

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-514531

(P2006-514531A)

(43) 公表日 平成18年5月11日(2006.5.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 B O 2 9
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-566359 (P2002-566359)	(71) 出願人	301005050 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
(86) (22) 出願日	平成14年2月14日 (2002.2.14)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月13日 (2003.8.13)	(72) 発明者	アストロモフ、アンナ アメリカ合衆国カリフォルニア州94070・サンカルロス・ワインディングウェイ 132
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004918		
(87) 国際公開番号	W02002/066654		
(87) 国際公開日	平成14年8月29日 (2002.8.29)		
(31) 優先権主張番号	60/269, 643		
(32) 優先日	平成13年2月16日 (2001.2.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/271, 332		
(32) 優先日	平成13年2月23日 (2001.2.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/276, 767		
(32) 優先日	平成13年3月16日 (2001.3.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物代謝酵素

(57) 【要約】

【課題】 薬物代謝酵素である精製されたポリペプチドを提供する。

【解決手段】 以下の ( a ) 乃至 ( d ) からなる群から選択した単離されたポリペプチドである。( a ) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、( b ) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一性のある天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、( c ) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、及び( d ) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (a) 乃至 (f) からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO: 1 - 12 (配列番号 1 乃至 12) からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド

(b) SEQ ID NO: 1 - 5 及び SEQ ID NO: 8 - 12 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

(c) SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 93% が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

(d) SEQ ID NO: 7 のアミノ酸配列と少なくとも 97% が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(e) SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片

(f) SEQ ID NO: 1 - 12 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片

10

## 【請求項 2】

SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択したアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

20

## 【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: 13 - 24 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

30

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

## 【請求項 9】

請求項 1 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連結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過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とを含むことを特徴とする方法。

40

## 【請求項 10】

前記ポリペプチドが SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択したアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。

## 【請求項 12】

以下の (a) 乃至 (i) からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

(a) SEQ ID NO: 13 - 24 からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO: 13 - 17 及び SEQ ID NO: 20 - 24 からなる

50

群から選択した或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも90%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO: 18のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも93%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(d) SEQ ID NO: 19のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも97%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(e) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(f) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(g) (c)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(h) (d)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(i) (a) ~ (h)のRNA等価物

10

【請求項13】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項14】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチド群を持つ或るプローブと前記サンプルとをハイブリダイズし、該プローブが、或るハイブリダイゼーション複合体が前記プローブと前記標的ポリヌクレオチド又はその断片群との間に形成される条件下で、前記標的ポリヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズする過程と、

20

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

を含み、

前記プローブと前記標的ポリヌクレオチド又は断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

【請求項15】

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

30

【請求項16】

請求項12に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

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

(b) 前記増幅した標的ポリヌクレオチド又はその断片の有無を検出し、該標的ポリヌクレオチド又はその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程と

を含むことを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項1に記載のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

40

【請求項18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 - 12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つことを特徴とする、請求項17の組成物。

【請求項19】

機能的なDME（新規の薬物代謝酵素）の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、

そのような治療が必要な患者に請求項17の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項20】

50

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

- ( a ) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
  - ( b ) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程と
- を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 2 2】

機能的な D M E の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、

10

そのような治療が必要な患者に請求項 2 1 の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 2 3】

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

- ( a ) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
  - ( b ) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出する過程と
- を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

20

【請求項 2 5】

機能的 D M E の過剰発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、

そのような治療が必要な患者に請求項 2 4 の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 2 6】

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

( a ) 適切な条件下で請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に混合させるステップと、

30

( b ) 請求項 1 に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項 1 に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定するステップと

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 7】

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

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

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

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

40

を含み、

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

【請求項 2 8】

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過程と、

( b ) 前記標的ポリヌクレオチドの、改変された発現を検出する過程と、

50

(c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程と

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸群を有する或る生体サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸群と、請求項 12 のポリヌクレオチドの少なくとも 20 の連続するヌクレオチド群を有する或るプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの或る標的ポリヌクレオチドとの間で或る特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される諸条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項 12 のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列又はその断片を有するポリヌクレオチドである過程と、

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、或る処理されていない生体サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程と

を含み、

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

【請求項 30】

生体サンプル中の D M E の発現に関連する症状又は疾患に対する診断試験法であって、

(a) 前記抗体を前記ポリペプチドと混合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成されるのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項 11 に記載の抗体と結合する過程と、

(b) 前記複合体を検出する過程と

を含み、

前記複合体の存在が、前記生体サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

【請求項 31】

前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) F a b 断片

(d) F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片

(e) ヒト化抗体

のいずれかであることを特徴とする請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 32】

請求項 11 に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項 33】

被検者中の D M E の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、

請求項 32 に記載の組成物の有効量を前記被験者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 34】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 35】

被験者中の D M E の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項 34 に記載の組成物の有効量を前記被験者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項 11 に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、

(a) 抗体応答を誘発する諸条件下で、S E Q I D N O : 1 - 12 からなる群から

10

20

30

40

50

選択した或るアミノ酸配列又はその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体を該ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する或るポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程と

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の方法で産出したポリクローナル抗体。

【請求項 38】

請求項 37 に記載のポリクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。

【請求項 39】

請求項 11 に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を作製する方法であって、

(a) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択した或るアミノ酸配列又はその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から、抗体を産出する細胞を単離する過程と、

(c) 不死化の細胞を用いて前記抗体産出細胞を融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 41】

請求項 40 に記載のモノクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。

【請求項 42】

Fab 発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 43】

組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 44】

SEQ ID NO: 1 - 12 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドをサンプル中で検出する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、或るサンプルと共に請求項 11 に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程と

を含み、

該特異結合が、SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する或るポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

【請求項 45】

SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、或るサンプルと共に請求項 11 に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO: 1 - 12 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程、と

10

20

30

40

50

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 46】

マイクロアレイの少なくとも 1 つのエLEMENT が請求項 13 に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項 47】

ポリヌクレオチドを含むサンプルの発現プロフィールを作成する方法であって、

(a) サンプルのポリヌクレオチドを標識するステップと、

(b) ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、請求項 46 に記載のマイクロアレイの要素をサンプルの標識されたポリヌクレオチドと接触させるステップと

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量するステップと

を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 48】

固体基板上的固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を含むアレイであって、

少なくとも 1 つの前記ヌクレオチド分子が、標的ポリヌクレオチドの少なくとも 30 の連続したヌクレオチドと特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを有し、

前記の標的ポリヌクレオチドが請求項 12 に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

【請求項 49】

請求項 48 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも 30 の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

20

【請求項 50】

請求項 48 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも 60 の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 51】

請求項 48 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

30

【請求項 52】

請求項 48 に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項 53】

請求項 48 に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの最初の配列を含むヌクレオチド分子にハイブリダイズした前記の標的ポリヌクレオチドを有することを特徴とするアレイ。

【請求項 54】

請求項 48 に記載のアレイで、リンカーが少なくとも 1 つの前記のヌクレオチド分子と前記の固体基板を連結していることを特徴とするアレイ。

【請求項 55】

請求項 48 に記載のアレイで、基板上的固有の物理的位置の各々が複数のヌクレオチド分子を含み、任意の単一の固有の物理的位置でのその複数のヌクレオチド分子は同一の配列を有し、基板上的固有の物理的位置の各々は、基板上的別の固有の物理的位置でのヌクレオチド分子の配列とは異なる配列を有するヌクレオチド分子を含むことを特徴とするアレイ。

40

【請求項 56】

SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 57】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 58】

50

- SEQ ID NO : 3 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 59】
- SEQ ID NO : 4 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 60】
- SEQ ID NO : 5 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 61】
- SEQ ID NO : 6 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 62】
- SEQ ID NO : 7 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 63】 10
- SEQ ID NO : 8 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 64】
- SEQ ID NO : 9 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 65】
- SEQ ID NO : 10 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 66】
- SEQ ID NO : 11 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 67】
- SEQ ID NO : 12 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。  
【請求項 68】 20
- SEQ ID NO : 13 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 69】
- SEQ ID NO : 14 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 70】
- SEQ ID NO : 15 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 71】
- SEQ ID NO : 16 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。 30  
【請求項 72】
- SEQ ID NO : 17 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 73】
- SEQ ID NO : 18 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 74】
- SEQ ID NO : 19 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。 40  
【請求項 75】
- SEQ ID NO : 20 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 76】
- SEQ ID NO : 21 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 77】
- SEQ ID NO : 22 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。  
【請求項 78】 50

SEQ ID NO: 23 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 79】

SEQ ID NO: 24 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生又は発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、及び肝臓の疾患を含む胃腸疾患の診断・治療・予防に関する。本発明は更に、薬物代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外因性化合物の効果についての評価に関する。

10

【背景技術】

【0002】

薬物の代謝及び薬物の体内での移動(薬物動態学)は、その効果、毒性、及び他の薬物との相互作用を判定する上で重要である。薬物の吸収、様々な組織への薬物の分布、及び薬物代謝産物の排除の、3つのプロセスが薬物動態を支配している。様々な代謝修飾が、溶解性、受容体との結合性、及び排泄速度を含む、薬物の物理化学的特性及び薬理学的特性の大部分を変容させるため、これらのプロセスは薬物代謝に密接に関係する。薬物を修飾する代謝経路はまた、ステロイド、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、及びビタミン等の、様々な天然基質を受容する。従って、これらの経路における酵素は、天然化合物、薬物、発癌物質、変異誘発物質、及び生体異物の間の生化学的及び薬理学的相互作用の重要な部位となる。

20

【0003】

薬物代謝における遺伝的な差異が、個体間において薬物効果及び毒性のレベルの著しい違いを引き起こすことが以前から知られている。治療指数が狭い薬物又は、コデイン等、生理活性を必要とする薬物の場合、このような遺伝子多型は極めて重要たり得る。更に、有望な新規の薬物が、患者群の一部のみに副作用を引き起こし得るという毒性のため臨床試験で排除されることがよくある。薬物代謝酵素が重要な部分を占める薬理ゲノミクス研究が進歩すれば、薬物の効果及び毒性の疑問に耐え得るツールが発展し、そのような情報が拡大されるであろう(Evans, W. E.及びR. V. Relling (1999) Science 286:487-491を参照)。

30

【0004】

薬物代謝反応は、薬物分子を機能化して更なる代謝のために準備するフェーズI、及びそれに引き続くフェーズIIに分類される。一般に、フェーズIの反応生成物は部分的或いは完全に不活性であり、フェーズIIの反応生成物は主要な排泄種である。しかしながら、フェーズI反応生成物は、投与された元の薬物よりも活性が高い場合があり、この代謝活性化原理がプロドラッグとして利用される(例えば、L-ドパ)。加えて、数種の非毒性化合物(例えば、アフラトキシン、ベンゾ- -ピレン)は、これらの経路を経て毒性中間体へ代謝される。フェーズI反応は通常、薬物代謝における律速段階である。しかし、その化合物又は他の化合物類への事前曝露によって、フェーズI酵素群の発現を誘発させることができ、それによって、代謝経路を経る基質フラックスを増し得る(Klaassen, C. D., 他(1996) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, New York, NY, 113-186; Katzung, B.G. (1995) Basic and Clinical Pharmacology, Appleton 及び Lange, Norwalk, CT, 48-59; Gibson, G.G. 及び P. Skett (1994) Introduction to Drug Metabolism, Blackie Academic and Professional, Londonを参照)。

40

【0005】

薬物代謝酵素(DME)は幅広い基質特異性を有する。これは、多種多様な抗体がそれら

50

の抗原に対して高い特異性を有する免疫系とは対照的である。多様な分子を代謝するDMEの能力によって、代謝のレベルにおいて薬物相互作用の可能性が生まれる。例えば、1化合物による、或るDMEの誘導は、その酵素による他の化合物の代謝に影響し得る。

#### 【0006】

DME類は、それらが触媒する反応の種類、及び関係する補助因子に従って分類されている。フェーズI酵素の主なクラスには、限定するものではないがチトクロームP450及びフラビン含有モノオキシゲナーゼが含まれる。フェーズI型触媒サイクル及び反応に関与するその他の酵素クラスには、限定するものではないが、NADPHチトクロームP450還元酵素(CPR)、ミクロソームチトクロームb5/NADHチトクロームb5レダクターゼ系、フェレドキシン/フェレドキシンレダクターゼレドックス対、アルド/ケト還元酵素、及びアルコールデヒドロゲナーゼが含まれる。フェーズII酵素の主なクラスには、限定するものではないが、UDPグルクロニルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Nアシルトランスフェラーゼ、及びNアセチルトランスフェラーゼが含まれる。

10

#### 【0007】

##### チトクロームP450及びP450触媒サイクル関連酵素

チトクロームP450スーパーファミリー酵素のメンバーは、様々な基質の酸化代謝を触媒する。そのような基質としては、ステロイド、脂肪酸、プロスタグランジン、ロイコトリエン、及びビタミン等の天然化合物や、薬物、発癌物質、変異誘発物質、及び生体異物が含まれる。P450ヘム-チオレートタンパク質としても知られるチトクロームP450は通常、P450含有モノオキシゲナーゼ系と呼ばれる多成分電子伝達鎖における末端酸化酵素として作用する。触媒される特異的反応には、ヒドロキシル化、エポキシ化、N-酸化、スルホキシド化、N-脱アルキル、S-脱アルキル、及びO-脱アルキル、脱硫酸化、脱アミノ化、並びにアゾ、ニトロ、及びN-オキシド基の還元が含まれる。これらの反応は、動物における糖質コルチコイド、コルチゾール、エストロゲン、及びアンドロゲンのステロイド産生や、昆虫における殺虫剤耐性や、植物における除草剤耐性及び花の発色や、微生物による環境浄化バイオレメディエーションに関係する。薬物、発癌物質、変異誘発物質、及び生体異物にチトクロームP450が作用して、解毒或いは、その物質の、より毒性の強い生成物への変換を引き起こし得る。チトクロームP450は肝臓に豊富に存在するが、その他の組織にも出現し、これらの酵素はミクロソームに位置する(ExPASyENZYME EC 1.14.14.1; Prosite PDOC00081 Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature; PRINTS EP450 I E-Class P450 Group I signature; Graham-Lorence, S.及びPeterson, J. A. (1996) FASEB J. 10:206-214を参照)。

20

30

#### 【0008】

400種類のチトクロームP450が、細菌、真菌、植物、及び動物を含む様々な生物において同定されている(Graham-Lorence、前出)。Bクラスは原核生物及び真菌に見られ、Eクラスは細菌、植物、昆虫、脊椎動物、及び哺乳動物に見られる。5つのサブクラス即ちグループが、EクラスチトクロームP450の大きなファミリーの中に含まれる(PRINTS EP450 I E-Class P450 グループ I シグネチャ)。

#### 【0009】

全てのチトクロームP450はヘム補助因子を用いており、構造的特性を共有する。ほとんどのチトクロームP450は、400~530アミノ酸の長さである。この酵素の二次構造は、約70%のヘリックスと約22%のシートである。このタンパク質のC末端部におけるヘム結合部位の周りの領域は、全てのチトクロームP450で保存されている。このヘム-鉄結合領域におけるアミノ酸10個のシグネチャ配列が同定され、この配列には、第5の配位部位にある、ヘム鉄の結合に関与する保存されたシステインが含まれる。真核生物チトクロームP450では、通常は膜貫通領域がこのタンパク質の初めの15~20のアミノ酸において見られ、一般に、約15の疎水性残基及びそれに続く正に帯電した残基からなる(Prosite PDOC00081前出; Graham-Lorence前出を参照)。

40

#### 【0010】

50

チトクロームP450酵素は、細胞増殖及び発達に関係する。この酵素は、化学物質を代謝して、DNAとの付加体を形成する反応性中間体にすることで起こる化学的な変異誘発及び発癌において役割を持つ (Nebert, D. W.及びGonzalez, F. J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:945-993)。これらの付加体は、発癌に導く、ヌクレオチド変化及びDNA再編成を引き起こし得る。肝臓及びその他の組織におけるチトクロームP450の発現は、多環式芳香族炭化水素、ペルオキシソーム増殖因子、フェノバルビタール、及び糖質コルチコイドデキサメタゾン等、生体異物によって誘発される (Dogra, S. C.他 (1998) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25:1-9)。或るチトクロームP450タンパク質は、P450遺伝子CYP1B1における突然変異が原発性先天性緑内障を引き起こすように、眼の発達に關与する可能性がある (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) \*601771 Cytochrome P450, subfamily 1 (dioxin-inducible), polypeptide 1; CYP1B1)。

10

## 【0011】

チトクロームP450は炎症及び感染に関係する。肝チトクロームP450活性は、様々な感染及び炎症性の刺激によって大いに影響され、抑制される活性と誘発される活性がある (Morgan, E. T. (1997) *Drug Metab. Rev.* 29:1129-1188)。in vivoで観察される効果は、炎症誘発性のサイトカイン及びインターフェロンによって模倣され得る。2つのチトクロームP450タンパク質に対する自己抗体は、自己免疫性多腺性内分泌不全症I型 (APECED、1種が多腺性自己免疫症候群) の患者に見られた (OMIM \*240300 Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy)。

## 【0012】

チトクロームP450類における突然変異は、乳幼児期の副腎障害で最も多い先天性副腎過形成や、偽ビタミンD欠乏くる病、脳髄黄色腫症 (進行性神経機能障害、早発性アテローム性動脈硬化症、及び白内障によって特徴付けられる、1種の脂質貯蔵病)、抗凝血薬であるクマリン及びワルファリンに対する遺伝性の耐性を含む、種々の代謝障害に結び付けられる (Isselbacher, K.J.他 (1994) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, Inc. New York, NY, 1968-1970; Takeyama, K.他 (1997) *Science* 277:1827-1830; Kitanaka, S.他 (1998) *N. Engl. J. Med.* 338:653-661; OMIM \*213700 Cerebrotendinous xanthomatosis; 及び OMIM #122700 Coumarin resistance)。チトクロームP450タンパク質アロマターゼの、極度に高レベルの発現が、重度の女性化乳房 (gynecomastia, feminization) を有する1少年の層状線維化肝細胞癌 (fibrolamellar hepatocellular carcinoma) に見られた (Agarwal, V.R. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:1797-1800)。

20

30

## 【0013】

チトクロームP450触媒サイクルは、NADPHチトクロームP450レダクターゼ (CPR) によるチトクロームP450の還元によって完了する。チトクロームb5とNADPHチトクロームb5レダクターゼとからなる別のミクロソーム電子伝達系は、チトクロームP450触媒サイクルへの電子の主要な供与体ではないと一般に思われている。しかしながら、Lamb, D.C.他 (1999; *FEBS Lett.* 462:283-288) による近年の研究報告は、ミクロソームチトクロームb5/NADPHチトクロームb5レダクターゼ系によって効果的に還元及びサポートされ得る或る鷲口瘡カンジダ (*Candida albicans*) チトクロームP450 (CYP51) を同定する。従って、この代替電子供与系によってサポートされる多くのチトクロームP450が存在すると思われる。

40

## 【0014】

チトクロームb5レダクターゼはまた、赤血球細胞において、酸化されたヘモグロビン (酸素を輸送できない、メトヘモグロビンすなわちferrihemoglobin) を、活性型ヘモグロビン (ferrohemoglobin) へ還元する。酸化剤又は、十分に還元されていない異常ヘモグロビン (ヘモグロビンM) が高いレベルで存在すると、メトヘモグロビン血症が引き起こされる。メトヘモグロビン血症はまた、赤血球チトクロームb5レダクターゼの遺伝的な欠損症からも起こり得る (概説はMansour, A.及びLurie, A.A. (1993) *Am. J. Hematol.* 42:7-12を参照)。

## 【0015】

50

チトクロームP450ファミリーのメンバーはまた、ビタミンDの合成及び異化に密接に関係している。ビタミンDは、植物組織で生成されるエルゴカルシフェロール（ビタミンD<sub>2</sub>）及び動物組織で生成されるコレカルシフェロール（ビタミンD<sub>3</sub>）の、2種の生物学的に等価なプロホルモンとして存在する。後者のコレカルシフェロールは、7-デヒドロコレステロールが近紫外線（すなわち290~310 nm）に曝露されると形成される。通常は、皮膚が短時間日光に曝されれば生成される（概説はMiller, W.L.及びPortale, A.A. (2000) *Trends Endocrinol. Metab.* 11:315-319を参照）。

#### 【0016】

両方のプロホルモン型は、肝臓において酵素25-ヒドロキシラーゼによって25-ヒドロキシビタミンD（25(OH)D）へ更に代謝される。25(OH)DはビタミンDの最も豊富に存在する前駆体であって、腎臓において酵素25-ヒドロキシビタミンD 1-ヒドロキシラーゼ（1-ヒドロキシラーゼ）によって、更に代謝されて活性型の1,25-ジヒドロキシビタミンD（1,25(OH)<sub>2</sub>D）になる。1,25(OH)<sub>2</sub>D生成の調節は主に、合成経路の、この最終ステップで行われる。1-ヒドロキシラーゼ活性は、酵素産物（1,25(OH)<sub>2</sub>D）の循環レベル、並びに副甲状腺ホルモン（PTH）、カルシトニン、インスリン、カルシウム、リン、成長因子、及びプロラクチンのレベルを含む、幾つかの生理学的因子に左右される。更に、腎臓外での1-ヒドロキシラーゼ活性が報告され、組織特異的かつ局所的な、1,25(OH)<sub>2</sub>D生成の調節も生物学的に重要であると考えられる。1,25(OH)<sub>2</sub>Dの24,25-ジヒドロキシビタミンD（24,25(OH)<sub>2</sub>D）への触媒作用は、酵素25-ヒドロキシビタミンD 24-ヒドロキシラーゼ（24-ヒドロキシラーゼ）を伴い、腎臓でも起こる。24-ヒドロキシラーゼはまた、基質として25(OH)Dを利用できる（Shinki, T.他（1997）*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12920-12925; Miller, W.L.及びPortale, A.A.前出、並びにその参考文献）。

#### 【0017】

ビタミンD25-ヒドロキシラーゼ、1-ヒドロキシラーゼ、及び24-ヒドロキシラーゼは全て、NADPH依存性I型（ミトコンドリア）チトクロームP450酵素であって、そのファミリーの他のメンバーとの高い相同性を示す。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼはまた、幅広い基質特異性を示し、胆汁酸中間体の26-ヒドロキシル化及び、コレステロールの25-ヒドロキシル化、26-ヒドロキシル化、及び27-ヒドロキシル化をも行う可能性がある（Dilworth, F.J.他（1995）*J. Biol. Chem.* 270:16766-16774; Miller, W.L.及びPortale, A.A.前出、並びにその参考文献）。

#### 【0018】

ビタミンDの活性型（1,25(OH)<sub>2</sub>D）は、カルシウム及びリン酸の恒常性に関与し、骨髄性細胞及び皮膚細胞の分化を促進する。ビタミンDの代謝に関与する酵素（例えば、1-ヒドロキシラーゼ）の欠損によって生じるビタミンDの欠乏は、低カルシウム血症、低リン酸血症、ビタミンD依存性（感受性）くる病（骨密度の低下並びに、あひる歩行を伴う内反膝すなわちO脚という特有の症状を示す疾患）を引き起こす。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼの欠損は、脳髄黄色腫症（アキレス腱、脳、肺、及びその他の多くの組織におけるコレステロール及びコレスタノールの沈着という特徴をもつ脂質貯蔵病）を引き起こす。この疾患は、進行性神経機能障害（思春期後の小脳性運動失調症を含む）、アテローム性動脈硬化症、及び白内障を示す。ビタミンD25-ヒドロキシラーゼの欠損によってくる病が起きないことから、25(OH)D合成の別の経路が存在することが推定される（Griffin, J. E.及びZerwekh, J. E. (1983) *J. Clin. Invest.* 72: 1190-1199; Gambin, G. T.他（1985）*J. Clin. Invest.* 75 : 954-960 ; 及びMiller, W. L.及びPortale, A. A.前出）。

#### 【0019】

フェレドキシン及びフェレドキシンレダクターゼは電子伝達アクセサリタンパク質であって、少なくとも1つのヒトチトクロームP450種（CYP27遺伝子によってコードされるチトクロームP450c27）をサポートする（Dilworth, F. J.他（1996）*Biochem. J.* 320:267-71）。ストレプトマイセス グリセウスチトクロームP450であるCYP104D1は、大腸菌に

において非相同的に発現され、内因性フェレドキシン及びフェレドキシンレダクターゼ酵素によって還元される (Taylor, M.他 (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 263:838-42)。このことから、多くのチトクロームP450種が、フェレドキシン/フェレドキシンレダクターゼ対によってサポートされることが示唆される。フェレドキシンレダクターゼはまた、或るモデル薬物代謝系に見られ、抗腫瘍性抗生物質であるアクチノマイシンDを反応性フリーラジカル種に還元することが知られている (Flitter, W.D.及びMason, R.P. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 267:632-639)。

#### 【 0 0 2 0 】

##### ジメチルアミノヒドロラーゼ

NG, NG-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ (DDAH) は、内因性一酸化窒素シンターゼ (NOS) インヒビターである、NG-モノメチル-アルギニン及び NG, NG-ジメチル-L-アルギニンを加水分解してL-シトルリンにする酵素である。DDAHが阻害されると、NOSが阻害されるのに十分な濃度までNOSインヒビターの細胞内濃度が増加する。したがって、DDAH阻害によってNOS阻害の方法が提供され、DDAH活性の変化が一酸化窒素生成における病態生理学的な変化に関与しているであろう (MacAllister, R.J., 他 (1996) Br. J. Pharmacol. 119: 1533-1540)。DDAHは細胞骨格異常を示す神経細胞及びアルツハイマー病における酸化ストレスに発見されている。同年齢の対照例の神経細胞には、DDAHは発見されていない。これは酸化ストレスや一酸化窒素に媒介される現象がアルツハイマー病の病因に関与していることを示唆する (Smith, M.A.他 (1998) Free Radic. Biol. Med. 25: 898-902)。

10

20

#### 【 0 0 2 1 】

##### フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)

フラビン含有モノオキシゲナーゼは、異例な範囲の基質群の、求核性の窒素、硫黄、及びリンのヘテロ原子を酸化する。チトクロームP450と同様に、FMOはミクロソーム酵素であり、NADPH及び $O_2$ を用い、その基質がチトクロームP450の基質と広範に重なる。FMOは、肝臓、腎臓、及び肺などの組織に分布している。

#### 【 0 0 2 2 】

組織特異的に発現される、5つの異なった既知のFMOアイソフォーム (FMO1、FMO2、FMO3、FMO4、及びFMO5) が哺乳動物に見られる。これらのアイソフォームは基質特異性が異なり、更に様々な化合物による阻害及び、反応の立体特異性等、他の特性も異なる。FMOは、アミノ酸13個のシグネチャ配列を有し、その成分はN末端の3分の2の配列にまたがる。それら成分には、また、多くのNヒドロキシル化酵素に見られるFATGYモチーフ、及びFAD結合領域を含む (Stehr, M.他 (1998) Trends Biochem. Sci. 23:56-57; PRINTS FM OXYGENASE Flavin-containing monooxygenase signature)。

30

#### 【 0 0 2 3 】

特異的な反応には、求核性三級アミンのNオキシドへの酸化、二級アミンのヒドロキシルアミン及びニトロンの酸化、一級アミンのヒドロキシルアミン及びオキシムへの酸化、及び硫黄含有化合物及びホスフィンのS-オキシド及びP-オキシドへの酸化が含まれる。ヒドラジン、ヨウ化物、セレン化物、及び硼素含有化合物も基質である。FMOは化学的にチトクロームP450に類似しているが、FMOは例えばその高い熱不安定性及びチトクロームP450の非イオン界面活性剤感受性に基づいて *in vitro* でチトクロームP450から通常は区別できる。しかしながら、FMOのアイソフォーム間で熱安定性及び界面活性剤感受性が異なるため、これらの特性を同定に用いるのは困難である。

40

#### 【 0 0 2 4 】

FMOは、幾つかの薬物及び生体異物の代謝において重要な役割を果たす。FMO (肝臓FMO3) は、(S)ニコチンの(S)ニコチンN-1'-オキシド (尿中に排泄) への代謝を主に担う。FMOはまた、胃潰瘍の治療に広く用いられている $H_2$ -アンタゴニストであるシメチジンのS-酸素化に関与する。FMOの肝臓発現型は、チトクロームP450と同じ調節制御下でない。例えば、ラットにおいて、フェノバルビタール処理によりチトクロームP450が誘導されるが、FMO1は抑制される。

50

## 【 0 0 2 5 】

FM0の内因性基質としては、システアミン（二硫化物であるシスタミンへ酸化される）及び、トリメチルアミンN-オキシドへ代謝されるトリメチルアミン（TMA）が含まれる。TMAは腐った魚のような臭いがし、FM03アイソフォームの突然変異によって、悪臭がする遊離アミンが大量に汗、尿、及び呼吸から排出されるようになる。これらの症状が、魚臭症候群の名を生んだ（OMIM 602079 Trimethylaminuria）。

## 【 0 0 2 6 】

リジルオキシダーゼ

リジルオキシダーゼ（リジン6-オキシダーゼ、L0）は、コラーゲンとエラスチンとの架橋結合による結合組織マトリクスの形成に關与する銅依存性アミノキシダーゼである。L0は、約50 kDaのNグリコシル化された前駆体タンパク質として分泌され、或るメタロプロテアーゼによって切断され成熟型の酵素と成るが、この前駆体も活性である。L0内の銅原子は、酸素へ、また酸素からの電子の伝達に關与し、これらの細胞外マトリクスタンパク質においてリジン残基の酸化的脱アミノ反応を促進する。銅の配位がL0活性に必須であるが、食事による銅の摂取が不十分でも、このアポ酵素の発現はその影響を受けない。しかし、機能的L0の欠乏は、食餌性銅欠乏に伴う、骨格組織及び血管組織の障害に結び付けられる。L0はまた、様々なセミカルバジド、ヒドラジン、及びアミノ亜硝酸（amino nitrites）、並びにヘパリンによって阻害される。-アミノプロピオニトリルは、一般に用いられるインヒビターの1つである。L0の活性は、オゾンやカドミウムに応答して増大し、また、局所組織外傷に응答して放出されるホルモンのレベルの上昇に응答して増大する。このようなホルモンの例には、トランスフォーミング成長因子-、血小板由来成長因子、アンジオテンシンII、及び線維芽成長因子等が含まれる。L0活性における異常は、メンケス症候群及び後角症候群（occipital horn syndrome）に結び付けられる。サイトゾル型のL0酵素は、異常な細胞増殖に關係すると思われる（概説はRucker, R. B.他（1998）Am. J. Clin. Nutr. 67:996S-1002S及びSmith-Mungo, L. I.及びKagan, H. M.（1998）Matrix Biol. 16:387-398を参照）。

## 【 0 0 2 7 】

ジヒドロ葉酸レダクターゼ

ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）は遍在性の酵素であって、ジヒドロ葉酸の、テトラヒドロ葉酸へのNADPH依存性の還元を触媒するが、この反応はグリシンとプリン類とのde novo合成、並びにデオキシウリジナーリン酸（dUMP）のデオキシチミジナーリン酸（dTMP）への変換における、必須過程である。この基本的な反応は、 $7,8\text{-ジヒドロ葉酸} + \text{NADPH} \rightarrow 5,6,7,8\text{-テトラヒドロ葉酸} + \text{NADP}^+$  である。

## 【 0 0 2 8 】

DHFR酵素は、トリメトプリム trimethoprim 及びメトトレキセートなど、様々なジヒドロ葉酸類似体によって阻害され得る。豊富なdTMPがDNA合成に必要であるため、迅速な細胞分裂にはDHFR活性が必要である。DNAウイルス（例えば、ヘルペスウイルス）の複製にも、高いレベルのDHFR活性を必要とする。そのため、DHFRを標的とする薬物が、癌の化学療法や、DNAウイルス複製の抑制に用いられている（同様の理由で、チミジル酸シンターゼ類も標的酵素である）。DHFRを抑制する薬物は、急激に分裂する細胞（すなわちDNAウイルス感染細胞）に対して優先的な細胞毒性を持つが、特異性を持たず、分裂する細胞を無差別に破壊する。更に、癌細胞は、獲得性の輸送欠陥、又は1つ以上のDHFR遺伝子の複製（duplication）の結果として、メトトレキセート等の薬物に対して耐性を有するようになり得る（Stryer, L.（1988）Biochemistry. W.H Freeman and Co., Inc. New York. 511-5619）。

## 【 0 0 2 9 】

アルド/ケト還元酵素

アルド/ケト還元酵素類は、単量体NADPH依存性オキシドレダクターゼであって幅広い基質特異性を有する（Bohren, K. M.他（1989）J. Biol. Chem. 264:9547-9551）。これらの酵素は、カルボニル含有糖及び芳香族化合物など、カルボニル含有化合物の、対応す

るアルコールへの還元を触媒する。従って、様々なカルボニル含有薬物及び生体異物はこのクラスの酵素によって代謝されると思われる。

#### 【0030】

ファミリーメンバーであるアルドースレダクターゼによって触媒される既知の或る反応は、グルコースがソルビトールへ還元され、更にソルビトールデヒドロゲナーゼによってフルクトースに代謝される。通常の条件下で、グルコースのソルビトールへの還元は主な経路ではない。しかしながら、高血糖状態では、ソルビトールの蓄積は糖尿病合併症の発症に関係すると思われる (OMIM \*103880 Aldo-keto reductase family 1, member B1)。この酵素ファミリーのメンバーらはまた、数種の肝癌で高度に発現される (Cao, D.他 (1998) J. Biol. Chem. 273:11429-11435)。

10

#### 【0031】

##### アルコールデヒドロゲナーゼ

アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) は、単純アルコールを酸化して対応するアルデヒドにする。ADHはサイトゾル酵素であって、補助因子NAD<sup>+</sup>を好み、また亜鉛イオンに結合する。ADHのレベルは肝臓において最も高く、腎臓、肺、及び胃粘膜においては低い。

#### 【0032】

既知のADHアイソフォームは、40 kDaのサブユニットからなる二量体タンパク質である。これらのサブユニットをコードする5つの既知の遺伝子座 (a、b、g、p、c) が存在し、その内の幾つかは特徴的な対立遺伝子変異体 (b1、b2、b3、g1、g2) を有する。サブユニットはホモ二量体及びヘテロ二量体を形成することができ、サブユニットの構成によって活性な酵素の特異的特性が決定される。従って、ホロ酵素がクラスI (サブユニット構成、aa、ab、ag、bg、gg)、クラスII (pp)、及びクラスIII (cc) として分類されている。クラスI ADHイソ酵素はエタノールその他の小さい脂肪族アルコールを酸化し、ピラゾールによって阻害される。クラスIIイソ酵素は長鎖の脂肪族アルコール及び芳香族アルコールを好み、メタノールを酸化できない。また、ピラゾールによって阻害されない。クラスIIIイソ酵素は、更に長い長鎖脂肪族アルコール (5炭素以上) 及び芳香族アルコールを好み、ピラゾールによって阻害されない。

20

#### 【0033】

短鎖アルコールデヒドロゲナーゼには、様々な基質特異性を有する多数の近縁酵素が含まれる。このグループに含まれるものは哺乳動物酵素であるD- -ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、(R)-3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、15-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ、NADPH-依存性カルボニルレダクターゼ、コルチコステロイド11- -デヒドロゲナーゼ、エストラジオール-17- -デヒドロゲナーゼ、細菌酵素であるアセトアセチル-CoAレダクターゼ、グルコース1-デヒドロゲナーゼ、3- -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、20- -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、リビトールデヒドロゲナーゼ、3-オキソアシルレダクターゼ、2,3-ジヒドロ-2,3-ジヒドロキシ安息香酸デヒドロゲナーゼ、ソルビトール-6-リン酸2-デヒドロゲナーゼ、7- -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、cis-1,2-ジヒドロキシ-3,4-シクロヘキサジエン-1-カルボン酸デヒドロゲナーゼ、シス-トルエンジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ、シス-ベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、ピフェニル-2,3-ジヒドロ-2,3- -ジオールデヒドロゲナーゼ、N-アシルマンノサミン1-デヒドロゲナーゼ (N-acylmannosamine 1-dehydrogenase)、及び2-デオキシ-D-グルコン酸3-デヒドロゲナーゼがある (Krozowski, Z. (1994) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 51:125-130; Krozowski, Z. (1992) Mol. Cell Endocrinol. 84:C25-31; 及びMarks, A.R.他 (1992) J. Biol. Chem. 267:15459-15463)。

30

40

#### 【0034】

##### UDPグルクロニルトランスフェラーゼ

UDPグルクロニルトランスフェラーゼファミリー (UGT) のメンバーは、補助因子ウリジン二リン酸-グルクロン酸 (UDP-グルクロン酸) から基質へのグルクロン酸基の転移を触媒する。この転移は、通常は求核性ヘテロ原子 (O、N、又はS) に対して行われる。基質

50

の例には、フェーズI反応によって機能的になった生体異物並びに、ビリルビン、ステロイドホルモン、及び甲状腺ホルモン等、内因性化合物が含まれる。グルクロン酸抱合の生成物は、基質の分子量が約250 g/mol未満であれば尿中に排泄されるが、グルクロン酸抱合された基質がそれより大きい場合は胆汁に排泄される。

#### 【0035】

UGTは肝臓、腎臓、腸、皮膚、脳、脾臓、及び鼻粘膜のミクロソームに存在する。これらの位置でUGTは、チトクロームP450酵素及びフラビン含有モノオキシゲナーゼとは小胞体膜の同じ側にあるため、フェーズI薬物代謝の生成物への到達に理想的な位置にある。UGTは、そのUGTを小胞体膜に固着するC末端膜貫通ドメイン並びに、そのC末端部分における約50のアミノ酸残基の保存されたシグネチャドメインを有する (Prosites PD0C00359 UDP-glycosyltransferase signature)。

10

#### 【0036】

薬物代謝に関係するUGTは、UGT1及びUGT2の2つの遺伝子ファミリーによってコードされる。UGT1ファミリーのメンバーは、補助因子結合及び膜挿入に関係する定常領域、及び可変基質結合ドメインを有する、単一の遺伝子座の選択的スプライシングによって生じる。UGT2ファミリーのメンバーは異なる複数の遺伝子座によってコードされ、UGT2A及びUGT2Bの2つのファミリーに分類される。2Aサブファミリーは嗅上皮で発現し、2Bサブファミリーは肝臓ミクロソームで発現する。UGT遺伝子における突然変異は、高ビリルビン血症 (OMIM# 143500 Hyperbilirubinemia I)、出生時からの著しい高ビリルビン血症によって特徴付けられるクリグラー - ナジャー症候群 (OMIM# 218800 Crigler-Najjar syndrome)、ジルベール病と呼ばれる軽度の高ビリルビン血症 (OMIM \*191740 UGT1) に関係する。

20

#### 【0037】

##### スルホトランスフェラーゼ

硫酸抱合はO-グルクロン酸抱合を受ける基質と同じ基質の多くに生じ、高水溶性の硫酸エステルが生成される。スルホトランスフェラーゼ (ST) は、補助因子3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸 (PAPS) から基質へSO<sub>3</sub><sup>-</sup>を転移することにより、この反応を触媒する。STの基質は主にフェノール及び脂肪族アルコールであるが、抱合して対応するスルファミン酸を生成する芳香族アミン及び脂肪族アミンも含まれる。これらの反応による生成物は主に尿中に排泄される。

#### 【0038】

STは、肝臓、腎臓、腸管、肺、血小板、及び脳を含む様々な組織に見られる。ST酵素は、一般にサイトゾル酵素であって、多数の型が同時に発現される場合が多い。例えば、12種類を越えるSTの型がラットの肝サイトゾルに存在する。これらの生化学的に特徴付けられたSTは、それらの基質選択性に基づいて、アリールスルホトランスフェラーゼ、アルコールスルホトランスフェラーゼ、エストロゲンスルホトランスフェラーゼ、チロシンエステルスルホトランスフェラーゼ、及び胆汁酸塩スルホトランスフェラーゼの5つのクラスに分類される。

30

#### 【0039】

ST酵素活性は、ラットでは性別及び年齢によって著しく異なる。発生の合図 (developmental cues) と性関連ホルモン類との効果があいまって、ST発現プロファイルにおけるこれらの差異並びに、チトクロームP450等の他のDMEのプロファイルにおけるこれらの差異を生じさせると考えられている。注目すべきは、ネコにおけるSTの高発現が、UDPグルクロナルトランスフェラーゼ活性のレベルの低下を部分的に補償する。

40

#### 【0040】

STの幾つかの型は、ヒト肝サイトゾルから精製されクローニングされている。熱安定性及び基質選択性が異なった2つのフェノールスルホトランスフェラーゼが存在する。熱安定酵素は、パラニトロフェノール、ミノキシジル、及びアセトアミノフェン等のフェノールの硫酸化を触媒し、熱不安定酵素は、ドーパミン、エピネフリン及びlevadopa等、モノアミン基質を好む。その他のクローニングされたSTには、エストロゲンスルホトランスフェラーゼ及びN-アセチルグルコサミン-6-O-スルホトランスフェラーゼが含まれる。

50

この最後の酵素は、細胞生化学におけるSTの別の主要な役割を例示する。即ち、細胞分化及びプロテオグリカンの成熟に重要となり得る、糖構造の修飾である。実際、或るスルホトランスフェラーゼの遺伝性欠損は、成熟したケラタン硫酸プロテオグリカンの合成不良という特徴をもつ障害である、斑状角膜変性症に関係すると思われる (Nakazawa, K.他 (1984) *J. Biol. Chem.* 259:13751-13757; OMIM \*217800 Macular dystrophy, corneal)。

#### 【0041】

##### ガラクトシルトランスフェラーゼ

ガラクトシルトランスフェラーゼ類は、グリコシルトランスフェラーゼ(糖転移酵素)のサブセットであり、溶液に遊離している糖脂質又は糖タンパク質の一部であるN末端アセチルグルコサミン(GlcNAc)オリゴ糖鎖にガラクトース(Gal)を転移する(Kolbinger, F.他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:433-440; Amado, M.他 (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1473:35-53)。ガラクトシルトランスフェラーゼは細胞表面で検出される可溶性細胞外タンパク質であり、ゴルジ体にも存在する。1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、Gal(1-3)GlcNAc結合を有するI型糖鎖を形成する。既知のヒト及びマウス1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、短いサイトゾルドメイン、1つの膜貫通ドメイン、及び8つの保存された領域を持つ1つの触媒ドメインを有すると考えられる(Kolbinger, F.前出及びHennet, T.他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:58-65)。マウスUDP-ガラクトース: -N-アセチルグルコサミン1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ-Iでは、領域1がアミノ酸残基の78-83、領域2がアミノ酸残基の93-102、領域3がアミノ酸残基116-119、領域4がアミノ酸残基147-158、領域5がアミノ酸残基の172-183、領域6がアミノ酸残基の203-206、領域7がアミノ酸残基の236-246、領域8がアミノ酸残基の264-275に位置する。マウスUDP-ガラクトース: -N-アセチルグルコサミン1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ-Iの領域8内に存在する1配列の1変異体が、細菌ガラクトシルトランスフェラーゼ類にも存在することから、この配列が、或るガラクトシルトランスフェラーゼ配列モチーフを規定することを示唆する(Hennet, T.前出)。近年の研究は、brainiacタンパク質は1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼであることを示唆している(Yuan, Y.他(1997) *Cell* 88:9-11; 及びHennet, T.前出)。

#### 【0042】

UDP-Gal:GlcNAc-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(-1,4-GalT)(Sato, T.他 (1997) *EMBO J.* 16:1850-1857)は、Gal(1-4)GlcNAc結合を有するII型糖鎖の形成を触媒する。1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの場合と同様に、酵素の可溶型が、膜結合型の切断によって形成される。1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ類に保存されているアミノ酸としては、ジスルフィド結合で連結された2つのシステインと、触媒ドメインにおける推定上のUDP-ガラクトース結合部位とを含む(Yadav, S.及びBrew, K. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:14163-14169; Yadav, S. P.及びBrew, K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:698-703、及びShaper, N. L.他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:31389-31399)。1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、糖タンパク質又は糖脂質上での糖鎖の合成に加えて、いくつかの特化した役割を有する。哺乳動物において、-ラクトアルブミンを有するヘテロ二量体の一部として、或る1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼが、泌乳時の乳腺ラクトース産生において機能する。精子の表面上の1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、卵を特異的に認識する受容体として働く。細胞表面1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ類はまた、細胞接着、細胞/基底膜相互作用、正常な細胞遊走、及び転移性細胞遊走において作用する(Shur, B. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:854-863; 及びShaper, J. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 376:95-104)。

#### 【0043】

##### グルタチオンSトランスフェラーゼ

グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)によって触媒される基本的な反応は、還元型グルタチオン(GSH)での求電子体の抱合である。GSTはホモ二量体又はヘテロ二量体タンパク

10

20

30

40

50

質であって、主にサイトゾルに局在するが、ある程度の活性がミクロソームにも見られる。主なイソ酵素は、共通の構造及び触媒特性を有し、ヒトにおいてそれらは、 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$ 、及び  $\sigma$  の4つの大クラスに分類される。2つの最も大きなクラスである  $\alpha$  及び  $\mu$  は、それぞれのタンパク質等電点 ( $\alpha$  は pI が約 7.5~9.0、 $\mu$  は pI が約 6.6) によって同定される。それぞれの GST は、GSH に対する共通の結合部位及び可変性疎水性結合部位を有する。それぞれのイソ酵素における疎水性結合部位は、特定の求電子性基質に対して特異的である。GST 内の特定のアミノ酸残基が、これらの結合部位及び触媒活性に重要であるとして同定されている。残基 Q67、T68、D101、E104、及び R131 は、GSH の結合に重要である (Lee, H-C 他 (1995) J. Biol. Chem. 270:99-109)。残基 R13、R20、及び R69 は GST の触媒活性に重要である (Stenberg G 他 (1991) Biochem. J. 274:549-555)。

10

## 【0044】

殆どの場合、GST は、潜在的な変異誘発性及び発癌性の化学物質を不活性化し解毒するなど有用な機能を果たす。しかしながら、場合によってはそれらの作用が有害となり、化学物質を活性化させて変異誘発性及び発癌性にし得る。ラット及びヒト GST の幾つかの型は、発癌の検出を助ける、信頼性の高い新生物発生前マーカーである。変異誘発性を調べるための良く知られたエイムス試験に用いられる サルモネラチフィウム などの細菌株におけるヒト GST の発現は、変異誘発におけるこれらの酵素の役割を決定するのに役立つ。マウスにおいて肝腫瘍を引き起こすジハロメタン (dihalomethanes) は、GST によって活性化されると考えられている。この考えは、ジハロメタンはヒト GST を発現する細菌細胞において非形質導入細胞よりも突然変異誘発性が高いということから支持される (Thier, R. 他 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8567-8580)。二臭化エチレン及び二塩化エチレンの変異誘発性はヒト GST である A1-1 を発現する細菌細胞において上昇し、アフラトキシン B1 の変異誘発は GST の発現が増強されることで実質的に減少する (Simula, T. P. 他 (1993) Carcinogenesis 14:1371-1376)。従って、GST 活性の制御が、変異誘発及び発癌の制御において有用であろう。

20

## 【0045】

GST は、多剤耐性 (MDR) として知られている現象である、多くの癌の、薬物治療に対する獲得耐性に関係すると思われる。MDR は、シクロホスファミドなどの細胞毒で治療を受けた癌患者に起こり、その薬物に対する耐性を有するようになった後、更にその他の様々な細胞毒に対しても耐性を有するようになる。GST レベルの上昇は、これらの薬物耐性癌の幾つかに関係する。また、薬剤に応答して GST レベルが上昇した後、GST によって触媒された GSH 抱合反応によりその薬剤が不活性化されると考えられる。次に、上昇した GST レベルにより癌細胞がその他の、GST に結合する細胞毒から保護される。腫瘍における A1-1 のレベルの上昇は、シクロホスファミド治療によって生じた薬物耐性に結び付けられてきた (Dirven H. A. 他 (1994) Cancer Res. 54:6215-6220)。従って、癌組織における GST 活性の調節は、癌患者の MDR 治療に有用であろう。

30

## 【0046】

- グルタミルトランスぺプチダーゼ

- グルタミルトランスぺプチダーゼは広範に発現する酵素であって、 $\gamma$ -グルタミルアミド結合を切断して細胞外のグルタチオン (GSH) の分解を開始させる。GSH の分解は、生合成経路のためにシステインが集まった領域を細胞に提供する。 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼはまた、細胞の酸化防止に寄与し、その発現は酸化ストレスによって引き起こされる。この細胞表面局在糖タンパク質は、癌細胞において高いレベルで発現される。幾つかの研究の示唆するところでは、癌細胞表面での  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼの高度な活性レベルを利用して、前駆薬を活性化し、その結果、抗癌治療薬を局所的に高い濃度に行うことができる (Hanigan, M. H. (1998) Chem. Biol. Interact. 111-112:333-42; Taniguchi, N. 及び Ikeda, Y. (1998) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 72:239-78; Chikhi, N. 他 (1999) Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 122:367-380)。

40

## 【0047】

50

### アシルトランスフェラーゼ

N-アシルトランスフェラーゼ酵素は、アミノ酸抱合体の、活性化したカルボキシル基への転移を触媒する。内因性化合物及び生体異物は、サイトゾル、ミクロソーム及びミトコンドリアにおいて、アシル-CoAシンセターゼによって活性化される。次に、アシル-CoA中間体は、サイトゾル又はミトコンドリアにおけるN-アシルトランスフェラーゼによってアミノ酸（通常はグリシン、グルタミン、又はタウリンであるが、オルニチン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、アスパラギン酸、及びいくつかのジペプチドを含む）と抱合し、アミド結合を有する代謝産物を形成する。この反応はO-グルクロン酸抱合に相補的であるが、アミノ酸抱合は、グルクロン酸抱合によって生じる場合が多い、反応性及び毒性の代謝産物を生成しない。

10

#### 【0048】

胆汁酸-CoA:アミノ酸N-アシルトランスフェラーゼ(BAT)は、このクラスの良く特徴づけられた酵素の1つである。BATは、胃腸管において界面活性剤として作用する、胆汁酸抱合体の生成を担う(Falany, C. N.他(1994) J. Biol. Chem. 269:19375-19379; Johnson, M. R.他(1991) J. Biol. Chem. 266:10227-10233)。BATはまた、部分肝切除の後の肝臓癌患者の予後の予測インジケータとして有用である(Furutani, M.他(1996) Hepatology 24:1441-1445)。

#### 【0049】

### アセチルトランスフェラーゼ

アセチルトランスフェラーゼは、ヒストンのアセチル化における役割について広く研究されている。ヒストンのアセチル化により、真核細胞のクロマチン構造が弛緩し、それによって転写因子が、ゲノムの、影響を受けた領域（又はゲノム全体）におけるDNAの鋳型のプロモーターエレメントに到達できるようになる。これとは対照的に、ヒストンの脱アセチル化により、クロマチン構造が閉じ転写因子の到達が制限されて転写が減少する。この最後に、ヒストンの脱アセチル化を阻害する化学薬品（例えば、酪酸ナトリウム）を細胞転写の刺激の一般的な手段として用いると、人為的結果であるが遺伝子発現が全体的に上昇する。アセチル化による遺伝子発現の調節(modulation)はまた、限定するものではないが、p53、GATA-1、MyoD、ACTR、TFII E、TFII F、及び高移動度群タンパク質(HMG)など、他のタンパク質のアセチル化によっても生じ得る。p53の場合、アセチル化によりDNAへの結合が増大し、p53によって調節される遺伝子の転写が刺激される。プロトタイプのヒストンアセチラーゼ(HAT)は、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)に由来するGcn5である。Gcn5は、テトラヒメナp55、ヒトGcn5、及びヒトp300/CBPを含む、アセチラーゼの1ファミリのメンバーである。ヒストンのアセチル化についてはCheung, W. L.他(2000) Curr. Opin. Cell Biol. 12:326-333及びBerger, S. L(1999) Curr. Opin. Cell Biol. 11:336-341に概説されている。数種のアセチルトランスフェラーゼ酵素は、限定するものではないがアセチルコリンエステラーゼ及びカルボキシルエステラーゼなど幾つかの他の酵素の主なクラスに一般的である、α/βヒドロラーゼフォールド(alpha/beta hydrolase fold) (Center of Applied Molecular Engineering Inst. of Chemistry and Biochemistry - University of Salzburg, <http://predict.sanger.ac.uk/irbm-course97/Docs/ms/>)を有する(Structural Classification of Proteins, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>)。

20

30

40

#### 【0050】

### N アセチルトランスフェラーゼ

芳香族アミン及びヒドラジン含有化合物は、肝臓その他の組織のN-アセチルトランスフェラーゼ酵素によってN-アセチル化される。数種の生体異物は、同じ酵素によってある程度、O-アセチル化され得る。N-アセチルトランスフェラーゼは、補助因子アセチル-補酵素A(アセチル-CoA)を用いて2つの過程でアセチル基を転移するサイトゾル酵素である。第1の過程では、アセチル基がアセチル-CoAから活性部位システイン残基に転移され、第2の過程でアセチル基が基質アミノ基に転移され酵素が再生される。

#### 【0051】

50

他のほとんどのDMEクラスとは対照的に、既知のN-アセチルトランスフェラーゼの数は少ない。ヒトの場合、2つの高度に類似した酵素であるNAT1及びNAT2が存在し、マウスには第3型酵素であるNAT3が存在するようである。N-アセチルトランスフェラーゼのヒト型は、独立した調節（NAT1は広範に発現されるが、NAT2は肝臓及び腸のみに発現される）及び、重複した基質選択性を有する。両方の酵素はある程度まで多くの基質を受容するようであるが、NAT1は数種の基質（パラアミノ安息香酸、パラアミノサリチル酸、スルファメトキサゾール、及びスルファニルアミド）を好み、一方NAT2は他の基質（イソニアジド、ヒドララジン、プロカインアミド、ダブソン、アミノグルテチミド、及びスルファメタジン）を好む。

#### 【0052】

1950年代の、抗結核薬であるイソニアジドを服用した患者らの臨床観察は、この化合物のアセチル化が速い人（fast acetylator）及び遅い人（slow acetylator）の記述を生んだ。これらの表現型は後に、酵素の活性又は安定性に影響を与える、NAT2遺伝子における突然変異によることが示された。イソニアジドのアセチル化が遅い表現型は、中東の集団に非常に優勢（約70%）であり、白人ではやや劣り（約50%）、アジアの集団では25%未満である。近年になって、NAT1における機能的な多型が検出され、検査を受けた集団の約8%が、アセチル化が遅い表現型を示す(Butcher, N. J.他 (1998) *Pharmacogenetics* 8:67-72)。NAT1は数種の既知の芳香族アミン発癌物質を活性化し得るため、広範に発現されるNAT1酵素における多型は、癌のリスクの判定に重要であると考えられる(OMIM \*108345 N-acetyltransferase 1)。

10

20

#### 【0053】

アリールアミンN-アセチルトランスフェラーゼはアリールアミン及び複素環式アミン基質のNアセチル化を触媒し、しばしば、比較的の不活性な化合物を化学的に活性な、腫瘍化を開始する求電子体に変える(Evans, D.A.P. (1993) *Genetic Factors in Drug Therapy: Clinical and Molecular Pharmacogenetics*. Cambridge: Cambridge Univ. Press 211-305に概説されている)。疫学的研究によると、末梢血単核細胞における細胞ゾルのアリールアミンN-アセチルトランスフェラーゼ活性に作用する対立形質変異は、タバコに存在する芳香族アミン発癌物質への曝露から生じる癌を含む特定の形態の癌に対する素因と相関し得る。アリールアミンN-アセチルトランスフェラーゼの活性が比較的少ない形態を有する集団の8%はこれらの癌をあまり発症しないようである(Doll, M.A. 他 (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 584-591; Butcher, N.J. 他 (1998) *Pharmacogenetics* 8:67-72)。

30

#### 【0054】

マイクロソームのアリールアセトアミドデアセチラーゼは、アリールアミンと複素環式基質とについて細胞基質アリールアミンN-アセチルトランスフェラーゼと競合し、また発癌物質の生体内変換を触媒して活性な形態にする。特に、アリールアセトアミドデアセチラーゼは様々な組織において4-アセチルアミノピフェニル、2-アセチルアミノフルオレン、及び2-アセチルアミノフタレンを変換する。補因子は必要でない。この酵素の活性は肝組織において最も高い(Lower, G.M. 及び Bryan, G.T. (1976) *J. Toxicol. Environ. Health* 1:421-32; Probst, M.R. 他 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:21650-6)。

40

#### 【0055】

##### メチルトランスフェラーゼ

細胞基質の、メチル基による共有結合性修飾は、癌及び他の疾患の病理に関連している(Gloria, L. et al. (1996) *Cancer* 78:2300-2306.)。真核生物DNAのシトシン高メチル化は転写活性を妨げる(Turker, M.S. 及び Bestor, T.H. (1997) *Mutat. Res.* 386:119-130)。高等真核生物のmRNAの内部には、N<sup>6</sup>-メチルアデノシンが存在する(Bokar, J.A. 他 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:17697-17704)。高メチル化されたウイルスDNAは感染細胞において低又は半メチル化されたDNAよりも高い割合で転写される(Willis, D.B. 他 (1989) *Cell. Biophys.* 15:97-111)。

#### 【0056】

50

神経インパルスの伝播、細胞増殖及び分化の変調、免疫応答の誘発及び組織恒常性には神経伝達物質の代謝が関与しうる(Weiss, B. (1991) *Neurotoxicology* 12:379-386; Collins, S.M. 他(1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 664:415-424; 及びBrown, J.K. and Imam, H. (1991) *J. Inherit. Metab. Dis.* 14:436-458)。組織において、神経伝達物質の活性を調節する合成及び分解の速度は、酵素と補因子のレベルによって左右される (Brown, J. K. 及び Imam, H. 前出)。神経伝達物質の分子のような小分子分解の多くの経路にはメチルトランスフェラーゼ活性が必要とされる(Kagan, R.M. 及び Clarke, S. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 310:417-427)。例えば、カテコールアミンであるエピネフリン或いはノルエピネフリンの分解にはカテコール O メチルトランスフェラーゼが必要であり、松果体ではN-アセチル-5-ヒドロキシトリプタミンがヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼによってメラトニンに変えられる。カテコール O メチルトランスフェラーゼ及びヒドロキシインドールメチルトランスフェラーゼ遺伝子は選択的開始コドンを有する(Rodriguez, I.R. 他(1994) *J. Biol. Chem.* 269:31969-31977; 及びTenhunen, J. 他(1994) *Eur. J. Biochem.* 223:1049-1059)。

10

20

30

40

50

## 【0057】

S-アデノシルメチオニン(AdoMet)は細胞内でのメチル化反応に重要なメチル基の源である(Bottiglieri, T. 及び Hyland, K. (1994) *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 154:19-26)。メチルトランスフェラーゼ活性は、メチル基の、AdoMet から、ホスホチジルエタノールアミン(phosphotidylethanolamine)又はウイルスmRNAのポリヌクレオチド5' キャップのような受容体分子への転移を触媒する(Montgomery, J.A.他(1982) *J. Med. Chem.* 25: 626-629)。

## 【0058】

タンパク質及び小分子S-アデノシルメチオニンメチルトランスフェラーゼファミリー(AdoMet-MT)のメンバーはAdoMet を基質又は生成物として利用し、三つの共通コンセンサス配列モチーフを抱いている(Kagan 及び Clarke, 前出)。モチーフIとIIは34アミノ酸残基 ~ 90アミノ酸残基の特徴的な間隔(最頻値52、平均 $57 \pm 13$ )をあけて配置されており、モチーフIIとIIIは12残基 ~ 38残基の間隔(最頻値22、平均 $22 \pm 5$ )をあけて配置されている。モチーフIはAdoMet 結合ポケットの一部からなり、モチーフIIもまた、AdoMetの結合に関与し得るが、モチーフIIIの役割は不確かである。間隔をあけるルールの主な例外はRNAメチルトランスフェラーゼと多くのポルフィリン前駆体メチルトランスフェラーゼである。これらの異種遺伝子型モチーフは、メチルトランスフェラーゼや、ゲノムシーケンシングプロジェクトで作成されたオープンリーディングフレーム(open reading frames generated genomic sequencing projects)からの関連酵素の予測に役立つことが示唆されている(Kagan 及びClarke、前出)。

## 【0059】

メッセンジャーRNA<sup>6</sup>-アデノシンメチルトランスフェラーゼ のホロ酵素は一部がHeLa細胞核抽出物から精製されて、875 kDaの ssDNA-アガロース結合タンパク質、70 kDa のAdoMet結合タンパク質、及び約30 kDa の未知の機能を有する成分の、三つのサブユニットが得られている。この三つの構成成分はRNAのm<sup>6</sup>Aメチル化活性に絶対的に必要である (Bokar, J.A., 前出)。

## 【0060】

脳、腸、骨髄、肝臓及び腎臓を含む多くの組織においてセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼはセリンを、セリンのヒドロキシメチル側鎖基をテトラヒドロ葉酸(メチル受容体)に転移させることによって、グリシンに変える。この反応の生成物はN<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-メチレンテトラヒドロ葉酸と水である。N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-メチレンテトラヒドロ葉酸は、組織成長及び細胞増殖時の、新規のプリンヌクレオチド合成やピリミジンヌクレオチド合成に、ホモシステインのメチオニンへの変換に、及びtRNAのメチル化において基質となる。

## 【0061】

成長に関連するメチルトランスフェラーゼの多くをコードする遺伝子はまだ同定されておらず、単離されていない。メチルトランスフェラーゼ反応での律速段階としてのそれら

の役割において、AdoMet-MT類は精神医学的、抗ウイルス性、抗癌性及び抗炎症性薬剤の設計の標的として同定されている(Bottiglieri, T. 及びHyland, K., 前出; Gloria, L. 他、前出)配列特異的メチル化によってEpstein-Barr ウイルスのLMP1 及びBCR2 エンハンサー・プロモータ領域の活性が阻害される(Minarovits, J. 他(1994) *Virology* 200:661-667)インターフェロン処理マウスのL細胞によって合成された、2'-5'-結合したオリゴ(アデニル酸)ヌクレオシド類似体は、抗ウイルス剤として作用する(Goswami, B.B. 他 (1982) *J. Biol. Chem.* 257:6867-6870)。AdoMet-MT のアデニン類似体阻害剤は、核酸のメチル化及び白血病L1210 細胞の増殖を低減した(Kramer, D.L. 他(1990) *Cancer Res.* 50:3838-3842)。

#### 【0062】

実験的神経刺激剤の使用によって、神経伝達物質の不活性化は神経系が正確に機能するために全く欠かせないものである事が示された(Avery, L. 及びHorvitz, H.R. (1990) *J. Ex. Zool.* 253:263-270)。神経伝達物質代謝経路における後成的、或いは遺伝的欠損は、パーキンソン病や遺伝性ミオクロオヌスを含む、異なった組織における広範囲の病態を生じ得る(McCance, K.L. 及びHuether, S.E. (1994) *Pathophysiology*, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, MO 402-404、及び Gundlach, A.L. (1990) *FASEB J.* 4:2761-2766.)。

10

#### 【0063】

##### アミノトランスフェラーゼ

アミノトランスフェラーゼ類は、ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) 依存性酵素の1ファミリを構成する。PLP依存性酵素は、アミノ酸の成分置換を触媒する。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AspAT) は、最も広く研究された PLP-含有酵素である。AspATは、ジカルボキシルL-アミノ酸(アスパラギン酸及びグルタミン酸)、及び対応する2-オキソ酸(オキサロ酢酸、及び2-オキソグルタル酸)の、可逆的なアミノ基転移反応を触媒する。このファミリの他のメンバーには、ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、チロシンアミノトランスフェラーゼ、芳香族アミノトランスフェラーゼ、アラニン:グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (AGT) 及びキヌレニンアミノトランスフェラーゼが含まれる(Vacca, R. A.他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:21932-21937)。

20

#### 【0064】

原発性高シュウ酸尿症I型は、常染色体性劣性疾患であって、肝特異的ペルオキシソーム酵素であるアラニン:グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ-1の欠損が起こる。この疾患の表現型は、グリオキシル酸代謝の欠損である。AGTが存在しない場合、グリオキシル酸はグリシンへアミノ基転移されず、シュウ酸へ酸化される。その結果、腎臓及び尿管に不溶性シュウ酸カルシウムが沈着し、最終的に腎不全が起こる(Lumb, M. J. 他 (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 20587-20596)。

30

#### 【0065】

キヌレニンアミノトランスフェラーゼは、L-トリプトファン代謝産物L-キヌレニンの不可逆的なアミノ転移を触媒してキヌレン酸を形成する。この酵素はまた、L-2-アミノアジピン酸から2-オキソグルタル酸及びその逆への可逆的なアミノ基転移反応を触媒して2-oxoadipate及びL-グルタミン酸を生成し得る。キヌレン酸はグルタミン酸作動性神経伝達の推定上のモジュレーターであるため、キヌレニンアミノトランスフェラーゼの欠損は多面発現的 (pleiotrophic) 効果に関係すると思われる(Buchli, R.他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:29330-29335)。

40

#### 【0066】

##### カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ

カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) は、カテコール基質(例えば、レボドパ、ドーパミン、又はDBA)の1つのヒドロキシル基への、S-アデノシル-L-メチオニン (AdoMet; SAM) 供与体のメチル基の転移を触媒する。3'-ヒドロキシル基のメチル化は4'-ヒドロキシル基のメチル化より優先され、COMTの膜結合アイソフォームは可溶型よ

50

りも位置特異的である。この酵素の可溶性の翻訳は、完全長mRNA (1.5kb) の内部開始コドンの利用によるか、或いは内部プロモータから転写された短いmRNA (1.3kb) の翻訳による。提案されたS<sub>N</sub>2様メチル化反応には、Mg<sup>2+</sup>が必要であり、Ca<sup>2+</sup>によって抑制される。供与体及び基質の、COMTへの結合は逐次的に起こる。まず、AdoMetがMg<sup>2+</sup>非依存的にCOMTに結合し、Mg<sup>2+</sup>の結合及びカテコール基質の結合がそれに続く。

#### 【0067】

組織におけるCOMTの量は活性のために通常必要とされる量より多く存在するため、障害が困難である。しかしながら、インヒビター群は、*in vitro*での使用 (例えば、没食子酸、トロポロン、U-0521、及び3', 4'-ジヒドロキシ-2-メチル-プロピオフェトロポロン: propiophetropolone) 及び臨床での使用 (例えば、nitrocatechol系化合物及びtolcapone) のために開発されている。これらのインヒビターを投与すると、レボドパの半減期が長くなり、続いてドーパミンの生成が起こる。また、COMTの障害により、限定するものではないがエピネフリン/ノルエピネフリン、イソプレナリン、リミテロール、ドブタミン、fenoldopam、アボモルフィン、及び -メチルドパなど、他の様々なカテコール構造化合物の半減期が長くなると思われる。ノルエピネフリンの欠損は臨床的抑鬱症に繋がるため、COMTインヒビターの使用は抑鬱症の治療に有用であると思われる。COMTインヒビターは通常、耐容性が良く副作用が最小限であり、最終的に肝臓で代謝され、体内にはわずかな代謝物が残るのみである (Mannisto, P.T.及びKaakkola, S. (1999) *Pharmacological Reviews* 51:593-628)。

10

#### 【0068】

##### 銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼはコンパクトなホモ二量体金属酵素であって、酸化損傷に対する細胞防御に関係する。この酵素は1つの亜鉛原子及び1つの銅原子を各サブユニットに有し、スーパーオキシドアニオンの、O<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>への不均化反応を触媒する。この不均化反応の速度は、拡散律速されるので、基質と酵素活性部位との間の好ましい静電的相互作用の存在によって増大する。このクラスの酵素の数例が、全て真核細胞の細胞質において同定され、幾つかの細菌種のペリプラズムでも同定された。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ類は強健な酵素であって、蛋白分解的消化や、尿素及びSDSによる変性に対し、高い耐性を持つ。これらの酵素のコンパクトな構造に加えて、金属イオン及びサブユニット内ジスルフィド結合が酵素の安定性に寄与していると考えられている。これらの酵素は70 °Cもの高温でも可逆的に変性する (Battistoni, A.他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:5655-5661)。

20

30

#### 【0069】

スーパーオキシドジスムターゼの過剰発現は、遺伝子組み換えアルファルファの耐凍性を高めるのに関与し、ジフェニルエーテル除草剤であるアシフルオルフェン (acifluorfen) などの環境毒素に対する耐性をも与えると思われる (McKersie, B. D.他 (1993) *Plant Physiol.* 103:1155-1163)。加えて、酵母細胞は、過酸化水素への曝露の後に凍結融解損傷に対する耐性が高まる。これは、曝露によるスーパーオキシドジスムターゼの発現のアップレギュレートにより、酵母細胞が更なる過酸化ストレスに適応するようになるためである。この研究では、酵母スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子群の突然変異は、冷凍保存過程を経て生物が生存するか否かを決定するのに重要であると長い間考えられていたグルタチオン代謝の調節に影響を及ぼす突然変異よりも、凍結融解抵抗性に悪影響を与えた (Jong-In Park, J.-I.他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:22921-22928)。

40

#### 【0070】

スーパーオキシドジスムターゼの発現はまた、結核を引き起こす生物である結核菌に関連する。スーパーオキシドジスムターゼは、結核菌によって分泌される10種の主なタンパク質の内の1つであり、その発現は酸化ストレスに応じて約5倍アップレギュレートされる。結核菌は、非病原性ミコプラズマの恥垢菌 (*M. smegmatis*) よりスーパーオキシドジスムターゼをほぼ2桁多く発現し、極めてより高い比率で、発現された酵素を分泌する。この結果、結核菌は恥垢菌よりも最大350倍多い酵素を分泌し、酸化ストレスに対

50

する実質的な耐性を与える (Harth, G.及びHorwitz, M. A. (1999) J. Biol. Chem. 274: 4281-4292)。

【0071】

銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼの発現の低下、並びに抗酸化能力を有するその他の酵素の発現の低下は初期の癌に関係すると思われる。銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼの発現レベルは、正常な前立腺組織と比べ、前立腺の上皮内新形成及び前立腺癌において低い (Bostwick, D. G. (2000) Cancer 89:123-134)。

【0072】

ホスホジエステラーゼ

ホスホジエステラーゼは、ホスホジエステル化合物の2つのエステル結合の一方の加水分解を触媒する酵素の1クラスを構成する。従って、ホスホジエステラーゼは様々な細胞プロセスにとって重要である。ホスホジエステラーゼには、細胞増殖及び複製に必須であるDNA及びRNAのエンドヌクラーゼ及びエクソヌクラーゼや、DNAのトポロジ再編成中の核酸鎖の分解及び再形成をするトポイソメラーゼが含まれる。或るTyr - DNAホスホジエステラーゼは、トポイソメラーゼI型とDNAとの間に形成されたデッドエンド共有結合中間体を加水分解することでDNAの修復に作用する (Pouliot, J. J.他(1999) Science 286: 552-555; Yang, S.-W. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11534-11539)。

【0073】

酸性スフィンゴミエリナーゼは、膜リン脂質スフィンゴミエリンを加水分解してセラミド及びホスホリルコリンを生成するホスホジエステラーゼである。ホスホリルコリンは、様々な細胞内シグナル伝達経路に関与するホスファチジルコリンの合成に用いられ、一方のセラミドは神経組織に高濃度で見られる膜脂質であるガングリオシドの生成のための必須前駆体である。酸性スフィンゴミエリナーゼが欠損すると、リソソームにおいてスフィンゴミエリン分子が蓄積され、それによってニーマン - ピック病が引き起こされる (Schuchman, E. H.及びS. R. Miranda (1997) Genet. Test. 1:13-19)。

【0074】

グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼ (glycerophosphoryl diester phosphodiesterase) (グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼとも呼ばれる) は、脱アセチル化リン脂質グリセロホスホジエステル (deacetylated phospholipid glycerophosphodiester) を加水分解してsn - グリセロール - 3 - リン酸及びアルコールを生成するホスホジエステラーゼである。グリセロホスホコリン、グリセルホスホエタノールアミン (glycerophosphoethanolamine)、グリセロホスホグリセロール (glycerophosphoglycerol)、及びグリセロホスホイノシトール (glycerophosphoinositol) は、グリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼのための基質の例である。大腸菌由来の或るグリセロホスホリルジエステルホスホジエステラーゼは、グリセロホスホジエステル (glycerophosphodiester) 基質に対して広範な特異性を有する (Larson, T. J.他(1983) J. Biol. Chem. 248:5428-5432)。

【0075】

サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) は、サイクリックヌクレオチドであるcAMP及びcGMPの調節に極めて重要な酵素である。cAMP及びcGMPは、ホルモン、光及び神経伝達物質など、様々な細胞外シグナルを伝達する細胞内セカンドメッセンジャーとして機能する。PDEはサイクリックヌクレオチドをそれらの対応するリン酸に分解し、それによってサイクリックヌクレオチドの細胞内濃度及びシグナル伝達におけるそれらの効果を調節する。それらの役割がシグナル伝達の制御因子であることから、PDEは化学療法の際として大規模に研究された (Perry, M. J.及びG. A. Higgs (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2:472-481; Torphy, J. T. (1998) Am. J. Resp. Crit. Care Med. 157: 351-370)。

【0076】

哺乳動物PDEのファミリーは、基質特異性及び親和性、補助因子に対する感受性、及び抑制剤に対する感受性に基づいて分類される (Beavo, J. A. (1995) Physiol. Rev. 75:725

10

20

30

40

50

-748; Conti, M.他(1995) Endocrine Rev. 16:370-389)。これらのファミリーのいくつかは、固有の遺伝子群を持ち、その多くは様々な組織でスプライス変異体として発現される。PDEファミリーの中には、多数のイソ酵素及びこれらのイソ酵素の多数のスプライス変異体が存在する(Conti, M.及びS.-L. C. Jin (1999) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 63:1-38)。多数のPDEファミリー、イソ酵素、及びスプライス変異体の存在は、サイクリックヌクレオチドが関わる調節経路の多様性及び複雑性を示すものである(Houslay, M. D.及びG. Milligan (1997) Trends Biochem. Sci. 22:217-224)。

#### 【0077】

PDE1型(PDE1)はCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性であって、それぞれが少なくとも2つの異なったスプライス変異体を有する少なくとも3つの異なった遺伝子によってコードされると思われる(Kakkar, R. 他.(1999) Cell Mol. Life Sci. 55:1164-1186)。PDE1は、肺、心臓、及び脳で見出された。数種のPDE1イソ酵素は、*in vitro*でリン酸化/脱リン酸化によって調節される。これらのPDE1イソ酵素をリン酸化すると、カルモジュリンに対するこの酵素の親和性が低下し、PDE活性が低下し、cAMPの定常状態レベルが増大する(Kakkar, 前出)。PDE1は、サイクリックヌクレオチド及びカルシウムのシグナル伝達の両方に関与するので、中枢神経系及び心血管、免疫系の障害のための有用な治療標的を提供し得る(Perry, M. J.及びG. A. Higgs (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2:472-481)。

10

#### 【0078】

PDE2は小脳、新皮質、心臓、腎臓、肺、肺動脈及び骨格筋に存在するcGMP-刺激性PDEである(Sadhu, K. 他(1999) J. Histochem. Cytochem. 47:895-906)。PDE2はカテコールアミン分泌でのcAMPの作用を媒介し、アルドステロン(Beavo, 前出)、の制御に関与し、嗅覚シグナル伝達において役割を果たしていると考えられている(Juilfs, D.M. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3388-3395)。

20

#### 【0079】

PDE3はcGMP及びcAMPの両方に対して高い親和性を有するため、これらのサイクリックヌクレオチドは、PDE3の競合的基質として作用する。PDE3は、心筋収縮能の刺激、血小板凝集の抑制、血管及び気道の平滑筋の弛緩、Tリンパ球及び血管平滑筋培養細胞の増殖抑制、脂肪組織からのカテコールアミン誘導性遊離脂肪酸放出の調節に作用する。ホスホジエステラーゼのPDE3ファミリーは、cilostamide、enoximone、及びlixazinoneなど、特異的インヒビターに対する感受性を有する。PDE3のイソ酵素は、cAMP依存性プロテインキナーゼ又はインスリン依存性キナーゼによって抑制され得る(Degerman, E.他(1997) J. Biol. Chem. 272:6823-6826)。

30

#### 【0080】

PDE4はcAMPに特異的であって、気道平滑筋、血管上皮、及び全ての炎症細胞に局在し、cAMP依存性リン酸化によって活性化され得る。cAMPのレベルの上昇によって、炎症細胞の活性化が抑制され気管支平滑筋が弛緩し得るため、PDE4は、喘息治療の発見に重点を置いて新規の抗炎症剤の可能性のある標的として広範に研究された。PDE4インヒビターは、現在、喘息、慢性閉塞性肺疾患、及びアトピー性湿疹の治療薬として臨床試験が行われている。PDE4の既知の4つ全てのイソ酵素は、マウスの行動記憶を向上させることが示された化合物であるインヒビター、ロリプラムに対して感受性を持つ(Barad, M.他(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15020-15025)。PDE4インヒビターはまた、急性肺傷害、内毒素血症、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、及び様々な神経や胃腸の疾患に対する可能性のある治療薬として研究された(Doherty, A. M. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3:466-473)。

40

#### 【0081】

PDE5は、基質としてのcGMPに対して高い選択性を有し(Turko, I. V.他(1998) Biochemistry 37:4200-4205)、2つのアロステリックcGMP特異的結合部位を有する(McAllister-Lucas, L. M. 他.(1995) J. Biol. Chem. 270:30671-30679)。cGMPのこれらのアロステリック結合部位への結合は、触媒活性の直接的な調節よりもcGMP依存性プロテインキナーゼによるPDE5のリン酸化にとって重要であると思われる。高いレベルのPDE5は、血管平

50

滑筋、血小板、肺、及び腎臓に見られる。インヒビター、ザプリナストはPDE5及びPDE1に対して効果がある。PDE5に対する特異性を得るためにザプリナストを改良してsildenafilが得られた (VIAGRA; Pfizer, Inc., New York NY)。このsildenafilは男性勃起不全の治療薬である (Terrett, N. 他. (1996) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6:1819-1824)。PDE5のインヒビターは、心血管治療薬として現在研究されている (Perry, M. J.及びG. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481)。

#### 【0082】

光受容体サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼであるPDE6類は、光伝達カスケードの重要な要素である。PDE6はGタンパク質トランスデュクションと結合して、cGMPを加水分解して光受容体膜におけるcGMP作動性陽イオンチャンネルを調節する。cGMP結合活性部位に加えて、PDE6はまた、PDE6の機能における調節的な役割を果たすと考えられる2つの高親和性cGMP結合部位を有する (Artemyev, N. O.他(1998) *Methods* 14:93-104)。PDE6の欠損は網膜の疾患に関係する。rdマウスの網膜変性症 (Yan, W.他(1998) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:2529-2536)、ヒトの常染色体性劣性網膜色素変性症 (色素性網膜炎) (Danciger, M.他(1995) *Genomics* 30:1-7)、及びアイリッシュセッター犬の杆状体/錐状体異形成1型 (Suber, M. L.他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3968-3972) は、PDE6B遺伝子における突然変異が原因である。

10

#### 【0083】

PDEのPDE7ファミリーは、複数のスプライス変異体を有する唯一つの既知のメンバーから成る (Bloom, T. J.及びJ. A. Beavo (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14188-14192)。PDE7はcAMP特異的であるが、その他の生理的機能については殆ど知られていない。PDE7をコードするmRNAが骨格筋、心臓、脳、肺、腎臓、及び脾臓で見られるが、PDE7タンパク質の発現は特定の組織型に限定される (Han, P.他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:16152-16157; Perry, M. J.及びG. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481)。PDE7はPDE4ファミリーに密接に関連するが、PDE4の特異的なインヒビターであるロリプラムによって阻害されない (Beavo, 前出)。

20

#### 【0084】

PDE8類はcAMP特異的であり、PDE4ファミリーに密接に関連する。PDE8は、甲状腺、精巣、眼、肝臓、骨格筋、心臓、腎臓、卵巣、及び脳において発現される。PDE8のcAMP加水分解活性は、PDEのインヒビターであるロリプラム、ピンボセチン、ミルリノン、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン)、又はザプリナストによって抑制されないが、PDE8はジピリダモールによって抑制される (Fisher, D. A.他(1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:570-577; Hayashi, M.他(1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:751-756; Soderling, S. H.他(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8991-8996)。

30

#### 【0085】

PDE9類はcGMP特異的であって、PDEのPDE8ファミリーに最も類似している。PDE9は、腎臓、肝臓、肺、脳、脾臓、及び小腸において発現される。PDE9はsildenafil (VIAGRA; Pfizer, Inc., New York NY)、ロリプラム、ピンボセチン、ジピリダモール、又はIBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン) によって抑制されないが、PDE5インヒビターであるザプリナストに対して感受性を有する (Fisher, D. A.他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:15559-15564; Soderling, S. H.他(1998) *J. Biol. Chem.* 273:15553-15558)。

40

#### 【0086】

PDE10類は二重基質PDEであって、cAMP及びcGMPの両方を加水分解する。PDE10は、脳、甲状腺、及び精巣に発現する (Soderling, S.H.他(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7071-7076; Fujishige, K.他(1999) *J. Biol. Chem.* 274:18438-18445; Loughney, K.他(1999) *Gene* 234:109-117)。

#### 【0087】

PDEは、約270 - 300アミノ酸の触媒ドメイン、及び補助因子の結合を担うN末端調節ドメインを含み、場合によっては、機能が未知の親水性C末端ドメインを含む (Conti, M. 及びS.-L. C. Jin (1999) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63:1-38)。全てのP

50

DEの触媒ドメイン中に保存されているある推定亜鉛結合モチーフが同定された。N末端調節ドメインとしては、PDE2、PDE5、及びPDE6における非触媒cGMP結合ドメイン、PDE1におけるカルモジュリン結合ドメイン、及びPDE3及びPDE4におけるリン酸化部位を持つドメインを含む。PDE5中では、N-末端cGMP-結合ドメインは約380のアミノ酸残基にまたがり、或る保存配列モチーフのタンデムリピートを含んでいる (McAllister-Lucas, L.M.他(1993) *J. Biol. Chem.* 268:22863-22873)。このNKXnDモチーフは、cGMP結合に重要であることが変異誘発によって示された (Turko, I. V.他(1996) *J. Biol. Chem.* 271:22240-22244)。PDEファミリーは、触媒ドメイン内において約30%のアミノ酸同一性を有するが、同じファミリー内のイソ酵素は通常約85から95%のこの領域における同一性を示す (例えばPDE4AとPDE4B)。更に、あるファミリー内の触媒ドメイン外の類似性は高いが (60%を超える)、ファミリー間のこのドメイン外の配列類似性は殆ど存在しない。 10

## 【0088】

免疫応答及び炎症応答を構成する機能の多くは、細胞内のcAMPのレベルを上昇させる薬剤によって阻害される (Verghese, M. W.他(1995) *Mol. Pharmacol.* 47:1164-1171)。様々な疾患がPDE活性の上昇が原因で起こり、サイクリックヌクレオチドのレベルの低下に関係する。例えば、マウスにおける尿崩症の或る型はPDE4活性の上昇に関係し、低 $K_m$ cAMP PDE活性の上昇がアトピー患者の白血球に見られ、PDE3が心疾患に関連する。

## 【0089】

PDE類の多くのインヒビターが同定され、臨床試験が行われている (Perry, M. J.及びG. A. Higgs (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:472-481; Torphy, T. J. (1998) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:351-370)。PDE3インヒビター類は、抗血栓剤、血圧降下薬及び、鬱血性心不全の治療に有用な強心薬として開発中である。PDE4インヒビターであるロリプラムは、抑鬱症の治療に用いられ、PDE4のその他のインヒビターは抗炎症薬として評価が行われている。ロリプラムはまた、*in vitro*でHIV-1の複製を増強することが示された、リポ多糖(LPS)誘導性TNF- $\alpha$ を阻害することが分かった。従って、ロリプラムはHIV-1の複製を阻害すると考えられる (Angel, J. B.他(1995) *AIDS* 9:1137-1144)。更に、ロリプラムは、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、及びインターフェロン $\gamma$ など、サイトカインの生成を抑制する能力に基づいて、脳脊髄炎の治療に有効であることが示された。ロリプラムはまた、遅発性ジスキネジアに有効であると考えられ、実験動物モデルにおける多発性硬化症の治療に効果があった (Sommer, N.他(1995) *Nat. Med.* 1:244-248; Sasaki, H.他(1995) *Eur. J. Pharmacol.* 282:71-76)。 20 30

## 【0090】

テオフィリンは、気管支喘息その他の呼吸器疾患の治療に用いられる非特異的PDEインヒビターである。テオフィリンは、気道平滑筋の機能に作用し、呼吸器疾患の治療における抗炎症能力又は免疫調節能力があると考えられる (Banner, K. H.及びC. P. Page (1995) *Eur. Respir. J.* 8:996-1000)。ペントキシフィリンは、間欠性跛行及び糖尿病性末梢血管疾患の治療に用いられる別の非特異的PDEインヒビターである。ペントキシフィリンはまた、TNF- $\alpha$ の生成を阻止することが知られ、また、HIV-1の複製を阻害し得る (Angel他, 前出)。

## 【0091】

PDE類は、様々な細胞型の細胞増殖に影響を与えると報告があり (Conti他(1995) *Endocrine Rev.* 16:370-389)、また様々な癌に関係すると思われる。前立腺癌細胞株DU145及びLNCaPの成長は、cAMP誘導体及びPDEインヒビターの送達によって抑制された (Bang, Y. J.他(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5330-5334)。これらの細胞はまた、上皮からニューロン形態への、表現型における永久的な変換を示した。また、PDEインヒビターがメサングウム細胞の増殖を調節する可能性があり (Matousovich, K.他(1995) *J. Clin. Invest.* 96:401-410)、またリンパ球の増殖を調節する可能性もある (Joulain, C.他(1995) *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 11:63-79)ことが示唆された。或る癌治療は、PDEを腫瘍の特定の細胞区画に送達し、細胞死を導く過程を伴うと記述されている (Deonara in, M. P.及びA. A. Epenetos (1994) *Br. J. Cancer* 70:786-794)。 40 50

## 【0092】

ホスホトリエステラーゼ

ホスホトリエステラーゼ (PTE、paraoxonase) 類の酵素は有毒の有機リン化合物を加水分解し、PTEは種々の組織から単離されている。PTE酵素は、哺乳動物には豊富に存在するが鳥や昆虫では存在しないと思われ、鳥や昆虫の、有機リン化合物に対する耐性の低さの説明となる (Vilanova, E.及びSogorb, M. A. (1999) Crit. Rev. Toxicol. 29:21-57)。ホスホトリエステラーゼは、哺乳動物による殺虫剤の解毒において中心的な役割を果たす。ホスホトリエステラーゼ活性は個人によって差があり、大人より幼児の方が低い。PTEノックアウトマウスは、有機リン系の毒素であるdiazoxon及びchlorpyrifos oxonに対して顕著な感受性を有する (Furlong, C.E.,他(2000) Neurotoxicology 21:91-100)。PTEは、有機リン含有化学廃棄物及び化学兵器 (例えば、パラチオン)、並びに農薬や殺虫剤の解毒能力を有する酵素として注目されている。幾つかの研究により、ホスホトリエステラーゼがアテローム性動脈硬化症及び、リポタンパク代謝に関係する複数の疾患に關与することが示された。

10

## 【0093】

チオエステラーゼ

脂肪酸生合成に係る2つの可溶性チオエステラーゼが、哺乳動物組織から単離された。その一方は長鎖脂肪酸アシルチオエステルに対してのみ活性であり、他方は様々な長さの脂肪酸アシル鎖を有するチオエステルに対して活性である。これらのチオエステラーゼは、脂肪酸の新規生合成における脂肪酸鎖の終結段階を触媒する。脂肪酸鎖の終結段階は、脂肪酸シンターゼのアシルキャリアタンパク質 (ACP) サブユニットの4'-ホスホパンテイン補欠分子族 (prosthetic group) に脂肪酸アシル鎖を結合しているチオエステル結合の加水分解を伴う (Smith, S. (1981a) Methods Enzymol. 71:181-188; Smith, S. (1981b) Methods Enzymol. 71:188-200)。

20

## 【0094】

大腸菌は、長鎖アシルチオエステルに対してのみ活性なチオエステラーゼI型及び、様々な長さの鎖に対して特異性を有するチオエステラーゼII型 (TEII) の、2つの可溶性チオエステラーゼを持つ (Naggert, J.他(1991) J. Biol. Chem. 266:11044-11050)。大腸菌TEIIは、新規の脂肪酸生合成における脂肪酸鎖終結酵素 (chain-terminating enzyme) として機能する哺乳動物チオエステラーゼの2つの型のいずれとも配列類似性を有していない。哺乳動物チオエステラーゼとは異なり、大腸菌TEIIは、特徴的なセリン活性部位 gly - X - ser - X - gly配列モチーフを欠く上に、セリン変性剤であるジソプロピルフルオロリン酸によって不活化されない。しかしながら、ヨードアセトアミド及びジエチルピロカルボネートによるヒスチジン58の修飾によってTEII活性が失われる。TEIIの過剰発現は大腸菌に含まれる脂肪酸を変化させない。これは、脂肪酸生合成において脂肪酸鎖終結酵素として機能していないことを示すものである (Naggert他, 前出)。このような理由から、Naggert他(前出)の提起では、大腸菌TEIIの生理学的基質はACP - ホスホパンテイン脂肪酸エステルではなく補酵素A(CoA)脂肪酸エステルである。

30

## 【0095】

カルボキシルエステラーゼ

哺乳動物カルボキシルエステラーゼ類は、様々な組織及び細胞型で発現される多重遺伝子ファミリーを構成する。アイソザイム群は顕著な配列相同性を持ち、主にアミノ酸配列に基づいて分類される。アセチルコリンエステラーゼ、ブチリルコリンエステラーゼ、及びカルボキシルエステラーゼは、エステラーゼのセリンスーパーファミリー (B-エステラーゼ) にグループ化される。他のカルボキシルエステラーゼとしては、サイログロブリン、トロニン、第IX因子、グリオタクチン (gliotactin)、及びプラスミノゲンがある。カルボキシルエステラーゼは、分子のエステル基及びアミド基の加水分解を触媒し、薬物、環境毒、及び発癌物質の解毒に關与する。カルボキシルエステラーゼの基質としては、短鎖及び長鎖アシルグリセロール、アシルカルニチン、炭酸、塩酸ジピペフリン (dipive frin hydrochloride)、コカイン、サリチル酸、カプサイシン、パルミトイル - CoA、イ

40

50

ミダプリル、ハロペリドール、ピロリジジナルカロイド、ステロイド、p-ニトロフェニル酢酸、マラチオン、butanilicaine、及びイソカルボキサジドが含まれる。この酵素は低い基質特異性を示すことがよくある。カルボキシルエステラーゼはまた、プロドラッグを対応する遊離酸に変換するために重要である。対応する遊離酸は、例えば血中コレステロールを低下させるために用いられるロバスタチンなど、そのプロドラッグの活性型であり得る（概説はSato, T.及びHosokawa, M. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:257-288を参照）。

#### 【0096】

ニューロリギン (neuroigin)類は、(i)N末端シグナル配列を有し、(ii)細胞表面受容体群に類似し、(iii)カルボキシルエステラーゼドメインを持ち、(iv)脳で高度に発現され、(v)カルシウム依存的にニューレキシン類と結合する、分子の1クラスである。カルボキシルエステラーゼ類との相同性を持つものの、ニューロリギン類は活性部位セリン残基を欠き、これらは触媒作用ではなく基質結合において役割を果たすと考えられる (Ichtchenko, K.他(1996) *J. Biol. Chem.* 271:2676-2682)。

10

#### 【0097】

##### スクアレンエポキシダーゼ

スクアレンエポキシダーゼ (スクアレンモノオキシゲナーゼ、SE) は、ミクロソーム膜結合FAD依存性オキシドレドクターゼであって、真核細胞のステロール生合成経路における初めの酸素添加ステップを触媒する。コレステロールは、LDL受容体仲介経路、若しくは生合成経路によって獲得される、細胞質膜の必須の構成成分である。生合成では、コレステロール分子における27全ての炭素原子がアセチル-CoAに由来する (Stryer, L., 前出)。SEはスクアレンを2,3(S)-オキシドスクアレンに変換するが、これは次にラノステロールに変換され、更にコレステロールに変換される。コレステロール生合成に関係するステップを以下に要約する (Stryer, L (1988) *Biochemistry*. W.H Freeman及びCo., Inc. New York. 554-560、及びSakakibara, J.他(1995) 270:17-20)。アセテート (アセチル-CoA由来) 3ヒドロキシ-3-メチル-グルタリルCoA メバロン酸 5-ホスホメバロン酸 5-ピロホスホメバロン酸 イソペンテニルピロリン酸 ジメチルアリルピロリン酸 ゲラニルピロリン酸 ファルネシルピロリン酸 スクアレン スクアレンエポキシド ラノステロール コレステロール。

20

#### 【0098】

コレステロールは真核細胞の生存能力に必須であるが、血清コレステロールのレベルが過度に上昇すると高等生物の動脈ではアテローム斑が形成される。例えば冠状動脈など必須血管の壁部に、この高度に不溶性の脂質の沈着があると、血流が減少して十分な血液が組織に流れなくなり組織壊死が起こり得る。HMG-CoAレダクターゼは、3-ヒドロキシ-3-メチル-グルタリルCoA (HMG-CoA) のメバロン酸への変換を担い、この変換がコレステロール生合成の第1のステップである。HMG-CoAは、血漿コレステロールレベルを低下させるようにデザインされた様々な医薬化合物の標的である。しかし、HMG-CoAの阻害はまた、その他の生化学経路に必要な非ステロール中間体 (例えば、メバロン酸) の合成をも減少させる。SEは、ステロール合成経路の後期に起こる律速反応を触媒し、コレステロールは、SEによる触媒ステップに続く、この経路の唯一の最終産物である。従って、SEは、その他の必要な中間体を減少させない抗高脂血症薬をデザインするための理想的な標的である (Nakamura, Y.他(1996) 271:8053-8056)。

30

40

#### 【0099】

##### エポキシドヒドロラーゼ

エポキシドヒドロラーゼ (加水分解酵素) は、エポキシド含有化合物への水の添加を触媒し、それによってエポキシドがその対応する1,2-ジオールに加水分解される。これらは細菌性ハロアルカンデハロゲナーゼに近縁で、加水分解酵素フォールドファミリの酵素の他のメンバー (例えば、放線菌 (*Streptomyces aureofaciens*) のプロモペルオキシダーゼA2 (bromoperoxidase A2)、*Pseudomonas putida* のヒドロキシムコン酸セミアルデヒド加水分解酵素 (hydroxymuconic semialdehyde hydrolases)、及び *Xanthobacter aut*

50

*otrophicus*の八口アルカンデハロゲナーゼ)に配列類似性を示す。エポキシド加水分解酵素は自然界に遍在しており、哺乳動物、無脊椎動物、植物、真菌及び細菌に存在している。この酵素のファミリーは、生物内に導入されると求電子性が高く破壊性になる場合が多い生体異物エポキシド化合物の解毒にとって重要である。エポキシドヒドロラーゼ反応の例には、*cis*-9,10-epoxyoctadec-9(Z)-enoic acid (ロイコトキシン)の、その対応するジオールである *threo*-9,10-dihydroxyoctadec-12(Z)-enoic acid (ロイコトキシンジオール)を形成する加水分解、及び *cis*-12,13-epoxyoctadec-9(Z)-enoic acid (イソロイコトキシン)からその対応するジオールである *threo*-12,13-dihydroxyoctadec-9(Z)-enoic acid (イソロイコトキシンジオール)への加水分解が含まれる。ロイコトキシンは、膜の透過性とイオン輸送を改変し、炎症応答を引き起こす。加えて、エポキシド発癌物質は、薬物及び環境毒素の解毒における中間体としてチトクロームP450によって生成されることが知られている。

10

## 【0100】

これらの酵素は、Asp(求核性)、Asp(ヒスチジンをサポートする酸)及びHis(水活性化ヒスチジン)からなる、触媒トライアドを有する。エポキシドヒドロラーゼの反応メカニズムは、或る共有結合エステル中間体を経て進み、標的分子のエポキシド環の第1炭素原子に対するAsp残基の1つの求核攻撃によって開始され共有結合エステル中間体が形成される(Arand, M.他(1996) J. Biol. Chem. 271:4223-4229; Rink, R.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14650-14657; Argiriadi, M.A.他(2000) J. Biol. Chem. 275:15265-15270)。

20

## 【0101】

チロシン触媒作用に関与する酵素

コハク酸とピルビン酸か或いはフマル酸とアセト酢酸への、アミノ酸であるチロシンの分解には、多数の酵素が必要であり、多数の中間化合物が生成される。加えて、多くの生体異物化合物は、チロシン異化経路の一部である1つ以上の反応が用いられて代謝され得る。この経路は主に細菌で研究されているが、チロシン分解は様々な生物において起こることが知られ、多数の同様の生物学的反応が関係すると思われる。

## 【0102】

コハク酸とピルビン酸へのチロシンの分解に関係する酵素には(例えばアルスロバクター属: *Arthrobacter* speciesで)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸オキシダーゼ、4-ヒドロキシフェニル酢酸3-ヒドロキシラーゼ(4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase)、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸2,3-ジオキシゲナーゼ(3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase)、5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase)、トランス,シス-5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸イソメラーゼ(trans,cis-5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase)、ホモプロトカテチュ酸イソメラーゼ/デカルボキシラーゼ(homoprotocatechuate isomerase/decarboxylase)、*cis*-2-oxohept-3-ene-1,7-dioate hydratase、2,4-dihydroxyhept-trans-2-ene-1,7-dioate aldolase、及びコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(succinic semialdehyde dehydrogenase)が含まれる。

30

40

## 【0103】

チロシンのフマル酸とアセト酢酸への分解に関係する酵素には(例えばシュードモナス属で)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ、ホモゲンチシン酸-1,2-ジオキシゲナーゼ、マレイルアセト酢酸イソメラーゼ、及びフマリルアセトアセターゼが含まれる。コハク酸/ピルビン酸経路からの中間体が受け入れられた場合は、4-ヒドロキシフェニル酢酸1-ヒドロキシラーゼ(4-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase)が関係し得る。

## 【0104】

様々な生物においてチロシン代謝に関係する更なる酵素の例として、4-クロロフェニル酢酸-3,4-ジオキシゲナーゼ(4-chlorophenylacetate-3,4-dioxygenase)、芳香族ア

50

ミノトランスフェラーゼ、5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase、2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate hydratase、及び5-カルボキシメチル-2-ヒドロキシムコン酸イソメラーゼ(5-carboxymethyl-2-hydroxyuconate isomerase)が挙げられる(Ellis, L. B. M.他(1999) Nucleic Acids Res. 27:373-376; Wackett, L. P. 及び Ellis, L. B. M. (1996) J. Microbiol. Meth. 25:91-93; 及び Schmidt, M. (1996) Amer. Soc. Microbiol. News 62:102)。

#### 【0105】

ヒトにおいて、チロシン分解経路の酵素における後天性或いは先天性の遺伝的欠陥は、遺伝性チロシン血症を引き起こし得る。この疾患の1つの型である遺伝性チロシン血症I型(HT1)は、チロシンをフマル酸とアセト酢酸に代謝する生物における経路の最終酵素であるフマリルアセト酢酸ヒドロラーゼの欠損によって引き起こされる。HT1は幼児期に始まる進行性の肝傷害を特徴としており、肝癌のリスクが高くなる(Endo, F.他(1997) J. Biol. Chem. 272:24426-24432)。

10

#### 【0106】

##### 薬物代謝酵素に関連する疾患の検出と診断へのマイクロアレイの使用

マイクロアレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子又は無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときは、マイクロアレイを用いて或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを試験するときは、マイクロアレイは次のような試験を行うプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、ハウスキーピング機能を行うか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの試験である。

20

遺伝子発現プロファイル作製の潜在的応用は特に、疾患の、診断、予後診断、及び治療の向上に関わる。例えば、大腸癌患者に由来する組織に発現されるレベルと配列との双方を、正常組織に発現されるレベル及び配列と比較しうる。

#### 【0107】

例えば、結腸直腸癌は米国では4番目に発生率の高い癌であり、癌による死の2番目に多い原因となっており、毎年約13万人が新患となり、5万5千人が死亡する。結腸癌と直腸癌は多くの環境危険因子を共有しており、両者とも、特有の遺伝的症候群を有する人々に見られる(結腸直腸癌の概説にはPotter, JD (1999) J Natl Cancer Institute 91:916-932を参照)。結腸癌は男女の発生頻度がおおよそ等しい、唯一の癌である。また米国では結腸癌の診断5年後の生存率は約55%である(Riesら(1990) National Institutes of Health, DHHS Publ No. (NIH)90-2789)。

30

#### 【0108】

結腸癌は遺伝子と環境の両者と因果関係がある。幾つかの分子経路が結腸癌の発生と関係があり、これらの経路いずれかの鍵遺伝子の発現は先天性又は後天性突然変異或いは高メチル化により失われる可能性がある。発現における変化が結腸癌又は結腸癌発症の素因の早期の指標となりうる遺伝子の同定が特に必要とされている。

#### 【0109】

異常なパターンのDNAメチル化がヒトの腫瘍に一貫して発生し、広範なゲノムの低メチル化部分と、局在的にメチル化の増加した部分が同時に含まれることは周知である。特に結腸癌では、結腸癌に先行する前癌性ポリープなど、腫瘍進行においてこれらの変化が早期に発生することが知られる。実に、DNAメチル化を行う酵素であるDNAメチルトランスフェラーゼは、結腸癌又は癌に先行する良性ポリープの患者の組織学的に正常な粘膜で著しく増加する。そしてこの増加は結腸腫瘍の進行中に継続する(Wafik他(1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:3470-3474)。DNAメチル化の増加は、「CpG島」と呼ばれるゲノムDNAのG+Cリッチ領域に生じ、この「CpG島」は遺伝子の周囲の「開いた」転写構造を維持するために重要であり、これらの領域がすると、遺伝子転写を止める「閉じた」構造になる。このようなCpG島の異常メチル化による分化遺伝子の静止又は下方制御によって不死化細胞の分化を防ぎ得ることが示唆されている(Anteguera, F. 他(1990) Cell 62:503-514)。

40

50

## 【 0 1 1 0 】

家族性大腸腺腫症(FAP)は大腸癌に先行するまれな常染色体優性症候群であり、大腸腺腫性ポリポシス(APC)遺伝子の先天性突然変異によって起こる。FAPは平均年齢44才で癌に進行する多発性結腸直腸腺腫の早期発症を特徴とする。APC遺伝子は、APC-β-カテニン-Tcf (T-細胞因子)経路の一部である。この経路の障害により、結腸上皮細胞の規則的な複製化、付着、移動が失われ、ポリープの成長につながる。APC-β-カテニン-Tcf 経路が活性化された後、一連の他の遺伝的变化が続き、正常結腸粘膜から転移性癌への移行を伴う。これらの変化にはK-Rasプロト癌遺伝子の突然変異、メチル化パターンの変化、及び癌抑制遺伝子p53とSmad4/DPC4の突然変異又は喪失が含まれる。突然変異したAPC遺伝子の遺伝は稀な現象であるが、APCの喪失又は突然変異や、APC-β-カテニン-Tcf経路への結果的効果は、一般的集団の大部分の大腸癌患者にとって中心的となると考えられる。

10

## 【 0 1 1 1 】

遺伝性非ポリポシス結腸直腸癌(HNPCC)はFAPほどよく定義されていない表現型の、別の先天性常染色体優性症候群である。結腸直腸癌症例の約2%を占めるHNPCCは癌の早期発症の傾向及び、他の癌、特に子宮内膜、尿路、胃及び胆道系に関連する癌の発症によって区別される。HNPCCは、DNAミスマッチ修復(MMR)経路の1つか複数の遺伝子の突然変異から発生する。2つのヒトMMR遺伝子MSH2及びMLH1の突然変異は、これまでに同定されたHNPCCファミリーの大部分に見出される。DNA MMR経路は複製中のDNAポリメラーゼの作用から生じるエラーを同定し、修復する。更に、MMR活性が喪失されると、アポトーシスを調節するBAX遺伝子及び細胞増殖を制御するTGFβ受容体II遺伝子の喪失などのような他の遺伝子の突然変異及び欠失の蓄積による、癌の進行を生じる。DNA MMR欠損患者では、DNAへの修復できない損傷の可能性があるため、癌への進行は通常より急速である。

20

## 【 0 1 1 2 】

潰瘍性腸炎は大腸癌に対する原因としては小さいが、罹病した患者は癌を発症する危険性が約20倍になる。進行は組織学的に正常な組織においても早期に現れ得るp53遺伝子の喪失を特徴とする。潰瘍性大腸炎から中間のポリープ状態を経ないで異形成/癌へ疾患が進行することは、大腸粘膜における増殖細胞の大腸内容物への曝露から生じた変異原活性が高度であることを示唆する。

## 【 0 1 1 3 】

ほとんどすべての大腸癌は、エストロゲン受容体(ER)遺伝子が沈黙した細胞から発生する。ER遺伝子転写の不活性化は年齢に関係しており、ER遺伝子の高メチル化に関連する(Issa, J-P J 他(1994) Nature Genetics 7:536-540)。培養した結腸癌細胞に外因性ER遺伝子を導入することにより、著しく成長が抑制される。結腸上皮細胞におけるERタンパク質の喪失とその結果の癌発症との間のつながりは確立されていない。

30

## 【 0 1 1 4 】

大腸癌に関連、また、本疾患の発生と進行に、特に遺伝子の下方制御又は欠失に関連する、多数の遺伝子変容が存在することは明らかであり、これら変容は癌発生の早期指標を提供する可能性があり、疾患進行のモニターに又は有望な治療標的の提供にも使用される可能性がある。大腸癌の或る症例に影響した特定の遺伝子群は、この疾患の分子的進行に依存する。大腸癌及び前癌状態に関連する更なる遺伝子を同定することにより、本疾患の発症及び進行に関連する、より信頼できる診断的パターンが得られるであろう。新規の薬物代謝酵素群、及びそれらをコードするポリヌクレオチド群の発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生又は発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、及び肝臓の疾患を含む胃腸疾患の診断・治療・予防において有用であり、また、薬物代謝酵素の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外因性化合物の効果についての評価にも有用である。

40

## 【 発明の開示 】

## 【 発明の効果 】

## 【 0 1 1 5 】

50

本発明は、総称して「DME」、個別にはそれぞれ「DME-1」、「DME-2」、「DME-3」、「DME-4」、「DME-5」、「DME-6」、「DME-7」、「DME-8」、「DME-9」、「DME-10」、「DME-11」、及び「DME-12」と呼ぶ、薬物代謝酵素である精製されたポリペプチドを提供する。或る実施態様において本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一性のある天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-12を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択した単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、SEQ ID NO:1-12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。

10

**【0116】**

また、本発明は(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ或る天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、又は(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリヌクレオチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或る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。一実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:13-24からなる群から選択される。

20

**【0117】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片からなる群から選択したポリペプチドをコードするようなポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモータ配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

30

**【0118】**

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の同一性を有する天然のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片とで構成される群から選択されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b) そのように発現したポリペプチドを回収する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモータ配列を有する。

40

**【0119】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような単離された抗体を提供する。

**【0120】**

50

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド配列、及び(e) (a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択された単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドを有する。

#### 【0121】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド、(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド、及び(e) (a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチドの配列を有する。検出方法は、(a) サンプル中の上記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなる或るプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b) 該ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、複合体が存在すればオプションでその量を検出する過程からなる。該プローブと該標的ポリヌクレオチド或いはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは、該標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む。

10

20

#### 【0122】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する一方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、及び(e) (a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択した、或るポリヌクレオチドの配列を持つ。検出方法は、(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチド又はその断片を増幅する過程と、(b) 前記の増幅した標的ポリヌクレオチド又はその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチド又はその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

30

#### 【0123】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群から選択される。一実施例では、SEQ ID NO:1-12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DME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。

40

#### 【0124】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免

50

疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを有するサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程からなる。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、この組成物を機能的DMEの発現の低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者に投与する方法を提供する。

**【0125】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性につき、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) 該ポリペプチドを含むサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物を機能的DMEの過剰発現に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者に投与する方法を提供する。

10

20

**【0126】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、又は(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択されたポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

30

**【0127】**

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、又は(d) SEQ ID NO:1-12からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択されたポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) 試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物であることを意味する。

40

**【0128】**

更に本発明は、SEQ ID NO:13-24からなる群から選択されたポリヌクレオチド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或る化合物に曝露する過程と、(b) この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出する過程と、(c) 可変量の該化合物の存在下での標的ポリヌクレオチドの発現を該化合物の不存在下での発現と比較する過程を含む、該スクリーニング方法を提供する。

50

## 【 0 1 2 9 】

本発明は更に、( a ) 核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、( b ) ( i ) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、( ii ) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、( iii ) ( i ) に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、( iv ) ( ii ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、( v ) ( i ) ~ ( iv ) のRNA等価物からなる群から選択したポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて、処理した生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程を含む、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドの間に特定のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、上記標的ポリヌクレオチドは、( i ) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、( ii ) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、( iii ) ( i ) のポリヌクレオチドに相補的な配列を有するポリヌクレオチド、( iv ) ( ii ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、及び( v ) ( i ) ~ ( iv ) のRNA等価物からなる群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記( i ) ~ ( v ) からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片を持つ。毒性の算定方法には更に、( c ) ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、( d ) 処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性を示す。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 1 3 0 】

( 本発明の記載について )

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明する前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変し得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

## 【 0 1 3 1 】

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

## 【 0 1 3 2 】

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

## 【 0 1 3 3 】

( 定義 )

用語「DME」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など任意の供給源からの、全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、ネズミ、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DMEのアミノ酸配列を指す。

【0134】

用語「アゴニスト」は、DMEの生物学的活性を強化又は模倣する分子を指す。このアゴニストとしては、DMEと直接に相互作用して、或いはDMEが関与する生物学的経路の成分と作用してDME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。

【0135】

用語「対立遺伝子変異体（又は変異配列）」は、DMEをコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から生じ得る。また、変容したmRNA又はポリペプチドを生じ得る。そのポリペプチドの構造又は機能は、変容することもしないこともある。或る遺伝子は、その天然型の対立遺伝子変異配列を全く持たない場合もあり、1個以上持つこともある。対立遺伝子変異配列を生じさせる通常の突然変異性変化は一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加又は置換に帰するものである。これら各種の変化は、単独で或いは他の変化と共に、或る配列内で1回以上、生じ得る。

10

【0136】

DMEをコードする「変容した/改変された」核酸配列としては、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換を持つ結果、DMEと同じポリペプチド或いはDMEの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを生じる配列を含む。この定義には、DMEをコードするポリヌクレオチド配列にとり正常な染色体の遺伝子座ではない位置での、対立遺伝子変異配列群への不相当或いは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、DME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型性を含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じた結果、機能的に等価なDMEとなるような、アミノ酸残基の欠失、挿入又は置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にDME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/又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、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとトレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン及びバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

20

30

【0137】

「アミノ酸」又は「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列又はその断片を指し、天然又は合成分子を指す。「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。

【0138】

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

40

用語「アンタゴニスト」は、DMEの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストとしては、DMEと直接に相互作用するか或いはDMEが関与する生物学的経路の諸成分に作用してDMEの活性を調節する、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0139】

用語「抗体」は、エピトープの決定基と結合できる、無傷の免疫グロブリン分子やそれらの断片、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片を指す。DMEポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、無傷ポリペプチド群を用いて、又は、当該の小ペプチド群を有する断片群を用いて作製可能である。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用

50

いるポリペプチド又はオリゴペプチドの由来は、RNAの翻訳の場合や、又は化学合成があり得る。また、それらは所望により、キャリアタンパク質に抱合することも可能である。通常用いられるキャリアであってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカシガイのヘモシアニン（KLH）等がある。結合したこのペプチドは、前記動物を免疫化するために用いる。

【0140】

「抗原決定基」の語は、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。タンパク質又はタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域又は3次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。或る抗原決定基は、或る抗体への結合において無損傷抗原（即ち免疫応答を誘発するために用いられる免疫原）と競合し得る。

10

【0141】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸又はオリゴヌクレオチド分子を指す。アプタマーは *in vitro* の進化過程（例えば米国特許番号第5,270,163号に記載されたSELEX（Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの略、試験管内選択法））から由来するもので、そのような過程は大きな組み合わせライブラリから標的的特異的なアプタマー配列を選択する。アプタマー組成は、2本鎖又は1本鎖であってもよく、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導體、又は他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーのヌクレオチド構成要素は修飾された糖基（例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基が2'-F又は2'-NH<sub>2</sub>で置換されている）を有することが可能で、これらの糖基は、例えば、ヌクラーゼに対する耐性或いは血中でのより長い寿命など、所望の特性を向上し得る。循環系からアプタマーが除去される速度を遅くするために、アプタマーを他の分子（例えば高分子量のキャリア）に抱合させることができる。アプタマー類は、例えば或る架橋剤の光活性化によって、それらの同種リガンド群と特異的に架橋させ得る（Brody, E.N. 及び L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13等を参照）。

20

【0142】

「イントラマー（intramer）」の用語は *in vivo* で発現されるアプタマーを意味するたとえば、ワクシニアウイルスに基づく或るRNA発現系は、白血球の細胞質内で特定のRNAアプタマーを高度に発現させるために使用されている（Blind, M. 他 (1999) Proc. Natl Acad. Sci. USA 96:3606-3610）。

30

【0143】

用語「スピーゲルマー（spiegelmer）」は、L-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導體又はヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性ヌクレオチドを含むアプタマーは、右旋性のヌクレオチドを含む基質に通常作用する天然の酵素による分解に耐性がある。

【0144】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」（コーディング）鎖と塩基対を形成することが可能な任意の組成物を指す。アンチセンス組成物の例には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸（PNA）や、修飾されたバックボーン連鎖たとえばホスホロチオ酸、メチルホスホン酸又はベンジルホスホン酸などを有するオリゴヌクレオチドや、修飾された糖基たとえば2'-メトキシエチル糖又は2'-メトキシエトキシ糖などを有するオリゴヌクレオチドや、或いは修飾された塩基たとえば5-メチルシトシン、2-デオキシウラシル又は7-デアザ-2'-デオキシグアノシンなどを有するオリゴヌクレオチドがあり得る。アンチセンス分子は、化学合成又は転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が産生した天然核酸配列との塩基対を形成し、転写又は翻訳を阻止する二重鎖を形成する。「負」又は「マイナス」という表現は、或る参考DNA分子のアンチセンス鎖を指すことがあり、「正」又は「プラス」という表現は、或る参考DNA分子のセンス鎖を意味し得る。

40

【0145】

50

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能又は生化学的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」又は「免疫原性」は、天然或いは組換え体のDME、合成のDME又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。

【0146】

「相補(的)」又は「相補性」の語は、塩基対形成によってアニーリングする2つの一本鎖核酸の間の関係を指す。例えば、配列「5'-AGT-3'」は、その相補配列「3'-TCA-5'」との対を形成する。

【0147】

「～のポリヌクレオチド配列を含む(持つ)組成物」又は「～のアミノ酸配列を含む(持つ)組成物」は、広い意味で、指定のポリヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を持つ、任意の組成物を指す。この組成物には、乾燥製剤又は水溶液が含まれ得る。DME若しくはDME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は、塩(例えばNaCl)、界面活性剤(例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS)及びその他の構成要素(例えばデンハート液、粉乳、サケの精子のDNA等)を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

10

【0148】

「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(Applied Biosystems, Foster City CA)を用いて5'及び/又は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、又はGELVIEW断片構築システム(GCG, Madison, WI)か、或いは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オーバーラップするcDNAやEST、又はゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び構築の両方を行ってコンセンサス配列を作製した配列もある。

20

【0149】

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

30

元の残基	保存的な置換	
Ala	Gly, Ser	
Arg	His, Lys	
Asn	Asp, Gln, His	
Asp	Asn, Glu	
Cys	Ala, Ser	
Gln	Asn, Glu, His	
Glu	Asp, Gln, His	
Gly	Ala	
His	Asn, Arg, Gln, Glu	10
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	20
Val	Ile, Leu, Thr	

## 【 0 1 5 0 】

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

## 【 0 1 5 1 】

「欠失」は、結果的に1個以上のアミノ酸残基又はヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸又はヌクレオチド配列における変化を指す。

30

## 【 0 1 5 2 】

「誘導体」の語は、化学修飾されたポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基又はアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的又は免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化 ( pegylation )、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドの、少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持するプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

## 【 0 1 5 3 】

「検出可能な標識」は、測定可能なシグナルを発生することができ、ポリヌクレオチド又はポリペプチドに共有結合又は非共有結合するようなレポーター分子又は酵素を指す。

40

## 【 0 1 5 4 】

「差次的発現」は少なくとも2つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加 ( 上方調節 )、或いは減少 ( 下方調節 )、又は欠損した、遺伝子又はタンパク質の発現を指す。このような比較は例えば、処理済サンプルと不処理サンプル、又は病態のサンプルと正常サンプルの間で行われ得る。

## 【 0 1 5 5 】

「エキソンシャッフリング」は、異なるコード領域 ( エキソン ) の組換えを意味する。1つのエキソンはコードされるタンパク質の1つの構造的又は機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャー群の新規な再構築 ( reassortment ) によって、新しいタ

50

ンパク質が組み立てられることが可能であり、新しいタンパク質機能の進化を促進できる。

【0156】

「断片」は、DME又はDME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) と同一配列であるが親配列より長さが短いものを指す。断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5~1000の連続したヌクレオチド又はアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、或る分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、定義された或る配列内に見られるようなポリペプチドの最初の250又は500アミノ酸 (又は最初の25%又は50%) から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

10

【0157】

SEQ ID NO:13-24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:13-24を特異的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:13-24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、又はSEQ ID NO:13-24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。SEQ ID NO:13-24の断片の正確な長さ及び、断片が対応するSEQ ID NO:13-24の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

20

【0158】

SEQ ID NO:1-12の或る断片は、SEQ ID NO:13-24の或る断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-12の断片には、SEQ ID NO:1-12を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、SEQ ID NO:1-12の断片は、SEQ ID NO:1-12を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-12の或る断片の正確な長さは、また、この断片がSEQ ID NO:1-12の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

30

【0159】

「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) と、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。

【0160】

「相同性」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列又は2つ以上のポリペプチド配列の、配列類似性、互換性、又は配列同一性を意味する。

【0161】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」又は「~%同一」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために、比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入しうるので、2つの配列をより有意に比較できる。

40

【0162】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ (一組の分子生物学的分析プログラム) (DNASTAR, Madison WI)の一部である。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をペアワイズでアラインメントする際

50

のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定される。「weighted(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る。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「percent similarity(類似性パーセント)」として一致率を報告する。

#### 【0163】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F. 他(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列をペアワイズで直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。

10

#### 【0164】

「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn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、ギャップ(gap)などのパラメータをデフォルト設定にセットして用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

20

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

30

#### 【0165】

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

#### 【0166】

高度の同一性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で、類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

40

#### 【0167】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」又は「~%同一」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公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の電荷及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を(従って機能も)保存する。

50

## 【0168】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（参照先と共に上述）。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列をペアワイズでアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスが選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「percent similarity」として一致率を報告する。

## 【0169】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較をする場合、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を使用しうる。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

## 【0170】

一致率は、ある定義されたポリペプチド配列（例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列）の全長について測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば定義された、より大きなポリペプチド配列から得られた断片（例えば少なくとも15、20、30、40、50、70又は150の連続した残基の断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の断片長を用いて、或る長さであってその長さに対して一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

## 【0171】

「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、染色体の複製、分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の微小染色体である。

## 【0172】

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改変された抗体分子を指す。

## 【0173】

「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。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を共有することの指標である。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容的アニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容的条件は、当業者が慣例的に決定できる。アニーリング条件はどのハイブリダイゼーション実験でも一定でありうるが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験ごとに変更し得る。許容的アニーリング条件は、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の存在下である。

## 【0174】

10

20

30

40

50

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

【0175】

本発明の、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに対する高ストリンジェンシー条件には、約  $0.2 \times \text{SSC}$  及び約 0.1% の SDS 存在下で 68 において 1 時間の洗浄条件が含まれる。或いは、65、60、55 又は 42 の温度で行ってもよい。SSC濃度は、約 0.1% の SDS 存在下で、約  $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$  の範囲で変更し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約 100 ~ 200  $\mu\text{g/ml}$  の、せん断した変性サケ精子 DNA がある。特定条件下で、例えば RNA と DNA のハイブリダイゼーションには、有機溶剤、例えば約 35 ~ 50% v/v の濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド群及びヌクレオチドにコードされるポリペプチド群について、類似の役割を強く示唆している。

【0176】

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の形成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、溶解状態で形成し得る ( $C_0t$  又は  $R_0t$  解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体 (例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピン又はガラススライド、或いは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板) に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0177】

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。

【0178】

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

【0179】

「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生物に導入すると免疫応答を引き起こし得る、DMEのポリペプチド断片又はオリゴペプチド断片である。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示する又は当分野で既知のあらゆる抗体生産方法に有用な、DMEのポリペプチド断片又はオリゴペプチド断片を含む。

【0180】

用語「マイクロアレイ」は、基板上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチド又はその他の化合物の構成を指す。

【0181】

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

【0182】

用語「モジュレート」又は「活性を調節」は、DMEの活性を変化させることを指す。例えば、調節によって、DMEのタンパク質活性、或いは結合特性、又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きうる。

【0183】

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

【0184】

「機能的に連結した」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、プロモータがコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモータはそのコード配列に機能的に連結している。機能的に連結したDNA配列は非常に近接するか、或いは連続的に隣接し得る。また、2つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合は、同一のリーディングフレーム内に在り得る。

【0185】

「ペプチド核酸（PNA）」は、末端がリジンで終わるアミノ酸残基のペプチドのバックボーンに結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子又は抗遺伝子剤を指す。末端のリジンは、この組成物に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNA又はRNAに優先的に結合して転写の伸長を停止するものであり、ポリエチレングリコール化することにより、細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0186】

DME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、タンパク質分解切断及び当分野で既知の、その他の修飾が含まれ得る。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、DMEの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

【0187】

「プローブ」とは、同一配列或いは対立遺伝子核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、DMEやそれらの相補配列、又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、単離されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであって、検出可能な標識又はレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。「プライマー」は、短い核酸であり、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による核酸配列の増幅（及び同定）に用い得る。

【0188】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の、少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100又は150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【0189】

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

10

20

30

40

50

いるなどして既知の配列から得ることができる。

【0190】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野で既知のソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロボースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム（テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能）は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム（Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research（マサチューセッツ州ケンブリッジ）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。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である（後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように修正し得る）。PrimerGenプログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能）は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域又は最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有なもの、及び保存されたもの双方のオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCR又はシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全又は部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

10

20

【0191】

「組換え核酸」は天然の配列ではなく、配列の、2つ以上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。この人為的組み合わせはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメント群の人為的操作によって、例えばのSambrookらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部が付加、置換又は欠失により改変された核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモータ配列に機能的に連結した核酸配列が含まれる。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ために使用されるベクターの一部とすることが可能である。

30

【0192】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部と成すことができ、ベクターは例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなベクターは哺乳動物に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳動物内で防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

40

【0193】

「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、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、翻訳又はRNA安定性を調節する宿主タンパク質又はウイルスタンパク質と相互作用する。

【0194】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸又は抗体の標識に用いられる化学的又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、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

50

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、生じる全ての窒素性塩基のチミンがウラシルで置換され、糖鎖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0195】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。DME、DMEをコードする核酸、又はその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞や細胞から単離した染色体や細胞内小器官（オルガネラ）や膜からの抽出物と、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、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0196】

用語「特異結合」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、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存する。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、遊離した標識A及びその抗体を含む反応において、エピトープAを持つポリペプチドが、或いは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体に結合する標識されたAの量を低減させる。

10

【0197】

「実質的に精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離又は分離された核酸配列又はアミノ酸配列であって、自然に会合する他の構成要素の少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が無いものを指す。

20

【0198】

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

【0199】

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、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気又は非磁気ビーズ、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。基板は、ウェル、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

30

【0200】

「転写イメージ(transcript image)」又は「発現プロファイル」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類又は組織による遺伝子発現の集合的パターンを指す。

【0201】

「形質転換(transformation)」とは、外因性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、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件又は人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核宿主細胞又は真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、バクテリオファージ或いはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。用語「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。更に、限られた時間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

40

【0202】

ここで用いる「遺伝形質転換体(transgenic organism)」とは任意の生物であり、限定するものではないが動植物を含み、生物の1個以上の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られているトランスジェニック(transgenic)技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接又は間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換

50

えウイルスの感染によって行う。或いは、核酸をレンチウイルスベクターのような組換えウイルスベクターで感染させて導入することができる(Lois, C. et al. (2002) Science 295:868-872)。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いは試験管内受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換又はトランス接合(transconjugation)によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrook他(1989)等の参考文献に記載されている。

#### 【0203】

特定の核酸配列の「変異体/変異配列」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の配列同一性を有する核酸配列であると定義する。定義づけには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体又は「多型性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子との有意な同一性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって通常、より多く又はより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互に有意なアミノ酸同一性を有する。多型性変異体は、所与の種の個体間で特定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塩基多型性」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状又は病状性向を示し得る。

#### 【0204】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で該特定ポリペプチド配列に対して少なくとも40%の配列同一性を有するポリペプチド配列として定義される。定義づけには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、一方のポリペプチドの或る所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を示し得る。

#### 【0205】

(発明)

本発明は、新規のヒト薬物代謝酵素(DME)及びDMEをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、またこれらの組成物を利用した自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生又は発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、及び肝臓の疾患を含む胃腸疾患の診断、治療、及び予防法の発見に基づく。

#### 【0206】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及びその対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識別番号(IncyteプロジェクトID)と相関する。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO)とIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)によって表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)とIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)によって表示した。列6は本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチド配列に相当する物理的な完全長クローンのIncyte ID番号を示す。完全長のクローンは列3に示すポリペプチド配列に少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドを

10

20

30

40

50

コードする。

【0207】

表2は、GenBankタンパク質 (genpept) データベースに対するBLAST分析によって同定されたような、本発明のポリペプチドとの相同性を有する配列を示している。列1及び列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (ポリペプチド SEQ ID NO:) とそれに対応するIncyte ポリペプチド配列番号 (Incyte ポリペプチド ID) を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBank識別番号 (GenBank ID NO:) を示す。列4は、各ポリペプチドとその相同体との間の一致について確率スコアを示す。列5は、該当箇所には適当な引用を示すとともにGenBank相同体1つ以上の注釈 (annotation) を示し、これら全ては特に引用を以って本明細書の一部とする。

10

【0208】

表3は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列1及び列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドのポリペプチド配列識別番号 (SEQ ID NO:) 及びそれに対応するIncyte ポリペプチド配列番号 (Incyte ポリペプチド ID) を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4及び列5はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム (Genetics Computer Group, Madison WI) によって決定された、リン酸化及びグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ配列、ドメイン、及びモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7は、タンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所には更に分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

20

【0209】

表2及び表3は共に、本発明のポリペプチド群の特性を要約したものであって、これらの特性は、請求の範囲にあるポリヌクレオチド群が薬物代謝酵素であることを立証する。例えば、SEQ ID NO:1は、ウサギのUDPグルクロノシルトランスフェラーゼ (GenBank ID g165801) と残基C87から残基K471まで、40%の同一性を有することが、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された (表2参照)。BLAST確率スコアは $1.1e^{-70}$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:1はまた、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル (HMM) を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された (表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析から得られたデータによって、SEQ ID NO:1がUDP-グリコシルトランスフェラーゼスーパーファミリーのメンバーであることが更に実証される。

30

【0210】

別の例において、SEQ ID NO:3はニワトリのスルホトランスフェラーゼ (GenBank ID g2687360) と残基K4からQ302まで49%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定された (表2参照)。BLAST確率スコアは $2.3e^{-81}$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:3はまた、スルホトランスフェラーゼドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル (HMM) を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された (表3参照)。BLIMPS解析よりのデータは、SEQ ID NO:3がスルホトランスフェラーゼである、更に実証的な証拠を提供する。

40

【0211】

別の例において、SEQ ID NO:4は *Mycobacterium bovis* の C-5 ステロールデサチュラーゼ (GenBank ID g9965825) に残基D38から残基P306まで37%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定された (表2参照)。BLAST確率スコアは $5.8e^{-44}$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:5はマウスのアリアルアセトアミドデアセチラーゼ (GenBank ID g12597322) に残基V38から残基L440まで、44%の同一性を有することが、BLAST解

50

析によって確率スコア $2.6e-87$ で決定された。BLIMPS及びMOTIFS 解析よりのデータは、SEQ ID NO:5が脂質分解酵素であることを更に確証する証拠を提供する。

【0212】

別の例において、SEQ ID NO:6 はヒトUDP グルクロノシルトランスフェラーゼ (GenBank IDs g3135025 及び g8650278) に対して残基M1から残基D529まで、93%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定された(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.2e-274$ であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:6はまた、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS及びPROFILESCAN 解析よりのデータは、SEQ ID NO:6がUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼである、更に確証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:7 はマウスのタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ(GenBank ID g5257221)に対して残基A9から残基S615まで97%の同一性を有することがBLAST解析によって確率スコア $0.0$ で決定された。

10

【0213】

別の例において、SEQ ID NO:10 はヒトNG, NG-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ (GenBank ID g4160666) に対して残基M57から残基S341まで、100%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定された(表2参照)。BLAST確率スコアは $2.5e-148$ であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。Prodom データベースを使ったBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:10 がNG, NG ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼである、更に確証的な証拠を提供する。

20

【0214】

また他の例として、SEQ ID NO:11はヒトのアリールスルファターゼ (GenBank ID g825628) と残基P76 から残基W554まで54%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された(表2参照)。BLAST確率スコアは $2.2e-146$ であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:11はまた、1つのスルファターゼドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリドメイン群のPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:11 がアリールスルファターゼである、更に実証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:1-12の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7に記述されている。

30

【0215】

SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8-9及び SEQ ID NO:12は同様の方法で解析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-12の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7に記述されている。

【0216】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列、又はゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列、或いはこれらの2種類の配列の任意の組み合わせを用いて組み立てた。列1は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)、対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、及び塩基対での各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列の構築(アセンブリ)に使われたcDNA配列及び/又はゲノム配列のヌクレオチド開始位置(5')と停止位置(3')、及びSEQ ID NO:13-24を同定するか、又はSEQ ID NO:13-24と、関連するポリヌクレオチド配列とを区別する技術(例えば、ハイブリダイゼーション技術又は増幅技術)に有用なポリヌクレオチド配列の断片のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示す。

40

【0217】

50

表4の列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、特にたとえば組織特異的なcDNAライブラリ又はプールされたcDNAライブラリに由来するIncyte cDNAを指す場合がある。或いは列2のポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチド配列の構築に寄与したGenBank cDNA又はESTを指す場合もある。更に、列2のポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL (The Sanger Centre、英国ケンブリッジ) データベースから由来した配列 (即ち「ENST」命名を含む配列) を同定し得る。或いは、列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records データベースから由来する場合もあり (即ち「NM」又は「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsから由来する場合もある (即ち「NP」の命名を含む配列)。又は列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティッチング (exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方からなる構築物を意味する場合がある。例えば、FL\_XXXXXX\_N<sub>1</sub>\_N<sub>2</sub>\_YYYYY\_N<sub>3</sub>\_N<sub>4</sub> として同定されるポリヌクレオチド配列はアルゴリズムが適用された配列のクラスタの識別番号がXXXXXXであり、アルゴリズムにより生成される予測の番号がYYYYYであり、(もし存在すれば) N<sub>1,2,3...</sub> が解析中に手動で編集された可能性のある特定のエキソンであるような「縫合された(stitched)」配列である(実施例5参照)。又は、列2のポリヌクレオチド断片は「エキソンストレッチング (exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンの構築物を指す場合もある。例えば、FLXX XXXX\_gAAAAA\_gBBBBB\_1\_N として同定されるポリヌクレオチド配列は「ストレッチされた」配列である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソンストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号又はNCBI RefSeq 識別番号、N は特定のエキソンを指す(実施例5を参照)。RefSeq 配列が「エキソンストレッチング」アルゴリズムのタンパク質相同体として使われた場合は、RefSeq 識別子(「NM」、「NP」又は「NT」と表示された)はGenBank 識別子(すなわち、gBBBBB)の代わりに使われる場合もある。

10

20

30

40

## 【0218】

或いは、接頭コードは手作業で編集されたか、ゲノムDNA配列から予測されたか、又は配列解析方法の組み合わせから由来している構成配列を同定する。次の表は構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する同じ配列の分析方法の例を列記する(実施例4と5を参照)。

接頭コード	解析のタイプ及び/又はプログラムの例
GNN 、 GFG 、 ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) 又は FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK)を用いた、ゲノム配列からのエキソン予測
GBI	手動で編集された、ゲノム配列の解析
FL	スティッチ又はストレッチゲノム配列(実施例5参照)
INCY	ゲノムへのEST配列のマッピングからの完全長転写物とエキソンとの予測。エキソン群と生じる転写物とを予測するために、ゲノム位置とEST構成とのデータが組み合わされる。

## 【0219】

場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するために、表4に示すような配列の適用範囲と重複するIncyte cDNAの適用範囲が得られたが、それに関連するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

## 【0220】

50

表5はIncyte cDNA配列を用いて構築された完全長ポリヌクレオチド配列のための代表的なcDNAライブラリを示している。代表的なcDNAライブラリは、上記のポリヌクレオチド配列を構築及び確認するために用いられたIncyte cDNA配列によって最も頻繁に代表されるIncyte cDNAライブラリである。cDNAライブラリを作製するために用いた組織及びベクターを表5に示し、表6で説明している。

【0221】

本発明には、また、DMEの変異体をも含む。好適なDME変異体は、DMEの機能的或いは構造的特徴を少なくとも1つ有し、かつ、DME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変異体である。

10

【0222】

本発明はまた、DMEをコードするポリヌクレオチド群を提供する。特定の実施例において、本発明は、DMEをコードする、SEQ ID NO:13-24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。SEQ ID NO:13-24のポリヌクレオチド配列には、配列表に示したように等価RNA配列も含まれるが、そこでは窒素塩基チミンの出現はウラシルで置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースの代わりにリボースで構成される。

【0223】

本発明はまた、DME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、このような変異体ポリヌクレオチド配列は、DMEをコードするポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%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:13-24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、DME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しうる。

20

【0224】

更に別の例では、本発明の或るポリヌクレオチド変異配列は、DMEをコードするポリヌクレオチド配列のスプライス変異配列である。或るスプライス変異配列はDMEをコードするポリヌクレオチド配列との顕著な配列同一性を持つ部分を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって生ずる、配列の数ブロックの付加又は欠失により、通常、より多数又はより少数のポリヌクレオチドを有することになる。或るスプライス変異配列には、約70%未満、又は約60%未満、或いは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、DMEをコードするポリヌクレオチド配列との間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異配列のいくつかの部分には、DMEをコードするポリヌクレオチド配列の各部との、少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、又は少なくとも約95%、なお又は100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。上記したスプライス変異配列は何れも、DMEの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るアミノ酸配列をコードし得る。

30

40

【0225】

遺伝暗号の縮重により、DMEをコードする種々のポリヌクレオチド配列が作り出され、中には、既知のいかなる天然遺伝子のポリヌクレオチド配列群とも最小の類似性しか有しない配列もあることは、当業者には理解されよう。したがって本発明は、可能コドン選択に基づく組み合わせの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列のパリエーションを網羅し得る。これらの組み合わせは、天然DME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る。また、このような全ての変異が明確に開示されていると考慮されたい。

【0226】

DMEとその変異配列とをコードするヌクレオチド配列は一般に、好適に選択されたスト

50

リンジェンシー条件下で天然DMEのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有するDME或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされるアミノ酸配列を改変せずに、DME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改変する別の理由には、天然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転写物を作ることもある。

#### 【0227】

本発明は、また、DMEとその誘導体群とをコードするDNA配列群又はその断片群を完全に合成化学によって作り出す過程をも含む。作製後にこの合成配列を、当分野で周知の試薬類を用いて、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できる。更に、合成化学を用いて、DMEをコードする配列、又はその任意の断片中に突然変異を導入できる。

#### 【0228】

更に本発明には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:13-24 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、Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511等を参照)。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。

#### 【0229】

DNAシーケンシングの方法は当分野では公知であり、本発明のいずれの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems) 等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) 又は当分野でよく知られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(Ausubel, F.M. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7、Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, 856-853等を参照)。

#### 【0230】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、DMEをコードする核酸配列を伸長し、プロモータや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である(例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applied*, 2:318--322を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限酵素断片から得る(例えば、Triglia, T. 他 (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に参与している。(Lagerstrom, M. 他 (1991) *PCR Methods Applied* 1:111-119等を参照)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及びライゲーション反応を用い

て未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている (Parker, J.D.他 (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinderライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

10

#### 【0231】

完全長cDNAをスクリーニングする際は、より大きなcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムプライマーのライブラリは、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

#### 【0232】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシング又はPCR産物のサイズを分析し、又はそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化されるフルオロフォアと、発光された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア (Applied Biosystems社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等) を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

20

#### 【0233】

本発明の別の実施態様では、適切な宿主細胞内で、DME、その断片又は機能的等価物を発現させる組換えDNA分子群内で、DMEをコードするポリヌクレオチド配列群又はその断片群をクローニングし得る。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配列群を作ることができ、これらの配列をDMEの発現に利用できる。

30

#### 【0234】

種々の目的で、DMEをコードする配列群を改変するために、当分野で一般的に既知の方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列群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/又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。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異誘導を利用して、新規な制限部位の作製、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を起こす突然変異を導入し得る。

40

#### 【0235】

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シャッフリングシャッフリング技術を用いてシャッフリングして、DMEの生物学的又は酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのPKINの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、所望の特性を持つ遺伝子変異配列群を同定する、選択又はスクリー

50

ニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。従って、「人工的な」育種及び急速な分子の進化によって遺伝的多様性が生み出される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を組み換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所与の遺伝子を同種又は異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と組み換え、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、定方向の、制御可能な方法で最大化させることができる。

#### 【0236】

別の実施態様では、DMEをコードする配列群は、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.他（1980）*Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223*; 及びHorn, T.他（1980）*Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232*を参照）。別法として、化学的方法を用いてDME自体又はその断片を合成することが可能である。例えば、種々の液相又は固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる（Creighton, T. (1984) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, 55-60、Roberge, J.Y.他（1995）*Science* 269:202-204等を参照）。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ（Applied Biosystems）を用いて達成し得る。更に、DMEのアミノ酸配列、又は任意のその一部を、直接合成の際に改変することにより、及び/又は他のタンパク質からの配列群又は任意のその一部と組み合わせることにより、変異体ポリペプチドを作製、又は、或る天然ポリペプチドの1配列を有するポリペプチドを作製し得る。

#### 【0237】

このペプチドは、分取用高速液体クロマトグラフィを用いて実質的に精製し得る（Chiez, R.M.及びF.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421などを参照）。この合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析又はシーケンシングによって確認できる（前出のCreighton, 28-53等を参照）。

#### 【0238】

生物学的に活性なDMEを発現させるために、DMEをコードするヌクレオチド配列群又はその誘導体を好適な発現ベクターに挿入し得る。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、転写及び翻訳の制御に必要なエレメント群を持つベクターである。必要なエレメントとしては、該ベクターと、DMEをコードするポリヌクレオチド配列群における調節配列群（エンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモータ、5'及び3'の非翻訳領域など）が含まれる。このようなエレメントは、強度及び特異性が様々である。特定の開始シグナル類を用いて、DMEをコードする配列群の、より効果的な翻訳を達成できる。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。DMEをコードする配列群、その開始コドン、及び上流の調節配列群が、好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写制御シグナルや翻訳制御シグナルは必要ないこともある。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因性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。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.* 20:125-162を参照）。

#### 【0239】

当業者に周知の方法を用いて、DMEをコードする配列群と、好適な転写及び翻訳制御エレメント群とを持つ発現ベクター群を作製できる。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、13章及び16章を参照）。

10

20

30

40

50

## 【0240】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、DMEをコードする配列群の保持及び発現ができる。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌などの微生物や、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又はタバコモザイクウイルス：TMV）又は細菌発現ベクター（例えばTiプラスミド又はpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある。（前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. 及びS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、Engelhard, E.K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-3227、Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311、『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, 191-196、Logan, J. 他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、ヘルペスウイルス又はワクシニアウイルス由来の発現ベクター、又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、組織又は細胞集団へ送達することができる (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. 及び 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。

## 【0241】

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を、DMEをコードするポリヌクレオチド配列群の使用目的に応じて選択できる。例えば、DMEをコードするポリヌクレオチド配列群の慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(St ratagene, La Jolla CA)又はpSPORT1 プラスミド(Life Technologies)などの、多機能の大腸菌ベクターを用い得る。ベクターのマルチクローニング部位に、DME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、組換え分子を持つ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は、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖のレスキュー、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう(例えば、Van Heeke, G. 及び S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照)。例えば抗体類の産生などに多量のDMEが必要な場合は、DMEの発現をハイレベルで指示するベクター類が使用できる。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモータ又は誘導T7バクテリオファージプロモータを含むベクターが使用できる。

## 【0242】

DMEの産生には、酵母発現系の使用が可能である。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモータ等の構成型或いは誘導型のプロモータを含む多数のベクターが、出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピキア酵母 (*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が細胞内への保持のどちらかを指示する。また、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ことを可能にする(例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, G.A. 他 (1987) Methods Enzymol. 153:516-544、及びScorer, C. A. 他 (1994) Bio/Technology 12:181-184を参照)。

## 【0243】

植物系もDMEの発現に使用可能である。DMEをコードする配列の転写は、ウイルスプロモータ、例えば単独或いはTMV (Takamatsu, N. (1987) EMBO J 6:307-311) 由来のオメガリダー配列と組み合わせるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモータによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモータ又は熱ショックプロモータを用いてもよい(例えば、Coruzzi, G. 他 (1984) EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie, 50

R. 他 (1984) *Science* 224: 838-843; 及び Winter, J. 他 (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105を参照)。これらの作製物は、直接DNA形質転換に又は病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196等を参照)。

#### 【0244】

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後期プロモータと3連リーダー配列とからなるアデノウイルス転写/翻訳複合体に、DMEをコードする配列群をライゲーションし得る。アデノウイルスゲノムの可欠E1又はE3領域への挿入を用いれば、宿主細胞内でDMEを発現する感染ウイルスを得ることができる(例えば、Logan, J. 及び T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659を参照)。更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40又はEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

10

#### 【0245】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を送達することもできる。治療のために約6 kb ~ 10 MbのHACを作製し、従来の送達方法(リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、又はベシクル)で送達されている(例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) *Nat Genet.* 15:345-355.を参照)。

20

#### 【0246】

哺乳類系での、組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、細胞株における、DMEの安定した発現が望ましい。例えば、DMEをコードする配列を細胞株に形質転換するために、発現ベクター類と、同じベクター上の或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用い得る。用いる発現ベクターは、ウイルス起源の複製要素、及び/又は内因性の発現要素を持ち得る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1 ~ 2日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

30

#### 【0247】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、*tk<sup>-</sup>*細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子と、*apr<sup>-</sup>*細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある(例えば、Wigler, M. 他 (1977) *Cell* 11:223-232; Lowy, I. 他 (1980) *Cell* 22:817-823を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M. 他(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. 他(1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14等を参照)。この他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変えるProc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051参照)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、又はルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(Rhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131等を参照)。

40

#### 【0248】

50

マーカー遺伝子発現の存在 / 不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、DMEをコードする配列が或るマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、DMEをコードする配列群を有する形質転換された細胞群は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定できる。又は、単一プロモータの制御下で、或るマーカー遺伝子を、DMEをコードする1配列とタンデムに配置することもできる。誘導又は選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子も発現していることを意味する。

**【0249】**

一般に、DMEをコードする核酸配列を持ち、DME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できる。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 / 又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又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。

10

**【0250】**

特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のどちらかを用いる、DMEの発現の検出及び計測のための免疫学的な方法は、当分野で既知である。このような技法には、酵素結合免疫ソルベントアッセイ (ELISA)、ラジオ免疫アッセイ (RIA)、蛍光活性化細胞選別 (FACS) などがある。DME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群を用いた、2部位のモノクローナルベース免疫アッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好ましいが、競合結合試験も用い得る。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である (Hampton, R. 他 (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV, Coligan, J. E. 他 (1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY, Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ等を参照)。

20

**【0251】**

多岐にわたる標識方法及び抱合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイ及びアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。DME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、エンドラベリング (末端標識化)、又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、DMEをコードする配列群、又はその任意の断片群を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングできる。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3又はSP6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、*in vitro*でRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、及びU.S. Biochemical等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子の他、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

30

**【0252】**

DME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。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。DMEをコードするポリヌクレオチド群を持つ発現ベクター類は、原核細胞膜又は真核細胞膜を透過してのDMEの分泌を指示するシグナル配列群を持つように設計できることは、当業者には理解されよう。

40

**【0253】**

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力又は発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及

50

びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」又は「プロ」形を切断する翻訳後のプロセシングを利用して、タンパク質の標的への誘導、折りたたみ及び/又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異的な細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等）は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

#### 【0254】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードする天然の核酸配列、修飾された核酸配列、又は組換えの核酸配列を、或る異種配列にライゲーションすることにより、上記した任意の宿主系内で、或る融合タンパク質の翻訳を生じ得る。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DMEタンパク質が、DME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も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、DMEをコードする配列と異種タンパク質配列との間に、タンパク質分解切断部位を融合タンパク質が持つように遺伝子操作すると、DME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及び精製方法は、前出の Ausubel (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

#### 【0255】

本発明の更なる実施態様では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液又はコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて *in vitro* で、放射能標識したDMEの合成が可能である。これらの系は、T7、T3又はSP6プロモータと機能的に連結したタンパク質コード配列の転写及び翻訳をカップルさせる。翻訳は、例えば<sup>35</sup>Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

#### 【0256】

本発明のDME又はその断片を用いて、DME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つ又は複数の試験化合物を用いて、DME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）又は小分子が挙げられる。

#### 【0257】

或る実施態様では、このように同定された化合物は、DMEの天然リガンドに密接に関連し、例えばリガンドやその断片であり、又は天然基質や、構造的又は機能的な擬態物質 (mimetic)、或いは自然結合パートナーである (Coligan, J.E. 他 (1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2)の5章等を参照)。同様に、この化合物はDMEが結合する天然受容体、或いは、少なくともこの受容体の或る断片、例えばリガンド結合部位など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、これらの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DME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、ショウジョウバエ、又は大腸菌からの細胞が含まれる。次に、DMEを発現する細胞、又はDMEを含む細胞膜分画を試験化合物と接触させて、DME又は試験化合物の何れかの、結合又は活性の刺激或いは阻害を分析する。

#### 【0258】

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、フルオロフォア

、放射性同位体、酵素抱合体又はその他の検出可能な標識によりその結合を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DMEと混合するステップと、DMEとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法でこのアッセイでは、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、無細胞再構成標本、化学ライブラリ又は天然産物の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。

#### 【0259】

本発明のDME又はその断片を用いて、DMEの活性を調節する化合物をスクリーニングできる。このような化合物としては、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニスト又は逆アゴニストなどが含まれ得る。一実施態様では、DMEが少なくとも1つの試験化合物と混合される、DME活性が許容される諸条件下で或るアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのDMEの活性を試験化合物不在下でのDMEの活性と比較する。試験化合物の存在下でのDMEの活性の変化は、DMEの活性をモジュレートする化合物の存在を標示する。別法では、試験化合物を、DMEの活性に適した条件下で、DMEを有する *in vitro*系すなわち無細胞系と混合してアッセイを実施する。これらアッセイの何れにおいても、DMEの活性をモジュレートする試験化合物は間接的にモジュレートする場合があります、その際は試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つ、又は複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

10

#### 【0260】

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、DME又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「ロックアウト」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号などを参照）。例えば129/SvJ細胞系などのマウス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され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、組織特異的又は発生段階特異的に目的遺伝子をロックアウトする（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マウス株などから採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。これらの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特定し、これらを交配させてヘテロ接合性系又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、可能性のある治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

20

30

#### 【0261】

DME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タイプを含む、少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、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）。

40

#### 【0262】

DME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「ロックイン」ヒト化動物（ブタ）又は遺伝子組換え動物（マウス又はラット）を作製できる。ロックイン技術を用いて、DME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。遺伝子組換え子孫又は近交系について試験し、潜在的医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばDMEを乳汁内に分泌するなどDME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）。

50

## 【0263】

## (治療)

DMEの複数の領域と薬物代謝酵素類との間には、例えば配列及びモチーフの文脈で、化学的及び構造的類似性が存在する。更に、DMEを発現する組織の例としては、肝組織、腎皮質組織、膵島細胞、及び骨髄神経芽細胞腫腫瘍を含む癌組織があり、表6に見られる。従って、DMEは、自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生又は発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、及び肝臓の疾患を含む胃腸疾患においてある役割を果たすと考えられる。DMEの発現若しくは活性の亢進に関連する疾患の治療においては、DMEの発現又は活性を低下させることが望ましい。また、DMEの発現又は活性の低下に関連する疾患の治療においては、DMEの発現又は活性を亢進させることが望ましい。

10

## 【0264】

従って、一実施態様では、DMEの発現又は活性の低下に関連した疾患の治療又は予防のために、被験者にDME又はその断片や誘導体が投与され得る。そのような疾患の例には、限定するものではないが、自己免疫/炎症性の疾患では、後天性免疫不全症候群(AIDS)及びアジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症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、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患(胎児赤芽球症)、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、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症(強皮症)、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、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、細胞増殖異常で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、及び奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、また発達障害では尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィ、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Syndenham舞踏病(Syndenham's chorea)及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴が含まれ、内分泌疾患の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラークリスチャン病、レテラー・ジーヴェ病、サルコイドーシス、エンブティセラ(トルコ鞍空虚)症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい抗利尿ホルモン(ADH)不適合分泌症候群(SIADH)及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プラマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病(chronic hypercalcemia)を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリ

20

30

40

50

ウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、ゴナドトロピン単独欠損症 (isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 $\alpha$ -還元酵素症候群、女性化乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれ、眼疾患では、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、色素性網膜炎(網膜色素変性症)、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、視交叉腫瘍(chiasmal tumor)が含まれ、代謝障害の中には、アジソン病、脳腱黄色腫症、先天性副腎過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、副腎髄質機能亢進症、低アドレナリン症、副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、高コレステロール血症、甲状腺機能亢進症、低血糖症、甲状腺機能低下症、高脂質血症、高脂血症、脂質ミオパシー(lipid myopathies)、脂肪異常栄養症、リソソーム蓄積症、メンケス症候群、後角症候群(occipital horn syndrome)、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損くる病、低カルシウム血症、低リン酸血症、思春期後小脳性運動失調症、チロシン血症が含まれ、また、胃腸疾患が含まれ、その中には嚥下障害、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、洞又は幽門の浮腫、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、遺伝性高ビリルビン血症、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、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、血色素症、ウィルソン病、 $\alpha_1$ 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、癌腫を含む肝癌が含まれる。

#### 【0265】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現又は活性の低下に関連した疾患の治療又は予防のために、DME又はその断片や誘導体を発現し得るベクターを被験者に投与し得る。

#### 【0266】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現又は活性の低下に関連した疾患の治療又は予防のために、実質的に精製されたDMEを有する組成物を、好適な医薬用キャリアと共に被験者に投与し得る。

#### 【0267】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現又は活性の低下に関連した疾患の治療又は予防のために、DMEの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

#### 【0268】

更なる実施態様では、DMEの発現又は活性の増大に関連した疾患の治療又は予防のために、被験者にDMEのアンタゴニストを投与し得る。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した自己免疫/炎症の疾患、細胞増殖異常、発生又は発達障害、内分泌障害、眼の疾患、代謝障害、及び肝臓の疾患を含む胃腸疾患が含まれる。一実施態様では、DMEに特異結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはDMEを発現する細胞又は

組織に薬物を運ぶターゲティング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【0269】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、DMEの発現又は活性の増大に関連した疾患の治療又は予防のために、DME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被験者に投与し得る。

【0270】

別の実施態様では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、又はベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来 of 医薬原理に従って選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療又は予防に相乗効果をもたらし得る。この方法により、少量の各薬物で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

10

【0271】

DME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できる。詳しくは、精製されたDMEを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリ群をスクリーニングしたりしてDMEと特異結合する薬物を同定できる。DMEの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造できる。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。中和抗体(すなわち二量体の形成を阻害する抗体)は通常、治療用に好適である。一本鎖抗体(例えば、ラクダ又はラマ)は有力な酵素阻害剤であり得る。またペプチドミメティックの設計及び免疫吸着剤やバイオセンサーの開発に利点があるであろう(Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

20

【0272】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、DME又は任意の断片、又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。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバントと、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、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ジニトロフェノールなどの界面活性剤と

30

【0273】

DMEに対する抗体を誘導するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、又は断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を持つものが好ましく、一般的には、約10個以上のアミノ酸からなる配列となる。これらのオリゴペプチド、ペプチド又は断片はまた、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。DMEアミノ酸類の短いストレッチ群は、KLHなど他のタンパク質の配列と融合され、このキメラ分子に対する抗体群が産生され得る。

【0274】

DME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群を産生する、任意の技術を用いて作製できる。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術及びEBV-ハイブリドーマ技術がある(Kohler, G. 他. (1975) Nature 256:495-497, Kozbor, D. 他 (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42, Cote, R.J. 他 (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030, Cole, S.P. 他 (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120等を参照)。

40

【0275】

更に、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「キメラ抗体」作製のために開発した技術が、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. 81:68516

50

855; Neuberger, M.S.他。(1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.他。(1985) Nature 314:452-454を参照)。別法では、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、DME特異的一本鎖抗体を生成し得る。関連した特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリ類からチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137等を参照)。

【0276】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは文献に開示されているように非常に特異的な結合試薬の免疫グロブリンのライブラリ又はパネルのスクリーニングによっても行い得る。(Orlandi, R. 他 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86: 3833-3837、Winter, G. 他 (1991) Nature 349:293-299等を参照)。

【0277】

DMEに対する特異結合部位を持つ抗体断片をも産生し得る。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される  $F(ab')_2$  断片と、 $F(ab')_2$  断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片を迅速且つ容易に同定することが可能となる (Huse, W.D. 他 (1989) Science 246:1275-1281等を参照)。

【0278】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れかを用いる競合結合試験、又は免疫放射定量測定法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、DMEとその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。2つの非干渉性DMEエピトープに対して反応性を持つモノクローナル抗体群を用いる、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、競合結合試験も利用できる (Pound、前出)。

【0279】

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、DME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DME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。ポリクローナル抗体類は多数のDMEエピトープに対して親和性が不均一であり、或るポリクローナル抗体製剤に関して判定した  $K_a$  は、DMEに対する抗体群の平均の親和性又は結合活性を表す。特定のDMEエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体の製剤の  $K_a$  は、親和性の真の測定値を表す。 $K_a$  値が  $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$  の高親和性抗体製剤は、DME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  $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$  の低親和性抗体製剤は、DME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. 及び Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0280】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価及び結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも  $1 \sim 2 \text{ mg/ml}$  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製剤は一般に、DME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。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である (前出のCattyの文献、同Coligan 他の文献等を参照)。

【0281】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチド、又はその任意の断片

や相補配列が、治療目的で使用される。ある実施態様では、DME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、RNA、PNA、又は修飾したオリゴヌクレオチド) 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、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はより大きな断片が、DMEをコードする配列の制御領域又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。(Agrawal, S., ed. (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJを参照)。

#### 【0282】

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作製する発現プラスミドの形で、細胞内に送達し得る (Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475 及び Scanlon, K.J. 他 (1995)9(13):1288-1296等を参照)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる (Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出の Ausubel, Uckerlert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347等を参照)。その他の遺伝子送達機構には、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公知のその他のシステムが含まれる (Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736. 等を参照)。

#### 【0283】

本発明の別の実施態様では、DME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。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症 (例えば X 染色体鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) *Science* 288:669-672) により特徴付けられる重症複合型免疫欠損 (SCID)-X1 の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に関連する重症複合型免疫欠損 (Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480、Bordignon, C. 他 (1995) *Science* 270:470-475)、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 (thalassaemia)、家族性高コレステロール血症、第 VIII 因子若しくは第 IX 因子欠損に起因する血友病 (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410、Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242) を治療し、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ (例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生体 (例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) (Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396、Poeschl, E. 他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399) などヒトレトロウイルス、B型若しくはC型肝炎ウイルス (HBV、HCV)、Candida albicans及びParacoccidioides brasiliensis等の真菌寄生体、並びにPlasmodium falciparum及びTrypanosoma cruzi等の原虫寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。DME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DME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。

#### 【0284】

本発明の更なる実施例では、DMEの欠損による疾患や異常症を、DME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DME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導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii) 遺伝子銃、(iii) リポソームを介した形質移入、(iv) 受容体を介した遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソンの使用 (Morgan, R.A. 及び W.F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217、Ivics, Z. (1997) *Cell* 91:501-510; Boulay, J-L. 及び H. Recipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450) がある。

#### 【0285】

10

20

30

40

50

限定するものではないがDMEの発現に有効でありうる発現ベクターには、PCDNA 3.1、E PITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA) 及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) がある。DMEを発現させるために、(i) 構成的に活性なプロモータ (例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK)、若しくは  $\alpha$ -アクチンの遺伝子など)、(ii) 誘導性プロモータ (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 (Gossen, M. 及び 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. 及び H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:45 10 1-456))、エクジソン誘導性プロモータ (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、又はRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモータ (Rossi, F.M.V. 及び H.M. Blau, 前出)、又は (iii) 正常な個体に由来する、DMEをコードする内因性遺伝子の天然のプロモータ若しくは組織特異的プロモータを用いることが可能である。

#### 【0286】

市販のリポソーム形質転換キット (例えばInvitrogen社のPerFect Lipid Transfection Kit) を用いれば、当業者はポリヌクレオチドを、培養中の標的細胞に送達することが可能になる。また、実験パラメータ群を最適化するのに必要な努力が最小限になる。別法では、リン酸カルシウム法 (Graham, F.L. 及び A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467) 若 20 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。初代培養細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳類の形質移入プロトコルの修正が必要である。

#### 【0287】

本発明の別の実施例では、DME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) プロモータ若しくは独立したプロモータの調節の下でDME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ド配列を伴うRev応答性エレメント (RRE) とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター (例えばPFB及びPFBNEO) 30 はStratagene社から市販されており、刊行データ (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。ベクターは、好適なベクター産生細胞株 (VPCL) において増殖され、VPCL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又はVSVg等の汎親和性エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. 及び A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. 他 (1998) J. Virol. 72:8463-847 1、Zufferey, R. 他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5, 910,434号 (「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high 40 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、細胞集団 (例えばCD4<sup>+</sup> T細胞) の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. 他 (1997) J. Virol. 71:7020-7029、Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-47 16、Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

#### 【0288】

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、DME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DMEをコードするポリヌクレオチドを送達する。ア 50

デノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を膀胱の無損傷の膀胱内に導入するためにも用途が広いことが証明された (Csete, M.E. 他 (1995) *Transplantation* 27:263-268)。潜在的に有用なアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号 (「Adenovirus vectors for gene therapy」) に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. 他 (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544 及び Verma, I. M. 及び N. Somia (1997) *Nature* 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

#### 【0289】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、DMEの発現に関して1以上の遺伝子異常を持つ標的細胞に、DMEをコードするポリヌクレオチド類を送達する。単純疱疹ウイルス (HSV) 系のベクターの利用は、HSVが向性を持つ中枢神経細胞にDMEを導入する際に特に有用たり得る。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス (HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に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についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 (「Herpes simplex virus swains for gene transfer」) に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモータの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外因性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27、及びICP22を欠失した組換えHSV系統の、作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) *J. Virol.* 73:519-532 及び Xu, H. 他 (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化したヘルペスウイルス配列群の操作、大ヘルペスウイルスゲノム (large herpesvirus genomes) の様々なセグメントを持つ複数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びに細胞群へのヘルペスウイルスの感染は、当業者に公知の技術である。

#### 【0290】

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、DMEをコードするポリヌクレオチド群を標的細胞群に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス (Semliki Forest Virus, SFV) の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターはSFVゲノムに基づいている (Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、ウイルスのカプシドタンパク質群を通常はコードする、サブゲノムRNAが産生される。このサブゲノムRNAは、完全長ゲノムRNAよりも高レベルに複製するので、酵素活性 (例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ) を持つウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質群が過剰産生される。同様に、DME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DMEをコードするRNAが産生され、高いレベルでDMEが合成される。通常、ウイルスの感染は、数日以内の細胞溶解を伴う。一方、シンドビスウイルス (SIN) の或る変異体を有するハムスター正常腎臓細胞 (BHK-21) 群が持続的な感染を確立する能力は、ウイルス類の溶解複製を、遺伝子治療に応用し得るように好適に改変可能であることを示唆する (Dryga, S.A. 他 (1997) *Virology* 228 :74-83)。ウイルスの宿主域は広いので、様々なタイプの細胞にDMEを導入することができる。或る集団における或るサブセットの細胞群の特異的形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及びウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

#### 【0291】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位 (transcription initiation site) とは例えばスタート部位 (start site

10

20

30

40

50

)から数えて約 - 10 と約 + 10 の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん体塩基対形成は、二重らせん体が開いてポリメラーゼ、転写因子又は調節分子と結合するのを阻害するので有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある (Gee, J.E. 他 (1994) in: Huber, B.E. 及び B.L. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, 163-177頁等を参照)。相補配列又はアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによって mRNA の翻訳を阻止するべく設計することができる。

#### 【0292】

リボザイムは酵素的 RNA 分子であり、RNA の特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、相補的標的 RNA へのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、遺伝子操作で作ったハンマーヘッド型リボザイム分子は、DME 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可能性がある。

#### 【0293】

任意の RNA 標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC 配列を含めたリボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する 15 ~ 20 リボヌクレオチドの短い RNA 配列が、そのオリゴヌクレオチドを機能不全にするような 2 次構造の特徴をもっていないかを評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチド群とのハイブリダイゼーションへのアクセス可能性をテストすることによって行い得る。

#### 【0294】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。作製方法には、固相フォスフォアミダイト化学合成等の、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、DME をコードする DNA 配列の *in vitro* 及び *in vivo* 転写によって RNA 分子を産出し得る。このような DNA 配列は、T7 や SP6 などの好適な RNA ポリメラーゼプロモータを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。或いは、相補的 RNA を構成的或いは誘導的に合成するこれらの cDNA 作製物を、細胞株、細胞又は組織内に導入することができる。

#### 【0295】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするために RNA 分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾としては、分子の 5' 末端、3' 末端、或いはその両方において隣接配列群を追加することや、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエート又は 2' -O-メチルを使用することが含まれる。この概念は、PNA の産出に固有のものであるが、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - 及び同様の修飾をしたものの他、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイプトシン (wybutosine) 等を含める。

#### 【0296】

本発明の更なる実施態様には、DME をコードするポリヌクレオチドの発現を改変する上で有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの発現改変を起こすのに有効な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター又はエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を改変し得る。従って、DME の発現又は活性の増加に関連する疾患の治療においては、DME 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、DME の発現又は活性の低下に関連する

10

20

30

40

50

疾患の治療においては、DME 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。

【0297】

特異ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変容させる場合と、既存の、商用の又は専用の、天然又は非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/又は構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組み合わせ的に又は無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。DMEをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルを、このようにして得た試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルには例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、或いは *in vitro* 無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。DMEをコードするポリヌクレオチドの発現における変容は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、DME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量を定量し、それによって1つ若しくは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を改変する際に試験化合物が有効であることを示す。特異ポリヌクレオチドの発現改変に有効な化合物に対して、例えば分裂酵母 (*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) 又はHeLa細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性を調べるためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruce, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

10

20

【0298】

ベクターを細胞又は組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro* 及び *ex vivo* の使用に対して同程度に適している。*ex vivo* 治療の場合、ベクターを、患者から採取した幹細胞内に導入し、クローニング増殖して同患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクション、リボソーム注入又はポリカチオンアミノポリマーによる送達は、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる (Goldman, C.K. 他 (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466.等を参照)。

30

【0299】

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

【0300】

本発明のさらなる実施例は、薬物として許容できる或る賦形剤と共に製剤される或る活性成分を一般に有する組成物の投与に関連する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な剤型が広く知られており、詳細は *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような組成物は、DME、DMEの抗体、擬態物質、アゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターなどからなる。

40

【0301】

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

【0302】

50

肺から投与する組成物は、液状又は乾燥粉末状で調製し得る。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）の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺送達が最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした（Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺送達は、針注射なしに投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくする。

#### 【0303】

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

10

#### 【0304】

DMEを有する、又はその断片群を有する高分子群を直接、細胞内に送達すべく、特殊な種々の形状の組成物群が調製され得る。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、DME又はその断片をHIV Tat-1タンパク質の短い陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系で、脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている（Schwarze, S.R. 他（1999）Science 285:1569-1572）。

#### 【0305】

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

20

#### 【0306】

治療有効量は、症状や容態を回復させる活性成分の量、たとえばDME又はその断片、DMEの抗体、DMEのアゴニスト又はアンタゴニスト、インヒビターなどの量を指す。治療有効性及び毒性は、細胞培養又は動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED<sub>50</sub>（集団の50%の治療有効量）又はLD<sub>50</sub>（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を策定するのに用いられる。このような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く持たず、ED<sub>50</sub>を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

30

#### 【0307】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。十分なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持すべく、用法及び用量を調整する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の全身健康状態、被験者の年齢、体重及び性別（ジェンダー）、投与の時間及び頻度、薬剤の併用、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

40

#### 【0308】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、ヌクレオチドの処方では、タンパク質又はそれらのインヒビター類とは異なる処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの送達は、特定の細胞、症状、部位などに特異的なものとなる。

50

## 【0309】

(診断)

別の実施態様では、DMEに特異結合する抗体類が、DMEの発現によって特徴付けられる疾患の診断、又はDMEやDMEのアゴニスト又はアンタゴニスト、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類に用いられる。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。DMEの診断アッセイには、ヒトの体液から、或いは細胞や組織の抽出物から、抗体及び標識を用いてDMEを検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものも、されていないものも可能であり、レポーター分子との共有結合又は非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広くさまざまな種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

10

## 【0310】

DMEを測定するための、ELISA, RIA, 及びFACSなど、種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変容した、或いは異常なレベルのDME発現を診断するための基盤を提供する。正常或いは標準的なDMEの発現の値は、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又は細胞とDMEに対する抗体とを複合体の形成に適した条件下で結合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験者、対照及び生検組織からの疾患サンプルで発現するDMEの量を標準値と比較する。標準値と被験体との偏差が、疾患を診断するパラメータを確定する。

## 【0311】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードするポリヌクレオチド群を診断目的に用い得る。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用いて、DMEの発現が疾患と相関し得る生検組織群における、遺伝子発現を検出し定量し得る。この診断アッセイを用いて、DMEの有無や過剰発現を調べ、治療時のDME値の調節を監視し得る。

20

## 【0312】

一実施形態では、例えばDMEをコード又は近縁の分子群をコードするゲノム配列群など、ポリヌクレオチド配列群を検出できるPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを用いて、DMEをコードする核酸配列群を同定できる。プローブが高度に特異的な領域(例えば5'調節領域)から作られている、或いはやや特異性の低い領域(例えば保存されたモチーフ)から作られているという、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シーとによって、そのプローブがDMEをコードする天然配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子変異配列や関連配列を同定するかどうかが決まることとなる。

30

## 【0313】

プローブ類はまた、関連する配列群の検出に利用され得る他、DMEをコードする任意の配列との少なくとも50%の配列同一性を持ち得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNA或いはRNAが可能であり、SEQ ID NO:13-24の配列、或いはDME遺伝子のプロモータ、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。

## 【0314】

DMEをコードするDNA群に対して特異的なハイブリダイゼーションプローブ群の作製方法としては、DME又はDME誘導體群をコードするポリヌクレオチド配列群を、mRNAプローブ群の作製のためのベクター類にクローニングする方法を含む。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、 $^{32}\text{P}$ 又は $^{35}\text{S}$ 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

40

## 【0315】

50

DMEをコードするポリヌクレオチド配列群を用いて、DMEの発現に関連する疾患を診断できる。そのような疾患の例には、限定するものではないが、自己免疫/炎症性の疾患では、後天性免疫不全症候群(AIDS)及びアジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィ(APEDED)、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、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患(胎児赤芽球症)、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、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、脾炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、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、細胞増殖異常で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、及び奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、また発達障害では尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィ、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス マジエニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham舞踏病(Sydenham's chorea)及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴が含まれ、内分泌疾患の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンドシュラークリスチャン病、レテラー・ジーヴェ病、サルコイドーシス、エンプティセラ(トルコ鞍空虚)症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい抗利尿ホルモン(ADH)不適合分泌症候群(SIADH)及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プラマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病(chronic hypercalcemia)を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、ゴナドトロピン単独欠損症(isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 $\alpha$ -還元酵素症候群、女性化乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれる。眼疾患では、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、色素性網膜炎(網膜色素変性症)、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、視交叉腫瘍(chiasmal tumor)が含まれ、代謝障害の中には、副

腎機能不全、脳腱黄色腫症、副腎皮質過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、副腎髄質機能亢進症、低アドレナリン症、上皮小体亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂血症、脂質ミオパシー (lipid myopathies)、脂肪異栄養症、リソソーム蓄積症、メンケス症候群、後角症候群 (occipital horn syndrome)、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損症、低カルシウム血症、低リン酸血症、思春期後小脳性運動失調症、チロシン血症が含まれ、また、胃腸疾患が含まれ、その中には嚥下障害、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、洞又は幽門の浮腫、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、遺伝性高ビリルビン血症、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、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、血色素症、ウィルソン病、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、癌腫を含む肝癌が含まれる。DMEをコードするポリヌクレオチド配列は、変容したDME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、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法や、ディップスティック (dipstick)、ピン (pin)、及びマルチフォーマットのELISA式アッセイ、及びマイクロアレイに使用することが可能である。このような定性方法又は定量方法は、当分野で公知である。

10

20

30

40

#### 【0316】

或る特定の態様では、DMEをコードするヌクレオチド配列群は、関連する障害、特に上記した障害を検出するアッセイ類において有用であり得る。DMEをコードするヌクレオチド配列群を、標準的な種々の方法で標識化し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプル中のシグナルの量が、対照サンプルと較べて著しく変化している場合は、該サンプル内の、DMEをコードするヌクレオチド配列群のレベル変化の存在が、関連する障害の存在を標示する。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者の治療をモニターするために用いることもできる。

#### 【0317】

DMEの発現に関連する障害の診断の基礎を提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。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下で、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から採取された体液或いは細胞抽出物と、DMEをコードする配列或いはその断片とを混合することにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量で用いて行った実験から得た値を正常な被験者から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

#### 【0318】

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

#### 【0319】

50

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現又は過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出したりする方法を提供し得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法又は積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生又は更なる進行を防止することが可能となる。

#### 【0320】

DMEをコードする配列群から設計されたオリゴヌクレオチド群の、更なる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いは *in vitro* で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはDMEをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはDME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、最適化した条件下で、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シー条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

10

#### 【0321】

或る特定の態様において、DMEをコードするポリヌクレオチド配列群由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて、一塩基多型（SNP）を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性又は後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP（single-stranded conformation polymorphism）及び蛍光SSCP（fSSCP）がある。SSCPでは、DMEをコードするポリヌクレオチド配列群に由来するオリゴヌクレオチドプライマー類を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でDNAを増幅する。DNAは例えば、病変組織又は正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー（amplimer）の検出が可能になる。更に、インシリコSNP（*in silico* SNP, isSNP）と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々のオーバーラップするDNA断片群の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調製に、また統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理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。

20

30

#### 【0322】

SNPはヒト疾患の遺伝的基礎を研究するために有益であり得る。例えば、少なくとも16種の一般的SNPが、非インスリン依存性真性糖尿病に関連している。SNPはまた、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、慢性肉芽腫性疾患等の単一遺伝子病の転帰の違いを研究するために有用である。例えば、マンノース結合レクチンでの変異体（MBL2）は、嚢胞性線維症の肺での有害な転帰と相関することがわかっている。SNPにはまた薬理ゲノミクスで有用性がある。薬理ゲノミクスは、生命にかかわる毒性のように、ある薬剤への患者の応答に影響する遺伝的変異体を同定する。例えば、N-アセチルトランスフェラーゼにおける或る変異は抗結核剤、イソニアジドに応答した末梢神経障害の発生率が高くなるが、ALOX5遺伝子のコアプロモータの変異は5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする抗喘息薬での治療に対する臨床的応答を減少する。異なった集団でのSNPの分布についての分析は遺伝的浮動、突然変異、組み換え及び選択の研究に有用であると共に、集団の起源と移動の調査にも有用である（Taylor, J.G. 他（2001）Trends Mol. Med. 7:507-512; Kwok, P.-Y. and Z. Gu（1999）Mol. Med. Today 5:538-543; Nowotny, P. 他（2001）Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641）。

40

#### 【0323】

DMEの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識又はビオチン標識、対照核酸の共増幅（coamplification）、及び、標準曲線から得た結果の補間もあ

50

る(例えば、Melby, P.C. 他 (1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplaa, C. 他 (1993) Anal. Biochem. 212:229-236を参照)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法又は比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

#### 【0324】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチド又はより長い断片を、マイクロアレイにおけるエレメントとして用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多型性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬物の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

10

#### 【0325】

別の実施態様では、DME、DMEの断片群又は、DMEに特異的な抗体類を、或るマイクロアレイ上のエレメント群として用い得る。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質-タンパク質相互作用、薬物-標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニター又は測定することが可能である。

20

#### 【0326】

或る実施例は、或る組織又は細胞タイプの転写イメージを生成するような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、特定の組織又は細胞タイプによる、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(Seilhamer 他、米国特許第5,840,484号の「Comparative Gene Transcript Analysis」を参照。これらを引用することを以って本明細書の一部とする)。したがって、特定の組織又は細胞タイプの転写物又は逆転写物全体に、本発明のポリヌクレオチド又はそれらの相補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを作製し得る。或る実施態様では、本発明のポリヌクレオチド又はそれらの相補体が1マイクロアレイ上に複数エレメントの1サブセットを持つような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。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ァイルを提供し得る。

30

#### 【0327】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検又はその生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。転写イメージはしたがって、組織又は生検サンプルの場合には in vivo、細胞株の場合には in vitroでの遺伝子発現を反映する。

#### 【0328】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、工業的又は天然の環境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と併せて使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを示す、しばしば分子フィンガープリント又は毒性シグネチャ(toxicant signatures)と称される特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する(Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:15 3-159, Steiner, S. 及び N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知毒性を有する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ある。フィンガープリント又はシグネチャは、多数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る場合には、最も有用且つ正確である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データ

40

50

をノーマライズすることに使用できるため、それらの遺伝子は重要である。ノーマライズ手順は、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。毒性シグネチャの要素に遺伝子機能を割り当てることで毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要とされない（例えば2000年2月29日に米国国立環境健康科学研究所（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中毒学的スクリーニングの際に、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

#### 【0329】

或る実施例では、核酸を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理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つ以上のプローブでハイブリダイズし、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し得る。処理した生物学的サンプル中の転写物レベルを、未処理生物学的サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写物レベルの差は、処理済サンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を標示する。

#### 【0330】

別の実施態様は、本発明のポリペプチド配列群を用いて或る組織又は細胞タイプのプロテオームを分析することに関する。プロテオームの語は、特定の組織又は細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に異なる分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターンすなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織又は細胞タイプ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、1次元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、2次元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応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により、分離が達成される（前出のSteiner及びAnderson）。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、或いは銀染色液又は蛍光染色液などの物質を用いてゲルを染色することにより、分散した、独自の位置にある点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、例えば試験化合物又は治療薬で処理された、又は未処理の生物学的サンプルから得られる、同等に位置するタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的又は酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。或るスポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、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データが得られる。

#### 【0331】

プロテオームのプロファイルは、DMEに特異的な抗体類を用いてDME発現レベルを定量することによっても作成できる。或る実施例では、マイクロアレイ上で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して各アレイ要素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. 他（1999）*Anal. Biochem.* 270:103-111, Mendozze, L.G. 他（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、チオール又はアミノ反応性蛍光化合物とサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイのエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

#### 【0332】

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。数種の組織の数種のタンパク質に対しては、転写物とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので（Anderson,

10

20

30

40

50

N.L. 及び J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18:533-537)、転写イメージには有意に影響しないがプロテオームのプロファイルを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中の転写物の分析はmRNAの急速な分解のために困難なので、プロテオームのプロファイル作成はこのような場合により信頼し得、情報価値があり得る。

#### 【0333】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシーケンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

10

#### 【0334】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生体サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、未処理生物学的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の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。

20

#### 【0335】

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

#### 【0336】

本発明の別の実施態様では、DMEをコードする核酸配列群を用いて、天然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群を作製できる。コード配列又は非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多重遺伝子族のメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域又は人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355; Price, C.M. (1993) *Blood Rev.* 7:127-134; and Trask, B.J. (1991) *Trends Genet.* 7:149--154を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝又は制限酵素断片長多型 (RFLP) と関連するような遺伝子連鎖地図を作製できる。 (例えば、Lander, E.S. 及び D. Botstein (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7353-7357を参照)。

30

40

#### 【0337】

蛍光 *in situ* ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (前出のHeinz-Ulrich, 他 (1995) *in Meyers*, 965-968頁等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌或いはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上の、DME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との相関性は、この疾患と関連するDNAの領域の決定に役立ち得るため、位置を決定するクローニングの作業を促進

50

し得る。

【0338】

確定した染色体マーカーを用いた連鎖分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、位置クローニング、又はその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患又は症候群に關与する遺伝子が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を提示している可能性がある (Gatti, R.A.他 (1988) Nature 336:577-580等を参照)。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

10

【0339】

本発明の別の実施態様では、DME、その触媒作用断片群、或いは免疫原断片群、又はそのオリゴペプチド群を、種々の任意の薬物スクリーニング技術における、化合物群のライブラリ類のスクリーニングに用い得る。薬物スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することができる。DMEと、試験する薬物との結合による複合体の形成を測定し得る。

【0340】

別の薬物スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる (Geysen, 他 (1984) PCT application W084/03564等を参照)。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、DME、或いはその断片と反応してから洗浄する。次に、結合したDMEが、当分野で周知の種々の方法で検出される。精製されたDMEはまた、前記した薬物スクリーニング技術に用いるプレート上に直接、被覆し得る。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

20

【0341】

別の実施例では、DMEと特異結合可能な中和抗体がDMEとの結合について試験化合物と競合する、競合的薬物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、DMEと1つ以上の抗原決定基を共有するどのペプチドの存在も検出する。

30

【0342】

別の実施態様では、DMEをコードするヌクレオチド配列群を、将来に開発される分子生物学技術であり、現在知られているヌクレオチド配列群の特性 (限定はされないが、トリプレット遺伝暗号及び特異的な塩基対相互作用など) に依存する新技術に用い得る。

【0343】

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

40

【0344】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物は、米国特許出願第60/269.643号、第60/271.332号、第60/276.767号、第60/282.077号、第60/285.447号、第60/287.060号及び第60/288.543号を含め、言及することをもって特に本明細書の一部となす。

【実施例】

【0345】

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFESEQ GOLDデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールに又は変性

50

剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL (Life Technologies) は、フェノールとグアニジンイソチオシアネートとの単相溶液である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムのクッション液の上に重層して遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

#### 【0346】

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

10

#### 【0347】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) 又はSUPERSCRIPTプラスミドシステム (Life Technologies) を用いて本技術分野で既知の推奨方法又は類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出のAusubel, 1997, 5.1-6.6ユニットなどを参照)。逆転写は、オリゴd(T)又はランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズの選択 (300 ~ 1000 bp) は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2B又はSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは分取用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの適合する制限酵素部位に結合させた。好適なプラスミドは例えば、PBLUESCRIPT プラスミド (Stratagene)、PSPORT 1 プラスミド (Life Technologies)、PCDNA2.1 プラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMV プラスミド (Stratagene)、PCR2-TOPOTAプラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド (Stratagene)、pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics) 又は pINCY (Incyte Genomics)、或いはその誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRF又はSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10B又はELECTROMAX DH10Bなど適格な大腸菌細胞に形質転換した。

20

30

#### 【0348】

##### 2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例1のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。プラスミドの精製には、下記の少なくとも1つを用いた。すなわちMagic又はWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットのいずれかである。プラスミドは、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。

40

#### 【0349】

別法では、高処理フォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Eugene OR) 及びFLUOROSKAN 2 蛍光スキャナ (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光分析的に定量した。

#### 【0350】

##### 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から回収したIncyte cDNAを、以下に示すように

50

シークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) 又はPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) 又はMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬、又はABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Molecular Dynamics) が、標準ABIプロトコル及び塩基呼び出し(base calling)ソフトウェアを用いるABI PRISM 373又は377シークエンシングシステム (Applied Biosystems) が、或いはその他の本技術分野で既知の配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出のAusubel, 1997, 7.7ユニットに概説) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例 8に記載した方法で配列を伸長させた。

10

20

30

40

50

#### 【0351】

Incyte cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、IncyteのcDNA配列、又はその翻訳を公共のデータベース (例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) と、ヒト、ラット、マウス、線虫、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、及び鵝口瘡カンジダ (*Candida albicans*) からの配列を含むPROTEOMEデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、及びPFAM等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並びに、SMART (Schultz 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857-5864; Letunic, I. 他 (2002) Nucleic Acids Res. 30:242-244) のようなHMMに基づいたタンパク質ドメインデータベースから選択したデータベースに対して問い合わせた。(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。Eddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照)。問い合わせは、BLAST、FASTA、BLIMPS及びHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するように構築した。或いは、GenBank cDNA、GenBank EST、ステッチされた配列、ストレッチされた配列又はGenscan予測コード配列 (実施例 4 及び 5 を参照) を用いてIncyte cDNAの集団を完全長まで伸長させた。Phred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて構築し、GenMark、BLAST及びFASTAに基づくプログラムを用いてcDNAの集団をオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長ポリペプチド配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳した。或いは、本発明のポリペプチドは完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。引き続き、GenBankタンパク質データベース (genpept)、SwissProt、PROTEOMEデータベース、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びProsites等のデータベース、PFAM等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、及びSMARTのようなHMMに基づいたタンパク質ドメインデータベースに対する問い合わせによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア (日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA) 及びLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて分析される。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列間の一致率も計算するMEGALIGNマルチシークエンスアラインメントプログラム (DNASTAR) に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって指定されるデフォルトパラメータを用いて作製する。

#### 【0352】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリ (構築) に利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを表7に示す

。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な参照文献であり、全ての文献は引用を以って全文を本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は、2つの配列が一致する強さを評価するために用いた、スコア、確率値その他のパラメータを示す（スコアが高いほど、又は確率値が低いほど、2配列間の同一性が高い）。

#### 【0353】

完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:13-24のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20～約4000ヌクレオチドの断片を表2の列4に示した。

#### 【0354】

##### 4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の薬物代謝酵素は、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94 及びBurge, C. 及び S. Karlin (1998) Cuff. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照）。プログラムは予測されたエキソンを連結し、メチオニンから停止コドンに及ぶ構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30 kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が薬物代謝酵素をコードするかを決定するために、コードされるポリペプチドをPFAMモデルにおいて薬物代謝酵素について問い合わせて分析した。潜在的な薬物代謝酵素もまた、薬物代謝酵素として注釈を既に付けられたIncyte cDNA配列に対する相同性を基に同定した。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgenpept及びgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップのBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分な又は取り除かれたエキソンなど、Genscanにより予測された配列のエラーを修正した。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNA又はGenscan予測配列の公共cDNA適用範囲の発見に用いられ、したがって転写の証拠を提供した。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正又は確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載された構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/又は公共のcDNA配列でGenscan予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集した、又は非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

#### 【0355】

##### 5 cDNA配列データとのゲノム配列データの統合(assembly)

##### ステッチ配列(Stitched Sequence)

部分cDNA配列は、実施例4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムにより予測されたエキソンを用いて伸長させた。実施例3に記載されたように構築された部分cDNAは、ゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNA及び1つ若しくは複数のゲノム配列から予測されたGenscanエキソンを含むクラスタに分解した。cDNA及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスタを分析し、引き続いて確認、編集又は伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライズ変異体を生成した。区間の長さ全体がクラスタ中の2以上の配列に存在するような配列区間を同定し、そのように同定された区間は推移性により等しいと考えられた。例えば、1つのcDNA及び2つのゲノム配列に或る区間が存在する場合、3つの区間は全て等しいと考えた。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を親配列(parent sequence)に沿って現れる順にステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列及び変異配列を作製する。1種類の親配列に沿って発生した区間間の連鎖(cDNA - cDNA又はゲノム配列 - ゲノム配列)は、親の種類を変える連鎖(cDNA - ゲノム配列)に優先した。結果として得られるステッチ配列は、

10

20

30

40

50

翻訳されてBLAST分析により公共データベースgenpept及びgbpriと比較された。Genscanにより予測された不正確なエクソンは、genpeptからのトップのBLASTヒットと比較することにより修正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

【0356】

#### ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分DNA配列は、BLAST分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。まず、BLASTプログラムを用いて、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例3に記載したように構築された部分cDNAを問い合わせた。次に、最も近いGenBankタンパク質相同体をBLAST分析によりIncyte cDNA配列又は実施例4に記載のGenScanエクソン予測配列のいずれかと比較した。結果として得られる高スコアリングセグメント対 (HSP) を用いてキメラタンパク質を産出し、翻訳した配列をGenBankタンパク質相同体上にマッピングした。元のGenBankタンパク質相同体と比較して、キメラタンパク質内では挿入又は欠失が起こり得る。GenBankタンパク質相同体、キメラタンパク質又はその両方をプローブとして用い、公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、部分的なDNA配列を相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を含んでいるか否かを決定した。

10

【0357】

#### 6 DME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:13-24を構築するために用いた配列を、BLAST及び他のSmith-Watermanアルゴリズムの実装を用いて、Incyte 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:13-24 と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどの構築アルゴリズム (表7) を使用して、連続及びオーバーラップした配列のクラスターに組み入れた。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスター化された配列が既にマッピングされていたかを確認した。マッピングされた配列が或るクラスターに含まれている場合、そのクラスターの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

20

【0358】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲又は区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に関して測定する (センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。もっとも、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットによって広範囲に変化する)。cM距離は、配列が各クラスター内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対する境界となるようなGenethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。

30

【0359】

NCBI「GeneMap'99」 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) などの公的に入手可能なヒト遺伝子マップ及びその他の情報源を用いて、既に同定された疾患遺伝子類が、上記の区間内若しくは近傍にマップされているかを決定できる。

40

【0360】

#### 7 ポリヌクレオチド発現の分析

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

【0361】

BLASTを適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Genomics) 等のcDNAデータベースにおいて同一又は関連分子を検索した。ノーザン分析は、多数

50

の膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、特定の一致を厳密な一致、或いは類似的な一致として分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

【0362】

【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

【0363】

積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。積スコアは、0 ~ 100のノーマライズされた値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアリングセグメント対(HSP)に一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不一致塩基対に-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(ギャップにより隔離され得る)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアのセグメント対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的オーバーラップとBLASTアラインメントの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%一致する場合のみ得られる。積スコア70は、一端が100%一致し、70%オーバーラップしているか、他端が88%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%オーバーラップしているか、他端が79%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

【0364】

或いは、DMEをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば或る完全長配列は、Incyte cDNA配列(実施例3を参照)と少なくとも一部はオーバーラップするように構築される。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、心血管系、結合組織、消化系、胚構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液及び免疫系、肝臓、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、又は尿路などの1つの器官/組織のカテゴリーに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/条件カテゴリー即ち癌、細胞株、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、DMEをコードするcDNAの組織特異的発現及び疾患特異的発現を反映する。cDNA配列及びcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)から得ることができる。

【0365】

#### 8 DMEをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列はまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマー複数をを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーは、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIG 0.4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは別の適切なプログラムを用いて設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0366】

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

## 【0367】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマーを有する。また、 $Mg^{2+}$  と  $(NH_4)_2SO_4$  と 2-メルカプトエタノールを含むバッファ、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で増幅を行った。ステップ1: 94 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 60 , 1分、ステップ 4: 68 , 2分、ステップ 5: ステップ2、3及び 4を20回反復する。ステップ6: 68 , 5分、ステップ7: 4 で保存する。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で増幅を行った。ステップ1: 94 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 57 , 1分、ステップ 4: 68 , 2分、ステップ 5: ステップ2、3及び 4を20回反復する。ステップ6: 68 、5分、ステップ7: 4 で保存する。

10

## 【0368】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5  $\mu$  lの希釈していないPCR産物に溶解した100  $\mu$  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した。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するためにプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合物のアリコート5 ~ 10  $\mu$  lを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

20

## 【0369】

伸長したヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI) を用いて消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) への再連結反応前に音波処理又はせん断した。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6 ~ 0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長したクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位のオーバーハング部分を満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質転換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。

30

## 【0370】

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 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 60 , 1分、ステップ 4: 72 , 2分、ステップ 5: ステップ2、3及び 4を29回反復する。ステップ6: 72 , 5分、ステップ7: 4 で保存する。上記のようにPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) でDNAを定量した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC エネルギートランスファー シークエンシングプライマー、及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) 又はABI PRISM BIGDYE ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット (Terminator cycle sequencing ready reaction kit) (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングした。

40

## 【0371】

同様に、上記手順を用いて完全長ヌクレオチド配列を検証し、或いはそのような伸長のために設計されたオリゴヌクレオチド及び適切なゲノムライブラリを用いて5'調節配列を得る。

## 【0372】

9 DMEをコードするポリヌクレオチドのSNP(一塩基多型)の同定

50

一塩基多型 (SNP) として知られる一般的なDNA配列変異体がLIFESEQ データベース (Incyte Genomics) を用いてSEQ ID NO:13-24において同定された。実施例 3 に記述されているように、同じ遺伝子からの配列を共にクラスタにして構築し、これによって遺伝子内のすべての配列変異体の同定ができた。一連のフィルタからなるアルゴリズムを使って、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルタは、最小限のPhredクオリティスコア15を要求することにより大多数のベースコールのエラーを除去し、また、配列アラインメントエラーや、ベクター配列、キメラ及びスプライス変異体の不適当なトリミングにより生じるエラーを取り除いた。染色体の高度解析の自動化手順により、推定SNPの近傍におけるオリジナルのクロマトグラムファイルが解析された。クローンエラーフィルタは統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、逆転写酵素、ポリメラーゼ、又は体細胞突然変異によって引き起こされるエラーのような、実験処理時に導入されるエラーを識別した。クラスタエラーフィルタは、統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体又は偽遺伝子のクラスタ化に起因するエラー、又は非ヒト配列によるコンタミネーションにより生じたエラーを同定した。最後のフィルタ群によって、免疫グロブリン又はT細胞受容体に存在する重複 (duplicates) とSNPが除去された。

10

#### 【0373】

高速処理MASSARRAY システム (Sequenom, Inc.) を用いて質量分析によって更に特徴付けるために数種のSNPを選択して、四つの異なったヒト母集団中のSNP部位における対立遺伝子発生頻度を分析した。白人母集団は、ユタ州の83人、フランス人4人、ベネズエラ3人及びアーミッシュ派2人を含む92人 (男性46人、女性46人) で構成された。アフリカ人母集団はすべてアフリカ系アメリカ人である194人 (男性97人、女性97人) からなる。ヒスパニック母集団はすべてメキシコ系ヒスパニックの324人 (男性162人、女性162人) からなる。アジア人母集団は126人 (男性64人、女性62人) からなり、親の内訳は中国人43%、日本人31%、コリアン13%、ベトナム人5%及びその他のアジア人8%と報告されている。対立形質の発生頻度は最初に白人母集団において分析し、いくつかの例において、この母集団で対立形質分散を示さなかったSNPは他の三つの母集団において更に検査しなかった。

20

#### 【0374】

##### 10 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

SEQ ID NO:13-24由来のハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、又はゲノム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載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新技術のソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[ $-^{32}\text{P}$ ]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250  $\mu\text{Ci}$ と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba I又はPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化したヒトゲノム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、毎分 $10^7$ カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

30

40

#### 【0375】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40°Cで16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィ又はそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

#### 【0376】

##### 11 マイクロアレイ

マイクロアレイ上でアレイエレメントの結合又は合成は、フォトリソグラフィ、圧電印

50

刷（インクジェット印刷、前出のBaldeschweiler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、均一且つ、無孔の表面を持つ固体とするべきである（Sчена (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。或いは、ドットプロット法又はスロットプロット法に類似の手順を利用して、熱的、紫外線的、化学的又は機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、当業者に周知の利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る（例えばSचना, M. 他 (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. 他 (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. 及び J. H odgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31を参照）。

10

## 【0377】

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

20

## 【0378】

組織又は細胞サンプルの調製

グアニジニ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)<sup>+</sup>RNAを精製する。各ポリ(A)<sup>+</sup>RNAサンプルは、MMLV逆転写酵素、0.05 pg/μlのオリゴ(dT)プライマー（21mer）、1×第1鎖バッファ、0.03 unit/μlのRNアーゼ阻害剤、500 μMのdATP、500 μMのdGTP、500 μMのdTTP、40 μMのdCTP、40 μMのdCTP-Cy3（BDS）又はdCTP-Cy5（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット（Incyte）を用い、200 ngのポリ(A)<sup>+</sup>RNAを含有する体積25 mlで行う。特異的対照ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、非コード酵母ゲノムDNAから *in vitro* 転写により合成する。37 °Cで2時間インキュベートした後、各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、85 °Cで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピナラム（CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いて精製する。混合した後、2つの反応サンプルは、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）を用いて完全に乾燥させ、14 μlの5×SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

30

40

## 【0379】

マイクロアレイの調製

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、クロン化したcDNAインサートを有するベクターを含有する細菌細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRで1~2 ngの初期量から5 μgより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて精製される。

## 【0380】

50

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、処理の間及び処理後に 0.1% の SDS 及びアセトン中で超音波をかけ、蒸留水で十分に洗浄する。スライドガラスは、4% フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、蒸留水中で十分に洗浄し、95% エタノール中で 0.05% アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 のオーブンで硬化させる。

#### 【0381】

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。この特許は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/ $\mu$ l のアレイエレメント DNA 1  $\mu$ l を高速ロボット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。装置はここで、スライド毎に約 5 nl のアレイエレメントサンプルを加える。

10

#### 【0382】

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

#### 【0383】

##### 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  $\times$  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  $\mu$ g 含む 9  $\mu$ l のサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合体は、65 まで 5 分間加熱し、マイクロアレイ表面上に等分して 1.8  $\text{cm}^2$  のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに 140  $\mu$ l の 5  $\times$  SSC を加えることにより、チェンバー内部を湿度 100 に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 で約 6.5 時間インキュベートする。アレイは、第 1 洗浄緩衝液中 (1  $\times$  SSC、0.1% SDS) において 45 で 10 分間洗浄し、第 2 洗浄緩衝液中 (0.1  $\times$  SSC) において各々 45 で 10 分間 3 度洗浄して乾燥させる。

20

30

#### 【0384】

##### 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 の励起のためには 488 nm、Cy5 の励起のためには 632 nm でスペクトル線を発生し得る Innova 70 混合ガス 10 W レーザ (Coherent, Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20  $\times$  顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、アレイ上に励起レーザ光の焦点を当てる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御の X-Y ステージに置き、対物レンズを通過してラスタースキャンする。本実施例で用いる 1.8  $\text{cm} \times$  1.8  $\text{cm}$  のアレイは、20  $\mu$ m の解像度でスキャンする。

#### 【0385】

2 回の異なるスキャンで、混合ガスマルチラインレーザは 2 つのフルオロフォアを連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、2 つのフルオロフォアに対応する 2 つの光電子増倍管検出器 (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) に送られる。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルタを用いて、シグナルをフィルタする。用いるフルオロフォアの最大発光の波長は、Cy3 では 565 nm、Cy5 では 650 nm である。装置は両方のフルオロフォアからのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルタを用いて、フルオロフォア 1 つにつき 1 度スキャンし、各アレイを通常 2 度スキャンする。

40

#### 【0386】

スキャンの感度は通常、既知濃度でサンプル混合体に添加される cDNA 対照種により生成

50

されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度を重量比1:100,000でハイブリダイゼーション種と相関させる。異なる源泉（例えば試験される細胞及び対照細胞など）からの2つのサンプルを、各々異なるフルオロフォアで標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、2つのフルオロフォアで較正するcDNAのサンプルを標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって較正を行う。

【0387】

光電子増倍管の出力は、IBM互換性PCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲への直線的20色変換を用いてシグナル強度がマッピングされたようなイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なるフルオロフォアを同時に励起及び測定する場合には、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いて、データは先ずフルオロフォア間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重なりに起因する)を補正する。

【0388】

グリッドが蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GE MT00LS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

【0389】

マイクロアレイを用いた疾患の診断の例において、SEQ ID NO:18の構成成分ポリヌクレオチド配列群(下記のClone Ids)が、大腸ポリープ又は大腸癌患者の組織でのSEQ ID NO:18の発現を正常大腸組織における発現と比較するために用いられた。大腸ポリープ(polyp)及び大腸癌(tumor)患者からの組織サンプルのSEQ ID NO:18の発現は、正常大腸組織に比べて約3倍から約8倍下方制御されていることが示された。

Clone ID	3583	3647	3649	3754	3755	3583	3311	3756	3757	3649	3647
					ポリ	ポリ	腫瘍	腫瘍	腫瘍	腫瘍	腫瘍
1633719				-1.98	-1.98	-2.32	-3.47	-3.10	-2.99	-2.19	-2.89
4107476	-2.85	-8.34	-4.83	-2.19	-1.87	-2.31	-3.11	-3.24	-3.33	-2.32	-2.93

【0390】

このようにして、SEQ ID NO:18のDME発現を、マッチする正常大腸組織と癌性大腸組織又は大腸ポリープ組織のサンプルで比較した。一例において、マッチする正常大腸及び癌大腸組織サンプルは3人の個人から得ており、Huntsman Cancer Institute, (Salt Lake City, UT)から提供された。ドナー3583は腺管絨毛腺腫過形成ポリープ(tubulovillous adenoma hyperplastic polyp)と診断された59才の男性である。ドナー3647は83才(性別不明)で中分化腺癌と診断された。ドナー3649(性別、年齢不明)は高分化腺癌と診断された。

【0391】

別の例において、マッチする正常大腸及び癌性大腸又は大腸ポリープ組織サンプルがHuntsman Cancer Institute, (Salt Lake City, UT)によって提供された。ドナー3754は有

茎性 (pendunculated) 大腸ポリープと診断された、年齢性別不明のドナーである。ドナー3755は 大腸ポリープと診断された、大腸癌の家族歴のある年齢性別不明のドナーである。ドナー3583 は腺管絨毛腺腫過形成ポリープと診断された58才の男性である。ドナー3311は浸潤性低分化腺癌で、リンパ節への転移があると診断された85才の男性である。ドナー3756は78才の女性で浸潤性中分化腺癌と診断されている。ドナー3757は浸潤性中～低分化腺癌で、リンパ節への転移があると診断された75才の女性である。ドナー3649は浸潤性高分化腺癌と診断された86才の個人で性別不明である。ドナー3647は浸潤性の中高分化 (moderately well-differentiated) 腺癌で、リンパ節への転移を有すると診断された83才の個人で性別不明である。ドナー3839は60才の個人、性別不明で大腸癌と診断されている。ドナー3581は結腸直腸腫瘍と診断された男性(年齢不明)である。ドナー3754、3755、3311、3756 及び 3757 は更なる3人のドナーから得た正常大腸組織のプールからなる共通の対照サンプルにマッチした。他のすべての比較は、同じドナーからのマッチした正常組織及び腫瘍組織又はポリープ組織に対して行った。

### 【0392】

#### 1.2 相補的ポリヌクレオチド

DME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DMEの発現を検出、低減又は阻害するために用いられる。約15～30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いる。Oligo4.06ソフトウェア (National Biosciences) 及びDME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'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモータ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DMEをコードする転写物に結合するのを阻害する。

### 【0393】

#### 1.3 DMEの発現

DME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DMEを発現させるためには、抗生物質耐性遺伝子と、cDNA転写レベルを高める誘導性のプロモータ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には、lacオペレーター調節因子と併用するT5又はT7バクテリオファージプロモータ、及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモータが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21 (DE3) 等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌は、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DMEを発現する。真核細胞でのDMEの発現は、昆虫細胞株又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る *Autographica californica* 核多角体病ウイルス (AcMNPV) の組換え型を感染させて行う。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、或いはトランスファー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、DME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、強力な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) 昆虫細胞への感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられる。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227, Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

### 【0394】

殆どの発現系では、DMEが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) と、又はFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識と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を素早く1回で行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を、特異的に操作した部位でDMEからタンパク質分解的に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクロー

ナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いた免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で得た精製DMEを直接用いて以下の実施例17、18、及び19の、適用可能なアッセイを行うことができる。

#### 【0395】

##### 1.4 機能的アッセイ

DME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、DME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を含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選択されるベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR 3.1プラスミド (Invitrogen, 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を有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 µgの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来又は造血由来の細胞株に一過的に形質移入する。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、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64又はCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザ光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFP又はCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、ヨウ化プロピジウムによるDNA染色によって計測される核DNA含量の変化、前方散乱光と90°側方散乱光によって計測される細胞サイズと粒度の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変容、及びフルオレセイン抱合したアネキシン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容とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY. に記述がある。

10

20

30

#### 【0396】

遺伝子発現に与えるDMEの影響は、DMEをコードする配列とCD64又は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又はCD64-GFPは、形質移入された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存領域と結合する。形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビーズを用いて効率的に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。DME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。

#### 【0397】

##### 1.5 DME特異的抗体の作製

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. 182:488-495を参照) 又は他の精製技術で実質的に精製されたDMEを用いて、標準的なプロトコルで動物 (例えば、ウサギ、マウス等) を免疫化して抗体を作り出す。

40

#### 【0398】

別法では、DME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)。

#### 【0399】

50

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、FMOCケミストリを用いるABI 431Aペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫原性を高める (前出のAusubel, 1995等を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-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DME活性を検査するには、ペプチド又はDME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、更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。

#### 【0400】

##### 1.6 特異的抗体を用いる天然DMEの精製

天然DME或いは組換えDMEは、DMEに特異的な抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーによって実質的に精製される。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化S EPHAROSE (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DME抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従ってレジンをブロックし、洗浄する。

10

#### 【0401】

DMEを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、DME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で) そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とDMEとの結合を切るような条件で (例えば、pH 2~3のバッファ、或いは高濃度の尿素又はチオシアン酸イオンのようなカオトロップで) 溶出させ、DMEを収集する。

20

#### 【0402】

##### 1.7 DMEと相互作用する分子の同定

DME又はその生物活性断片を、<sup>125</sup>Iボルトンハンター試薬で標識する (例えば Bolton A. E.及びW.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539を参照)。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DMEと共にインキュベートし、洗浄して、標識されたDME複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なDME濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したDMEの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

#### 【0403】

別法では、DME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、MATCHMAKE Rシステム (Clontech) などの2-ハイブリッドシステムに基づく市販キットを用いて分析する。

30

#### 【0404】

DMEは又は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大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判定できる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

#### 【0405】

##### 1.8 DME活性の実証

DMEのチトクロームP450活性は、アニリンの4-ヒドロキシル化を用いて測定する。アニリンは、この酵素によって4-アミノフェノールに変換され、アニリンの最大吸光波長は630nmである (Gibson 及び Skett, 前出)。このアッセイは便利な測定ではあるが、2-及び3-位置でも発生する総ヒドロキシル化を過小評価する。アッセイは37で行い、反応バッファ (緩衝液) には一定分量の酵素及び適量のアニリン (約2mM) が含まれる。この反応では、この緩衝液にNADPH 又は NADPHを産生する補因子系を含むようにする。この反応緩衝液の或る調製には85 mM のTris (pH 7.4)、15 mM 塩化マグネシウム、50 mM ニコチン酸アミド、40 mgイソクエン酸三ナトリウム及び2単位のイソクエン酸デヒドロゲナーゼが含まれており、アッセイの直前に10mlの反応バッファストック溶液に8mgのNADP<sup>+</sup>を加える。反応は光学キュベットで行い、630nmでの吸光度を測定する。このアッセイでは、

40

50

吸光度の増加率が酵素活性に比例する。標準曲線は4-アミノフェノールの既知濃度を用いて作成できる。

#### 【0406】

DMEの1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub> - ヒドロキシラーゼ活性は、DMEを発現する遺伝子組換えラットにおける、<sup>3</sup>H標識された1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25(OH)<sub>2</sub>D)から24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)<sub>2</sub>D)への変換をモニタリングして判定する。エタノールに溶解した1μgの1,25(OH)<sub>2</sub>D(或いはコントロールとしてエタノールのみ)を、DMEを発現する約6週齢のオス遺伝子組換えラット群又は、DMEの欠損変異体を発現する若しくはDMEを発現していないという点を除けば同一のコントロールラット群に静脈内投与する。ラットを8時間後に断頭により屠殺し、腎臓を手早く取り除き、洗浄し、9倍量の氷冷バッファ(15mM Tris-acetate (pH7.4)、0.19Mスクロース(蔗糖)、2mM酢酸マグネシウム、及び5mMのコハク酸ナトリウム)においてホモジナイズする。次に、各ホモジネートの所定量(例えば3ml)を、0.25nMの1,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]D(比放射能は約3.5GBq/mmol)と共に、常に振盪しながら酸素存在下、37℃で15分間インキュベートする。総脂質を記載(Bligh, E.G. 及びW.J. Dyer (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917)のとおり抽出し、流速1ml/分にてn-ヘキサン/クロロホルム/メタノール(10:2.5:1.5)溶媒系を用いたFINEPAK SIL カラム(JASCO, 東京、日本)によってクロロホルム相を分析する。或いは、クロロホルム相をJ SPHERE ODS-AM column (YMC Co. Ltd., 京都、日本)を用いてアセトニトリルバッファ系(40~100%、水中、30分)で、1ml/分の流速にて逆相HPLCによって分析する。この溶出物は30秒(又はそれ以下)分画にて収集し、各分画中に存在する<sup>3</sup>Hの量をシンチレーションカウンタを用いて測定する。コントロールサンプル(すなわち、1,25-ジヒドロキシビタミンD又は24,25-ジヒドロキシビタミンD(24,25(OH)<sub>2</sub>D)を含むサンプル)のクロマトグラムと反応生成物のクロマトグラムとを比較することにより、基質(1,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]D)と生成物(24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]D)との相対的な移動度(mobilities)を判定し、収集した各画分と関連させる。コントロールラットにおいて生成された24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]Dの量を、DMEを発現する遺伝子組換えラットの24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]Dの量から差し引く。遺伝子組換えラットとコントロールラットとの24,25(OH)<sub>2</sub>[1-<sup>3</sup>H]Dの生成の差が、そのサンプルに存在するDMEの25-ヒドロラーゼ活性の量に比例する。基質と生成物(群)との同一性の確認は、質量分光法によって行う(Miyamoto, Y.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14115-14119)。

10

20

30

#### 【0407】

DMEのフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)活性を測定するには、代謝産物群のクロマトグラフィ分析を行う。例えば、Ring, B.J. 他(1999; Drug Metab. Dis. 27:1099-1103)は、FMOを0.1Mリン酸ナトリウムバッファ(pH 7.4又は8.3)及び1mM NADPH中で37℃にてインキュベートし、反応を或る有機溶剤で停止させ、HPLCによって産物形成を判定した。或いは、活性の測定は、酸素の取込をクラーク型電極(Clark-type electrode)を用いてモニタリングする。例えば、Ziegler, D.M. 及び Poulsen, L.L. (1978; Methods Enzymol. 52:142-151)は、FMOを、基質であるメチマゾール(methimazole)を含有するNADPH-産生補因子系(上記のものに類似)において37℃でインキュベートした。酸素取込率は酵素活性に比例する。

40

#### 【0408】

DMEのUDP-グルクロニルトランスフェラーゼ(glucuronyltransferase)活性は、遊離アミノ基の比色判定を用いて測定する(Gibson 及び Skett, 前出)。アミン含有基質(例えば2-アミノフェノール)のインキュベートを37℃で、必要な補因子群を含有する反応バッファ(40mM Tris (pH 8.0), 7.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.025% Triton X-100, 1mM アスコルビン酸、0.75mM UDP-グルクロン酸)中のこの酵素のアリコットと共にを行った。十分な時間をおき、反応は氷冷した20%トリクロロ酢酸(0.1Mリン酸バッファ(pH 2.7)中)を添加して停止させ、氷上でインキュベートし、遠心分離して上澄みを清澄化させる。全ての未反応2-アミノフェノールは、このステップで破壊される。十分な、新たに調製した亜硝酸ナトリウムを次に添加し、このステップにより、グルクロン酸抱合産物のジアゾニウム塩

50

が形成される。過剰な亜硝酸を除去するため十分なスルファミン酸アンモニウム (ammonium sulfamate) を添加し、ジアゾニウム塩を芳香族アミン (例えば N-ナフチルエチレンジアミン) と反応させ、着色したアゾ化合物を産生する。この化合物は、分光光度法でアッセイできる (540 nm など)。標準曲線は、既知濃度のアニリンを用いて作成できる。このアニリンは、2-アミノフェノール グルクロニドと同様の特性を持つ発色団を形成することとなる。

#### 【0409】

DMEのグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 活性の測定には、モデル基質、例えば 2,4-ジニトロ-1-クロロベンゼンを用いる。この基質はグルタチオンと反応して生成物である 2,4-ジニトロフェニル-グルタチオンを形成し、生成物の最大吸光波長は 340 nm である。重要な注意点は GST 類が様々な基質特異性を持つことであり、モデル基質の選択は、目的の GST の基質選択性 (substrate preference) に基づくべきである。アッセイは室温で行い、適切な反応バッファ (例えば 1 mM グルタチオン、1 mM ジニトロクロロベンゼン、90 mM リン酸カリウムバッファ、pH 6.5) に一定量の酵素を入れる。反応は光学キュベットで行い、340nmでの吸光度を測定する。このアッセイでは、吸光度の増加率が酵素活性に比例する。

10

#### 【0410】

DMEのN-アシルトランスフェラーゼ活性の測定には放射標識したアミノ酸基質を用い、抱合産物群への放射ラベルの取込を測定する。酵素をインキュベートする反応バッファには無標識のアシル-CoA化合物と放射標識したアミノ酸とを入れ、放射標識されたアシル抱合体と無反応アミノ酸とを分離するため、n-ブタノール又は他の適切な有機溶剤への抽出を行う。例えば Johnson, M. R 他 (1990; J. Biol. Chem. 266:10227-10233) は、胆汁酸-CoA:アミノ酸N-アシルトランスフェラーゼ活性の測定を、この酵素をコリル-CoA 及び  $^3\text{H}$ -グリシン又は  $^3\text{H}$ -タウリンと共にインキュベートし、また、トリチウム化コール酸抱合体 (tritiated cholate conjugate) を n-ブタノールへの抽出によって分離し、シンチレーションによって抽出産物内の放射活性を測定して行った。或いは N-アシルトランスフェラーゼ活性の測定には、下記の還元された CoA (CoASH) の分光光度測定法を用いる。

20

#### 【0411】

DMEのN-アセチルトランスフェラーゼ活性は、放射ラベルの、 $[^{14}\text{C}]$ アセチル-CoAから基質分子への転移を用いて測定される (例えば Deguchi, T. (1975) J. Neurochem. 24:108 3-5を参照)。或いは、CoASHとのDTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid; Ellman試薬) 反応に基づく分光光度アッセイを用い得る。遊離のチオール含有CoASHは、N-アセチルトランスフェラーゼが触媒する、基質へのアセチル基の転移時に形成される。CoASHの検出には、DTNB抱合体の吸光度 (412 nm) を用いる (De Angelis, J. 他 (1997) J. Biol. Chem. 273:3045-3050)。酵素活性は、基質への放射能取込率、又は、この分光光度アッセイでは吸光度の増加率に比例する。

30

#### 【0412】

DMEのタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性を 37 で様々な時間にわたり測定する。S-アデノシル-L-[メチル- $^3\text{H}$ ]メチオニン ( $[^3\text{H}]$ AdoMet; 比放射能 = 75 Ci/mmol; NEN Life Science Products) が、メチル供与体基質として用いられる。有用なメチル受容基質としては、グルタチオンS-トランスフェラーゼフィブリリングリシン-アルギニンドメイン融合タンパク質 (GST-GAR)、不均一核リボ核タンパク質 (hnRNP) 又は、アデノシンジアルデヒドで処理した細胞からの可溶化液中に存在する低メチル化タンパク質が含まれる。メチル化反応は SDS-PAGE サンプルバッファを加えると停止する。反応の産物は SDS-PAGE によって分離され、蛍光光度分析によって視覚化される。 $^3\text{H}$ 標識メチル供与体基質の存在は、DMEのタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性の標示となる (Tang, J. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275:7723-7730 及び Tang, J. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275:19866-19876)。

40

#### 【0413】

DMEのカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ活性は、50mM Tris-HCl (pH7.4)、1.2

50

mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM SAM (S-アデノシル-L-メチオニン) ヨウ化物(0.5 μCiのメチル-[H<sup>3</sup>]SAMを含む)、1mMジチオスレイトール、及び様々な濃度のカテコール基質(例えば、L-ドパ、ドーパミン、又はDBA)から成る最終容量1.0mlの反応混合液において測定する。この反応は、250~500 μgの精製したDME又は未精製のDMEを含むサンプルを加えて開始し、37 °Cで30分間行う。この反応を停止させるには、氷上で素早く冷却し、直後に7 mlの氷冷n-ヘプタンで抽出する。10分間1000×gで遠心分離した後、液体シンチレーションカウンタで、この有機抽出物の3 mlのアリコット群を放射活性内容物について分析する。有機相におけるカテコール関連放射活性のレベルが、DMEのカテコール-0-メチルトランスフェラーゼ活性に比例する(Zhu, B. T.及びJ. G. Liehr (1996) 271:1357-1363)。

#### 【0414】

DMEのDHFR活性を判定するには、15 °Cで分光光度法により、340nm ( $\epsilon_{340} = 11,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )においてNADPHの消滅を調べる。標準的なアッセイ混合液は、100 μM NADPH、14mM 2-メルカプトエタノール、MTEN バッファ(50mM 2-morpholinoethanesulfonic acid、25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane、25mMエタノールアミン、及び100mM NaCl、pH7.0)を含み最終容量を2.0mlとする。反応は50 μMのジヒドロ葉酸を(基質として)添加して開始させる。反応液におけるNADPHのNADP<sup>+</sup>への酸化はジヒドロ葉酸の還元に一致し、また、サンプルにおけるDHFR活性の量に比例する(Nakamura, T.及びIwakura, M. (1999) J. Biol. Chem. 274:19041-19047)。

#### 【0415】

DMEのアルド/ケト還元酵素活性は、NADPHが消費される時の340nmにおける吸光度の低下で測定する。標準的な反応混合液は、135mMのリン酸ナトリウムバッファ(酵素によりpH6.2~7.2の範囲)、0.2mM NADPH、0.3M硫酸リチウム、0.5~2.5mg酵素、及び好適なレベルの基質を含む。この混合液を30 °Cでインキュベートし、反応を分光光度計で連続的に測定する。酵素活性は、酵素1mg当たり消費されるNADPHのモル数として計算される。

#### 【0416】

DMEのアルコールデヒドロゲナーゼ活性は、NAD<sup>+</sup>がNADHへ還元される時の340nmにおける吸光度の増大を利用して測定する。標準的な反応混合液は、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.5)、及び0.25mM EDTAである。反応液を25 °Cでインキュベートし、分光光度計でモニタリングする。酵素活性は、酵素1mg当たり生成されたNADHのモル数として計算する。

#### 【0417】

DMEのカルボキシルエステラーゼ活性は、基質として4-メチルウンベリフェリル酢酸(4-methylumbelliferyl acetate)を用いて判定する。酵素反応は、37 °Cで1mlの反応バッファ(90 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、40 mM KCl、pH 7.3)に、およそ10 μlのDME含有サンプルを0.5mM 4-メチルウンベリフェリル酢酸とともに加えて開始される。4-メチルウンベリフェロンの産生を分光光度計( $\epsilon_{350} = 12.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )で1.5分間モニターする。特異的活性はタンパク質の一分間につき一ミリグラム形成される産物のマイクロモルとして表され、サンプル中のDMEの活性に相当する(Evgenia, V.ら(1997) J. Biol. Chem. 272:14769-14775)。

#### 【0418】

別法では、DMEのコカインベンゾイルエステル加水分解酵素活性を、約0.1mlのDME及び3.3 mM コカインを、1mM benzamidine及び1mM EDTA及び1mMジチオスレイトールを含む反応バッファ(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4)、37 °Cでインキュベートして測定する。全量で0.4mlの反応液を1時間インキュベートし、等量の5%トリクロロ酢酸で終了させる。0.1mlの内部標準3,4-ジメチル安息香酸(10 μg/ml)を加える。沈澱タンパク質は12,000×gで10分間遠心分離して分離する。上澄みは清潔な試験管に移して、0.4mlの塩化メチレンで2回抽出する。2つの抽出液を合わせて、窒素流下で乾燥する。この残留物を、100 ml当たり8 μlのジエチルアミンを含む14%アセトニトリル、250mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH4.0)に再懸濁してから、C18逆相HPLCカラム上に注入して分離する。このカラム溶出液を235nmでモニタリングする。DME活性を定量するため、内標準に対する分析物のピーク面積比を比較する。標準曲線は、トリクロロ酢酸処理したタンパク質マトリクス内で調製した安息香酸標準で作成する(Evgenia, V.他(1997) J. Biol. Chem. 272:14769-14775)。

10

20

30

40

50

## 【0419】

別法では、水溶性基質のパラニトロフェニル酪酸に対するDMEカルボキシルエステラーゼ活性を当業者に周知の分光光度法で判定する。この方法では、DME含有サンプルを、6mMのタウロコール酸の存在下、0.5 M Tris-HCl (pH 7.4又は8.0)又は酢酸ナトリウム(pH 5.0)で希釈する。このアッセイは新たに調製されたパラ-ニトロフェニル酪酸溶液(pH 5.0の酢酸ナトリウム中に100 µg/ml)を加えることによって開始される。次にカルボキシルエステラーゼ活性をモニタリングし、405nmにセットした分光光度計で基質のコントロール自己加水分解と比較する(Wan, L.他(2000) J. Biol. Chem. 275:10041-10046)。

## 【0420】

DMEのスルホトランスフェラーゼ活性は、 $[^{35}\text{S}]$ PAPSからモデル基質(フェノールなど)への $^{35}\text{S}$ の取込を用いて測定する(Folds, A. 及び J. L. Meek (1973) Biochim. Biophys. Acta 327:365-374)。一定量の酵素を、37 °Cにて、1 mLの10 mM リン酸バッファ(pH 6.4)、50 mM フェノール、及び0.4~4.0 mM  $[^{35}\text{S}]$  アデノシン 3'-リン酸 5'-ホスホ硫酸(PAPS)でインキュベートする。十分な時間をおいて5~20%の放射ラベルを基質へ転移させ、0.2 mlの0.1 M 酢酸バリウムを加えてタンパク質とリン酸バッファとを沈殿させる。次に、0.2 mlの0.1 M 水酸化バリウム( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ )を、続いて0.2 ml 硫酸亜鉛( $\text{ZnSO}_4$ )を加える。上澄みを清澄化するため遠心分離し、これにより、タンパク質と、無反応  $[^{35}\text{S}]$ PAPSとを除去する。上澄みの放射能を、シンチレーションで測定する。酵素活性は、反応産物における放射能のモル数から判定する。

## 【0421】

DMEを含むサンプルを、2.5 µmolイミダゾールHCl (pH6.8)、3.75 µgの塩化プロタミン(protamine chloride)、25nmolの完全に脱硫酸化されN-再硫酸化されたヘパリン(ヘキソサミンとして)、及び50pmol (約  $5 \times 10^5$  cpm)の $[^{35}\text{S}]$  PAPSと共に最終反応容量を50 µlとして37 °Cで20分間インキュベートして、DMEのヘパラン硫酸6-スルホトランスフェラーゼ活性を*in vitro*で測定する。この反応は、熱湯に反応チューブを1分間浸漬して停止させる。0.1 µmolのコンドロイチン硫酸A(グルクロン酸として)を反応混合液にキャリアとして加える。 $^{35}\text{S}$ 標識ポリ多糖を、1.3%酢酸カリウムを有する冷却した三倍量のエタノールで沈殿させ、脱塩カラムを用いるゲルクロマトグラフィによって、取り込まれなかった $[^{35}\text{S}]$ PAPS及びその分解生成物から完全に分離する。一単位の酵素活性は1分間に1 pmolの硫酸を転移するのに必要な量と定義し、沈殿した多糖の中に取り込まれた $[^{35}\text{S}]$ PAPSの量によって判定する(Habuchi, H.他(1995) J. Biol. Chem. 270:4172-4179)。

## 【0422】

別法では、DMEのヘパラン硫酸6-スルホトランスフェラーゼ活性を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)によって分離した後、ゲルから酵素を抽出して再生し測定する。分離した後、ゲルをバッファ(0.05M Tris-HCl, pH8.0)で洗浄し、3~5mmのセグメントに切断し、0.15M NaClを有する同じバッファと共に100 µlで4 °Cで48時間攪拌する。溶出した酵素を遠心分離して収集し、上記したように、スルホトランスフェラーゼ活性についてアッセイする(Habuchi, H.他(1995) J. Biol. Chem. 270:4172-4179)。

## 【0423】

別法では、DMEのスルホトランスフェラーゼ活性を、 $[^{35}\text{S}]$ PAPSから、固定されたペプチドへの、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の転移を測定して判定する。この固定されたペプチドは、C末端システイン残基が付加された成熟P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1ポリペプチドのN末端の15残基である。このペプチドは3つの潜在的なチロシン硫酸化部位にわたる。このペプチドは、このシステイン残基によって、ヨードアセトアミド活性化した樹脂に連結される(1mlの樹脂あたり1.5~3.0 µmolペプチドの密度)。この酵素アッセイは、40mM Pipes (pH6.8)、0.3M NaCl、20mM  $\text{MnCl}_2$ 、50mM NaF、1% Triton X-100、及び1mM 5'-AMPを含む最終容量130 µlにおいて、10 µlのペプチド誘導体化ビーズと2~20 µlのDME含有サンプルとを混合して行う。このアッセイは、0.5 µCiの $[^{35}\text{S}]$ PAPS (1.7 µM; 1Ci = 37GBq)を加えて開始させる。37 °Cで30分経過した後に、反応ビーズを65 °C、6Mグアニジンで洗浄し

10

20

30

40

50

、ビーズに取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定する。ビーズ結合ペプチドに転移された $[^{35}\text{S}]$ 硫酸を測定し、サンプルにおけるDME活性を判定する。1単位の活性は1分間に1pmolの生成物が形成されると定義する (Ouyang, Y-B.他 (1998) *Biochemistry* 95:2896-2901)。

**【0424】**

別法では、DMEスルホトランスフェラーゼのアッセイを、50mM HEPES-NaOH (pH7.0)、250mM スクロース、1mMジチオスレイトール、 $14\mu\text{M}$   $[^{35}\text{S}]$ PAPS (15Ci/mmol)及び、ドーパミン (25 $\mu\text{M}$ )、p-ニトロフェノール (5 $\mu\text{M}$ )又は他の候補基質を含む最終容量30 $\mu\text{l}$ において、硫酸供与体として $[^{35}\text{S}]$ PAPSを用いて行う。アッセイの反応は、精製されたDME酵素試薬、或いはDME活性を持つサンプルを加えて開始させ、その反応を37で15分間続け、100で3分間加熱して終了させる。形成された沈降物を遠心分離によって除去する。次に $^{35}\text{S}$ 硫酸化物を調べるために、上澄みを薄層クロマトグラフィ或いは二次元薄層分離法のいずれかによって分析する。 $^{35}\text{S}$ 硫酸化物の同定ができるように好適な標準を上澄みと平行して分析し、反応産物の移動の相対速度に基づいてDME含有サンプルの酵素特異性を判定する (Sakakibara, Y.他 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:6242-6247)。

10

**【0425】**

DMEのスクアレンエポキシダーゼ活性は、精製したDME (又はDMEを有する未精製の混合液)、20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.01mM FAD、0.2単位のNADPH -チトクロームC (P-450)レダクターゼ、0.01 mM  $[^{14}\text{C}]$ スクアレン (20 $\mu\text{l}$ のTween 80を用いて拡散された)、及び0.2% Triton X-100を有する混合液においてアッセイする。1mM NADPHを加えて反応を開始させ、37で30分間インキュベートする。非けん化脂質を、酢酸エチル/ベンゼン (0.5:99.5, v/v)で展開したシリカゲルTLCによって分析する。反応生成物を、DMEを含まない反応混合液による反応生成物と比較する。2,3(S) - オキシドスクアレンの存在を、好適な脂質標準を用いて確認する (Sakakibara, J.他 (1995) 270:17-20)。

20

**【0426】**

DMEのエポキシドヒドロラーゼ活性は、エーテル抽出物のガスクロマトグラフィ分析 (GC) を用いて基質の消失によって測定するか、又はアセトンで急冷した反応混合物のGC分析により基質の消失とジオール生成によって測定する。DMEを含むサンプル又はエポキシドヒドロラーゼのコントロールサンプルを10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、及び 5 mM エポキシド基質 (例えば、エチレンオキシド、スチレンオキシド、プロピレンオキシド、イソプレンモノオキシド、エピクロロヒドリン、エピプロモヒドリン、エピフルオロヒドリン、グルシドール、1,2-エポキシブタン、1,2-エポキシヘキサン、1,2-エポキシオクタン)でインキュベートする。様々な時点でサンプルの一部を反応混合液から取り出して、GC分析用の内標準 (例えば1-ノナノール) を有する1mlの氷冷アセトンに加える。タンパク質及び塩類を遠心分離 (15分、4000 $\times$ g) によって除去し、抽出物を0.2mm $\times$ 25m CP-Wax57-CBカラム (CHROMPACK, Middelburg, The Netherlands) 及び水素炎イオン化検出器を用いてGCにより分析する。GC産物の同定は、当業者に周知の好適な標準及びコントロールを用いて行う。1単位のDME活性は、1分間に1 $\mu\text{mol}$ のジオール生成を触媒する酵素の量と定義する (Rink, R.他 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:14650-14657)。

30

40

**【0427】**

DMEのアミノトランスフェラーゼ活性は、DMEを含むサンプルを、1mM L-キヌレニン及び1mM 2-オキソグルタル酸の存在下で、最終容量200 $\mu\text{l}$ の70 $\mu\text{M}$  PLPを含む150mM Tris 酢酸バッファ (pH8.0)で37で1時間インキュベートしてアッセイする。キヌレニン酸の形成は、当業者に周知の好適な標準及びコントロールを用いて330nmで分光光度検出によりHPLCで定量する。別法では、L-3-ヒドロキシキヌレニンを基質として用い、キサンツレン酸の生成を340nmでのUV検出で生成物のHPLC分析により判定する。キヌレニン酸及びキサンツレン酸の生成はそれぞれ、アミノトランスフェラーゼ活性を示す (Buchli, R.他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:29330-29335)。

**【0428】**

50

別法では、DMEのアミノトランスフェラーゼ活性の測定は、酵素結合補助因子であるピリドキサル5'-リン酸 (PLP)のUV/VIS吸収スペクトルにおける変化をモニタリングして、一回のターンオーバー条件下で、精製したDME或いはDMEを有する未精製サンプルの、様々なアミノ酸及びオキソ酸基質に対する活性を判定して行う。この反応は、9 $\mu$ M 精製DME又はDME含有サンプルと試験する基質 (アミノ酸及びオキソ酸基質) とを有する50mM 4-メチルモルフォリン (pH7.5)において25 で行う。アミノ酸からオキソ酸への半反応を調べるため、酵素結合したPLPのピリドキサミン5'リン酸 (PMP) への変換により生じる、360nmにおける吸光度の低下及び330nmにおける吸光度の増加を測定する。DMEの特異性及び相対的な活性を、特定の基質に対する酵素試薬の活性によって判定する (Vacca, R. A.他 (1997) J. Biol. Chem. 272:21932-21937)。

10

#### 【0429】

DMEのスーパーオキシドジスムターゼ活性は、細胞ペレット、培養した上澄み、又は精製したタンパク質試薬からアッセイする。サンプル又は溶解物を15%非変性ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動法によって分離する。このゲルを、2.5mMのニトロブルーテトラゾリウムにおいて30分間インキュベートし、その後30mMリン酸カリウム、30mM TEMED、及び30 $\mu$ Mリボフラビン (pH7.8)において20分間インキュベートする。スーパーオキシドジスムターゼ活性は背景のブルーに対して白いバンドとして可視化され、このためにはライトボックス上でゲルに照明を当てる。スーパーオキシドジスムターゼ活性の定量は、好適なスーパーオキシドジスムターゼのポジティブ及びネガティブコントロール (例えば様々な量の、市販の大腸菌スーパーオキシドジスムターゼなど) を用いて活性ゲルの走査型濃度計測法 (densitometric scanning) により行う (Harth, G.及びHorwitz, M. A. (1999) J. Biol. Chem. 274:4281-4292)。

20

#### 【0430】

##### 1.9 DME インヒビターの同定

実施例17のアッセイで説明したように、試験する化合物を、好適なバッファ及び基質と共に、様々な濃度でマルチウェルプレートのウェルに分注する。DME活性を各ウェル毎に測定し、DME活性を阻害するそれぞれの化合物の能力、及び用量反応プロファイル (dose-response profiles) を判定できる。DME活性を増強する分子の同定にも、このアッセイを用いることができる。

30

#### 【0431】

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に記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり幾つかの実施例に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、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、分子生物学又は関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

#### 【0432】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名法の概略を示す。

40

表2は、GenBank識別番号及び本発明のポリペプチドに最も近いGenBank相同体の注釈を示す。各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

#### 【0433】

表3は、予測されるモチーフ及びドメインを含む本発明のポリヌクレオチド配列の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いるための方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースと共に示す。

#### 【0434】

表4は、本発明のポリヌクレオチド配列を構築するために用いたcDNA断片やゲノムDNA断片を、ポリヌクレオチド配列の選択した断片と共に示す。

#### 【0435】

50

表 5 は、本発明のポリヌクレオチドの代表的な cDNA ライブラリを示す。

【 0 4 3 6 】

表 6 は、表 5 に示した cDNA ライブラリの作製に用いた組織及びベクターを説明する付表である。

【 0 4 3 7 】

表 7 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、アルゴリズムを、適用可能な説明、参照文献及び閾値パラメータと共に示す。

【 0 4 3 8 】

【 表 1 】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド NO:	ポリペプチド SEQ ID	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	Incyte 完全長クローン ID
7486594	1	7486594CD1	7486594CD1	13	7486594CB1	7593724CA2
7485766	2	7485766CD1	7485766CD1	14	7485766CB1	
7491172	3	7491172CD1	7491172CD1	15	7491172CB1	
2804794	4	2804794CD1	2804794CD1	16	2804794CB1	2804794CA2
7589506	5	7589506CD1	7589506CD1	17	7589506CB1	
7493833	6	7493833CD1	7493833CD1	18	7493833CB1	
7486212	7	7486212CD1	7486212CD1	19	7486212CB1	
7494167	8	7494167CD1	7494167CD1	20	7494167CB1	
7495223	9	7495223CD1	7495223CD1	21	7495223CB1	
7671089	10	7671089CD1	7671089CD1	22	7671089CB1	
7974858	11	7974858CD1	7974858CD1	23	7974858CB1	90087795CA2
8032184	12	8032184CD1	8032184CD1	24	8032184CB1	8032184CA2

10

20

30

40

【 0 4 3 9 】

50

【表 2】

表 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO.またはプロテオーム ID NO:	標準スコア	注釈
1	7486594CD1	G165801	1.1E-70	[アナウサギ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )]UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ Tukey, R.H. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268:15260-15266.
2	7485766CD1	G8037803	5.0E-36	[ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato] GsaA Charkowski, A.O. 他 (1998) J. Bacteriol. 180:5211-5217.
3	7491172CD1	G2687360	2.3E-81	[ニワトリ]スルホトランスフェラーゼ
4	2804794CD1	G9965825	5.8E-44	[ <i>Mycobacterium bovis</i> BCG] C-5 ステロロールデサチュラーゼ
5	7589506CD1	G12597322	2.6E-87	[マウス]アミノアセトアミドアセチラーゼ
6	7493833CD1	G3135025	1.2E-274	[ヒト] UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ Ritter, J.K. 他 (1992) Biochemistry 31:3409-3414.
7	7486212CD1	G5257221	0.0	[マウス]タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ Chen, D. 他 (1999) Science 284:2174-2177.
8	7494167CD1	G296532	1.8E-99	[ヒト]N-アセチルラクタクトミニドβ-1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ Bierhuizen, M.F. 他 (1993) Genes Dev. 7:468-478.
9	7495223CD1	G3004445	1.7E-85	[ウシ] アリールアセチルアルブミン-CoA N-アシルトランスフェラーゼ Vessey, D.A. 及び Lau, E. (1998) J. Biochem. Mol. Toxicol. 12:275-279
10	7671089CD1	G4160666	2.5E-148	[ヒト]NG,NG-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ Kimoto, M. (1998) Eur. J. Biochem. 258:863-868.
11	7974858CD1	G825628	2.2E-146	[ヒト]アリスルファターゼ Modarelli, S. 他 (1993) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374(5):327-335.
12	8032184CD1	G30151	2.5E-29	[ヒト]チクロロムCオキシダーゼサブユニット VIIb Sadlock, J.E. 他 (1993) Biochim. Biophys. Acta 1172 (1-2):223-225.

10

20

30

40

【 0 4 4 0 】

【表 3 - 1】

表3-1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド F ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシ化部位	シグナルペプチド、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	7485594CD1	489	S29, S99, S185, S328, S340, T190, T418, Y40, Y399		シグナル切断: M1-L19	SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-E22	HMMER
					UDP-グルコシルシロノシルおよび UDP-グルコシルトランスフェラーゼ: L76-K487	HMMER-PFAM
					膜貫通ドメイン: Q4-T27, N251-N271, H447-M475; N 末端はサイトソル内	TMAP
					UDP-グルコシルトランスフェラーゼ: BL00375; C87-P127, P146-N169, L212-E239, N311-P355, L410-Q449	BLIMPS-BLOCKS
					UDP-グリコシルトランスフェラーゼ (udpgt.prf): Q338-K391	PROFILES CAN
					トランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼタンパク質、UDP-グルコシルトランスフェラーゼ前駆体、シグナル膜貫通、UDPGT 糖タンパク質 ミクロソーム型; PD000190: L212-A403, S20-Q257, A387-L473	BLAST-PRODOM
					UDP-グルコシルシロノシルおよび UDP-グルコシルトランスフェラーゼ: DM00367P3651 31188-462: L143-V422	BLAST-DOMO
2	7485766CD1	212	S12, S43, S210, T89, T131, T158, Y31	N129, N180	UDP-グルコシルトランスフェラーゼシグナルペプチド: W317-Q360	MOTIFS
					グリコシルトランスフェラーゼ: M1-P195	HMMER-PFAM
					グリコシルトランスフェラーゼ: PF00043; Q52-G81	BLIMPS-PFAM
					膜貫通ドメイン: D161-Y187; N 末端はサイトソル内	TMAP
3	7491172CD1	303	S83, S100, S111, S127, S164		スルホトランスフェラーゼタンパク質: I33-C285	HMMER-PFAM
					膜貫通ドメイン: A211-I230; N 末端はサイトソル内	TMAP

【 0 4 4 1 】

【表 3 - 2】

表3-2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	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	シグネチャ配列、トメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
4	2804794CD1	445	S150, S418, S435, T22, T32, T44, T321, T353, T394, Y97, Y236	N155	スルホトランスフェラーゼタンパク質: PF00685; F51-S83, P112-F152, Y162-K207, L257-L286 トランスフェラーゼ スルホトランスフェラーゼ ステロイド代謝ヒドロキシステロイド アルコール エステロゲン タンパク質 ステロイド結合: PD001218; H25-E284 PAPS (3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸) 結合部位 結合: DM0098 P52847 S-298; Y35-L291 膜貫通ドメイン: D38-K62, S170-F198, V273-V297, Q333-D356, T364-K388, I391-P411, S415-S435; N 末端はサイトソル内	BLIMPS-PFAM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO TMAP
5	7589506CD1	440	S3, S58, S153, S241, T71, T115, T117, T304	N302, N319, N421	タンパク質 BEI0.2 CV1A11 29C 膜貫通(酵母 C-5 ステロールデサチラーゼ(Gr3))に類似); PD040456; D70-F268 膜貫通ドメイン: M33-P56, N80-W107; N 末端はサイトソル内がない シグナル切断: M1-A47 カルボキシルエステラーゼ タイプ B: BL00122; R139-W149, A172-F187 脂質分解酵素 "G-D-X-G" フAMILY: BL01173; V141-S153, I174-Y200, R216-A229 アリーアセトアミド脱アセチル化酵素 EC 3.1.1.1. AADAC ヒドロラーゼ 膜貫通 ミクロソーム シグナル・アンカー: PD087155; L242-D353 脂質分解酵素 "G-D-X-G" FAMILY、推定セリン活性部位: I217-A229	BLAST-PRODOM TMAP SPSCAN BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-BLOCKS BLAST-PRODOM MOTIFS

【表 3 - 3】

表3-3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	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	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
6	7493833CD1	529	S2, S132, S143, S298, S421, S437, T41, T71, T82, T84, T118, T206, T245, T522, Y236, Y438	N315	シグナルペプチド: M3-C23, M1-S24  UDP-グルコシル(β-glucoronosyl)および UDP-グルコシルトランスフェラーゼ: G24-K527 膜貫通領域: D146-F174, Q487-C515; N 末端はサイトソル内  UDP-グルコシルトランスフェラーゼ: BL00375; S34-L56, C127-P167, P190-N213, V255-C282, F295-P344, N350-P394, Q449-Y488 UDP-グリコシルトランスフェラーゼシグネチャ (udpgt:pf): N378-T419  UDP-グルコシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼタンパク質、UDP-グルコシルトランスフェラーゼ前駆体、シグナル膜貫通、UDPGT 糖タンパク質 ミクロソーム型: PD000190: G24-A325, S421-R528, V296-S437  UDP-グルコシル及び UDP-グルコシルトランスフェラーゼ: DM00367P16662187-461: F187-F462 UDP-グリコシルトランスフェラーゼシグネチャ: W356-Q399	HMMER  HMMER-PIFAM  TMAP  BLIMPS-BLOCKS  PROFILES CAN  BLAST-PRODOM  BLAST-DOMO  MOTIFS  HMMER
7	7486212CD1	615	S80, S145, S253, S359, S454, S498, T46, T120, M511, N552, T133, T239, T295, T523	N186, N237, M511, N552	シグナルペプチド: M1-A22, M1-A25, M1-G20, M1-G21	HMMER
					膜貫通領域: V195-Y218, K382-W410; N: 末端はサイトソル内	TMAP

10

20

30

40

【表 3 - 4】

表3-4

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	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	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
8	7494167CD1	430	S33 S103 S167 S168 S226 S247 S345 T29 T170 T213 T285 T394 Y220 Y315 Y365	N87 N272	アルギニン-メチルトランスフェラーゼ トランスフェラーゼ メチルトランスフェラーゼタンパク質 インターフ エロン受容体 1-結合 選択的スプライシング: PD011237: V299-G467 signal_cleavage: M1-A31	BLAST-PRODOM SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-S33 コア-2/1 - 分枝酵素: N87-R398 膜貫通ドメイン: L4-N27 S110-I131, N 末端はサイトソル 内がない	HMMER HMMER_PFAM TMAP
8					タンパク質 ベータ1トランスフェラーゼ グリコシルトランスフェラ ーゼ 酵素 コア 6N アセチルグルコサミントランスフェラーゼ 3 ガラクトシドシログリコシル糖タンパク質 (GALACTOSYLOGLYCOYLGLYCOPROTEIN) 6N アセチ ルグルコサミントランスフェラーゼ: PD003538: N87-D184, PD005410: I185-Y358, PD011484: I362-F418 LUMENAL ドメイン: DM07544IQ064308-399: L82-F418	BLAST_PRODUM
9	7495223CD1	284	S16 S24 S166 T133	N42	N-アシルトランスフェラーゼ トランスフェラーゼ アシルトランスフ エラーゼ アシルキル アシル COA:アミノ酸 グリジン アリールア セチル アシル CO - A アリールアセチルトランスフェラ ーゼ: PD034577:N158-Q284, PD022048:M1-I157 signal_cleavage: M1-E25	BLAST_DOMO BLAST_PRODUM SPSCAN
10	7671089CD1	341	S34 S88 S126 S153 S199 S301 S317 S319 T190 T213 T269 T294	N179		

10

20

30

40

【表 3 - 5】

表3-5

SEQ ID NO.	inocyte ポリペプチド ID	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	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
11	7974858CD1	599	S298 S386 S413 S509 S524 S565 S576 T131 T189 T243 T347 T406 T489 T559 Y169	N157 N306 N318 N431 N497 N527	NG NG ジメチルアルギニン ロラーゼ ヒドロラーゼ PD038714: G67-R293 PD119068: T294-S341 signal_cleavage: M1-G47	BLAST_PRODROM SPSCAN
11					シグナルペプチド: M27-Q48, M24-A49, M27-G47 スルファターゼ: P76-P502 膜貫通ドメイン: C18-W46, N 末端はサイトゾル内にな い	HMMER HMMER_PFAM TMAP
					スルファターゼタンパク質: BL00523: P76-G92, C122-K133, G168-H178, P258-H269, L300-G329, D379-E389, L495- E504 スルファターゼシグネチャ sulfatase_2.prf: Q149-G198	BLIMPS_BLOCKS PROFILESCAN
					ヒドロラーゼ アリールスルファターゼ前駆体 シグナル 糖タン パク質 リソソームタンパク質 スルホヒドロラーゼ ムコ多糖症	BLAST_PRODROM
					スルファターゼ PD001700: P76-Y282, T239-P513 アリールスルファターゼ B 前駆体 ASB N アセチルガラクトサミ ン 4 スルファターゼ G4S ヒドロラーゼ シグナル 糖タンパク質、 PD037102: H420-W554	BLAST_PRODROM
					アリールスルファターゼ ヒドロラーゼ前駆体 アリールサルフェ ート スルホヒドロラーゼ ARS シグナル 糖タンパク質 細胞 外基質	BLAST_PRODROM
					PD035731: L58-M217 アリールスルファターゼ B に類似、PD023029: I323-W434	BLAST_PRODROM

10

20

30

40

【表 3 - 6】

表 3-6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	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	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
12	8032184CD1	81	S12 T74		スルファターゼ: DM01026 P33727 44-518; P76-P536, DM01026 P15289 18-477; P76-G439, L495-Q525, P532-G552, G5-P15, DM01026 P34059 28-486; P76-A444, L495-R534, DM01026 P50473 63-522; S74-Y438 スルファターゼシグネチャ 1: P120-G132 スルファターゼシグネチャ 2: G168-H178 signal cleavage: M1-T59 膜貫通ドメイン: G39-L67	MOTIFS MOTIFS SPSCAN TMAP BLAST_PRODOME BLAST_DOMO
					チトクローム C 酸化酵素ポリペプチド VII B 前駆体 酸化還元酵素 ミトコンドリア 輸送ペプチド: PD019660; M2-Q81 チトクローム C 酸化酵素鎖 VIII B: DM07697 P2431 1-79; M2-Q81, DM07697 P13183 1-87; M2-Q81	BLAST_DOMO

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表4-1

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 求 リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
13/7486594CB1/ 2944	1-360, 187-863, 187-1003, 188-709, 188-862, 188-881, 188-998, 188-1100, 201-709, 210-360, 367-542, 551-1011, 607-1011, 615-1012, 615-1176, 616-1012, 625-1043, 645-977, 684-1012, 756-1012, 778-1620, 778-1665, 937-1805, 956-1752, 983-1821, 1040-1767, 1058-1589, 1064-1411, 1065-1523, 1096-1377, 1157-1855, 1242-1678, 1415-2103, 1464-1740, 1510-2360, 1513-1862, 1581-1895, 1613-2421, 1682-1895, 1863-2514, 1942-2350, 1942-2412, 1943-2793, 1998-2417, 2003-2824, 2017-2415, 2025-2410, 2045-2407, 2092-2878, 2173-2401, 2261-2944, 2292-2418
14/7485766CB1/ 639	1-639, 23-639
15/7491172CB1/ 912	1-529, 1-912
16/2804794CB1/ 1636	1-257, 1-300, 1-337, 1-438, 1-481, 1-496, 4-545, 12-717, 31-409, 96-431, 131-326, 131-664, 154-619, 156-406, 160-497, 174-703, 174-712, 174-737, 174-800, 174-839, 174-854, 265-952, 294-992, 355-776, 375-983, 482-1082, 497-1176, 631-1169, 664-941, 677-1306, 716-1285, 773-1406, 850-1489, 893-1552, 958-1626, 969-1634, 994-1415, 1052-1415, 1063-1415, 1064-1415, 1077-1610, 1079-1536, 1094-1312, 1094-1415, 1095-1415, 1119-1415, 1119-1636, 1120-1636, 1150-1415, 1175-1624, 1190-1614, 1201-1466, 1213-1626, 1230-1415, 1415-1613, 1415-1636
17/7589506CB1/ 4484	1-559, 215-697, 328-933, 341-930, 346-993, 559-1138, 958-1528, 1056-1605, 1147-1605, 1297-1794, 1335-1603, 1335-1765, 1335-1833, 1366-1928, 1448-1914, 1548-2070, 1553-1817, 1553-2057, 1564-1888, 1564-2112, 1866-2451, 1935-2090, 1949-2240, 1949-2360, 1949-2424, 2069-2661, 2120-2547, 2138-2544, 2147-2544, 2153-2344, 2158-2406, 2159-2307, 2167-2545, 2231-2504, 2263-2725, 2319-2563, 2319-2799, 2331-2568, 2374-2615, 2379-2725, 2383-2987, 2461-3105, 2468-2881, 2488-2741, 2504-2728, 2510-2725, 2511-3080, 2526-2699, 2586-2822, 2586-2856, 2657-2904, 2657-3054, 2657-3103, 2657-3155, 2657-3269, 2716-3317, 2721-2964, 2728-2995, 2737-2932, 2737-2937, 2772-3100, 2798-3054, 2799-3057, 2800-3317, 2823-3377, 2839-3043, 2881-3218, 2898-3130, 2919-3372, 2988-3238, 3000-3245, 3000-3478, 3044-3602, 3046-3271, 3079-3348, 3079-3690, 3105-3335, 3105-3736, 3120-3718, 3223-3466, 3242-3512, 3251-3538, 3251-3554, 3251-3732, 3265-3565, 3267-3546, 3269-3518, 3270-3518, 3303-3510, 3309-3645, 3323-3729, 3328-

10

20

30

40

【 0 4 4 7 】

【表 4 - 2】

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
18/7493833CB1/ 1639	3729, 3343-3474, 3347-3630, 3347-3632, 3364-3610, 3368-3628, 3369-3641, 3373-3625, 3381-3621, 3393-3631, 3450-3702, 3453-3704, 3484-3665, 3489-3854, 3497-3758, 3498-3787, 3501-3725, 3506-4098, 3560-3837, 3564-3729, 3583-3874, 3636-3908, 3702-3901, 3761-4000, 3761-4298, 3778-4190, 3789-4197, 3796-4463, 3803-4006, 3806-4044, 3806-4105, 3810-4049, 3819-4073, 3853-4464, 3859-4080, 3859-4151, 3859-4160, 3877-4484, 3879-4045, 3879-4140, 3888-4154, 3892-4138, 3892-4252, 3995-4203, 3997-4222, 3998-4458, 4004-4484, 4007-4468, 4049-4468, 4060-4356, 4085-4411, 4099-4472, 4106-4461, 4109-4484, 4158-4426, 4217-4468, 4302-4465, 4337-4471
19/7486212CB1/ 2229	1-530, 1-587, 1-721, 148-712, 151-697, 151-740, 151-751, 151-768, 151-791, 151-841, 154-791, 154-799, 154-803, 179-762, 204-530, 204-550, 277-1013, 336-1013, 361-1011, 373-1011, 373-1025, 374-1121, 381-1022, 397-961, 433-1013, 446-1016, 446-1022, 447-1217, 452-631, 459-1222, 480-1175, 508-1022, 538-1182, 539-1121, 615-1265, 623-1500, 637-1529, 640-1182, 641-1321, 641-1528, 654-1250, 681-1336, 681-1338, 687-1601, 688-1320, 690-1169, 704-1534, 705-1181, 720-1199, 720-1288, 720-1407, 720-1601, 722-1170, 722-1274, 722-1309, 723-1409, 722-1601, 723-1527, 724-1516, 733-1407, 733-1601, 740-1284, 742-1306, 746-1225, 749-1488, 751-1310, 751-1505, 754-1274, 754-1377, 758-1225, 759-1309, 769-1201, 769-1219, 769-1316, 769-1351, 769-1366, 771-1441, 774-1254, 789-1445, 814-1601, 820-1148, 820-1368, 820-1464, 821-1381, 836-1374, 841-1232, 843-1178, 844-1229, 845-1204, 845-1417, 848-1601, 851-1330, 851-1438, 860-1398, 865-1558, 867-1346, 869-1211, 869-1225, 869-1234, 870-1309, 874-1601, 884-1562, 893-1272, 893-1388, 894-1438, 895-1521, 895-1618, 909-1418, 910-1558, 911-1402, 917-1331, 919-1528, 919-1577, 920-1420, 924-1311, 924-1601, 928-1369, 934-1639, 935-1302, 945-1300, 947-1322, 950-1432, 955-1499, 955-1515, 962-1397, 962-1552, 963-1639, 966-1475, 966-1589, 967-1411, 972-1348, 973-1601, 977-1558, 989-1517, 989-1518, 990-1528, 993-1381, 1030-1618, 1039-1523, 1046-1618, 1087-1175, 1087-1217, 1087-1223, 1087-1249, 1087-1262, 1087-1275, 1087-1285, 1087-1304, 1087-1309, 1087-1312, 1087-1314, 1087-1315, 1087-1316, 1087-1317, 1087-1318, 1087-1319, 1087-1320, 1087-1321, 1087-1322, 1087-1323, 1087-1324, 1087-1325, 1087-1326, 1087-1327, 1087-1328, 1087-1329, 1087-1330, 1087-1331, 1087-1332, 1087-1333, 1087-1334, 1087-1335, 1087-1336, 1087-1337, 1087-1338, 1087-1339, 1087-1340, 1087-1341, 1087-1342, 1087-1343, 1087-1344, 1087-1345, 1087-1346, 1087-1347, 1087-1348, 1087-1349, 1087-1350, 1087-1351, 1087-1352, 1087-1353, 1087-1354, 1087-1355, 1087-1356, 1087-1357, 1087-1358, 1087-1359, 1087-1360, 1087-1361, 1087-1362, 1087-1363, 1087-1364, 1087-1365, 1087-1366, 1087-1367, 1087-1368, 1087-1369, 1087-1370, 1087-1371, 1087-1372, 1087-1373, 1087-1374, 1087-1375, 1087-1376, 1087-1377, 1087-1378, 1087-1379, 1087-1380, 1087-1381, 1087-1382, 1087-1383, 1087-1384, 1087-1385, 1087-1386, 1087-1387, 1087-1388, 1087-1389, 1087-1390, 1087-1391, 1087-1392, 1087-1393, 1087-1394, 1087-1395, 1087-1396, 1087-1397, 1087-1398, 1087-1399, 1087-1400, 1087-1401, 1087-1402, 1087-1403, 1087-1404, 1087-1405, 1087-1406, 1087-1407, 1087-1408, 1087-1409, 1087-1410, 1087-1411, 1087-1412, 1087-1413, 1087-1414, 1087-1415, 1087-1416, 1087-1417, 1087-1418, 1087-1419, 1087-1420, 1087-1421, 1087-1422, 1087-1423, 1087-1424, 1087-1425, 1087-1426, 1087-1427, 1087-1428, 1087-1429, 1087-1430, 1087-1431, 1087-1432, 1087-1433, 1087-1434, 1087-1435, 1087-1436, 1087-1437, 1087-1438, 1087-1439, 1087-1440, 1087-1441, 1087-1442, 1087-1443, 1087-1444, 1087-1445, 1087-1446, 1087-1447, 1087-1448, 1087-1449, 1087-1450, 1087-1451, 1087-1452, 1087-1453, 1087-1454, 1087-1455, 1087-1456, 1087-1457, 1087-1458, 1087-1459, 1087-1460, 1087-1461, 1087-1462, 1087-1463, 1087-1464, 1087-1465, 1087-1466, 1087-1467, 1087-1468, 1087-1469, 1087-1470, 1087-1471, 1087-1472, 1087-1473, 1087-1474, 1087-1475, 1087-1476, 1087-1477, 1087-1478, 1087-1479, 1087-1480, 1087-1481, 1087-1482, 1087-1483, 1087-1484, 1087-1485, 1087-1486, 1087-1487, 1087-1488, 1087-1489, 1087-1490, 1087-1491, 1087-1492, 1087-1493, 1087-1494, 1087-1495, 1087-1496, 1087-1497, 1087-1498, 1087-1499, 1087-1500, 1087-1501, 1087-1502, 1087-1503, 1087-1504, 1087-1505, 1087-1506, 1087-1507, 1087-1508, 1087-1509, 1087-1510, 1087-1511, 1087-1512, 1087-1513, 1087-1514, 1087-1515, 1087-1516, 1087-1517, 1087-1518, 1087-1519, 1087-1520, 1087-1521, 1087-1522, 1087-1523, 1087-1524, 1087-1525, 1087-1526, 1087-1527, 1087-1528, 1087-1529, 1087-1530, 1087-1531, 1087-1532, 1087-1533, 1087-1534, 1087-1535, 1087-1536, 1087-1537, 1087-1538, 1087-1539, 1087-1540, 1087-1541, 1087-1542, 1087-1543, 1087-1544, 1087-1545, 1087-1546, 1087-1547, 1087-1548, 1087-1549, 1087-1550, 1087-1551, 1087-1552, 1087-1553, 1087-1554, 1087-1555, 1087-1556, 1087-1557, 1087-1558, 1087-1559, 1087-1560, 1087-1561, 1087-1562, 1087-1563, 1087-1564, 1087-1565, 1087-1566, 1087-1567, 1087-1568, 1087-1569, 1087-1570, 1087-1571, 1087-1572, 1087-1573, 1087-1574, 1087-1575, 1087-1576, 1087-1577, 1087-1578, 1087-1579, 1087-1580, 1087-1581, 1087-1582, 1087-1583, 1087-1584, 1087-1585, 1087-1586, 1087-1587, 1087-1588, 1087-1589, 1087-1590, 1087-1591, 1087-1592, 1087-1593, 1087-1594, 1087-1595, 1087-1596, 1087-1597, 1087-1598, 1087-1599, 1087-1600, 1087-1601, 1087-1602, 1087-1603, 1087-1604, 1087-1605, 1087-1606, 1087-1607, 1087-1608, 1087-1609, 1087-1610, 1087-1611, 1087-1612, 1087-1613, 1087-1614, 1087-1615, 1087-1616, 1087-1617, 1087-1618, 1087-1619, 1087-1620, 1087-1621, 1087-1622, 1087-1623, 1087-1624, 1087-1625, 1087-1626, 1087-1627, 1087-1628, 1087-1629, 1087-1630, 1087-1631, 1087-1632, 1087-1633, 1087-1634, 1087-1635, 1087-1636, 1087-1637, 1087-1638, 1087-1639, 1087-1640, 1087-1641, 1087-1642, 1087-1643, 1087-1644, 1087-1645, 1087-1646, 1087-1647, 1087-1648, 1087-1649, 1087-1650, 1087-1651, 1087-1652, 1087-1653, 1087-1654, 1087-1655, 1087-1656, 1087-1657, 1087-1658, 1087-1659, 1087-1660, 1087-1661, 1087-1662, 1087-1663, 1087-1664, 1087-1665, 1087-1666, 1087-1667, 1087-1668, 1087-1669, 1087-1670, 1087-1671, 1087-1672, 1087-1673, 1087-1674, 1087-1675, 1087-1676, 1087-1677, 1087-1678, 1087-1679, 1087-1680, 1087-1681, 1087-1682, 1087-1683, 1087-1684, 1087-1685, 1087-1686, 1087-1687, 1087-1688, 1087-1689, 1087-1690, 1087-1691, 1087-1692, 1087-1693, 1087-1694, 1087-1695, 1087-1696, 1087-1697, 1087-1698, 1087-1699, 1087-1700, 1087-1701, 1087-1702, 1087-1703, 1087-1704, 1087-1705, 1087-1706, 1087-1707, 1087-1708, 1087-1709, 1087-1710, 1087-1711, 1087-1712, 1087-1713, 1087-1714, 1087-1715, 1087-1716, 1087-1717, 1087-1718, 1087-1719, 1087-1720, 1087-1721, 1087-1722, 1087-1723, 1087-1724, 1087-1725, 1087-1726, 1087-1727, 1087-1728, 1087-1729, 1087-1730, 1087-1731, 1087-1732, 1087-1733, 1087-1734, 1087-1735, 1087-1736, 1087-1737, 1087-1738, 1087-1739, 1087-1740, 1087-1741, 1087-1742, 1087-1743, 1087-1744, 1087-1745, 1087-1746, 1087-1747, 1087-1748, 1087-1749, 1087-1750, 1087-1751, 1087-1752, 1087-1753, 1087-1754, 1087-1755, 1087-1756, 1087-1757, 1087-1758, 1087-1759, 1087-1760, 1087-1761, 1087-1762, 1087-1763, 1087-1764, 1087-1765, 1087-1766, 1087-1767, 1087-1768, 1087-1769, 1087-1770, 1087-1771, 1087-1772, 1087-1773, 1087-1774, 1087-1775, 1087-1776, 1087-1777, 1087-1778, 1087-1779, 1087-1780, 1087-1781, 1087-1782, 1087-1783, 1087-1784, 1087-1785, 1087-1786, 1087-1787, 1087-1788, 1087-1789, 1087-1790, 1087-1791, 1087-1792, 1087-1793, 1087-1794, 1087-1795, 1087-1796, 1087-1797, 1087-1798, 1087-1799, 1087-1800, 1087-1801, 1087-1802, 1087-1803, 1087-1804, 1087-1805, 1087-1806, 1087-1807, 1087-1808, 1087-1809, 1087-1810, 1087-1811, 1087-1812, 1087-1813, 1087-1814, 1087-1815, 1087-1816, 1087-1817, 1087-1818, 1087-1819, 1087-1820, 1087-1821, 1087-1822, 1087-1823, 1087-1824, 1087-1825, 1087-1826, 1087-1827, 1087-1828, 1087-1829, 1087-1830, 1087-1831, 1087-1832, 1087-1833, 1087-1834, 1087-1835, 1087-1836, 1087-1837, 1087-1838, 1087-1839, 1087-1840, 1087-1841, 1087-1842, 1087-1843, 1087-1844, 1087-1845, 1087-1846, 1087-1847, 1087-1848, 1087-1849, 1087-1850, 1087-1851, 1087-1852, 1087-1853, 1087-1854, 1087-1855, 1087-1856, 1087-1857, 1087-1858, 1087-1859, 1087-1860, 1087-1861, 1087-1862, 1087-1863, 1087-1864, 1087-1865, 1087-1866, 1087-1867, 1087-1868, 1087-1869, 1087-1870, 1087-1871, 1087-1872, 1087-1873, 1087-1874, 1087-1875, 1087-1876, 1087-1877, 1087-1878, 1087-1879, 1087-1880, 1087-1881, 1087-1882, 1087-1883, 1087-1884, 1087-1885, 1087-1886, 1087-1887, 1087-1888, 1087-1889, 1087-1890, 1087-1891, 1087-1892, 1087-1893, 1087-1894, 1087-1895, 1087-1896, 1087-1897, 1087-1898, 1087-1899, 1087-1900, 1087-1901, 1087-1902, 1087-1903, 1087-1904, 1087-1905, 1087-1906, 1087-1907, 1087-1908, 1087-1909, 1087-1910, 1087-1911, 1087-1912, 1087-1913, 1087-1914, 1087-1915, 1087-1916, 1087-1917, 1087-1918, 1087-1919, 1087-1920, 1087-1921, 1087-1922, 1087-1923, 1087-1924, 1087-1925, 1087-1926, 1087-1927, 1087-1928, 1087-1929, 1087-1930, 1087-1931, 1087-1932, 1087-1933, 1087-1934, 1087-1935, 1087-1936, 1087-1937, 1087-1938, 1087-1939, 1087-1940, 1087-1941, 1087-1942, 1087-1943, 1087-1944, 1087-1945, 1087-1946, 1087-1947, 1087-1948, 1087-1949, 1087-1950, 1087-1951, 1087-1952, 1087-1953, 1087-1954, 1087-1955, 1087-1956, 1087-1957, 1087-1958, 1087-1959, 1087-1960, 1087-1961, 1087-1962, 1087-1963, 1087-1964, 1087-1965, 1087-1966, 1087-1967, 1087-1968, 1087-1969, 1087-1970, 1087-1971, 1087-1972, 1087-1973, 1087-1974, 1087-1975, 1087-1976, 1087-1977, 1087-1978, 1087-1979, 1087-1980, 1087-1981, 1087-1982, 1087-1983, 1087-1984, 1087-1985, 1087-1986, 1087-1987, 1087-1988, 1087-1989, 1087-1990, 1087-1991, 1087-1992, 1087-1993, 1087-1994, 1087-1995, 1087-1996, 1087-1997, 1087-1998, 1087-1999, 1087-2000, 1087-2001, 1087-2002, 1087-2003, 1087-2004, 1087-2005, 1087-2006, 1087-2007, 1087-2008, 1087-2009, 1087-2010, 1087-2011, 1087-2012, 1087-2013, 1087-2014, 1087-2015, 1087-2016, 1087-2017, 1087-2018, 1087-2019, 1087-2020, 1087-2021, 1087-2022, 1087-2023, 1087-2024, 1087-2025, 1087-2026, 1087-2027, 1087-2028, 1087-2029, 1087-2030, 1087-2031, 1087-2032, 1087-2033, 1087-2034, 1087-2035, 1087-2036, 1087-2037, 1087-2038, 1087-2039, 1087-2040, 1087-2041, 1087-2042, 1087-2043, 1087-2044, 1087-2045, 1087-2046, 1087-2047, 1087-2048, 1087-2049, 1087-2050, 1087-2051, 1087-2052, 1087-2053, 1087-2054, 1087-2055, 1087-2056, 1087-2057, 1087-2058, 1087-2059, 1087-2060, 1087-2061, 1087-2062, 1087-2063, 1087-2064, 1087-2065, 1087-2066, 1087-2067, 1087-2068, 1087-2069, 1087-2070, 1087-2071, 1087-2072, 1087-2073, 1087-2074, 1087-2075, 1087-2076, 1087-2077, 1087-2078, 1087-2079, 1087-2080, 1087-2081, 1087-2082, 1087-2083, 1087-2084, 1087-2085, 1087-2086, 1087-2087, 1087-2088, 1087-2089, 1087-2090, 1087-2091, 1087-2092, 1087-2093, 1087-2094, 1087-2095, 1087-2096, 1087-2097, 1087-2098, 1087-2099, 1087-2100, 1087-2101, 1087-2102, 1087-2103, 1087-2104, 1087-2105, 1087-2106, 1087-2107, 1087-2108, 1087-2109, 1087-2110, 1087-2111, 1087-2112, 1087-2113, 1087-2114, 1087-2115, 1087-2116, 1087-2117, 1087-2118, 1087-2119, 1087-2120, 1087-2121, 1087-2122, 1087-2123, 1087-2124, 1087-2125, 1087-2126, 1087-2127, 1087-2128, 1087-2129, 1087-2130, 1087-2131, 1087-2132, 1087-2133, 1087-2134, 1087-2135, 1087-2136, 1087-2137, 1087-2138, 1087-2139, 1087-2140, 1087-2141, 1087-2142, 1087-2143, 1087-2144, 1087-2145, 1087-2146, 1087-2147, 1087-2148, 1087-2149, 1087-2150, 1087-2151, 1087-2152, 1087-2153, 1087-2154, 1087-2155, 1087-2156, 1087-2157, 1087-2158, 1087-2159, 1087-2160, 1087-2161, 1087-2162, 1087-2163, 1087-2164, 1087-2165, 1087-2166, 1087-2167, 1087-2168, 1087-2169, 1087-2170, 1087-2171, 1087-2172, 1087-2173, 1087-2174, 1087-2175, 1087-2176, 1087-2177, 1087-2178, 1087-2179, 1087-2180, 1087-2181, 1087-2182, 1087-2183, 1087-2184, 1087-2185, 1087-2186, 1087-2187, 1087-2188, 1087-2189, 1087-2190, 1087-2191, 1087-2192, 1087-2193, 1087-2194, 1087-2195, 1087-2196, 1087-2197, 1087-2198, 1087-2199, 1087-2200, 1087-2201, 1087-2202, 1087-2203, 1087-2204, 1087-2205, 1087-2206, 1087-2207, 1087-2208, 1087-2209, 1087-2210, 1087-2211, 1087-2212, 1087-2213, 1087-2214, 1087-2215, 1087-22

【表 4 - 3】

表4-3

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 示 リヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	522-804, 539-1084, 545-723, 545-1134, 549-1055, 551-1064, 555-1017,
	575-1188, 585-1317, 589-931, 616-853, 645-1212, 662-1347, 672-1242,
	688-953, 707-1235, 716-1162, 726-1388, 730-1300, 764-1252, 769-1228,
	770-1363, 777-1435, 779-1162, 785-1293, 791-1438, 796-981, 803-1221,
	803-1344, 807-980, 840-1521, 848-1096, 856-1519, 862-1114, 863-1035,
	868-1177, 868-1382, 870-1447, 876-1479, 880-1147, 883-1260, 883-
	1506, 888-1192, 888-1431, 888-1443, 892-1437, 902-1455, 902-1527,
	903-1148, 917-1618, 926-1541, 952-1602, 965-1523, 966-1548, 978-
	1695, 985-1494, 987-1554, 987-1298, 1004-1758, 1030-1323, 1031-1617,
	1043-1632, 1048-1526, 1053-1608, 1078-1329, 1078-1708, 1099-1643,
	1104-1350, 1105-1319, 1126-1419, 1126-1718, 1130-1506, 1139-1390,
	1141-1680, 1152-1989, 1170-1805, 1192-1683, 1195-1694, 1207-1430,
	1214-1546, 1216-1770, 1218-1468, 1225-1878, 1226-1580, 1227-1968,
	1228-1896, 1236-1983, 1237-1506, 1239-1445, 1252-1450, 1254-1726,
	1269-1853, 1272-1553, 1279-1809, 1295-1548, 1295-1837, 1296-2084,
	1299-1457, 1305-1718, 1306-1852, 1307-1510, 1307-1570, 1311-1592,
	1315-1718, 1320-1789, 1325-1961, 1329-1718, 1335-1874, 1338-1779,
	1341-1412, 1351-2118, 1357-1582, 1362-2136, 1369-2042, 1376-2136,
	1389-1565, 1394-2038, 1399-1659, 1401-1558, 1403-2074, 1410-1646,
	1410-1693, 1411-1949, 1428-1925, 1431-1998, 1432-1910, 1434-1908,
	1446-1709, 1446-1882, 1447-2129, 1452-1903, 1457-1703, 1465-2096,
	1467-2229, 1468-2099, 1471-1717, 1475-1709, 1475-1718, 1476-2112,
	1482-1979, 1483-2162, 1509-1718, 1511-1820, 1513-1718, 1522-2112,
	1529-2010, 1531-1796, 1531-1803, 1535-2191, 1539-1797, 1542-1718,
	1544-2003, 1547-2099, 1570-1801, 1579-2106, 1583-1802, 1591-1857,
	1592-2191, 1602-2191, 1608-2108, 1611-2177, 1615-2191, 1623-1718,
	1674-1718, 1674-2191, 1682-1718, 1688-1718, 1689-2191, 1690-1933,
	1690-2065, 1705-2191, 1709-1976, 1717-1788, 1732-2191, 1737-2118,
	1738-2191, 1749-2191, 1769-1983, 1781-2191, 1786-1852, 1786-1859,
	1786-1865, 1786-1886, 1786-1932, 1786-1941, 1786-1947, 1786-1954,
	1786-1986, 1786-2010, 1786-2059, 1786-2073, 1786-2085, 1786-2192,
	1810-2191, 1817-2062, 1818-2014, 1822-2191, 1838-2061, 1841-2086,
	1848-2015, 1858-2006, 1865-2191, 1868-2101, 1868-2130, 1868-2144,
	1868-2150, 1869-2191, 1883-2136, 1886-2191, 1887-2064, 1887-2130,
	1890-2064, 1894-2170, 1931-2090, 1931-2191, 1935-2187, 1939-2191,
	1957-2191, 1962-2191, 1986-2095, 2136-2191, 2187-2209, 2189-2220,

10

20

30

40

【表 4 - 4】

表4-4

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
20/7494167CBI/ 1744	2190-2221, 2191-2217, 2191-2221, 2191-2225, 2191-2226, 2192-2221, 2192-2223, 2192-2225, 2192-2226, 2193-2223, 2193-2225, 2193-2226
21/7495223CBI/ 1054	1-579, 1-1395, 1073-1130, 1073-1168, 1077-1168, 1232-1744, 1292-1727
22/7671089CBI/ 4208	1-1054, 172-470, 474-804
23/7974858CBI/ 2624	1-605, 323-842, 464-1134, 468-1134, 487-974, 508-778, 528-1048, 529-768, 560-758, 670-1219, 711-1323, 783-1377, 838-1367, 854-1370, 938-1412, 997-1396, 1001-1491, 1021-1360, 1043-1367, 1046-1605, 1107-1713, 1134-1430, 1134-1595, 1135-1739, 1243-1578, 1302-1745, 1406-1609, 1469-1610, 1534-1776, 1566-2104, 1579-2170, 1629-2112, 1633-2123, 1636-2004, 1639-1928, 1699-2008, 1710-2257, 1719-2331, 1879-2352, 1932-2503, 1950-2219, 1952-2452, 2001-2584, 2048-2299, 2091-2354, 2237-2797, 2237-2825, 2305-2580, 2312-2605, 2334-2958, 2374-2616, 2385-2645, 2398-2635, 2419-2673, 2428-2697, 2433-2677, 2475-2759, 2504-2776, 2510-2810, 2547-2825, 2568-2812, 2568-2858, 2597-2846, 2597-3206, 2604-2790, 2630-2910, 2680-2942, 2680-3126, 2680-3220, 2693-2956, 2701-2961, 2716-2990, 2723-2970, 2735-3007, 2774-3028, 2774-3041, 2906-3134, 2909-3140, 2916-3182, 2920-3144, 2920-3165, 2920-3311, 2932-3200, 2950-3169, 2974-3196, 2975-3261, 2975-3467, 2981-3266, 3002-3211, 3038-3324, 3052-3221, 3052-3311, 3058-3322, 3072-3295, 3072-3599, 3123-3402, 3141-3413, 3199-3458, 3200-3448, 3200-3450, 3234-3486, 3236-3422, 3260-3490, 3261-3580, 3269-3482, 3304-3569, 3327-3528, 3351-3594, 3392-3614, 3393-3581, 3399-3618, 3411-3645, 3425-3663, 3429-3679, 3444-3693, 3459-3727, 3461-3717, 3463-3710, 3476-3734, 3480-3728, 3499-3787, 3519-3672, 3556-4179, 3563-3820, 3570-4182, 3576-3912, 3576-3934, 3576-4185, 3578-3819, 3587-3788, 3588-3819, 3637-3870, 3667-3913, 3781-4021, 3799-4050, 3799-4181, 3799-4201, 3920-4139, 3922-4176, 3959-4193, 3970-4208, 3981-4208
	1-147, 1-603, 3-147, 4-793, 147-222, 147-238, 147-349, 147-383, 147-418, 147-510, 147-531, 147-542, 147-563, 147-793, 148-791, 148-793, 152-488, 166-544, 195-484, 205-804, 296-793, 441-728, 441-729, 441-734, 513-729, 555-1129, 555-1262, 685-804, 804-1026, 804-2094, 1024-1317, 1024-1460, 1078-1292, 1078-1596, 1242-1531, 1266-1823, 1329-2080, 1437-2079, 1463-2083, 1469-2014, 1479-2082, 1531-2111, 1531-

10

20

30

40

【表 4 - 5】

表 4 - 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
	2113, 1537-2090, 1544-2196, 1594-1899, 1596-2186, 1630-2025, 1634-2183, 1656-2151, 1676-2151, 1683-2214, 1693-2241, 1699-2133, 1706-2143, 1708-2313, 1708-2343, 1711-1954, 1752-2124, 1813-1907, 1813-2035, 1828-2142, 1834-2519, 1834-2525, 1836-2068, 1845-2124, 1848-2121, 1871-2607, 1875-2450, 1909-2624, 1923-2600, 1923-2624, 1928-2551, 1931-2210, 1931-2501, 1963-2544, 1980-2582, 2006-2272, 2296-2525, 2541-2580
24/8032184CB1/563	1-490, 9-563, 13-563, 87-544, 90-542, 95-541, 106-546, 110-546, 113-538, 151-542, 167-541, 168-541, 172-538, 180-543, 218-544, 281-538, 282-541, 282-543, 288-541, 322-511, 357-541, 365-538

10

20

30

40

【表 5】

表 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID	代表的ライブラリ
13	7486594CB1	LIVRNO07
16	2804794CB1	BLADTUT08
17	7589506CB1	PANCN0T08
18	7493833CB1	ADMEDNV17
19	7486212CB1	CONUTUT01
20	7494167CB1	KIDCTME01
22	7671089CB1	BRAINON01
23	7974858CB1	ADENINB01
24	8032184CB1	TESTINO01

10

20

30

40

【 0 4 5 2 】

表6-1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ADENINB01	PBLUESCRIPT	ライブラリは或る3才児の炎症性アデノイド組織から単離した RNA を用いて作製した(RNA は Clontech 社から得た)。
ADMEDNV17	PCR2 - TOPOTA	ライブラリは異なるドナーからのプールされた cDNA を使って作製された。10 人の突然死の白人男女ドナー(21 才から 57 才まで)から採取し、プールされた骨格筋組織、9 人の突然死の白人男女ドナー(18 才から 32 才まで)から採取し、プールされた胸腺組織、32 人の自然流産のため死亡の白人男女胎児(妊娠 18 週から 24 週まで)から採取し、プールされた肝組織、59 人の自然流産のため死亡の白人男女胎児(妊娠 20 週から 33 週まで)から採取し、腎組織、妊娠 23 週で胎児死亡の一人の白人男子から採取された脳組織から単離された mRNA を用いて cDNA を作製した。
BLADTUT08	PINCY	ライブラリは、根治的膀胱切除および前立腺切除時に 72 才白人男性から摘除した膀胱腫瘍組織から単離された RNA を用いて作製された。病理は、右膀胱基部に浸潤性でグレード 3(3 の内)の移行上皮癌が見られた。患者の病歴には、純粋高コレステロール血症 (pure hypercholesterolemia) およびタバコニコチン依存症がある。家族歴には、心筋梗塞、脳血管疾患、および脳腫瘍がある。
BRAINON01	PSPORT1	ライブラリは、或る脳腫瘍ライブラリからの 488 万の独立クローンから作製し、ノーマライズした。RNA は 26 才の白人男性の頭蓋形成および脳腫瘍病変の切除時に採取された脳組織から作製した。関連腫瘍組織の病理は、脳の右前頭頂部におけるグレード 4 の少星細胞腫を示した。極めて長時間(48 時間)の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件には、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 を適用した。
CONUTUT01	PINCY	ライブラリは 61 才の女性の腹式子宮全摘および、所屬リンパ節切除を伴った両側副腎摘出時に得た S 状結腸腸間膜腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は S 状結腸腸間膜の 2 つの部位に転移性のグレード 4 の悪性ミューラー混合腫瘍の存在が示された。
KIDCTME01	PCDNA2.1	この、5' に偏向してランダムプライムされたライブラリは 65 才男性の尿管切除時に摘出された腎臓皮質組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は切除辺縁部分には浸潤のないことを示した。一致する腫瘍組織の病理はグレード 3 の腎細胞癌、明細胞型であり、腎臓中央部分内にまだらの多嚢胞性塊の形成が見られた。腫瘍は腎臓に深く浸潤していたが、貫通していなかった。
LIVRNO07	PINCY	ライブラリは 2 人のドナーからのプールされた cDNA を使って作製された。cDNA は、パター症候群で死亡した 20 週齢の白人男子胎児(ドナー A)と無脳症で死亡した 16 週齢の白人女子胎児(ドナー B)から摘出された肝臓組織から単離された RNA を用いて作成した。ドナー B の家族歴には、僧帽弁逸脱が含まれる。
PANCNCT08	PINCY	ライブラリは、65 歳の白人女性の根治的膵重全摘時に採取した膵臓組織の単離 RNA を使用して作製された。関連する腫瘍組織の病理は、浸潤性でグレード 2 の腺癌を示した。患者の病歴には II 型糖尿病、変形性関節症、心血管疾患、大腸での良性腫瘍、および白内障がある。以前の手術としては、脾臓全摘出、胆嚢全摘出および腹式子宮摘出がある。家族歴には心臓

【表 6 - 2】

表6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
TESTNCF01	PSPORT1	<p>ライブラリの説明            管疾患、II型糖尿病および胃癌がある。            この5'キヤップの単離された完全長ライブラリは、自動車事故による頭部外傷で死亡した26歳の白人男性の精巣組織から単離された RNA を用いて作製された。患者の病歴には、誕生時のヘルニア、タバコの使用(1日1.5箱)、マリファナの使用および毎日のアルコール飲用(ビールと蒸留酒)があった。</p>

10

20

30

40

表 7 - 1

プログラム	説明	参考文献	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、あいまいな塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder, アミノ酸配列または核酸配列の比較および注釈付けに有用である。	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。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool. アミノ酸配列および核酸配列の配列類似性検索に有用である。BLASTにはblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値1.0E-10 以下
FASTA	問合せ配列と同種の配列群との類似性を検索する Pearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最少5つの機能(fasta、tfasta、fastx、tfastxおよびsssearch)がある。	Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W. R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; Smith, T. F. 及び 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=96%以上 一致した長さ=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	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLocks IMProved Searcher。	Henikoff, S. 及び J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. 及び S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; 及び Atwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下
HMMER	PFAM のような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 (1998) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350頁	PFAM ヒット: 確率値=1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット: スコア=0 以上

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表 7-2

プログラム	説明	参照文献	パラメータ閾値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列内の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	ノーマライズされた質量スコアとその特定のPrositeモチーフに対するGCC指定「HIGH」値通常、スコア=1.4-2.1.
Phred	高い感度と確率で自動配列決定機トレースを調べるベースコールングアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. 及び 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プログラムであるSWATやCrossMatchを含むPhrap Revised Assembly プログラムで、配列相溶性の検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T. F. 及び M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T. F. 及び M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上一致した長さ=56以上
Consed	Phrapアセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み行列解析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J. M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み行列を用いて蛋白配列での膜貫通セグメントを描写し配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. 及び P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM)を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他, eds, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ.	
Motifs	Prositeで定義された配列と一致したペプタンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, 第9版, M51-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

【配列表】

2006514531000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/04918
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/52 C12N9/00 C12N15/11 C12N15/63 C12N1/21 C12N5/10 A01K67/027 C07K16/40 G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/25 A61K38/43 A61K39/395 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A01K 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)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 53750 A (GENENTECH INC ;BOTSTEIN DAVID (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AU) 14 September 2000 (2000-09-14)  page 67, line 30 -page 68, line 14 page 75, line 8 -page 102, line 3 claims 1-70; figures 9,10; table 4 --- -/--	1-18,20, 23, 26-32, 34, 36-56,68
<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		Date of mailing of the international search report
2 December 2002		31 03 03
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) 340-3916		Authorized officer  Seroz, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/US 02/04918

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILLIAMS J ANDREW ET AL: "Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer." CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 17, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 4667-4677, XP00222162 ISSN: 0008-5472 page 4669, right-hand column, paragraph 2 -page 4673, right-hand column, paragraph 3 ---	1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-56, 68
A	TUKEY ROBERT H ET AL: "Cloning and characterization of rabbit liver UDP-glucuronosyltransferase cDNAs: Developmental and inducible expression of 4-hydroxybiphenyl UGT2B13." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 20, 1993, pages 15260-15266, XP00222163 ISSN: 0021-9258 figure 1 -----	1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-56, 68

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 02/04918**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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: 21, 22, 24, 25  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
(1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially), 56 (completely),  
68 (completely)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 02 04918

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
56 (completely), 68 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

2. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
57 (completely), 69 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

3. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
58 (completely), 70 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

4. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
59 (completely), 71 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing

International Application No. PCT/US 02 04918

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

5. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
60 (completely), 72 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

6. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
61 (completely), 73 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

7. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
62 (completely), 74 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

8. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
63 (completely), 75 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid

International Application No. PCT/US 02 04918

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

9. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
64 (completely), 76 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

10. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
65 (completely), 77 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

11. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
66 (completely), 78 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

International Application No. PCT/US 02 04918

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

12. Claims: (1-18, 20, 23, 26-32, 34, 36-55) (all partially),  
67 (completely), 79 (completely)

A human drug metabolizing enzyme (DME) having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No 1 and the polynucleotide which identifies and encodes the same and having the sequence SEQ ID No 13. The present application also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists, methods for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of DME as well as arrays containing the polynucleotide depicted in SEQ ID No 13.

International Application No. PCT/US 02 04918

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210**

## Continuation of Box I.1

Although claims 33 and 35 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

Although claims 19 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 composition.

## Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 21, 22, 24, 25

Present claims 21, 22, 24 and 25 relate to a composition defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, it contains an antagonist compound identified by a claimed method.

The claims cover all compositions having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compositions. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compositions by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies raised against a DME (see page 68, line 32 to page 69, line 6).

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 02/04918

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0053750 A	14-09-2000	AU 1748200 A	19-06-2000
		AU 1749900 A	12-07-2000
		AU 2192800 A	12-07-2000
		AU 2224800 A	28-09-2000
		AU 2399300 A	28-09-2000
		AU 2495200 A	28-09-2000
		AU 2596700 A	28-09-2000
		AU 2600800 A	28-09-2000
		AU 2879400 A	31-07-2001
		AU 2883600 A	28-09-2000
		AU 3072199 A	27-09-1999
		AU 3107700 A	28-09-2000
		AU 3381600 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		CA 2321677 A	16-09-1999
		CA 2361840 A	14-09-2000
		CA 2361849 A	14-09-2000
		CA 2362427 A	14-09-2000
		EP 1173563 A	23-01-2002
		EP 1263948 A	11-12-2002
		EP 1159419 A	05-12-2001
		EP 1220905 A	10-07-2002
		EP 1135485 A	26-09-2001
		EP 1141284 A	10-10-2001
		EP 1159422 A	05-12-2001
		EP 1141289 A	10-10-2001
		US 2002182673 A	05-12-2002
		US 2002192209 A	19-12-2002
		US 2003032057 A	13-02-2003
		US 2002119130 A	29-08-2002
		WO 0053753 A	14-09-2000
		WO 0053754 A	14-09-2000
		WO 0053755 A	14-09-2000
		WO 0153486 A	26-07-2001
		WO 0053756 A	14-09-2000
		WO 0053757 A	14-09-2000
		WO 0053758 A	14-09-2000
		US 2003004311 A	02-01-2003
		US 2002127584 A	12-09-2002
		US 2002094416 A	18-07-2002
		US 2003009012 A	09-01-2003
		US 2003009013 A	09-01-2003
		US 2003027992 A	06-02-2003
		US 2003036634 A	20-02-2003
		US 2002183493 A	05-12-2002
		US 2003027993 A	06-02-2003

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	4 B 0 6 4
A 6 1 P	1/08	(2006.01)	A 6 1 P	1/08	4 B 0 6 5
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	5/26	(2006.01)	A 6 1 P	5/26	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	7/08	(2006.01)	A 6 1 P	7/08	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K	16/40	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 1 2 N	9/04	(2006.01)	C 1 2 N	9/04	E
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/58	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M

<b>G 0 1 N 37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/58	A
<b>C 1 2 N 5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 37/00	1 0 2
<b>A 6 1 K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	F
		C 1 2 N 5/00	A
		A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 60/282,077  
 (32)優先日 平成13年4月6日(2001.4.6)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/285,447  
 (32)優先日 平成13年4月19日(2001.4.19)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/287,060  
 (32)優先日 平成13年4月27日(2001.4.27)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/288,543  
 (32)優先日 平成13年5月3日(2001.5.3)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 オウ - ヤング、ジャニス  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 0 5・プリズベーン・ゴールドデンイーグルレーン 2 3 3  
 (72)発明者 ボーグン、マライア・アール  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 7 7・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4  
 (72)発明者 ディング、リー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 6・パロアルト・# 1 4 6・アルマストリート 3 3 5  
 3  
 (72)発明者 ダガン、ブレンダン・エム  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 6・サニーベイル・# 3 0 6・ブエナビスタアベニュー  
 2 4 3  
 (72)発明者 フォーサイス、イアン・ジェイ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 1・レッドウッドシティ・ローブルアベニュー 3 0 8  
 (72)発明者 ギエツェン、キンバリー・ジェイ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 3・サンノゼ・ロスウエコドライブ 6 9 1  
 (72)発明者 グリフィン、ジェニファー・エイ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 5・フレモント・メローウェイ 3 3 6 9 1  
 (72)発明者 リー、アーンステーション・エイ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 7 0 6・アルバニー・ケインズストリート 6 2 4  
 (72)発明者 リュ、ヤン  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 3・パロアルト・コリーナウェイ 3 8 8 5  
 (72)発明者 リチャードソン、トマス・ダブリュ  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 2・レッドウッドシティ・# 1 0 7・キャニオンロード  
 6 1 6  
 (72)発明者 リング、ヒュイジュン・ジュー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 2・ロスアルトス・オレンジアベニュー 6 2 5

- (72)発明者 サンジャンワラ、マデウスダン・エム  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 2 4 ・ ロスアルトス・シルビアコート 2 1 0
- (72)発明者 スウォーナカール、アニータ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 2 2 ・ サンフランシスコ・# 5 ディー・ロックスリーアベ  
ニュー 8
- (72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ・ ユニオンシティ・# 7 1 2 ・ ユニオンスクエア 3  
3
- (72)発明者 ワレン、ブリジット・エイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 1 4 ・ クーペルティノー・# 2 ・ パークウッドドライブ  
1 0 1 3 0
- (72)発明者 スー、ユーミング  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 0 ・ マウンテンビュー・ウォルナットドライブ 1 7 3  
9
- (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 9 4 0 8 7 ・ サニーベイル・ルイスアベニュー 8 2 6
- (72)発明者 ゼバージャディアン、エギー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 2 7 ・ サンフランシスコ・ジュニペロセラブールバード  
8 3 0

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB14 BB50 BB51 DA12 DA13 FA12 FA16 FB02 FB07  
FB12 GC15 JA01  
4B024 AA01 AA11 BA08 BA10 BA43 CA02 CA04 CA09 FA02 HA14  
4B029 AA07 BB20 CC11 FA15  
4B050 CC03 FF16 LL01 LL03  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ44 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34  
4B064 AG27 CA19 CC24 CE13 DA13  
4B065 AB01 BA02 CA28 CA29 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA22 BA23 CA53 NA14 ZA01  
ZA02 ZA05 ZA16 ZA33 ZA36 ZA42 ZA45 ZA52 ZA54 ZA55  
ZA59 ZA66 ZA68 ZA69 ZA70 ZA71 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94  
ZA96 ZA97 ZB02 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB31 ZB35 ZC06  
ZC21 ZC35  
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA05 ZA16 ZA33 ZA36  
ZA42 ZA45 ZA52 ZA54 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA69 ZA70  
ZA71 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZA97 ZB02 ZB11 ZB13  
ZB15 ZB26 ZB31 ZB35 ZC06 ZC21 ZC35  
4C087 AA01 BC83 CA12 ZA01 ZA02 ZA05 ZA16 ZA33 ZA36 ZA42  
ZA45 ZA52 ZA54 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA69 ZA70 ZA71  
ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZA97 ZB02 ZB11 ZB13 ZB15  
ZB26 ZB31 ZB35 ZC06 ZC21  
4H045 AA11 AA20 AA30 DA75 DA76 EA51 EA52 EA53 FA74

專利名称(译)	藥物代謝酶		
公開(公告)号	<a href="#">JP2006514531A</a>	公開(公告)日	2006-05-11
申請号	JP2002566359	申請日	2002-02-14
[標]申請(專利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申請(專利权)人(译)	洞察基因组公司		
[標]發明人	アストロモフアンナ オウヤングジャンス ボーグンマライアアール デイングリー ダガンブレンダンエム フォーサイスイアンジェイ ギエツエンキンバリージェイ グリフィンジェニファーエイ リーアーンステイーンエイ リュヤン リチャードソントマスダブリュ リングヒュイジュンジー サンジャンワラマデウスダンエム スウォーナカールアニータ チョーラナリンダーケイ ワレンブリジットエイ スーユーミング ユエヘンリー ゼバージャディアンエギー		
發明人	アストロモフ、アンナ オウ-ヤング、ジャンス ボーグン、マライア・アール デイング、リー ダガン、ブレンダン・エム フォーサイス、イアン・ジェイ ギエツエン、キンバリー・ジェイ グリフィン、ジェニファー・エイ リー、アーンステイーン・エイ リュ、ヤン リチャードソン、トマス・ダブリュ リング、ヒュイジュン・ジー サンジャンワラ、マデウスダン・エム スウォーナカール、アニータ チョーラ、ナリンダー・ケイ ワレン、ブリジット・エイ スー、ユーミング ユエ、ヘンリー ゼバージャディアン、エギー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/76 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/26 A61P7/02 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11 /00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37 /06 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12N9		

/04 C12N9/10 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 G01N37/00  
C12N5/10 A61K38/00 C12N9/14 G01N33/573

CPC分类号 A01K2217/05 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10  
A61P5/14 A61P5/26 A61P7/02 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/12  
A61P15/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P27/02 A61P29  
/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 C12N9/0004  
C12N9/10 C12N9/14 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/573

FI分类号 C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/16  
A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/26 A61P7/02 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/10 A61P9  
/12 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00  
A61P25/08 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00  
A61P35/02 A61P37/06 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1  
/21 C12N9/02 C12N9/04.E C12N9/10 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.  
D G01N33/53.M G01N33/58.A G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02

F-TERM分类号 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/FA12 2G045  
/FA16 2G045/FB02 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11  
4B024/BA08 4B024/BA10 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/FA02 4B024  
/HA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC11 4B029/FA15 4B050/CC03 4B050/FF16 4B050/LL01  
4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ44 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063  
/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE13 4B064/DA13  
4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA28 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084  
/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14  
4C084/ZA01 4C084/ZA02 4C084/ZA05 4C084/ZA16 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA42 4C084  
/ZA45 4C084/ZA52 4C084/ZA54 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA68 4C084/ZA69  
4C084/ZA70 4C084/ZA71 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084  
/ZA97 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZB31 4C084/ZB35  
4C084/ZC06 4C084/ZC21 4C084/ZC35 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086  
/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA05 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA42 4C086/ZA45  
4C086/ZA52 4C086/ZA54 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA69 4C086  
/ZA70 4C086/ZA71 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZA97  
4C086/ZB02 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB31 4C086/ZB35 4C086  
/ZC06 4C086/ZC21 4C086/ZC35 4C087/AA01 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/ZA01 4C087/ZA02  
4C087/ZA05 4C087/ZA16 4C087/ZA33 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA45 4C087/ZA52 4C087  
/ZA54 4C087/ZA55 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA69 4C087/ZA70 4C087/ZA71  
4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB02 4C087  
/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB31 4C087/ZB35 4C087/ZC06 4C087/ZC21  
4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045  
/EA53 4H045/FA74

优先权 60/269643 2001-02-16 US  
60/271332 2001-02-23 US  
60/276767 2001-03-16 US  
60/282077 2001-04-06 US  
60/285447 2001-04-19 US  
60/287060 2001-04-27 US  
60/288543 2001-05-03 US

外部链接 [Espacenet](#)

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供纯化的多肽，它是一种药物代谢酶。 溶液：分离的多肽选自以下 (a) 至 (d) 组成的组： (a) 由选自 SEQ ID NO：1-12的氨基酸序列组成的多肽， (b) 与选自SEQ ID NO：1-12的氨基酸序列至少90%相同具有天然氨基酸序列的多肽， (c) 具有选自具有SEQ ID NO：1-12的组的氨基酸序列的多肽的生物活性片段，和 (d) SEQ ID NO：1-12具有选自下组的氨基酸序列的多肽的免疫原性片段：

Clone ID					3755	3583	3311	3756	3757	3649	3647
	3583	3647	3649	3754	ホリ	ホリ	腫瘍	腫瘍	腫瘍	腫瘍	腫瘍
1633719				-1.98	-1.98	-2.32	-3.47	-3.10	-2.99	-2.19	-2.89
4107476	-2.85	-8.34	-4.83	-2.19	-1.87	-2.31	-3.11	-3.24	-3.33	-2.32	-2.93