

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-196

(P2004-196A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 9/12	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 請求項の数 17 O L	(全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-110822 (P2003-110822)	(71) 出願人	597173680
(22) 出願日	平成15年4月15日 (2003.4.15)		スミスクライン ビーチャム コーポレーション
(62) 分割の表示	特願平10-236037の分割		アメリカ合衆国 19103 ペンシルベニア州、フィラデルフィア、ワン フランクリン プラザ (番地なし)
原出願日	平成10年8月21日 (1998.8.21)		
(31) 優先権主張番号	60/056480	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成9年8月21日 (1997.8.21)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	09/111727		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成10年7月8日 (1998.7.8)	(74) 代理人	100107168
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安田 徹夫

(特許庁注：以下のものは登録商標)
Windows

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A S P 5

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 A S P 5 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを提供する。

【解決手段】 特定の配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる A S P 5 ポリペプチド、および別の特定の配列のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる A S P 5 ポリヌクレオチドを得る。

【効果】 A S P 5 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは高血圧、喘息を含む機能障害または疾病の治療と、このような疾病の診断アッセイに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (i) ~ (iii) から選択される単離されたポリペプチド：

(i) 配列番号 2 の全長にわたる配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、

(ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、および

(iii) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 2】

以下の (i) ~ (vi) から選択される単離されたポリヌクレオチド、またはそのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド：

(i) 配列番号 2 の全長にわたる配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、その全長にわたって、少なくとも 70% の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(iii) 配列番号 1 の全長にわたる配列番号 1 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 70% の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(iv) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、および

(vi) 適当なライブラリーを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1 のヌクレオチド配列またはその断片をもつ標識プローブでスクリーニングすることにより得られるポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体。

【請求項 4】

以下の (i) または (ii) の医薬組成物：

(i) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性または発現を増強する必要がある被験者を治療するための医薬組成物であって、

該ポリペプチド活性の *in vivo* 産生をもたらす形態の、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、を含有する医薬組成物；または

(ii) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある被験者を治療するための医薬組成物であって、

(a) 治療に有効な量の、該ポリペプチドに対するアンタゴニスト、および/または

(b) 該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を抑制する核酸分子、および/または

(c) 治療に有効な量の、該ポリペプチドのリガンド、基質または受容体に関して該ポリペプチドと競合するポリペプチド、を含有する医薬組成物。

【請求項 5】

被験者における請求項 1 に記載のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病または該疾病への罹りやすさを検査する方法であって、

(a) 該被験者のゲノム内の該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に突然変異があるか否かを調べること、および/または

(b) 該被験者から得られたサンプル中の該ポリペプチド発現の存在または量を分析すること、を含んでなる方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリペプチドの機能を刺激または抑制する化合物を同定するためのスクリーニング法であって、

(a) 候補化合物と、該ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質と、の結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合させた標識により測定すること、

(b) 候補化合物と、該ポリペプチド（または該ポリペプチドを担持している細胞もしくはその膜）またはその融合タンパク質と、の結合を、標識競合物質の存在下で測定すること、

(c) 候補化合物が該ポリペプチドの活性化または抑制により生ずるシグナルをもたらすか否かを、該ポリペプチドを担持している細胞または細胞膜に適した検出系を用いて調べること、

(d) 候補化合物と、該ポリペプチドを含有する溶液と、を一緒にして混合物を調製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定して、該混合物の活性をスタンダードと比較すること、および

(e) 候補化合物が細胞における該ポリペプチドをコードする mRNA および該ポリペプチドの産生に及ぼす効果を検出すること、
よりなる群から選択される方法を含んでなるスクリーニング法。

10

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドのアンタゴニスト。

20

【請求項 8】

下記発現系が適合性の宿主細胞内に存在するとき請求項 1 に記載のポリペプチドを産生し得るポリヌクレオチドを含有する発現系。

【請求項 9】

宿主細胞が適当な培養条件下で配列番号 2 の全長にわたる配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを産生するように、請求項 8 に記載の発現系を用いて細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、組換え宿主細胞の作製方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法により得られる組換え宿主細胞。

30

【請求項 11】

配列番号 2 の全長にわたる配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを発現している請求項 10 に記載の組換え宿主細胞の膜。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドを産生させるのに十分な条件下で培養し、その培養培地から該ポリペプチドを回収することを含んでなる、前記ポリペプチドの生産方法。

【請求項 13】

以下の (a) ~ (d) から選択される単離されたポリヌクレオチド：

40

(a) 配列番号 3 の全長にわたる配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 70 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 3 のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 3 のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、および

(d) 配列番号 4 の全長にわたる配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 14】

以下の (a) ~ (d) から選択される単離されたポリペプチド：

(a) 配列番号 4 の全長にわたる配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %

50

の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、
 (b) 配列番号4のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、
 (c) 配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド、および
 (d) 配列番号3に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項15】

以下の(a)または(b)の単離されたポリペプチド：

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または
 (b) 配列番号2のアミノ酸配列において、少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつASP5活性を有するポリペプチド。

10

【請求項16】

請求項15に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項17】

以下の(a)または(b)の単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または
 (b) (a)のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしかつASP5活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【発明の属する技術分野】

本発明は、新たに同定されたポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの治療の際のまたは治療に有効でありうるアゴニスト、アンタゴニストおよび/またはインヒビターである化合物を同定する際の使用、並びに該ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの生産方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

薬物探索プロセスには目下根本的な大変化が生じている。というのは、それが「機能的ゲノム学」(functional genomics)、すなわち高処理量のゲノムまたは遺伝子ベースの生物学に及んでいるからである。このアプローチは「ポジショナルクローニング」に基づいた比較的初期のアプローチに急速に取って代わりつつある。表現型、つまり生物学的機能または遺伝病、が同定され、続いてその遺伝子地図の位置を手がかりとして病因遺伝子が突き止められるだろう。

30

【0003】

機能的ゲノム学は、現在入手できる多くの分子生物学データベースから興味のもてそうな遺伝子配列を同定するための生物情報科学(bioinformatics)の様々なツールに大きく依存している。依然として、まだ未解明の遺伝子およびその関連ポリペプチド/タンパク質を薬物探索の標的として同定し特性づける必要性が存在している。

【0004】

現在5種のヒト・アスパラギン酸プロテアーゼ、すなわちペプシン、ガストリクシン、カテプシンD、カテプシンEおよびレニンが知られており、これらは多種多様な機能を有している。ペプシンおよびガストリクシンは胃における栄養過程に関与しており、カテプシンDは多くの細胞型におけるタンパク質の代謝回転に関与している。またレニンはアンギオテンシンの前駆体であるアンギオテンシノーゲンからのアンギオテンシンの産生という高度に特異的な機能を有する。いくつかの上皮細胞型におけるカテプシンEの所在は抗原プロセッシングにおける役割を示したものの、カテプシンEの正確な役割についてはまだ確認されないでいる。カテプシンEは特定の炎症性症状、例えば胃におけるヘリコバクター・ピロリ感染症にも関与しているかもしれない。レニンおよびカテプシンD(カテプシンDの場合には少ない程度に)は高血圧(レニン)およびアルツハイマー病(カテプシンD)の潜在的な治療標的として同定されている。

40

50

【0005】

本発明は、ASP5、特にASP5ポリペプチドおよびASP5ポリヌクレオチド、組換え物質、並びにその生産方法に関する。もう一つの態様において、本発明は、高血圧および喘息（以後まとめて「前記疾患」という）の治療をはじめとする、前記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。他の態様では、本発明は、本発明により提供される物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニスト/インヒビターを同定する方法、並びに同定された化合物を用いてASP5平衡異常と関連した症状を治療することに関する。さらに他の態様において、本発明は不適当なASP5活性またはASP5レベルと関連した疾病を検出するための診断アッセイに関する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

一つの態様において、本発明はASP5ポリペプチドに関する。この種のペプチドには、配列番号2の全長にわたる配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドとしては配列番号2のアミノ酸配列を含むものがある。

【0007】

本発明の他のペプチドには、そのアミノ酸配列が配列番号2の全長にわたる配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有する単離されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドとしては配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドがある。

【0008】

本発明の更なるペプチドには、配列番号1に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされる単離されたポリペプチドが含まれる。

【0009】

本発明のポリペプチドはアスパラギン酸プロテアーゼファミリーのメンバーであると考えられる。それゆえ、それらには興味もてる。なぜなら、アスパラギン酸プロテアーゼは高血圧に見られるようないくつかの症状に関与しているからである。これらの特性を以後「ASP5活性」または「ASP5ポリペプチド活性」または「ASP5の生物学的活性」という。これらの活性の中には、前記ASP5ポリペプチドの抗原性および免疫原性、特に配列番号2のポリペプチドの抗原性および免疫原性も含まれる。本発明のポリペプチドはASP5の少なくとも1つの生物学的活性を示すことが好ましい。

【0010】

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

【0011】

また、前記ポリペプチドの変異体、すなわち同類アミノ酸置換（ある残基が性質の似ている他の残基により置換される）により基準ポリペプチドと相違しているポリペプチドも本発明に含まれる。典型的なこうした置換は、Ala, Val, LeuおよびIleの間；SerとThrの間；酸性残基 AspとGluの間；AsnとGlnの間；塩基性残基 LysとArgの間；または芳香族残基 PheとTyrの間で起こる。特に、数個、5~10個、1~5個、1~3個、1~2個または1個のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加されている変異体が好適である。

【0012】

10

20

30

40

50

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

【0013】

本発明の更なる態様において、本発明は、ASP5ポリヌクレオチドに関する。このようなポリヌクレオチドには、配列番号2の全長にわたる配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリペプチドが一層好ましいが、少なくとも98~99%の同一性を有するものがより一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドが最も好ましいものである。かかるポリヌクレオチドとして、配列番号2のポリペプチドをコードする配列番号1に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドが挙げられる。

10

【0014】

本発明の更なるポリヌクレオチドには、配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、その全コード領域にわたって、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドが一層好ましいが、少なくとも98~99%の同一性を有するものがより一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するポリヌクレオチドが最も好ましいものである。

20

【0015】

本発明の更なるポリヌクレオチドには、配列番号1の全長にわたる配列番号1のポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドが含まれる。これに関して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドが一層好ましいが、少なくとも98~99%の同一性を有するものがより一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するポリヌクレオチドが最も好ましいものである。かかるポリヌクレオチドとして、配列番号1のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドおよび配列番号1のポリヌクレオチドが挙げられる。

30

【0016】

本発明はまた、上記の全てのポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを提供する。

【0017】

配列番号1のヌクレオチド配列はASP4 (PCT WO98/11236)との相同性を示す。配列番号1のヌクレオチド配列はcDNA配列であり、420アミノ酸からなる配列番号2のポリペプチドをコードするポリペプチドコード配列(ヌクレオチド248-1507)を含む。配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に含まれるポリペプチドコード配列と同一であっても、遺伝子コードの重複性(縮重)のため、やはり配列番号2のポリペプチドをコードする、配列番号1に含まれる配列以外の配列であってもよい。配列番号2のポリペプチドはアスパラギン酸プロテアーゼファミリーの他のタンパク質と構造的に関連しており、ASP4 (PCT WO98/11236)との相同性および/または構造類似性を有する。

40

【0018】

本発明の好適なポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、とりわけ、それと相同なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物学的機能/性質をもつことが期待される。さ

50

らに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは少なくとも1つのASP5活性を有する。

【0019】

また、本発明は、配列番号1および配列番号2の対応する全長配列の決定に先立って最初に同定された部分的なまたは他のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関する。

【0020】

したがって、更なる態様において、本発明は、

(a) 配列番号3の全長にわたる配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは97~99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号3のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または

(d) 配列番号4の全長にわたる配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは97~99%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、

を提供する。

【0021】

さらに、本発明は、

(a) 配列番号4の全長にわたる配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、

(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、

(c) 配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または

(d) 配列番号3に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

を提供する。

【0022】

配列番号3のヌクレオチド配列およびそれによりコードされるペプチド配列はエクспレスド・シーケンス・タグ(Expressed Sequence Tag: EST)配列から誘導される。当業者であれば、EST配列中に若干のヌクレオチド配列読み取り誤差が必然的に存在することを理解するであろう(Adams, M. D.ら, Nature 377 (supp) 3, 1995を参照のこと)。したがって、配列番号3のヌクレオチド配列およびそれによりコードされるペプチド配列は配列精度において同一の固有限界を受ける。さらに、配列番号3によりコードされるペプチド配列は、相同性または構造類似性が最も高いタンパク質と同一の領域、または相同性および/または構造類似性(例えば、同類アミノ酸の差異)が高い領域を含んでいる。

【0023】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニングにより、ヒト肺の細胞中のmRNAから誘導されたcDNAライブラリーから、EST分析(Adams, M. D.ら, Science (1991) 252: 1651-1656; Adams, M. D.ら, Nature (1992) 355: 632-634; Adams, M. D.ら, Nature (1995) 377 Supp: 3-174)を用いて得ることができる。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノムDNAライブラリーのような天然源から得ることができ、商業的に入手可能な公知の技法を用いて合成することもできる。

【0024】

10

20

30

40

50

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

10

【0025】

本発明の更なる具体例としては、数個、例えば5~10個、1~5個、1~3個、1~2個、または1個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、欠失または付加されている、配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドがある。

【0026】

配列番号1に含まれるヌクレオチド配列と同一であるか実質的に同一であるポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するために、また、配列番号1に対して高い配列類似性を有する他の遺伝子（ヒト以外の種に由来する相同体およびオーソログ体（ortholog）をコードする遺伝子を含む）のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために、cDNAおよびゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして、または核酸増幅（PCR）反作用のプライマーとして用いることができる。一般的に、これらのヌクレオチド配列は基準のヌクレオチド配列と好ましくは80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%同一である。プローブまたはプライマーはたいてい15個以上のヌクレオチドを含み、好ましくは30個以上を含み、50個以上のヌクレオチドを有していてもよい。特に好ましいプローブは30~50個の範囲のヌクレオチドを有するものである。

20

【0027】

本発明のポリペプチド（ヒト以外の種に由来する相同体およびオーソログ体を含む）をコードするポリヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列またはその断片を有する標識プローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングし、該ポリヌクレオチド配列を含む全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する各工程を含んでなる方法により得られる。このようなハイブリダイゼーション技法は当業者に公知である。好ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5xSSC（150mM NaCl, 15mM クエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5xDenhardt溶液、10%デキストラン硫酸および20μg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含有する溶液中42°Cで一晩インキュベートし、次いでフィルターを0.1xSSC中約65°Cで洗浄することを含む。かくして、本発明は、配列番号1のヌクレオチド配列またはその断片を有する標識プローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で適当なライブラリーをスクリーニングすることにより得られるポリヌクレオチドをも包含する。

30

40

【0028】

当業者には理解されるように、多くの場合、ポリペプチドをコードする領域がそのcDNAの5'末端で短く切断されることから、単離されたcDNA配列は不完全であるだろう。それは逆転写酵素のためであり、この酵素はもともと「プロセスィビティ」（processivity: 重合中に鑄型に結合した状態にいる該酵素の能力の尺度）が低く、第一鎖cDNA合成の間にmRNA鑄型のDNAコピーを完成させることができない。

50

【0029】

全長cDNAを得るための、または短鎖cDNAを伸長させるための、当業者に公知で利用可能な方法がいくつかあり、例えば、cDNA末端高速増幅法(RACE)に基づいた方法がある(例えば、Frohmanら, PNAS USA 85, 8998-9002, 1988を参照のこと)。例えばMarathon™技術(Clontech Laboratories Inc.)により示されるような、上記技法の最近の改良により、より長いcDNAの検索が大いに簡便化された。Marathon™技術では、所定の組織より抽出されたmRNAからcDNAを作製し、各末端に「アダプター」配列を連結する。続いて、遺伝子特異的およびアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて核酸増幅(PCR)を行い、cDNAの「欠失」5'末端を増幅する。次に、「nested」プライマー、すなわち増幅産物の内部にアニールするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列のさらに3'側にアニールするアダプター特異的プライマーおよび既知遺伝子配列のさらに5'側にアニールする遺伝子特異的プライマー)を用いてPCR反応を繰り返す。その後、この反応の産物をDNA塩基配列決定により解析し、この産物を既存のcDNAに直接結合するか、または5'プライマー設計用の新たな配列情報を用いて別の全長PCRを行うことにより、全長cDNAを構築することができる。

10

【0030】

本発明の組換え体ポリペプチドは、当業界で公知の方法を用いて、発現系を含有する遺伝子操作宿主細胞から生産することができる。したがって、更なる態様において、本発明は、本発明の1以上のポリヌクレオチドを含有する発現系、該発現系により遺伝子操作された宿主細胞、および組換え技法による本発明ポリペプチドの生産に関する。本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いてこの種のタンパク質を生産するために、無細胞翻訳系を使用することもできる。

20

【0031】

組換え体生産に関しては、本発明のポリヌクレオチドの発現系またはその一部を組み込むために宿主細胞を遺伝子操作する。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載された方法により行うことができる。好適なこうした方法として、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)または感染などがある。

30

【0032】

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

40

【0033】

多種多様な発現系を使用することができる。こうした発現系として、特に、染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体要素由来、ウイルス(例:パキウウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス)由来のベクター

50

、およびこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものがある。これらの発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。一般的に、宿主内でのポリペプチドの産生のためにポリヌクレオチドを維持し、増やし、発現することができる系またはベクターはどれも使用しうる。Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (前掲) に記載されるような、日常的に用いられる公知の技法のいずれかにより、適当なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。 10

【0034】

スクリーニングアッセイで使用するため本発明のポリペプチドを発現させようとする場合、一般にそのポリペプチドを細胞の表面に産生させることが好適である。その場合は、スクリーニングアッセイでの使用に先立って細胞を回収する。該ポリペプチドが培地に分泌される場合は、そのポリペプチドを回収し精製するために培地を回収する。細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後ポリペプチドを回収する必要がある。組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。最も好ましくは、高性能液体クロマトグラフィーが精製に用いられる。ポリペプチドが単離および/または精製中に変性されるときは、タンパク質を再生させるための公知の技法を用いて、活性のあるコンフォメーションを復元することが可能である。 20

【0035】

本発明はまた、診断薬としての本発明のポリヌクレオチドの使用に関する。機能障害と関連した、配列番号1のポリヌクレオチドにより特徴づけられる遺伝子の変異型の検出は、該遺伝子の過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾病またはその疾病への罹りやすさの診断に追加しうる、またはその診断を下しうる診断用ツールを提供するだろう。該遺伝子に突然変異がある個体を、さまざまな技法によりDNAレベルで見つけ出すことができる。 30

【0036】

診断用の核酸は、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料由来の細胞から得ることができる。検出のためにゲノムDNAを直接使用してもよいし、分析前にPCRまたは他の増幅法を使ってゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい。同様の方法でRNAまたはcDNAを使用することもできる。欠失および挿入突然変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅DNAを標識ASP5ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることで同定できる。完全にマッチした配列とミスマッチの二重鎖とはRNアーゼ消化により、または融解温度の差異により区別できる。また、DNA配列の差異は、変性剤を含むもしくは含まないゲルでのDNA断片の電気泳動の移動度の変化により、または直接DNA塩基配列決定によっても検出できる(例えば、Myersら, *Science* (1985) 230:1242を参照のこと)。特定位置での配列変化はヌクラーゼプロテクションアッセイ(例えば、RNアーゼおよびS1プロテクション)または化学的開裂法によっても確認できる(Cottonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 85:4397-4401を参照のこと)。別の実施態様では、例えば、遺伝子変異の効率のよいスクリーニングを行うため、ASP5ヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイ(array)を構築することができる。アレイ技法は公知で、一般的な適用可能性を有し、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的 40 50

変異性を含めた分子遺伝学のさまざまな問題を解きあかすために用いられている（例えば、M. Cheeら, Science, Vol. 274, pp. 610-613 (1996) を参照のこと）。

【0037】

診断アッセイは、前記の方法によりASP5遺伝子の変異を検出することで、前記疾患への罹りやすさを診断または判定する方法を提供する。さらに、被験者から得られたサンプルからポリペプチドまたはmRNAのレベルの異常な低下または増加を測定する方法により、前記疾患の診断を下すことができる。発現の低下または増加は、当業界で公知のポリヌクレオチドの定量法、例えば核酸増幅（例：PCR、RT-PCR）、RNAアーゼプロテクション、ノーザンブロッティング、その他のハイブリダイゼーション法のいずれかによりRNAレベルで測定することができる。宿主から得られたサンプル中の本発明ポリペプチドのようなタンパク質のレベルを測定するアッセイ法は当業者によく知られている。こうしたアッセイ法として、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、ELISAアッセイなどがある。

10

【0038】

かくして、もう一つの態様において、本発明は、

- (a) 本発明のポリヌクレオチド（好ましくは、配列番号1のヌクレオチド配列）もしくはその断片、
- (b) (a) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、
- (c) 本発明のポリペプチド（好ましくは、配列番号2のポリペプチド）もしくはその断片、または
- (d) 本発明のポリペプチド（好ましくは、配列番号2のポリペプチド）に対する抗体

20

を含んでなる診断用キットに関する。このようなキットにおいて、(a)、(b)、(c) または (d) が実質的な構成成分であることが理解されよう。かかるキットは疾患または疾患への罹りやすさ、特に高血圧および喘息を診断するうえで有用である。

【0039】

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

30

【0040】

罹患個体と非罹患個体とのcDNAまたはゲノム配列の差異も調べることができる。罹患個体の一部または全部に突然変異が観察されるが、どの正常個体にも観察されない場合は、その突然変異が疾患の原因である可能性がある。

40

【0041】

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

【0042】

本発明のポリペプチドに対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外の動物）に該ポリペプチドまたはエピトープを含む断片、類似体もしくは細胞を

50

投与することにより得られる。モノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物から抗体を産生させる任意の技法を用いることができる。例を挙げると、ハイブリドーマ技法 (Kohler, G. および Milstein, C., Nature (1975) 256: 495 - 497)、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kozbor, Immunology Today (1983) 4: 72) およびEBV-ハイブリドーマ技法 (Cole, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., 1985) などがある。

本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体をつくるために、米国特許第4,946,778号に記載されるような一本鎖抗体の調製法を適応させることができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳動物を含む他の生物を利用することができる。

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

【0043】

本発明のポリペプチドに対する抗体は、とりわけ、前記疾患の治療に使用できる可能性がある。

【0044】

本発明の更なる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、各種サブクラス (IgG、IgM、IgA、IgE) の免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の様々な部分と、を含んでなる遺伝子工学的に作製された可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとしてはヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部が好ましく、その場合は融合がヒンジ領域で起こる。特定例では、血液凝固因子Xaで開裂され得る開裂配列を組み込むことで、Fc部分を簡単に除去できる。さらに、本発明は、これら融合タンパク質の遺伝子工学的作製方法、並びに薬物スクリーニング、診断および治療におけるそれらの使用に関する。また、本発明の更なる態様はこのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は国際特許出願 WO94/29458 およびWO94/22914に見いだせる。

【0045】

本発明の更なる態様は哺乳動物において免疫学的応答を引き出す方法に関し、この方法は、特に前記疾患から該動物を防御するための抗体および/またはT細胞免疫応答を生ずるのに十分な本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる。本発明のさらに別の態様は、哺乳動物を前記疾患から防御する抗体を産生させるような免疫学的応答を引き出すために、in vivo で本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を指令するベクターを介して該ポリペプチドを供給することを含んでなる、哺乳動物において免疫学的応答を引き出す方法に関する。

【0046】

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

10

20

30

40

50

る。

【0047】

本発明のポリペプチドは、多くの病的状態、特に前記疾患を含めて、さまざまな生物学的機能に参与している。それゆえ、このポリペプチドの機能を刺激または抑制する化合物を同定するスクリーニング法を開発することが望ましい。したがって、更なる態様において、本発明は、このポリペプチドを刺激または抑制する化合物を同定するための化合物のスクリーニング法を提供する。一般的には、前記疾患の治療および予防目的のためにアゴニストまたはアンタゴニストが使用される。種々の供給源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーおよび天然産物の混合物から化合物を同定することができる。このように同定されたアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターは、場合により、該ポリペプチドの天然のまたは修飾された基質、リガンド、受容体、酵素などであってよく、また、その構造的または機能的なミメティックであってよい (Coliganら, *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991)を参照のこと)。

【0048】

スクリーニング法では、本発明のポリペプチド、または該ポリペプチドを担持する細胞もしくは膜、またはその融合タンパク質への候補化合物の結合を、候補化合物に直接または間接的に結合された標識を用いて簡単に測定できる。あるいはまた、スクリーニング法では標識した競合物質との競合を用いることもある。さらに、こうしたスクリーニング法では、候補化合物がポリペプチドの活性化または抑制により生ずるシグナルを結果的にもたらずか否かを、該ポリペプチドを担持する細胞に適した検出系を用いて試験することができる。一般的には、既知のアゴニストの存在下で活性化のインヒビターをアッセイして、アゴニストによる活性化に候補化合物の存在が与える影響を調べる。アゴニストまたはインヒビターの不在下で、候補化合物がポリペプチドの活性化を抑制するか否かを調べることによる逆アゴニストまたはインヒビターのスクリーニング法では、構成的に活性のあるポリペプチドが用いられる。さらに、これらのスクリーニング法は、候補化合物と本発明のポリペプチドを含む溶液とを混ぜ合わせて混合物をつくり、この混合物中のASP5活性を測定し、そしてこの混合物のASP5活性をスタンダードと比較する各ステップを単に含むだけでよい。本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定する高処理量スクリーニングアッセイでは、上記のようなFc部分とASP5ポリペプチドから作製されるような融合タンパク質も使用することができる (D. Bennettら, *J. Mol. Recognition*, 8: 52-58 (1995) およびK. Johansonら, *J. Biol. Chem.*, 270(16): 9459-9471 (1995)を参照のこと)。

さらに、全てのアスパラギン酸プロテアーゼはペプスタチンによって阻害されるので、本発明のポリペプチドについてのスクリーニングアッセイにペプスタチンを使用してもよい。

【0049】

また、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは該ポリペプチドに対する抗体を用いて、細胞内でのmRNAまたはポリペプチドの産生に及ぼす添加化合物の作用を検出するためのスクリーニング法を組み立てることができる。例えば、当業界で公知の標準方法によりモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、ポリペプチドの分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定するためのELISAアッセイを構築することができ、これは適切に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を抑制または増強する物質(それぞれアンタゴニストまたはアゴニストともいう)の探索に用いることができる。

【0050】

膜に結合した受容体または可溶性の受容体が存在するのであれば、当業界で公知の標準的な受容体結合法によりこの種の受容体を同定するために本発明のポリペプチドを用いることができる。こうした受容体結合法には、限定するものではないが、リガンド結合アッセイおよび架橋アッセイがあり、これらのアッセイでは、ポリペプチドを放射性アイソトー

ブ（例：^{1 2 5}I）で標識するか、化学的に修飾（例：ビオチン化）するか、または検出や精製に適したペプチド配列に融合させ、そして推定上の受容体源（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液など）とインキュベートする。その他の方法としては、表面プラズモン共鳴および分光学的ような生物物理的方法がある。これらのスクリーニング法は、該ポリペプチドまたは（存在するのであれば）その受容体への結合と競合する該ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するために用いることもできる。スクリーニングアッセイを行うための標準的な方法は当業界でよく理解されている。

【0051】

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

10

【0052】

かくして、他の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、またはこの種のポリペプチドの産生を低下または増加させる化合物を同定するためのスクリーニングキットに関し、このキットは、

- (a) 本発明のポリペプチド、
- (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞、
- (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜、または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、

20

を含んでなり、前記ポリペプチドは好ましくは配列番号2のポリペプチドである。このようなキットにおいて、(a)、(b)、(c) または (d) が実質的な構成成分であることが理解されよう。

【0053】

当業者であれば、本発明のポリペプチドは、その構造に基づいて該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターを設計する方法にも使用できることが容易に理解されよう。この方法は、

- (a) 最初に該ポリペプチドの三次元構造を解析し、
 - (b) アゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターの確実と思われる反応部位または結合部位の三次元構造を想定し、
 - (c) 想定された反応部位または結合部位と結合または反応すると予想される候補化合物を合成し、そして
 - (d) その候補化合物が実際にアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターであるか否かを調べる、
- ことを含んでなる。これは通常相互作用プロセスであることがさらに理解されよう。

30

【0054】

更なる態様において、本発明は、ASP5ポリペプチド活性の過剰量と不足量のいずれかに関係した、例えば高血圧および喘息などの異常な状態の治療法を提供する。

【0055】

該ポリペプチドの活性が過剰である場合は、いくつかのアプローチが利用可能である。一つのアプローチは、例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などの結合をブロックすることにより、または第2のシグナルを抑制することで異常な状態を軽減することにより、該ポリペプチドの機能を抑制するのに有効な量で、上記のインヒビター化合物（アンタゴニスト）を製剤学上許容される担体とともに患者に投与することを含んでなる。もう一つのアプローチでは、内因性のポリペプチドとの競合状態でリガンド、基質、酵素、受容体などと結合する能力がまだある可溶性形態のポリペプチドを投与することができる。このような競合物質の典型的な例はASP5ポリペプチドの断片である。

40

【0056】

さらに別のアプローチでは、発現阻止法を使って内因性ASP5ポリペプチドをコードす

50

る遺伝子の発現を抑制することができる。こうした公知技術は、体内で産生されるか別個に投与されるアンチセンス配列の使用を必要とする（例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression（遺伝子発現のアンチセンスインヒビターとしてのオリゴデオキシヌクレオチド）、CRC Press, Boca Raton, FL（1988）中のO'Connor, J. Neurochem（1991）56:560を参照のこと）。あるいはまた、この遺伝子と共に三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給することもできる（例えば、Leeら, Nucleic Acids Res（1979）6:3073; Cooneyら, Science（1988）241:456; Dervanら, Science（1991）251:1360を参照のこと）。これらのオリゴマーはそれ自体を投与することもできるし、関連オリゴマーをin vivoで発現させることもできる。

【0057】

ASP5およびその活性の過少発現に関係した異常な状態を治療する場合も、いくつかのアプローチを取ることができる。一つのアプローチは、治療に有効な量の本発明ポリペプチドを活性化する化合物（すなわち、前記アゴニスト）を製剤学上許容される担体とともに患者に投与して、異常な状態を緩和することを含んでなる。別法として、患者の関連細胞においてASP5を内因的に産生させるために遺伝子治療を用いることができる。例えば、上で述べたような複製欠損レトロウイルスベクターによる発現のために本発明のポリヌクレオチドを遺伝子操作する。次にレトロウイルス発現構築物を単離し、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入されたパッケージング細胞に導入する。その結果、パッケージング細胞は対象の遺伝子を含有する感染性のウイルス粒子を産生するようになる。in vivo細胞操作およびin vivoポリペプチド発現のために、これらの産生細胞を患者に投与する。遺伝子治療の概論に関しては、Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd（1996）中のChapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches（およびその中の引用文献）を参照のこと。もう一つのアプローチは治療量の本発明のポリペプチドを適当な製剤学上の担体とともに投与することである。

更なる態様において、本発明は、治療に有効な量のポリペプチド（例えば、可溶性形態の本発明ポリペプチド）、アゴニストもしくはアンタゴニストペプチド、または小分子化合物を製剤学上許容される担体または賦形剤と共に含有する医薬組成物を提供する。この種の担体としては、食塩水、生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組合せがあるが、これらに限らない。本発明はさらに、上記の本発明組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医薬パックおよびキットに関する。本発明のポリペプチドおよび他の化合物は単独で使用しても、他の化合物、例えば治療用化合物と一緒に使用してもよい。

【0058】

医薬組成物は投与経路、例えば全身または経口による投与経路に適合させることができる。全身投与に適した形態は、注入（注射）、典型的には静注である。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注入経路も使用できる。全身投与の別の手段には、胆汁酸塩、フシジン酸、その他の界面活性剤などの浸透剤を用いた経粘膜および経皮投与がある。さらに、本発明のポリペプチドまたは他の化合物を腸溶剤またはカプセル剤として製剤化し得るのであれば、経口投与も可能である。これらの化合物を軟膏、ペースト、ゲルなどの剤形で局所に投与しても、かつ/または局在化させてもよい。

【0059】

必要な投与量範囲は、本発明のペプチドまたは他の化合物の選択、投与経路、製剤の性質、患者の状態、そして医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1k

gあたり0.1~100 μ gの範囲である。入手可能な化合物が多様であること、投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば、経口投与は静注による投与よりも高い投与量を必要とすると予想されよう。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0060】

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

10

【0061】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列は、類似の相同性を有する別の配列を同定する際の価値ある情報源を提供する。これは、こうした配列をコンピュータ読み取り可能媒体中に保存し、次に保存したデータを用いてGCCのような公知の検索ツールにより配列データベースを検索することで最大限促進される。したがって、更なる態様において、本発明は、配列番号1の配列を含んでなるポリヌクレオチドおよび/またはそれによりコードされるポリペプチドを保存したコンピュータ読み取り可能媒体を提供する。

【0062】

以下の定義は上記の説明中でしばしば用いられた用語を理解しやすくするためのものである。

20

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

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

「単離された」組成物または物質が天然に存在するのであれば、それはそのもとの環境から変化しているか分離されており、またはその両方である。例えば、生存している動物の体内に自然界で存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態の共存物質から分離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書中で用いられるように、「単離された」ものである。

30

【0063】

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

40

【0064】

「ポリペプチド」とは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合（すなわち、ペプチドアイソスター）により連結された2個以上のアミノ酸を含むペプチドまたはタンパク質

50

を意味する。「ポリペプチド」は短鎖（通常はペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーという）と長鎖（一般的にはタンパク質という）の両方をさす。ポリペプチドは20種類の遺伝子コード化アミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセスで、または当業界で公知の化学的修飾法のいずれかで修飾されたアミノ酸配列を含む。このような修飾は基本的な教科書、より詳細な学術論文および研究文献に詳述されている。修飾はペプチド骨格、アミノ酸側鎖、アミノまたはカルボキシル末端を含めてポリペプチドのどこでも行うことができる。同じタイプの修飾が所定のポリペプチドのいくつかの部位に同程度でまたはさまざまに異なる程度で存在してもよい。また、所定のポリペプチドが多くタイプの修飾を含んでいてもよい。ポリペプチドはユビキチン化のために分枝していても、分枝のある又はない環状であってもよい。環状の、分枝した、または分枝した環状のポリペプチドは翻訳後の天然プロセスから生じることがあり、また、合成法によって製造することもできる。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、ユビキチン化などがある（例えば、*Proteins - Structure and Molecular Properties* 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993; *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson 編, Academic Press, New York, 1983中のWold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs. 1-12; Seifterら, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol* (1990) 182:626-646; および Rattanら, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci* (1992) 663:48-62を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0065】

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

【0066】

当業界で知られた「同一性」とは、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の比較により決定された、2以上のかかる配列間の関係のことである。当業界ではまた、「同一性」はポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の鎖間のマッチ(match)により決定された、このような配列間の配列関係の程度を意味する。「同一性」は公知の方法により難なく算出することができ、こうした方法として、例えば Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編, Oxford University Press, New York, 1988; Bio computing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) に記載された方法があるが、これらに限らない。「同一性」を決定する方法は、検討する配列間で最大級のマッチが得られるように設計される。さらに、「同一性」を決定する方法は一般に利用可能なコンピュータプログラムに編集されている。2配列間の「同一性」を決定するコンピュータプログラム法としては、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J.ら, Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTINおよびFASTA (Atschul, S.F.ら, J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)) があるが、これらに限らない。BLAST XプログラムはNCBIおよび他のソースから一般に入手可能である (BLAST Manual, Atschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Atschul, S.ら, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。公知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に使用することができる。

【0067】

ポリペプチド配列を比較するためのパラメーターは次のものを含む:

- 1) アルゴリズム: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970) 比較マトリックス: Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919 (1992) からのBLOSSUM62
 ギャップペナルティー: 12
 ギャップ長ペナルティー: 4

これらのパラメーターと共に有用なプログラムは Genetics Computer Group (Madison WI) から「gap」プログラムとして一般に入手可能である。前記のパラメーターはペプチド比較のためのデフォルトパラメーター(default parameter)である(末端ギャップのペナルティーは無し)。

【0068】

ポリヌクレオチド配列を比較するための好適なパラメーターは次のものを含む:

- 1) アルゴリズム: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)
 比較マトリックス: マッチ = +10、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティー：50

ギャップ長ペナルティー：3

Genetics Computer Group (Madison WI)から「gap」プログラムとして入手可能である。前記のパラメータはポリヌクレオチド比較のためのデフォルトパラメータである。

【0069】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの「同一性」に関する好適な意味は以下の(1)および(2)に提供される。

(1) ポリヌクレオチドの具体例としては、配列番号1の基準配列に対して少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドがある。このポリヌクレオチド配列は配列番号1の基準配列と同一であっても、該基準配列に対して、ある整数個までのヌクレオチド変異を含んでいてもよい。前記変異は少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換(トランジションおよびトランスバージョンを含む)または付加よりなる群から選択され、こうした変異は基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間どこに存在してもよく、基準配列中のヌクレオチドの間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして点在することができる。ヌクレオチド変異の前記の数は、配列番号1のヌクレオチドの総数に、同一性%を規定する整数を100で割った値を掛け、その積を配列番号1のヌクレオチドの総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n \times x_n - (x_n \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_n はヌクレオチド変異の数であり、 x_n は配列番号1のヌクレオチドの総数であり、 y は50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97または100%については1.00であり、 \cdot は掛け算記号であり、ここで x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を改変すると、そのコード配列にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異が生じ、こうした変異後に該ポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドを改変させることもできる。

【0070】

例えば、本発明のポリヌクレオチド配列は配列番号2の基準配列と同一でありうる。すなわち、それは100%同一であっても、同一性%が100%未満となるように該基準配列に対して、ある整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。前記変異は少なくとも1個の核酸の欠失、置換(トランジションおよびトランスバージョンを含む)または付加よりなる群から選択され、こうした変異は基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間どこに存在してもよく、基準配列中のヌクレオチドの間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして点在することができる。所定の同一性%に関する核酸変異の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、同一性%を規定する整数を100で割った値を掛け、その積を配列番号2のアミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n \times x_n - (x_n \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_n はアミノ酸変異の数であり、 x_n は配列番号2のアミノ酸の総数であり、 y は70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85といった数字であり、 \cdot は掛け算記号であり、ここで x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0071】

(2) ポリペプチドの具体例としては、配列番号2のポリペプチド基準配列に対して少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリペプチドを含んでなる単離されたポリペプチドがある。このポリペプチド配列は

配列番号2の基準配列と同一であっても、該基準配列に対して、ある整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。前記変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（同類および非同類アミノ酸置換を含む）または付加よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間のいずれに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして点在することができる。アミノ酸変異の前記の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、同一性を規定する整数を100で割った値を掛け、その積を配列番号2のアミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2中のアミノ酸の総数であり、 y は50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97または100%については1.00であり、 \cdot は掛け算記号であり、ここで x_a と y の非整数の積は、その積を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0072】

例えば、本発明のポリペプチド配列は配列番号2の基準配列と同一でありうる。すなわち、それは100%同一であっても、同一性が100%未満となるように該基準配列に対して、ある整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。前記変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（同類および非同類アミノ酸置換を含む）または付加よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間のいずれに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして点在することができる。所定の同一性%に関するアミノ酸変異の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、同一性を規定する整数を100で割った値を掛け、その積を配列番号2のアミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2中のアミノ酸の総数であり、 y は70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85といった数字であり、 \cdot は掛け算記号であり、ここで x_a と y の非整数の積は、その積を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0073】

「融合タンパク質」とは、2つの、しばしば無関係の、融合された遺伝子またはその断片によりコードされるタンパク質のことである。一例として、EP-A-0464には、免疫グロブリン分子の定常領域の様々な部分と他のヒトタンパク質またはその一部とを含んでなる融合タンパク質が記載されている。多くの場合、治療および診断における使用には、融合タンパク質の一部として免疫グロブリンFc領域を使用することが有利であり、これにより例えば薬物速度論的性質が向上する（例えば、EP-A-0232262を参照のこと）。一方、いくつかの使用にとっては、その融合タンパク質を発現させ、検出し、精製した後でFc部分を除去することが望ましいだろう。

【0074】

【実施例】

実施例1

Clontech Laboratories社から購入したヒト多組織ノーザンブロット(MTNカタログ番号7760-1)を、Asp4cDNAクローンのEcoRI/SalI制限エンドヌクレアーゼ消化により作製したAsp4cDNAプローブ(298ヌクレオチド長)とハイブリダイズさせた。

GATCCTCGGGCAGCGTTTTCTTGGGGGGCGTATGTGACCGTCTTCGACCGCGGGGACAT
 GAAGACGGGGCGCAGAGTGGGACTGGGCGCGCGCTCGCCCTCGCGGGAGCGGACCTGG
 GAAGGGCGGAGACCGCGCAGGCGCAGTACCGCGGGTGCCGCCAGGTGATGCCCAT
 GCCCACCGGGTAGCAGAGCTAGCGCTACTCAGTAAAAATCCAATATTTCCATTGAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAATTCATCACATTGGAGATCTCCAATCACTAGTGCGG
 CCGCCTGCAGGTCgA (配列番号5)

10

【0075】

Asp4とAsp5との同一性が>90%であるため、このプローブはどちらの遺伝子にもハイブリダイズできるだろう。プローブDNAをランダムプライミング反応中に³²P-dCTPを取り込ませて放射性標識し(RadPrime DNA Labelling System, Gibco-BRL)、次にこの標識プローブをCHROMA SPIN+TE-30カラム(Clontechカタログ番号K1321-1)を用いて精製した。プレハイブリダイゼーションを一時間行なった後に、ExpressHyb緩衝液(Clontech)を使用し、プローブを最終濃度 1×10^6 cpm/mlまで加えて68℃で2時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションの後に、膜を $2 \times$ SSC, 0.05% SDSで各20分ずつ2回洗浄し、さらに $0.1 \times$ SSC, 0.1% SDSで各50℃で20分ずつ2回洗浄した。次にこの膜をプラスチック製のラップで覆い、2枚の増感紙を使用して-70℃でX線フィルムに露光した。これにより、ASP4/ASP5は肺で最も高く発現され、次に腎臓で発現されることがわかった(試験した組織は心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および膵臓であった)。該プローブの肺および腎臓への局在は、以前に観察されたASP5についてのESTの位置確認と一致している。

20

30

【0076】

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

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>SmithKline Beecham Corporation

<120>ASP5

<130>PA03-190

10

<140>unknown

<141>1998-08-21

<150>U. S. Provisional Application No. 60/056,480

<151>1997-8-21

<150>U. S. Non-Provisional Application No. 09/111,727

20

<151>1998-7-8

<160>5

<170>FastSEQ for Windows Version 2.0

<210> 1

<211> 1648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400>1

ccaccaccac igccacccaa gtagggagtg aggagcacca ggagcacagg atgctacttc 60
 igccaacctt acaaaaatac tctgcacaaa tcttcaaaaa acatccttgt cccactgcgt 120
 caccigcggg cagatttcat gtccctggctt ccttctaaac ctggagggtg ggcatgaaca 180
 gggtaggagc acaggggaaa gaaaatgagc ccccaggaca cctgggttca caccagggtc 240
 cccagcgaig tctccaccac cgtctgtgca accctgtctg ctgctgtctg cctctgtgaa 300
 tgtggagcct tccggggcca cactgatecg catecccttt catcgagtcc aacctggagc 360
 caggatccig aacctactga ggggatggag agaaccagca gagctcccca agttgggggc 420
 cccatccctt ggggacaagc ccattcttct accctctctg aactacaggg atgtgcagta 480
 tttgggggaa attgggctgg gaacgcctcc aaaaacttc actgttgcct ttgacactgg 540
 ctctccaat ctctgggtcc cgtccaggag atgccacttc ttcagtgtgc cctgctggtt 600
 acaccaccga ttgatccca aagcctctag ctcttccag gccaatggga ccaagtttgc 660
 cattcaatat ggaactgggc gggtagatgg aatcctgagc gaggacaagc tgactattgg 720
 iggaatcaag ggtgcatcag tgattttcgg ggaggctctg tgggagccca gcctgggtctt 780
 cgtttttgc cattttgatg ggatattggg cctcggtttt cccattctgt ctgtggaagg 840
 agttcggccc ccgatggatg tactggtgga gcaggggcta ttggataagc ctgtcttctc 900
 cttttacctc aacagggacc ctgaagagcc tgatggagga gagctgggtc tggggggctc 960
 ggaccgggca cactacatcc caccctcac ctctgtgcca gtcacgggtc ctgcctactg 1020
 gcagatccac atggagcgtg tgaagggtggg cccagggctg actctctgtg ccaagggctg 1080
 tctgcccac ctggatcagg gcacgtccct catcacagga cccactgagg agatccgggc 1140

20

30

40

ccigcatgca gccatigggg gaatccccit gctggctggg gactacatca tcctgtgctc 1200
 ggaaatccca aagctccccg cagtctctt ccttcttggg ggggtctggt ttaacctcac 1260
 ggcccaigat tacgtcatcc agactactcg aaatggcgtc cgctctgct tgcctgggtt 1320
 ccaggccctg gatgtccctc cgctgcagg gccctctgg atctctggg acgtctctt 1380
 ggggacgtat gtggccgtct tcgaccgagg ggacatgaag agcagcggcc gggtagggcct 1440
 ggcgcgcgt cgcactcgcg gagcggacct cggatgggga gagactgcgc aggcgcagtt 1500
 cccgggiga cgccaagt aagcgcagtc gcagcgggtg gtcgcgtagg tcctgctacc 1560
 cagtaaaaat ccactattc cattgagaaa aaacaaaaa aaaaaaaaa aaaaaactcg 1620
 agggggccc gtaccaatt cgccctat 1648

10

<210> 2

<211> 420

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<401>2

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

30

40

Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Arg Arg Cys His Phe Phe	
100	105
Ser Val Pro Cys Trp Leu His His Arg Phe Asp Pro Lys Ala Ser Ser	
115	120
Ser Phe Gln Ala Asn Gly Thr Lys Phe Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Gly	
130	135
Arg Val Asp Gly Ile Leu Ser Glu Asp Lys Leu Thr Ile Gly Gly Ile	10
145	150
Lys Gly Ala Ser Val Ile Phe Gly Glu Ala Leu Trp Glu Pro Ser Leu	
165	170
Val Phe Val Phe Ala His Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Gly Phe Pro	
180	185
Ile Leu Ser Val Glu Gly Val Arg Pro Pro Met Asp Val Leu Val Glu	
195	200
Gln Gly Leu Leu Asp Lys Pro Val Phe Ser Phe Tyr Leu Asn Arg Asp	20
210	215
Pro Glu Glu Pro Asp Gly Gly Glu Leu Val Leu Gly Gly Ser Asp Pro	
225	230
Ala His Tyr Ile Pro Pro Leu Thr Phe Val Pro Val Thr Val Pro Ala	
245	250
Tyr Trp Gln Ile His Met Glu Arg Val Lys Val Gly Pro Gly Leu Thr	30
260	265
Leu Cys Ala Lys Gly Cys Ala Ala Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ser Leu	
275	280
Ile Thr Gly Pro Thr Glu Glu Ile Arg Ala Leu His Ala Ala Ile Gly	
290	295
Gly Ile Pro Leu Leu Ala Gly Glu Tyr Ile Ile Leu Cys Ser Glu Ile	40
305	310
Pro Lys Leu Pro Ala Val Ser Phe Leu Leu Gly Gly Val Trp Phe Asn	
	315
	320

tctctgggtc ccgtccagga gatgccactt cttcagtggt ccttgcctgt tacaccaccg 480
 atttgatccc aaagccteta gctccttcca ggccaatggg accaagtttg ccattcaata 540
 tggaaactggg cgggtagatg gaatcctgag cgaggacaag ctgactattg gtggaatcaa 600
 gggtagatca gtgattttcg gggaggctct gtgggagccc agcctggctt tegtttttgc 660
 ccattttgat gggatattgg gcctcggttt tccattctg tctgtggaag gagttcggcc 720
 cccgatggat gtactggtgg agcaggggct attggataag cctgtcttct cttttacct 780
 caacagggac ccigaagagc ctgatggagg agagctggtc ctggggggct cggaccggc 840
 aactacatc ccaccctca ccttcgtgcc agtcacggtc cctgcctact ggcagatcca 900
 catggagcgt gigaaggtag gccagggct gactctctgt gccaagggt gtgctgcat 960
 cctggatacg ggcacgtccc tcatacagg acccactgag gagatccggg ccttgcattg 1020
 agccattggg ggaatccct tgcctggctgg ggagtacatc atccigtgt cggaaatccc 1080
 aaagctccc gcagctctt tctttctgg gggggtctgg tttaacctca cggcccatga 1140
 ttacgtatc cagactactc gaaatggcgt ccgctctgc ttgtccggt tccaggccct 1200
 ggatgtccct ccgctgcag ggccctctg gatcctcggg gacgtcttct tggggacgta 1260
 tggggccgtc ttgaccgcg gggacatgaa gagcagcgc cgggtgggccc tggcgcgcg 1320
 tgcactcgc ggagcggacc tcggatgggg agagactgcg caggcgcagt tccccgggtg 1380
 acgccaagt gaagcgcag cgcagcgggt ggtcgcgtag gtctgtctac ccagtaaaaa 1440
 tccactattt ccattgagaa aaaacaaaa aaaaaaaaa aaaaaaactc gaggggggccc 1500
 cgtaccaat tgccttat 1519

10

20

<210> 4

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<403>4

Met Ser Pro Pro Pro Leu Leu Gln Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu

1

5

10

15

40

Leu Asn Val Glu Pro Ser Gly Ala Thr Leu Ile Arg Ile Pro Leu His	
20	25
Arg Val Gln Pro Gly Arg Arg Ile Leu Asn Leu Leu Arg Gly Trp Arg	
35	40
Glu Pro Ala Glu Leu Pro Lys Leu Gly Ala Pro Ser Pro Gly Asp Lys	
50	55
Pro Ile Phe Val Pro Leu Ser Asn Tyr Arg Asp Val Gln Tyr Phe Gly	10
65	70
Glu Ile Gly Leu Gly Thr Pro Pro Gln Asn Phe Thr Val Ala Phe Asp	
85	90
Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Arg Arg Cys His Phe Phe	
100	105
Ser Val Pro Cys Trp Leu His His Arg Phe Asp Pro Lys Ala Ser Ser	20
115	120
Ser Phe Gln Ala Asn Gly Thr Lys Phe Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Gly	
130	135
Arg Val Asp Gly Ile Leu Ser Glu Asp Lys Leu Thr Ile Gly Gly Ile	
145	150
Lys Gly Ala Ser Val Ile Phe Gly Glu Ala Leu Trp Glu Pro Ser Leu	
165	170
Val Phe Val Phe Ala His Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Gly Phe Pro	30
180	185
Ile Leu Ser Val Glu Gly Val Arg Pro Pro Met Asp Val Leu Val Glu	
195	200
Gln Gly Leu Leu Asp Lys Pro Val Phe Ser Phe Tyr Leu Asn Arg Asp	
210	215
Pro Glu Glu Pro Asp Gly Gly Glu Leu Val Leu Gly Gly Ser Asp Pro	40
225	230
Ala His Tyr Ile Pro Pro Leu Thr Phe Val Pro Val Thr Val Pro Ala	

<210> 5
<211> 298
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<404>5

10

```
gacccctcggc gacgttttct tgggggcgta tgtgaccgtc ttcgaccgcg gggacatgaa 60
gagcggcgca cgagtgggac tggcgcgcgc tcgccctcgc ggagcggacc tgggaaggcg 120
cgagaccgcg caggcgcagt accgcgggtg ccgccaggt gatgcgcatg cgcaccgggt 180
agcagagcta gcgctactca gtaaaaatcc aatatticca ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
aaagaattcc catcacattg gagatctcca atcactagtg cggccgcctg caggtcga 298
```

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/12	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/06	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 9/64	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 9/64	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/54	
G 0 1 N 33/68	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 デビッド ジェイ . ポウエル
アメリカ合衆国 1 9 0 8 7 ペンシルバニア州 , ラドナー , レモントン ウェイ 1 2 2

(72)発明者 ジョン ケイ
イギリス国 シー エフ 4 8 アール ティー ウェールズ , カーディフ , サイカモア ツリー
クロース ラディア 1

(72)発明者 ジェフリー ヒル
イギリス国 シー エフ 5 2 ディー エル ウェールズ , カーディフ , ザ クレセント ランダ
フ , カスウェル ハウス 4 1

(72)発明者 トルディ スミス
アメリカ合衆国 1 9 0 8 7 ペンシルバニア州 ラドナー , レモントン ウェイ 1 2 2

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB08
4B024 AA01 AA11 BA14 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04 HA14
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ03 QQ08 QQ42 QR32 QR36 QR48 QR51
QS25 QS33 QS36
4B065 AA01X AA26X AA57X AA90X AA91X AA93Y AB01 BA02 CA33 CA44
CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 AA17 BA35 BA44 CA53 DC02
MA17 MA22 MA23 MA28 MA35 MA37 MA52 MA56 MA63 MA66
NA14 ZA422 ZA592 ZC192 ZC202
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 MA17 MA22 MA23
MA28 MA37 MA52 MA56 MA63 MA66 NA14 ZA42 ZA59 ZC19
ZC20
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	ASP5		
公开(公告)号	JP2004000196A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003110822	申请日	2003-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公司		
[标]发明人	デビッドジェイポウエル ジョンケイ ジェフリーヒル トルディスミス		
发明人	デビッド ジェイ.ポウエル ジョン ケイ ジェフリー ヒル トルディ スミス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/46 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 C07K16/18 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/57 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/ /68		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P11/00 A61P11/06 C12N9/6478		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/12 A61P11/06 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/68 C12N5 /00.A A61K37/54 A61K37/02 A61K38/00 A61K38/46 A61K38/48 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB08 4B024 /AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063 /QA05 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS36 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084 /BA35 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC02 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084 /ZA422 4C084/ZA592 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086 /AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA28 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA42 4C086 /ZA59 4C086/ZC19 4C086/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/056480 1997-08-21 US 09/111727 1998-07-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供ASP5多肽和多核苷酸。一种ASP5多肽，其包含与特定序列的氨基酸序列具有至少70%同一性，并且与另一特定序列的核苷酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。得到包含核苷酸序列的ASP5多核苷酸。[效果] ASP5多肽和多核苷酸可用于治疗功能障碍或疾病，包括高血压，哮喘和此类疾病的诊断检测。

(5) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 9/12	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 31 頁) 最終頁		

(21) 出願番号	特願2003-110822 (P2003-110822)	(71) 出願人	597173680
(22) 出願日	平成15年4月15日 (2003. 4. 15)		スミスクライン ビーチヤム コー
(62) 分割の表示	特願平10-236037の分割		ション
原出願日	平成10年8月21日 (1998. 8. 21)		アメリカ合衆国 1 9 1 0 3 ベン
(31) 優先権主張番号	60/056480		ニア州, フィラデルフィア, ワン
(32) 優先日	平成9年8月21日 (1997. 8. 21)		クリン プラザ (番地なし)
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	09/111727		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成10年7月8日 (1998. 7. 8)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
	(特許庁注: 以下のものは登録商標)	(74) 代理人	100107168
	Windows		弁理士 安田 徹夫