyr His Ala Met Asp Ile Arg Cys Tyr His Ser
 50 55 60
 Gly Gly Pro Leu His Leu Gly Asp Ile Glu Asp Phe Asp Gly Arg
 65 70 75
 Pro Cys Ile Val Cys Pro Trp His Lys Tyr Lys Ile Thr Leu Ala
 80 85 90
 Thr Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Ser Ile Asn Pro Lys Asp Pro Ser
 95 100 105
 Ala Lys Pro Lys Trp Cys Ser Lys Gly Ile Lys Gln Arg Ile His
 110 115 120
 Thr Val Thr Val Asp Asn Gly Asn Ile Tyr Val Thr Leu Ser Asn
 125 130 135
 Glu Pro Phe Lys Cys Asp Ser Asp Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Phe
 140 145 150
 Lys Val Ile Lys Ser Ser Ser
 155

<210> 5
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 3170236CD1

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

```

Glu Ile Thr Lys Thr Phe Glu Val Asn Ile Leu Gly His Phe Trp
      140      145
Ile Thr Lys Ala Leu Leu Pro Ser Met Met Glu Arg Asn His Gly
      155      160
His Ile Val Thr Val Ala Ser Val Cys Gly His Glu Gly Ile Pro
      170      175
Tyr Leu Ile Pro Tyr Cys Ser Ser Lys Phe Ala Ala Val Gly Phe
      185      190
His Arg Gly Leu Thr Ser Glu Leu Gln Ala Leu Gly Lys Thr Gly
      200      205
Ile Lys Thr Ser Cys Leu Cys Pro Val Phe Val Asn Thr Gly Phe
      215      220
Thr Lys Asn Pro Ser Thr Arg Leu Trp Pro Val Leu Glu Thr Asp
      230      235
Glu Val Val Arg Ser Leu Ile Asp Gly Ile Leu Thr Asn Lys Lys
      245      250
Met Ile Phe Val Pro Ser Tyr Ile Asn Ile Phe Leu Arg Leu Gln
      260      265
Lys Phe Leu Pro Glu Arg Ala Ser Ala Ile Leu Asn Arg Met Gln
      275      280
Asn Ile Gln Phe Glu Ala Val Val Gly His Lys Ile Lys Met Lys
      290      295

```

```

<210> 6
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5216587CD1

```

```

<400> 6
Met Leu Arg Leu Val Pro Thr Gly Ala Arg Ala Ile Val Asp Met
  1      5      10
Ser Tyr Ala Arg His Phe Leu Asp Phe Gln Gly Ser Ala Ile Pro
  20      25
Gln Ala Met Gln Lys Leu Val Val Thr Arg Leu Ser Pro Asn Phe
  35      40
Arg Glu Ala Val Thr Leu Ser Arg Asp Cys Pro Val Pro Leu Pro
  50      55
Gly Asp Gly Asp Leu Leu Val Arg Asn Arg Phe Val Gly Val Asn
  65      70
Ala Ser Asp Ile Asn Tyr Ser Ala Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Val
  80      85
Lys Pro Pro Phe Asp Ile Gly Phe Glu Gly Ile Gly Glu Val Val
  95      100
Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ser Ala Arg Tyr Thr Val Gly Gln Ala
  110     115
Val Ala Tyr Met Ala Pro Gly Ser Phe Ala Glu Tyr Thr Val Val
  125     130
Pro Ala Ser Ile Ala Thr Pro Val Pro Ser Val Lys Pro Glu Tyr
  140     145
Leu Thr Leu Leu Val Ser Gly Thr Thr Ala Tyr Ile Ser Leu Lys
  155     160
Glu Leu Gly Gly Leu Ser Glu Gly Lys Lys Val Leu Val Thr Ala
  170     175
Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gln Phe Ala Met Gln Leu Ser Lys Lys
  185     190
Ala Lys Cys His Val Ile Gly Thr Cys Ser Ser Asp Glu Lys Ser

```

```

                200                205                210
Ala Phe Leu Lys Ser Leu Gly Cys Asp Arg Pro Ile Asn Tyr Lys
                215                220                225
Thr Glu Pro Val Gly Thr Val Leu Lys Gln Glu Tyr Pro Glu Gly
                230                235                240
Val Asp Val Val Tyr Glu Ser Val Gly Gly Ala Met Phe Asp Leu
                245                250                255
Ala Val Asp Ala Leu Ala Thr Lys Gly Arg Leu Ile Val Ile Gly
                260                265                270
Phe Ile Ser Gly Tyr Gln Thr Pro Thr Gly Leu Ser Pro Val Lys
                275                280                285
Ala Gly Thr Leu Pro Ala Lys Leu Leu Lys Lys Ser Ala Ser Val
                290                295                300
Gln Gly Phe Phe Leu Asn His Tyr Leu Ser Lys Tyr Gln Ala Ala
                305                310                315
Met Ser His Leu Leu Glu Met Cys Val Ser Gly Asp Leu Val Cys
                320                325                330
Glu Val Asp Leu Gly Asp Leu Ser Pro Glu Gly Arg Phe Thr Gly
                335                340                345
Leu Glu Ser Ile Phe Arg Ala Val Asn Tyr Met Tyr Met Gly Lys
                350                355                360
Asn Thr Gly Lys Ile Val Val Glu Leu Pro His Ser Val Asn Ser
                365                370                375
Lys Leu

```

```

<210> 7
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5643770CD1

```

```

<400> 7
Met Ser Asn Arg Asn Asp Met Ser Asn Cys Cys Ser Phe Lys Ile
  1                    5                    10                    15
Pro Arg Gln Arg Asn Arg Gln Thr Met Gly Ser Ile Glu Gln Thr
  20                    25                    30
Thr Glu Ile Leu Leu Cys Leu Ser Pro Val Glu Val Ala Ser Leu
  35                    40                    45
Lys Glu Gly Ile Asn Phe Phe Arg Asn Lys Ser Thr Gly Lys Asp
  50                    55                    60
Tyr Val Leu Tyr Lys Asn Lys Ser Arg Leu Arg Ala Cys Lys Asn
  65                    70                    75
Met Cys Lys His Gln Gly Gly Leu Phe Ile Lys Asp Ile Glu Asp
  80                    85                    90
Leu Ala Gly Ser Cys
  95

```

```

<210> 8
<211> 563
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3580359CD1

```

<400> 8
Met Lys Pro Gly Ala Thr Gly Glu Ser Asp Leu Ala Glu Val Leu
1 5 10 15
Pro Gln His Lys Phe Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ala Tyr Leu Asn
20 25 30
Gln His Leu Ser Gly Phe Gly Ala Glu Arg Glu Ala Thr Leu Thr
35 40 45
Ile Ala Gln Tyr Arg Ala Gly Lys Ser Asn Pro Thr Phe Tyr Leu
50 55 60
Gln Lys Gly Phe Gln Thr Tyr Val Leu Arg Lys Lys Pro Pro Gly
65 70 75
Ser Leu Leu Pro Lys Ala His Gln Ile Asp Arg Glu Phe Lys Val
80 85 90
Gln Lys Ala Leu Phe Ser Ile Gly Phe Pro Val Pro Lys Pro Ile
95 100 105
Leu Tyr Cys Ser Asp Thr Ser Val Ile Gly Thr Glu Phe Tyr Val
110 115 120
Met Glu His Val Gln Gly Arg Ile Phe Arg Asp Leu Thr Ile Pro
125 130 135
Gly Leu Ser Pro Ala Glu Arg Ser Ala Ile Tyr Val Ala Thr Val
140 145 150
Glu Thr Leu Ala Gln Leu His Ser Leu Asn Ile Gln Ser Leu Gln
155 160 165
Leu Glu Gly Tyr Gly Ile Gly Ala Gly Tyr Cys Lys Arg Gln Val
170 175 180
Ser Thr Trp Thr Lys Gln Tyr Gln Ala Ala Ala His Gln Asp Ile
185 190 195
Pro Ala Met Gln Gln Leu Ser Glu Trp Leu Met Lys Asn Leu Pro
200 205 210
Asp Asn Asp Asn Glu Glu Asn Leu Ile His Gly Asp Phe Arg Leu
215 220 225
Asp Asn Ile Val Phe His Pro Lys Glu Cys Arg Val Ile Ala Val
230 235 240
Leu Asp Trp Glu Leu Ser Thr Ile Gly His Pro Leu Ser Asp Leu
245 250 255
Ala His Phe Ser Leu Phe Tyr Phe Trp Pro Arg Thr Val Pro Met
260 265 270
Ile Asn Gln Gly Ser Tyr Ser Glu Asn Ser Gly Ile Pro Ser Met
275 280 285
Glu Glu Leu Ile Ser Ile Tyr Cys Arg Cys Arg Gly Ile Asn Ser
290 295 300
Ile Leu Pro Asn Trp Asn Phe Phe Leu Ala Leu Ser Tyr Phe Lys
305 310 315
Met Ala Gly Ile Ala Gln Gly Val Tyr Ser Arg Tyr Leu Leu Gly
320 325 330
Asn Asn Ser Ser Glu Asp Ser Phe Leu Phe Ala Asn Ile Val Gln
335 340 345
Pro Leu Ala Glu Thr Gly Leu Gln Leu Ser Lys Arg Thr Phe Ser
350 355 360
Thr Val Leu Pro Gln Ile Asp Thr Thr Gly Gln Leu Phe Val Gln
365 370 375
Thr Arg Lys Gly Gln Glu Val Leu Ile Lys Val Lys His Phe Met
380 385 390
Lys Gln His Ile Leu Pro Ala Glu Lys Glu Val Thr Glu Phe Tyr
395 400 405
Val Gln Asn Glu Asn Ser Val Asp Lys Trp Gly Lys Pro Leu Val
410 415 420
Ile Asp Lys Leu Lys Glu Met Ala Lys Val Glu Gly Leu Trp Asn
425 430 435
Leu Phe Leu Pro Ala Val Ser Gly Leu Ser His Val Asp Tyr Ala
440 445 450

Leu Ile Ala Glu Glu Thr Gly Lys Cys Phe Phe Ala Pro Asp Val
 455 460 465
 Phe Asn Cys Gln Ala Pro Asp Thr Gly Asn Met Glu Val Leu His
 470 475 480
 Leu Tyr Gly Ser Glu Glu Gln Lys Lys Gln Trp Leu Glu Pro Leu
 485 490 495
 Leu Gln Gly Asn Ile Thr Ser Cys Phe Cys Met Thr Glu Pro Asp
 500 505 510
 Val Ala Ser Ser Asp Ala Thr Asn Ile Glu Cys Ser Ile Gln Arg
 515 520 525
 Asp Glu Asp Ser Tyr Val Ile Asn Gly Lys Lys Trp Trp Ser Ser
 530 535 540
 Gly Ala Gly Asn Pro Lys Cys Lys Ile Ala Ile Val Leu Gly Arg
 545 550 555
 Thr Gln Asn Thr Ser Leu Ser Arg
 560

<210> 9
 <211> 1678
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 266711CB1

<400> 9
 ggcgggtggaa aagcgagtga agagagcgcg acggcggcgg cggcggcggc gcagctattg 60
 ctggacggcc agtgggagag cgaggcctga gcctctgcgt ctaggatcaa aatggtttca 120
 atcccagaat actatgaagg caagaacgtc ctctcaccag gagctaccgg ttttctaggg 180
 aaggtgcttc tggaaaagtt gctgaggctc tgtcctaagg tgaattcagt atatgttttg 240
 gtgaggcaga aagctggaca gacaccacaa gagcgagtgg aagaagtctc tagtggcaag 300
 ctttttgaca gattgagaga tgaatccca gatttttagag agaaaattat agcaatcaac 360
 agcgaactca cccaacctaa actggctctc agtgaagaag ataaagaggt gatcatagat 420
 tctaccaata ttatattcca ctgtgcagct acagtaaggt ttaatgaaa ttaagagat 480
 gctgttcagt taaatgtgat tgcaacgcga cagcttattc tccttgacaca acaaatgaag 540
 aatctggaag tgttcatgca tgtatcaaca gcatatgcct actgtaatcg caagcatatt 600
 gatgaagtag tctatccacc acctgtggat cccaagaagc tgattgattc tttagagtgg 660
 atggatgatg gccatagtaa tgatcacg ccaaaattga taggagacag acctaataca 720
 tacatatata caaaagcatt ggcagaatat gttgtacaac aagaaggagc aaaactaat 780
 gtggcaattg taaggccatc gattgttggg gccagttgga aagaaccttt tccagtaagt 840
 tgttagaaac ctttataaat aactggagtt gagaatttta agttgtaact ctgtataaaa 900
 agagctggca gttctttaag aacaggtatt atttactaaa ggtgaattac catggcaag 960
 ctgttttgtg ttcatagagt taattttatt ggtactttca tttctataat gtgacgctgg 1020
 gtatatagaa atgtagatca acatttaaaa aatcctaagt gaaaattaaa agctgtgaca 1080
 ttttcttaag tcagaggaga tttggtttgt ttcttagtag caaaaagagg cagaccttcc 1140
 aggaggtaga ccccttcctc tgtagatcac aaagtaaaa aggtacaggg tgttagggta 1200
 tttgtgaatt cctggaatga gagaaagcag aaatataaac cagttgggtc aattgattta 1260
 ggcaaaacct aggtctgtgt aatggtagta agtgatagca tctgttgttg ctttgacaat 1320
 tattctatct tctctgttt tattcataat tttgaggagg atttaccatt ttcctaatc 1380
 tcaggctatt gaattagtaa atagcataaa atcaaacttg aacaagctta attttgtaaa 1440
 aatattcaac aatataaacc ctcttttata aatbttctct tgagagagt taatggaaga 1500
 gtagtaggta gcccttgaa aatgatttta ctcaattatt tttgatccca gaggaagact 1560
 gcttctgttt gggactggta gaaatagtct ggccatgaatc tagtctgttt tttagttttt 1620
 agaagacagc taccaagtat atatttgggg ttgtagagtt caaataataa atctctag 1678

<210> 10
 <211> 1494
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1666030CB1

<400> 10

```

cggctcgagg gctcgtctgt gactcgtcat ggcgaccgag cagaggcctt tccacctggt 60
ggtgttcggc gcgctctggct tcaccggcca gttcgtgacc gaggaggtgg cccgggagca 120
ggtggaccgg gagcggagct cccgcctgcc ctgggcccgtg gcgggcccgt cccgggagaa 180
gctgcagcgg gtgctggaga aggcggccct gaagctggga agaccaacac tgtcatctga 240
agttggaatc atcatctgtg atattgctaa tccagcctcg cttgatgaaa tggctaaaca 300
ggcaacagtt gtcctcaatt gcgtaggacc atatcggttt tatggagaac ctgtaataaa 360
agcatgtatt gaaaaatggag ccagttgtat cgacatcagt ggagaacctc agtttctgga 420
actaatgcaa ctgaagtatc atgagaaagc tgcagacaaa ggggtttata tcattggaag 480
cagcggcttt gactccattc cagcagatct gggagtaata tataccagaa ataaaatgaa 540
tggacttttg actgctgtgg aaagtttctt gactatacat tcaggacctg aggggttgag 600
cattcatgat ggtacctgga agtcagcaat ttatggtttt ggagatcaga gtaatttgag 660
aaaactaaga aatgtatcaa atctgaaacc tgtcccgtctc attggtccaa aattgaagag 720
aagggtggcca atttcttatt gtcgggaact caaaggttat tccattcctt ttatgggatc 780
tgatgtgtct gttgtaagga ggactcaacg ttacttgtat gaaaatttag aggaatcacc 840
agttcagtat gctcgtgatg taactgtggg aggcacacc tctgttatta agctgatgtt 900
tgcaggactt ttctttttgt tctttgtgag gtttggattt ggaaggcaac ttctcataaa 960
attcccattg ttcttctcct ttggctattt ttcaaaaaca ggcaccaacac aaaaacagat 1020
tgatgctgcc tcattcacgc tgacattctt tggcaagga tacagccaag gcactggtag 1080
agataagaac aaaccaataa tcaaaatttg tactcaggtg aaaggaccag aggtgggcta 1140
tgtggctacc cccatagcta tggttcaggc agccatgact cttctaagtg atgcttctca 1200
tctgcctaag gccggcgggg tcttcacacc tggagcagct ttttccaaaa caaagttgat 1260
tgacagactc aacaaacacg gtattgagtg tagtgttatt agcagctctg aagtctaac 1320
actggaagaa ttaactgaag tcataacgtg cgtgaattaa cagcttctct atttgatt 1380
tgaattctt ctgtaagcct gtctgagtg atgtggaaac gattgtcaaa tctaaaatat 1440
ctatatatta aaaagtagga aattgtccta gcttacccta aaaaaaaaaa aaaa 1494

```

<210> 11

<211> 1053

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2607950CB1

<400> 11

```

cggcgtcttg cattaactatt gtgcggctgc aggaggtgtc gagcggcgtt attttttttt 60
gcggtttggc ttttttttcc tttttttttt tttggaaccg cggttgttta aaagcctgag 120
ggaacctgga ggggggctcc cactctctac cttctttcct ccgagtttgt gactccgaga 180
tggacaaaagt gtgtgctggt tttggaggct cccgaggcat tggcagagct gtggcccagt 240
taatggcccc gaaaggctac cgactggcgg tcattgcccag aaacctggaa ggggccaaag 300
ccgcgcgccg tgacctcggc ggagatcatt tggcatttag ctgtgatgtt gctaaagaac 360
atgatgttca aaatacattt gaagagatgg aaaaacattt aggtcgagta aatttcttgg 420
taaatgcagc tggatattaac agggatggtc ttttagtaag aacaaaaact gaagatatgg 480
tatctcagct tcataactaac ctcttgggtt ccatgctgac ctgtaaagct gccatgagga 540
ctatgattca acaacagggg gggctctatt ttaatgtagg aagcatttgt ggcttaaaag 600
gcaactctgg ccagtcctgt tacagtgcca gtaaaggagg attagttgga ttttcacgtg 660
ctcttgctaa agaggtagca agaaagaaaa tttagagtaa tgtagttgca ccaggatttg 720
tacacacaga tatgacgaaa gacttgaaag aagaacattt aaagaaaaat attcctcttg 780
ggaggtttgg agaaactatt gaggtggcac atgcccgttg gtttctttta gaatcaccgt 840
atattacagg gcatgttctg gtagtggatg ggggattaca actcattttg taatttgag 900
attattcagt tataggggtg attagcatca agggcacact ttggctactg attagacaat 960
tatacctaca tgggtaacat gtgctaatac aacctgctga tgctacaaat gtaatttct 1020

```

gtctttataa aaatatgtct caaaaaaaaa aaa

1053

<210> 12
<211> 979
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2949481CB1

<400> 12
ggctcgtgca gtagcgtcac gcgaggcgg agcgaggact cggggacagt taccacctat 60
ttgcaattca aggagaatat aagacagaga agaaagctgt gaatgaattt catttgatta 120
gcaatagatt ggacactcta ctgatcttgc ctctctacaa cctctcttcc acctgacctc 180
taaatgttga agtgtttcag gaattgtctt agaccttctt ccttatctac acttctcttc 240
caactcagct gtcattctcag tgaccagttt ttatctgagc atgaatcttg atggctctgc 300
acaagatcct gaaaagaggg aatattcttc tgtgtgtgtg ggcagagaag atgacattaa 360
aaaatctgaa agaatgacag ctggtgtcca tgatagagaa gtggtcattt tctaccacaa 420
gggagaatat catgctatgg atattcgctg ttaccactca ggaggacctt tacatttggg 480
agatatagag gattttgatg gacgaccgtg tatagtttgc cctggcata aatacaaaa 540
tactttggca acaggagaag gtctgtacca gtctataaac cctaaagac catcagcaaa 600
acccaagtgg tgctccaaag gaataaagca aaggattcac acagtgcag tagacaacgg 660
aaatatttat gtgactcttt ctaatgaacc ttttaagtgt gactctgatt tttatgccc 720
tggagacttc aaagtaatta agagtcttc ctgataaaaa atatatagaa atgaaaaatg 780
ttgtgtatgc ttgaaaacat ttttagaata actctgcttc agttttaaag gtgatgaaat 840
ttttcaacat aggcacaact gtttaaaatt cacatacatt tgagaggttt aagagcacac 900
atacttagta tgatgtaagg attatcatca ggatcaatag aatacatttt atcgaatctt 960
ctgggattaa ttaggacct

<210> 13
<211> 1010
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 994, 1002, 1005
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3170236CB1

<400> 13
agacagtacc tcttccctag gactacacaa ggactgaacc agaaggaaga ggacagagca 60
aagccatgaa catcatccta gaatccttc tgcttctgat caccatcacc tactcctact 120
tggagtcggt ggtgaagttt ttcattcttc agaggagaaa atctgtggct ggggagattg 180
ttctcattac tggagctggg catggaatag gcaggcagac tacttatgaa tttgcaaaac 240
gacagagcat attggttctg tgggatatta ataaagcggg tgtggaggaa actgcagctg 300
agtgcgaaaa actaggcgtc actgcgcatg cgtatgtggt agactgcagc aacagagaag 360
agatctatcg ctctctaaat caggtgaaga aagaagtggg tgatgtaaca atcgtggtga 420
ataatgctgg gacagtatat ccagccgatc ttctcagcac caaggatgaa gagattacca 480
agacatttga ggtcaacatc ctaggacatt tttggatcac aaaagcactt cttccatcga 540
tgatggagag aaatcatggc cacatcgtca cagtggcttc agtgtgcggc cacgaagga 600
ttccttacct catcccata tgttccagca aatttgccgc tgttggcttt cacagaggtc 660
tgacatcaga acttcaggcc ttgggaaaaa ctggtatcaa aacctcatgt ctctgcccag 720
tttttgtgaa tactgggttc accaaaaatc caagcacaag attatggcct gtattggaga 780
cagatgaagt cgtaagaagt ctgatagatg gaatacttac caataagaaa atgatttttg 840

```

ttccatcgta tatcaatata tttctgagac tacagaagtt tcttctgaa cggcctcag 900
cgattttaa tcgtatgcag aatattcaat ttgaagcagt ggttggccac aaaatcaaaa 960
tgaaatgaat aaataagctc cagacagaga ctncctctc cnttncatcc 1010

```

```

<210> 14
<211> 3021
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5216587CB1

```

```

<400> 14
agagagcggg cggagggcga ggccatgctg cggctgggtg ccaccggggc cggggccatc 60
gtggacatgt cgtacgcccg ccacttccct gacttccagg gctccgccat tccccaggcc 120
atgcagaagc tgggtgtgac ccggctgagc cccaacttcc gcgaggccgt caccctgagc 180
cgggactgcc cgggtgcccct ccccggggac ggagacctcc tcgtccggaa ccgatttgtt 240
ggtgttaacg catctgacat caactattca gcaggccgct atgaccctcc agttaagcct 300
ccctttgaca taggtttgac aggcattggg gaggtgggtg ccctaggcct ctctgctagt 360
gccagatata cagttggcca agctgtggct tacatggcac ctggttcttt tgetgagtac 420
acagttgtgc ctgccagcat tgcaactcca gtgcccctcag tgaaccocga gtatcttacc 480
ctgctggtaa gtggcaccac cgcatacatc agcctgaaa agctcggagg actgtcggaa 540
gggaaaaaag ttttggtgac agcagcagct gggggaacgg gccagtttgc catgcagctt 600
tcaaagaagg caaagtgcca tgaattgga acctgctctt ctgatgaaaa gtctgctttt 660
ctgaaatctc ttggctgtga tcgtcctatc aactataaaa ctgaaccctt aggtaccgtc 720
cttaagcagg agtaccctga aggtgtcgat gtggtctatg aatctgttgg gggagccatg 780
tttgacttgg ctgtagacgc cctggctacg aaagggcgtc tgatagtaat agggtttacc 840
tctggctacc aaactcctac tggcctttcg cctgtgaaag caggaaacatt gccagccaaa 900
ctgctcaaga aatctgccag cgtacagggc ttcttccctga accattacct ttctaagtat 960
caagcagcca tgagccactt gctcagatg tgtgtgagcg gagacctggt ttgtgaggaa 1020
gaccttggag atctgtctcc agagggcaggt tttactggcc tggagtccat attccgtgct 1080
gtcaattata tgtacatggg aaaaaacact ggaaaaattg tagttgaatt acctcactct 1140
gtcaacagta agctgtaaaa acagaacaat gacataaatc aaggggagaaa gaaaatgggc 1200
actttatgtc tcagaattac tcaaatcaat ttatttttag ttggtaatgg atataatatt 1260
tcttaaaaca aaagtaaggt gttaatgaat aggtctctcc ttctctctcc cctcctctcc 1320
ttcccttggg ggaaaaaaaa aaatgtgcta ataaaaactt cctccatggc taagagggaa 1380
aacgcttaca ttcaattctt tagtcatgga tggctctggt ccagatgtta ttgttccagg 1440
gaactaaatt cattcctgat gccagatctg atcgagtcag tatgtcttca gcttgatcag 1500
attttaaaat cagttttgaa agtggttccc gacttctttg ctttgggaga atttggctct 1560
atgctcataa gcagttcatg agtgacaagt gtagcaaaaag ccagccatat attttcagaa 1620
tctatatect caggaaatgg tecttttttt tctataaatc accaaccac tatctaaatg 1680
gacatttggg ggaattccct cccaaatttg attttgttat tagaaaaatg attccgtgaa 1740
cacagatgtg ttttgaagaa gtagcacgta atggctttta tctaccatca acctgataag 1800
gcacatgtga aatggaaatg ttctctttcc tctgaagcag caaattaatg ttgaaaactt 1860
acatagacag aaagtaggtt ttggaaaggg aaaccacaga gattaggggg acttaaaatt 1920
aatataggca caggaaagag aaaagtgtgc gctccattct cagtggggggt tcaccacaaa 1980
acacgggccc caggagggaa gcgctgtcta ggcacacggc aaggccttag taacagcatg 2040
ctacactgct cgaggtagcg tatgtcccct cgccctgtgc accgtagaga cctcagtcac 2100
ctcaaggaag aatacatttg ctctctctta gaggcgttcg aactagaagc tatgcttac 2160
ctctgattct ggaaacagaa tagcagccc t cattctgca ttcccatttt ctctccacg 2220
tgtttctggtg gaatgagatg ctcttggca ctatagcctg atgtcccaca ttgaccact 2280
gaccacacag gaaaagcagc gaaacctgca ccctctcttc tgagtacgc ctgtggctca 2340
tcggcttccc tcttaacctt tagtgccttg aagactgctg ccgctgtcac cgttgcctg 2400
aaaccccatg ggcccgttct gattgaaggt gaaggtgaag cccaccagat ttttttcaa 2460
agtcttaggt ttcggtgtat ctaacctgct cagtaaatat ggacgcaatt aaagatgctc 2520
taggaaatct ggggactgta tttaatTTTT ctctctctcc atctgaggag caaggaaatc 2580
ctactgctga atagctgta gtatctatct tacaagatct actcattttc aggtacctaa 2640
tgtagctgct agcatgcatg cacaacaata caatttatat ggtaaatgga accaaataat 2700
ggcttccactg aatgttatgg ctgactgaa gggaaatgct acggtaataa gctgccaat 2760

```

```

tatggatcat gccgaagtgt cacaactgca ctaaagacaa atagcactag aggctattgc 2820
cactgtgacg cttttgagtt ctgaagaagg gtagcggcct gatgacgagg tctttgtgtc 2880
ctcattatag caaaggggta ctgggtgcagg ggactaggaa aaacccgtcc agtgtgggtc 2940
ttagttattc atccatccct ttcagacctc acagccacag ccacacggaa agagactttg 3000
ctcactgttt acattcacia c 3021

```

```

<210> 15
<211> 714
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5643770CB1

```

```

<400> 15
caagagcaga gatgggaggg acagcacagt ggcttctcag aattgaatat ggtgttagac 60
ttctaaaaga gctgtggtag agggagaaaa ctgtcaaagg aatcagtaa ctgttaaagg 120
aaaatacctt aaacgtcctg ttttcaggct gactaatgcc ttaggggagc aaatgagcaa 180
cagaaacgat atgagcaact gctgttcttt caaaatcccc aggcagagga accggcagac 240
gatgggagc atcgaacaaa caactgagat cctgttgtgc ctatcacctg ttgaagttgc 300
cagtcttaag gaaggaatca atttctttcg caataagagc actggcaaaag actacgtctt 360
gtacaagaat aagagccgac tgagggcagc caagaatag tgcaagcacc aaggaggcct 420
gttcataaaa gatatcgagg attttagccgg aagttgttga aatggatgaa aacaacggac 480
ttttgctttt agaactgaat cctcctaacc cttgggactt acagcccaga tctcctgaag 540
agttggcttt tggagaagta caggtgccag gctgtggcaa gagaatgagg aattggattt 600
ggaatcccca tgggtgccag ctctaagtca ctgttttgtt ccattcttag aggaccttgg 660
catccagaag gagtaattat ttaacagata acatatctca ctcatgcctg catg 714

```

```

<210> 16
<211> 2519
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3580359CB1

```

```

<400> 16
agcaccgggg tgataagtgt ccaggacagg aggccagcga tgttgccctg ctaaccgggt 60
atctaagaga aacagggctt ttttattctt aggcctgaca gtctgacggc cctttttctg 120
aacgggaccc tgcaggctct ccgcctgctg ttgcattaaa ttgggggtg gaagaggctt 180
ctgctgtgtt ccttaccgca aacgatgacc atggccttgc cttctttaaa attgaggcct 240
ccaactctga cgctgactgg agaattgaaa cccgaacaca cattgggctc ttttggcact 300
tgactagagc taaaacctcg ggattcagcg ggcaagcgtt gctcagcaac ggcgcttagg 360
ctgtgtgctg ttggctggag ccagacccca ccccgccctc ggcccatgct cttaggggga 420
cgttgcccca atcctgaagg acttcggcac togagacctg tggatgccgc gttgctgtgg 480
cctgccccgg tgatcatgaa gccagggtgct actggcaggt ccgatttggc cgaagtgtctg 540
ccccagcaca agttcgacag caagtccctg gaggcctacc taaaccagca ctgtcttggc 600
tttggggccg aacgtgaggc tacgctgacc attgcccagt acagagcagg aaagtccaat 660
ccaacctttt atctccagaa gggctttcaa acatatgtgc tcaggaaaaa accaccagg 720
tcactttctc ctaaaagcaca tcagattgat agagaattta aagtccagaa agccttgttt 780
tcaattggat tccccgttcc caagcctata ctgtactgca gtgatacttc tgtcattgga 840
acagaatttt acgtaatgga acatgtgcag ggtcgaatct tccgtgattt aacaattct 900
ggacttagcc cagcagaacg ttcagccata tatgtggcca cggtagaaac attggctcag 960
ttacattcct tgaatataca gtcactgcag ctggaaggat atgggtatagg tgcgtgggtc 1020
tgcaaaaagc aggtatcaac ctggacaaag caatatcaag ctgacagctc tcaggacatc 1080
cctgccatgc aacagctatc ggagtggcta atgagaacct tgcccataa tgacaatgaa 1140
gagaatttga ttcattggaga tttcagacta gataacatag ttttccacc taagagtgct 1200

```

cgagttatag	cagtgcctgga	ttgggagctg	tcaaccattg	gtcatccttt	gtcagactta	1260
gctcattttt	ccctgttcta	cttttggcca	aggacagttc	caatgataaa	tcaaggttct	1320
tatagtghaa	actcagggat	accatcaatg	gaagaactga	tttcaatata	ttgccgctgc	1380
aggggaatta	attctattct	tcctaactgg	aatttctttc	ttgccctttc	atattttaag	1440
atggctggaa	tagcacaggg	agtatatagc	agatatcttc	tgggaaataa	ttcatctgag	1500
gatagctttt	tatttgccaa	tattgtgcaa	cctctggcag	aaactggact	acaactctcc	1560
aaacgaactt	tcagtactgt	actaccacag	attgatacta	ctggacagtt	gtttgtacag	1620
actcggaaa	gtcaggaagt	tcttattaag	gtgaagcatt	tcatgaaaca	acacattctt	1680
ccagctghaa	aggaggtaac	tgagttctat	gttcaaaatg	aaaattcagt	ggacaagttg	1740
ggaaaacctt	tagtgattga	taaactcaag	gaaatggcca	aagtcgaggg	tctctggaac	1800
ttgtttttgc	cagctgtcag	cggaactcagc	cagctggact	atgccttgat	tgctgaagaa	1860
acaggaaaat	gcttttttgc	tccagatgtc	tttaactgcc	aagcaccaga	cacagggaat	1920
atggaggttc	tgcacctgta	tggaaagtgag	gaacagaaga	aacagtggtc	tgagcctctt	1980
cttcaagggg	acattacctc	ttgcttctgt	atgacagaac	ctgatgtagc	ttcaagtgat	2040
gccacgaata	ttgaatgcag	catccaacga	gatgaagata	gctatgtaat	taacggcaaa	2100
aaatgggtgga	gcagtgaggc	tgggaatccc	aagtgcmeta	ttgcaattgt	tttgggaaga	2160
actcaaaaata	cttctctctc	caggtaatta	aacaattctg	attgagaac	ctgtgtagga	2220
atgagccagt	cttctctcta	tctaggtaat	ttacttaaaa	ttcactgttt	ggactcacia	2280
atcataatgt	aagatatgag	agtaaatgtc	atatatttgt	atctcacaag	tattttctaa	2340
caggtgtttt	tggaaaacat	tatagggagt	attgctgaac	attctctgct	gtggaatttt	2400
cagtattaga	aagtgttgct	aaattatcaa	agctgtttgg	attaaattat	cagacaaatt	2460
ttttcagacc	tgtgtaatga	agtgattaga	tgttttagatc	aaaggcaata	atcttgaaa	2519

【手続補正書】**【提出日】**平成14年4月18日(2002.4.18)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 以下の(a)乃至(d)を有する群から選択したアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチド。

(a) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列

(b) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列

(c) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片

(d) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片

【請求項2】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択した請求項1に記載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】 請求項2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5】 配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号16を有する群から選択した請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合し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7】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項8】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項9】 請求項1に記載のポリペプチドを製造する方法であって、
(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、
(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とからなり、
前記組換えポリヌクレオチドが、請求項1に記載の前記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したプロモーター配列を有することを特徴とする方法。

【請求項10】 請求項1に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項11】 以下の(a)乃至(e)を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含む実質上単離されたポリヌクレオチド。

(a) 配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列

(b) 配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号16を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列

(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド配列

(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド配列

(e) (a)～(d)のRNA等価物

【請求項12】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続した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13】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標

的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、

前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、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ことを特徴とする方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを有することを特徴とする医薬品成分。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16に記載の医薬品成分。

【請求項18】 機能性OXRDの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項16に記載の医薬品成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項19に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする医薬品成分。

【請求項21】 機能性OXRDの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項20に記載の医薬品成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項22に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする医薬品成分。

【請求項24】 機能性OXRDの過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項23に記載の医薬品成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 適切な条件下で請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、

(c) 試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、

試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

【請求項27】 請求項5に記載の配列を有する標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために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す過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項28】 請求項5に記載の配列を有する標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために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の発現に適した条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、

(c) 種々の量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項29】 試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブと、請求項11に記載のポリヌクレオチドまたはその断片のポリヌクレオチド配列を有する前記生物学的サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間に、特定のハイブリタイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記処理されたサンプルの核酸を前記プローブでハイブリタイズする過程と、

(c) 前記ハイブリタイゼーション複合体の量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合

体の量を、処理されていない生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、

前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

【請求項30】 前記ポリペプチドが配列番号1の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項31】 前記ポリペプチドが配列番号2の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項32】 前記ポリペプチドが配列番号3の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項33】 前記ポリペプチドが配列番号4の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項34】 前記ポリペプチドが配列番号6の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項35】 前記ポリペプチドが配列番号7の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項36】 前記ポリペプチドが配列番号8の配列を有することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項37】 生物学的サンプル中のヒトオキシドレダクターゼタンパク質(OXRD)に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

(a) 前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成されるのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項10に記載の抗体と結合する過程と、

(b) 前記複合体を検出する過程とを含み、

前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相關することを特徴とする方法。

【請求項38】 前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

- (c) Fab断片
- (d) F(ab')₂断片
- (e) ヒト化抗体

のいずれかであることを特徴とする請求項10に記載の抗体。

【請求項39】 請求項10に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む化合物。

【請求項40】 被検者のヒトオキシドレダクターゼタンパク質(OXRD)の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項39に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項41】 前記抗体が標識されることを特徴とする請求項39に記載の化合物。

【請求項42】 被検者のヒトオキシドレダクターゼタンパク質(OXRD)の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項41に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項43】 請求項10に記載の抗体の特異性を有するポリクロナール抗体を調製する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列またはその免疫抗原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなポリクロナール抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項44】 請求項43に記載の方法で産出した抗体。

【請求項45】 請求項44に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項46】 請求項10に記載の抗体の特異性を有する抗体を用いてモノクロナール抗体を製造する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列またはその免疫抗原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

(c) 不滅の細胞を用いて前記抗体産出細胞を融合して、モノクロナール抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するような前記培養モノクロナール抗体から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項47】 請求項46に記載の方法で産出したモノクロナール抗体。

【請求項48】 請求項47に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項49】 Fab発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項10に記載の抗体。

【請求項50】 組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項10に記載の抗体。

【請求項51】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項10に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、

該特異結合が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号

6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

【請求項52】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a)前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項10に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b)前記サンプルから前記抗体を分離し、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7及び配列番号8を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項53】 自身の少なくとも1つの要素が請求項12に記載のポリヌクレオチドであるマイクロアレイ。

【請求項54】 ポリヌクレオチドを有するサンプルの転写イメージを生成する方法であって、

(a)前記サンプルの前記ポリヌクレオチドを標識する過程と、

(b)ハイブリダイゼーション複合体の形成に適した条件下で、請求項30に記載のマイクロアレイの前記要素を前記サンプルの標識されたポリヌクレオチドに接触させる過程と、

(c)前記サンプル中での前記ポリヌクレオチドの発現を定量する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項55】 固体基質上の異なる物理位置に固定された異なるヌクレオチド分子を有するアレイであって、少なくとも1つの前記ヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするような第1オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を有し、前記標的ポリヌクレオチドが請求項11に記載の配列を有することを特徴とするアレイ。

【請求項56】 前記第1オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列が、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチドに完

全に相補的であることを特徴とする請求項55に記載の阵列。

【請求項57】 前記第1オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列が、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とする請求項55に記載の阵列。

【請求項58】 前記阵列がマイクロ阵列であることを特徴とする請求項55に記載の阵列。

【請求項59】 前記第1オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列にハイブリダイズされた前記標的ポリヌクレオチドを更に有することを特徴とする請求項55に記載の阵列。

【請求項60】 リンカーが少なくとも1つの前記ポリヌクレオチド分子を前記固体基質に結合させることを特徴とする請求項55に記載の阵列。

【請求項61】 前記固体基質上の異なる物理位置が各々同一配列を有する複数のヌクレオチド分子を含み、前記固体基質上の異なる物理位置が各々前記基質上の別の物理位置において前記ヌクレオチド分子の配列とは異なる配列を有するヌクレオチド分子を含むことを特徴とする請求項55に記載の阵列。

【請求項62】 配列番号1のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項63】 配列番号2のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項64】 配列番号3のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項65】 配列番号4のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項66】 配列番号6のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項67】 配列番号7のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項68】 配列番号8のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項69】 配列番号9のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項70】 配列番号10のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項71】 配列番号11のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項72】 配列番号12のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項73】 配列番号14のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項74】 配列番号15のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項75】 配列番号16のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/13879
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C07K16/18 C07K16/40 C12Q1/68 A61K38/44		
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 C07K C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 45435 A (GENETICS INSTITUTE, INC.) 15 October 1998 (1998-10-15)	1,3, 6-16,18, 19,22, 25-27
A	abstract page 1, line 1 -page 2, line 6 page 48; table 2 page 56, line 1 -page 64, line 21 page 80, line 1 -page 86, line 2 page 87; table 3 SEQ ID NO: 580, EST clone B673 page 287 -page 288 page 590 -page 631; claims 1-8 --- -/--	2,4,5,17
<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.
^a Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 October 2000		Date of mailing of the international search report 11. 1. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuchs, U

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/13879
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL database, Heidelberg, FRG Emest Hum20 accession number AA376285 18 April 1997 ADAMS, M.D. ET AL.: "EST88740 HSC172 cells II Homo sapiens cDNA 5' end similar to male sterility 2" XP002149757 the whole document ---	11-15
P,X	EMBL database, Heidelberg, FRG Emhtg accession number AC013828 16 November 1999 BIRREN, B. ET AL.: "Homo sapiens clone RP11-23B7, WORKING DRAFT SEQUENCE, 20 unordered pieces" XP002149758 the whole document ---	11-15
A	WO 98 20137 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 14 May 1998 (1998-05-14) abstract page 3, line 13 - line 29 page 38, line 14 -page 46, line 27 page 53 -page 54; claims 1-17 ---	1-19,22, 25-27
A	WO 96 08568 A (GOVERNMENT USA, SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 21 March 1996 (1996-03-21) abstract page 3, line 17 -page 4, line 10 page 10, line 5 -page 42, line 27 page 63 -page 66; claims 1-31 -----	1-19,22, 25-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/13879

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 claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 20, 21, 23 and 24
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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.:
1-19, 22, 25-27 partially

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

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-19, 22, 25-27 partially

Invention 1

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: a) an amino acid sequence having the SEQ ID NO: 1, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1, c) a biologically active fragment of SEQ ID NO: 1, d) an immunogenic fragment of SEQ ID NO: 1; an isolated polynucleotide encoding said polypeptide; a recombinant polynucleotide comprising said polynucleotide; a cell transformed with said recombinant polynucleotide; a transgenic organism comprising said recombinant polynucleotide; a method for producing said polypeptide; an isolated antibody which specifically binds to said polypeptide; an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: a) a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 9, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 9, c) a polynucleotide sequence complementary to a); d) a polynucleotide sequence complementary to b); an RNA equivalent of a)-d); a method for detecting a target polynucleotide in a sample having the sequence of said polynucleotide by hybridizing with a probe or by PCR; a pharmaceutical composition comprising an effective amount of said polypeptide; a method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional OXR0, comprising administering to a patient said pharmaceutical composition; a method for screening a compound for effectiveness as an agonist or antagonist of said polypeptide; a method for screening for a compound that specifically binds to said polypeptide or that modulates the activity of said polypeptide; a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 9;

2. Claims: 1-19, 22, 25-27 partially

Invention 2

Idem as subject 1 but limited to SEQ ID NOS: 2 and 10;

3.-7. Claims: 1-19, 22, 25-27 partially

Inventions 3-7

Idem as subject 1 but limited to SEQ ID NOS: 3, 4, 6-8 and 11, 12, 14-16.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 20, 21, 23 and 24

Claims 20, 21, 23 and 24 refer to an agonist and an antagonist of a polypeptide of claim 1 without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT).

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the result to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/13879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9845435 A	15-10-1998	AU 6956698 A	30-10-1998
		EP 0973898 A	26-01-2000
WO 9820137 A	14-05-1998	US 5861496 A	19-01-1999
		AU 5585898 A	29-05-1998
		EP 0941342 A	15-09-1999
WO 9608568 A	21-03-1996	US 5856454 A	05-01-1999
		AU 690347 B	23-04-1998
		AU 3680195 A	29-03-1996
		CA 2199808 A	21-03-1996
		EP 0784687 A	23-07-1997
		US 6015673 A	18-01-2000

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 37/02	1 0 5	A 6 1 P 43/00	1 0 5 4 C 0 8 4
43/00		C 0 7 K 16/40	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		9/04	Z
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
9/04		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
33/53	5/00	A	
	A 6 1 K 37/50		

(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, MZ, 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 ボーグン、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 リュ、デュング・アイナ・エム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95136・
 サンノゼ・パークベルモントプレイス 55

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB07 BB10 BB14
BB50 BB51 DA13 DA36 FA16
FB01 FB02 FB05
4B024 AA01 AA11 BA08 CA04 DA02
DA06 EA04 FA02 GA11 HA12
HA15
4B050 CC03 DD07 LL01 LL03
4B063 QA19 QA20 QQ44 QR08 QR36
QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01
BA02 CA28 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA07 BA23 DC23
NA14 ZA01 ZA24 ZB07 ZB11
ZB21 ZB26 ZC54
4H045 AA11 CA40 DA75 EA22 EA28
EA50 FA72

专利名称(译)	氧化还原酶蛋白		
公开(公告)号	JP2003517288A	公开(公告)日	2003-05-27
申请号	JP2000620057	申请日	2000-05-19
[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	ユエヘンリー タングワイトム ボーグンマライアアール リュデユングアイナエム		
发明人	ユエ、ヘンリー タング、ワイ・トム ボーグン、マライア・アール リュ、デユング・アイナ・エム		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/44 A61P25/00 A61P25/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N9/04 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P29/00 C12N9/0004		
FI分类号	A61P25/00 A61P25/02.103 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00 A61P43/00.105 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/04.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/50		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB07 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA08 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ44 4B063/QR08 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA28 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA23 4C084/DC23 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA24 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZC54 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	60/135049 1999-05-20 US 60/136740 1999-05-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了人氧化还原酶蛋白 (OXRD) 和鉴定和编码OXRD的多核苷酸。 本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。 此外，本发明提供了一种用于诊断，治疗或预防与OXRD表达有关的疾病的方法。

