

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-198

(P2004-198A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 25/14	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 請求項の数 19 O L	(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-113158 (P2003-113158)	(71) 出願人	597173680
(22) 出願日	平成15年4月17日 (2003. 4. 17)		スミスクライン ビーチャム コーポレー ション
(62) 分割の表示	特願平10-239286の分割		アメリカ合衆国 1 9 1 0 3 ペンシルベ ニア州, フィラデルフィア, ワン フラン クリン プラザ (番地なし)
原出願日	平成10年8月25日 (1998. 8. 25)		
(31) 優先権主張番号	08/920234	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成9年8月25日 (1997. 8. 25)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100107168
			弁理士 安田 徹夫
(特許庁注: 以下のものは登録商標)			
Windows			
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ショウジョウバエK U Z遺伝子に関連したヒト・ディスプレイグリン・メタロプロテアーゼ

(57) 【要約】

【課題】ヒトK U Zポリペプチドおよびポリヌクレオチド並びに前記ポリペプチドの組換え法による生産方法を提供する。

【解決手段】配列番号2のヒトK U Zポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と全長において少なくとも80%同一であり、かつヒトK U Zポリペプチドの活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはこのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【効果】ヒトK U Zポリペプチドおよびポリヌクレオチドは炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患を含む機能障害または疾病の治療と、このような症状の診断アッセイに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のヒト K U Z ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と全長において少なくとも 80% 同一であり、かつヒト K U Z ポリペプチドの活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはこのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記のポリヌクレオチドが、配列番号 2 のヒト K U Z ポリペプチドをコードする配列番号 1 中に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記のポリヌクレオチドが、その全長において配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 80% 同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

配列番号 1 のポリヌクレオチドである、請求項 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

D N A または R N A である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

配列番号 2 のヒト K U Z ポリペプチドのアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失または置換されており、かつヒト K U Z ポリペプチドの活性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 7】

下記発現系が適合性の宿主細胞内に存在するとき配列番号 2 のポリペプチドと少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を含むヒト K U Z ポリペプチドを産生することができる発現系を含んでなる D N A または R N A 分子。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現系を含有する宿主細胞。

【請求項 9】

ヒト K U Z ポリペプチドを産生させるのに十分な条件下で請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、この培養物から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる、ヒト K U Z ポリペプチドの産生方法。

【請求項 10】

宿主細胞が適当な培養条件下でヒト K U Z ポリペプチドを産生するように、請求項 7 に記載の発現系を用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、ヒト K U Z ポリペプチドを産生する細胞の作製方法。

【請求項 11】

全長において配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一であるアミノ酸配列を含んでなるヒト K U Z ポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 11 に記載のヒト K U Z ポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項 14】

請求項 11 に記載のヒト K U Z ポリペプチドの活性増加または発現増加を必要としている患者を治療するための医薬組成物であって、治療に有効な量の、前記ポリペプチド活性の *in vivo* 生産をもたらす形の、配列番号 2 のヒト K U Z ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と全長において少なくとも 80% 同一であるヌクレオチド配列、または前記ヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、
を含んでなる医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

請求項 11 に記載のヒト K U Z ポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、治療に有効な量の、

- (a) 前記ポリペプチドに対するアンタゴニスト、および/または
 - (b) 前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を抑制する核酸分子、および/または
 - (c) 前記ポリペプチドのリガンド、基質または受容体に関して前記ポリペプチドと競合するポリペプチド、
- を含んでなる医薬組成物。

【請求項 16】

請求項 11 に記載のヒト K U Z ポリペプチドの発現または活性と関連した被験者の疾病またはその罹病性の検出方法であって、

- (a) 前記被験者のゲノム中にヒト K U Z ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の突然変異があるかどうかを調べる、および/または
 - (b) 前記被験者から得られたサンプル中のヒト K U Z ポリペプチド発現の存在または量を分析する、
- ことを含んでなる方法。

【請求項 17】

請求項 11 に記載のヒト K U Z ポリペプチドを阻害（拮抗）または活性化する化合物の同定方法であって、

- (a) ヒト K U Z ポリペプチドを発現している細胞（もしくはヒト K U Z ポリペプチドを発現している細胞膜）またはヒト K U Z ポリペプチドに応答する細胞と候補化合物とを接触させ、そして
 - (b) その結合、または機能的応答の刺激もしくは抑制を観察するか、または候補化合物と接触させた細胞（または細胞膜）の能力を、接触させなかった同一の細胞と、ヒト K U Z ポリペプチド活性に関して比較する、
- ことを含んでなる方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法により同定されたアンタゴニスト。

【請求項 19】

請求項 10 に記載の方法により作製された組換え宿主細胞、またはヒト K U Z ポリペプチドを発現しているその膜。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチド、このポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、前記のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、並びにその生産方法に関する。より詳細には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは A D A M ファミリーに関係しており、以後ヒト K U Z と記す。本発明はまた、このようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用を阻害または活性化することに関する。

【0002】

【従来の技術】

ショウジョウバエ K U Z 遺伝子のヒト相同体として知られるタンパク質はメタロプロテアーゼの A D A M ファミリーのメンバーである。このプロテアーゼおよび別のファミリーメンバーである T N F 転換酵素は、プロ T N F をプロセシングして T N F の成熟形態にすることが示された (Blackら、Nature 385:729、1997; Lunnら、FEBS Lett. 400:333-335, 1997)。したがって、このメンバーおよび追加のファミリーメンバーが、他のサイトカイン、成長因子、または受容体のプロセシングにおいて何らかの役割を担っていることが予想されるだろう。プロセシングが生じ、かつその生化学が A D A M ファミリーのメンバーを含む機構と一致する他のサイ

10

20

30

40

50

トカインや受容体には、CD23、L-セレクチン、FASリガンド、CD16およびその他が含まれる(Hooperら、Biochem J. 321, 265-279, 1997に概説されている)。存在しうる基質とADAMファミリーメンバーとの関係は不明であり、そのためヒトKUZタンパク質は1以上の細胞型においてこれらのサイトカインおよび成長因子の任意の組合わせのプロセッシングに参与している可能性がある。他のファミリーメンバーであるメルトリン(meltrin)とフェルチリン(fertilin)は、細胞-細胞融合に参与している(Yagami-Hiromasara、Nature 377: 652-656 (1995))。ヒトKUZタンパク質のウシ相同体は基質としてミエリンを使用することが示されており(Howardら、Biochem J. 317: 45-50, 1996)、またショウジョウバエKUZ遺伝子産物は神経分化に参与している(Rookeら、Science 273: 1227-1231, 1996)。これらのプロセッシング酵素の1以上を阻害することは、炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患における治療上の有用性をもちうる。

10

こうしたことは、ADAMファミリーに治療標的としての確立され実証された歴史があることを示している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

明らかに、炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患を含むがこれらに限らない、機能障害または疾病を予防し、改善し、治療する上で何らかの役割を果たすADAMファミリーの新たなメンバーを同定して特性付ける必要性が存在している。本発明はこのようなメンバーを提供するものである。

20

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明は、一つの態様において、ヒトKUZポリペプチドおよび組換え物質、並びにその生産方法に関する。本発明のもう一つの態様はヒトKUZポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。こうした使用には、とりわけ、炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患の治療が含まれる。他の態様では、本発明は、本発明により提供される物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニストを同定する方法、並びに同定された化合物を用いてヒトKUZの平衡異常と関連した状態を治療することに関する。本発明のさらに他の態様は、不適当なヒトKUZ活性またはヒトKUZレベルと関連した疾病を検出するための診断アッセイに関する。

30

【0005】

定義

下記の定義は、本明細書中で頻繁に使用される用語を理解しやすくするためのものである。

「ヒトKUZ」とは、特に、一般的には配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそのアレリック変異体を意味する。

「ヒトKUZ活性もしくはヒトKUZポリペプチド活性」または「ヒトKUZもしくはヒトKUZポリペプチドの生物学的活性」とは、類似の活性、向上した活性、または望ましくない副作用が低下したこれらの活性を含めて、ヒトKUZの代謝的または生理的機能を意味する。さらに、前記ヒトKUZの抗原的および免疫原的活性も含まれる。

40

「ヒトKUZ遺伝子」とは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはそのアレリック変異体および/またはそれらの相補体を意味する。

【0006】

本明細書中で用いる「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

「単離された」とは、天然の状態から「人間の手によって」改変されたことを意味する。

「単離された」組成物または物質が天然に存在するのであれば、それはそのもとの環境か

50

ら変化しているか移動しており、またはその両方である。例えば、生存している動物の体内に自然界で存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態の共存物質から分離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書中で用いられるように、「単離された」ものである。

【0007】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをさし、これは修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであり得る。「ポリヌクレオチド」には、制限するものではないが、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域が混じり合ったDNA、一本鎖および二本鎖RNA、一本鎖領域と二本鎖領域が混じり合ったRNA、DNAとRNAを含むハイブリッド分子（一本鎖でも、またはより典型的には二本鎖でもよく、一本鎖領域と二本鎖領域が混じり合ったものでもよい）が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」はRNAまたはDNAまたはRNAとDNAの両方からなる三重鎖領域を意味する。「ポリヌクレオチド」という用語はまた、1個以上の修飾塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。「修飾」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような特殊な塩基がある。DNAおよびRNAに対してさまざまな修飾が行われてきた。こうして、「ポリヌクレオチド」は、自然界に一般的に存在するポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、並びにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。また、「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと称される比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

10

20

【0008】

「ポリペプチド」とは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合（すなわち、ペプチドアイソスター）により連結された2個以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を意味する。「ポリペプチド」は短鎖（通常はペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーという）と長鎖（一般的にはタンパク質という）の両方をさす。ポリペプチドは20種類の遺伝子コード化アミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセスで、または当技術分野で公知の化学的修飾法のいずれかで修飾されたアミノ酸配列を含む。このような修飾は基本的な教科書、より詳細な学術論文および研究文献に詳述されている。修飾はペプチド骨格、アミノ酸側鎖、アミノまたはカルボキシル末端を含めてポリペプチドのどこでも行うことができる。同じタイプの修飾が所定のポリペプチドのいくつかの部位に同程度でまたはさまざまに異なる程度で存在してもよい。また、所定のポリペプチドが多くタイプの修飾を含んでいてもよい。ポリペプチドはユビキチン化のために分枝していても、分枝のある又はない環状であってもよい。環状の、分枝した、または分枝した環状のポリペプチドは翻訳後の天然プロセスから生じることがあり、また、合成法によって製造することもできる。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、ユビキチン化などがある。例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson 編, Academic Press, New York, 1983中のWorld, F., Posttranslational Protein Modi

30

40

50

f i c a t i o n s : P e r s p e c t i v e s a n d P r o s p e c t s , p g s . 1 - 1 2 ; S e i f t e r ら , " A n a l y s i s f o r p r o t e i n m o d i f i c a t i o n s a n d n o n p r o t e i n c o f a c t o r s " , M e t h E n z y m o l (1 9 9 0) 1 8 2 : 6 2 6 - 6 4 6 ; お よ び R a t t a n ら , " P r o t e i n S y n t h e s i s : P o s t t r a n s l a t i o n a l M o d i f i c a t i o n s a n d A g i n g " , A n n N Y A c a d S c i (1 9 9 2) 6 6 3 : 4 8 - 6 2 を 参 照 の こ と 。

【 0 0 0 9 】

本明細書中で用いる「変異体」とは、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、不可欠な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。典型的なポリヌクレオチドの変異体は基準ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列の点で相違する。この変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下で述べるように、基準配列によりコードされるポリペプチドにおいてアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端切断(トランケーション)を生じさせることができる。典型的なポリペプチドの変異体は基準ポリペプチドとアミノ酸配列の点で相違する。一般的には、基準ポリペプチドの配列と変異体の配列が全般的によく類似しており、多くの領域で同一となるような相違に限られる。変異体と基準ポリペプチドは任意に組み合わせた1以上の置換、付加、欠失によりアミノ酸配列が相違してよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は遺伝子コードによりコードされるものであっても、なくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体はアレリック変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変異体は、突然変異誘発法または直接合成により調製することができる。

【 0 0 1 0 】

「同一性」はヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、最大級の整合(一致)が得られるように配列を並べる。「同一性」それ自体は当技術分野で認識された意味をもち、発表された技法を使って計算することができる。例えば、COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M. 編, Oxford University Press, New York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W. 編, Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M. and Griffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991を参照のこと。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の同一性を決定する方法は多数存在していると同時に、「同一性」なる用語は当業者には公知である(Carillo, H. and Lipton, D., SIAM J Applied Math (1988) 48:1073)。2つの配列間の同一性または類似性を決定するために汎用される方法としては、Guide to Huger Computers, Martin J. Bishop 編, Academic Press, San Diego, 1994 および Carillo, H. and Lipton, D., SIAM J Applied Math (1988) 48:1073 に記載される方法があるが、これらに限らない。同一性および類似性の決定方法はコンピュータプログラムに集成されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好適なコンピュータプログラム法としては、

10

20

30

40

50

G C S プログラムパッケージ (D e v e r e u x , J . ら , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h (1 9 8 4) 1 2 (1) : 3 8 7) 、 B L A S T P 、 B L A S T N 、 F A S T A (A t s c h u l , S . F . ら , J M o l e c B i o l (1 9 9 0) 2 1 5 : 4 0 3) があがあるが、これらに限らない。

【0011】

一例として、配列番号1の基準ヌクレオチド配列に対して、例えば、少なくとも95%の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が配列番号1の基準ヌクレオチド配列のそれぞれ100ヌクレオチドにつき最高で5つの点突然変異を含みうることを除けば、基準配列と同一であることを意図している。言い換えると、基準ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るには、基準配列中の5%までのヌクレオチドを欠失させるか、他のヌクレオチドで置換するか、または基準配列中の全ヌクレオチドの5%までのヌクレオチド数を基準配列に挿入すればよい。基準配列のこれらの突然変異は、基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間どこかで起こり、基準配列中のヌクレオチドの間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして配置することができる。

10

【0012】

同様に、配列番号2の基準アミノ酸配列に対して、例えば、少なくとも95%の「同一性」を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、このポリペプチド配列が配列番号2の基準アミノ酸配列のそれぞれ100アミノ酸につき最高で5つのアミノ酸変更を含みうることを除けば、基準配列と同一であることを意図している。言い換えると、基準アミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るには、基準配列中の5%までのアミノ酸残基を欠失させるか、他のアミノ酸で置換するか、または基準配列中の全アミノ酸残基の5%までのアミノ酸数を基準配列に挿入すればよい。基準配列のこれらの変更は、基準アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間どこかで起こり、基準配列中のアミノ酸残基の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして配置することができる。

20

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のポリペプチド

一つの態様において、本発明はヒトKUZポリペプチド(またはヒトKUZタンパク質)に関する。このヒトKUZポリペプチドには、配列番号2のポリペプチドだけでなく、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド、その全長において配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドも含まれる。さらに、少なくとも97~99%同一であるものが非常に好適である。また、その全長において配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドもヒトKUZポリペプチドに含まれる。さらに、少なくとも97~99%同一であるものが非常に好適である。ヒトKUZポリペプチドはヒトKUZの少なくとも1つの生物学的活性を示すことが好ましい。

30

40

【0014】

ヒトKUZポリペプチドは「成熟」タンパク質の形であっても、融合タンパク質のような、より大きいタンパク質の一部であってもよい。しばしば、追加のアミノ酸配列を含めることが有利であり、このようなアミノ酸配列としては、分泌すなわちリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え生産の際の安定性を確保する付加的配列などがある。

【0015】

また、ヒトKUZポリペプチドの断片も本発明に含まれる。こうした断片は全体的に前記ヒトKUZポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミ

50

ノ酸配列を有するポリペプチドである。ヒトKUZポリペプチドと同様に、断片は「フリースタンディング」(それ自体で独立)していても、より大きいポリペプチド内に含まれていてもよく、つまりその大きいポリペプチドの一部または一領域、最も好ましくは一つの連続領域、を断片が構成していてもよい。本発明のポリペプチド断片の代表的な例として、およそその見当でアミノ酸番号1-20、21-40、41-60、61-80、81-100、および101からヒトKUZポリペプチドの末端までの断片が挙げられる。ここで、「およそ」とは、上記の範囲の一端または両端で数個、5個、4個、3個、2個または1個のアミノ酸が増えたり減ったりした範囲を含むものである。

【0016】

好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含むものとカルボキシル末端を含むものとの二連の残基の欠失を除いた、ヒトKUZポリペプチドのアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、ヘリックスとヘリックス形成領域、シートとシート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。その他の好適な断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は、同様の活性をもつ断片、その活性が向上した断片、または望ましくない活性が減少した断片を含めて、ヒトKUZ活性を媒介するものである。さらに、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性がある断片も含まれる。

【0017】

これらのポリペプチド断片はどれも、抗原活性を含めたヒトKUZの生物学的活性を保持することが好ましい。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は同類アミノ酸置換により対象物と異なるもの、すなわち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、Ala, Val, Leu と Ileの間; Ser と Thr の間; 酸性残基 AspとGluの間; Asn とGln の間; 塩基性残基 LysとArg の間; または芳香族残基 PheとTyr の間で起こる。特に、数個、5~10個、1~5個または1~2個のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加されている変異型が好適である。

【0018】

本発明のヒトKUZポリペプチドは任意の適当な方法で製造することができる。このようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより製造されたポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドの製造のための手段は当業界でよく理解されている。

【0019】

本発明のポリヌクレオチド

本発明のもう一つの態様はヒトKUZポリヌクレオチドに関する。ヒトKUZポリヌクレオチドには、ヒトKUZポリペプチドおよび断片をコードする単離されたポリヌクレオチド、並びにこれらと密接に関連したポリヌクレオチドが含まれる。さらに特定すると、本発明のヒトKUZポリヌクレオチドとしては、配列番号2のヒトKUZポリペプチドをコードする配列番号1中に含まれるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号1の特定配列を有するポリヌクレオチドがある。さらに、ヒトKUZポリヌクレオチドには、配列番号2のヒトKUZポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と全長において少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号1のヌクレオチド配列と全長において少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。これに関連して、少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドが好適であり、特に少なくとも95%同一であるものが好適である。さらに、少なくとも97%同一であるものがより好ましく、少なくとも98~99%同一であるものがより一層好ましく、少なくとも99%同一であるものが最も好ましい。また、増幅

10

20

30

40

50

反応に使用できる条件下、またはプローブやマーカーとして使用できる条件下でハイブリダイズするのに十分な、配列番号1中に含まれるヌクレオチド配列との同一性を有するヌクレオチド配列もヒトKUZポリヌクレオチドに含まれる。本発明はまた、このようなヒトKUZポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

本発明のヒトKUZは、ヒトKUZをコードする表1のcDNA(配列番号1)の配列決定の結果により示されるように、ADAMファミリーの他のタンパク質と構造的に関連している。配列番号1のcDNA配列は配列番号2の748個のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム(ヌクレオチド番号113-2356)を含んでいる。表2のアミノ酸配列(配列番号2)は748個のアミノ酸残基においてB . taurusメタロプロテアーゼ(Howard, L.ら、Biochem J. 317, 45-50, (1996))と約97%の同一性を有し、また589個のアミノ酸残基においてディスインテグリン(disintegrin)・メタロプロテアーゼについての部分ヒトクローン(GenBank Z48579)と99%の同一性を有する(BLAST使用)。さらに、ヒトKUZ(配列番号2)は589個のアミノ酸残基においてショウジョウバエKUZ遺伝子と49%の同一性を有する(Rooke, J.ら、Science 273, 1227-1231, 1996)。また、ヒトKUZ(配列番号2)は805個のアミノ酸残基においてTNF- 転換酵素と25%の同一性を有する(Black, R.ら、Nature, 385:729-733, 1997; Moss, M. L.ら、Nature 385:733-736, 1997)。表1のヌクレオチド配列(配列番号1)は2255個のヌクレオチド残基においてB . taurusメタロプロテアーゼ(Howard, L.ら、Biochem J. 317, 45-50, (1996))と約94%の同一性を有し、また2116個のヌクレオチド残基においてディスインテグリン・メタロプロテアーゼについての部分ヒトクローン(GenBank Z48579)と100%の同一性を有する(BLAST使用)。したがって、本発明のヒトKUZポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、とりわけ、それらの相同ポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物学的機能/特性をもつことが予測され、それらの有用性は当業者には自明である。

10

20

【0021】

ヒトKUZのヌクレオチド配列(配列番号1)

30

【表1】

GTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCTCCGGACCAAGCCCCTTCAGCTTCTCCCTCCGGATCGAT
GTGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGGCGGCGGGCGGCAGCGGCAGCGGAAGATGGTGT
GCTGAGAGTGTTAATTCTGCTCCTCTCCTGGGCGGCGGGGATGGGAGGTGAGTATGGGAA
TCCTTTAAATAAATATATCAGACATTATGAAGGATTATCTTACAATGTGGATTCAATACA
CCAAAAACACCAGCGTGCCAAAAGAGCAGTCTCACATGAAGACCAATTTTTACGTCTAGA
TTCCATGCCCATGGAAGACATTTCAACCTACGAATGAAGAGGGACACTTCCCTTTTCAG
TGATGAATTTAAAGTAGAAACATCAAATAAAGTACTTGATTATGATACCTCTCATATTTA
CACTGGACATATTTATGGTGAAGAAGGAAGTTTTAGCCATGGGTCTGTTATTGATGGAAG
ATTTGAAGGATTCATCCAGACTCGTGGTGGCACATTTTATGTTGAGCCAGCAGAGAGATA
TATTAAGACCGAACTCTGCCATTTCACTCTGTCATTTATCATGAAGATGATATTAATA
TCCCCATAAATACGGTCTCAGGGGGCTGTGCAGATCATTGAGTATTTGAAAGAATGAG
GAAATACCAGATGACTGGTGTAGAGGAAGTAACACAGATACCTCAAGAAGAACATGCTGC
TAATGGTCCAGAACTTCTGAGGAAAAACGTACAACCTCAGCTGAAAAAATACTTGTCA
GCTTTATATTCAGACTGATCATTGTTCTTTAAATATTACGGAACACGAGAAGCTGTGAT
TGCCCAGATATCCAGTCATGTTAAAGCGATTGATACAATTTACCAGACCACAGACTTCTC
CGGAATCCGTAACATCAGTTTCATGGTCAAACGCATAAGAATCAATACAACCTGCTGATGA
GAAGGACCCTACAAATCCTTTCCGTTTCCCAAATATTGGTGTGGAGAAGTTTCTGGAATT
GAATTCTGAGCAGAATCATGATGACTACTGTTTGGCCTATGTCTTACAGACCGAGATTT
TGATGATGGCGTACTTGGTCTGGCTTGGGTTGGAGCACCTTCAGGAAGCTCTGGAGGAAT
ATGTGAAAAAGTAACTCTATTCAGATGGTAAGAAGAAGTCCTTAAACACTGGAATTAT
TACTGTTCAGAACTATGGGTCTCATGTACCTCCCAAAGTCTCTCACATTACTTTTGCTCA
CGAAGTTGGACATAACTTTGGATCCCCACATGATTCTGGAACAGAGTGCACACCAGGAGA
ATCTAAGAATTTGGGTCAAAAAGAAAATGGCAATTACATCATGTATGCAAGAGCAACATC
TGGGGACAACTTAACAACAATAAATTTCACTCTGTAGTATTAGAAATATAAGCCAAGT
TCTTGAGAAGAAGAGAAACAACCTGTTTTGTTGAATCTGGCCAACCTATTTGTGGAATGG
AATGGTAGAACAAGGTGAAGAATGTGATTGTGGCTATAGTGACCAGTGTAAAGATGAATG
CTGCTTCGATGCAAATCAACCAGAGGGAAGAAAATGCAAACCTGGAACCTGGGAAACAGTG
CAGTCCAAGTCAAGTCTTGTGTACAGCACAGTGTGCATTCAAGTCAAAGTCTGAGAA
GTGTCGGGATGATTCAGACTGTGCAAGGGAAGGAATATGTAATGGCTTACAGCTCTCTG

10

20

30

40

CCCAGCATCTGACCCTAAACCAAACCTTCACAGACTGTAATAGGCATACACAAGTGTGCAT
 TAATGGGCAATGTGCAGGTTCTATCTGTGAGAAATATGGCTTAGAGGAGTGTACGTGTGC
 CAGTTCTGATGGCAAAGATGATAAAGAATTATGCCATGTATGCTGTATGAAGAAAATGGA
 CCCATCAACTTGTGCCAGTACAGGGTCTGTGCAGTGGAGTAGGCACTTCAGTGGTCGAAC
 CATCACCCCTGCAACCTGGATCCCCTTGCAACGATTTTAGAGGTTACTGTGATGTTTTCAT
 GCGGTGCAGATTAGTAGATGCTGATGGTCTCTAGCTAGGCTTAAAAAGCAATTTTTAG
 TCCAGAGCTCTATGAAAACATTGCTGAATGGATTGTGGCTCATTGGTGGGCAGTATTACT
 TATGGGAATTGCTCTGATCATGCTAATGGCTGGATTTATTAAGATATGCAGTGTTCATAAC
 TCCAAGTAGTAATCCAAAGTTGCCTCCTCCTAAACCACTTCCAGGCACTTTAAAGAGGAG
 GAGACCTCCACAGCCATTACAGCAACCCAGCGTCAGCGGCCCCGAGAGAGTTATCAAAT
 GGGACACATGAGACGCTAACTGCAGCTTTTGCCTTGGTTCTTCTAGTGCCTACAATGGG
 AAACTTCACTCCAAAGAGAAACCTATTAAGTCATCATCTCCAACTAAACCCTCACAAG
 TAACAGTTGAAGAAAAAATGGCAAGAGATCATATCCTCAGACCAGGTGGAATTACTTAAA
 TTTTAAAGCCTGAAAATTTCAAATTTGGGGGTGGGAGGTGGAAAAGGAACCCAATTTTTCTT
 ATGAACAGATATTTTTAACTTAATGGCACAAAGTCTTAGAATATTATTATGTGCCCCGTG
 TTCCCTGTTCTTCGTTGCTGCATTTTCTTCACTTGCAGGCAAACCTTGGCTCTCAATAAAC
 TTTTACCACAAATTGAAATAAATATATTTTTTCAACTGCCAATCAAGGGTAGGAGGCTC
 GACCACCTCAACATTGGAGACATCACTTGCCAATGTACATACCTTGTTATATGCAGACAT
 GTATTTCTTACGTACACTGTACTTCTGTGTGCAATTGTAAACAGAAATTGCAATATGGAT
 GTTTCTTTGTATTATAAAATTTTTCCGCTCTTAATTAATAAATTACTGTTTAATTGACATA
 CTCAGGATAACAGAGAATGGTGGTATTACAGTGGTCCAGGATTCTGTAATGCTTTACACAG
 GCAGTTTTGAAATGAAATCAATTTACCTTTCTGTTACGATGGAGTTGGTTTTGATACTC
 ATTTTTCTTTATCACATGGCTGCTACGGGCACAAGTACTATACTGAAGAACACAGTTA
 AGTGTGTGCAAACCTGGACATAGCAGCACATACTACTTCAGAGTTCATGATGTAGATGTC
 TGGTTTCTGCTTACGTCTTTTAACTTTCTAATTCATTTTCAATTAATAGGTG
 AAATTTTATTCATGCTTTGATAGAAATTATGTCAATGAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAGG
 GCGGCCGCTCTAGAGGATCCCTCGAGGGGCCAAGCTTACGCGTGCATG

10

20

30

40

【 0 0 2 2 】

ヒトKUZのアミノ酸配列（配列番号2）

【表2】

MVLLRVL I LLLSWAAGMGQYGNPLNKY I RHYEGLSYNVDSLHQKHQRAKRAVSHEDQFL
 RLDFHAHGRHFNLRMKRDTSLF SDEFKVT SNKVL DYDTSHIYTGHIYGEEGSFSHGSVI
 DGRFEGFIQTRGGTFYVEPAERYIKDRITLPHFSVIYHEDDINYPHKYGPQGGCADHSVFE
 RMRKYQMTGVEEVQIPQEEHAANGPELLRKKRTTSAEKNTCQLYIQTDLFFKYYGTRE
 AVIAQISSHVKAIDTIYQTTDFSGIRNISFMVKRIRINTTADEKDPTNPF RFPNI GVEKF
 LELNSEQNDDYCLAYVFTDRDFDDGVLGLAWVGAPSGSSGGICEKSKLYSDGKKKSLNT
 GIITVQNYGSHVPPKVSHITFAHEVGHNFSGPHDSGTECTPGESEKLGQKENGNYIMYAR
 ATSGDKLNNKFSLCSIRNISQVLEKRNCFVESGQPICGNGMVEQGEECDGYSQCK
 DECCFDANQPEGRECKLPGKQCSPSQGPCCTAQCAFESKSEKCRDDSDCAREGICNGFT
 ALCPASDPKPNFTDCNRHTQVCINGQCAGSICEKYLEECTCASSDGKDDKELCHVCCMK
 KMDPSTCASTGVSQWSRHFSGRITLQPGSPCNDFRGYCDVFMRCRLVDADGPLARLKA
 IFPELYENIAEWIVAHWWAVLLMGIALIMMAGFIKICSVHTPSSNPKLPPPKPLPGTL
 KRRRPPQPIQQPQRQRPRESYQMGMRR

10

【0023】

20

ヒトKUZをコードする本発明の一つのポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニングにより、ヒト滑膜繊維芽細胞、ヒト破骨細胞腫、ヒト活性化単球、ヒトT細胞、ヒト結腸癌の細胞中のmRNAから誘導されたcDNAライブラリーから、エクスペンド・シークエンス・タグ(expressed sequence tag: EST)分析(Adams, M. D. ら, Science (1991) 252: 1651-1656; Adams, M. D. ら, Nature (1992) 355: 632-634; Adams, M. D. ら, Nature (1995) 377 Supp: 3-174)を用いて得ることができる。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノムDNAライブラリーのような天然源から得ることができ、商業的に入手可能な公知の技法を用いて合成することもできる。

30

【0024】

配列番号2のヒトKUZポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、表1中に含まれるポリペプチドコード配列(配列番号1のヌクレオチド番号113-2356)と同一であっても、遺伝子コードの重複性(縮重)のため、やはり配列番号2のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドをヒトKUZポリペプチドの組換え生産のために用いる場合、そのポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片単独、他のコード配列(例えば、リーダーもしくは分泌配列、プレ-、プロ-もしくはプレプロ-タンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードするもの)と同じリーディングフレーム内にある成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片が含まれる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明のこの態様の好ましい具体例として、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)により提供されかつGentz ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 821-824に記載されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはHAタグである。また、このポリヌクレオチドは5'および3'非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNA安定化配列を含んでいてもよい。

40

【0026】

さらに好適な具体例は、数個、5~10個、1~5個、1~3個、1~2個、または1個

50

のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、欠失または付加されている、表2のヒトKUZポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号2)を含むヒトKUZ変異型をコードするポリヌクレオチドである。

【0027】

本発明はさらに、前記の配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は特にストリンジェントな条件下で前記のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書中で用いる「ストリンジェントな条件」とは、配列間に少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性があるときだけハイブリダイゼーションが起こる条件を指す。

10

【0028】

配列番号1中に含まれるヌクレオチド配列またはその断片と同一であるか実質的に同一である本発明のポリヌクレオチドは、ヒトKUZポリペプチドをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するために、また、ヒトKUZ遺伝子との配列類似性が高い他の遺伝子(ヒト以外の種に由来する相同体およびオースログ体(ortholog)をコードする遺伝子を含む)のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために、cDNAおよびゲノムDNAのハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。このようなハイブリダイゼーション技法は当業者には公知である。一般的に、これらのヌクレオチド配列は対象物のヌクレオチド配列と80%、好ましくは90%、より好ましくは95%同一である。プローブはたいてい15個以上のヌクレオチドを含み、好ましくは30個以上を含み、50個以上のヌクレオチドを有していてもよい。特に好ましいプローブは30~50個の範囲のヌクレオチドを有するものである。

20

【0029】

一実施態様において、ヒトKUZポリペプチド(ヒト以外の種に由来する相同体およびオースログ体を含む)をコードするポリヌクレオチドを得ることは、配列番号1のヌクレオチド配列またはその断片を有する標識プローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングし、前記のポリヌクレオチド配列を含む全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する各工程を含んでなる。かくして、もう一つの態様では、本発明のヒトKUZポリヌクレオチドはさらに、配列番号1のヌクレオチド配列またはその断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んでなるヌクレオチド配列を含むものである。ヒトKUZポリペプチドも、前記のハイブリダイゼーション条件により得られたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを含む。このようなハイブリダイゼーション技法は当業者に公知である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は上で定義したとおりであるか、または、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl, 15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xDenhardt溶液、10%デキストラン硫酸および20μg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含有する溶液中で42°Cで一晩インキュベートし、次いでフィルターを0.1xSSC中約65°Cで洗浄する条件である。

30

【0030】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、動物およびヒトの疾病に対する治療薬および診断薬を探索するための研究用の試薬および材料として利用することができる。

40

【0031】

ベクター、宿主細胞、発現

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター、このベクターにより遺伝子操作された宿主細胞、および組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いてこの種のタンパク質を生産するための無細胞翻訳系も使用することができる。

【0032】

組換え体生産に関しては、本発明のポリヌクレオチドの発現系またはその一部を組み入れ

50

るために、宿主細胞が遺伝子操作される。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davis ら, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) および Sambrook ら, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション (transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング (scrape loading)、弾丸導入 (ballistic introduction) または感染により行うことができる。

【0033】

適当な宿主の代表的な例として、細菌細胞 (例: ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞 (例: 酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞 (例: ドロソフィラ S2、スポドプテラ Sf9)、動物細胞 (例: CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞) および植物細胞が挙げられる。

【0034】

多種多様な発現系を使用することができる。こうした発現系として、特に、染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、ウイルス (例: パキユロウイルス、SV40 のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス) 由来のベクター、およびこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものがある。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。一般的に、宿主内でのポリペプチドの産生のためにポリヌクレオチドを維持し、増やし、発現するのに適した系またはベクターはどれも使用することができる。Sambrook ら, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (前掲) に記載されるような、日常的に用いられる公知の技法のいずれかにより、適当なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。

【0035】

翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【0036】

スクリーニングアッセイで使用するためヒト KUZ ポリペプチドを発現させようとする場合、そのポリペプチドを細胞の表面に産生させることが好適である。この場合は、スクリーニングアッセイでの使用に先立って細胞を回収する。ヒト KUZ ポリペプチドが培地に分泌される場合は、そのポリペプチドを回収し精製するために培地を回収する。細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後ポリペプチドを回収する必要がある。

【0037】

組換え細胞培養物からヒト KUZ ポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。最も好ましくは、高速液体クロ

マトグラフィーが精製に用いられる。ポリペプチドが単離および/または精製中に変性されるときは、タンパク質を再生させるための公知の技法を用いて、活性のあるコンフォメーションを復元することが可能である。

【0038】

診断アッセイ

本発明はまた、診断薬としてのヒトKUZポリヌクレオチドの使用に関する。機能障害と関連したヒトKUZ遺伝子の変異型の検出は、ヒトKUZの過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾病またはその罹病性の診断に追加しうる、またはその診断を下しうる診断用ツールを提供するだろう。ヒトKUZ遺伝子に変異がある個体を、さまざまな技法によりDNAレベルで見つけ出すことができる。

10

【0039】

診断用の核酸は、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から得ることができる。検出のためにゲノムDNAを直接使用しても、分析前にPCRまたは他の増幅法を使って酵素的に増幅してもよい。同様の方法でRNAまたはcDNAを使用することもできる。欠失および挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅DNAを標識ヒトKUZヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることで同定できる。完全にマッチした配列とミスマッチの二重鎖とはRNアーゼ消化により、または融解温度の差異により区別できる。また、DNA配列の差異は、変性剤を用いるもしくは用いないゲルでのDNA断片の電気泳動の移動度の変化により、または直接DNA配列決定によっても検出できる（例えば、Myersら, Science (1985) 230:1242 を参照のこと）。特定位置での配列変化はヌクレアーゼプロテクションアッセイ（例えば、RNアーゼおよびS1プロテクション）または化学的開裂法によっても確認できる（Cottonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401 を参照のこと）。別の実施態様では、例えば、遺伝子変異の効率のよいスクリーニングを行うため、ヒトKUZヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技法は公知で、一般的な適用可能性を有し、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変異性を含めた分子遺伝学のさまざまな問題を解きあかすために用いられている（例えば、M. Cheeら, Science, Vol. 274, pp. 610-613 (1996) を参照のこと）。

20

30

【0040】

診断アッセイは、前記の方法によりヒトKUZ遺伝子の変異を検出することで、炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患への罹りやすさを診断または判定する方法を提供する。

【0041】

さらに、被験者から得られたサンプルからヒトKUZポリペプチドまたはヒトKUZ mRNAのレベルの異常な低下または増加を測定する方法により、炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患の診断を下すことができる。発現の低下または増加は、当技術分野で公知のポリヌクレオチド定量法のいずれか、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼプロテクション、ノーザンブロット、その他のハイブリダイゼーション法によりRNAレベルで測定することができる。宿主から得られたサンプル中のヒトKUZポリペプチドのようなタンパク質のレベルを測定するためのアッセイ法は当業者によく知られている。こうしたアッセイ法として、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、ELISAアッセイなどがある。

40

【0042】

かくして、もう一つの態様において、本発明は、疾病、特に、炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患またはこのような疾病への罹りやすさを診断するためのキットに関し、このキットは、

(a) ヒトKUZポリヌクレオチド（好ましくは、配列番号1のヌクレオチド配列）も

50

しくはその断片、

(b) (a) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、

(c) ヒトKUZポリペプチド(好ましくは、配列番号2のポリペプチド)もしくはその断片、または

(d) ヒトKUZポリペプチド(好ましくは、配列番号2のポリペプチド)に対する抗体、

を含んでなる。このようなキットにおいて、(a)、(b)、(c) または (d) が実質的な構成成分であることが理解されよう。

【0043】

染色体アッセイ

本発明のヌクレオチド配列はまた、染色体の同定にも有用である。この配列は個々のヒト染色体上の特定の位置を標的指向し、その特定位置とハイブリダイズすることができる。本発明に従って関連配列の染色体地図を作成することは、これらの配列と遺伝子関連疾患とを関連させる上で重要な第一段階である。ひとたび配列が正確な染色体位置にマッピングされたら、その染色体上のその配列の物理的位置を遺伝地図データと関連させることができる。この種のデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library からオンラインで入手可能) 中に見いだせる。その後、同一の染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関係を連鎖分析(物理的に隣接した遺伝子の共遺伝)により同定する。

【0044】

患者と正常個体とのcDNAまたはゲノム配列の差異も調べることができる。患者の一部または全部に変異が観察されるが、どの正常個体にも観察されない場合は、その変異が疾病の原因である可能性がある。

【0045】

抗体

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、ヒトKUZポリペプチドに免疫特異的な抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。「免疫特異的」とは、その抗体が従来技術における他の関連ポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0046】

ヒトKUZポリペプチドに対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物(好ましくはヒト以外)に該ポリペプチドまたはエピトープを含む断片、類似体もしくは細胞を投与することにより得られる。モノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす任意の技法を用いることができる。例を挙げると、ハイブリドーマ技法(Kohler, G.およびMilstein, C., Nature (1975) 256:495-497)、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法(Kozbor, Immunology Today (1983) 4:72) およびEBV-ハイブリドーマ技法(Cole, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) などがある。

【0047】

本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適応させることができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳動物を含む他の生物を利用することができる。

前記の抗体を用いて、そのポリペプチドを発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。

ヒトKUZポリペプチドに対する抗体は、とりわけ、炎症、神経変性、アレルギー性疾患

10

20

30

40

50

、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患の治療に使用できる可能性がある。

【0048】

ワクチン

本発明の別の態様は、哺乳動物において免疫学的応答を引き出す方法に関し、この方法は、特に炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患から前記動物を防御するための抗体および/またはT細胞免疫応答を生ずるのに十分なヒトKUZポリペプチドまたはその断片を哺乳動物に接種することを含んでなる。本発明のさらに別の態様は、哺乳動物を疾病から防御する抗体を産生させるような免疫学的応答を引き出すために、*in vivo* でヒトKUZポリヌクレオチドの発現を指令するベクターを介してヒトKUZポリペプチドを供給することを含んでなる、哺乳動物において免疫学的応答を引き出す方法に関する。

10

【0049】

本発明の更なる態様は、哺乳動物宿主に導入したとき、その哺乳動物においてヒトKUZポリペプチドに対する免疫学的応答を引き出す免疫学的/ワクチン製剤(組成物)に関し、この組成物はヒトKUZポリペプチドまたはヒトKUZ遺伝子を含む。ワクチン製剤は適当な担体をさらに含んでいてもよい。ヒトKUZポリペプチドは胃の中で分解されるので、非経口的(皮下、筋肉内、静脈内、皮内等への注射を含む)に投与することが好ましい。非経口投与に適した製剤としては、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤およびこの製剤を受容者の血液と等張にする溶質を含みうる水性および非水性の無菌注射液、並びに懸濁化剤または増粘剤を含みうる水性および非水性の無菌懸濁液がある。こうした製剤は1回量容器または数回量容器(例えば、密閉アンプルおよびバイアル)で提供することができ、また、使用直前に無菌の液状担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態で保管することもできる。ワクチン製剤はこの製剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系、例えば水中油型のアジュバント系や当技術分野で公知の他のアジュバント系を含んでいてもよい。投与量はワクチンの比活性で変化し、ルーチンな実験操作により簡単に決定できる。

20

【0050】

スクリーニングアッセイ

本発明のヒトKUZポリペプチドは、このポリペプチドを活性化する化合物(アゴニスト)またはその活性を阻害する化合物(アンタゴニスト、または阻害剤ともいう)のスクリーニング法において使用することができる。こうして、本発明のポリペプチドは、例えば、細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーおよび天然産物の混合物からアゴニストまたはアンタゴニストを評価し同定するためにも用いられる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドの、場合によって、天然のまたは修飾された基質、リガンド、受容体、酵素などであってよく、また、本発明のポリペプチドの構造的または機能的な模擬物であってもよい(Coliganら, *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991))を参照のこと)。

30

【0051】

ヒトKUZポリペプチドは多くの病理を含めて多数の生物学的機能に関与している。したがって、一方ではヒトKUZポリペプチドを刺激し、他方ではヒトKUZポリペプチドの機能を阻害し得る化合物および薬物を見つけ出すことが望まれる。一般的に、アゴニストは炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患のような症状の治療および予防目的で用いられる。アンタゴニストは炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患のような症状のさまざまな治療および予防目的で使用しうる。

40

【0052】

一般に、こうしたスクリーニング法はヒトKUZポリペプチドを発現する適当な細胞、またはヒトKUZポリペプチドに応答する適当な細胞を用いるものである。この種の細胞には哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ由来の細胞または大腸菌細胞が含まれる。次いで、

50

ヒトKUZポリペプチドを発現する細胞（もしくは発現されたポリペプチドを含む細胞膜）またはヒトKUZポリペプチドに応答する細胞を試験化合物と接触させて、その結合または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する。候補化合物と接触させた細胞の能力を、接触させなかった同一細胞とヒトKUZ活性に関して比較する。

酵素活性または活性の阻害は、プロテアーゼについての標準的な技術のいずれかを使用して測定可能で、例えば、こうした技術として、タンパク質の配列をベースとした蛍光消滅基質、ビオチン化および放射性標識ペプチドを使用するシンチレーション近接アッセイ、産物タンパク質に対するウェスタンブロットまたはELISAがある。

【0053】

これらのアッセイでは候補化合物の結合を簡単に試験することができ、そこでは候補化合物と直接または間接に結合された標識により、または標識した競合物質との競合を用いるアッセイにより、ヒトKUZポリペプチドを担持する細胞への付着が検出される。さらに、これらのアッセイでは、ヒトKUZポリペプチドを担持する細胞に適した検出系を用いて、候補化合物がヒトKUZポリペプチドの活性化により生ずるシグナルを結果的にもたらすか否かを試験することができる。一般的に、活性化の阻害剤は既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物の存在がアゴニストによる活性化に与える影響が調べられる。

【0054】

さらに、これらのアッセイは、候補化合物とヒトKUZポリペプチドを含む溶液とを混ぜ合わせて混合物をつくり、この混合物中のヒトKUZ活性を測定し、そしてこの混合物のヒトKUZ活性を標準と比較する各ステップを単に含むだけでよい。

【0055】

また、ヒトKUZのcDNA、タンパク質またはこのタンパク質に対する抗体を用いて、細胞内でのヒトKUZ mRNAまたはタンパク質の生産に及ぼす添加化合物の作用を検出するためのアッセイを組み立てることができる。例えば、当技術分野で公知の標準方法によりモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、ヒトKUZタンパク質の分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定するためのELISAを構築することができ、これは適切に操作された細胞または組織からのヒトKUZの生産を抑制または増強する物質（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストともいう）の探索に用いることができる。

【0056】

膜結合受容体または可溶性受容体が存在するのであれば、当技術分野で公知の標準的な受容体結合法によりこの種の受容体を同定するためにヒトKUZタンパク質を用いることができる。こうした受容体結合法には、限定するものではないが、リガンド結合および架橋アッセイがあり、このアッセイでは、ヒトKUZを放射性アイソトープ（例： ^{125}I ）で標識するか、化学的に修飾（例：ビオチン化）するか、または検出や精製に適したペプチド配列に融合させ、そして推定上の受容体源（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液など）とインキュベートする。その他の方法としては、表面プラズモン共鳴および分光学のような生物物理的方法がある。受容体の精製およびクローニングに用いることに加えて、これらの結合アッセイは、もし存在するのであれば、ヒトKUZのその受容体への結合と競合するヒトKUZのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するために用いることもできる。スクリーニングアッセイを行うための標準的な方法は当技術分野でよく理解されている。

【0057】

ヒトKUZポリペプチドの潜在的なアンタゴニストの例としては、抗体、ある場合には、ヒトKUZポリペプチドのリガンド、基質、受容体、酵素などと密接な関係があるオリゴヌクレオチドもしくはタンパク質（例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などの断片）、または本発明のポリペプチドと結合するが応答を誘導しない（それゆえポリペプチドの活性を妨げる）小分子などがある。

【0058】

かくして、他の態様において、本発明は、ヒトKUZポリペプチドのアゴニスト、アンタ

ゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、またはヒトKUZポリペプチドの生産を低下または増加させる化合物を同定するためのスクリーニングキットに関し、このキットは、

- (a) ヒトKUZポリペプチド(好ましくは、配列番号2のポリペプチド)
 - (b) ヒトKUZポリペプチド(好ましくは、配列番号2のポリペプチド)を発現する組換え細胞、
 - (c) ヒトKUZポリペプチド(好ましくは、配列番号2のポリペプチド)を発現する細胞膜、または
 - (d) ヒトKUZポリペプチド(好ましくは、配列番号2のポリペプチド)に対する抗体、
- を含んでなる。このようなキットにおいて、(a)、(b)、(c) または (d) が実質的な構成成分であることが理解されよう。

10

【0059】

予防および治療法

本発明は、ヒトKUZポリペプチド活性の過剰量と不足量のどちらにも関係した炎症、神経変性、アレルギー性疾患、または基質サイトカインもしくは受容体の脱調節を伴う他の疾患などの異常な状態の治療法を提供する。

ヒトKUZポリペプチドの活性が過剰である場合は、いくつかのアプローチが利用可能である。一つのアプローチは、例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などの結合をブロックすることにより、または第2のシグナルを抑制することで異常な状態を軽減することにより、ヒトKUZポリペプチドの機能を阻害するのに有効な量で、前記の阻害剤化合物(アンタゴニスト)を製剤学上許容される担体とともに患者に投与することを含んでなる。もう一つのアプローチでは、リガンド、基質、酵素、受容体などと結合する能力がまだある可溶性形態のヒトKUZポリペプチドを、内因性のヒトKUZポリペプチドとの競合状態で投与する。このような競合剤の典型的な例はヒトKUZポリペプチドの断片である。

20

【0060】

さらに別のアプローチでは、発現阻止法を使って内因性ヒトKUZポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制することができる。こうした公知技術は、体内で生成されるか別個に投与されるアンチセンス配列の使用を必要とする。例えば、*Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)中のO'Connor, J *Neurochem* (1991) 56:560を参照のこと。あるいはまた、この遺伝子と共に三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給することもできる。例えば、Lee ら, *Nucleic Acid Res* (1979) 6:3073; Cooney ら, *Science* (1988) 241:456; Dervan ら, *Science* (1991) 251:1360を参照のこと。これらのオリゴマーはそれ自体を投与することもできるし、関連オリゴマーを *in vivo* で発現させることもできる。

30

【0061】

ヒトKUZおよびその活性の過少発現に関係した異常な状態を治療する場合も、いくつかのアプローチを取ることができる。一つのアプローチは、治療上有効な量のヒトKUZポリペプチドを活性化する化合物(すなわち、前記のアゴニスト)を製剤学上許容される担体とともに患者に投与して、異常な状態を緩和することを含んでなる。別法として、患者の関連細胞においてヒトKUZを内因的に産生させるために遺伝子治療を用いることができる。例えば、上で述べたような複製欠損レトロウイルスベクターによる発現のために本発明のポリヌクレオチドを遺伝子操作する。次にレトロウイルス発現構築物を単離し、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入されたパッケージング細胞に導入する。その結果、パッケージング細胞は対象の遺伝子を含有する感染性のウイルス粒子を産生するようになる。*in vivo*での細胞処理および *in vivo*でのポリペプチド発現のために、これらの産生細胞を患者

40

50

に投与する。遺伝子治療の概論に関しては、Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) 中のChapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (およびその中の引用文献) を参照のこと。もう一つのアプローチは治療量のヒトKUZポリペプチドを適当な製剤学上の担体とともに投与することである。

【0062】

製剤および投与

可溶性形態のヒトKUZポリペプチドのようなペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストペプチド、または小分子は適当な製剤学上の担体と組み合わせて製剤化することができる。このような製剤は治療上有効な量のポリペプチドまたは化合物と、製剤学上許容される担体または賦形剤を含有する。この種の担体としては、食塩水、生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組合せがあるが、これらに限らない。製剤は投与様式に適合させるべきであり、これは当技術分野の技量の範囲内である。本発明はさらに、前記の本発明組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医薬用パックおよびキットに関する。

本発明のポリペプチドおよび他の化合物は単独で使用しても、他の化合物、例えば治療用化合物と一緒に使用してもよい。

【0063】

医薬組成物を全身投与するときの好ましい形態は、注入(注射)、典型的には静注である。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注入経路も使用できる。全身投与の別の手段は、胆汁酸塩、フシジン酸、その他の界面活性剤などの浸透剤を用いた経粘膜および経皮投与である。さらに、腸溶剤またはカプセル剤として適切に製剤化されているのであれば、経口投与も可能である。これらの化合物は軟膏、ペースト、ゲルなどの剤形で局所に投与しても、かつ/または局在化させてもよい。

【0064】

必要な投与量範囲はペプチドの選択、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり0.1 ~ 100 μg の範囲である。利用可能な化合物が多種多様であり、それぞれの投与経路の効率も異なるため、必要とされる投与量は広範に変動することを予想すべきである。例えば、経口投与は静注による投与よりも高い投与量を必要とすることが予想される。こうした投与量レベルの変動は、当技術分野でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0065】

治療に用いるポリペプチドは、上述したような「遺伝子治療」と称する治療法において、患者の体内で産生させることもできる。例えば、患者由来の細胞を、*ex vivo* でポリペプチドをコードするDNAまたはRNAのようなポリヌクレオチドにより、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いて、遺伝子工学的に操作する。その後、この細胞を患者に導入する。

【0066】

【実施例】

他に詳述した場合を除いて、当業者には公知で一般的な技術を使用して、以下の実施例を行なった。これらの実施例は本発明を例示するものであるが、限定するものではない。

【0067】

実施例 1

ウシ・ディスインテグリン・メタロプロテアーゼ遺伝子のコード領域の5'末端を使用してHGSデータベースを検索した。EST1759347(プロジェクトID: HSYAG89)がヒト胸腺間質細胞のcDNAライブラリーから同定され、このESTの全挿入物を配列決定したところ、該挿入物が公表されたヒトKUZ遺伝子(Howard L

10

20

30

40

50

ら、Biochem. J. 317 (Pt 1), 45-50, 1996)の欠失5'末端を含有することを確認した。また、公表された部分ヒトKUZ遺伝子中のヌクレオチド160位に存在するがウシ相同体内には存在しない153個のヌクレオチド残基からなる内部挿入物は、HSYAG89には存在していない。したがって、HSYAG89はショウジョウバエKUZ遺伝子に関連するウシ・ディスインテグリン・メタロプロテアーゼのヒト対応物である。

次にApa I、Not I二重消化物を用いてノーザンブロットを行い、コード領域の3.5 kb断片を得、これをゲル電気泳動により単離し放射性標識した。この断片を使用して多組織ブロット(Clontech)上でコード配列を検出した。これらのブロットはヒトKUZをコードするmRNAの広範な発現を示し、心臓、脳、膵臓および胸腺で最高の発現を示した。存在しうる基質は、293細胞または同等の細胞において該基質を共発現させ、その細胞上清中の産物タンパク質断片を検出することにより同定できる。

10

【0068】

実施例2

全長cDNAを得るための方法はいくつがあるが、そのうちの2つを以下に説明する。

1) cDNA末端の高速増幅(Rapid Amplification of cDNA Ends: RACE)法は5'末端を得るために利用することができる。Frohmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002 (1988)を参照のこと。簡単に述べると、特定のオリゴヌクレオチドをmRNAにアニーリングし、これによりcDNA鎖の合成を開始させる。RNアーゼHを用いてmRNAを破壊した後、cDNAの3'末端にポリCアンカー配列を付加し、得られた断片をネステッド(nested)組のアンチセンスプライマーおよびアンカー配列プライマーを用いて増幅する。増幅断片は適当なベクターにクローニングして、制限分析および配列解析にかける。

20

2) ポリメラーゼ連鎖反応は、2組のプライマーを用いるネステッドPCRを連続して行なうことで、ヒトcDNAライブラリー由来のcDNAの5'末端を増幅するために使用することができる。1組のアンチセンスプライマーは部分cDNAの5'末端に特異的であり、もう1組のプライマーはベクター特異的配列にアニーリングする。増幅産物は適当なベクターにクローニングして、制限分析および配列解析にかける。

30

【0069】

本明細書中に引用された、特許および特許出願明細書を含めた全ての刊行物は、あたかも各刊行物が明確にかつ個々に示されているかのように、その全体を参考としてここに組み入れるものとする。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>SmithKline Beecham Corporation

<120>Human Disintegrin Metalloprotease Related to Drosophila KUZ gene

<130>PA03-199

10

<150>U. S. Application Serial No.08/920,234

<151>1997-8-25

<160>2

<170>FastSEQ for Windows Version 2.0

20

<210> 1

<211> 3349

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>1

30

```

gtccccgctt cccgtggagg ctccggacca agccccctca gcttctccct ccggatcgat    60
gtgctgctgt taaccctga ggaggcggcg gcggcggcag cggcagcggg agatgggtgt    120
gctgagagtg ttaattctgc tctctctctg ggccggcgggg atgggaggtc agtatgggaa    180
tcctttaa ataatatca gacattatga aggattatct tacaatgtgg attcattaca    240
ccaaaaacac cagcgtgcc aagagcagt ctacatgaa gaccaatit tacgtctaga    300
titccatgcc catggaagac attcaacct acgaatgaag agggacacti cccitttcag    360
tgatgaattt aaagtagaaa catcaaataa agtacttgat tatgatacct ctcatattta    420
cactggacat atttatggtg aagaaggaag ttttagccat gggctctgta ttgatggaag    480

```

40

attgaagga	ttcatccaga	ctcgtggtgg	cacatitit	gttgagccag	cagagagata	540	
tattaaagac	cgaactctgc	catttcactc	tgicattit	catgaagatg	atattaacta	600	
icccataaa	tacggtcctc	aggggggctg	tgcatatcat	tcagtatttg	aaagaatgag	660	
gaaataccag	atgactggtg	tagaggaagt	aacacagata	cctcaagaag	aacatgctgc	720	
taatgggtcca	gaactctga	ggaaaaaacg	tacaacttca	gctgaaaaaa	atacttgcca	780	
gctttatatt	cagactgac	atttgttctt	taaatattac	ggaacacgag	aagctgtgat	840	
igcccagata	iccagtcag	ttaaagcgat	tgatacaatt	taccagacca	cagacttctc	900	10
cggaaatccgt	aacatcagtt	tcatggtgaa	acgcataaga	atcaatacaa	ctgctgatga	960	
gaaggaccct	acaaatcctt	tccgtttccc	aaatattggt	gtggagaagt	tcttggaaatt	1020	
gaattctgag	cagaatcatg	atgactactg	tttggcctat	gtcttcacag	accgagattt	1080	
igaigaigggc	gtacttggtc	tggcttgggt	tggagaccct	tcaggaagct	ctggaggaat	1140	
atgtgaaaaa	agtaaactct	attcagatgg	taagaagaag	tccttaaca	ctggaattat	1200	
iacigticag	aactatgggt	ctcatgtacc	tcccaaagtc	tctcacatta	cttttgcctca	1260	
cgaagttgga	cataactttg	gateccccaca	tgattctgga	acagagtgca	caccaggaga	1320	20
atctaagaat	tigggtcaaa	aagaaaatgg	caattacatc	atgtatgcaa	gagcaacatc	1380	
tggggacaaa	cttaacaaca	ataaattctc	actctgtagt	attagaaata	taagccaagt	1440	
ictigagaag	aagagaaca	actgttttgt	tgaatctggc	caacctattt	gtggaaatgg	1500	
aatggtagaa	caaggtgaag	aatgtgattg	tggctatagt	gaccagtgtg	aagatgaatg	1560	
ctgcttcgat	gcaaatcaac	cagaggggaag	aaaatgcaa	ctgaaacctg	ggaaacagtg	1620	
cagtccaagt	caaggtcctt	gttgtacagc	acagigtgca	ttcaagtcaa	agtctgagaa	1680	
gigtccggat	gattcagact	gtgcaaggga	aggaatatgt	aatggcttca	cagctctctg	1740	30
cccagcatct	gaccctaacc	caaacttcac	agactgtaat	aggcatacac	aagtgtgcat	1800	
taatgggcaa	tgtgcaggtt	ctatctgtga	gaaatattggc	ttagaggagt	gtactgtgtc	1860	
cagttctgat	ggcaaagatg	ataaagaatt	atgccatgta	tgctgtatga	agaaaatgga	1920	
cccatcaact	tgtgccagta	caggtctgt	gcagtggagt	aggcacttca	gtggctgaac	1980	
catcacctg	caacctggat	ccccttgc	cgatittaga	ggttactgtg	atgttttcat	2040	
gcggtgcaga	ttagtagatg	ctgatggctc	tctagctagg	cttaaaaaag	caatttttag	2100	
tccagagctc	tatgaaaaca	ttgctgaaatg	gattgtggct	cattgggtggg	cagtattact	2160	40
taigggaatt	gctctgatca	tgctaattggc	tggatttatt	aagatatgca	gtgttcatac	2220	

tccaagtagt aatccaaagt tgcctcctcc taaaccactt ccaggcactt taaagaggag 2280
 gagacctcca cagcccattc agcaacccca gcgtcagcgg ccccgagaga gttatcaaat 2340
 gggacacaig agacgctaac tgcagcittt gccttggttc ttcttagtgc ctacaatggg 2400
 aaaacttcac tccaaaagaga aacctattaa gtcatcatct ccaaactaaa ccttcacaag 2460
 taacagtiga agaaaaaatg gcaagagatc atatcctcag accagggtgga attacttaaa 2520
 ttttaaagcc tgaaaattcc aatttggggg tgggaggtgg aaaaggaacc caattttctt 2580
 atgaacagat atttttaact taatggcaca aagtcttaga atattattat gtgccccgtg 2640
 ttcccgttc ttcgttgctg cattttcttc acttgcagge aaacttggct ctcaataaac 2700
 tttaccaca aatigaaata aatataatit ttcaactgc caatcaaggg taggaggctc 2760
 gaccacctca acattggaga catcacttgc caatgtacat accttgttat atgcagacat 2820
 gtatttcita cgtacactgt acttctgtgt gcaattgtaa acagaaatg caatatggat 2880
 gtttcittgt attataaaat ttttccgctc ttaattaaaa attactgitt aattgacata 2940
 ctcaggataa cagagaatgg tggattcag tggtcagga ttctgtaatg ctttacacag 3000
 gcagtttga aatgaaaatc aatttacctt tctgttacga tggagttggt tttgatactc 3060
 atttttctt taccacatgg ctgctacggg cacaagtgc tatactgaag aacacagtta 3120
 agtgttgtgc aaactggaca tagcagcaca tactacttca gatttcata tgtagatgtc 3180
 tggtttcgc ttacgtcttt taaactttct aattcaatc catttttcaa ttaatagggtg 3240
 aaattttatt catgctttga tagaaattat gtcaatgaaa tgaaaaaaaaa aaaaaaaaaagg 3300
 gcggccgctc tagaggatcc ctgaggggc ccaagcttac gcgtgcatg 3349

10

20

30

<210> 2
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<401>2

Met Val Leu Leu Arg Val Leu Ile Leu Leu Leu Ser Trp Ala Ala Gly

1

5

10

15

40

Met Gly Gly Gln Tyr Gly Asn Pro Leu Asn Lys Tyr Ile Arg His Tyr	
20 25 30	
Glu Gly Leu Ser Tyr Asn Val Asp Ser Leu His Gln Lys His Gln Arg	
35 40 45	
Ala Lys Arg Ala Val Ser His Glu Asp Gln Phe Leu Arg Leu Asp Phe	
50 55 60	
His Ala His Gly Arg His Phe Asn Leu Arg Met Lys Arg Asp Thr Ser	10
65 70 75 80	
Leu Phe Ser Asp Glu Phe Lys Val Glu Thr Ser Asn Lys Val Leu Asp	
85 90 95	
Tyr Asp Thr Ser His Ile Tyr Thr Gly His Ile Tyr Gly Glu Glu Gly	
100 105 110	
Ser Phe Ser His Gly Ser Val Ile Asp Gly Arg Phe Glu Gly Phe Ile	
115 120 125	20
Gln Thr Arg Gly Gly Thr Phe Tyr Val Glu Pro Ala Glu Arg Tyr Ile	
130 135 140	
Lys Asp Arg Thr Leu Pro Phe His Ser Val Ile Tyr His Glu Asp Asp	
145 150 155 160	
Ile Asn Tyr Pro His Lys Tyr Gly Pro Gln Gly Gly Cys Ala Asp His	
165 170 175	
Ser Val Phe Glu Arg Met Arg Lys Tyr Gln Met Thr Gly Val Glu Glu	30
180 185 190	
Val Thr Gln Ile Pro Gln Glu Glu His Ala Ala Asn Gly Pro Glu Leu	
195 200 205	
Leu Arg Lys Lys Arg Thr Thr Ser Ala Glu Lys Asn Thr Cys Gln Leu	
210 215 220	
Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe Lys Tyr Tyr Gly Thr Arg Glu	
225 230 235 240	40
Ala Val Ile Ala Gln Ile Ser Ser His Val Lys Ala Ile Asp Thr Ile	

705					710					715					720
Lys	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Pro	Ile	Gln	Gln	Pro	Gln	Arg	Gln	Arg
				725					730						735
Pro	Arg	Glu	Ser	Tyr	Gln	Met	Gly	His	Met	Arg	Arg				
				740					745						

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 37/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/48	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 9/48	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/64	

(72)発明者 キャサリン エリザベス エリス

アメリカ合衆国 0 8 0 2 8 ニュージャージー州, グラスボロ, フォーダム プレイス 8 3 1

(72)発明者 ジェフリー リチャード ジャクソン

アメリカ合衆国 1 9 4 0 6 ペンシルバニア州, カレッジビル, スプルーース レーン 1 3 4

(72)発明者 ルース ジュディク メイヤー

アメリカ合衆国 1 9 0 8 7 ペンシルバニア州, ウェイン, リベイル ロード 1 1 0

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA14 CA01 CA04 CA06 CA11 DA03 GA11 HA12
 HA17
 4B050 CC03 DD11 LL01 LL03
 4B063 QA01 QA05 QA17 QQ04 QQ36 QQ44 QQ53 QQ79 QR62 QR77
 QS16 QS24 QS32 QS36 QX01 QX07
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA01 CA33 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA35 BA44 CA62 DA58 DC32
 MA01 MA17 MA22 MA23 MA44 MA66 NA14 ZA152 ZA222 ZB112
 ZB132 ZC192 ZC202
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA17 MA22 MA23 MA44 MA66
 NA14 ZA15 ZA22 ZB11 ZB13 ZC19 ZC20
 4H045 AA11 CA40 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	人解整合素金属蛋白酶与果蝇KUZ基因有关		
公开(公告)号	JP2004000198A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003113158	申请日	2003-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	史密斯克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公司		
[标]发明人	キャサリンエリザベスエリス ジェフリーリチャードジャクソン ルースジュディクメイヤー		
发明人	キャサリン エリザベス エリス ジェフリー リチャード ジャクソン ルース ジュディク メイヤー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/55 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/48 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/57 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43 /00 C12N9/6489		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 A61P37 /08 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/48 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/64 A61K38 /16.200 A61K38/55 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA11 4B024/DA03 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B050 /CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA17 4B063/QQ04 4B063/QQ36 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063 /QS24 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084 /AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/DA58 4C084/DC32 4C084/MA01 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA44 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084 /ZA152 4C084/ZA222 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA44 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA15 4C086/ZA22 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZC19 4C086 /ZC20 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	08/920234 1997-08-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过所述多肽的重组方法提供人KUZ多肽和多核苷酸以及生产方法。编码与编码SEQ ID NO：2的人KUZ多肽的核苷酸序列长度至少80%且具有人KUZ多肽活性或编码核苷酸序列的多肽的核苷酸序列包含互补核苷酸序列的分离的多核苷酸。人KUZ多肽和多核苷酸可用于治疗功能障碍或疾病，包括炎症，神经变性，过敏性疾病或涉及底物细胞因子或受体失调的其他疾病，以及这些症状的诊断它对测定很有用。

