

(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 - 509053

(P2003 - 509053A)

(43)公表日 平成15年3月11日(2003.3.11)

(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 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/46		A 6 1 P 1/00	4 B 0 5 0
45/00		25/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/00		35/00	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2001 - 523775(P2001 - 523775)

(86)(22)出願日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月14日(2002.3.14)

(86)国際出願番号 PCT/US00/25515

(87)国際公開番号 W001/020004

(87)国際公開日 平成13年3月22日(2001.3.22)

(31)優先権主張番号 60/154,141

(32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド

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

(72)発明者 ユエ、ヘンリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーベイル・ルイスアベニュー 826

(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】 プロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼ

(57)【要約】

本発明は、プロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼ (PPHKP) と、PPHKPを同定及びコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、発現ベクター及び宿主細胞、抗体、アゴニスト、アンタゴニストを提供する。更に、本発明は、PPHKPの発現に関連する疾患の診断・治療・予防方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、

(a) SEQ ID NO:1乃至SEQ ID NO:11 (SEQ ID NO:1 - 11) からなる群から選択されたアミノ酸配列と、

(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、

(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、

(d) SEQ ID NO:1 - 11からなる群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片との前記(a) - (d)で構成される群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする単離されたポリペプチド。

【請求項2】 SEQ ID NO:1 - 11からなる群から選択された請求項1の単離されたポリペプチド。

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

【請求項4】 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】 SEQ ID NO:12 - 22からなる群から選択された請求項4の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3のポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項6の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項8】 請求項6の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドを生産する方法であって、

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

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

【請求項10】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項11】 単離されたポリヌクレオチドであって、

(a) SEQ ID NO:12 - 22からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と、

(b) SEQ ID NO:12 - 22からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、

(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等価物とで構成される群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項11のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 サンプルにおいて、請求項11に記載のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 前記サンプル内の前記標的ポリヌクレオチドと相補的な配列からなる少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブで前記サンプルをハイブリダイズするステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片とのハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該ステップと、

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

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

【請求項15】 サンプルにおいて、請求項11のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを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ステップと、

(b) 増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチド及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-11からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項16の組成物。

【請求項18】 機能的PPHKP(プロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼ)の発現の低下に関連する疾患やその症状の治療方法であって、請求項16の組成物をそのような治療が必要な患者に投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項19】 請求項1のポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項20】 請求項19のスクリーニング方法によって同定されたアゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項21】 機能的PPHKPの発現の低下に関連する疾患やその症状の治療方法であって、請求項20の組成物をそのような治療が必要な患者に投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項22】 請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおけるアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項23】 請求項22のスクリーニング方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項24】 機能的PPHKPの過剰な発現に関連する疾患やその症状の治療方法であって、請求項23の組成物をそのような治療が必要な患者に投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項25】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合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のポリペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 請求項1のポリペプチドと前記試験化合物との結合を検出して、請求項1のポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項26】 請求項1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のポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性を評価するステップと、

(c) 前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性と、前記試験化合物の不在下での請求項1のポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、

前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性の変化が、請求項1のポリペプチドの活性を調節する化合物の存在を示唆すること特徴とするスクリーニング方法。

【請求項27】 請求項5の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌク

レオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップと、

(c) 様々な量の前記化合物の存在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現と、前記化合物の不在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現とを比較するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項28】 試験化合物の毒性を評価する方法であって、

(a) 核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処置するステップと、

(b) 処置した前記生体サンプルの核酸を、請求項11のポリヌクレオチドの連続する少なくとも20個のヌクレオチドを含むプローブと、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下でハイブリダイズさせるステップであって、標的ポリヌクレオチドが請求項11のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含む、前記ステップと、

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を測定するステップと、

(d) 前記処置した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処置の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量とを比較するステップとを含み、

前記処置した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差が試験化合物の毒性を示唆することを特徴とする試験化合物の毒性評価方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、プロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼの核酸配列及びアミノ酸配列に関し、また、胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常の診断・治療・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)**

キナーゼおよびホスファターゼは細胞内シグナル伝達機構に必須の要素である。キナーゼは、高エネルギーのリン酸基をアデノシン三リン酸(ATP)から様々な標的タンパク質のヒドロキシアミノ酸への転移を触媒する。それとは対照的に、ホスファターゼはタンパク質からリン酸基を除去する。可逆的なタンパク質のリン酸化は、真核細胞においてタンパク質の活性を調節する主な方法である。一般に、タンパク質は、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、および分化因子などの細胞外のシグナルに応答してリン酸化され、活性化される。シグナル伝達経路のダウンレギュレーションが必要な場合に、タンパク質の脱リン酸化が起こる。キナーゼの活性とホスファターゼの活性との組み合わせによって、細胞増殖、分化、および細胞周期の進行などの重要な細胞内プロセスが調節されている。

【0003】**プロテインキナーゼ**

キナーゼは、既知の最も大きな酵素のスーパーファミリーを構成し、標的タンパク質によって多種多様である。キナーゼは、チロシン残基をリン酸化するプロテインチロシンキナーゼ(PTK)と、セリン残基および/またはトレオニン残基をリン酸化するプロテインセリン/トレオニンキナーゼ(STK)とに分類することができる。ある種のキナーゼは、セリン/トレオニン残基およびチロシン残基の両方に対する特異性を有する。殆ど全てのキナーゼが、保存された250~300個のアミノ酸触媒ドメインを含む。このドメインは、11のサブドメインに分類することができる。N末端サブドメインI-IVは、ATP供与体分子と結合してそれを方向付ける二葉構造(two lobed structure)に折り畳まれ、サブドメイ

ンVは二葉に渡っている。C末端サブドメインVI - IXはタンパク質基質と結合し、リン酸をATPからセリン残基、トレオニン残基、またはチロシン残基のヒドロキシル基に転移させる。11のサブドメインのそれぞれは、そのサブドメインに特徴的な特定の触媒残基またはアミノ酸モチーフを含む。例えば、サブドメインIは、アミノ酸8個からなる高グリシンATP結合共通モチーフを含み、サブドメインIIは最大の触媒活性に極めて重要なリシン残基を含み、サブドメインVI - IXは高度に保存された触媒中心を含む。STKおよびPTKはまた、ヒドロキシアミノ酸特異性を与えるサブドメインVIおよびVIIにおける固有の配列モチーフを含む。ある種のSTKおよびPTKは、両方のファミリーの構造的特性を有する。加えて、キナーゼは、キナーゼドメインに隣接した或いはその中にある通常は5 ~ 100個の残基からなる追加のアミノ酸配列によって分類することができる。これらの追加のアミノ酸配列が、キナーゼの活性を制御し、基質特異性を決定する (Hardie, G. and Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book*, Vol 1: 7-20 Academic Press, San Diego, Caを参照)。

【0004】

セカンドメッセンジャー依存性プロテインキナーゼは主に、例えば、サイクリックAMP (cAMP)、サイクリックGMP、イノシトール三リン酸、ホスファチジルイノシトール、3,4,5-三リン酸、サイクリックADPリボース、アラキドン酸、ジアシルグリセロール、およびカルシウム-カルモジュリンなどのセカンドメッセンジャーの効果を仲介する。サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) は、STKファミリーの重要なメンバーである。サイクリックAMPは、研究を行った哺乳動物細胞において、ホルモン作用の細胞内メディエータである。ホルモン誘導性細胞応答には、甲状腺ホルモン分泌、コルチゾール分泌、プロゲステロン分泌、グリコーゲン分解、骨吸収、および心拍数や心筋収縮力の調節が含まれる。PKAは全ての動物細胞に見られ、これらの殆どの細胞におけるサイクリックAMPの効果を仲介すると考えられている。PKAの発現の変化は、癌、甲状腺疾患、糖尿病、アテローム性動脈硬化、および心血管疾患を含む様々な疾患や障害に関係する (Isselbacher, K. J. 他 (1994) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, New York, NY, pp. 416-431, 1887)。

【0005】

カルシウム-カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼはまた、STKファミリーのメンバーである。カルモジュリンは、標的タンパク質に結合して多くのカルシウム調節性プロセスを仲介するカルシウム受容体である。これらのプロセスにおける主な標的タンパク質は、CaM依存性プロテインキナーゼ (CaMキナーゼ) である。CaMキナーゼは、平滑筋の収縮、グリコーゲン分解 (ホスホリラーゼキナーゼ)、および神経伝達 (CaMキナーゼIおよびCaMキナーゼII) の調節に関与する。CaMキナーゼIは、神経伝達物質関連タンパク質であるシナプシンIおよびII、遺伝子転写調節因子であるCREB、および嚢胞性線維症コンダクタンス制御因子 (cystic fibrosis conductance regulator) タンパク質であるCFTRを含む様々な基質をリン酸化する (Haribabu, B. 他 (1995) EMBO Journal 14: 3679-3686)。CaMキナーゼIIはまた、様々な部位でシナプシンをリン酸化し、チロシンヒドロキシラーゼのリン酸化および活性化によって脳におけるカテコールアミンの合成を調節する。多くのCaMキナーゼは、CaMのみならずリン酸化によっても活性化される。例えば、CaMキナーゼは、それ自体が自己リン酸化したり、キナーゼカスケードの一部として他のキナーゼによってリン酸化されたりしうる。カルモジュリン結合プロテインキナーゼ様タンパク質をコードするmRNAが、哺乳動物の前脳に多量に存在する。このタンパク質は、軸索および樹状突起における両方の小胞に関連し、生後多量に蓄積される。このタンパク質のアミノ酸配列はCaM依存性STKに類似しており、このタンパク質はカルシウムの存在下でカルモジュリンと結合する (Godbout, M. 他 (1994) J. Neurosci. 14: 1-13)。

【0006】

分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (MAP) は、細胞内のシグナル伝達を調節する別のSTKファミリーである。MAPキナーゼは、リン酸化カスケードによる細胞表面から核へのシグナル伝達を仲介する。幾つかの亜集団が同定され、それぞれは明らかに異なる基質特異性を有し、特定の細胞外刺激に応答する (Egan, S. E. and Weinberg, R. A. (1993) Nature 365: 781-783)。MAPキナーゼシグナル伝達経路は、酵母はもちろん哺乳動物にも存在する。MAPキナーゼ経路を活性化する細胞外刺激には、上皮成長因子 (EGF)、紫外線、高浸透圧媒体、熱シ

ヨック、内毒素性リポ多糖 (LPS)、および腫瘍壊死因子 (TNF) やインターロイキン1 (IL-1) などの炎症誘発性サイトカインが含まれる。MAPキナーゼの発現の変化は、癌、炎症、免疫異常、および成長や発達に影響を及ぼす障害を含む様々な疾患や障害に関係する。

【0007】

PTKは、膜貫通型受容体PTKと非膜貫通型非受容体PTKに分類することができる。膜貫通型PTKは殆どの成長因子の受容体である。成長因子が受容体に結合することによって、ATPから受容体及びその他の細胞内シグナル伝達タンパク質の選択された細胞内チロシン側鎖へのリン酸基の転移を活性化する。受容体PTKに結合する成長因子 (GF) には、上皮成長因子、血小板由来成長因子、線維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子、インスリンおよびインスリン様成長因子、神経成長因子、血管内皮成長因子、マクロファージコロニー刺激因子が含まれる。非受容体PTKは膜貫通領域を含まないが、その代わりに細胞表面受容体の細胞内領域と複合体を形成する。非受容体PTKを介して機能する受容体には、サイトカインやホルモン (成長ホルモンおよびプロラクチン) の受容体、並びにTリンパ球上およびBリンパ球上の抗原特異的受容体が含まれる。

【0008】

多くのPTKは、活性化が正常な細胞制御の影響を受けないようになった癌細胞の突然変異発癌遺伝子産物として初めに同定された。実際、既知の発現遺伝子の約1/3がPTKをコードし、細胞の形質転換 (発癌) にはチロシンリン酸化活性の上昇を伴う場合が多いことが知られている (Charbonneau H. and Tonks N. K. (1992) Annu Rev Cell Biol 8: 463-493)。従って、PTK活性を調節することが、ある種の癌の抑制に重要な手段であると思われる。

【0009】

プロテインホスファターゼ

ホスファターゼは、選択されるホスホアミノ酸基質に基づいたチロシン特異性或いはセリン/トレオニン特異性の何れかによって特徴付けられる。しかしながら、ある種のリン酸はホスホチロシン残基およびホスホセリン/トレオニン残基の両方に対して特異性を有する。多くのセリン/トレオニン特異的ホスファター

ゼ(STP)は、生化学的に精製され詳細に特徴付けられた。STPIは一般に、2つ以上のサブユニットからなり、広範かつ重複するタンパク質基質特異性を有する。STPIはサイトゾル、核、ミトコンドリアに存在し、細胞骨格構造および膜構造に関連する。ある種のPTKは、活性化のために Ca^{2+} や Mn^{2+} などの二価の陽イオンが必要である。STPIは、グリコーゲン代謝、筋収縮、タンパク質合成、卵成熟、および肝代謝において重要な役割を果たしている(Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508を参照)。

【0010】

プロテインホスファターゼ2A(PP2A)は、主に哺乳動物組織から精製され、十分に特徴付けられたSTPである。三量体PP2Aホロ酵素は、ウサギ骨格筋から精製された(Hendrix, P. 他(1993) *J. Biol. Chem.* 268: 15267-15276)。PP2Aホロ酵素の活性は、ポリカチオン巨大分子によって刺激される。PP2Aホロ酵素は、36kDaの単一の触媒サブドメインと65kDaおよび72kDaの2つの調節サブユニットとからなる。調節サブユニットは、基質特異性、酵素活性、およびホロ酵素の細胞内局在化を決定していると思われる。特に、72kDaのサブユニット(PR72)は、ポリカチオンの刺激効果を増大させ、カゼインキナーゼIおよびIIによってリン酸化される。ヒトPR72をコードするcDNAがクローニングされ、PR72遺伝子転写物が骨格筋および心臓においてのみ検出された。このことは、PR72がPP2Aホロ酵素に組織特異性を与えたことを示唆するものである。55kDaの調節サブユニットもまた、ウサギ骨格筋からの三量体型のプロテインホスファターゼ2Aから精製された。このPR55サブユニットは、この2つの遺伝子によってコードされることが分かった。ヒトPR55とウサギPR55のアミノ酸配列の比較によって、高度に保存されていることが分かった。ヒトPR55のアイソフォームが神経芽細胞腫由来細胞系において高いレベルで検出され、その他のヒト細胞系では極めて低いレベルで検出された。このことは、このアイソフォームが神経特異的であることを示唆するものである(Mayer, R. E. 他(1991) *Biochemistry* 30: 3589-3597)。

【0011】

STPとは対照的に、チロシン特異的ホスファターゼ(YP)は、一般に単量体タンパク質であって細胞膜を通過するシグナル伝達において主に機能する。YPは、

膜貫通型受容体様タンパク質或いは可溶性非膜貫通型タンパク質の何れかに分類される。それぞれのYPは、活性部位を含む約250個のアミノ酸の保存された触媒ドメインを有する。活性部位コンセンサス配列は、ホスファターゼ活性に必須のシステイン残基を含む13個のアミノ酸からなる。YPはリンパ球の活性化および細胞接着において重要な役割を果たす。さらに、少なくとも8種類のYPをコードする遺伝子が、染色体領域にマッピングされた。この染色体領域は、リンパ腫、白血病、小細胞肺癌、腺癌、および神経芽細胞腫を含む様々な腫瘍条件で転座即ち再編されている (Charbonneau, H. and Tonks, N.K. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 463-493を参照)。

【0012】

新規のプロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼ、並びにそれらをコードするポリヌクレオチドの発見によって、胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常の診断・治療・予防において有用な新規の組成物を提供することができるようになり、当分野におけるニーズが満たされる。

【0013】

(発明の要約)

本発明は、総称して「PPHKP」、個別にはそれぞれ「PPHKP-1」、「PPHKP-2」、「PPHKP-3」、「PPHKP-4」、「PPHKP-5」、「PPHKP-6」、「PPHKP-7」、「PPHKP-8」、「PPHKP-9」、「PPHKP-10」、および「PPHKP-11」と呼ぶプロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼである精製されたポリペプチドを提供する。本発明の一実施態様では、(a) SEQ ID NO:1乃至11 (SEQ ID NO:1 - 11) からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1 - 11のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0014】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたポリペプチドをコードする。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:12 - 22からなる一群から選択される。

【0015】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を提供する。

【0016】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの生産方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドの発現に好適な条件下で、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含

む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、(b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【0017】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0018】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:12 - 22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:12 - 22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0019】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:12 - 22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:12 - 22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(a) 前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を構成する少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルをハイブ

リダイズさせるステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片とでハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、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、該ステップと、(b)前記ハイブリダイゼーション複合体の存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0020】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b)SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c)前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d)前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e)前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(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ステップと、(b)増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。

【0021】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:1-11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b)SEQ ID NO:1-11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c)SEQ ID NO:1-11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d)SEQ ID NO:1-11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む効果的な量のポリペプチド及び好適な医薬用賦形剤を含む組成物を提供する。一実施例では、SEQ ID NO:1-11からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的PPHKPの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0022】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)このサンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的PPHKPの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0023】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)このサンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアンタゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的PPHKPの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0024】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配

列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)このポリペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

【0025】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 11からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 11とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む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。このスクリーニング方法は、(a)このポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性を評価するステップと、(c)この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性と、この試験化合物の不在下でのこのポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性の変化が、このポリペプチドの活性を調節する化合物の存在を示唆するという特徴を有する。

【0026】

更に本発明は、SEQ ID NO:12 - 22からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、(a)この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0027】

本発明はさらに、試験化合物の毒性を評価する方法を提供する。この方法は、(a)核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処置するステップと、(b)処置した前記生体サンプルの核酸をプローブとハイブリダイズするステップと、(c)ハイブリダイゼーション複合体の収量を測定するステップと、(d)前記処置した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処置の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量とを比較するステップとを含み、前記処置した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差異が試験化合物の毒性を示唆する。この方法における前記プローブは、(1)SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2)SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3)前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4)前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5)前記(1)乃至(4)のRNA等価物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの連続する少なくとも20個のヌクレオチドを含む。また、前記ハイブリダイゼーションは、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われる。また、前記標的ポリヌクレオチドが、(1)SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2)SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3)前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4)前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5)前記(1)乃至(5)のRNA等価物とを含む。代替的に前記標的ポリヌクレオチドは前記ポリヌクレオチド配列の断片である。

【0028】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質及び核酸配列、方法について説明する前に、本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更でき

ることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いられたものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理解されたい。

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

（定義）

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

PPHKPをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、PPHKPと同じポリペプチド或いはPPHKPの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、PPHKPをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置でのアレル変異配列との不適當或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにPPHKPをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じPPHKPと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にPPHKPの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち極性非荷電側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びチロシンが含まれ得る。

【0035】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子の配列を指す場合、

「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0036】

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

【0037】

用語「アンタゴニスト」は、PPHKPの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、PPHKPに直接相互作用するか、或いはPPHKPが関与する生物学的経路の成分と作用して、PPHKPの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

本明細書において「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス（コーディン

グ)鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス成分には、DNAと、RNAと、ペプチド核酸(PNA)と、ホスホロチオネートやメチルホスホネート、ベンジルホスホネート(benzylphosphonate)などの修飾された骨格(backbone linkage)を有するオリゴヌクレオチドと、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などの修飾された糖を有するオリゴヌクレオチドと、5-メチルシトシンまたは2'-deoxyuracil、7-deaza-2'-deoxyguanosineなどの修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アンチセンス分子は、化学合成や転写を含む任意の方法で作ることができる。相補的アンチセンス分子は、一度細胞に導入されると、細胞によって作られた天然の核酸配列と塩基対となって二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「負」または「マイナス」という表現はアンチセンス鎖であり、「正」または「プラス」という表現はセンス鎖である。

【0041】

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

【0042】

用語「相補的」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、配列「5'AGT3'」が相補的な配列「3'TCA5'」と対をなす。

【0043】

「所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物」または「所定のアミノ酸配列を含む組成物」は広い意味で、所定のヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この組成物は、乾燥した製剤或いは水溶液を含み得る。PPHKP若しくはPPHKPの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。

ハイブリダイゼーションにおいて、プローブは、塩（例えば、NaCl）及び界面活性剤（例えば、SDS：ドデシル硫酸ナトリウム）、その他の物質（例えば、デンハート液、乾燥ミルク、サケ精子DNAなど）を含む水溶液に展開され得る。

【0044】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット（PE Biosystems, Foster City CA）を用いて5'及び/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGEL VIEW 断片構築システム（GCG, Madison, WI）またはPhrap（University of Washington, Seattle WA）等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び重複の両方によって構築されるコンセンサス配列もある。

【0045】

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

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Set
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu

Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

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

【0046】

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

【0047】

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

【0048】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合或いは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

【0049】

用語「断片」は、PPHKPまたはPPHKPをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。「断片」の最大の長さは、親配列から1つのヌクレオチド/

アミノ酸残基を差し引いた長さである。例えば、ある断片は、5～1000個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基を含む。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子、またはその他の目的に用いる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さである。断片は、優先的に分子の特定の領域から選択される場合もある。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示された最初の250若しくは500のアミノ酸（或いは、ポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された連続するアミノ酸の所定の長さを含み得る。これらの長さは一例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の任意の長さが、本発明の実施例に含まれ得る。

【0050】

SEQ ID NO:12 - 22の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:12 - 22を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO:12 - 22のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:12 - 22を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:12 - 22の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0051】

「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）、それに続く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。

【0052】

「相同性」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列間または2つ以上のポリペプチド配列間の配列類似性である。この配列類似性は配列同一性と言い換えることができる。

【0053】

SEQ ID NO:1 - 11のある断片は、SEQ ID NO:12 - 22のある断片によってコード

される。SEQ ID NO:1 - 11のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1 - 11を同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1 - 11のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1 - 11を認識する抗体の作製用の免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:1 - 11の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0054】

用語「類似性」は相補性の程度を表す。これには、部分的類似性と完全な類似性とがある。用語「同一性」を「類似性」とも言える。同一の配列と標的の核酸とのハイブリダイゼーションが少なくとも部分的に阻止される部分的に相補的な配列は、「実質的に類似」と呼ばれる。完全に相補的な配列と標的の配列とのハイブリダイゼーションの阻止は、緩いストリンジェントな条件の下、ハイブリダイゼーションアッセイ（サザンブロットニング或いはノーザンブロットニング法、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて検査される。実質的に類似の配列或いはハイブリダイゼーションプローブは、緩いストリンジェントな条件の下、完全に類似（同一）の配列と標的の配列との結合に対して競合して抑制する。これは、緩いストリンジェントな条件下では非特異的な結合が許容されるということではなく、緩いストリンジェントな条件では、2つの配列の互いへの結合が特異的（即ち、選択的）に相互作用しなければならぬ。部分的な相補性ともいえない（例えば、30%未満の類似性或いは同一性）第2の標的配列を用いて、非特異的な結合が存在しないことの検査が可能である。非特異的な結合が存在しない場合は、実質的に類似配列或いはプローブが第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

【0055】

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

【0056】

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

【0057】

別法では、一般に用いられ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式が、NCBI、Bethesda、MD、及びインターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) などから入手できるNational Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)によって得られる。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>にアクセスして、対話形式で利用できる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (以下に記載) の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメーターと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)でblastnを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のよ

うにする。

【0058】

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

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

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

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

【0062】

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

【0063】

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

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

【0064】

「ヒト人工染色体 (HAC)」は、約6 kb (キロベース) ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、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を含む直鎖状の小染色体である。

【0065】

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

【0066】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高い相同性を有することを意味する。アニーリングが許容される条件下で、特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成され、洗浄過程の後もハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスの厳密性即ちストリンジェント (stringency) の決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合、即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合が減少する。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によって日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの間は一定であるが、洗浄過程は、目的のストリンジェントにするためにその最中に条件の変更が可能であり、ハイブリダイゼーション特異性が得られる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68 で、約6 × SSC、約1% (w/v) のSDS、並びに約100 µg / mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【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、洗浄過程を行う際の温度によっても左右される。この洗浄温度は通常、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の熱融点 (T_m) より約5 ~ 20 低く選択される。この T_m は、(所定のイオン強度とpHの下) 標的の配列の50%が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーションの条件は、周知であり、Sambrook, J. 他による, 1989, Molecular Cloni

ng: A Laboratory Manual, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainville NY; 特に2巻の9章に記載されている。

【0068】

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

【0069】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合によって、形成された2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中（例えば、C₀tまたはR₀t分析）で形成されるか、或いは溶液中の1つの核酸配列と固体の支持物（例えば、紙、膜、フィルター、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板）に固定されたもう一つの核酸配列とで形成され得る。

【0070】

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

【0071】

「免疫応答」は、炎症性疾患及び外傷、免疫異常、感染症、遺伝病などに関連する症状を指す。これらの症状は、細胞系及び全身防衛系に影響を及ぼすサイト

カイン及びケモカイン、別の情報伝達分子などの様々な因子の発現という特徴をもつ。

【0072】

用語「マイクロアレイ」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。

【0073】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0074】

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

【0075】

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

【0076】

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

【0077】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチド骨格に結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子又は抗遺伝子剤を指す。この末端のリシンにより、この組成物が溶解性となる。PNAは、相補的な一本鎖DNAやRNAに優先的に結合して転写

物の伸長を止め、ポリエチレングリコール化して細胞における寿命を延ばし得る。

【0078】

PPHKPの「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及びその他の当分野で既知の修飾を含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、PPHKPの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0079】

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

【0080】

本発明に用いられるプローブ及びプライマーは、既知の配列の少なくとも15の連続するヌクレオチドを含む。特異性を高めるために、より長いプローブ及びプライマーが用いることも可能である。例えば、開示した核酸配列の連続する少なくとも20または25、30、40、50、60、70、80、90、100、150のヌクレオチドを含む。プローブ及びプライマーは、上記した例より相当長いものも用いることができ、本明細書の表及び図面、配列表に示された任意の長さのヌクレオチドも用いることができることを理解されたい。

【0081】

プローブ及びプライマーの準備及び使用方法については、例えば、Sambrook, J.他による、1989年、名称「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2

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

【0082】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のプライマー選択用のコンピュータプログラムで選択される。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェアは、それぞれが最大100ヌクレオチドまでのPCR用のプライマーの対の選択、及び32,000塩基までの入力ポリヌクレオチド配列から最大5,000ヌクレオチドまでの大きなポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドの分析に有用である。類似のプライマー選択用プログラムには、能力を拡大する追加の機能が含まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TXより入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択できるため、ゲノムワイドスコープ(genome-wide scope)におけるプライマーの設計に有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MAより入手可能)によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーのニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム(UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UKより入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域或いは最も保存されていない領域のどちらかとハイブリダイ

ズするプライマーを選択することができる。従って、このプログラムは、固有及び保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記した任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法やシーケンシングプライマー、マイクロアレイエレメント、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

【0083】

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

【0084】

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

【0085】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の非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'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写や翻訳、またはRNAの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。

【0086】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的部分である。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、インヒビター、磁気粒子及びその他の

当分野で既知の成分が含まれる。

【0087】

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

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

「転写イメージ」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

【0094】

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

【0095】

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

移入、形質転換、トランス接合 (transconjugation) などの方法によって、宿主に導入することができる。本発明のDNAをそのような生物に導入する技術は周知であり、前出のSambrook他 (1989) に記載されている。

【0096】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメーター設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastnによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定の核酸配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。このような核酸の対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。ある変異配列は、例えば、「アレル」変異配列(上述)または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、「多型」変異配列と表すことができる。スプライス変異配列は基準分子と同一性が極めて高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの択一的スプライシングによってポリヌクレオチドの数が多くなったり、少なくなったりする。対応するポリペプチドは、基準分子に存在する追加の機能ドメインを有したり、基準分子に存在するドメインが欠落したりし得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。得られるポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多型変異配列は、所定の種と種における特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1ヌクレオチド多型」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団、病態、病態の性向を示唆し得る。

【0097】

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

【0098】

(発明)

本発明は、新規のヒトプロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼ (PPHKP) 及びPPHKPをコードするポリヌクレオチドの発見に基づいた、胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常の診断、治療、及び予防におけるそれらの組成物の使用に関する。

【0099】

表1は、PPHKPをコードする完全長のヌクレオチド配列の構築に用いたインサイト社クローンを示す。列1及び列2はそれぞれ、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号 (SEQ ID NO) を示す。列3は、各PPHKPをコードする核酸が同定されたIncyteクローンのクローンIDを示し、列4は、それらのクローンが単離されたcDNAライブラリを示す。列5は、Incyteクローン及びそれらに対応するcDNAライブラリを示す。cDNAライブラリが示されていないインサイト社クローンは、プールされたcDNAライブラリに由来する。場合によっては、GenBank配列識別子が列5に示されている。列5に示されているインサイト社クローン及びGenBank cDNA配列は、各PPHKPのコンセンサスヌクレオチド配列の構築に用いられ、ハイブリダイゼーション技術における断片として有用である。

【0100】

表2の各列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特性を示す。列1は配列番号 (SEQ ID NO)、列2は各ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の数、列3は潜在的なリン酸化部位、列4は潜在的なグリコシル化部位、列5はシグネチャ (signature) 配列及びモチーフを有するアミノ酸残基、列6は、BLAST分析によって同定された相同配列、及び相当する引用を示す。また、引用することを持って本明細書のの一部とする。列7は、分析方法、場合によってはその分析方法が適用できる検索可能なデータベースを示す。列7の分析方法は、配列相同性及びタンパク質モチーフによって各ポリペプチドを特長つけるために用いられた。

【0101】

表3の列は、PPHKPをコードするヌクレオチド配列に関連した組織特異性及び疾患、異常症、症状を示している。表3の列1は、ヌクレオチドの配列番号 (SE

Q ID NO)を示している。列2は、列1のヌクレオチド配列の断片を示している。これらの断片は、例えば、SEQ ID NO:12 - 22を同定し、SEQ ID NO:12 - 22と関連するポリヌクレオチド配列とを区別する、ハイブリダイゼーション若しくは増幅の技術において有用である。これらの断片によってコードされるポリペプチドは、例えば、免疫原性ペプチドとして有用である。列3は、PPHKPを発現する組織名、及びPPHKPを発現する全組織におけるその割合を示す。列4は、PPHKPを発現する組織に関連する疾患若しくは異常症、症状、並びにPPHKPを発現する全組織におけるそれらの割合を示す。列5は、各cDNAライブラリのサブクローニングに用いたベクターを示す。注目すべきは、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:22の組織特異的な発現である。SEQ ID NO:14を発現するcDNAライブラリの約75%が、神経組織、特に脳および脊髄組織に由来する。SEQ ID NO:17を発現するcDNAライブラリの約88%が、神経組織、特に脳組織に由来する。SEQ ID NO:22を発現するcDNAライブラリの約82%が胃腸組織に由来する。

【0102】

表4の各列は、PPHKPをコードするcDNAのクローンが単離されたcDNAライブラリの作製に用いられた組織についての説明である。列1は、ヌクレオチドのSEQ ID NOを示し、列2はそれらのクローンが単離されたcDNAライブラリを示し、列3は列2のcDNAライブラリに対応する組織の由来及び詳細を示す。

【0103】

SEQ ID NO:12は、第7染色体の88.40~90.30センチモルガン及び第11染色体の89.80~90.70センチモルガンの範囲にマッピングされる。この第7染色体の88.40~90.30センチモルガンの範囲には、B細胞CC/リンパ腫7bに関連するESTが含まれる。SEQ ID NO:16は、第20染色体の短腕(p)の末端~6.20センチモルガンの範囲にマッピングされる。この範囲には、非受容体型基質1であるタンパク質チロシンホスファターゼに関連するESTが含まれる。SEQ ID NO:21は、第22染色体の0.0~40.20センチモルガンの範囲にマッピングされる。この範囲には、白血病関連リンタンパク質p18に関連するESTが含まれる。このリンタンパク質p18は、種々のタイプのヒト急性白血病の細胞に高レベルで見られるサイトゾルリンタンパク質である。

【0104】

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

【0105】

本発明はまた、PPHKPをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、PPHKPをコードするSEQ ID NO:12-22からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO:12-22のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

【0106】

本発明はまた、PPHKPをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、PPHKPをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも80%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも90%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO:12-22からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも80%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも90%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO:12-22からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列の変異配列を提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、PPHKPの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードする。

【0107】

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

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

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:12-22及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; and Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

【0111】

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

【0112】

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

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

【0113】

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

【0114】

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

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

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

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

【0118】

別の実施例によれば、PPHKPをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である（例えば、Caruthers, M.H.等（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:215-223; 及びHorn, T.他（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser.225-232を参照）。別法として、化学的方法を用いてPPHKP自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、ペプチド合成は種々の固相技術を用いて実行可能である（例えば、Creighton, T. (1984) *Proteins. Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60; Roberge, J.Y.等(1995) *Science* 269:202-204を参照）。また、合成の自動化は例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー（PE Biosystems）を用いて達成し得る。更にPPHKPのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【0119】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィー(例えば、Chiez, R.M. 及び F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421を参照)を用いて実質的に精製可能である。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸分析或いはシーケンシングにより確認することができる(例えば、Creighton、前出、pp28-53を参照)。

【0120】

生物学的に活性なPPHKPを発現させるために、PPHKPをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要なエレメントを含む。これらのエレメントには、ベクター及びPPHKPをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、

5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このようなエレメントは、その長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、PPHKPをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドン及びコザック配列などの近傍の配列が含まれる。PPHKPをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれなければならない。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、自然及び合成の様々なものから得ることが可能である。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。(例えば、Scharf, D. 他 (1994) Results Probl. Cell Differ. 201 - 18-162.を参照)。

【0121】

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

【0122】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、PPHKPをコードする配列の保持及び発現が可能である。これらには、限定するものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌や、ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で

形質転換された植物細胞系や、動物細胞系などが含まれる（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.他 (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C. A. ら (1994) *Bio/Technology* 12:18 1-184; Engelhard, E.K. 他 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227、Sandig, V. 他 (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:1937-1945、タカマツ, N. (1987) *EMBOJ.* 6:307-311、Coruzzi, G. 他 (1984) *EMBOJ.* 3:1671-1680、Broglie, R. 他 (1984) *Science* 224:838-843、Winter, J. 他 (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. 他 (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、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. 他 (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356、Yu, M. 他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他(1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P. 他(1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0123】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、PPHKPをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて選択可能である。例えば、PPHKPをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT 1 プラスミド(GIBCO BRL)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にPPHKPをコードする配列をライゲーションするとlacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクターを用いて、クローニン

グされた配列の *in vitro*での転写、ジデオキシスクリーニング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失を作り出すことが可能である(例えば、Van Heeke, G.及びS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509. を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のPPHKPが必要な場合は、PPHKPの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力に発現を誘発するT5またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターを使用できる。

【0124】

PPHKPの発現に酵母の発現系の使用が可能である。因子やアルコールオキシダーゼやPGHプロモーターなどの構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多種のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは *Pichia pastoris* に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、上記のAusubel.; 及びBitter, G.A. 他 (1987) Methods Enzymol. 153:51-794; Scorer, C. A. 他 (1994) Bio/Technology 12:181-184. を参照)

植物系もPPHKPの発現に使用可能である。PPHKPをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV (例えば、Coruzzi, 前出、Broglie, 前出、Winter, 前出を参照) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて促進される。これらの作製物は、直接のDNA形質転換或いは病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞の中に導入可能である。(例えば、The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill NY, pp.191-196を参照)。

【0125】

哺乳動物細胞では、多種のウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物/翻訳複合体にPPHKPをコードする配列を結合し得る。ウイルスのゲノムの非必須のE1またはE3領域への挿入により、感染した宿主細胞にPPHKPを発現する生ウイルスを得ることが可能である(Logan

, J.及びShenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659を参照)。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させることが可能である。タンパク質を高レベルで発現させるために、SV40またはEBVを基にしたベクターを用いることが可能である。

【0126】

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

【0127】

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

【0128】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収することが可能である。選択系には、以下のものに限定はしないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれtk^r又はapr^r細胞において使用される。(例えば、Wigler, M. 他(1977) Cell 11:223-232; 及びLowy, I. 他(1980) Cell 22:817-823を参照)。また代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を選択のベースとして用いること

ができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、als或いはpatはクロルスルフロン (cPPHKPsulfuron)、ホスフィントリシンアセチルトランスフェラーゼ (phosphinotricin acetyltransferase) に対する耐性を与える(例えば、Wigler, M. 他. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. 他(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14を参照)。さらに選択に利用できる遺伝子、例えば、代謝のために細胞が必要なものを変えるtrpB及びhisDが文献に記載されている(例えば、Hartman, S.C.及びR.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51を参照)。アノトシアニン、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GUS、ルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリンなどの可視マーカーが用いられる。緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Clontech, Palo Alto, CA)も使用できる。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(例えば、Rhodes, C.A.他 (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131を参照)。

【0129】

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

【0130】

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

、これらに限定されるものではない。

【0131】

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

【0132】

種々の標識技術及び結合技術が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイに用いられ得る。PPHKPをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、PPHKPをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングすることも可能である。当分野では周知であり市販されているこのようなベクターを、T7, T3, またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドの追加によって、in vitroでのRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えば、Amersham Pharmacia Biotech及びPromega (Madison WI)、U.S. Biochemical Corp (Cleveland OH) が市販する種々のキットを用いて行うことができる。容易な検出のために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、コファクター、インヒビター、磁気粒子、及び放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤など

が含まれる。

【0133】

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

【0134】

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

【0135】

本発明の別の実施例では、PPHKPをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラ PPHKPタンパク質が、PPHKPの活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分が、市販の親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。このような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6

- His、FLAG、c - mc、赤血球凝集素 (HA) が含まれるが、これらに限定されるものではない。GST及びMBP、Trx、CBP、6 - Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物 (phenylarsine oxide)、カルモジュリン、金属キレート樹脂のそれぞれで同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c - mc、及び赤血球凝集素 (HA) によって、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた融合タンパク質の免疫親和性の精製ができる。また、PPHKPをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、PPHKPが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現と精製の方法は、Ausubel. (1995、前出 ch 10). に記載されている。市販されている様々なキットを用いて、融合タンパク質の発現及び精製を促進できる。

【0136】

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

【0137】

本発明のPPHKPまたはその断片を用いて、PPHKPに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも1つまたは複数の試験化合物を用いて、PPHKPへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。試験化合物の例には、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。

【0138】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのPPHKPの天然のリガンド、または天然の基質、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. 他 (1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、PPH

KPが結合する天然受容体、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ある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。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には、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてPPHKPを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、大腸菌からの細胞が含まれる。PPHKPを発現する細胞またはPPHKPを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、PPHKPまたは化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

【0139】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、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することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたPPHKPと結合させるステップと、PPHKPとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、細胞遊離剤、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

【0140】

本発明のPPHKPまたはその断片を用いて、PPHKPの活性を調整する化合物をスクリーニングすることが可能である。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含まれる。一実施例では、PPHKPが少なくとも1つの試験化合物と結合する、PPHKPの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのPPHKPの活性が試験化合物不在下でのPPHKPの活性と比較する。試験化合物の存在下でのPPHKPの活性の変化は、PPHKPの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をPPHKPの活性に適した条件下でPPHKPを含むin vitroまたは細胞遊離系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、PPHKPの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要

がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【0141】

別の実施例では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、PPHKPまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ノックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（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細胞株等のマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。この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（neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292）等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をノックアウトする（Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330）。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

【0142】

PPHKPをコードするポリヌクレオチドをin vitroでヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞の種類を含む少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、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. 他 (1998) Science 282:1145-1147）。

【0143】

PPHKPをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物（ブタ）または遺伝子組換え動物（マウスまたはラット）

を作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、PPHKP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、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、潜在的な医薬品を用いて処置し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばPPHKPを乳汁内に分泌するなどPPHKPを過剰発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る (Janne, J. 他 (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4:55-74)。

【0144】

(治療)

PPHKPのある領域とプロテインホスファターゼ及びプロテインキナーゼのある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、PPHKPの発現は、胃腸組織、炎症組織、神経組織、増殖組織、および癌組織に密接に関連する。従って、PPHKPは、胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常においてある役割を果たすと考えられる。PPHKPの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、PPHKPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、PPHKP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、PPHKPの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0145】

従って、一実施例において、PPHKP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PPHKP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、このような疾患には胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常が含まれ、胃腸疾患の中には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過

敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、及び後天性免疫不全症候群（AIDS）腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、肝脂肪症、血色素症、ウィルソン病、 α -1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌とが含まれ、免疫系の疾患の中には、炎症及び日光性角化症、後天性免疫不全症候群（AIDS）及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ（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、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、神経の疾患の中には、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、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及び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、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、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、クールー及びクロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫（cerebelloretinal hemangioblastomatosis）、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経

骨格異常症、自律神経系障害、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、気分性及び不安性の障害、分裂病性疾患を含む精神病と、季節性障害（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、及びトゥレット病と、進行性核上麻痺、皮質基部変性（corticobasal degeneration）及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、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、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、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、脾臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、精巣、胸腺、甲状腺、及び子宮の癌が含まれる。

【0146】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPPHKP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、PPHKPまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

【0147】

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

【0148】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPPHKP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、PPHKPの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0149】

更なる実施例では、PPHKPの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にPPHKPのアンタゴニストを投与することが可能である。

限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常が含まれる。一実施態様では、PPHKPと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはPPHKPを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング或いは運搬機構として間接的に用いられ得る。

【0150】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPPHKPの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、PPHKPをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【0151】

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

【0152】

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

【0153】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、PPHKPまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備え

るそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。このようなアジュバントにはフロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバント、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、及びジニトロフェノールなどの界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG (bacilli Calmette-Guerin) 及びCorynebacterium parvumが特に好ましい。

【0154】

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

【0155】

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

【0156】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えば、Morrison, S.L.他. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81-4851-4855; Neuberger, M.S.他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.等. (1985) Nature 314:452,454を参照)。別法では、当分野

で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、PPHKP特異性一本鎖抗体を生成する。関連する特異性を備えるが別のイデオタイプ組成の抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから鎖混合によって生成することもできる（例えば、Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-3を参照）。

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、PPHKPに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下でPPHKP抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除して得られる値である。多数のPPHKPエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体医薬の K_a は、PPHKPに対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のPPHKPエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体医薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ の高親和性抗体医薬は、PPHKP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 $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$ の低親和性抗体医薬は、PPHKPが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製 (immunopurification) 及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0161】

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

【0162】

本発明の別の実施例では、PPHKPをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、PPHKPをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子 (DNA及びRNA、修飾ヌクレオチド) を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、PPHKPをコードする配列の制

御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である。

【0163】

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送達することができる（例えば、Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. 他 (1995) 9(13):1288-1296.を参照)。また、アンチセンス配列は、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（例えば、Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, 前出; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347を参照)。その他の遺伝送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ、及び当分野で周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. 他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.を参照）。

【0164】

本発明の別の実施例では、PPHKP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の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療は、(i) 遺伝子欠損症（例えば、X染色体連鎖遺伝（Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) *Science* 288:669-672）によって特徴づけられる重度の複合型免疫欠損（SCID）-X1）、遺伝性アデノシン - デアミナーゼ（ADA）欠損症（Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. 他 (1995) *Science* 270:470-475）に関連する重度の複合型免疫欠損、嚢胞性繊維症（Zabner, J. 他 (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. 他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. 他. (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因子欠損による血友病（Crystal, 35 R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and Somia. N. (1997) *Nature* 389:239-242）を治療したり、(ii) 条件的致死性遺伝子産物（例

例えば、細胞増殖の制御不能による癌の場合)を発現させたり、及び(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. 他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 11395-11399)や、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、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て行うことができる。PPHKの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からPPHKを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【0165】

本発明の更なる実施例では、PPHKの欠損による疾患や異常症は、PPHKをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってPPHK欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的な導入技術には、(i)個々の細胞内へのDNAのマイクロインジェクション、(ii)金粒子の打ち込み、(iii)リポソーム仲介性トランスフェクション、(iv)受容体仲介性遺伝子導入、及び(v)DNAトランスポソン(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)の使用が含まれる。

【0166】

PPHKの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。PPHKを発現させるために、(i)恒常的に活性なプロモーター(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、チミンキナーゼ(TK)、若しくは - アクチン遺伝子等)、(ii)誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、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. 他 (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている: Invitrogen)、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(Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 前出)、または(iii)正常な個体に由来するPPHKP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ることが可能である。

【0167】

市販のリポソーム形質転換キット(例えば、Invitrogenが販売しているPERFECT LIPID及び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である。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. 他 (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、これらの標準的な哺乳動物トランスフェクションプロトコルを変更する必要がある。

【0168】

本発明の別の実施例では、PPHKP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)プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でPPHKP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)追加のレトロウイルス・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ディング配列を伴う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PFBNE0)はStratagene社から入手可能であり、公表データ(Riviere, I. 他. (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。このベクターは、VSVg(Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; D

ull, T. 他 (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. 他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880) 等の乱交雑エンベロープタンパク質若しくは標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロープ遺伝子を発現する好適なベクター産生細胞系 (VPCL) において増殖される。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」) において、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が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、ある細胞集団 (例えば、CD4⁺T細胞) の形質導入、並びに形質導入した細胞を患者に戻す方法は、遺伝子治療の分野では周知であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. 他 (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0169】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、PPHKPの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にPPHKPをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。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隣臓の無損傷の隣島の中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. 他 (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が、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また、Antinozzi, P.A. 他 (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544; and Verma, I.M. and N. Sojima (1997) Nature 18:389:239-242を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0170】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、PPHKPの発現に関連する

1 或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にPPHKPをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス (HSV) 系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にPPHKPを導入する際に特に重要である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製適格性の単純疱疹ウイルス (HSV) I型系のベクターは、霊長類の眼にレポーター遺伝子を送達するために用いられてきた (Liu, X. 他 (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製は、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 (*Herpes simplex virus swains for gene transfer*) 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。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コントロールの下で、細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を含むゲノムからなる組換えHSV d92についての記載がある。また上記特許には、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV株の作製及び使用方法が開示されている。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) *J. Virol.* 73:519-532 and Xu, H. 他 (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。クローニングされたヘルペスウイルス配列の操作や、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トランスフェクト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分野で周知の技術である。

【0171】

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PPHKPをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス (Semliki Forest Virus, SFV) の生物学的な研究が広範に行われ、遺伝子伝達ベクター (gene transfer vector) 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が完全長のゲノムRNAより高いレベルで複製されるため、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対してカプシドタンパク質が

過剰に産生される。同様に、PPHKPをコードする配列を ウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のPPHKPをコードするRNAが産生され、高いレベルでPPHKPが合成される。通常は ウイルス感染は2～3日以内の細胞溶解に関係するが、シンドビスウイルス(SIN)の変異体を有するハムスターの正常な腎細胞(BHK-21)の持続的な感染を確立する能力は、 ウイルスの溶解性の複製が遺伝子治療に適用できるように好適に変更することが可能であることを示唆している(Dryga, S.A. 他. (1997) *Virology* 228 :74-83)。様々な宿主に ウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にPPHKPを導入することができる。ある集団における細胞のサブセットの特定の形質導入には、形質導入する前に細胞のソーティングを必要とする場合がある。 ウイルスの感染性cDNAクローンの操作、 ウイルスcDNA及びRNAのトランスフェクション、並びに ウイルスの感染方法は当分野で周知である。

【0172】

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

【0173】

酵素性RNA分子であるリボザイムは、RNAの特異的切断を触媒するために用いることができる。リボザイム作用の機構には、相補的な標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションが含まれ、ヌクレオチド鎖切断が続く。例えば、PPHKPをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。

【0174】

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

【0175】

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

【0176】

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

【0177】

本発明の更なる実施例は、PPHKPをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物には、限定するものではないが、特定のポリヌクレオチド配列と相互作用可能な非高分子化学物質、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、転写因子やその他のポリペプチド転写調節因子が含まれる。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター或いはエンハンサーとして作用し、ポリヌクレオチドの発現を変化させ得る。従って、PPHKPの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、PPHKP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用であり、PPHKP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、PPHKP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用であり得る。

【0178】

特定のポリヌクレオチドの発現の変化の有効性を調べるために、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することができる。試験化合物は、有効な化合物の化学修飾を含む当分野で周知の任意の方法で得ることができる。このような方法は、ポリヌクレオチドの発現を変化させる場合、一般に市販されている或い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、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いて化合物を合理的にデザインする場合、更に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。PPHKP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露して得る。サンプルには、例えば無傷細胞、透過化処理した細胞、*in vitro*細胞遊離系または再構成生化学系が含まれ得る。PPHKPをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、PPHKP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、特定の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の収量を定量し、その値が1或い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おける基準となり得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現の変化が検出される場合は、ポリヌクレオチドの発現の変化に試験化合物が有効であることを示している。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物を調べるために、例えばSchizosaccharomyces pombe遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clarke, M.L. 他 (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13) を用いてスクリーニングする。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を調べるための、各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、及び修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリのスクリーニングを含む (Bruice, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0179】

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

【0180】

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

【0181】

本発明の別の実施例は、上記した全ての治療効果のために、医学上認められる担体と共に医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような組成物は、PPHKP、PPHKPの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、又はPPHKPのインヒビターなどからなる。この組成物は、単体で、或いは安定剤などの1種類以上の別の薬剤と共に、無菌の生体適合性医薬品担体に投与することができる。このよう

な医薬品担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、及び水などが含まれるがこれらに限定されるものではない。この組成物は、単独或いは薬物又はホルモンなどの別の薬剤と共に投与することができる。

【0182】

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

【0183】

肺投与用の組成物は、液状または乾燥粉末状に調製することができる。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば、従来の低分子量有機薬剤）の場合には、速効薬剤のエアロゾル輸送が当分野で周知である。高分子（例えばより大きなペプチドやタンパク質）の場合には、肺の肺胞領域を介する肺輸送の技術が近年向上したため、インスリン等の薬剤を実際に血中に輸送することが可能となった（Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射を用いなくて投与できるという点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーが必要でなくなる。

【0184】

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

【0185】

組成物の特殊な形状は、PPHKPまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく調製される。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。別法では、PPHKPまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして作製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されることが確認されている（Schwarze, S.R. 他 (1999) Science 285:1569-1572）。

【0186】

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

【0187】

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

【0188】

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

【0189】

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

【0190】

(診断)

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

【0191】

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

【0192】

別の実施例によれば、PPHKPをコードするポリヌクレオチドを診断のために用

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

【0193】

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

【0194】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、PPHKPをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:12-22の配列、或いはPPHKP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。

【0195】

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

レポーターの集団によって標識され得る。

【0196】

PPHKPをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、PPHKPの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には胃腸疾患、免疫系の疾患、神経疾患、および癌を含む細胞増殖異常が含まれ、胃腸疾患の中には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、及び後天性免疫不全症候群(AIDS)腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、肝脂肪症、血色素症、ウィルソン病、 α -1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌とが含まれ、免疫系の疾患の中には、炎症及び日光性角化症、後天性免疫不全症候群(AIDS)及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ(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、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染

症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、神経の疾患の中には、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、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及び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、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、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、クールー及びクローイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、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、気分性及び不安性の障害、分裂病性疾患を含む精神病と、季節性障害 (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、及びトゥーレット病と、進行性核上麻痺、皮質基部変性 (corticobasal degeneration) 及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病 (MCTD)、骨髓線維症、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、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髓腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髓、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、精巣、胸腺、甲状腺、及び子宮の癌が含まれる。PPHKをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック (dipstick)、ピン (pin)、ELISA式アッセイ、及び変異PPHKの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。このような質的或いは量的方法は、当分野では周知である。

【0197】

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

【0198】

PPHKPの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、正常あるいは標準的な発現の概要が確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、PPHKPをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。基準値と被験者の値との偏差を用いて罹患しているかどうかを決定する。

【0199】

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

【0200】

癌では、個体からの生体組織における異常な量の転写物が、疾患の発生の素因

を示し、また実際に臨床的症狀が出る前に疾患を検出する方法を提供することが可能である。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法或いは積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または進行を防ぐことが可能となる。

【0201】

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

【0202】

或る実施態様において、PPHKP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、一塩基多型(SNP)を検出し得る。SNPは、ヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となる場合が多いヌクレオチドの置換、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、一本鎖立体構造多型(SSCP)及び蛍光SSCP(fSSCP)法が含まれる。SSCPでは、PPHKP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たポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でDNAを増幅する。このDNAは、例えば病変或いは正常な組織、生検サンプル、体液等に由来し得る。このDNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR産物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。この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標識することによって、DNAシーケンシング装置などのハイスループット機器でアンプリマー(amplimer)の検出をすることが可能になる。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、共通のコンセンサス配列の構築に用いられる個々の重複するDNA断片の配列を比較することによって、多型を同定することができる。これらのコンピュー

データベースの方法は、DNA配列クロマトグラムの自動分析及び統計モデルを用いたシーケンシングエラーや研究室でのDNAの調整に起因する配列のばらつきを排除する。別法では、例えばハイスループットの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。

【0203】

PPHKPの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification)、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる (例えば、Melby, P.C.等(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44 ; Duplaa, C.等(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照)。多数のサンプルの定量速度は、目的のオリゴマーやポリヌクレオチドが種々の希釈液に含まれ、分光光度法或いは非色応答によって定量が迅速なハイスループット型のアッセイを用いることで加速された。

【0204】

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に由来する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。マイクロアレイを転写イメージング技術に用いて、多数の遺伝子の相対発現レベルを同時にモニタリングすることができる。これについては、Seilhamer, J.J.他に付与された米国特許第5,840,484号 (名称「Comparative Gene Transcript 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する。マイクロアレイはまた、遺伝子変異、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いて、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を解明し、疾患を診断し、遺伝子発現に関連する疾病の進行/後退をモニタリングし、疾患の治療における治療薬の開発や活性のモニタリングを行うことができる。特に、患者にとって最適かつ有効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作成することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づいて、患者に対して極めて効果的でありながら副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0205】

別の実施例では、PPHKPに特異的な抗体、PPHKPまたはその断片をマイクロアレ

イ上でエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようにタンパク質間相互作用、薬剤 - 標的相互作用及び遺伝子発現プロフィールをモニタリング及び測定することが可能である。

【0206】

或る実施例は、或る組織または細胞型の転写イメージを生成する本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞型により遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所定の条件下で所定の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析される (Seilliamer 他、米国特許第5,840,484号の"Comparative Gene Transcript Analysis" を参照。この特許に言及することを以って本明細書の一部とする)。従って、特定の組織または細胞型の転写物全体または逆転写物全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列をハイブリダイズすることにより、転写イメージが生成され得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列がマイクロアレイ上に複数のエレメントのサブセットを構成するハイスループット型でハイブリダイゼーションさせる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロフィールとなり得る。

【0207】

転写イメージは、組織、細胞株、生検サンプル、またはその他の生体サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。従って、転写イメージは、組織または生検サンプルの場合には in vivo、または細胞株の場合には in vitro における遺伝子発現を反映する。

【0208】

本発明のポリヌクレオチドの発現プロフィールを示す転写イメージはまた、合成化合物または天然化合物の毒性試験のみならず、in vitroモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用され得る。全ての化合物は、作用及び毒性の機構を示唆する、頻繁に分子フィンガープリント若しくは毒性シグネチャと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを引き起こす (Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:15 3-159、Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、また言及することを以って本明細書の一部とする)。試験

化合物が、毒性を有する既知の化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性が高い。フィンガープリンまたはシグネチャが、より多くの遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいれば、より有用かつ正確になる。理想としては、発現のゲノム全域にわたって測定し、最高品質のシグネチャを提供することである。任意の試験化合物によっても発現が変化しない遺伝子も同様に重要である。それは、これらの遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを標準化することができるためである。標準化処置は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャのエLEMENTへの遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない(例えば2000年2月29日にNational Institute of Environmental Health Sciencesより発行されたPress Release 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、毒性シグネチャを用いる毒性スクリーニングにおいて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要でありまた望ましいことである。

【0209】

或る実施例では、試験化合物の毒性は、核酸を含有する生体サンプルをその試験化合物で処置して評価する。処置した生体サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1若しくは複数のプローブでハイブリダイズさせ、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量することができる。処理した生体サンプル中の転写レベルを、非処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差が、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示唆する。

【0210】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞型のプロテオームを分析することに関連する。「プロテオーム」という用語は、特定のある組織または細胞型におけるタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームを構成する各タンパク質は、更に個々に分析することができる。プロテオーム発現パターン即ちプロフィールは、所定の条件下で所定の時間に発現したタンパ

ク質の数及びそれらの相対的な存在量を定量することにより分析する。従って、ある細胞のプロテオームのプロフィールは、特定の組織または細胞型のポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、このような分離は2次元ゲル電気泳動によって行う。この2次元ゲル電気泳動法では、まず、1次元の等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、次に、2次元のドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に従って分離する（前出のSteiner and Anderson）。これらのタンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの染色剤を用いてゲルを染色して、分散した個別の位置にあるスポットとしてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処置済みまたは未処置のいずれかの生体サンプルから得られる等位置にあるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処置に関連するタンパク質スポット密度の変化を調べる。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的に切断した後、質量分析する標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基であるその部分的な配列を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

【0211】

プロテオームのプロフィールは、PPHKPに特異的な抗体を用いてPPHKP発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上のエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝露して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する（Lueking, A. ら. (1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendoza, L.G. ら. (1999) Biotechniques 27:778-788）。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

【0212】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行して分析するべきである。或る組織における或るタンパク質では、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関性が低いことがあるため (Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18:533-537)、プロテオーム毒性シグネチャは、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロフィールを変化させる化合物の分析において有用たり得る。更に、体液中での転写の分析は、mRNAが急速に分解するため困難である。しがたがって、このような場合にはプロテオームのプロフィール作成はより信頼でき、情報価値がある。

【0213】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処置して評価する。処置された生体サンプル中で発現したタンパク質を分離して、各タンパク質の量が定量できるようにする。各タンパク質の量を、未処置生体サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプル中のタンパク質の量の差は、処置されたサンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。個々のタンパク質は、それらのアミノ酸残基をシーケンシングし、これらの部分配列を本発明のポリペプチドと比較することで同定する。

【0214】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処置することにより評価する。生体サンプルから得たタンパク質を、本発明のポリペプチドに特異的な抗体と共にインキュベートする。その抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処置された生体サンプル中のタンパク質の量を、未処置生体サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差が、処置サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。

【0215】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して使用し、分析する。(例えば、Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号; Schena, M. 他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:10614-10619; Baldeschweiler 他(1995) PCT出願番号W

095/251116; Shalon, D.他 (1995) PCT出願番号W095/35505; Heller, R.A. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; 及び Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、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。また、この文献を引用することを以って本明細書の一部とする。

【0216】

本発明の別の実施例ではまた、PPHKPをコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コーディング配列または非コーディング配列の何れかを用いることができるが、或る例では、コーディング配列より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間にコーディング配列が保存されていることにより、染色体マッピング時に望ましくない交差ハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。この配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工の染色体、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、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である (Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

【0217】

in situ蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) は、他の物理的及び遺伝子地図データと相関し得る (例えば、Heinz-Ulrich, 他による(1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968を参照)。遺伝子地図データの例は、種々の科学誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のワールドワイドウェブのサイトで見付けることができる。物理的な染色体地図上のPPHKPをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関

連するDNA領域の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

【0218】

染色体標本の in situハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子地図を拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置させることにより、たとえ正確なヒト染色体の位置が分かっていなくても、関連するマーカーが明らかになる場合が多い。この情報は、位置クローニング或いは別の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患の研究をしている研究者にとって価値がある。疾患や症候群に關与する1つ或いは複数の遺伝子の位置が、例えば血管拡張性失調症の11q22-23などの特定の遺伝子領域に遺伝子結合によって大まかに決定されると、その領域に対するどの配列マッピングも、さらなる調査のための関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表す（例えば、Gatti, R.A.他による(1988) Nature 336:577-580を参照）。また、目的の本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、即ち感染者の間の、転位置、反転などによる染色体位置の違いを検出することもある。

【0219】

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

【0220】

薬剤スクリーニングに用いる別の方法は、目的のタンパク質に対して、好適な結合親和性を有する化合物のスクリーニング処理能力を高めるために用いられる（例えば、Geysen,他による(1984) PCT出願番号 W084/03564を参照）。この方法では、相当な数の異なる小さな試験用化合物が、プラスチックピン或いは他の基板の上に合成される。試験用化合物は、PPHKP、或いはその断片と反応してから

洗浄される。次に、結合されたPPHKPが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたPPHKPはまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いて、ペプチドを捕らえ、固体支持物に固定することもできる。

【0221】

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

【0222】

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

【0223】

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

【0224】

前述した及び以下に記載した全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願番号60/154,141に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0225】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

RNAは、Clontech社から購入、或いは表4に列記した組織から単離した。まず、この組織の一部をホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解する一方、この組織の別の一部をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIZOL (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの单相溶液などの好適な変性剤の混合液に溶解した。この溶解物を塩

化セシウムにおいて遠心分離によって、或いはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムのどちらかとエタノール、或いは別の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

【0226】

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

【0227】

ある場合には、Stratagene社にRNAを提供し、Stratagene社が対応するcDNAライブラリを作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERSCRIP T プラスミドシステム(Life Technologies)を用いて当分野で周知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, ユニット5.1-6.6を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに結合させてから、好適な1つの制限酵素或いは複数の制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S 1000または SEPHAROSE CL2B、SEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、アガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。PBLUESCRIP Tプラスミド(Stratagene)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)、pcDNA2.1プラスミド(Invitrogen Carlsbad CA)、pINCYプラスミド(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)などの好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位にcDNAを結合させた。この組換えプラスミドを、Stratagene社のXL1-Blue, XL1-BlueMRF、SOLR、またはLife Technologies社のDH5 またはDH10B、ELECTROMAX DH 10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に導入し組み込んだ。

【0228】

2 cDNAクローンの単離

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

【0229】

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

【0230】

3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドにおいて回収したインサイト社cDNAは、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンシング反応は、標準的な方法で、或いはABI CATALYST 800 (PE Biosystems) thermal cyclerまたはPTC-200 thermal cycler (MJ Research)とHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムとの組み合わせなどのハイスループット装置で行った。cDNAのシークエンシング反応の準備には、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(PE Biosystems)などのABIシークエンシングキットに含まれる試薬を用いた。cDNAのシークエンシング反応の電気泳動的な分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Molecular Dynamics)、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム

(PE Biosystems)、当分野で周知のその他の配列解析システムを用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例の6に記載した方法で配列を伸長した。

【0231】

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

【0232】

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

ータベースに対して問い合わせこれら完全長の配列を分析した。HMMは、確率を利用して遺伝子ファミリーのコンセンサス一次構造を解析する（例えば、Edy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365を参照）。

【0233】

完全長のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:12 - 22からのポリヌクレオチド配列の断片の同定にも使用できる。約20 ~ 4000個までのヌクレオチドの断片はハイブリダイゼーション及び増幅に有用であり、上記の発明で説明した。

【0234】

4 ポリヌクレオチド発現の分析

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

【0235】

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

【0236】

【数1】

(BLAST スコア × 配列一致率)

5 × (長さ(配列1), 長さ(配列2))の最小値

として定義される積スコアである。積スコアは、0 ~ 100の標準化された値であり、以下のように求める。BLASTスコアにヌクレオチド配列の一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアのセグメントの対

(HSP)において一致する各塩基に+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積スコアを計算する。積スコアは、BLASTアラインメントの断片的重複と質とのバランスを表す。例えば積スコア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%一致する場合にのみ得られる。積スコア70は、100%の一致で一端が70%重畳しているか、或いは88%一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。積スコア50は、100%の一致で一端が50%重畳しているか、或いは79%の一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。

【0237】

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

【0238】

5 PPHKPをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:12-22を構築するために用いたcDNA配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、インサイト社LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:12-22と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap(表5)などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。Stanford Human Genome Center (SHGC)、Whitehead Institute for Genome Research (WIGR)及びGenethonなどの公共の情報源から入手できる放射線ハイブリッド(radiation hybrid)及び遺伝子マッピングのデータを用いて、クラスター化した配列がすでにマッピングされてい

るかを調べる。クラスターにマッピングされた配列が含まれている場合は、そのクラスターの全ての配列（特定のSEQ ID NOを含む）をそのマッピング位置に割り当てた。

【0239】

SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:16、及びSEQ ID NO:21の遺伝子地図の位置は、ヒト染色体の区間即ち範囲として本明細書の発明の部分に記載した。SEQ ID NO:12に対して2つ以上の遺伝子地図の位置が報告されるということは、SEQ ID NO:12に類似性を有するが完全には同一でない以前にマッピングした配列がそれぞれの対応するクラスターに組み入れられたことを示唆する。センチモルガンで示したマッピング位置の範囲は、染色体の短腕（p）の末端から測定した（センチモルガン（cM）は、同一染色体上の遺伝子間の乗換え率に基づいた距離を表す単位である。平均すると、1cMはヒトの染色体の1メガベースに概ね等しいが、組換え率の高い部分と低い部分があるため、大きく変化し得る）。距離cMは、配列がそれぞれのクラスターに含まれている放射線ハイブリッドマーカの境界を検出できるGenethonによってマッピングされた遺伝子マーカに基づいている。示された区間内に位置する公共の配列及びインサイト社の配列に関連する疾患も、本明細書の該当する発明の部分に記載した。

【0240】

6 PPHKPをコードするポリヌクレオチドの伸長

SEQ ID NO:12 - 22の完全長の核酸配列は、完全長分子の好適な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてその完全長分子の好適な断片を伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア（National Biosciences）或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68～72の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを伸長した。

【0241】

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

【0242】

当分野で既知の方法を利用したPCR法で高い忠実度で増幅した。PCRはPTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.)用いて96ウェルブロックプレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と -メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素(Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメーターで増幅を行った。

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

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

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

【0243】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 µlの希釈していないPCR産物に溶解した

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

【0244】

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

【0245】

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

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

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

【0246】

同様に上述の手順で、SEQ ID NO:12 - 22のヌクレオチド配列を利用し、この伸長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適なゲノムライブラリを用いて5調節配列を得た。

【0247】

7 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用法

SEQ ID NO:12 - 22から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記すが、より大きなcDNAフラグメントの場合でも基本的に同じ手順を用いる。オリゴヌクレオチドを、OLIGO4.06ソフトウェア(National Bioscience)のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、50pmolの各オリゴマーと、250µCiの[³²P]アデノシン三リン酸(Amersham, Chicago, IL)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston MA)とを組み合わせて用いることにより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、SEPHADEX G-25超精細排除デキストランビードカラム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて実質的に精製する。毎分10⁷カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、次のエンドヌクレアーゼ、Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、XbaI或いはPvu II(DuPont NEN)の1つを用いて切断したヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において用いる。

【0248】

各切断物からのDNAを、0.7%アガロースゲル上で分画して、ナイロン製メンブラン(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に転写する。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くた

め、例えば、最大0.1×クエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件の下、プロットを順次室温にて洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー或いは別のイメージ化手段で視覚化して比較する。

【0249】

8 マイクロアレイ

マイクロアレイ上のアレイエレメントの連結または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾプリント（インクジェットプリンター、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板は、均一な非多孔性の固体とするべきである（Schena（1999）前出）。推奨する基板には、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。別法では、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、熱や紫外線、または化学的或いは機械的な結合手段で基板の表面にエレメントを配置して結合させることができる。通常のアレイは利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正な数のエレメントを含めることができる（Schena, M. 他（1995）*Science* 270:467-470、Shalon, D. 他（1996）*Genome Res.* 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson（1998）*Nat. Biotechnol.* 16:27-31.を参照）。

【0250】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片（EST）、或いはそれらの断片やオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントとなり得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片やオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）などの当分野で周知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。このアレイエレメントを、生体サンプル中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。生体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結合する。ハイブリダイゼーションの後、生体サンプルからハイブリダイズしなかった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けるハイブリダイゼーションを検出する。別法では、レーザー脱離及び質量スペクトロメトリー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程度及び相対的存在量は、算定することができる。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。

【0251】

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、MLLV逆転写酵素、0.05 pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1 \times 第1鎖緩衝液、0.03単位/ μ lのRNアーゼインヒビター、500 μ M dATP、500 μ M dGTP、500 μ M dTTP、40 μ M dCTP、40 μ M dCTP-Cy3 (BDS)またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて逆転写する。この逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte)を用いて、200 ngのポリ(A)⁺RNAを含む25 ml容量で行う。特異的なコントロールポリ(A)⁺RNAは、in vitro転写により非コーディング酵母ゲノムDNAから合成する。370 で2時間インキュベートした後、各反応サンプル(一方はCy3標識、他方は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を変性する。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つの反応サンプルを、1 mlのグリコーゲン(1 mg/ml)、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールを用いてエタノール沈殿させる。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 5 \times SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

【0252】

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作製する。各アレイエレメントは、クローン化cDNA挿入断片を含むベクターを含有する細菌性細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNA挿入断片に隣接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によって、1~2 ngの初期量から5 μ gを超える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-40

0 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製する。

【0253】

精製したアレイエレメントを、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での洗浄と、0.1%のSDS及びアセトン中で超音波による洗浄を行う。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%エタノール中の0.05%アミノプロピルシラン (Sigma) でコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 °Cの天火で硬化させる。

【0254】

米国特許第5,807,522号に記載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。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が100 ng/ μ lのアレイエレメントDNA 1 μ lを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。次にこの装置が、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルを分注する。

【0255】

マイクロアレイには、STRATALINKER UVクロスリンカー (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回洗浄し、蒸留水で3回洗浄する。非特異的な結合部位は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) における0.2%カゼイン中で60 °Cで30分間マイクロアレイをインキュベートし、その後上述したように0.2%SDS及び蒸留水で洗浄することによってブロックする。

【0256】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 × SSC、0.2%SDSハイブリダイゼーション緩衝液にCy3及びCy5標識したcDNA合成産物を各0.2 μ g含む9 μ lのサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合液を、65 °Cで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上に一定量分注してから1.8 cm² のカバーガラスで覆う。この

アレイを、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ャンバーに移す。チャンバーの角に140 μ lの5 \times SSCを加えて、チャンバー内を湿度100%に保持する。このアレイを含むチャンバーを、60 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ Cで10分間、第2洗浄緩衝液中(0.1 \times SSC)において45 $^{\circ}$ Cで10分間それぞれ3回洗浄し、その後乾燥させる。

【0257】

検出

レポーター標識されたハイブリダイゼーション複合体は、Cy3を励起するための488 nm、及びCy3を励起するための632 nmのスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10 Wレーザー(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡で検出する。20倍の顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いて、アレイ上に励起レーザー光を集中させる。この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、対物レンズを通してラスタスキャンする。本実施例で用いた1.8 cm \times 1.8 cmのアレイは、20 μ mの解像度でスキャンする。

【0258】

2つの異なるスキャンにおいて、混合ガスマルチラインレーザーは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、波長に基づいて2つの蛍光体に対応する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との間に配設された好適なフィルターを用いて信号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できるが、レーザー源に好適なフィルターを用いて、蛍光体1につき1回スキャンし、各アレイを通常2回スキャンする。

【0259】

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コントロール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配列を含め、その位置におけるシグナルの強度がハイブリダイズ

する種の重量比1:100,000に相関するようにする。異なる試料(例えば検査細胞及びコントロール細胞を代表する)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光体で標識し、他と異なって発現する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させる場合には、較正は2つの蛍光体を有する較正するcDNAのサンプルを標識して、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えて行う。

【0260】

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(AID)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、リニア20色変換を用いてシグナル強度が青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲にマッピングされるイメージとして表示される。データはまた、定量的に分析される。2つの異なる蛍光体を同時に励起して測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、先ずデータは蛍光体間の光学的漏話(重複発光スペクトルに起因する)に対して補正される。

【0261】

グリッドを蛍光シグナルイメージ上に重畳して、各スポットからのシグナルがグリッドの各エレメントに中央に位置するようにする。各エレメント内の蛍光シグナルを統合し、シグナルの平均強度に対応する数値を得る。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。

【0262】

9 相補的ポリヌクレオチド

PPHKPをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のPPHKPの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15~約30個の塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、より小さな或いはより大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びPPHKPのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的なオリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、

相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがPPHKPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0263】

1.0 PPHKPの発現

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

【0264】

殆どの発現系では、PPHKPが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く1回で行うことができる。Schistosoma japonicumからの26キログルトンの酵素GSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で

固定されたグルタチオンで融合タンパク質の精製が可能となる(Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でPPHKPからタンパク質的に切断できる。アミノ酸8個のペプチドであるFLAGで、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)で精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したPPHKPを直接用いて以下の実施例11及び15のアッセイを行うことができる。

【0265】

1.1 PPHKPの活性の実証

プロテインキナーゼの活性は、標識した ^{32}P -ATPの存在下でPPHKPによるタンパク質基質のリン酸化を定量して測定する。PPHKPを、タンパク質基質、 ^{32}P -ATP、および好適なキナーゼバッファでインキュベートする。基質に組み込まれた ^{32}P を電気泳動によって遊離 ^{32}P -ATPから分離し、組み込まれた ^{32}P をラジオアイソトープカウンタでカウントする。組み込まれた ^{32}P の量がPPHKPの活性に比例する。リン酸化されたアミノ酸残基は、アミノ酸液のホスホアミノ酸分析(phosphoamino acid analysis)によって決定される。

【0266】

別法では、プロテインホスファターゼの活性は、p-ニトロフェニルリン酸塩(PNPP)の加水分解によって測定する。PPHKPを、0.1%のβ-メルカプトエタノールの存在下で、HEPES緩衝液(pH 7.5)においてPNPPと共に37℃で60分間インキュベートする。6 mlの10N NaOHを追加して反応を停止させ、PNPPの加水分解による410 nmにおける反応混合液の吸光率の上昇を分光光度計で測定する。吸光率の上昇が、PPHKPの活性に比例する。

【0267】

1.2 機能のアッセイ

PPHKPの機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのPPHKPをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを、cDNAを高いレベル

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

【0268】

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

をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0269】

1.3 PPHKPに特異的な抗体の産生

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

【0270】

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

【0271】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのABI 431Aペプチドシンセサイザー(PE Biosystems)を用いてfmoc法のケミストリにより合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によりKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel, 1995を参照)。フロイントの完全アジュバントにおいてオリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗PPHKP活性を検査するには、ペプチドまたはPPHKPを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0272】

1.4 特異的な抗体を用いる天然PPHKPの精製

天然PPHKP或いは組換えPPHKPを、PPHKPに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティーカラ

ムは、CNBr-活性化SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗PPHKP抗体とを共有結合させることにより形成する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従ってブロッキング処理し洗浄する。

【0273】

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

【0274】

1.5 PPHKPと相互作用する分子の同定

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

【0275】

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

【0276】

PPHKPはまた、ハイスループット型の酵母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つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる(Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0277】

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

【0278】

(表の簡単な説明)

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

【0279】

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

【0280】

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

【0281】

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

【0282】

表5は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、及びアルゴリズム、並びにその説明、引用文献、閾値パラメーターを示す。

【表1】

表 1

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	12	365665	SYNORAT01	365665H1 (SYNORAT01), 1751084F6 (LIVRTUT01), 1753091T6 (LIVRTUT01), 2649915H1 (THYMFET02), 2741857F6 (BRSTTUT14), 2914093F6 (KIDNTUT15), 3129019F6 (LUNGTTUT12), 3187065H1 (THYMNON04), 3875544H1 (HEARNOT06)
2	13	760934	BRAITUT02	405845R6 (EOSIHET02), 732719F1 (LUNGNOT03), 760934H1 (BRAITUT02), 760934R7 (BRAITUT02)
3	14	926043	BRAINOT04	926043H1 (BRAINOT04), 998403X309D1 (KIDNTUT01), 1835276R6 (BRAINON01), 3268349H1 (BRAINOT20), SXLA01113V1, G921351, G4454847
4	15	1234795	LUNGFET03	1234795F1 (LUNGFET03), 1234795H1 (LUNGFET03), 3091866H1 (BRSTNOT19), SXBA00067V1, SXBA01121V1, SXBA01178V1, SXBA00158V1, SXBA01170V1, SXBA01184V1
5	16	1271505	TESTTUT02	1271505H1 (TESTTUT02), 1271505X309F1 (TESTTUT02), 1395158X11 (THYRNOT03), 1432510R1 (BEPINON01), 1518249F6 (BLADTUT04), 1829986H1 (THPLAZT01), 2236286F6 (PANCTUT02), 3590149F6 (293TF5T01)
6	17	1385073	BRAITUT08	533781F1 (BRAINOT03), 533781R1 (BRAINOT03), 927395R6 (BRAINOT04), 1286637H1 (BRAINOT11), 1287320F6 (BRAINOT11), 1385073F6 (BRAINOT08), 1385073H1 (BRAINOT08), 3334151F6 (BRAIFET01), 4339301H1 (BRAUNOT02), 4754877H1 (BRAHNOT01), SANA02528F1
7	18	1606974	LUNGNOT15	542579R6 (OVARNOT02), 938242R1 (CERVNOT01), 1472528F1 (LUNGTUT03), 1606974H1 (LUNGNOT15), 1729937H1 (BRSTTUT08), G2207365
8	19	1829744	THPLAZT01	817088R6 (OVRTUT01), 1757328R6 (PITUNOT03), 1829744H1 (THPLAZT01), 1899355T6 (BLADTUT06), 3818445F6 (BONSTUT01)
9	20	4030831	BRAINOT23	601077R1 (BRSTNOT02), 863312T1 (BRAITUT03), 1333294F1 (COLNNOT13), 1623843F6 (BRAITUT13), 1657143F6 (URETTUT01), 1863418F6 (PROSNOT19), 1899555F6 (BLADTUT07), 3692741H1 (HEAANOT01), 4030831H1 (BRAINOT23), 4691493H1 (BRAENOT02), SARA02402F1, SARA02217F1
10	21	5039718	COLHTUT01	286342F1 (EOSIHET02), 398033R6 (PITUNOT02), 854522R1 (NGANNOT01), 1632128H1 (COLNNOT19), 1711324F6 (PROSNOT16), 2620936X309D4 (KERANOT02), 2941327H1 (HEAONOT03), 4895491H1 (LIVRTUT12), 5039718H2 (COLHTUT01), SCHA00577V1, SCJA02058V1
11	22	5595281	COLCDIT03	2211301F6 (SINPFET03), 2211301T6 (SINPFET03), 5595281H1 (COLCDIT03)

【表 2】

SEQ ID NO.	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列	相同配列	分析方法及びデータベース
1	329	S26 T110 T164 S103 T123 T207	N3 N7 N36 N227	シグナルペプチド: M1-624 STK/Calnexin-ゼレン領域: H138-L318	ミオシン出願キナーゼβ (g1903488) [細胞性粘菌]	BLAST-GenBank, BLAST-Prodcom, SPScan, Motifs
2	141	T33		哺乳動物動物酸ホスファターゼ: I20-E141	リゾホスファターゼ ホスファターゼ (g6691475) [ヒト]	BLAST-GenBank, BLAST - DOMO, Motifs
3	447	T22 S28 S63 S109 T121 S183 S190 T226 S283 S331 T369 T7 T114 S163 T204 S242 S246 S272 S292 T303 S381 T412	N11 N33 N273 N347	プロテインホスファターゼ2A 調節サブユニットPR55シグネチャ: E79-N93 プロテインホスファターゼ2A 調節サブユニットPR55ドメイン: T22-D68, L86-R126, T146-G348, K389-R441 プロテインホスファターゼ2A 調節サブユニットPR55の領域: M1-F365	プロテインホスファターゼ 2Aサブユニットβ (g190426) [ヒト]	BLAST-GenBank, BLAST-DOMO, BLAST-Prodcom, BLIMPS-BLOCKS, BLIMPS-PRINTS, Motifs
4	666	T280 S628 S21 S91 S214 S266 S369 S421 S422 T434 T590 S613 S618 S643 T12 T23 S72 S82 S393 T439 S468 S471 T479 T528 S597 S605 S610	N38 N49 N190 N212 N300 N641	チロシン特異的プロテインホスファターゼ 活性部位: L220-T280 Yホスファターゼシグネチャ: M237-R278 VH1型二重特異性ホスファターゼ: V85-I129	ニューロンチロシン トレオニンホスファターゼ1 (g1781037) [マウス]	BLAST-GenBank, BLAST-DOMO, BLAST-Prodcom, HMMER - PFAM, BLIMPS-PRINTS, ProfileScan, Motifs

【表 3】

表 2 - 2

SEQ ID NO.	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列	相同配列	分析方法及びデータベース
5	358	T54 T90 T140 T210 S215 S14 T27 T95 S232 S238		プロテインキナーゼシグネチャ: G142-L315 チロシンキナーゼ触媒 ドメインシグネチャ: A242-S264 プロテインキナーゼドメイン: E18-R303	キナーゼ (g4827159) [ドブネズミ]	BLAST-GenBank, BLAST-DOMO, HMMER - PFAM, BLIMPS-PRINTS, Motifs
6	470	T7 T91 T103 S118 T276 S341 T439 S452 S464 T21 T46 T51 T103 S138 S292 T391 S451 Y135 Y460		プロテインキナーゼシグネチャ: Y24-I286 チロシンキナーゼ触媒 ドメインシグネチャ: Y135-Y153, Y201-E223 プロテインキナーゼドメイン: D29-I276	カルモジュリン結合タンパク質 (g349075) [ドブネズミ]	BLAST-GenBank, BLAST-DOMO, HMMER - PFAM, BLIMPS-PRINTS, Motifs
7	150	S41 T43	N7	シグナルペプチド: M1-Y28 チロシン特異的プロテイン ホスファターゼ活性部位: Y93-M105 Yホスファターゼシグネチャ: P64-A107 チロシン特異的プロテイン ホスファターゼドメイン: V93-G103, R126-A141, I74-I125	チロシンホスファターゼに 類似のCOS41.7 (g1764017) [カタコウレイボヤ (Giona intestinalis)]	BLAST-GenBank, HMMER - PFAM, BLIMPS-PRINTS, BLIMPS-BLOCKS, SpScan, Motifs
8	253	T81 S250 T8 S34 T121 S128 T216 S29 T132 S228 S229		プロテインキナーゼシグネチャ およびプロフィール [L158-L170 プロテインキナーゼドメイン: L33-S187 タンパク質加水分解酵素ドメイン: G42-R247	YGR262C推定上 プロテインキナーゼ (g1536954) [酵母]	BLAST-GenBank, BLAST-ProDom, HMMER - PFAM, Motifs

【表4】

表 2-3

SEQ ID NO.	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列	相同配列	分析方法及びデータベース
9	442	S84 S190 S215 T231 S241 S339 S428 T4 S255 T355		非受容体チロシンキナーゼドメイン: E64--G229, G246--F331, V389--D436	非受容体チロシンキナーゼ (g974334) [細胞性粘菌]	BLAST-GenBank, BLAST-Prodom, Motifs
10	659	S37 S70 S132 S140 S266 S286 T292 S484 S542 S552 S564 S668 S569 S649 S653 T65 S254 T395 T638 Y369	N614	シグナルペプチド: M1-V19 VH1型二重特異性ホスファターゼ: I332-S470	MAPキナーゼホスファターゼ (g6714641) [キイロシヨウジョウハエ]	BLAST-GenBank, BLAST-DOMO, SpScan, Motifs
11	145	T32 S33 S55 S141 T35 S41 T89 S91 S104 T110 S27 S45 S51 T58			PP1のPKC強化阻害タンパク質 (17kDa) (PKC-potentiated inhibitory protein of PP1)	BLAST-GenBank, Motifs

【表5】

冊
3

SEQ ID NO:	固有断片	発現組織 (割合)	疾患または症状 (割合)	ベクター
12	164-223 758-817	心血管 (0.286) 生殖 (0.286) 造血/免疫 (0.143)	癌 (0.524) 炎症/外傷 (0.334) 細胞増殖 (0.095)	PSPORT1
13	158-217	心血管 (0.200) 造血/免疫 (0.200)	癌 (0.800) 炎症 (0.300)	PSPORT1
14	1-60 1189-1248	神経 (0.750) 生殖 (0.083) 泌尿器 (0.083)	癌 (0.333) 炎症/外傷 (0.333) 神経 (0.250)	PSPORT1
15	163-222 1081-1140	腎臓 (0.385) 生殖 (0.154) 神経 (0.154)	癌 (0.692) 炎症/外傷 (0.308) 細胞増殖 (0.231)	PINCY
16	326-385	生殖 (0.288) 胃腸 (0.212) 造血/免疫 (0.192)	癌 (0.577) 炎症/外傷 (0.327) 細胞増殖 (0.308)	PINCY
17	326-385 1298-1357	神経 (0.885) 発達 (0.077)	炎症/外傷 (0.384) 神経 (0.231) 癌 (0.192)	PINCY
18	251-310	生殖 (0.372) 心血管 (0.140) 内分泌 (0.093)	癌 (0.558) 炎症/外傷 (0.233) 細胞増殖 (0.209)	PINCY
19	380-439	生殖 (0.368) 胃腸 (0.105) 造血/免疫 (0.105)	癌 (0.474) 炎症/外傷 (0.369) 細胞増殖 (0.211)	PINCY
20	213-272 813-872	神経 (0.304) 生殖 (0.278) 胃腸 (0.104)	癌 (0.435) 炎症/外傷 (0.357) 細胞増殖 (0.096)	PINCY
21	219-279 921-980	生殖 (0.343) 胃腸 (0.194) 造血/免疫 (0.134)	癌 (0.552) 炎症/外傷 (0.314) 細胞増殖 (0.090)	PINCY
22	233-292	胃腸 (0.818) 発達 (0.091) 生殖 (0.091)	炎症/外傷 (0.636) 癌 (0.182) 細胞増殖 (0.091)	PINCY

【表6】

ヌクレオチド SEQ ID NO	ライブラリ	ライブラリの説明
1 2	SYNORAT01	このライブラリは、リウマチ様関節炎の51歳のアジア人女性の肘から採取した滑液膜組織から単離したRNAを用いて作製した。
1 3	BRAITUT02	このライブラリは、58歳の白人男性の前葉から脳髄膜の病巣切除の際に採取した脳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、グレード2転移性副腎腫を示していた。患者の既往症には、グレード2腎細胞癌、不眠症及び慢性気道閉塞があった。家族歴には、腎臓の悪性新生物があった。
1 4	BRAIN0T04	このライブラリは、脳溢血の44歳の白人男性の脳組織より単離したRNAを用いて作製された。凝固血を含むこの組織は、右前方側頭葉の脈絡叢から採取した。家族歴には、冠状動脈疾患及び心筋梗塞があった。
1 5	LUNGFET03	このライブラリは、妊娠20週目で死亡した白人女胎児の肺組織から単離したRNAを用いて作製した。
1 6	TESTTUT02	このライブラリは、31歳の白人男性から片側睾丸摘除の際に採取した睾丸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、胎児性癌を示していた。
1 7	BRAITUT08	このライブラリは、47歳の白人男性の脳髄膜組織切除の際に左前葉から採取された脳腫瘍組織から単離されRNAを用いて作製した。病変は、局所性の腫瘍の放射線壊死を伴うグレード4原線維性星状細胞腫を示していた。患者の既往症には、脳血管障害、欠乏性貧血、高脂血症、てんかん、及び喫煙の習慣があった。家族歴としては、脳血管障害及び悪性前立腺癌があった。
1 8	LUNGN0T15	このライブラリは、69歳の白人男性の肺の部分切除の際に肺組織から単離したRNAを用いて作製した。関連腫瘍組織は、病理学的には残存性グレード3の浸潤性扁平上皮癌を示していた。患者の既往症には、急性心筋梗塞、前立腺肥大症、および悪性皮膚新生物があった。家族歴には、脳血管疾患、1型糖尿病、急性心筋梗塞、アテローム性冠動脈疾患があった。

【表7】

ヌクレオチド SEQ ID NO	ライブラリ	ライブラリの説明
19	THP1AZT01	このライブラリは、0.8 μM の 5'-aza-2'-デオキシシチジンで 3 日間処理した THP-1 単球細胞から単離した RNA を用いて作製した。THP-1 (ATCC TIB 202) は、急性単球性白血病の 1 歳の白人男児の末梢血液由来のヒト前単核細胞株である。
20	BRAIN0T23	このライブラリは、45 歳の黒人男性から脳葉切除の際に採取した右側頭葉組織から単離した RNA から作製した。関連する腫瘍組織は、病理学的には右側頭葉の胎生期発育不全神経上皮腫瘍を示していた。右側頭部位硬膜は中枢神経軸の石灰化偽腫瘍と一致する。患者は、痙攣性難治性癲癇、部分癲癇、及び記憶障害を呈していた。患者の既往症には、肥満症、髄膜炎、背痛、不特定の睡眠無呼吸症、急性ストレス反応、後天性膝変形、及び慢性副鼻腔炎があった。家族歴には、肥満症、良性高血圧、肝硬変、アルコール中毒、高脂血症、心血管疾患、及び II 型糖尿病があった。
21	COLHTUT01	このライブラリは、右結腸半切除、随伴性虫垂切除、及び恒久的結腸フィステル形成の際に、55 歳の白人男性の右結腸より取り除かれた結腸腫瘍組織より単離した RNA を用いて作製された。病理学的には、浸潤グレード 3 の腺癌を示していた。患者の既往症には、良性高血圧、精神不安定、異常血液化学、心臓ブロック、骨粗鬆症、アクネ、及び前立腺過形成があった。家族歴には、前立腺癌、急性心筋梗塞、発作、アテローム性冠動脈疾患があった。
22	COLCDIT03	このライブラリは、67 歳の女性の盲腸より採取した病変結腸ポリープ組織より単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、良性盲腸ポリープを示していた。関連する腫瘍組織は、病理学的には盲腸内にて腫瘤 (fungating mass) を形成する乳頭状腺腫中に生じる浸潤性グレード 3 腺癌を示していた。

【表 8】

【表9】

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

【配列表】

冊 5 - 2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
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	標準化された質のスコア≧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 Philis 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ためのグラフィックツールである。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャ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	Prosites で定義された配列と一致したパターンについてアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他、前出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 YUE, Henry
 TANG, Y. Tom
 BANDMAN, Olga
 HILLMAN, Jennifer L.
 BAUGHN, Mariah R.
 AZIMZAI, Yalda
 LU, Dyung Aina M.

<120> PROTEIN PHOSPHATASE AND KINASE PROTEINS

<130> PF-0742 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/154,141
 <151> 1999-09-15

<160> 22

<170> PERL Program

<210> 1
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 365665CD1

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

Pro	Ser	Thr	Ile	185	Leu	Leu	Ile	Leu	Glu	190	Asp	Lys	Thr	Ile	Lys	195	Gly
Cys	Ile	Ser	Val	200	Glu	Pro	Tyr	Ile	Leu	205	Gly	Glu	Phe	Val	Lys	210	Leu
Ser	Asn	Asn	Thr	215	Lys	Val	Val	Lys	Thr	220	Glu	Tyr	Lys	Ala	Thr	225	Glu
Tyr	Gly	Leu	Ala	230	Tyr	Gly	His	Phe	Ser	235	Tyr	Glu	Phe	Ser	Asn	240	His
Arg	Asp	Val	Val	245	Val	Asp	Leu	Gln	Gly	250	Trp	Val	Thr	Gly	Asn	255	Gly
Lys	Gly	Leu	Ile	260	Tyr	Leu	Thr	Asp	Pro	265	Gln	Ile	His	Ser	Val	270	Asp
Gln	Lys	Val	Phe	275	Thr	Thr	Asn	Phe	Gly	280	Lys	Arg	Gly	Ile	Phe	285	Tyr
Phe	Phe	Asn	Asn	290	Gln	His	Val	Glu	Cys	295	Asn	Glu	Ile	Cys	His	300	Arg
Leu	Ser	Leu	Thr	305	Arg	Pro	Ser	Met	Glu	310	Lys	Pro	Cys	Lys	Ser	315	
				320						325							

<210> 2
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 760934CD1

<400> 2
 Met Leu Phe Thr Phe His Arg Glu Ser Leu Gln Met Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Pro Phe Leu His Ile Leu Glu Ser Asn Leu Leu Lys Ala Met Asp
 20 25 30
 Ser Ala Thr Ala Pro Asp Lys Ile Arg Lys Leu Tyr Leu Tyr Ala
 35 40 45
 Ala His Asp Val Thr Phe Ile Pro Leu Leu Met Thr Leu Gly Ile
 50 55 60
 Phe Asp His Lys Trp Pro Pro Phe Ala Val Asp Leu Thr Met Glu
 65 70 75
 Leu Tyr Gln His Leu Glu Ser Lys Glu Trp Phe Val Gln Leu Tyr
 80 85 90
 Tyr His Gly Lys Glu Gln Val Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly Leu
 95 100 105
 Cys Pro Leu Asp Met Phe Leu Asn Ala Met Ser Val Tyr Thr Leu
 110 115 120
 Ser Pro Glu Lys Tyr His Ala Leu Cys Ser Gln Thr Gln Val Met
 125 130 135
 Glu Val Gly Asn Glu
 140

<210> 3
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID NO: 926043CD1

<400> 3

```

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

```

440

445

<210> 4
 <211> 666
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 1234795CD1

<400> 4
 Met Ala His Glu Met Ile Gly Thr Gln Ile Val Thr Glu Arg Leu
 1 5 10 15
 Val Ala Leu Leu Glu Ser Gly Thr Glu Lys Val Leu Leu Ile Asp
 20 25 30
 Ser Arg Pro Phe Val Glu Tyr Asn Thr Ser His Ile Leu Glu Ala
 35 40 45
 Ile Asn Ile Asn Cys Ser Lys Leu Met Lys Arg Arg Leu Gln Gln
 50 55 60
 Asp Lys Val Leu Ile Thr Glu Leu Ile Gln His Ser Ala Lys His
 65 70 75
 Lys Val Asp Ile Asp Cys Ser Gln Lys Val Val Tyr Asp Gln
 80 85 90
 Ser Ser Gln Asp Val Ala Ser Leu Ser Ser Asp Cys Phe Leu Thr
 95 100 105
 Val Leu Leu Gly Lys Leu Glu Lys Ser Phe Asn Ser Val His Leu
 110 115 120
 Leu Ala Gly Gly Phe Ala Glu Phe Ser Arg Cys Phe Pro Gly Leu
 125 130 135
 Cys Glu Gly Lys Ser Thr Leu Val Pro Thr Cys Ile Ser Gln Pro
 140 145 150
 Cys Leu Pro Val Ala Asn Ile Gly Pro Thr Arg Ile Leu Pro Asn
 155 160 165
 Leu Tyr Leu Gly Cys Gln Arg Asp Val Leu Asn Lys Glu Leu Met
 170 175 180
 Gln Gln Asn Gly Ile Gly Tyr Val Leu Asn Ala Ser Asn Thr Cys
 185 190 195
 Pro Lys Pro Asp Phe Ile Pro Glu Ser His Phe Leu Arg Val Pro
 200 205 210
 Val Asn Asp Ser Phe Cys Glu Lys Ile Leu Pro Trp Leu Asp Lys
 215 220 225
 Ser Val Asp Phe Ile Glu Lys Ala Lys Ala Ser Asn Gly Cys Val
 230 235 240
 Leu Val His Cys Leu Ala Gly Ile Ser Arg Ser Ala Thr Ile Ala
 245 250 255
 Ile Ala Tyr Ile Met Lys Arg Met Asp Met Ser Leu Asp Glu Ala
 260 265 270
 Tyr Arg Phe Val Lys Glu Lys Arg Pro Thr Ile Ser Pro Asn Phe
 275 280 285
 Asn Phe Leu Gly Gln Leu Leu Asp Tyr Glu Lys Lys Ile Lys Asn
 290 295 300
 Gln Thr Gly Ala Ser Gly Pro Lys Ser Lys Leu Lys Leu Leu His
 305 310 315
 Leu Glu Lys Pro Asn Glu Pro Val Pro Ala Val Ser Glu Gly Gly
 320 325 330
 Gln Lys Ser Glu Thr Pro Leu Ser Pro Pro Cys Ala Asp Ser Ala
 335 340 345
 Thr Ser Glu Ala Ala Gly Gln Arg Pro Val His Pro Ala Ser Val
 350 355 360

Pro Ser Val Pro Ser Val Gln Pro Ser Leu Leu Glu Asp Ser Pro
 365 370 375
 Leu Val Gln Ala Leu Ser Gly Leu His Leu Ser Ala Asp Arg Leu
 380 385 390
 Glu Asp Ser Asn Lys Leu Lys Arg Ser Phe Ser Leu Asp Ile Lys
 395 400 405
 Ser Val Ser Tyr Ser Ala Ser Met Ala Ala Ser Leu His Gly Phe
 410 415 420
 Ser Ser Ser Glu Asp Ala Leu Glu Tyr Tyr Lys Pro Ser Thr Thr
 425 430 435
 Leu Asp Gly Thr Asn Lys Leu Cys Gln Phe Ser Pro Val Gln Glu
 440 445 450
 Leu Ser Glu Gln Thr Pro Glu Thr Ser Ser Leu Ile Arg Arg Lys
 455 460 465
 Pro Ala Ser Pro Arg Ser Cys Arg Pro Pro Gly Leu Gln Thr Ala
 470 475 480
 Arg Ala Ser Asp Cys Ile Arg Ser Glu Pro Ala Ala Val Ala Pro
 485 490 495
 Pro Arg Gly Pro Phe Tyr Leu His Cys Ile Glu Val Gly Ala Trp
 500 505 510
 Arg Thr Ile Thr Thr Pro Ala Ser Phe Ser Ala Phe Pro Pro Ala
 515 520 525
 Ser Ser Thr Ser Arg Ser Leu Leu Ala Trp Ala Leu Lys Gly Trp
 530 535 540
 His Ser Asp Ile Leu Ala Pro Gln Thr Ser Thr Pro Ser Leu Thr
 545 550 555
 Ser Ser Trp Tyr Phe Ala Thr Glu Ser Ser His Phe Tyr Ser Ala
 560 565 570
 Ser Ala Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Ser Tyr Ser Ala Tyr Ser Cys
 575 580 585
 Ser Gln Leu Pro Thr Cys Gly Asp Gln Val Tyr Ser Val Arg Arg
 590 595 600
 Arg Gln Lys Pro Ser Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Trp His
 605 610 615
 Glu Glu Ser Pro Phe Glu Lys Gln Phe Lys Arg Arg Ser Cys Gln
 620 625 630
 Met Glu Phe Gly Glu Ser Ile Met Ser Glu Asn Arg Ser Arg Glu
 635 640 645
 Glu Leu Gly Lys Val Gly Ser Gln Ser Ser Phe Ser Gly Ser Met
 650 655 660
 Glu Ile Ile Glu Val Ser
 665

<210> 5
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 1271505CD1

<400> 5
 Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro
 20 25 30
 Val Gln Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro
 35 40 45
 Cys Leu Leu Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr

```

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

```

```

<210> 6
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 1385073CD1

```

```

<400> 6
Met Pro Phe Gly Cys Val Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asn Tyr Asn
1          5          10          15
Gln Pro Ser Glu Val Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Gln Val Ile
20         25         30
Lys Thr Glu Glu Phe Cys Glu Ile Phe Arg Ala Lys Asp Lys Thr
35         40         45
Thr Gly Lys Leu His Thr Cys Lys Lys Phe Gln Lys Arg Asp Gly
50         55         60

```

```

Arg Lys Val Arg Lys Ala Ala Lys Asn Glu Ile Gly Ile Leu Lys
65 70 75
Met Val Lys His Pro Asn Ile Leu Gln Leu Val Asp Val Phe Val
80 85 90
Thr Arg Lys Glu Tyr Phe Ile Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Arg
95 100 105
Glu Val Phe Asp Trp Ile Leu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Glu Arg
110 115 120
Asp Thr Ser Asn Val Val Arg Gln Val Leu Glu Ala Val Ala Tyr
125 130 135
Leu His Ser Leu Lys Ile Val His Arg Asn Leu Lys Leu Glu Asn
140 145 150
Leu Val Tyr Tyr Asn Arg Leu Lys Asn Ser Lys Ile Val Ile Ser
155 160 165
Asp Phe His Leu Ala Lys Leu Glu Asn Gly Leu Ile Lys Glu Pro
170 175 180
Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Val Gly Arg Gln
185 190 195
Arg Tyr Gly Arg Pro Val Asp Cys Trp Ala Ile Gly Val Ile Met
200 205 210
Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Asn Pro Pro Phe Tyr Glu Glu Val Glu
215 220 225
Glu Asp Asp Tyr Glu Asn His Asp Lys Asn Leu Phe Arg Lys Ile
230 235 240
Leu Ala Gly Asp Tyr Glu Phe Asp Ser Pro Tyr Trp Asp Asp Ile
245 250 255
Ser Gln Ala Ala Lys Asp Leu Val Thr Arg Leu Met Glu Val Glu
260 265 270
Gln Asp Gln Arg Ile Thr Ala Glu Glu Ala Ile Ser His Glu Trp
275 280 285
Ile Ser Gly Asn Ala Ala Ser Asp Lys Asn Ile Lys Asp Gly Val
290 295 300
Cys Ala Gln Ile Glu Lys Asn Phe Ala Arg Ala Lys Trp Lys Lys
305 310 315
Ala Val Arg Val Thr Thr Leu Met Lys Arg Leu Arg Ala Pro Glu
320 325 330
Gln Ser Ser Thr Ala Ala Ala Gln Ser Ala Ser Ala Thr Asp Thr
335 340 345
Ala Thr Pro Gly Ala Ala Asp Arg Ser Ala Thr Pro Ala Thr Asp
350 355 360
Gly Ser Ala Thr Pro Ala Thr Asp Gly Ser Val Thr Pro Ala Thr
365 370 375
Asp Gly Ser Ile Thr Pro Ala Thr Asp Gly Ser Val Thr Pro Ala
380 385 390
Thr Asp Arg Ser Ala Thr Pro Ala Thr Asp Gly Arg Ala Thr Pro
395 400 405
Ala Thr Glu Glu Ser Thr Val Pro Thr Thr Gln Ser Ser Ala Met
410 415 420
Leu Ala Thr Lys Ala Ala Ala Thr Pro Glu Pro Ala Met Ala Gln
425 430 435
Pro Asp Ser Thr Ala Pro Glu Gly Ala Thr Gly Gln Ala Pro Pro
440 445 450
Ser Ser Lys Gly Glu Glu Ala Ala Gly Tyr Ala Gln Glu Ser Gln
455 460 465
Arg Glu Glu Ala Ser
470

```

```

<210> 7
<211> 150
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID NO: 1606974CD1

<400> 7

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

<210> 8

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID NO: 1829744CD1

<400> 8

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

Ser Asn Met Leu Leu Lys Pro Pro Leu Glu Gln Leu Asn Ile Val
 170 175 180
 Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser Phe Ile Ser Ala Leu Pro Glu Asp
 185 190 195
 Lys Gly Val Asp Leu Tyr Val Leu Glu Lys Ala Phe Leu Ser Thr
 200 205 210
 His Pro Asn Thr Glu Thr Val Phe Glu Ala Phe Leu Lys Ser Tyr
 215 220 225
 Ser Thr Ser Ser Lys Lys Ala Arg Pro Val Leu Lys Lys Leu Asp
 230 235 240
 Glu Val Arg Leu Arg Gly Arg Lys Arg Ser Met Val Gly
 245 250

<210> 9
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 4030831CD1

<400> 9
 Met Arg Arg Thr Arg Arg Pro Arg Phe Val Leu Met Asn Lys Met
 1 5 10 15
 Asp Asp Leu Asn Leu His Tyr Arg Phe Leu Asn Trp Arg Arg Arg
 20 25 30
 Ile Arg Glu Ile Arg Glu Val Arg Ala Phe Arg Tyr Gln Glu Arg
 35 40 45
 Phe Lys His Ile Leu Val Asp Gly Asp Thr Leu Ser Tyr His Gly
 50 55 60
 Asn Ser Gly Glu Val Gly Cys Tyr Val Ala Ser Arg Pro Leu Thr
 65 70 75
 Lys Asp Ser Asn Tyr Phe Glu Val Ser Ile Val Asp Ser Gly Val
 80 85 90
 Arg Gly Thr Ile Ala Val Gly Leu Val Pro Gln Tyr Tyr Ser Leu
 95 100 105
 Asp His Gln Pro Gly Trp Leu Pro Asp Ser Val Ala Tyr His Ala
 110 115 120
 Asp Asp Gly Lys Leu Tyr Asn Gly Arg Ala Lys Gly Arg Gln Phe
 125 130 135
 Gly Ser Lys Cys Asn Ser Gly Asp Arg Ile Gly Cys Gly Ile Glu
 140 145 150
 Pro Val Ser Phe Asp Val Gln Thr Ala Gln Ile Phe Phe Thr Lys
 155 160 165
 Asn Gly Lys Arg Val Gly Ser Thr Ile Met Pro Met Ser Pro Asp
 170 175 180
 Gly Leu Phe Pro Ala Val Gly Met His Ser Leu Gly Glu Glu Val
 185 190 195
 Arg Leu His Leu Asn Ala Glu Leu Gly Arg Glu Asp Asp Ser Val
 200 205 210
 Met Met Val Asp Ser Tyr Glu Asp Glu Trp Gly Arg Leu His Asp
 215 220 225
 Val Arg Val Cys Gly Thr Leu Leu Glu Tyr Leu Gly Lys Gly Lys
 230 235 240
 Ser Ile Val Asp Val Gly Leu Ala Gln Ala Arg His Pro Leu Ser
 245 250 255
 Thr Arg Ser His Tyr Phe Glu Val Glu Ile Val Asp Pro Gly Glu
 260 265 270
 Lys Cys Tyr Ile Ala Leu Gly Leu Ala Arg Lys Asp Tyr Pro Lys

```

                275                280                285
Asn Arg His Pro Gly Trp Ser Arg Gly Ser Val Ala Tyr His Ala
                290                295                300
Asp Asp Gly Lys Ile Phe His Gly Ser Gly Val Gly Asp Pro Phe
                305                310                315
Gly Pro Arg Cys Tyr Lys Gly Asp Ile Met Gly Cys Gly Ile Met
                320                325                330
Phe Pro Arg Asp Tyr Ile Leu Asp Ser Glu Gly Asp Ser Asp Asp
                335                340                345
Ser Cys Asp Thr Val Ile Leu Ser Pro Thr Ala Arg Ala Val Arg
                350                355                360
Asn Val Arg Asn Val Met Tyr Leu His Gln Glu Gly Glu Glu Glu
                365                370                375
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Ile Glu Pro
                380                385                390
Glu His Glu Gly Arg Lys Val Val Val Phe Phe Thr Arg Asn Gly
                395                400                405
Lys Ile Ile Gly Lys Lys Asp Ala Val Val Pro Ser Gly Gly Phe
                410                415                420
Phe Pro Thr Ile Gly Met Leu Ser Cys Gly Glu Lys Val Lys Val
                425                430                435
Asp Leu His Pro Leu Ser Gly
                440

```

```

<210> 10
<211> 659
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 5039718CD1

```

```

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

```

Ser	Ile	Gln	Thr	Met	Trp	Ala	Thr	Leu	Gln	Val	Leu	His	Gln	Ala
				200					205					210
Cys	Glu	Ala	Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Ser	Ala
				215					220					225
Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	His	Tyr	Gln	Glu	Arg	Leu	Asn	Ser	Glu	Gln
				230					235					240
Ser	Cys	Leu	Asn	Glu	Trp	Thr	Ala	Met	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Leu
				245					250					255
Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Gln	Glu	Gln
				260					265					270
Met	Glu	Gln	Ala	Ile	Arg	Ala	Glu	Leu	Trp	Lys	Val	Leu	Asp	Val
				275					280					285
Ser	Asp	Leu	Glu	Ser	Val	Thr	Ser	Lys	Glu	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu
				290					295					300
Glu	Leu	Arg	Leu	Gly	Leu	Pro	Leu	Gln	Gln	Tyr	Arg	Asp	Phe	Ile
				305					310					315
Asp	Asn	Gln	Met	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Gln	Arg	Asp	Arg	Ala	Ser
				320					325					330
Arg	Ile	Phe	Pro	His	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Glu	Trp	Asn	Ala	Ala
				335					340					345
Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	His	Ile	Leu	Asn
				350					355					360
Met	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Asn	Phe	Tyr	Pro	Glu	Arg	Phe	Thr	Tyr
				365					370					375
His	Asn	Val	Arg	Leu	Trp	Asp	Glu	Glu	Ser	Ala	Gln	Leu	Leu	Pro
				380					385					390
His	Trp	Lys	Glu	Thr	His	Arg	Phe	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Gln
				395					400					405
Gly	Thr	His	Val	Leu	Val	His	Cys	Lys	Met	Gly	Val	Ser	Arg	Ser
				410					415					420
Ala	Ala	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ala	Met	Lys	Gln	Tyr	Glu	Cys	Ser
				425					430					435
Leu	Glu	Gln	Ala	Leu	Arg	His	Val	Gln	Glu	Leu	Arg	Pro	Ile	Ala
				440					445					450
Arg	Pro	Asn	Pro	Gly	Phe	Leu	Arg	Gln	Leu	Gln	Ile	Tyr	Gln	Gly
				455					460					465
Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Arg	Gln	Ser	His	Val	Trp	Glu	Gln	Lys	Val
				470					475					480
Gly	Gly	Val	Ser	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Ser	Thr
				485					490					495
Pro	Phe	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Glu	Pro	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu
				500					505					510
Lys	Val	Val	Gly	Met	Glu	Glu	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Lys	Glu	Glu
				515					520					525
Pro	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Ile	Asn	Leu	Arg	Gly	Val	Met	Arg	Ser
				530					535					540
Ile	Ser	Leu	Leu	Glu	Pro	Ser	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	Thr	Ser	Glu
				545					550					555
Thr	Ser	Asp	Met	Pro	Glu	Val	Phe	Ser	Ser	His	Glu	Ser	Ser	His
				560					565					570
Glu	Glu	Pro	Leu	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Leu	Ala	Arg	Thr	Lys	Gly
				575					580					585
Gly	Gln	Gln	Val	Asp	Arg	Gly	Pro	Gln	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg
				590					595					600
Gln	Ser	Val	Val	Thr	Leu	Gln	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ala	Asn	Arg
				605					610					615
Thr	Gln	Ala	Phe	Gln	Glu	Gln	Glu	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln
				620					625					630
Gly	Glu	Pro	Cys	Ile	Ser	Ser	Thr	Pro	Arg	Phe	Arg	Lys	Val	Val
				635					640					645
Arg	Gln	Ala	Ser	Val	His	Asp	Ser	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu	Ala	
				650					655					

<210> 11
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 5595281CD1

<400> 11
 Met Leu Ser Ser Ser Pro Ala Ser Cys Thr Ser Pro Ser Pro Asp
 1 5 10 15
 Gly Glu Asn Pro Cys Lys Lys Val His Trp Ala Ser Gly Arg Arg
 20 25 30
 Arg Thr Ser Ser Thr Asp Ser Glu Ser Lys Ser His Pro Asp Ser
 35 40 45
 Ser Lys Ile Pro Arg Ser Arg Arg Pro Ser Arg Leu Thr Val Lys
 50 55 60
 Tyr Asp Arg Gly Gln Leu Gln Arg Trp Leu Glu Met Glu Gln Trp
 65 70 75
 Val Asp Ala Gln Val Gln Glu Leu Phe Gln Asp Gln Ala Thr Pro
 80 85 90
 Ser Glu Pro Glu Ile Asp Leu Glu Ala Leu Met Asp Leu Ser Thr
 95 100 105
 Glu Glu Gln Lys Thr Gln Leu Glu Ala Ile Leu Gly Asn Cys Pro
 110 115 120
 Arg Pro Thr Glu Ala Phe Ile Ser Glu Leu Leu Ser Gln Leu Lys
 125 130 135
 Lys Leu Arg Arg Leu Ser Arg Pro Gln Lys
 140 145

<210> 12
 <211> 1884
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID NO: 365665CB1

<400> 12
 ctgcactacc acagaggaag gaaatcagcc tggaaacatg ctaaactgca gccagaactc 60
 cagctcatcc tcagtgtggt ggctgaaatc acctgcattt tccagtgggt cttctgaggg 120
 ggacagccct tggctcctatc tgaattccag tgggagttct tgggtttcat tgccgggaaa 180
 gatgaggaaa gagatccttg aggctcgcac cttgcaacct gatgactttg aaaagctggt 240
 ggcaggagtg aggcatgatt ggctgtttca gagactagag aatacggggg tttttaagcc 300
 cagtcaactc caccgagcac atagtgtctt tttgttaaaa tattcaaaaa aatctgaact 360
 gtggacggcc caggaaacta ttgtctatct gggggactac ttgactgtga agaaaaagg 420
 cagacaaaaga aatgcttttt gggttcatca tcttcatcaa gaagaaatc tggggaggta 480
 tgttgggaaa gactataagg agcagaagg gctctggcac cacttactg atgtggagcg 540
 acagatgacc gcacagcact atgtgacaga atttaacaag agactctatg aacaaaacat 600
 tcccacccag atattctaca tcccatccac aatactactg attttagagg acaagacaat 660
 aaagggatgt atcagtgtgg agccttacat actgggagaa ttgttaaaat tgtcaaaata 720
 cacgaaagtg gtgaaaacag aatacaaacg cacagaatat ggcttggcct atggccattt 780
 ttcttatgag ttttctaate atagatgt tgtggctgat ttacaagggt gggttaaccg 840
 taatggaaaa ggactcatct acctcacaga tcccagatt cactccgttg atcagaaagt 900
 tttcactacc aattttgaa agagaggaat tttttacttc ttaataaacc agcatgtgga 960
 atgtaatgaa atctgccatc gtctttcttt gactagacct tcaatggaga aaccatgtaa 1020

```

gcataggct gtagggattg gtaatgtgac agaccttagt gatgctctca gatatctggt 1080
gatgctcgca aatatctggt tctctccttc caggcacata gaatacggca cagtctggtc 1140
ctttggggct tgggcagggc cgtgacacag gttctggcca atgatttgca agaggaattg 1200
atcagtataa ctttaagtcc tgcatttaat tggcagcaca agatcctgca gagcctcttt 1260
cctctgcca cagttatcaa gaatgggtca ggagaccgct gcttctgggc ataagtctctg 1320
caaggaaagc aacatggaaa acagcccaa ctcaccatg agggatgaaa agcactcttg 1380
agaaaggcat gtgttgttta agccattgag attttagagc tttttgtcac tatctgtcaa 1440
gactgatact actggggcct ttcctattga tttgggagtt ctttacatat taaaaaaaa 1500
tgagcctttg tgatacgaat tcaatttgtt ttctgtctt ttgacatttg actttgcata 1560
aaagtttatac tgtgcataat tttatatgta gttgaattca tcaatctttt attttggatg 1620
gctttttggt tatgtataat acttagatcc tccttatact ctgagtttct tcttttttaa 1680
ttctcctgta tttccttcta gtataattaa atctgtaaaa agtaagatgg aagagtggta 1740
cagttttctt tatccagtct gtccttgatg ggcatttagg tagactggat aaagaaaatg 1800
tgatacabat acaccatgga acactatgtg tattaatcca ctctcacact gctatgaaga 1860
gatacctgag actgggtaat ttag                                     1884

```

<210> 13
<211> 784
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 760934CB1

```

<400> 13
cggacgggtg gcgagcgcgt gggcggacgc gtgggaggac gcgtgggctc agcccctccc 60
atctcagttg tgttcacaac aggtctgtgt gctggtgctt gtgttgttgg gagtcttcat 120
tcacagagga cccaagacc ggactcgggt ccatttctct ccttctggcc cgttctggc 180
ccttatgcat tacttgcctt tttctcagct ctgtctggac tcatgaggtc ctgggggag 240
aatcagttctg tgtcccctga atgctgagtg ccctctaggt gcttaaatgt tgttcaactt 300
tcacagggaa agtcttcaga tggcagtagg cccattcctc cacatcctag agagcaacct 360
gtgaaagcc atggactctg ccaactgcccc cgacaagatc agaaagctgt atctctatgc 420
ggctcatgat gtgaccttca taccgctctt aatgacctg gggatttttg accacaaatg 480
gccaccgttt gctgttgacc tgaccatgga actttaccag cacctggaat ctaaggagtg 540
gtttgtgcag ctctattacc acgggaagga gcagggtgcc agaggttggc ctgatgggct 600
ctgcccgtg gacatgttct tgaatgccat gtcagtttat accttaagcc cagaaaaata 660
ccacgcactc tgcctcaaaa ctcaggatgat ggaagtggaa aatgaagagt aactgattta 720
taaaagcagg atgtgttgat tttaaaataa agtgccttta tacaatgaaa aaaaaaaaaa 780
aaaa                                             784

```

<210> 14
<211> 1657
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 926043CB1

```

<400> 14
ccagagcacc gggcacggcc ttcaatgggc gaggacacgg acacgcggaa aattaaccac 60
agcttcctgc gggaccacag ctatgtgact gaagctgaca tcttctctac cgttgagttc 120
aaccacacgg gagagctgct ggccacaggt gacaagggcg gccgggtcgt catcttccag 180
cgggaaccag agagtaaaaa tgcgccccac agccagggcg aatacagcgt gtacagcact 240
ttccagagcc acgagccgga gtttgactat ctcaagagcc tggagataga ggagaagatc 300
aacaagatca agtggctccc acagcagaac gccgcccact cactcctgtc caccaacgat 360
aaaactatca aattatggaa gattaccgaa cgagataaaa ggcccgaagg atacaacctg 420
aaggatgaag aggggaaact taaggacctg tccacgggta cgtcactgca ggtgccagtg 480
ctgaagccca tggatctgat ggtggaggtg agccctcgga ggatctttgc caatggccac 540
acctaccaca tcaactccat ctccgtcaac agtgactgcy agacctacat gtcggcggat 600

```

```

gacctggcca tcaacctctg gcacctggcc atcaccgaca ggagcttcaa catcgtggac 660
atcaagccgg ccaacatgga ggaccttacg gaggtgatca cagcatctga gttccatccg 720
caccactgca acctcttctg ctacagcagc agcaagggct cctgcccgtc ctgacacatg 780
cgggcagatg cctctgtgga caagcattcc aagctctttg aagagcctga ggaccccagt 840
aaccgctcat tcttctcgga aatcatctcc tccgtgtccg acgtgaagtt cagccacagc 900
ggccgctaca tgctcaccgg ggactacctt acagtcaagg tctgggacct gaacatggag 960
gcaagacca tagagacctt ccagggtccat gactaccttc ggagcaagct ctgttccctg 1020
tacgagaacg actgcatttt cgacaagttt gaatgtgcct ggaacgggag cgacagcgtc 1080
atcatgaccg gggcctacaa caacttcttc cgcattgttc atcggaacac caagcgggac 1140
gtgaccctgg aggcctcgag ggaaagcagc aagccccggg ctgtgctcaa gccacggcgc 1200
gtgtgcgtgg ggggcaagcg ccggcgtgat gacatcagtg tggacagctt ggacttcacc 1260
aagaagatcc tgcacacggc ctggcaccgg gctgagaaca tcattgccat cgccgccacc 1320
aacaacctgt acatcttcca ggacaaggta aactctgaca tgcactaggt atgtgcagtt 1380
cccggcccct gccaccagc ctcagtcaag tcattccccg catgaccttc acgaccgcaa 1440
tgcaaggagg ggaagaaagt cacagcactg atgaggacag ctgcagaggt ggcagtggtg 1500
ggacacagga agtttgggcc cctctcctgc cccagctttc ctaggccaga attgtgtttg 1560
gcagttaattg tctgtttaa aaaataaaaa ggagaggaag cgttcaccgc cgcaaatcat 1620
aaaatggaca tgactgtgga gtcttacagt tcaggggt 1657

```

```

<210> 15
<211> 2118
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 1234795CB1

```

```

<400> 15
gggaaaagag gacttattgt tgtcatggcc catgagatga ttggaactca aattgttact 60
gagaggttgg tggctctgct ggaaagtggg acggaaaaag tgctgcta attgatgccg 120
ccatttgggg aatacaatac atcccacatt ttggaagcca ttaatatcaa ctgctccaag 180
cttatgaagc gaaggttgca acaggacaaa gtgttaatta cagagctcat ccagcattca 240
gcaaaacata aggttgacat tgattgcagt cagaaggttg tagtttacga tcaaagctcc 300
caagatggtg cctctctctc ttcagactgt tttctcactg tacttctggg taaactggag 360
aagagcttca actctgttca cctgcttgcg ggtgggtttg ctgagttctc tegtgtttc 420
cctggcctct gtgaaggaaa atccactcta gtcccactc geatttctca gccttgctta 480
cctgttgcca acattgggac aaccgcaatt ctcccacatc tttatcttgg ctgccagcga 540
gatgtcctca acaaggagct gatgcagcag aatgggattg gttatgtgtt aaatgccagc 600
aatcactgtc caaagcctga ctttatcccc gagtctcatt tctgctgtgt gcctgtgaa 660
gacagctttt gtgagaaaa tttgcccgtg ttggacaaat cagtagattt cattgagaaa 720
gcaaaagcct ccaatggatg tgttctagtg cactgtttag ctgggatctc ccgctccgcc 780
accatcgcta tcgctacat catgaagagg atggacatgt ctttagatga agcttacaga 840
tttgtgaaag aaaaaagacc tactatatct ccaaacttca atttcttggg ccaactcctg 900
gactatgaga agaagattaa gaaccagact ggagcatcag ggccaaagag caaactcaag 960
ctgctgcacc tggagaagcc aatgaacct gtcccctgctg tctcagaggg tggacagaaa 1020
agcgagacgc cctcagctcc accctgtgcc gactctgcta cctcagaggc agcaggacaa 1080
aggcccgtgc atcccgccag cgtgccccagc gtgccccagc tgcagccgtc gctgttagag 1140
gacagcccgc tggtagaggg gctcagtggt ctgcacctgt ccgcagacag gctggaagac 1200
agcaataagc tcaagcgttc cttctctctg gatatacaat cagtttccata ttcagccagc 1260
atggcagcat cttacatgg caactcctca tcagaagatg ctttggaaata ctacaaacct 1320
tccactactc tggatgggac caacaageta tggcagttct ccctgttca ggaactactg 1380
gagcagactc ccgaaccagc tcccctgata aggaggaagc cagcatccc aagaagctgc 1440
agaccgccag gccttcagac agccagagca agcgattgca ttcggtcaga accagcagca 1500
gtggcaccgc ccagaggtcc ctttlatctc cactgcatcg aagtgggagc gtggaggaca 1560
attaccacac cagcttctct ttcggccttt ccaccagcca gcagcacctc acgaagtctg 1620
ctggcctggg cccttaaggg ctggcactcg gatattcttg cccccagac ctctaccctc 1680
tcctgacca gcagctggta ttttgccaca gagtccctc acttctactc tgcctcagcc 1740
atctacggag gcagtgccag ttaactctgc tacagctgca gccagctgcc cacttgccga 1800
gaccaagtct attctgtgcg caggcggcag aagccaagt acagagctga ctgcggggc 1860
agctggcatg aagagagccc ctttgaagag cagtttaaac gcagaagctg ccaaatggaa 1920
ttggagaga gcatcatgtc agagaacagg tcaccgggag agctggggaa agtgggcagt 1980

```

```

cagtctagct tttcgggcag catggaaatc attgaggtct cctgagaaga aagacacttg 2040
tgacttctat agacaatttt ttttttcttg ttcacaaaaa aattccctgt aaatctgaaa 2100
tatatatatg tacatacc                               2118

```

```

<210> 16
<211> 2116
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 1271505CB1

```

```

<400> 16
ggaggcggct ccgcgcgcgt ccgctgctag gacccgggca gggctggagc tgggctggga 60
tcccagagctc ggcagcagcg cacgggcccgg cccacctgct ggtgccttgg aggctctgag 120
ccccggcggc gccccggccc acgcggaaacg acggggcgag atgcgagcca cccctctggc 180
tgctcctgcg ggttcctctg ccaggaagaa gcggttggag ttggatgaca acctagatac 240
cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag cccagactgc ccccttgcct 300
gttgcccctg agcccacctc ctgctccaga tegtgaact gctgtggcca ctgcctcccg 360
tcttgggccc tatgtcctcc tggagcccga ggaggcggg cgggctacc aggccctgca 420
ctgccctaca ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc gtccaggaag ccctggcctg 480
gctggagccc tacgcgcggc tgcccccgca caagcatgtg gctcggccca ctgaggtcct 540
ggctggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc catggggaca tgcacagcct 600
ggtgcgaacg cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc gtgtcttcc gccagatggc 660
caccgcccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggtcctg cgtgatctca agctgtgtcg 720
ctttgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctggtgctg gagaacctgg aggactcctg 780
cgtgctgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac gctgcccag cctacgtggg 840
acctgagata ctcagctcac gggcctcata ctcgggcaag gcagccgatg tctggagcct 900
ggcgctggcg ctcttcacca tgctggcccgg cactacccc tccaggact cggagcctgt 960
cctgctcttc ggcaagatcc gcgcggggc ctacgccttg cctgcaggcc tctcggcccc 1020
tgcccgtctg ctggttctgt gcctcctctg tccggagcca gctgaacggc tcacagccac 1080
aggcatcctc ctgcaccctt ggtgctgaca ggaccgatg cccttagccc caaccgatc 1140
ccatctcttg gaggtgccc aggtggtccc tgatggactg gggctggagc aagccagggg 1200
agaggagggg gacagagaag tggttctgta tgctaggac caccctaact cacgctcagc 1260
tgccaacagt ggattgagtt tgggggtagc tccaagcctt ctctgcctc tgaactgagc 1320
caaaccttca gtgccttcca gaaggagaa aggcagaagc ctgtgtggag tgtgctgtgt 1380
acacatctgc tttgttccac acacatgcag ttctgcttg ggtgcttacc aggtgccaag 1440
ccctgttctc ggtgctggga gtacagcagt gagcaaagga gacaatattc cctgctcaca 1500
gagatgacaa actggcatcc ttgagctgac aacacttttc catgaccata ggtcactgtc 1560
tacactgggt acactttgta ccagtgtcgg cctccactga tgctggtgct caggcacctc 1620
tgtccaagga caatcccttt cacaaacaaa ccagctgcct ttgtatcttg taccttttca 1680
gagaaagggg ggtatccctg tgccaaaggc tccaggectc tcccctgcaa ctcaggacce 1740
aagcccagct cactctggga actgtgttcc cagcatctct gtcctcttga ttaagagatt 1800
ctccttccag gcctaagcct gggatttggg ccagagataa gaatccaaac tatgaggcta 1860
gttcttgtct aactcaagac tgttctggaa tgagggtcca ggctgtcaa ccatggggct 1920
tctgacctga gcaccaaggt tgagggacag gattaggcag ggtctgtcct gtggccacct 1980
ggaaagtccc aggtgggact cttctgggga cacttggggt ccacaatcc aggtccatac 2040
tctaggtttt ggataccatg agtatgtatg tttacctgtg cctaataaag gagaattatg 2100
aaataaaaaa aaaaaa                               2116

```

```

<210> 17
<211> 2897
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 1385073CB1

```

```

<400> 17

```

```

ctagccgaag cggctgcate tggcgccgcy tctgccccgc gtgctcggag cggattctgc 60
ccgccgtccc cggagccctc gggccccccg tgagccccgc atcacttccct ccctgtgacc 120
aaccggcgct gcaggttaga gcctggcaat gccgtttggg tgtgtgactc tgggcgacaa 180
gaagaactat aaccagccat cggaggtgac tgacagatat gatttgggac aggtcatcaa 240
gactgaggag ttttgtgaaa tcttccgggc caaggacaag acgacaggca agctgcacac 300
ctgcaagaag ttccagaagc gggacggccg caaggtgcyg aaagctgcca agaacgagat 360
agggatcctc aagatggtga agcatcccaa catcctacag ctggtggatg tgtttgtgac 420
ccgaaggag tactttatct tccctggagct gccacgggg agggaggtgt ttgactggat 480
cctggaccag ggctactact cggagcgaga cacaagcaac gtggtacggc aagtccctga 540
ggccgtggcc tttttgact cactcaagat cgtgcacagc aatctcaagc tggagaacct 600
ggtttactac aaccggctga agaactcgaa gattgtcacc agtgacttcc atctggctaa 660
cctagaaaat ggccctatca aggagccctg tgggaccccc gagtatctgg cccagggagt 720
ggtagggcgg cagcggatg gacgccctgt ggactgctgg gccattggag tcatcatgta 780
catcctgctt tcaggcaacc cacctttcta tgaggaggtg gaagaagatg attatgagaa 840
ccatgataag aatctcttcc gcaagatcct ggctggtgac tatgagtttg actctccata 900
ttggagatag cctggtcaca aggtgatgag aggtggagat 960
agaccagcgg atcactgcag aagaggccat ctcccatgag tggatttctg gcaatgctgc 1020
ttctgataag aacatcaagg atggtgtctg tgcacagatt gaaaagaact ttgccagggc 1080
caagtggagg aaggctgtcc gagtgaccac cctcatgaaa cggctccggg caccagagca 1140
gctcagcagc ggctcagccc agtcggcctc agccacagac actgccaccc ccggggctgc 1200
agaccgtagt gccaccccag ccacagatgg aagtgccacc ccagccactg atggcagtgt 1260
caccaccagc accgatggaa gcatcactcc agccactgat gggagtgta ccccagccac 1320
tgacagggag cctactccag ccactgatgg gagagccaca ccagccacag aagagagcac 1380
tgtgcccacc acccaaaagca gtgccatgct gccaccaag gcagctgcca cccctgagcc 1440
ggctatggcc cagccggaca gcacagcccc agagggcgcc acagggccag ctcaccctc 1500
tagtaaaggg gaagaggctg ctggttatgc ccaggagtct caaagggagg aggccagctg 1560
agttaggcagc ctggtgaggg gggcagggg atgggcagga ggtggggaga gtggatgagg 1620
ggcttctcac tgtacataga gtcaactggca tgatgccctc gctcccccac gcccccacat 1680
cccagtgggg cataactagg ggtcacggga gaggcagctc gctcctctgt tgatgtgtg 1740
tgagtggtag gcaggccagt ggcaggccg gccccagccc ctgcatggat tccttgtggc 1800
tttctgtct tttgctagct tcaccagtct ctgttccttg tgggatgctg ctctagggat 1860
actcaggggg ctctgctct ccttcccctt cccttcttgc ctaccattc ccctaggcag 1920
gccctgcagg tcccacactc tcccagggcc taaacttggg cggccttggc ctgagagctg 1980
gtctccagc gaggccctgt cagcggctct aggtcctgc acatgaaggt gtgtgctgt 2040
ggtgtgtgg ctgctctagg agcagataca ggctgggata gaggatgcag aaaggtaggg 2100
cagtatgttt aagtcagac ttggcacatg gctagggata ctgctcacta gctgtggagg 2160
tcctcaggag tggagagaat gagtaggagg gcagaagctt ccatttttgt ccttctaaag 2220
accctgttat ttgtgttatt tccctgcttt ccgagtcctg cagtgggctg ccctgacct 2280
tgaacctcat gagcctctaa gggaaaggag gaacaattag gacgtggcaa tgagacctg 2340
cagggcagag tacaagccca gcacccagtg tcccagcctt actgggtcct taccctgggc 2400
caaacaggga gggctgatac ctcttctgct ttcctagatg cccacctcct acaatctcag 2460
cccacaagtc ctctccaccc taggggctt gctgcatggc aataactcat aatctgatt 2520
ggaggtttgc cctttacagg ggcagatct ctgctcagtt caacaatgaa atgaagagga 2580
actccctct tctacagctc acttctatca gaggcccagg tgccctcagag ccacattgag 2640
ttgcttttcc tgggatgagg aagtagggtt aaactcccca gtttccctgag ggaggtcct 2700
gacaggtgcc ctttctcaga ccctaccaca gctgggatag gcagccacat tggctctgc 2760
ccttctctgg cactccgtgg tggctctgcc ctctccctg catgctctg ggtctgctct 2820
ggtgtgtgaa ggtcgggtgg ttaactgtgt gctactgaa cctggcaaat aaacatcacc 2880
ctgcaagcc aaaaaaa 2897

```

<210> 18
<211> 839
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 1606974CB1

```

<400> 18
gtggtgagtt acttggtctg gagcgggcca ggggacgct gggcggagcg gggctggcca 60
gcctcggccc ccatgaccgc ctgtctctgt ccctttccca gcgatgggcy tgcagcccc 120

```

```

caacttctcc tgggtgcttc cgggcccggct ggcgggactg gcgctgccgc ggctccccgc 180
ccactaccag ttctgtgttg acctgggctg ggggcacctg gtgtccctga cggagcgcgg 240
gccccctcac agcgacagct gcccccggcct caccctgcac cgcctgcgca tccccgactt 300
ctgcccgcgc gcccccgacc agatcgaccg cttcgtgcag atcgtggacg aggccaacgc 360
acggggagag gctgtgggag tgcactgtgc tctgggcttt ggccgactg gcaccatgct 420
ggcctgttac ctggtgaagg agcggggctt ggctgcagga gatgccattg ctgaaatccg 480
acgactacga cccggctcca tcgagaccta tgagcaggag aaagcagtct tccagttcta 540
ccagcgaacg aaataagggg ccttagtacc cttctaccag gccctcactc ccttccccca 600
tgttgtcgat ggggccagag atgaagggaa gtggactaaa gtattaaacc ctctagctcc 660
cattggctga agacactgaa gtagccacc cctgcaggca ggtcctgatt gaaagggagg 720
cttgactgc tttgttgaat aatgagttt tacgaaccaa aaaaaaaaaa aaaaaaggcg 780
gcccgaagct tattcccctt agtgagggtt aatttttagt tggcactggc cgtcgtata 839

```

<210> 19
<211> 1081
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 1829744CB1

```

<400> 19
gggaacctca ggcttcagag agccgaaaag ttgggaggcg taaccactta caggccggaa 60
gtgtccgggg tggacgcatt cgggtagccg aagaagtccc aggattgccg aagaagtccc 120
aggatttccg aagcgagccg aagcatcgcg acagttttca gagacagctg atcggttgga 180
gctgtttgcg cgagcagtcg tggcggcggc cagagctact acgcccggcg atggcgagga 240
gccccccccg gaggctgagg ctctggccgc agccccggag cggagcagcc gcttcttgag 300
cggcctggag ctggtgaagc aggtgcccga ggcgcgcgtg ttccgtggcc gcttccaggg 360
ccgcgcggcg gtgatcaagc accgcttccc caagggctac cggcaccggg cgtggaggc 420
gcccgttggc agacggcgga cgggtcagga ggccccggcg ctctccgct gtcgcccgcg 480
tggaaatatc gccccagttg tcttttttgt ggactatgct tccaactgct tatatatgga 540
agaaattgaa ggctcagtga ctgttcgaga ttatattcag tccactatgg agactgaaaa 600
aaactccccg ggtctctcca acttagccaa gacaattggg caggttttgg ctgcaatgca 660
cgatgaagac ctattcatg gtgatctcac cacctccaac atgctcctga aacccccct 720
ggaacagctg aacattgtgc tcatagactt tgggctgagt ttcatctcag cacttccaga 780
ggataaggga gtagacctct atgtcctgga gaaggccttc ctcagtacc atcccaaac 840
tgaactgtg tttgaagcct ttctgaagag ctactccacc tctccaaaa aggccaggcc 900
agtgctaaaa aaattagatg aagtgcgcct gagaggaaga aagaggtcca tggttgggta 960
gaagaatgtg tatgacaacc acacacagtg aagctctttt ttcaaagtaa atttgaagaa 1020
atgctacaag tatgagatga gatctaagta aaggtgttaa gatattttta aaaaaaaaaa 1080
a
1081

```

<210> 20
<211> 2924
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 4030831CB1

```

<400> 20
ggcggggacc cggatgtgtg tgggtggcggc ggccgaagag cttgtgtgcg gagctgagag 60
gcctatggat gaggaggacg cggcggcccc gggttgttct catgaacaag atggatgacc 120
tcaacctgca ctaccggttt ctgaattggc gccggcggat ccgggagatt cgagaggtcc 180
gagctttccg atatcaggag aggttcaaac atatccttgt agatggagat actttaagtt 240
atcatggaaa ctctggtgaa gttggctgct acgtggcttc tcgaccctg accaaggaca 300
gcaattatth tgagggtgct attgtggaca gtggagtccg gggcaccatt gctgtggggc 360
tggctccctc gtactacagc ttggatcacc agcctggctg gttgcctgac tctgtagcct 420
accatgctga tgatggcaag ctgtacaagt gccgagccaa gggccgccag tttgggtcaa 480

```

```

agtgcaactc cggggaccgg attggctgtg gcattgagcc tgtgtccttt gatgtgcaga 540
ccgcccagat cttcttcacc aaaaatggga agcgggtggg ctctaccatc atgcccagat 600
ccccagatgg actgttccca gcagtgggca tgactccctt gggtgaggag gtgcccgtgc 660
acctcaacgc tgagctgggc cgtgaggagc acagcgtcat gatgtggac agttacgagg 720
atgaatgggg cgggctacat gatgtcagag tctgtgggac tctgtggag tacttaggga 780
agggcaaaag catcgtggat gtggggctgg cccaggcccg gcaccactc agcaccgcc 840
gccactactt cgagggtggag atcgtggacc ctggagagaa atgctacatc gccctggggc 900
tggcacggaa ggactatccc aagaacaggc accctggctg gagcagaggg tctgtggctt 960
atcatgcaga cgatgggaag atcttccatg gcagtgggtg gggggacccc tttggggccc 1020
gctgttacia aggggacatc atgggctgtg gaatcatggt cccccgggac tacattttgg 1080
acagtgaggg ggacagtgat gacagttgtg acacagtgat cctgtctccg actgcccggg 1140
ccgtccggaa cgtgcggaat gtcagtacc tgaccaggga aggggaagag gaagaggagg 1200
aagaggaaga ggaagaggat ggggaagaga tagagccgga gcatgagggc aggaaggtgg 1260
tggtttctct cactcggaat ggcaagatca ttgggaagaa ggatgctggt gttcctctcg 1320
gaggcttctt ccccaccatt ggaatgctga gctgcgggga gaaagtcaa gtagatctgc 1380
acccttgtag tcccttccca gacctgctcc ttctccctgc tcaccctctg 1440
ctgggcccagg caccagttc ctgacttccc agaggcttcg tttaccagc aggccctgg 1500
aggtgtgtag tcaactctgcc cccactggct caggcccctg tcacgcttct ctgtgccccc 1560
gtttctgacc tgggtgctgcc actgttgta gtcctggggc ctgagctcct ggttggagac 1620
gaatggaccc aaagaatggt gttgggatgt ggggtggtccc actcgtcttg gtcagtgagg 1680
ttctgggtcc cccttccct caccggccct gtgtgggtgg agaggcgtga gcaccctatc 1740
tcagctgcta ttccggcatg atgctttgta gagggtagag tagacagccc cctcccctac 1800
tcaccatggt atttctcctt gaattcctct ttcttggttt ctttccctgg tgtgtgaacc 1860
agttgctgct gtcatacccc tggcagggcc aggggacctc tctttggtca tctctgtcct 1920
ttcactggct gctgcccag gaagactcct ctaggctctc catcttccc ttgagagctg 1980
gctccccacc ccaacctgct caggcaccac agaggatcta ggtctctggc tccccatacc 2040
tggaccacaca tgggtgggtg cctgttgcat gtttaagaga gaggggctgt gagggtgacag 2100
ggcactaggg ccttcactcc tttctccct tccatcctt ctttaccagt gccaccatg 2160
tccctagctc cggggtattg ggctgaggc tctgggccc gtctccctgc cagcgtgagg 2220
gcaagacccc agagccttag ctgagcaagc ccagaggggc agcgtggccc ctcccctccc 2280
tttctctgce ccgtcccag cctcagcttg ctgcttgctg cagttgcttg tttcgttca 2340
gtgtttgatt ctagcactta catgtgtcct ccccaccaag ccctctatct ccttctaata 2400
cttcaacccc tggcccctc cccgtaacag tgacttttcc aggggagga aggcagcagg 2460
agctgttggc ctltggttgc acagagcggg tagggctgta gggaaagcgg gtgagctggt 2520
gtgctgctgg gcctccctt ggccctcgtc tcccacccta cgatgtatga aatgtatgta 2580
cagaccagag atgtttatc agccgataaa gatggagttt ccgtatttat cagtatggcc 2640
ggaaccagga gcctttctag tccactgggc taggaacagg actgctggat gggggcagcc 2700
gaaggcagct tgctcatggg gagatgtgga ccaatgttgg ccaggggatg ggaatcatat 2760
gttccatggg cctggctaca ggctgagca cagatacgtc ccctgggaga tgaggctttg 2820
accttctgt gaataagtgt tgactccaat ttccggctaaa gtttatagaa attctttatt 2880
attagacaaa aatagactct ctttttccc ctaaaaaaaaa aaaa 2924

```

```

<210> 21
<211> 2781
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID NO: 5039718CB1

```

```

<400> 21
cggctcgagg cgggtccagg actgtccgcc ggggtgaggg aaggggcccgt gcccggtgcc 60
agcccagggt ctcgcccgtt ggctccatgg cctggtcac agtgagcccgt tgcccccgg 120
gcagcggcgc ctccacgccc gtggggccct gggaccaggc ggtccagcga aggagtcgac 180
tccagcgaag gcagagcttt gcggtgctcc gtggggctgt cctgggactg caggatggag 240
gggacaatga tgatgcagca gaggccagtt ctgagccaac agagaaggcc ccgagtgagg 300
aggagctcca cggggaccag acagacttcg ggcaaggatc ccagagctcc cagaagcagg 360
aggagcagag ccagcacctg cacctcatgg tacagctgct gaggcccag gatgacatcc 420
gcctggcagc ccagctggag gcaccccggc ctcccggct cgcctacctg ctggtagttt 480
ctacacgaga aggagaaggt ctgagccagg atgagacggt cctcctgggc gtggatttcc 540
ctgacagcag ctccccagc tgcaccctgg gctggtctt gccctctggt agtgacaccc 600

```

```

agggtgactt agatggagac gggggcttca gcgtgacgtc tgggtgggcaa agccggatct 660
tcaagcccat ctccatccag accatgtggg ccacactcca ggtattgcac caagcatgtg 720
aggcagctct aggcagcggc cttgtaccgg gtggcagtgc cctcacctgg gccagccact 780
accaggagag actgaactcc gaacagagct gcctcaatga gtggacggct atggccgacc 840
tggagtctct ggggctccc agtgcgagc ctggcgggtc ctcagaacag gagcagatgg 900
agcaggcgat cgtgtctgag ctgtggaaag tgttggatgt cagtgcctg gagagtgtca 960
cttccaaga gatccgccag gctctggagc tgcgcctggg gctccccctc cagcagtacc 1020
gtgacttcat cgacaaccag atgctgctgc tggtagcaca gcgggaccga gctccccca 1080
tcttccccca cctctacctg ggctcagagt ggaacgcagc aaacctggag gagctgcaga 1140
ggaacagggt caccacatc ttgaacatgg cccgggagat tgacaacttc taccctgagc 1200
gcttccacta ccacaatgtg cgctctggg atgaggagtc gggccagctg ctgcccact 1260
ggaaggagac gcaccgcttc attgaggctg caagagcaca gggcaccac gtgctggtcc 1320
actgcaagat gggcgtcagc cgctcagcgg ccacagtgtc ggcctatgcc atgaagcagt 1380
acgaatgcag cctggagcag gcctgcgcc acgtgcagga gctccggccc atcgcccgcc 1440
ccaaccctgg ctctctggc cagctgcaga tctaccagg catctgagc gccagccgcc 1500
agagccatgt ctgggagcag aaagtgggtg gggctcccc agaggagcac ccagccctg 1560
aagtctctac accattccca cctcttccc cagaacctga ggggtggtggg gaggagaagg 1620
ttgtagcat ggaagagagc caggcagccc cgaaagaaga gcctgggcca cggccacgta 1680
taaacctccg aggggtcatg aggtccatca gtcttctgga gccctccttg gagctggaga 1740
gcacctcaga gaccagtgc atgccagagg tcttctcttc ccacgagtct tcacatgaag 1800
agcctctgca gcccttccca cagcttgcaa ggaccaaggg aggccagcag gtggacaggg 1860
ggcctcagcc tgcctgaa gctccgagc cagtggttac cctccagggc agtgccgtgg 1920
tggccaaccg gaccagggc tccagggc aggagcaggg gcaggggagc gggcagggag 1980
agccctgcat tctctctacg cccaggttcc ggaagggtgt gagacaggcc agcgtgcatg 2040
acagtggaga ggagggcgag gcctgagccc tcacacatgc ccacgctccc ctgacactga 2100
agaggatcca caactcttg gaaaaacacc ctacgtctg ttgcccaca cattctctc 2160
agctccgccc cataccgctc actacagcct cacctcccac ccctgtcact acggcctcac 2220
ctcccacccc tgtcactaca gcctcacctc ctacagcctt aagtcccagg cccatgtctg 2280
cctgtccaag ggctcaagac tttctaactg ggatgtggta gagggactga aggtacctt 2340
gggggcaaca gcaccctagt ttcattctca actctagccc tgcacactca cctgtggcac 2400
ggaatgaaaa cagagcttcc cgtgcaaaaa gggtcacgcc tcccaccccc gccccctccc 2460
tgcacctctc gtctctccc agtctattcc tggaaaccagc caggccaggc aaccagtggc 2520
ccccaaaggg aggcaggatc ctcaggcccc agcccgggga ggctggaagg gctggcagat 2580
cgcttccctc atccacctcc accggctcag ctgtctccag acctcctgtg 2640
acaccacgcc agatcacagg gcaccaggcc agagatagtc tctttttgt ccttctgtg 2700
ctctggctag tcagttttc atagccttac agtatctggc tttgtactga gaaataaac 2760
acattttcat aaaaaaaaa a 2781

```

<210> 22

<211> 754

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID NO: 5595281CB1

<400> 22

```

gttctctgtc tctcacttc cctctgtggc tctgctcaga actggcgggt tttcccagct 60
ccttgcccag accaatactt ccatgctgtc tcaagccct gcttctctgca catctcccag 120
cccagatggg gagaacccat gtaagaaggc cactgggct tctgggagga gaaggacatc 180
atccacagac tcagagtcca agtcccacc ggactcctcc aagatacca ggtcccggag 240
accagccgc ctgacagtga agtatgaccg gggccagctc cagcgtggc tggagatgga 300
gcaatgggtg gatgctcaag ttcaggagct ctccaggat caagcaacc cttctgagcc 360
tgagattgac ctggaagctc tcatggatct atccacagag gagcagaaga ctgagctgga 420
ggccattctt gggaaactgcc ccgcccac agaggctttt atctctgagc tgcctcagtc 480
actcaagaaa ctccggagac tcagccggcc tcagaaataa gcctgagaga ccatctttag 540
cagcctcagc actgccaggc ctgcccgtgaa actccagatc ctggctaaga gggaaatagc 600
tcttggggac acaaaacaaga aatgtggaca aggagggaca tttgcatact cctactgtct 660
gtgtggtcac agctagtctc tgtcagctgg gctctctggg agaaaactgg ctgttgtcca 720
atgccttctt tggcagccaa gtggataaaa cctt 754

```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/25515
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/55 C12N15/54 C12N15/11 C12N9/12 C12N9/16 C07K16/40 C12Q1/68 A01K67/027 A61K31/713 G01N33/50 G01N33/53 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 A61K G01N 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) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, STRAND		
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 99 09199 A (RYAZANOV ALEXEY G ;UNIV NEW JERSEY MED (US); PAVUR KAREN S (US); H) 25 February 1999 (1999-02-25) page 17 -page 18; figure 1 ---	1,3,4,6-9,16
A	MARTELL K J ET AL: "HVH-5: A PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE ABUNDANT IN BRAIN THAT INACTIVATES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY,US,NEW YORK, NY, vol. 65, no. 4, 1995, pages 1823-1833, XP000196676 ISSN: 0022-3042 --- -/--	
<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. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 February 2001		Date of mailing of the international search report 17 May 2001 (17.05.01)
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Blanco Urgoiti, B

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/25515

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STONE S R ET AL: "THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE COMPLEMENTARY DNA ENCODING THE HUMAN LUNG PROTEIN PHOSPHATASE 2A-ALPHA CATALYTIC SUBUNIT" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 16, no. 23, 1988, page 11365 XP002160654 ISSN: 0305-1048</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>KUHEN K L ET AL: "Mechanism of interferon action Sequence of the human interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (PKR) deduced from genomic clones" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 178, no. 1, 31 October 1996 (1996-10-31), pages 191-193, XP004043360 ISSN: 0378-1119</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US 00/25515**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.: 20,21,23,24
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:

see additional sheet

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.:
1-28 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: 1-28 (partially)

A polypeptide with an amino acid sequence of SEQ ID NO.1, 90% identical, or an immunogenic or biological active fragment. The polynucleotide encoding the same. Promoter sequence, transformed host cell containing said polynucleotide. Transgenic organism comprising said polynucleotide. Method for producing the polypeptide of SEQ ID NO.1. An antibody binding to such polypeptide. A polynucleotide comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO.12, 90% identical, or complementary. A polynucleotide comprising at least 60 nucleotides of said polynucleotide. A method for detecting such polynucleotide in a sample by hybridization with a probe. A method for detecting such polynucleotide in a sample by polymerase chain reaction. A composition comprising such polypeptide and a pharmaceutical excipient. A method for treating a disease, administering to a patient said composition. A method for screening an agonist of such polypeptide, and a composition comprising such agonist, and a pharmaceutical excipient. A method for screening an antagonist of such polypeptide, and a composition comprising such antagonist, and a pharmaceutical excipient. Methods of treatment using said agonist or antagonist. Method for screening ligands of said polypeptide. Method of screening modulators of the activity of such polypeptide. Method for screening modulators of the expression of the polynucleotide of SEQ ID NO.12. Method for assessing toxicity of a compound, adding such compound in a sample and comparing the amount of said polynucleotide present in such a sample, compared to the amount present in an untreated sample.

2. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 2 and polynucleotide of SEQ ID NO 13.

3. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 3 and polynucleotide of SEQ ID NO 14.

4. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 4 and polynucleotide of SEQ ID NO 15.

5. Claims: 1-28 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 5 and polynucleotide of SEQ ID NO 16.

6. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 6 and polynucleotide of SEQ ID NO 17.

7. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 7 and polynucleotide of SEQ ID NO 18.

8. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 8 and polynucleotide of SEQ ID NO 19.

9. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 9 and polynucleotide of SEQ ID NO 20.

10. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 10 and polynucleotide of SEQ ID NO 21.

11. Claims: 1-28 (partially)

Idem as invention 1 but limited to polypeptide of SEQ ID NO 11 and polynucleotide of SEQ ID NO 22.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20,21,23,24

Claims 20,21,23, and 24 refer to antagonists respectively agonists of the polypeptide 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 results 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 00/25515

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9909199 A	25-02-1999	AU 9110098 A EP 1060260 A	08-03-1999 20-12-2000

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 25/00		A 6 1 P 37/00	4 C 0 8 4
35/00		43/00	1 0 1 4 H 0 4 5
37/00		C 0 7 K 16/40	
43/00	1 0 1	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/40		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		9/12	
1/21		9/16	B
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
9/12		G 0 1 N 33/15	Z
9/16		33/50	Z
C 1 2 Q 1/68		33/53	M
G 0 1 N 33/15		33/566	
33/50		33/574	
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A
33/574		A 6 1 K 37/54	

(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, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 バンドマン、オルガ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94043・
 マウンテンビュー・アンナアベニュー
 366
- (72)発明者 ヒルマン、ジェニファー・エル
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94040・
 マウンテンビュー・#17・モンロードライ
 ブ 230

- (72)発明者 ボーゲン、マライア・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・
サンレアンドロ・サンティアゴロード
14244
- (72)発明者 アジムザイ、ヤルダ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94545・
ハイワード・ロックスプリングスドライブ
2045
- (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 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA10 BA11 CA04
CA09 FA02 HA03 HA14
4B050 CC04 DD11 LL01 LL03
4B063 QA18 QA19 QQ27 QQ33 QR38
QR55 QR62 QS25 QS34
4B065 AB01 CA29 CA31 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08
BA20 BA21 CA53 DC22 NA14
ZA01 ZA66 ZB01 ZB26 ZC19
ZC20
4H045 AA11 CA40 DA75

专利名称(译)	蛋白磷酸酶和蛋白激酶		
公开(公告)号	JP2003509053A	公开(公告)日	2003-03-11
申请号	JP2001523775	申请日	2000-09-14
[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 バンドマンオルガ ヒルマンジェニファーエル ボーグンマライアアール アジムザイヤルダ リュデュングアイナエム		
发明人	ユエ、ヘンリー タング、ワイトム バンドマン、オルガ ヒルマン、ジェニファー・エル ボーグン、マライア・アール アジムザイ、ヤルダ リュ、デュング・アイナ・エム		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K38/46 A61K45/00 A61P1/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/54 C12N15/55 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/56 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P25/00 C12N9/1205		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P1/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.101 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12N9/16.B C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/56 G01N33/574 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/54		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/FA02 4B024/HA03 4B024/HA14 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ27 4B063/QQ33 4B063/QR38 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AB01 4B065/CA29 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/CA53 4C084/DC22 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA66 4C084/ZB01 4C084/ZB26 4C084/ZC19 4C084/ZC20 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75		
优先权	60/154141 1999-09-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码PPHKP的蛋白磷酸酶和蛋白激酶 (PPHKP) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体和宿主细胞，抗体，激动剂，拮抗剂。 此外，本发明提供了用于诊断，治疗和预防与PPHKP表达有关的疾病的方法。

