

(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 - 510077

(P2003 - 510077A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 7/00	4 B 0 6 3
39/395		7/02	4 B 0 6 4
A 6 1 P 7/00		7/04	4 C 0 8 4
7/02		7/06	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 42数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 526936(P2001 - 526936)

(86)(22)出願日 平成12年9月29日(2000.9.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月28日(2002.3.28)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/09594

(87)国際公開番号 W001/023554

(87)国際公開日 平成13年4月5日(2001.4.5)

(31)優先権主張番号 199 47 010.3

(32)優先日 平成11年9月30日(1999.9.30)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 ユニヴェルシテートクリニクム フライブルグ

ドイツ国 D - 79106 フライブルグ フングステターシュトラッセ 49

(72)発明者 パール・ハイケ

ドイツ国 D - 79112 スパルゲルベグ 32

(74)代理人 弁理士 岩谷 龍

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P R V - 1 遺伝子とその使用

(57)【要約】

本明細書は、P R V - 1 タンパク質をコードし、配列番号 1 を必ず含有しているヌクレオチド配列について記載しており、さらにこの遺伝子の検出方法、すなわち該遺伝子によってコードされているmRNAおよび該遺伝子によってコードされているポリペプチドの検出方法についても記載している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有することを特徴とするN-グリコシル化ポリペプチド、または50以上のアミノ酸を有するN-グリコシル化ポリペプチドの断片。

【請求項2】 下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有することを特徴とするポリペプチド。

【請求項3】 請求項1記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項4】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3記載の抗体。

【請求項5】 PRV-1ポリペプチドが請求項3または4記載の1以上の抗体と免疫学的アッセイにおいて反応することを特徴とする、真性赤血球増加症を検出するための方法。

【請求項6】 用いる抗体がポリクローナルあるいは、請求項3または4記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】 通常賦形剤に加えて請求項3または4記載の抗体を含有することを特徴とする真性赤血球増加症を治療するための薬剤。

【請求項8】 請求項1記載のポリペプチドまたは下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有するポリペプチドと、薬学的に許容しうる賦形剤とを含有することを特徴とする薬剤。

【請求項9】 下記のヌクレオチド配列：

配列番号1記載の1番～1600番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列を必ず1つ含有するポリヌクレオチド、および薬理的に許容しうる賦形剤を少なくとも1つ含有することを特徴とする薬剤。

【請求項10】 請求項1記載のポリペプチドまたは下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有するポリペプチドの使用、またはそれらの生物学的活性断片あるいは生物学的活性誘導体の成長因子としての使用。

【請求項11】 骨髄および末梢血中における汎血球減少症および汎血球増多

症を治療する薬剤を製造するための、請求項1記載のポリペプチドまたは下記の
アミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ
含有するポリペプチドの使用、またはそれらの生物学的活性断片あるいは生物学
的活性誘導体の使用。

【請求項12】 骨髄および末梢血中における汎血球減少症および汎血球増多
症を治療する薬剤を製造するための、下記のヌクレオチド配列：

配列番号1記載の1番～1600番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の36番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の36番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の36番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の39番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の39番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の39番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の99番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の99番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；

配列番号1記載の99番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列を必ず1
つ含有するポリヌクレオチドの使用、またはそれらの断片あるいは誘導体の使用

。

【請求項13】 *ex vivo*または*in vitro*において内在性細胞
および/または株化細胞株を治療および/または増殖させるための、請求項1記
載のポリペプチドまたは下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；

配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有するポリペプチドの使用、またはそれらの生物学的活性断片あるいは生物学的活性誘導体の使用。

【請求項14】 細胞の成長を阻害するための、請求項1記載のポリペプチドまたは下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有するポリペプチドの使用、またはそれらの生物学的活性断片あるいは生物学的活性誘導体の使用。

【請求項15】 ポリペプチドが細胞増殖抑制剤として用いられることを特徴とする請求項14記載の使用。

【請求項16】 増殖性疾患を治療する薬剤を製造するための、請求項1記載のポリペプチドまたは下記のアミノ酸配列：

配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有するポリペプチドの使用、またはそれらの生物学的活性断片あるいは生物学的活性誘導体の使用。

【請求項17】 増殖性疾患が骨髄増殖性疾患、真性赤血球増加症、本態性血

小板血症、骨髓線維症、CML（慢性骨髄性白血病）、全ての白血病やリンパ腫および充実性腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする請求項16記載の使用。

【請求項18】 細胞の成長を阻害するための、下記のヌクレオチド配列：

配列番号1記載の1番～1600番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列を必ず1つ含有するポリヌクレオチドの使用、またはそれらの断片あるいは誘導体の使用。

【請求項19】 増殖性疾患を治療する薬剤を製造するための、下記のヌクレオチド配列：

配列番号1記載の1番～1600番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1238番の塩基配列によってコードされるヌクレオチド配列を必ず1つ含有するポリヌクレオチドの使用、またはそれらの断片ある

いは誘導体の使用。

【請求項20】 増殖性疾患が骨髄増殖性疾患、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、骨髄線維症、CML（慢性骨髄性白血病）、全ての白血病やリンパ腫および充実性腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする請求項19記載の使用。

【請求項21】 下記のヌクレオチド配列：

配列番号1記載の1番～1600番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の36番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の39番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1346番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1262番の塩基からなるヌクレオチド配列；
配列番号1記載の99番～1238番の塩基からなるヌクレオチド配列を必ず1つ含むポリヌクレオチド、あるいはその断片または誘導体を少なくとも1つ含有し、および/または請求項1記載のポリペプチドまたは下記のアミノ酸配列：
配列番号2記載の1番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の1番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～437番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～409番のアミノ酸からなるアミノ酸配列；
配列番号2記載の22番～401番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を必ず1つ含有するポリペプチド、またはそれらの生物学的活性断片が生物学的活性誘導体を少なくとも1つ含有し、および/または請求項3または4記載の抗体を少なくとも1つ含有することを特徴とする真性赤血球増加症または造血系の障害を検出するキット。

【請求項22】 キットが、ELISA試験キットであることを特徴とする請

求項21記載のPRV-1タンパク質を検出するためのキット。

【請求項23】 キットが半定量的あるいは定量的RT-PCR分析キットであることを特徴とするPRV-1mRNAを検出するための請求項21記載のキット。

【請求項24】 キットがノーザンブロットキットであることを特徴とするPRV-1mRNAを検出するための請求項21記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明はPRV-1遺伝子をコードするヌクレオチド配列、該ヌクレオチド配列を含む組み換えDNA、該組み換えDNAを含むベクター、およびこれらのベクターで形質転換した細胞に関するものであり、さらにPRV-1ポリペプチド、該ポリペプチドに対する抗体、該PRV-1ポリペプチドを検出するための方法および、PRV-1ポリペプチドあるいはPRV-1ポリペプチドを標的とする抗体を含有する薬剤に関する。

【0002】**(背景技術)**

真性赤血球増加症(真性多血症)(polycythemia rubra vera)は、polycythemia veraあるいはp.veraとも呼ばれ、赤血球系細胞、顆粒球細胞および巨大核細胞の形成が増加する悪性血液疾患である。この疾病はクローン化する過程に原因があり、造血前駆細胞の1つが変異する結果として生じる。ドイツでは、真性赤血球増加症の症例は住民100万人につき4~6人の割合で見られる。治療せず放置しておくと、18ヶ月以内に死に至る。瀉血や化学療法による治療を行った場合、平均生存期間は13年以上となる。

【0003】

真性赤血球増加症は、臨床学的な判定により診断が下される。臨床上的症状としては、3分の2の患者に頭痛、かゆみ、脾腫、3分の1の患者に出血、血栓症、高血圧がみられ、又、尿酸生成増加による痛風や敗血症性潰瘍を生じることもある。臨床検査上最も重要な所見としては、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、赤血球数および総赤血球量の増加が見られることであり、また多くの場合で、好中性顆粒球増多症または血小板増多症の増加が見られる。判定条件の大部分がかなり不明瞭である一方で、全ての患者がこれらの判定条件を満たすわけではないので、しばしば真性赤血球増加症と、例えば慢性顆粒球性白血病や本態性血小板増多症等の他の骨髄増殖性疾患と区別するのが困難であり、従って診断を確実にするのは難しい。現在まで、真性赤血球増加症の分子レベルでの原因は、全く

解明されていない。真性赤血球増加症は治療をしないと深刻な症状の進行をたどるため、正確な診断が大切である。

【0004】

(発明の開示)

本発明の目的は、それゆえ真性赤血球増加症の原因を分子レベルで見つけることであり、真性赤血球増加症の診断を可能にすることであった。

【0005】

この目的は、健康な対照被験者ではみられない、真性赤血球増加症と関連して特異的に発現される遺伝子を単離することによって達成された。該遺伝子はPRV - 1 (polycythemia rubra vera) 遺伝子と呼ばれる。

【0006】

類似のヌクレオチド配列が国際出願WO 98/50552に開示されている。

【0007】

発明の主要部分の1つとしては、PRV - 1 遺伝子をコードしており、かつ配列番号1を必ず含有するポリヌクレオチドに関するものである。本発明のポリヌクレオチドはシングルストランドのDNAあるいはダブルストランドのDNAであってもよいし、RNAであってもよい。本発明のポリヌクレオチドがRNAである場合、ヌクレオチド‘U’はヌクレオチド‘T’の代わりとなるということは当業者には明白である。‘ポリヌクレオチド’は15あるいはそれ以上のヌクレオチドを含む核酸を意味すると理解されている。

【0008】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明に係るヌクレオチド配列は図1に描写されている。本発明は、図1に示されている配列に相当するポリヌクレオチドに関するものであり、また少し異なるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにも関連するものである。本願明細書における、少し異なるヌクレオチド配列というのは、ほんの少し、好ましくは50以下、特に好ましくは25以下のヌクレオチドが置換されていてもよい配列を意味し、さらにこのように少し異なるヌクレオチド配列によってコードされ

る遺伝子の機能は影響されてないと理解されることとする。当業者には、アミノ酸をコードしている元のトリプレットは同じアミノ酸をコードする他のトリプレットで置換えてもよいという事実はよく知られている。これに加えて、ほとんど重要ではない領域は小さい範囲で、欠失および/または変異されていてもよい。特に好ましい態様では、ポリヌクレオチドは配列番号1記載の36番～1346番の塩基からなるヌクレオチド、すなわちPRV-1遺伝子をコードしている領域を含む。他の態様では、ポリヌクレオチドは配列番号1記載の36番～1262番あるいは36番～1238番の塩基からなるヌクレオチドを含む。この領域はおそらくPRV-1ポリペプチドの活性領域をコードしている。

結局、本発明におけるポリヌクレオチドは配列番号1記載の39番～1346番、39番～1262番あるいは39番～1238番の塩基からなるヌクレオチドを含んでもよいため、スタートするメチオニンをコードするコドンは存在しない。好ましい態様としては、配列番号1記載の99番～1346番、99番～1262番あるいは99番～1238番の塩基からなるヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが挙げられる。この結果、PRV-1ポリペプチドのシグナルペプチドをコードする5'末端のコドンは存在しない。

【0009】

本発明に係るポリヌクレオチドはPRV-1遺伝子の断片であってもよい。一般に、該断片は100を越えるヌクレオチドを有し、好ましくは300を越えるヌクレオチドを有する。該断片はプライマーやプローブとして、特にPCRに用いてもよい。この場合、該断片は目的に合わせて切断してもよい。通常、プライマーの長さは10～30ヌクレオチドであり、プローブは15～50ヌクレオチドである。

【0010】

PRV-1遺伝子は内在性遺伝子であり、健康な個体で発現する場合は数個の器官に限定して発現する。通常、該遺伝子は造血器官、すなわち骨髄や胎児の肝臓で主に発現し、脾臓においては弱い発現がみられるが、心臓、筋肉、膵臓あるいは肝臓では発現しない。真性赤血球増加症罹患患者では、この遺伝子は特に造血細胞で非常に強く、過剰に発現している。

【0011】

PRV-1遺伝子は図2で示されるタンパク質配列を表すタンパク質をコードしている。シグナルペプチドは全ての表面分子のタンパク質配列中に存在し、通常タンパク質が製造される際に取り除かれ、ハイフンによって分けられている。該タンパク質は配列番号2を有する。本発明の他の側面としては、従って(イ)配列番号2を有する本質的に純粋なポリペプチド、あるいは(ロ)配列番号2を有しているがシグナルペプチド(すなわち配列番号2記載の22番~437番のアミノ酸)を欠いているポリペプチドが挙げられる。他の態様としては、配列番号2記載の1番~409番、22番~409番、1番~401番あるいは22番~401番(おそらく該タンパク質の活性領域である)からなるアミノ酸を含むポリペプチドが挙げられる。

【0012】

生物学的活性に関しては、本発明に係るポリペプチドはグリコシル化されているのが好ましく、もっとも好ましくはN-グリコシル化されていることである。PRV-1ポリペプチドのアミノ酸Asn-46、Asn-189、およびAsn-382(アミノ酸の番号は配列番号2における番号に相当する)のうち少なくとも1つのアミノ酸でグリコシル化されていればよい。本発明はまた、N-グリコシル化された本発明に係るポリペプチドの断片も含んでいる。該断片はアミノ酸を50以上、好ましくは100以上、最も好ましくは150以上有するものが好ましい。他の態様としては、ポリペプチドがO-グリコシル化されているものが挙げられる。

【0013】

特定のアミノ酸を、タンパク質の生物学的活性を損なわない範囲で他のアミノ酸で置換してもよいことは、当業者には明らかである。そのような、本発明に係るポリペプチドを変異させたものも本発明の課題の一部を構成する(変異型)。アミノ酸の置換はタンパク質の生物学的活性に否定的な影響を与えるものであってはならない。当業者は置換するアミノ酸を選択する際、よく知られている法則を用いてよい。

【0014】

調製する方法によるが、P R V - 1 ポリペプチドは、例えばグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー (glycosylphosphatidylinositol anchor) を有していてもよい。グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーは配列番号2の407番~409番のアミノ酸に相当するアミノ酸に結合する。G P I (グリコシルホスファチジルイノシトール) アンカーは脂質を用いてタンパク質を細胞膜の外側に結合させるのに用いられる。結果的にはまだ説明されるに至っていないが、G P I とリンクしたタンパク質は培地中にしばしば放出される。これは 'シェディング (Shedding)' と呼ばれる。これまで、これは特別なプロセスであるのか否か、すなわちそのようなタンパク質は制御された方法で酵素によって膜から切り取られるのか、あるいはアンカーの非特異的な喪失を示しているのか否か明らかにされていない。P R V - 1 は、おそらく細胞膜上および細胞外の両方で見られる。膜に結合しない分泌型の方が、成長因子や成長阻害剤としてのポリペプチドの効果においておそらくより重要である。というのはこの形態は、成長因子として拡散して他の細胞に到達することができるためである。

【0015】

C末端のアミノ酸を処理することによって、タンパク質が細胞膜に結合するのに影響を与えることができるということは、当業者には明らかなことである。これは特にP R V - 1 ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの断片を発現することを目的とした、決められたDNAコンストラクトの調製に関する。これらのアミノ酸をコードしているコドンに変異させてもよいし、欠失させてもよい。

【0016】

該遺伝子はu P A R / L y 6 ファミリーの表面レセプターをコードしている。このレセプターファミリーは細胞分裂を促進させる分裂誘発性シグナルを変換することができる。従って、P R V - 1 遺伝子がとりわけ真性赤血球増加症患者の骨髄細胞上で過剰発現すると、これらの細胞は過剰増殖すると仮定される。

【0017】

P R V - 1 は健康な個体の顆粒白血球あるいは例えば慢性顆粒球性白血病、急性顆粒球性白血病、本態性血小板増多症または二次性赤血球増多症等の、他の骨髄増殖性疾患患者では発現しないことが分かっている。

【0018】

PRV-1遺伝子でコードされているポリペプチドを分析方法および検出方法に用いることができるようにするため、ポリペプチドを便宜上組み換えDNAから生成する。該組み換えDNAは、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列を含む組み換えDNA、あるいは少なくともPRV-1遺伝子のコーディング領域、つまり配列番号1の36番～1346番または少なくとも39番～1262番か39番～1238番からなるヌクレオチドを含む組み換えDNAで、機能的にプロモーターに結合している組み換えDNAである。しかしながら、組み換えDNAは配列番号1の断片のみを含有しているものでもよい。

【0019】

本発明はさらにPRV-1ポリペプチドまたはその断片の組み換えDNAを含有するベクターに関するものであり、また該ベクターでトランスフェクトまたは形質転換した宿主細胞に関するものである。宿主細胞は例えば大腸菌等のバクテリアなどの原核細胞でもよい。しかしながら、原核細胞で発現するポリペプチドはグリコシル化されない。従って、真核細胞が好ましく、真核細胞は発現したタンパク質を翻訳後にグリコシル化することができ、タンパク質を他の方法で修飾することができる。真核性宿主細胞の例としては、組み換えバキュロウイルスで感染させて発現させるのに用いられるSf9細胞等の昆虫細胞や、293細胞、COS細胞、CHO細胞やヒーラ(HeLa)細胞等の哺乳類の細胞が挙げられるが、これらの例に限定されることはない。宿主細胞として酵母細胞を用いることもできる。グリコシル化のパターンは宿主細胞によって異なってもよいことは当業者には明らかである。従って、発現産物の生物学的活性は変化してもよい。タンパク質の生物学的活性が保持されるような方法で発現産物をグリコシル化する宿主細胞を用いることが特に好ましい。

【0020】

本発明の他の側面としては、本発明に係るポリペプチドを調製するための方法に関する。この方法では、本発明のポリペプチドをコードするDNAは宿主細胞で発現する。続いて、発現したポリペプチドが宿主細胞によって培地に分泌されるか細胞内に保持されるかによって、培地または細胞を、ポリペプチド単離のた

めに選んで用いる。その後、本発明に係るポリペプチドを現在知られている方法、例えばクロマトグラフィー法を用いて濃縮および/または精製する。タンパク質を精製する方法は、例えばR・スコープス (Scopes) 著「タンパク質精製法 - 理論と実際 - (第3版)」(1994) シュプリンガーフェアラーク (Springer Verlag) 出版に述べられている。特に好ましい態様の1つとして、本発明に係る方法は、グリコシル化されたポリペプチドが濃縮され、および/または精製される工程を含んでいる。この工程は本発明に係るポリペプチドが本質的に精製される前であっても、すでに精製された後のどちらに行われてもよい。後者の場合、精製されたポリペプチドがグリコシル化された部分は分離され、単離される。この方法の最も好ましい態様としては、N-グリコシル化されたポリペプチドが特異的に単離されることである。この方法の他の態様としては、配列番号2のAsn-46、Asn-189およびAsn-382のアミノ酸のうち少なくとも1つがグリコシル化されているポリペプチドが単離されることである。

【0021】

顆粒白血球から単離されたPRV-1ポリペプチドまたは組換えて製造されたPRV-1ポリペプチドは真性赤血球増加症を診断および治療するために用いてもよい。

【0022】

治療法の可能性の1つとしては、‘アンチセンス治療法’が挙げられる。この方法は、‘アンチセンス’RNA分子、つまりPRV RNAに相補的なRNAを用いる方法である。PRV-1のRNAは配列5´-AAAAGCAGAAA GAGATTACCAGCC-3´(配列番号3)を開始部分に有するため、この配列に対する必要なアンチセンスRNAは下記のヌクレオチド配列：5´-GGCTGGTAATCTCTTTCTGCTTTT-3´(配列番号4)を有する。このアンチセンスRNAをベクターに組込み、真性赤血球増加症細胞に導入する。このRNAを例えばトランスフェクション法によって導入する。この形質転換に用いられるベクターは特異的に真性赤血球増加症細胞に導入されるように配置されているのが好ましい。アンチセンスRNAが発現することによりPRV-1 mRNAはポリペプチドに翻訳されなくなる。この方法で処理された細胞は

いかなるPRV-1タンパク質をも形成することができない。

【0023】

本発明は従って、PRV-1ポリペプチドまたはそのエピトープが検出され、またその発現の程度が決定されることにより特徴付けられる、真性赤血球増加症を検出するための方法に関するものでもある。

【0024】

例えば顆粒白血球等、骨髄以外の成熟細胞上でレセプターが過剰発現するということは、真性赤血球増加症が存在することを強く示唆している。この過剰発現は便宜上、PRV-1レセプターに対する抗体を用いた免疫測定法により検出される。適した試験方法としては、公知の免疫測定方法に手を加えたものがあげられ、PRV-1ポリペプチド特異的抗体を、固化されたあるいは液状の他の標識された抗体と合わせて利用したものが挙げられる。ラベリングは自体公知の方法により行われ、例えば放射性同位体を用いて蛍光法や発光法によってラベリングを行ったり、酵素を用いて染色反応によって行ったり、あるいは測定に適した他の方法を用いて行われる。これらの変形法は当業者に知られているため、ここではこれ以上の詳細な説明は必要ではない。本発明によると、ELISA法が特に好ましい。

【0025】

PRV-1レセプターを特異的に検出するために必要な抗体は自体公知の方法と同様の方法で調製される。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のどちらも適しているが、どちらかといえばモノクローナル抗体を用いるのが好ましい。

【0026】

タンパク質から得られるペプチドも抗体を調製するのに用いてもよい。本発明の内容に範囲内においては、以下の配列を有するペプチドを用いて成功した。

a) K V S D L P R Q W T P K N (34番~46番のアミノ酸) [配列番号5]および、

b) S A R E K R D V Q P P A S Q H (391番~405番のアミノ酸) [配列番号6]

【0027】

ポリクローナル抗体は、通常適切な宿主（ウサギ）をPRV-1ポリペプチドで免疫すると免疫学的支持体（アジュバント）に適切に結合し、免疫反応を誘発することにより製造される。モノクローナル抗体はハイブリドーマ技術を用いて自体公知の方法により生産することができる。抗体はアフィニティ精製により精製してもよい。抗体の調製および精製は例えば、ハーロウ（Harlow）およびレーン（Lane）著「抗体：研究室マニュアル」、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版等に記載されている。

【0028】

さらに、そのようなポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体はPRV-1を標的しており、真性赤血球増加症を治療するのに用いてもよい。

【0029】

他の態様としては、PRV-1レセプターはRT-PCR法を用いて検出してもよい。RT-PCR法を行うために、一般的には顆粒白血球であるPRV-1過剰発現細胞から、RNAをまず単離する。そして逆転写はRTプライマーを用いて自体公知の方法により行う。RTプライマーは下記のヌクレオチド配列（配列番号7）を有するプライマーであるのが好ましい。

配列番号7：

ATTAGGTTATGAGGTCAGAGGGAGGTT

【0030】

このようにして、特異的PRV-1RNAをDNAに変換する。このDNAを自体公知の方法でPCR法により増幅させる。下記の2つのプライマーを増幅サイクルに用いるのが好ましい。

センスプライマーとして（配列番号8）：

GCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGG

アンチセンスプライマーとして（配列番号9）：

GAATCGTGGGGGTAATAGAGTTAGCAGG

【0031】

当業者は他の適切なプライマーを見つけるために、開示されている配列を容易

に用いてよい。

【0032】

RNAを該方法の開始物質として用いるため、PCRシグナルはPRV-1遺伝子が発現している場合にのみポジティブである。上記で説明したように、これは患者が真性赤血球増加症に罹患しているときのみのことである。PRVは健康な個体の顆粒白血球では発現しない。従って、いかなるRT-PCRシグナルも存在しないということは、真性赤血球増加症に罹患していないことを示す。RT-PCR法の定量化はタクマン(TaqMan)(商標登録)テクノロジーのものを用いて行われるのが好ましい。この定量化にはプライマーに加えてプローブが必要となる。プローブの好ましい配列としては、5'-TTCTTGTTGAACCAACCCAGACAAATCGG-3'(配列番号10)が挙げられる。定量的RT-PCRはPRV-1転写産物を検出するのに用いられ、従って本発明の主要な一部を構成する。

【0033】

他の方法としては、プロット法、好ましくはノーザンプロット法を用いて真性赤血球増加症を診断することもできる。そのような方法では、RNAを顆粒白血球から単離し、プロット法、例えばノーザンプロット法を用いてPRV-1の発現を調べる。配列番号1のcDNA配列あるいは該配列の断片もプローブとして用いることができる。ハイブリダイゼーションは顆粒白血球を真性赤血球増加症罹患患者からえたときのみ起こる。というのは、罹患患者の顆粒白血球上でのみ発現しているためである。ハイブリダイゼーションが起こらないということは、その個体から得られた顆粒白血球が、真性赤血球増加症に罹患していないことを示唆している。

【0034】

該遺伝子の断片をノーザンプロットハイブリダイゼーションに用いることもできる。そのような断片は通常100を越える、好ましくは300を越える塩基を有している。代わりに、様々な異なった遺伝子断片をノーザンプロット法のプローブとして用いることができ、制限酵素を用いて遺伝子を切断することにより調製することができる。断片がcDNA由来のものである場合、該断片はダブルス

トランドで存在するため、シングルストランドに分離されてハイブリダイゼーションに供される。適切な断片の例としては、420塩基対～831塩基対のBamHI - PstI断片や831塩基対～1900塩基対のPstI - PstI断片が挙げられる。

【0035】

PRV-1 mRNAつまり、PRV-1の発現はまず第1にRT-PCR反応においてmRNAを逆転写し、次にcDNAを増幅することにより検出されてもよい。増幅されたDNAはハイブリダイゼーションのプロープで検出される。

【0036】

陽性であると診断された場合、疾病は治療されなければならず、そうでなければ比較的短い期間で死に至る。治療には、PRV-1を標的とする、細胞毒性成分が適切な部位に結合する特異的な抗体を用いることができる。

【0037】

本発明は、従ってさらに通常の賦形剤に加えて、PRV-1レセプターを標的とする抗体を含む薬剤に関する。

【0038】

PRV-1レセプターは真性赤血球増加症において過剰発現するため、多くの抗体は抗PRV-1抗体と接触した場合に罹患顆粒白血球の表面に結合する。多くの抗体がこれらの細胞に結合すると、免疫学的細胞によるこれらの顆粒白血球の破壊が促進される。このようにして、真性赤血球増加症細胞を特異的に排除することができる。

【0039】

驚くべきことに、PRV-1ポリペプチドは造血性活性を発揮することが分かっている。PRV-1ポリペプチドは特定の造血前駆細胞を促進させて赤血球系のコロニーを形成することができる。とりわけこの機能を示すのはN-グリコシル化されたPRV-1ポリペプチドである。本発明に係るポリペプチドの好ましい例としては、N-グリコシル化されたPRV-1ポリペプチドやその断片であり、これらは成長因子活性を示す。

【0040】

本発明の他の側面としては、従って、薬理的に許容しうる賦形剤に加えてPRV-1ポリペプチドあるいはその生物学的活性断片を含有する薬剤が挙げられる。PRV-1ポリペプチドは好ましくはグリコシル化されたPRV-1ポリペプチドであり、さらに好ましくはN-グリコシル化されたPRV-1ポリペプチドあるいはその生物学的活性断片である。本発明は本発明に係るポリヌクレオチドを少なくとも1つ含有する薬剤にも関する。

【0041】

本発明はさらに、PRV-1ポリペプチド、あるいはその生物学的活性断片や生物学的活性変異体の、*in vivo*または*ex vivo*での成長因子としての使用に関する。PRV-1ポリペプチド、あるいはその生物学的活性断片またはその生物学的活性変異体は、骨髄および末梢血中のすべての汎血球減少症および汎血球増多症（汎血球異常症、末梢血液および骨髄の細胞内成分の変化）を治療するために用いてもよい。本発明のポリペプチドは、例えば腎不全、化学療法または全身放射線照射（whole body radiation）の場合の貧血を治療するのに用いたり、化学療法や全身放射線照射中の好中球減少症や血小板減少症を治療するのに用いてもよい。また本発明のポリペプチドは、末梢幹細胞や骨髄幹細胞を体外で治療するのに用いてよく、これらの細胞は拡大（増幅）され、患者に戻される。さらに本発明のポリペプチドは敗血症、全身性炎症反応症候群（SIRS）や局所的炎症反応を治療するのに用いてもよい。本発明のポリペプチドまたはそれらを含む薬剤は様々な方法で投与してもよい。投与形態としては、静脈注射、筋肉注射、皮下注射、腹腔内注射、経口投与、経皮投与および経粘膜投与等が挙げられる。

【0042】

本発明に係るポリヌクレオチドは汎血球減少症や汎血球増多症（汎血球異常症）を治療するのに用いてもよい。この場合、目的としては、PRV-1ポリペプチドまたはその機能的断片を罹患患者の細胞内で発現させることである。この関係では遺伝子治療法がまず第1に用いられる。細胞は患者から単離され、本発明に係るポリヌクレオチドでトランスフェクトされてもよい（体外操作）。そしてその細胞はその後患者の体内に戻される。また、本発明に係るポリヌクレオチド

がウイルスの媒介により標的細胞に接触する方法を用いてもよい。挿入された核酸が発現すると造血性活性が引き起こされる。

【0043】

驚くべきことに、高濃度ではPRV-1ポリペプチドは細胞の成長を阻害する作用を有することも分かった。従って、例えばPRV-1タンパク質の量を増加させると、赤血球系のコロニーおよび顆粒白血球性/単核球性コロニーの形成を実質的に完全に停止させることが観察された。この効果は、とりわけ慢性骨髄性白血病(CML)および真性赤血球増加症を治療する際に用いられるインターフェロン- γ の活性に似ている。このような内在性阻害物質は、例えばヒドロキシウレア等のインターフェロン- γ がまだ得られていなかった頃に用いられており、現在もまだいくらか使用されている化学的細胞増殖抑制剤と比較すると優れた効果を有している。インターフェロン- γ の欠点は、非常に深刻な副作用があることである。患者は重篤なインフルエンザにかかっているように感じる。本発明は造血阻害物質を利用できるようにするものであり、その阻害活性は濃度依存的である。

【0044】

本発明の他の側面としては、従って本明細書中で述べられているように、細胞成長を阻害するためのPRV-1ポリペプチドの使用が挙げられ、特に細胞増殖抑制剤としての使用が挙げられる。好ましくは造血細胞の成長阻害に用いられるポリペプチドが挙げられる。本発明は、増殖性疾患を治療する薬剤を製造するための、本発明に係るポリペプチドの使用に関するものである。これらの疾患としては、特に骨髄増殖性疾患、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、骨髄線維症、CML(慢性骨髄性白血病)および全ての白血病やリンパ腫および充実性腫瘍が挙げられる。

【0045】

本発明の他の側面としては、本明細書中に述べられているように、細胞成長を阻害するためのポリヌクレオチドの使用、その生物学的活性断片や生物学的活性変異体の使用が挙げられる。ポリヌクレオチドを適切なベクターに組み込み、適切な標的細胞に形質移入してもよい。PRV-1ポリペプチドまたはその生物学的

活性断片あるいはその生物学的活性変異体は適切な濃度において発現され、成長阻害作用が作動する。同様に、ポリヌクレオチドをウイルスベクターに組み込み、その後適切な標的細胞にウイルスを用いて感染させると、PRV-1が発現する。本発明は、例えば骨髄増殖性疾患、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、骨髄線維症、CML（慢性骨髄性白血病）および全ての白血病やリンパ腫および充実性腫瘍などの、増殖性疾患を治療する薬剤を製造するために、本出願に係るポリヌクレオチドを使用することにも関連している。

【0046】

本発明はまた真性赤血球増加症または造血系疾患を検出するためのキットに関する。これらのキットは本発明に係るポリヌクレオチドおよび/または本発明に係るポリペプチドおよび/または本発明に係る1以上の抗体を含むものである。これに加えて、該キットは容器や検出反応を行うのに適した組成物を含んでいてもよい。そのような組成物の例としては、緩衝液、ブロッキングメンブレン用の薬品、ハイブリダイゼーション溶液、二次抗体、検出反应用の基質溶液等が挙げられる。該キットは好ましくはPCR反応、RT-PCR、ノーザンブロット、サザンブロット、ウエスタンブロットおよびELISA、RIAまたはこれらの類似反応を行うのに用いられる。

【0047】

【実施例】

下記の実施例は以上の説明のために行われた。

〔実施例1〕PRV遺伝子の特徴付け

下記の実験はPRV遺伝子の特徴付けるために行われた：

- 下記の手順は顆粒白血球を貯蔵血液または瀉血により得た真性赤血球増加症患者の血液から単離するために用いられた。：
- 等量（v/v）の3%デキストランを含む0.9%NaCl溶液を血液に添加し、混合液を20分間室温（RT）に放置した。
- 混合液は2層に分離した。明るい色の上層を取り除き、室温で1800gにて10分間遠心分離した。
- 上清を捨て、細胞ペレットを同じ量（体積）の0.9%NaCl溶液で再懸濁

した。

- 細胞を含むNaCl溶液を35mlずつフィコール・ハイパック (Ficoll-Hypaque) 15mlに層状に重ねた。
- フィコール・ハイパック上の細胞を室温で1800g 60分間停止させずに遠心分離を行った。
- 細胞ペレットと中間層のある2つの層が形成された。
- 2層および中間層を吸引して取り除き、細胞ペレットを30秒間氷冷した0.2%NaCl 10mlで再懸濁し、30秒後に1.6%氷冷したNaClを10ml素早く加えた。
- 細胞を室温で1800g 10分間遠心分離した。
- 細胞をPBS 10mlで1回洗浄し、遠心分離した。
- 細胞ペレットは純粋な顆粒白血球を95~99%含んでいた。
- RNAを通常の方法を用いてこれらの細胞から単離した。
- このRNA 10mgを用いてノーザンブロット法でPRV-1の発現について調べた。配列番号1に示されている全cDNA配列をプローブとして用いた。

【0048】

この実験は39人の真性赤血球増加症患者と対照試料として29個の貯蔵血液を用いて行われた。PRV-1プローブは真性赤血球増加症患者において強くハイブリダイズしていることが認められた。健康な対照試料ではハイブリダイズは認められなかった。

【0049】

〔実施例2〕PRV-1は成長因子活性を有する

胎児を妊娠13.5日の妊娠マウスから取り出し、胎児の肝臓を取り出した。肝臓に含まれている細胞を抗体で染色し、特定の細胞について濃縮し、カラムクロマトグラフィーを用いて他の細胞型を取り除いた。これにより特定の造血前駆細胞(CFU-E (colony forming units-erythroid))が濃縮された細胞混合物が得られた。従って、胎児の肝臓では合計約2%がCFU-Eで構成されているだけであるが、濃縮細胞では30~40%がCFU-Eであった。

【0050】

これらのCFU-Eをレトロウイルスを用いてトランスフェクトした。これを行うため、293-Tと呼ばれるパッケージング細胞株を、前もって48時間トランスフェクトした。293-T細胞は確立されたヒト胎児腎臓の細胞株である。293-T細胞にレトロウイルス由来のいくつかの遺伝子を安定させて導入した。これらの293-T細胞に2つのプラスミド、pOSおよびpKATを導入すると、293-T細胞はマウスの胎児肝臓細胞に感染可能なレトロウイルスを生産する。293-T細胞に空のpOSベクターとpKATを導入すると、レトロウイルスタンパク質のみを発現する野生型のレトロウイルスが生産される。一方、例えばPRV-1等のヒト遺伝子をpOSベクターに組み込みクローニングすると、細胞に感染した際にこのタンパク質を発現するレトロウイルスを生産する。293-T細胞はレトロウイルスを細胞培地に分泌する。

【0051】

2日後、レトロウイルスを含む293-Tトランスフェクト細胞から得られた細胞培地を回収し、0.45 µmフィルターで1回濾過した。胎児肝臓細胞をトランスフェクトするために、これらの細胞に濾過した細胞培地を混ぜた。細胞培地はレトロウイルスを含んでおり、この混合物をポリブレンの存在下で201800 rpmで2時間遠心分離した。トランスフェクトされた胎児肝臓細胞を培地（メトカルト（Methocult）、セルシステム社製）で生育させた。培地は通常の塩およびアミノ酸、仔牛血清に加えてエリスロポエチン（EPO）を0.0001~0.4 IU/mlおよびメチルセルロース（0.8%）を含有したものであった。

CFU-Eは造血コロニーを形成するのにEPOを必要とする。メチルセルロースは培地を凝固させてゼリー状にし、このゼリー状培地に固定された個々の細胞を、液体培地内にあるのとは対照的に動かないよう固定することができる。従って、造血コロニーが単一細胞から形成されるか、あるいは形成されないかを観察することができる。CFU-Eは赤血球系コロニー、すなわち赤血球細胞およびその前駆細胞を含有するコロニーを形成する。

【0052】

3日後、成長した造血コロニーの数を数える。様々な混合物を比較する。混合

物は1つの実験につき全てを調べることはできないが、混合物1～3は非常に似た対照試料であるため、それぞれを混合物4と個別に比較してもよい。

【0053】

混合物1：レトロウイルスでトランスフェクトされなかった細胞、

混合物2：空pOSベクターでトランスフェクトされた細胞、

混合物3：造血系活性のない‘緑色蛍光タンパク質’（GFP）でトランスフェクトされた細胞、

混合物4：pOS-PRV-1（ベクター+本発明に係る遺伝子）でトランスフェクトされた細胞。

【0054】

表1は上述したように行われた3つの実験から得られた結果を示したものである。各項目の数値はコロニーの数を示している。

【0055】

【表1】

	混合物1	混合物2	混合物3	混合物4
	非形質転換	空のベクター (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
実験1	116	156	80	326
実験2		271	273	410
実験3	120		131	291

【0056】

この実験により、PRV-1でトランスフェクトされたCFU-Eは、コントロールである様々なCFU-Eを形成するよりも非常に多くのコロニー（約3倍）を形成することを示している。これらの結果からPRV-1はCFU-Eの成長因子であることが分かる。

【0057】

〔実施例3〕PRV-1成長因子の溶解性

PRV-1が溶解性成長因子であるか否か、また細胞と細胞の接触が必要であるか否かを調べるためにさらに実験を行った。pOSおよびpKATベクターでトランスフェクトされた後にパッケージング細胞株293-Tにより製造されるのはレトロウイルスだけではない。加えて293-T細胞はpOSでクローン化された遺伝子、すなわち本発明ではPRV-1遺伝子、でコードされるタンパク質も合成する。遺伝子産物が溶解性タンパク質である場合には293-Tパッケージング細胞周囲の培地に分泌される。293-T細胞がpKAT無しでpOSベクターのみでトランスフェクトされる場合、レトロウイルスは形成されない。細胞培地は細胞によって製造される溶解性タンパク質しか含有しない。pOS-PRV-1トランスフェクト細胞由来で、いかなるレトロウイルスをも含有していない培地をCFU-Eと混合し、全てをメチルセルロース培地に置床し、形成されたコロニーを数える。下記の結果が得られた。

【0058】

表2はPRV-1の溶解性を示す。各項目の数値はコロニーの数を示す。

【0059】

【表2】

	混合物1	混合物2	混合物3	混合物4
	非形質転換	空のベクター (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
実験4		137	187	557

【0060】

この実験でも、PRV-1含有培地で処理したCFU-Eはコントロールの細胞と比べて非常に多くの造血コロニーを形成した。PRV-1は溶解性成長因子であることが、この結果から結論づけられる。

【0061】

〔実施例4〕PRV-1は阻害効果および細胞増殖抑制効果をも有する。

この実験は、末梢血液細胞を用いて行った。少数の前駆細胞が健康な人間の末

梢血液内を循環するため、適切な培地（メチルセルロース）で末梢血管細胞由来の造血コロニーを培養することができる。末梢静脈血40mlを健康なドナーから採血した（抗凝血剤としてヘパリンまたはEDTAをまず導入しておく）。フィコール/ハイパック15mlを血液に添加し、混合物を1600rpm40分で連続して遠心分離した。これにより血液を細胞内成分に細分化する密度勾配が形成された。遠心分離後、単核細胞とよばれるもので、幹細胞を含有するものが血清とフィコールの間の中間層に見られる。この中間層は除去され、PBS（等張塩溶液）で洗浄された。これにより精製された単核細胞が得られ、そのうち約0.1%が造血系幹細胞であった。

【0062】

単核細胞を3%濃度のFCS（仔牛血清）を加えた特にリッチな培地（IMDM）に移した。この3%FCS/IMDM培地に次にPRV-1を加えたものと加えないものを用意した。

【0063】

IMDM中の単核細胞を 7×10^5 細胞/mlの密度で市販の培地に添加した。該培地はステムセルテクノロジー（メトカルト（Methocult））から購入されたものであり、IMDMおよび30%FCS、1%BSA（牛血清抗体）、メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、EPO（エリスロポエチン）3IU/mlおよび1.0%メチルセルロースを含有していた。細胞を該培地で14日間培養した。この混合物中に存在している少数の肝細胞が、造血コロニーに成長する。通常100~200の造血コロニーが、用いた 7×10^5 細胞ごとに成長する。

【0064】

PRV-1を非常に多く発現する細胞株も構築された。これらの細胞によって生産されるPRV-1は変化しているのでリン脂質アンカーを有さない。従って、このPRV-1発現産物は配列番号2の1~401番のアミノ酸からなっており、402~437番のアミノ酸は失われている。この変化したPRV-1は、野生型PRV-1のようにリン脂質アンカーによって細胞膜には組込まれないが、その代わりに完全に細胞から分泌される。実施例3のように、293の細胞から

なる細胞株はいかなるレトロウイルスも生産しないが、タンパク質（PRV-1）は発現する。

【0065】

造血コロニーアッセイをするために、単核血液細胞を、非トランスフェクト細胞（293）と共に48時間インキュベートしたIMDM培地に移すか、または変化させたPRV-1（293-GPI-less-PRV-1）を発現する細胞と共に48時間インキュベートした培地に移した。これらの細胞の造血コロニー形成能を調べた。赤血球系血液細胞（赤）および骨髄性血液細胞（白）のコロニー数を14日後に測定した。実験を3回繰り返し、異なった日に別のドナーの血液を用いて行った。実験は反覆して実施し、評価された。下記の結果が得られた。

【0066】

【表3】

細胞上清	ドナー1		ドナー2	
	赤色コロニー	白色コロニー	赤色コロニー	白色コロニー
293	248/221	70/114	127/161	25/66
293-GPI-less -PRV-1	7/3	0/0	31/19	0/0

【0067】

【表4】

細胞上清	ドナー1		ドナー2	
	赤色コロニー	白色コロニー	赤色コロニー	白色コロニー
293	99/91	20/19	49/33	8/1
293-GPI-less -PRV-1	0/0	0/0	0/0	0/0

【0068】

【表5】

細胞上清	ドナー1		ドナー2	
	赤色コロニー	白色コロニー	赤色コロニー	白色コロニー
293	107/207	22/30	24/32	5/8
293-GPI-less -PRV-1	4/3	0/6	0/1	3/0

【0069】

このデータから、実施例3で用いられたものよりも高い濃度のPRV-1が細胞成長阻止効果を有することがわかる。

【0070】

〔実施例5〕成長因子PRV-1はN-グリコシル化されている。

顆粒白血球を真性赤血球増加症罹患患者から単離し、タンパク質抽出物を標準的な方法でこれらの細胞から調製した。これらのタンパク質抽出物をベーリンガー・マンハイム社の‘N-グリコシダーゼF脱グリコシル化キット’についてのプロトコールに従って処理した。詳しくは、‘変性用緩衝液’をタンパク質抽出物に加え、混合物を95℃3分間加熱し、‘反応用緩衝液’またはN-グリコシダーゼを加えた‘反応用緩衝液’を用いて処理した。各混合物を37℃で一晩インキュベートし、タンパク質をPAGEゲル電気泳動で分析し、次にウエスタンブロット分析を行った。PRV-1タンパク質は配列番号5のアミノ酸配列を有するタンパク質を標的する抗体で検出した。顆粒白血球から精製されたPRV-1タンパク質は60~65kDaのサイズであるが、N-グリコシダーゼで切断された後にはたった40kDaの大きさでしかないことが示された。このことは、PRV-1はアスパラギン残基(アスパラギン=N)がグリコシル化されていることを明らかに証明している。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Freiburg

<120> Das Gen PRV-1 und dessen Verwendung

<130> E980930

<140>

<141>

<150> DE 199 47 010.3

<151> 1999-09-30

<160> 10

<170> PADAT Sequenzmodul, Version 1.0

<210> 1
 <211> 1600
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <223>

<400> 1

aaaagcagaa agagattacc agccacagac gggatcatgag cgcggtatta ctgctggccc	60
tcctgggggtt catcctccca ctgccaggag tgcagggcgt gctctgccag tttgggacag	120
ttcagcatgt gtggaagggtg tccgacctgc cccggcaatg gacccctaag aacaccagct	180
gcgacagcgg ctggggggtgc caggacacgt tgatgctcat tgagagcggg cccaagtga	240
gcctgggtgt ctccaagggc tgcacggagg ccaaggacca ggagccccgc gtcactgagc	300
accggatggg ccccggcctc tcctgatct cctacacctt cgtgtgccgc caggaggact	360
tctgcaaaa cctcgttaac tccctccgc tttgggcccc acagcccca gcagaccag	420
gatccttgag gtgcccagtc tgcttgtcta tggaaggctg tctggagggg acaacagaag	480
agatctgccc caaggggacc acacaetggt atgatggcct cctcaggctc aggggaggag	540
gcatcttctc caatctgaga gtccagggat gcatgcccc a gccaggttgc aacctgtca	600
atgggacaca ggaaattggg cccgtgggta tgactgagaa ctgcaatagg aaagattttc	660
tgacctgtca tggggggacc accattatga cacacggaaa cttggctcaa gaaccactg	720
attggaccac atcgaatacc gagatgtgag aggtggggca ggtgtgtcag gagacgctgc	780
tgctcataga ttaggactc acatcaacce tggtaggggac aaaaggctgc agcactgttg	840
gggtcaaaa ttcccagaag accaccatcc actcagcccc tcctgggggtg cttgtggcct	900
cctataccca cttctgtctc tggacctgt gcaatagtgc cagcagcagc agcgttctgc	960
tgaactccct ccctcctcaa gctgcccctg tcccaggaga ccggcagtgt cctacctgtg	1020
tgcagcccct tggaacctgt tcaagtggct cccccgaat gacctgcccc aggggcgcca	1080
ctcattgtta tgatgggtac attcatctct caggaggtgg gctgtccacc aaaatgagca	1140
ttcagggctg cgtggcccaa ccttccagct tcttgtttaa ccacaccaga caaatcggga	1200
tcttctctgc gcgtgagaag cgtgatgtgc agcctcctgc ctctcagcat gagggaggtg	1260
gggctgaggg cctggagtct ctcacttggg gggtaggggt ggcaactggc ccagcgtgt	1320

ggtggggagt ggtttgcctt tctgtatac tctattacc ccacgattct tcaccgctgc 1380
 tgaccacca cactcaacct cctctgacc tcataacct atggccttgg acaccagatt 1440
 ctttccatt ctgtccatga atcatcttcc ccacacacaa tcattcatat ctactcaact 1500
 aacagcaaca ctggggagag cctggagcat ccggacttgc cctatgggag aggggacgct 1560
 ggaggagtgg ctgcatgtat ctgataatac agaccctgtc 1600

<210> 2

<211> 437

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

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

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> antisense-Primer

<400> 9

gaatcgtggg ggtaatagag ttagcagg

28

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> probe

<400> 10

ttcttggtga accacaccag acaaatcgg

29

【図面の簡単な説明】

【図1】は、PRV-1遺伝子をコードするヌクレオチド配列を示している

。

【図2】は、PRV-1遺伝子によってコードされているタンパク質のアミノ酸配列を示している。

【図1】

AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCATGAGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCC
 TGGGGTTCATCTCCACTGCCAGGAGTGCAGGCCTGCTCTGCCAGTTTGGGACAGTTCAGC
 ATGTGTGGAAGGTGTCCGACCTGCCCCGGAATGGACCCCTAAGAACCAGCTGCGACAGCG
 GCTTGGGGTGCCAGGACACGTTGATGCTCATTGAGAGCGGACCCCAAGTGAGCCTGGTGTCT
 CCAAGGGCTGCACGGAGGCCAAGGACCAGGAGCCCCGCGTCACTGAGCACCGGATGGGCCCCG
 GCCTCTCCCTGATCTCCTACACCTTCGTGTGCCGCCAGGAGGACTTCTGCAACAACCTCGTTA
 ACTCCCTCCCGCTTTGGGCCCCACAGCCCCAGCAGACCCAGGATCCTTGAGGTGCCAGTCT
 GCTTGTCTATGGAAGGCTGTCTGGAGGGGACAACAGAAGAGATCTGCCCCAAGGGGACCACAC
 ACTGTTATGATGGCCTCCTCAGGCTCAGGGGAGGAGGCATCTTCTCCAATCTGAGAGTCCAGG
 GATGCATGCCCCAGCCAGGTTGCAACCTGCTCAATGGGACACAGGAAATTGGGCCCGTGGGTA
 TGACTGAGAACTGCAATAGGAAAGATTTCTGACCTGTATCGGGGGACCACCATATGACAC
 ACGGAAACTTGGCTCAAGAACCCTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGG
 GGCAGGTGTGTCAGGAGACGCTGCTGCTCATAGATGTAGGACTCACATCAACCCTGGTGGGGA
 CAAAAGGCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCACAGAAGACCACCATCCACTCAGCCCTC
 CTGGGGTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTGCCAGCA
 GCAGCAGCGTTCTGCTGAACCTCCCTCCCTCAAGCTGCCCTGTCCAGGAGACCGGCAGT
 GTCCTACCTGTGTGCAGCCCCCTGGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCGAATGACCTGCCCA
 GGGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTGGGCTGTCCACCAAAA
 TGAGCATTCAGGGCTGCGTGGCCCAACCTTCCAGCTTCTTGTGAACCACACCAGACAAATCG
 GGATCTTCTCTGCGCGTGAGAAGCGTGATGTGCAGCCTCCTGCCTCTCAGCATGAGGGAGGTG
 GGGCTGAGGGCTGGAGTCTCTCACTTGGGGGGTGGGGCTGGCACTGGCCCCAGCGCTGTGGT
 GGGAGTGGTTTGGCCCTCCTGCTAACTCTATTACCCCCACGATTCCTCACCGCTGCTGACCA
 CCCACACTCAACCTCCCTCTGACCTATAACCTAATGGCCTTGGACACCAGATTCTTTCCCAT
 TCTGTCCATGAATCATCTCCCCACACACAATCATTATCTACTCACCTAACAGCAACACT
 GGGGAGAGCCTGGAGCATCCGGACTTGCCCTATGGGAGAGGGGACGCTGGAGGAGTGGCTGCA
 TGTATCTGATAATACAGACCCTGTC

【図2】

MSAVLLLALLGFILPLPGVQA---LLCQFGTVQHVWVSDLPRQWTPKNTSCD
 SGLGCQDTLMLIESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPLSLISY
 TFVCRQEDFCNNLVNSLPLWAPQPPADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEI
 CPKGTTHCYDGLLRRLRGGGIFSNLRVQGCMPQPGCNLLNGTQEIGPVGMT
 ENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGNLAQEPTDWTTSNTEMCEVGQVCQETLLL
 IDVGLTSTLVGTKGCSTVGAQNSQKTTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLN
 SASSSSVLLNSLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLGTCSSGSPRMTCPRGATH
 CYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGCVAQPSSFLLNHTRQIGIFSAREKRDVQP
 PASQHEGGGAEGLESLTWGVGLALAPALWVGVCPCSC

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int. National Application No. PCT/EP 00/09594
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C12N15/11 G01N33/577 C12Q1/68	C07K14/475 C07K16/22 A61K31/713 A61K38/18
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 G01N C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TEMERINAC S ET AL: "CLONING OF PRV-1, A NOVEL MEMBER OF THE UPAR RECEPTOR SUPERFAMILY WHICH IS OVEREXPRESSED IN POLYCYTHEMIA VERA" BLOOD,US,W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, vol. 92, no. 10, SUPPL. 01, 15 November 1998 (1998-11-15), pages 426A-Abstr1760, XP000867771 ISSN: 0006-4971 abstract ---	1-9, 13, 21-24
X	WO 98 50552 A (ZYMOGENETICS INC) 12 November 1998 (1998-11-12) cited in the application page 81 -page 84; claim 16 ---	1-9
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 February 2001		Date of mailing of the international search report 23/02/2001
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) 340-3016		Authorized officer Blanco Urgoiti, B

6

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/09594

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X, L	WO 00 24886 A (PAHL HEIKE ;UNIVERSITAETSKLINIKUM FREIBURG (DE)) 4 May 2000 (2000-05-04) the whole document (L: Prioritet)	1-13, 21-24
P,X	WO 99 63088 A (BAKER KEVIN ;CHEN JIAN (US); GENENTECH INC (US); YUAN JEAN (US); G) 9 December 1999 (1999-12-09) figures 249,250	1-4,8,9
P,X	WO 00 36102 A (FERRARA NAPOLEONE ;STEWART TIMOTHY A (US); DESNOYERS LUC (US); GAO) 22 June 2000 (2000-06-22) claim 2; figure 10	1-4,8,9
P,X	TEMERINAC SNEZANA ET AL: "Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera." BLOOD, vol. 95, no. 8, 15 April 2000 (2000-04-15), pages 2569-2576, XP002159981 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-9,13, 21-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/09594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850552 A	12-11-1998	AU 7480198 A	27-11-1998
		EP 0991757 A	12-04-2000
WO 0024886 A	04-05-2000	DE 19849044 A	27-04-2000
		AU 6088399 A	15-05-2000
WO 9963088 A	09-12-1999	AU 4328699 A	20-12-1999
		AU 2212299 A	26-07-1999
		WO 9935170 A	15-07-1999
WO 0036102 A	22-06-2000	AU 1932000 A	03-07-2000
		AU 1748200 A	19-06-2000
		AU 2192800 A	12-07-2000
		AU 2495200 A	28-09-2000
		AU 2600800 A	28-09-2000
		AU 3381600 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		AU 4328699 A	20-12-1999
		WO 0053753 A	14-09-2000
		WO 0053755 A	14-09-2000
		WO 0075327 A	14-12-2000
		WO 0053757 A	14-09-2000
		WO 0053758 A	14-09-2000
		WO 0073454 A	07-12-2000
		WO 0073445 A	07-12-2000
		WO 0073348 A	07-12-2000
WO 0073452 A	07-12-2000		
WO 0032221 A	08-06-2000		
WO 0037640 A	29-06-2000		
WO 0075316 A	14-12-2000		

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04
DA02 DA03 EA04 GA01 GA11
HA01 HA03 HA12 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ01 QQ42 QQ52
QR08 QR42 QR55 QR62 QR82
QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22
BA23 BA34 CA18 CA34 CA53
DB52 MA01 NA14 ZA081
ZA421 ZA511 ZA512 ZA531
ZA541 ZA551 ZA661 ZA891
ZA961 ZB261 ZB271 ZB351
ZC011 ZC311
4C085 AA13 AA14 BB11 CC03 CC12
DD62
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA00 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	PRV-1基因及其用途		
公开(公告)号	JP2003510077A	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001526936	申请日	2000-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	海胆威赛施她忒诊所琴弗赖堡		
申请(专利权)人(译)	海胆威赛施她忒诊所琴弗赖堡		
[标]发明人	パールハイケ		
发明人	パール・ハイケ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/10 A61P9/12 A61P17/04 A61P19/06 A61P25/04 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/575 C07K16/18 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P17/04 A61P19/06 A61P25/04 C07K14/575		
FI分类号	A61K39/395.N A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/10 A61P9/12 A61P17/04 A61P19/06 A61P25/04 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA34 4C084/CA18 4C084/CA34 4C084/CA53 4C084/DB52 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZA421 4C084/ZA511 4C084/ZA512 4C084/ZA531 4C084/ZA541 4C084/ZA551 4C084/ZA661 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB351 4C084/ZC011 4C084/ZC311 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC12 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	19947010 1999-09-30 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

该说明书描述了编码PRV-1蛋白并且必须包含SEQ ID NO : 1的核苷酸序列，并且进一步描述了用于检测该基因的方法，即该基因和该基因编码的mRNA。还描述了检测编码的多肽的方法。

	混合物1	混合物2	混合物3	混合物4
	非形質転換	空のベクター (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
実験1	116	156	80	326
実験2		271	273	410
実験3	120		131	291