

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 529358

(P2003 - 529358A)

(43)公表日 平成15年10月7日(2003.10.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7052	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7052		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		48/00	4 B 0 6 4
		A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全198数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 572586(P2001 - 572586)

(86) (22)出願日 平成13年4月3日(2001.4.3)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月2日(2002.10.2)

(86)国際出願番号 PCT/US01/10892

(87)国際公開番号 W001/074897

(87)国際公開日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(31)優先権主張番号 60/194,314

(32)優先日 平成12年4月3日(2000.4.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/225,693

(32)優先日 平成12年8月16日(2000.8.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 キュラジェン コーポレイション
アメリカ合衆国 コネチカット州 06511
ニュー ハイブン ロング ウォーフ ド
ライブ 555

(72)発明者 ヴェルネ, コリーヌ アー. エム.
アメリカ合衆国 コネチカット 06471,
ノース ブランフォード, ボックス エル
, フォクソン ロード 1739

(72)発明者 バージェス, キャサリン イー.
アメリカ合衆国 コネチカット 06109,
ウェザーズフィールド, キャリッジ ヒル
ドライブ 90

(74)代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 AMF - 1 ~ AMF - 1 0 のタンパク質およびこのタンパク質をコードする核酸

(57)【要約】

本明細書において、ポリペプチドをコードする新規なヒト核酸配列を開示している。また、これらの核酸配列によってコードされるポリペプチド、このポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体、ならびに、前述のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体の誘導体、改変体、変異体、またはフラグメントもまた開示される。本発明はさらに、これらの新規なヒト核酸およびタンパク質のいずれか1つに関する障害の診断、処置および予防のための治療法、診断法、および研究法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列の成熟形態；

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列とは異なり、ただし、該改変体は、該アミノ酸残基の15%以下が該成熟形態のアミノ酸配列と異なっている、改変体；

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟型のアミノ酸配列とは異なり、ただし、該改変体は、アミノ酸残基の15%以下が該アミノ酸配列と異なっている、改変体、
からなる群より選択されるアミノ酸を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列の天然に存在する対立遺伝子改変体のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 前記対立遺伝子改変体が、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19からなる群より選択される核酸配列とは、単一のヌクレオチドが異なる、核酸配列の翻訳物である、アミノ酸配列を含む、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項4】 前記改変体のアミノ酸配列が、保存的アミノ酸置換を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20

からなる群より選択されるアミノ酸の成熟形態；

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸の成熟形態の改変体であって、ここで、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列とは異なり、ただし、該改変体は、該アミノ酸残基の15%以下が該成熟形態のアミノ酸配列と異なっている、改変体；

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟型のアミノ酸配列とは異なり、ただし、該改変体は、アミノ酸残基の15%以下が該アミノ酸配列と異なっている、改変体；

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの少なくとも一部分または該ポリペプチドの改変体をコードする核酸フラグメントであって、ここで、該改変体における1つ以上のアミノ酸残基が、該成熟形態のアミノ酸配列とは異なっており、ただし、該改変体は、アミノ酸残基の15%以下が、該アミノ酸配列と異なっている、核酸フラグメント；ならびに

(f) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)の相補体を含む、核酸分子、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項6】 前記核酸分子が、天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項7】 前記核酸分子が、天然に存在するポリペプチド改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項8】 前記核酸分子が、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19からなる群より選択された核酸配列とは、単一ヌクレオチドが異なる、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項9】 請求項5に記載の核酸分子であって、前記核酸分子が、以下：

(a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19からなる群より選択されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19からなる群より選択されるヌクレオチド配列とは1つ以上のヌクレオチドが、異なっているヌクレオチド配列であって、ただし、該ヌクレオチドの20%以下が該ヌクレオチド配列とは異なる、ヌクレオチド配列；

(c) (a)の核酸フラグメント；ならびに

(d) (b)の核酸フラグメント、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項10】 前記核酸分子が、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19からなる群より選択されるヌクレオチド配列、または該ヌクレオチド配列の相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項11】 請求項5に記載の核酸分子であって、該核酸分子が、以下：

(a) 第一のヌクレオチド配列であって、前記アミノ酸配列をコードするコード配列とは、1つ以上のヌクレオチド配列が異なるコード配列を含み、ただし、該第一のヌクレオチド配列におけるコード配列において、該ヌクレオチドの20%以下が、該コード配列とは異なっている、第一のヌクレオチド配列；

(b) 該第一のポリヌクレオチドの相補体である単離された第二のポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)の核酸フラグメント、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項12】 請求項11に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項13】 前記核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】 請求項12に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項15】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項16】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】 サンプルにおける請求項1に記載のポリペプチドの存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルを、該ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体と接触させる工程；および

(c) 該ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定する工程、を包含し、それによって、該サンプルにおけるポリペプチドの存在または量を決定する、方法。

【請求項19】 サンプルにおける請求項5に記載の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルを、該核酸分子に結合するプローブと接触させる工程；および

(c) 該核酸分子に結合した該プローブの存在または量を決定する工程、を包含し、それによって、該サンプルにおける該核酸分子の存在または量を決定する、方法。

【請求項20】 前記核酸分子の存在または量が、細胞または組織の型に関するマーカーとして用いられる、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記細胞または組織の型が、癌性である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する因子を同定する

方法であって、該方法は、以下：

(a) 該ポリペプチドを該因子と接触させる工程；および

(b) 該因子が該ポリペプチドに結合するか否かを決定する工程、

を包含する方法。

【請求項23】 前記因子が細胞レポーターまたは下流のエフェクターである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 請求項1に記載のポリペプチドの発現または活性を調節する因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該ポリペプチドを発現する細胞を提供する工程；

(b) 該細胞と該因子とを接触させる工程；および

(c) 該因子が、該ポリペプチドの発現または活性を調節するか否かを決定する工程、

を包含し、それによって、該ペプチドの発現または活性における変化は、該因子が該ポリペプチドの発現または活性を調節することを示す、方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、該ポリペプチドの活性を調節するに十分な量で、請求項1に記載のポリペプチドを発現する細胞サンプルと、該ポリペプチドに結合する化合物とを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項26】 AMFX関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該AMFX関連障害を処置または予防するに十分な量で、請求項1に記載のポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項27】 請求項26に記載の方法であって、前記障害が、以下：細胞シグナルプロセッシング、細胞接着、または移動経路調節に関連する障害、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌および軟部組織の癌、細胞の形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、血管形成、有機性アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖

の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、および外因性刺激に対する細胞応答、ならびに他の疾患、障害および条件など、からなる群より選択される、方法。

【請求項28】 前記障害が、細胞シグナルプロセッシングおよび代謝経路調節に関する、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記被験体がヒトである、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 AMFX関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該AMFX関連障害を処置または予防するに十分な量で、請求項5に記載の核酸を投与する工程を包含する、方法。

【請求項31】 請求項30に記載の方法であって、前記障害が、以下：細胞シグナルプロセッシング、細胞接着、または移動経路調節に関連する障害、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌および軟部組織の癌、細胞の形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、血管形成、有機性アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、および外因性刺激に対する細胞応答、ならびに他の疾患、障害および条件など、からなる群より選択される、方法。

【請求項32】 前記障害が、細胞シグナルプロセッシングおよび代謝経路調節に関する、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 前記被験体がヒトである、請求項30に記載の方法。

【請求項34】 AMFX関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該AMFX関連障害を処置または予防するに十分な量で、請求項15に記載の抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項35】 請求項34に記載の方法であって、前記障害が、以下：細胞シグナルプロセッシング、細胞接着、または移動経路調節に関連する障害、化学

物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌および軟部組織の癌、細胞の形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、血管形成、有機性アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、および外因性刺激に対する細胞応答、ならびに他の疾患、障害および条件など、からなる群より選択される、方法。

【請求項36】 前記障害が、細胞シグナルプロセッシングおよび代謝経路調節に関する、請求項34に記載の方法。

【請求項37】 前記被験体がヒトである、請求項34に記載の方法。

【請求項38】 請求項1に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項39】 請求項5に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項40】 請求項15に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項41】 請求項38に記載の薬学的組成物を1つ以上の容器に含む、キット。

【請求項42】 請求項39に記載の薬学的組成物を1つ以上の容器に含む、キット。

【請求項43】 請求項40に記載の薬学的組成物を1つ以上の容器に含む、キット。

【請求項44】 第一の哺乳動物被験体において、請求項1に記載のポリペプチドの変化したレベルに関連する疾患の存在または該疾患に対する素因を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該第一の哺乳動物被験体由来のサンプルにおいて該ポリペプチドの発現のレベルを測定する工程；および

(b) 工程(a)の該サンプルにおける該ポリペプチドの量を、第二の哺乳動

物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、該第二の哺乳動物被験体は、該疾患を有さないか、または該疾患に対する素因がないことが知られている、工程；

を包含し、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第一の被験体における該ポリペプチドの発現レベルの変化が、該疾患の存在または該疾患に対する素因を示す、方法。

【請求項45】 前記素因が癌に対するものである、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 第一の哺乳動物被験体において、請求項5に記載の核酸分子の変化したレベルに関連した疾患の存在または該疾患に対する素因を決定する方法であって、該方法は、以下：

a) 該第一の哺乳動物被験体由来のサンプルにおいて該核酸の量を測定する工程；および

b) 工程(a)の該サンプルにおける該核酸の量を、第二の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程であって、該第二の哺乳動物被験体は、該疾患を有さないか、または該疾患に対する素因がないことが知られている、工程、

を包含し、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第一の被験体における該核酸のレベルの変化が、該疾患の存在または該疾患に対する素因を示す、方法。

【請求項47】 前記素因が癌に対するものである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、該哺乳動物に、該病理学的状態を軽減するに十分な量のポリペプチドを投与する工程を包含し、ここで該ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20のうち少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントである、方法。

【請求項49】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、該哺乳動物に、該病理学的状態を軽減するに十分な量の請求項15に記載の抗体を投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、概して、新規なAMF 1核酸、AMF 2核酸、AMF 3核酸、AMF 4核酸、AMF 5核酸、AMF 6核酸、AMF 7核酸、AMF 8核酸、AMF 9核酸およびAMF 10核酸、ならびにそれらにコードされるポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、新規なポリペプチドをコードする核酸、ならびにこれらの核酸およびポリペプチドを生成するためのベクター、宿主細胞、抗体、および組換え方法に関する。

【0002】**(背景)**

細胞表面上で発現される分子を介しての細胞間相互作用に根底にある機構が関連する、障害および疾患の診断、予後、および予防処置または治療処置についての必要性が存在する。このような疾患および障害としては、細胞移動、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着もしくは細胞移動経路の調節に関連する疾患および障害が挙げられ、組織再構築、増殖性疾患、癌、腫瘍の浸潤および転移、発生プロセス、結合組織調節、および他の細胞外微小環境(microenviron)の効果が挙げられるが、これらに限定されない。本発明は、この必要性を満たす方法および組成物を提供する。

【0003】**(発明の要旨)**

本発明は、新規なポリペプチドをコードする新規な核酸配列の発見に部分的に基づく。開示されるAMF 1核酸、AMF 2核酸、AMF 3核酸、AMF 4核酸、AMF 5核酸、AMF 6核酸、AMF 7核酸、AMF 8核酸、AMF 9核酸およびAMF 10核酸、ならびにこれらにコードされるポリペプチド、ならびにその誘導體、ホモログ、アナログおよびフラグメントは、本明細書で以後、まとめて、「AMF X」核酸または「AMF X」ポリペプチドと称される。

【0004】

1つの局面において、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、

15、17、および19に開示される核酸に対して同一性を有する核酸配列を含むAMFXポリペプチドをコードする、単離されたAMFX核酸分子を提供する。いくつかの実施形態において、このAMFX核酸分子は、AMFX核酸配列のタンパク質コード配列を含む核酸分子と相補的な核酸配列に対して、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする。本発明はまた、AMFXポリペプチド、またはそのフラグメント、ホモログ、アナログもしくは誘導体をコードする、単離された核酸を包含する。例えば、この核酸は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18および20のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも80%同一である、ポリペプチドをコードし得る。この核酸は、例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19のうちのいずれかの核酸配列を含む、ゲノムDNAフラグメントまたはcDNA分子であり得る。

【0005】

本発明にはまた、オリゴヌクレオチドであり、例えば、AMFX核酸（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19）の少なくとも6個連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、またはそのオリゴヌクレオチドの相補体である。

また、本発明に含まれるのは、実質的に純粋なAMFXポリペプチド（配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18および20）である。特定の実施形態において、このAMFXポリペプチドは、ヒトAMFXポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含む。

【0006】

本発明はまた、AMFXポリペプチド、またはそのフラグメント、ホモログ、アナログ、もしくは誘導体に対して、免疫選択的に結合する抗体を、特徴とする。本発明の1つの実施形態において、抗AMFX抗体は、ポリクローナル抗体である。本発明の別の実施形態において、抗AMFX抗体は、モノクローナル抗体である。本発明の他の実施形態において、抗AMFX抗体は、治療抗体である。

【0007】

別の局面において、本発明は、治療有効量または予防有効量の、治療的および

薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物を包含する。この治療剤は、例えば、AMFX核酸、AMFXポリペプチド、またはAMFXポリペプチドに特異的な抗体であり得る。さらなる局面において、本発明は、1つ以上の容器中に、治療有効量または予防有効量の、この薬学的組成物を含む。

【0008】

さらなる局面において、本発明は、ポリペプチドの生成方法を包含し、その方法は、AMFX核酸を含む細胞を、そのDNAによりコードされるAMFXポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養することによる。所望される場合、このAMFXポリペプチドは、その後回収され得る。

【0009】

別の局面において、本発明は、サンプルにおけるAMFXポリペプチドの存在を検出する方法を包含する。この方法において、サンプルは、そのポリペプチドに選択的に結合する化合物と、そのポリペプチドとその化合物との間の複合体の形成を可能にする条件下で、接触される。この複合体が、存在する場合は検出され、それにより、このサンプル中のこのAMFXポリペプチドが同定される。

【0010】

本発明はまた、特定の細胞型または組織型を、それらによるAMFXの発現に基づいて同定する方法を包含する。

【0011】

本発明にはまた、サンプルにおけるAMFX核酸分子の存在を検出する方法も包含され、この方法は、AMFX核酸プローブまたはAMFX核酸プライマーをそのサンプルと接触させる工程、およびその核酸プローブまたは核酸プライマーがそのサンプル中のAMFX核酸分子に結合しているか否かを検出する工程による。

【0012】

さらなる局面において、本発明は、AMFXポリペプチドの活性を調節する方法を提供し、この方法は、そのAMFXポリペプチドを含む細胞サンプルを、そのポリペプチドの活性を調節するに十分な量の、そのAMFXポリペプチドに結合する化合物と、接触させる工程による。この化合物は、例えば、本明細書中に

さらに記載されるような、低分子（例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、糖質、脂質または他の有機（炭素含有）分子もしくは無機分子）であり得る。

【0013】

また、本発明の範囲内にあるのは、障害または症候群を処置または予防するための医薬の製造における治療剤の使用であり、このような障害または症候群としては、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着または細胞移動経路調節に関する障害が挙げられ、これらとしては、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸部癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、外部刺激に対する細胞性応答が挙げられるが、これらに限定されない。意図される実施形態において、抗AMFXモノクローナル抗体を使用するAMFXポリペプチドの首尾良い標的化は、腫瘍増殖、ならびに他のAMFX関連疾患およびAMFX関連障害に対して阻害効果を有すると予想される。この治療剤は、例えば、AMFX核酸、AMFXポリペプチド、またはAMFX特異的抗体、またはそれらの生物学的に活性な誘導體もしくはフラグメントであり得る。

【0014】

本発明はさらに、障害または症候群の調節因子についてスクリーニングするための方法を包含し、このような障害または症候群としては、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着または細胞移動経路調節に関する障害が挙げられ、これらとしては、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸部癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性

疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、外部刺激に対する細胞性応答が挙げられるが、これらに限定されない。この方法は、AMFXポリペプチドと試験化合物を接触させる工程、およびその試験化合物がそのAMFXポリペプチドに結合するか否かを決定する工程を包含する。このAMFXポリペプチドへのこの試験化合物の結合は、この試験化合物が、上述の障害または症候群の活性の調節因子であるか、または上述の障害または症候群の潜伏もしくはその障害または症候群に対する素因の調節因子であることを示す。1つの実施形態において、この試験化合物は抗AMFX抗体である。

【0015】

また、本発明の範囲内にあるのは、障害もしくは症候群の活性の調節因子、あるいは障害または症候群の潜伏もしくは障害または症候群に対する素因の調節因子についてスクリーニングするための方法であり、この方法は、以下の障害または症候群について危険が増加した試験動物に試験化合物を投与することにより、そしてこの障害または症候群としては、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着または細胞移動経路調節に関する障害が挙げられ、これらとしては、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸部癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、外部刺激に対する細胞性応答が挙げられるが、これらに限定されない。この試験動物は、AMFX核酸によりコードされる組換えポリペプチドを発現する。その後、AMFXポリペプチドの発現または活性が、この試験動物において測定され、同様に、AMFXポリペプチドを組換え発現しそしてこの障害または症候群について危険が増加していない、コントロール動物におけるこのタンパク質の発現または活性も、測定される。ついで、この試験動物およびこのコントロール動物の両方におけるAMFXポリペプチドの発現が、比較される。このコントロール動物に対するこの試験動物におけるAMFXポリペプチドの活性における変化は、この試験化合物が、この

障害または症候群の潜伏の調節因子であることを示す。

【0016】

なお別の局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト被験体）におけるAMFXポリペプチド、AMFX核酸、またはその両方のレベルの変化に関連する疾患の存在、あるいはその疾患に対する素因を決定するための方法を包含する。この方法は、この被験体由来の試験サンプルにおけるAMFXポリペプチドの量を測定する工程、およびこの試験サンプル中のこのポリペプチドの量をコントロールサンプル中に存在するこのAMFXポリペプチドの量と比較する工程を包含する。このコントロールサンプルに対して比較した場合のこの試験サンプル中のこのAMFXポリペプチドのレベルの変化が、その被験体における疾患の存在またはその疾患に対する素因を示す。好ましくは、この素因としては、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着または細胞移動経路調節に関する障害が挙げられ、これらとしては、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸部癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、外部刺激に対する細胞性応答が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明の新規なポリペプチドの発現レベルは、種々の癌についてスクリーニングするため、および癌の段階を決定するための、方法において使用され得る。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、哺乳動物における障害に関連する病理学的状態を、処置または予防する方法を包含し、この方法は、この被験体に、AMFXポリペプチド、AMFX核酸、またはAMFX特異的抗体を、被験体（例えば、ヒト被験体）に、その病理学的状態を軽減または予防するに十分な量で投与する工程による。好ましい実施形態において、この障害としては、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着または細胞移動経路調節に関する障害が挙げられ、例えば、化学物質抵抗性、放射線療法抵抗性、栄養因子制限二次組織部位微小

環境における生存、結合組織障害、組織再構築、腫瘍形成、乳癌、卵巣癌、子宮頸部癌、前立腺癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再構築、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン輸送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖の自己分泌調節および細胞増殖のパラクリン調節、外部刺激に対する細胞性応答が挙げられるが、これらに限定されない。

【0018】

なお別の局面において、本発明は、本発明の細胞性レセプターおよび下流エフェクターを同定するための方法において使用され得、この方法は、当該分野で一般に使用される多数の技術のうちのいずれか1つによる。これらとしては、ツーハイブリッドシステム、アフィニティー精製、抗体または他の特異的相互作用分子との共沈が挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

他のように規定されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるのと類似または等価な方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が、以下に記載される。本明細書中に記載されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献が、その全体が参考として援用される。矛盾する場合、本明細書（定義を含む）が支配する。さらに、この材料、方法、および実施例は、単なる例示に過ぎず、そして限定的であることは意図されない。

【0020】

本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0021】

（詳細な説明）

本発明は、新規なポリペプチドをコードする新規な核酸配列の発見に、部分的に基づく。これらの新規な核酸およびそのコードされるポリペプチドは、個々に、AMF 1、AMF 2、AMF 3、AMF 4、AMF 5、AMF 6、AMF 7、

AMF 8、AMF 9およびAMF 10と呼ばれる。これらの核酸、およびそのコードされるポリペプチドは、本明細書中でまとめて、「AMF X」と称される。

【0022】

本発明の新規なAMF X核酸は、配列が表1 A、2 A、3 A、4 A、5 A、6 A、7 A、8 A、9 A、および10 Aに提供される核酸、またはそのフラグメント、誘導體、アナログ、もしくはホモログを包含する。本発明の新規なAMF Xタンパク質は、配列が、表1 B、2 B、3 B、4 B、5 B、6 B、7 B、8 B、8 A、9 Aおよび10 Aに提供されるタンパク質フラグメントを包含する。個々のAMF X核酸およびAMF Xタンパク質は、以下に記載される。本発明の範囲内にあるのは、細胞シグナルプロセッシング、細胞接着または移動経路調節に関連する障害の処置もしくは予防において、これらの核酸およびペプチドを使用する方法である。

【0023】

(AMF - 1 (登録番号14209510.0.216とも呼ばれる))

新規なAMF 1は、フィブリリン様タンパク質である。このAMF 1クローンは、本明細書中で登録番号14209510.0.216と代替的に呼ばれる。1852ヌクレオチドのAMF 1核酸(配列番号1)が、表1 Aに示される。このAMF 1オープンリーディングフレーム(「ORF」)は、ヌクレオチド208~210で始まる。このAMF 1 ORFは、ヌクレオチド1699~1701のTGAコドンで終わる。1つの実施形態において、このAMF 1ポリペプチドは、C末端フラグメントであり、ここで、このAMF 1 ORFが表1 Aに示されるN末端を超えて伸長すること、すなわち、実線の下線により区別された配列は、後に成熟全長mRNAが形成された場合にスプライシングで排除されるイントロン配列であることが、意図される。別の実施形態において、このAMF 1 ORFは、配列番号1の472位~474位のインフレームのATG開始コドンで始まる。この別の実施形態において、その5'UT配列(実線の下線および破線の下線により区別される)は、このATGまで伸長する。表1 Aに示されるように、推定5'イントロン領域(または、5'非翻訳領域)、および終止コドンに対して3'側の推定非翻訳領域に下線が付され、そしてその推定開始コドン

および終止コドンが、太字で示される。

【0024】

(表1A. AMF1ヌクレオチド配列(配列番号1))

【0025】

【表1A】

NGCATGACTCCCGAGAAGGTGAGCCCTCACCCACATGCTAAGAGCCCTTCTGGGCCACCCAGATCCATCTCCGC
ACTGCTGGGCTCTCTGAGTTTCAGGCTCCCCCTGAGAGCCTGGGTGGCCCTGGACCCTGCCAGCCTGGGGCTTGGG
CTTTGTCCCTTGGGGCTTGAGTGTGGCCAGGGCTCTGGCGATTGTGTGGTGACAGAAGCCATGCTGCAACGC
CTGCCATCCGCAGACGTGAATGAGTGTGCAGAGAACCCTGGCGTCTGCACATAACGGCGTCTGTCTCACACCGATG
GATCCTTCCGCTGTGAGTGTCCCTTTGGCTACAGCCTGGACTTCACITGGCATCAACTGTGTGGACACAGACGAGTG
CTCTGTGGCCACCCCTGTGGGCAAGGGAATGCACCAATGTTCATCGGAGGCTTCGAATGTGCCTGTGCTGACGGC
TTTGAAGCTGGCCTCATGATGACCTGCGAGGACATCGACGAATGCTCCCTGAACCCGCTGCTCTGTGCCTCCGCT
GCCCAATACCGAGGGCTCCTACCTGTGCACCTGTCCAGCCGGCTACACCCCTGCGGGAGGACGGGGCCATGTGTG
AGATGTGGACGAGTGTGCAGATGGTCAGCAGACTGCCACGCCCGGGCATGGAGTGAAGAACCCTCATCGGTACC
TTCCGCTGCGCTCTGTCCCCGAGGCATGCGGCCCTGCTGGCTCTGGGGAGGGCTGCACAGATGACAAATGAATGCC
ACGCTCAGCCTGACCTCTGTGTCAACGGCCGCTGTGTCAACACCCGCGGCAGCTTCCGGTGCAGCTGTGATGAGGG
ATTCCAGCCAGCCCCACCCCTTACCGAGTGCACGACATCCGGCAGGGCCCTGCTTTGCGAGGTGCTGCAGACC
ATGTGCCGCTCTCTGTCCAGCAGCAGTGAAGCTGTCCAGGGCCGAGTGTCTGTGTGGGGTGGCCCGGGCTGGG
GGCCCGCTGCGAGCTCTGTCCCTGCCCCGACCTCTGCTTACAGGAAGCTGTGCCCCCATGGCTCAGGCTACAC
TGCTGAGGGCCGAGATGTAGATGAATGCCGTATGCTGTCTCACCTGTGTGCTCATGGGGAGTGCATCAACAGCCTT
GGCTCCTTCCGCTGCCACTGTACGGCCGGTACACACCGGATGCTACTGCTACTACCTGCCTGGATATGGATGAGT
GCAGCCAGTCCCCAAAGCCATGTACCTTCCCTCTGCAAAAACCGAAGGGCAGTTTCCCTGTGCAGCTGTCCCGAGG
CTACCTGCTGGAGGAGGATGGCAGGACCTGCAAGACCTGGACGAATGCACCTCCCGGCAGCACAACTGTCAAGTTC
CTCTGTGCAACACTGTGGGCGCCTTACCTGCCGCTGTCCACCCGGCTTCAACCAGCACCCAGGCTGCTTCG
ACAATGATGAGTGTCTCAGCCAGCCTGGCCCATGTGGTGCCACGGGCACTGCCACAACACCCCGGGCAGCTTCCG
CTGTGAATGCCACCAAGGCTTACCCCTGGTTCAGCTCAGGCCATGGCTGTGAAGATGTGAATGAATGTGATGGGCCC
CACCGTCCAGCATGGCTGTCAAGACAGCTAGGGGGCTACCGCTCAGCTGCCCCAGGGTTTACCCAGCACT
CCCAGTGGGCCCACTGTGTGGGTGAGTGAAGAAGGGCTGGGAAGAGGCTGGGGCCCTCCACAGATCTGCTCAGAGC
AGGCGCTACAGAGCCACCCCTGCAGATGATGTGACAAGCACAAATATCTAAAGATTGAACAGGGCCAGCCAGA
AGATGAGATGAGTGTGCCCTGTGCCCC

その497アミノ酸AMF1タンパク質(配列番号2)が、表1Bに示される。別の実施形態において、このAMF1 ORFは、配列番号2の89位のメチオニンをコードする、インフレームの最初のATGで始まり、このメチオニンは、表1Bにおいて太字および下線で示される。

【0026】

(表1B. AMF1アミノ酸配列(配列番号2))

【0027】

【表1B】

QKPLQRLPSADVNECAENPGVCTINGVCVNTDGSFRCECPFGYSLDFTGINCVDTECSVGHPCGQGTCTNVIIGF
 ECACADGFEPGLMTCEDIDECSLNPLLCAFRCHNTEGSYLCTCPAGYTLREDGAMCRDVDECADGQDDCHARGME
 CKNLIGTFACVCPFGMRFLPGSGEGCTDDNECHAQPDLCVNGRCVNTAGSFRCDCEGFQPSPTLLECHDIRQGPC
 PAEVLQTMCRSLSSSEAVTRARCCCGGGRGWGPRCELCPPLPGTSAYRKLCPFGSGYTAEGRDVDECRMLAELCAH
 GXCINSLGSRFRCHCOAGYTPDATATTCLDMDECSQVFKPCTFLCKNTKGSFLCSCPFGYLLBEDGRTCKDLDECTS
 RQHNCOFLCVNTVGAFTCRCPFGFTQHEQAACFDNDECSAQFGPCGAHGHCHNTPGSFRCECHQGFLLVSSGHGCE
 VNECDGPERCQEGCQNLGGYRCSCPQGFQHSQWAQCVGE

公の核酸配列データベースの分析において、例えば、このAMF 1核酸配列が、表1Cに示されるMus musculusフィブリリン2 (fbn2) 遺伝子の完全cds (GenBank登録番号L39790) (配列番号61)と238塩基のうち194塩基(81%)が同一である238塩基のフラグメントと、197塩基のうち156塩基(79%)が同一である197塩基のフラグメントとを有することが、見出された。本明細書中のすべてのBLASTアライメントにおいて、「E-Value」または「Expect」値は、整列された配列が、検索されたデータベースにおいて、BLAST問い合わせ配列に対するその類似性を偶然のみで達成し得た確率の数的指標である。例えば、表1Cにおいて示されるように、AMF 1 BLAST分析から検索された対象(「Subject」)、この場合はMus musculusフィブリリン2 (fbn2) 遺伝子の完全cdsが、問い合わせAMF 1配列と全く偶然に一致した確率が、第1のフラグメントについて 9×10^{-26} 分の1(すなわち、確率 9×10^{-26})であり、第2のフラグメントについて 7×10^{-8} 分の1である。

【0028】

(表1C: Mus fbn2 (配列番号61および62)に対するAMF 1のBLAST)

【0029】

【表1C】

```

>MUSFBN2 L39790 Mus musculus fibrillin 2 (fbn2) gene, complete cds. 8/1995
Length = 9859, Strand = Plus / Plus
Score = 125 bits (63), Expect = 9e-26
Identities = 194/238 (81%)
Sbjct: nucleotides 6542-6779 (SEQ ID NO:61)

Query: 293 tcaacaccgatggatccttcggtgtgagtgtecccttggctacagcctggacttcactg 352
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 6542 tcaacactgatggatccttcggtgtgagtgtecccttggctacacacctggattacactg 6601

Query: 353 gcatcaactgtgtggacacagacgagtgctctgtcggccaccctgtgggcaaggacat 412
      |  ||  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 6602 gagtccggtgtgtggacactgacgagtgctccatcggcaaccctgtgggcaaggacat 6661

Query: 413 gcaccaatgtcaccgaggcttcgaatgtgctgtgacggctttgagcctggcctca 472
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 6662 gcaccaactgtcaccggtgttcgaatgtcactgtcaaccgaaggctttgagccggggccca 6721

Query: 473 tgatgacctgagggacatcgagaatgctccctgaaccgctgctctgtgcttccg 530
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 6722 tgatgaactgagaagacatcaacgagtggtcccagaaccgctgctctgtgcttccg 6779

Strand = Plus / Plus
Score = 65.9 bits (33), Expect = 7e-08
Identities = 156/197 (79%)
Sbjct: nucleotides 7477-7673 (SEQ ID NO:62)

Query: 1231 aagccatgtaccctcctctgtcaaaaacagcaagggcagtttccctgtgcagctgtcccccga 1290
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 7477 aagccatgcaacttcctctgtcagaacacccaagggcagttaccagtgctcctgccccagc 7536

Query: 1291 ggctacctgctggaggaggatggcaggacctgcaagaacctggagcaatgcacctccccg 1350
      || ||| ||| ||||| ||||| || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 7537 gggtacgtcctgagggaggacggaaagacgtgcaagaacctgagcaatgtcacaacccaa 7596

Query: 1351 cagcacaactgtcagttcctctgtgtcaaacactgtggggccttcaactgcgctgtcca 1410
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 7597 cagcacaactgcagttcctctgtgtcaaacacctgggggattcaactgtaaatgtccg 7656

Query: 1411 cccggcttccccagca 1427
      ||||| ||||| |||||
Sbjct: 7657 cccggcttccccagca 7673 (SEQ ID NO:62)

```

さらに、このAMF1核酸配列は、表1bにおけるBLASTNの結果に示されるように他の核酸に対して強い相同性を有する。

【0030】

(表1D. AMF1のBLASTNアライメントデータ)

【0031】

【表1D】

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
MUSFBN2 L39790 Mus musculus fibrillin 2 (fbn2) gene, complet...	125	9e-26
MMU20217 U20217 Mus musculus fibrillin-2 mRNA, partial cds....	115	9e-23
HUMFIBRLLN L13923 Homo sapiens fibrillin mRNA, complete cds....	72	1e-09
HSFIBRMR X63556 H.sapiens mRNA for fibrillin. 2/1997	72	1e-09
AF187554 AF187554 Homo sapiens sperm antigen-16 mRNA, comple...	72	1e-09
AF135060 AF135060 Rattus norvegicus fibrillin-2 mRNA, comple...	66	7e-08
AF073800 AF073800 Sus scrofa fibrillin-1 precursor (FBN1) mR...	58	2e-05
AF135059 AF135059 Rattus norvegicus fibrillin-1 mRNA, comple...	56	7e-05

BLAST検索を、公のタンパク質データベースに対して実施した。表1Eに

示されるように、このAMF 1タンパク質は、492アミノ酸残基長のHomo sapiens膜貫通プロテアーゼ、セリン2(ec 3.4.21.-.) (配列番号63)と、349アミノ酸残基中同一な137残基(39%)および349アミノ酸残基中ポジティブな200残基(57%)を有する。

【0032】

(表1E.TMS2(配列番号63)に対するAMF1のBLASTP)

【0033】

【表1E】

```

TMS2_HUMAN homo sapiens transmembrane protease, serine 2 (ec 3.4.21.-). 7/1998
Length = 492
Score = 266.0, bits (573.0), Expect = 1e-70
Identities = 137/349 (39%), Positives = 200/349, (57%)

Query: 1 CVRFDWDKSLKLIYSGSSHQWLPICSSNWNDSYSEKTCQQLGPFESAHRTEVAHRDFANS 60
||| +|+| | |+| +|+| | +|+|+| +|+| | +|
Sbjct: 148 CVRLYGNFLLQMYSSQRKSWHPVCDDWNNENYGRAACRDMGYKNNFYSSQGIWDD-SGS 206

Query: 61 FSILRYNST-----IQESLHRSE-CFSQRYISLQCSHCGLR---AMTGRIVGGALASDSK 111
| ++ |++ | + | + | | + +|+| ||+ + |||| |
Sbjct: 207 TSFMKLNTSAGKVDIYKLLYHSDACSSKAVVSLRCLACGVNLSRQSRIVGGESALFGA 266

Query: 112 WFWQVSLHFGTTEICGGTLIDAQWVLTAAHCFFVTREKVLG---WKVYAGTSLNLHLQPE 168
||||||| | +|+|+| +|+|+|+| || | | +| +
Sbjct: 257 WFWQVSLHFGVQNVHVCGGSIITPEWIVTAAHCV---EKFLNHPWHWTAFAGILRQSPMFY 322

Query: 169 AAS--IAKILINSNYTDEEDDYDIALMRLSKPLTLAHTHPACLPMHSGQTFSLNETCWIT 226
| + ++| + || + + |||||+| |||| + + | || | + ||+
Sbjct: 323 GAGYQVQKVLSPNYDSKTKNDIALMKLQKPLTFEDLVKPVCLPMPGMLLQPEQLCWIS 382

Query: 227 GFGKRETDOKTSPFLREVOVNLIDFKKQNDYLVYDSYLTFRMCMCAGDLRGGDRDSCQGD 286
|+| | | || | +| | + ++| | | + +| | +| | +| | | | |
Sbjct: 383 GWGATEKKG-KTSEVLNAAKVLIIETQRCSRYVYDNLITPAMICAGFLQGVVDSQGD 441

Query: 287 GGFLVCEQNNRWYLAGVTSNGTGGQQRNKPQVYTKVTEVLPWIYSKES 335
|||| | | |+| | |||+| + +|+| | ||| +|+|
Sbjct: 442 GGFLVTSNNNIWVLIQDTSWGGSCAKAYRPGVYGNVVMVFEDWIYRQMEA 490 (SEQ ID
NO:63)

```

AMF 1はまた、表1FにおけるBLASTPアライメントデータに示されるように多数の他のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。

【0034】

(表1F.AMF1についてのBLASTP分析の結果)

【0035】

【表1F】

Matching Entry (in SwissProt + SpTrEMBL)	Begin- End	Description	Score	E Value
TMS2_HUMAN	[1-335]	TRANSMEMBRANE PROTEASE, SERINE 2 (EC 3.4.21.-).	266.0	1e-70
HEPS_HUMAN	[11-335]	SERINE PROTEASE HEP SIN (EC 3.4.21.-) (TRANSMEMBRANE PROTEASE, SERINE1).	232.0	2e-60
HEPS_MOUSE	[9-335]	SERINE PROTEASE HEP SIN (EC 3.4.21.-).	230.0	1e-59
HEPS_RAT	[9-340]	SERINE PROTEASE HEP SIN (EC 3.4.21.-).	224.0	8e-58
KAL_HUMAN	[90-335]	PLASMA KALLIKREIN PRECURSOR (EC 3.4.21.34) (PLASMA PREKALLIKREIN)(KININOGENIN) (FLETCHER FACTOR).	219.0	2e-56
KAL_MOUSE	[97-335]	PLASMA KALLIKREIN PRECURSOR (EC 3.4.21.34) (PLASMA PREKALLIKREIN)(KININOGENIN) (FLETCHER FACTOR).	215.0	3e-55
KAL_RAT	[87-335]	PLASMA KALLIKREIN PRECURSOR (EC 3.4.21.34) (PLASMA PREKALLIKREIN)(KININOGENIN) (FLETCHER FACTOR).	213.0	2e-54
O95518	[92-329]	DJ1170K4.2 (NOVEL TRYPSIN FAMILY PROTEIN WITH CLASS A LDL RECEPTOR DOMAINS) (FRAGMENT).	213.0	2e-54
O97506	[90-336]	ALLIKREIN.	204.0	6e-52

AMF1ならびに他のAMFXタンパク質における同定可能なドメインの存在は、ソフトウェアアルゴリズム(例えば、PROSITE、DOMAIN、Blocks、Pfam、ProDomain、およびPrints)を使用する検索によって、およびその後、そのドメインの一致(または数)をInterproウェブサイト(<http://www.ebi.ac.uk/interpro>)を使用して交差することによりInterpro数を決定することによって、決定され得る。その後、DOMAIN結果が、Reverse Position Specific BLAST分析を用いてConserved Domain Database(CDD)から収集され得る。このBLAST分析ソフトウェアは、SmartおよびPfamのコレクションにおいて見出されたドメインをサンプリングする。

【0036】

AMFX RNAについての発現情報は、組織供給源を使用して誘導した。この供給源としては、実施例において記載されるような、占有データベース供給源、公のEST供給源、文献供給源、および/またはRACE供給源が、挙げられるが、これらに限定されない。AMF1は、少なくとも以下の組織において発現される：結腸癌由来細胞株、胃癌由来細胞株および卵巣癌由来細胞株。AMF1は、腫瘍胎児性表現型を示す胎児腎臓および肺においてもまた、強力に発現され

る。

【0037】

AMF 1の核酸およびタンパク質は、種々のAMF関連病態および/または障害に関連する可能な治療適用において有用である。例えば、フィブリリン様タンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療に有用であり得、そしてフィブリリン様タンパク質は、それを必要とする被験体に投与された場合に有用であり得る。AMF 1タンパク質またはそのフラグメントをコードする新規な核酸は、診断適用においてさらに有用であり得、ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される。これらの材料は、治療方法または診断方法における使用のための、本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0038】

AMF X核酸およびタンパク質は、以下に記載の種々の疾患および障害ならびに/または他の病態に関連する可能な診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、結腸癌、胃癌および卵巣癌、ならびに他の疾患、障害および状態などに罹患している患者の処置に対する効力を有する。非限定的な例として、本発明の組成物は、結腸癌、胃癌および卵巣癌に罹患している患者の処置に対する効力を有する。さらなるAMF関連疾患および障害は、本明細書中を通して記載される。

【0039】

さらに、AMF 1についてのタンパク質類似性の情報、発現パターンおよびマップ位置は、AMF 1が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的および/または生理学的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、可能な診断適用および治療適用において、ならびに研究ツールとして有用である。これらには、特異的または選択的な核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとしての作用(ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される)、ならびに以下のような可能な治療適用が挙げられる:(i)タンパク質治療剤、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞傷害性抗体)、(iv)遺伝子治療

(遺伝子送達/遺伝子除去)において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボで組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的防御武器(biological defense weapon)。

【0040】

これらの材料は、治療方法または診断方法における使用のための、新規AMF1物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらの抗体は、以下の「抗AMFX抗体」の節に記載されるような、疎水性チャートからの予測を使用して、当該分野で公知の方法に従って生成され得る。種々の実施形態において、考えられるAMF1エピトープは、疎水性プロットまたは親水性プロットを生成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによって予測されるような、AMF1ポリペプチドの親水性領域である。

【0041】

(AMF-2(登録番号20421338とも呼ばれる))

新規AMF2は、ネフリン(nephrin)様タンパク質である。このAMF2クローンはまた、本明細書中で登録番号20421338と呼ばれる。379ヌクレオチドのAMF2核酸(配列番号3)を、表2Aに示す。1つの実施形態において、このAMF2構築物は、より長い遺伝子の内部フラグメントであり、このORFは、表2Aおよび2Bに示されるN末端およびC末端を超えて伸長すると考えられる。表2Aに示されるように、第1位で開始する最初のコードトリプレットを、太字で示す。

【0042】

表2A. AMF2ヌクレオチド配列(配列番号3)

【0043】

【表2A】

```
GGAGGGCCCTGTGATTCTACTGCGAGGCAGGCACCCCCACAACCTCACATGCCGGGCGCTTCATGCGAAGCCCTGCTG
CCACCATCATCTGGTTCGGGACGGGACGCGAGCAGGAGGGCGCTGTGGCCAGCACGGAATTGCTGAAGGATGGGAA
GAGGGGAGACCACCGTGGAGCCACTGCTTATTAACCCACGGACCTGGACATAGGGCGTGTCTTCACTTGCCGAAGC
ATGAACGAAGCCATCCCTAGTGGCAAGGAGACTTCCATCGAGCTGGATGTGCACCCACCTCCTACAGTGACCCTGT
CCATTGAGCCACAGACGGGGCAGGAGGGTGAGCGTGTGTCTTTACCTGCCAGGCCACAGCCACCCCGAGATCT
```

126アミノ酸(配列番号4)のコードされるAMF2タンパク質(配列番号

4) を、表2Bに示す。

【0044】

表2B. AMF2アミノ酸配列(配列番号4)

【0045】

【表2B】

```
GGFVILLQAGTIPHNLTGAFNAKPAATIIWFRDGTQQEGAVASTEELKDKRETTVQQLLINPTOLDIGRVPTCRS
MNEAIPSGKETSIELDVHFPFTVTLSELPQTGQGERVVFTCOATANPEI
```

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF2核酸配列は、表2Cに示されるように、神経細胞接着分子1、大アイソフォーム前駆体(Neural Cell Adhesion Molecule 1, Large Isoform Precursor)に弱く類似する、Homo sapiens cDNA FLJ12646 fis、クローンNT2RM4001987(GenBank登録番号AK022708)(配列番号64)に対する163塩基中162塩基(99%)の同一性を有することが見出された。

【0046】

表2C. NT2RM4001987(配列番号64)に対するAMF2のBLASTNアライメント

【0047】

【表2C】

```
>AK022708 AK022708 Homo sapiens cDNA FLJ12646 fis, clone NT2RM4001987, weakly
similar to NEURAL CELL ADHESION MOLECULE 1, LARGE ISOFORM PRECURSOR. 9/2000 Length
= 2656
```

```
Score = 315 bits (159), Expect = 9e-84
```

```
Identities = 162/163 (99%)
```

```
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 217 acttgccgaagcatgaacgaagccatccctagtggcaaggagacttccatcgagctggat 276
|||||
```

```
Sbjct: 1 acttgccgaagcatgaacgaagccatccctagtggcaaggagacttccatcgagctggat 60
```

```
Query: 277 gtgcaccaccctcctacagtgaccctgtccattgagccacagacggggcaggagggtgag 336
|||||
```

```
Sbjct: 61 gtgcaccaccctcctacagtgaccctgtccattgagccacagacgggtgaggagggtgag 120
```

```
Query: 337 cgtggttgcttttacctgccaggccacagccaaccccgagatct 379
|||||
```

```
Sbjct: 121 cgtggttgcttttacctgccaggccacagccaaccccgagatct 163 (SEQ ID NO:64)
```

BLASTP検索を、公的なタンパク質データベースに対して行った。表2Dに示されるように、AMF2タンパク質は、1011アミノ酸残基長の*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)ニューロムスクリン(*neuromusculin*) (登録番号Q24273) (配列番号65)に対する、120アミノ酸残基中36アミノ酸残基(30%)の同一性を有し、そして120残基中54残基(45%)の陽性を有する。

【0048】

表2D. ニューロムスクリン (配列番号65) に対するAMF2のBLASTP

【0049】

【表2D】

```
>Q24273 Q24273 drosophila melanogaster (fruit fly). neuromusculin. 5/1999
      Length = 1011
      Score = 55.8 bits (132), Expect = 9e-08
      Identities = 36/120 (30%), Positives = 54/120 (45%), Gaps = 10/120 (8%)

Query: 15  LTCRAFNAKPAATLIWFR-----DGTQQEGAVASTELLKDGKRETVSQLLINPTDLDI 68
      |||  |+|  + |+      +  ||  ||  | |+|+ ||  +
Sbjct: 282  LTCDIHGARPAVNLTWYNTTTIISSENEITEVRSKSLKSDGTFHTQSELIFNATEFEN 341

Query: 69  GEVFTCRSMNEAIPSGKE----TSIELDVHPPPTVTLSEIPQTGQEGERVVFTCCATANP 124
      |||  |+  +  +  +  +++ |+| +||  |+  |  |+  |+  |||
Sbjct: 342  DRVFECEARNIVLQINREKPISSALTLVLYPPVVVKVSPSAITANTSEIVLLNCEYFANP 401
```

AMF2はまた、862アミノ酸のタンパク質*Mus musculus* (マウス) B細胞レセプターCD22前駆体(*leu-14*) (Bリンパ球細胞接着分子) (*bl-cam*) (登録番号P35329) (配列番号66)に対する高い相同性(114アミノ酸中30アミノ酸(26%)の同一性および114アミノ酸中59アミノ酸(51%)の陽性)を有する(表2E)。

【0050】

表2E. CD22 (配列番号66) に対するAMF2のBLASTP

【0051】

【表2E】

```

>CD22_MOUSE P35329 mus musculus (mouse). b-cell receptor cd22 precursor (lau-14) (b-
lymphocyte cell adhesion molecule) (bl-cam).
7/1999
Length = 862
Score = 51.5 bits (121), Expect = 2e-06
Identities = 30/114 (26%), Positives = 59/114 (51%), Gaps = 13/114 (11%)

Query: 15 LTCRAFNAKP---AATIIFERDGTQQEGAVASTELLKDGKRETTVSQLLINPTDLDIGRV 71
      +||| ++ | + ||+| | ++ ++| +|+|+++ |+
Sbjct: 270 MTCRVNSSNPKLRITVAVSWFKDGRPLED-----QELEQQQMEKLLILHSVTKDMRGK 321

Query: 72 FTCRSMNEAIPSGKETSIELDVHHPPTVT-LSIEPQTGQEGERVVFTCQATANP 124
      + |++ |+ | |+ +|| ||+ | + + | | +||+ | |++ |+|
Sbjct: 322 YRCQASNDIGP-GESEEVELTVHYAPEPSRVHIYPSPEEGQSVELICESLASP 374

```

AMF 2はまた、表2 FのBLASTPアライメントデータに示される他のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。

【0052】

表2 F . AMF 2のBLASTPアライメント

【0053】

【表2 F】

BLASTP		Score	E
Sequences producing significant alignments:		(bits)	Value
Q24273	Q24273 drosophila melanogaster (fruit fly). neuromusc...	56	9e-08
CD22_MOUSE	P35329 mus musculus (mouse). b-cell receptor cd22...	52	2e-06
O97174	O97174 drosophila melanogaster (fruit fly). eg163a10...	50	5e-06
Q922H8	Q922H8 mus musculus (mouse). immunosuperfamily protei...	49	1e-05

AMF 1、ならびに他の全てのAMF Xタンパク質における識別可能なドメインの存在は、ソフトウェアアルゴリズム(例えば、PROSITE、DOMAIN、Blocks、Pfam、ProDomainおよびPrints)を使用する検索、次いでInterproウェブサイト(<http://www.ebi.ac.uk/interpro>)を使用してドメイン適合(または数)をクロスする(crossing)ことによるInterpro数の決定によって、決定され得る。次いで、DOMAINの結果を、Reverse Position Specific BLAST分析を用いてConserved Domain Database(CDD)から収集し得る。このBLAST分析ソフトウェアは、SmartおよびPfamコレクションに見出されるドメインをサンブ

ルする。

【0054】

AMF2 RNAの発現情報は、実施例に記載されるように、組織供給源（専有のデータベース供給源、公的なEST供給源、文献供給源、および/またはRACE供給源を含むが、これらに限定されない）を使用して導き出され得た。AMF2は、少なくとも以下の組織において発現される：胎児腎臓、腎細胞癌から誘導されるいくつかの細胞株。これはまた、脳腫瘍および黒色腫由来細胞株において上方制御される。

【0055】

AMF1の核酸およびタンパク質は、種々のAMF関連病態および/または障害に関連する可能な治療適用において有用である。例えば、ネフリン様タンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療に有用であり得、そしてネフリン様タンパク質は、それを必要とする被験体に投与された場合に有用であり得る。AMF2タンパク質またはそのフラグメントをコードする新規な核酸は、診断適用においてさらに有用であり得、ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される。これらの材料は、治療方法または診断方法における使用のための、本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0056】

AMF2核酸およびタンパク質は、以下に記載の種々の疾患および障害ならびに/または他の病態に関連する可能な診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、腎細胞癌、脳腫瘍、黒色腫、Finnish型の先天性の腎炎症候群、ならびに他の疾患、障害および状態などに罹患している患者の処置に対する効力を有する。非限定的な例として、本発明の組成物は、腎細胞癌、脳腫瘍、黒色腫、Finnish型の先天性の腎炎症候群に罹患している患者の処置に対する効力を有する。さらなるAMF2関連疾患および障害は、本明細書中を通して記載される。

【0057】

さらに、AMF2についてのタンパク質類似性の情報、発現パターンおよびマ

ップ位置は、AMF 2が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的および/または生理学的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、可能な診断適用および治療適用において、ならびに研究ツールとして有用である。これらには、特異的または選択的な核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとしての作用(ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される)、ならびに以下のような可能な治療適用が挙げられる:(i)タンパク質治療剤、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞傷害性抗体)、(iv)遺伝子治療(遺伝子送達/遺伝子除去)において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボで組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的防御武器(biological defense weapon)。

【0058】

これらの材料は、治療方法または診断方法における使用のための新規AMF 2物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらの抗体は、以下の「抗AMF X抗体」の節に記載されるような、疎水性チャートからの予測を使用して、当該分野で公知の方法に従って生成され得る。種々の実施形態において、考えられるAMF 2エピトープは、疎水性プロットまたは親水性プロットを生成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによって予測されるような、AMF 2ポリペプチドの親水性領域である。

【0059】

(AMF - 3 (登録番号27251385とも呼ばれる))

新規AMF 3は、この遺伝子に関連するフィブリリン様タンパク質である。このAMF 3クローンはまた、本明細書中で登録番号27251385と呼ばれる。3374ヌクレオチドのAMF 3核酸(配列番号5)を、表3Aに示す。AMF 3のオープンリーディングフレーム(「ORF」)は、ヌクレオチド3~5で開始する。このAMF 3 ORFは、ヌクレオチド3357~3359のTAGコドンで終結する。AMF 3は、C末端フラグメントであるようであり、従って、このORFが、その示されるN末端を超えて伸長すると考えられる。表3Aに示されるように、開始コドンの5'側および終止コドンの3'側の推定非翻訳領

域に下線を付し、そして最初のコードトリプレットおよび終止コドンを、太字で示す。

【0060】

表3A . AMF 3ヌクレオチド配列 (配列番号5)

【0061】

【表3A】

```

GCCAGGAGGCAGCTGCCAATGCTGGGCTCCTTCCATTGCCGCTGTCCAGTGGACACCGGCTCAGTGACAG
CAGGCCGCATGTGAAGACTACCGGGCCGGCGCTGCTTCTCAGTGCTTTTCGGGGCCGCTGTGCTGGAGACCTC
GCCGGCCACTACACTCGCAGGCAGTGTCTGTGTGACAGGGCCAGGTGCTGGCCAGCTGGCCCGTCCCTGAGCTGT
GTCCTCCTCGGGGCTCCAATGAATTCCAGCAACTGTGCGCCAGCGGCTGCGGCTGTACCCGGCCACCTTGGCT
CTTCCCTGGCCTCCTGGGCTTCGATCCAATGGCATGGGTCCCTCTTGGGCCAGCGGACTCAACCCCAATGGC
TCTGATGCCGCTGGGATCCCGAGCTGGGCTGGCAACTCTAATATTGGCACTGTACCTGAACCCAGACCATTG
ACATCTCCCGACACTTCAACCACTGTGTCTGAATGGCTGCTGCTGCCCACGCCCTTCCAGCTACCGCTGCGAGTG
TAACGTGGGCTACACCCAGGACGTGCGCGGGCAGTGCAATTGATGTAGACGAATGCACCAGCAGCCCTGCCACCAC
GGTACTGCGCTCAACATCCCGGCACCTACCCTGCGGCTGCTACCCGGGCTTCCAGGCCACGCCCCACAGGCAGG
CATGCGTGGATGTGGACGAGTGCAATGTCAGTGGTGGCTTTGTACCTGGGGCCGCTGTGTCAACACAGAGGGCAG
CTTCCAGTGTGTCTGCAATGCAGGCTTCGAGCTCAGCCCTGACGGCAAGAAGTGTGTGGACCACAACGAGTGTGCC
ACCAGCACCATGTGCGTCAACGGCGTGTGTCTCAACGAGGATGGCAGCTTCTCCTGCTCTGCAACCCGGCTTCC
TGCTGGCGCCTGGCGGCCACTACTGATGGACATGACGAGTGCAGACGCCCGGCATCTGCGTGAACGGCCACTG
TACCAACCCGAGGGCTCCTTCCGCTGCCAGTGCCTGGGGGGCTGGCGGTAGGCACGGAATGGCCGCTGTGCTCA
GACACCACCTGGCCAGCACCTGCTATGGGGCCATCGAGAAGGGCTCCTGTGCCCGCCCTTCCCTGGCACTGTCA
CCAAGTCCGAGTGTCTGCTGTGCCAATCCGGACCAGGTTTTGGGGAGCCCTGCCAGCTTGTCTGCCAAAAGTCT
CGCTGAGTTCAGGCAGTGTGTCAGCAGTGGGCTTGGCATTACCAAGGATGGTCCAGACATCAACGAGTGTGCTCTG
GATCCTGAGGTTTGTGCCAATGGCCTGTGCGGAGAACCTTCGGGGCAGCTACCGCTGTGTCTGCAACCTGGGTTATG
AGGCAGGTGCCTCAGGCAAGGACTGCACAGAGTGGATGAGTGTGCCCTCAACAGCCCTCCTGTGTGACCAACGGTGTG
GTGCCAGAATAGCCCTGGCAGCTACAGCTGCTCCTGCCCGCCCGGCTTCCACTTCTGGCAGGACACCGAATCTGC
AAAGATGTCCAGCAATCCCTGTCAGCCCTGTGTGAGTGGGCTTGTCCGAACTTGGCCGGCTCCTACACCTGCA
AATGTGGCCCTGGCAGCCGCTGACCCCTCTGCTGCTAGACAGCACCAGGGCACCCTGCTGGCTGAA
GATCCAGGAGAGCCGCTGTGAGGTGAACCTTCAGGAGCCAGCCCTGCGGCTGTGAGTGTGTGCCACCTCGGGCA
GCCTGGGGAGCCCTGCGAACGCTGCGAGATCGACCTGCTGTGCCCGGGCTTGGCCCGGATGACGGTGTGCA
CCTCGATGATGTGAACGAGTGTGAGTCTTCCCGGAGTCTGTCCCAACGGCGGTGGCTCAGACTGCTGCTGCT
TTCCGCTGTGAGTGTCCAGAGGCTGATGCTGGACGCCCTCAGGCCGGCTGTGCCGCTGAGATTGGAACCA
TGTTCCTGCGATGGGATGAGGATGAGTGTGGGGTCAACCTGGCTGGCAAGTACCGGATGGACCTGCTGCTGCT
CCATCGGGCCGCTGTGGGAGTGTGAGTGTGGAGGCTGCGCGGATCCCGAGTCTCTGAGTTCGCCAGCCTGTGCC
GCGGGGCTGGCTTCCGACCGCAGGTAACCTGCAGAAACAGGTTGGGCGAGCTTCCACTGCGCCTGTGCCGGGGCTTCG
TTCCCTGGATGCCAGAACCGEACTGCAAGATTCGACGAGTGTGCAATCTCCTGACCTCTGCGGGCAGGGCAC
CTGTGTCAACACGCCGGCAGCTTGTGAGTGGGATGTTTTCCCGGCTACGAGAGTGGCTTCATGCTGATGAAGAAC
TGCATGGAGTGGACGAGTGTGCAAGGGACCCGCTGCTGCTGCGGGGAGGCACTTGCACCACCGGATGGGAGCT
ACAAGTGCAGTGTCCCTGGGCATGAGCTGACGGCCAAGGGCACTGCTGTGAGGACATGATGAGTGTCTCCCT
GAGTGTGAGCCTGTCTCCCATGGCCAGTGTGTCAATGTTCATCGGTGCCCTCCAGTGTCTCTGCCATGCCGGCTTC
CAGAGCACACTGACCCGAGGCTGCGTGGACATCAACGAATGCCGGGTCCAGAAATGGTGGGTGTGACGTGCC
GTATTAACACTGAGGGCAGCTACCGGTGACGCTGTGGGCGAGGCTACTCGCTGATGCCCGACGGAAGGCTACCGG
AGACGTGGACGAGTGTGAAGAGAACCCTCGCTTTGTGACCAGGCCCTGCAACCAATGCCCAGGGGTCACCGG
TGCTGTCTATGATGGCTTCAATGGCCAGCCAGACATGAGGACATGTGTTGATGTGGATGAGTGTGACTGCAACC
CTCACATCTGCCCTCAATGGGGACTGCGAGAACAAGGGTTCCCTTGTCTGCCACTGTGAGCTGGGCTACATGGT
CAGGAGGGGGCCACAGGCTGCTGTGATGTGATGAATGCGAGGTTGGAGGACACAAGTGTGACAGTCAACCGCTCC
TGTCTCAACATCCCGGGAGTTTCACTGTAGGTGCCCTGCCAGGCTGGGTGGGGGATGGCTTCGAATGTACAGACC
TGGATGAATGCGTCTCCAGGAGCACCGGTGACGCCCAAGAGGTGACTGTCTCAATGTCCCTGGCTCCTACCGCTG
CACCTGCCCGAGGGCTTTCCCGGGATGGCTTCTTCTGCGAAGACAGGGATGAATGTGCCGAGAACCCTGGACCTC
TGTGACAACGGGTAATGCTCAATGGCC

```

1118アミノ酸 (配列番号6) のコードされる AMF 3タンパク質 (配列番号6) を、表3Bに示す。

【0062】

表3B. AMF3アミノ酸配列(配列番号6)

【0063】

【表3B】

```

QGGSCVNMVGSFHCRCVGERLSDSSAACEDYRAGACFSVLFGGRCAGDLAGHYTRRQCCDRGRCWAGFVPELC
PRGGSNEFQQLCAQRLPPLPGHPGLFPGLLGFSGNGMGPPLGPARLNEHGS DARGIPSLGPGNSNIGTATLNQTID
ICRHFTNLCLNGRCLPTFSSYRCECNVGYTQDVRGECIDVDECTSSPCHHGDCVNIPTGTYHRCRCYPGFQATPTRQA
CVDVDECIIVSGGLCHLGRVCNTEGSFQCVCNAGFELSFDGKNCVDHNECATSTMVCVNGVCLNEDGFSCLCKPGL
LAFGGHYCMOIDECCQTPGICVNGHCTNTEGSFRCQCLGGLAVGTDGRVCVDTHVRSTCYGAIEKGS CARPFGTVT
KSECCCANPDHGFGEPCQLCPAKNSAEFQALCSSGLGITTDGRDINECALDPEVCANGVCENLRGSYRCVCLGYE
AGASGKDC TDVDECALNSLLCDNGMCQNSPGSYSCSPPGFHFWDTEICKDVDECLSPPCVSGVCRNLGASSTCK
CGPGRILDPSGTFCLDSTKGTWCWLKIQESRCEVNLQGASLRSECCATLGAANGSPCERCEIDPACARGFAAMTGV
CDDVNECESFPVGVCPNGRCVNIAGSFRCECPEGLMLDASGRLCVDVRLPFCFLRWDEDECGVTLPKXRMVCCCS
IGAVNGVECEACPDPESLEFASLCPRLGIFASRDFLSGRPFYKDVNEUKVFPGLCTHGTCTRNVTGSPHCACAGGFA
LDAQERNCTDIDECRISPDLCGQGTCVNTPGSFRCCEFPGYESGFMLMKNCMDVDECARDPILCRGGTCTNIDGSY
KCQCPGHELTAKGTACEDIDECSLSDGLCPHGQCVNVI GAFQCSCHAGFQSTPDRQGCVDINECRVQNGGCDVHR
INTEGSRCS CGQYS LMPDGRACADVDECEBNPRVCDQGHCTNMPGGHRCCLCYDGFMATPDMRTDVDDECLNP
HICLHGDCENTKGSFVCHCQLGYMVAKGATGCSVDVECEVGGHNCDSHASCLNI PGSFSCRCLPGWVGDGFEC HDL
DECVSQEHRCSPRGDCLNVPGSYRCTCRQGFAGDGFCEDRDECAENVDLCDNG

```

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF3核酸配列のフラグメントは、表3Cに示される、Homo sapiens cDNA FLJ20029 fis、クローンADSE02022 (GenBank登録番号AK000036) (配列番号67) に対する134塩基中134塩基(100%)の同一性を有することが見出された。

【0064】

表3C. FLJ20029 (配列番号67) に対するAMF3のBLASTN

【0065】

【表3C】

```

>AK000036 AK000036 Homo sapiens cDNA FLJ20029 fis, clone ADS02022. 1/2000
Length = 1399; Strand = Plus / Plus
Score = 266 bits (134), Expect = 7e-68
Identities = 134/134 (100%)

Query: 2306 cacagatatcgacgagtgctgcatctctcctgacctctgcccagggcacctgtgtaa 2365
      |||
Sbjct: 190 cacagatatcgacgagtgctgcatctctcctgacctctgcccagggcacctgtgtaa 249

Query: 2366 cacgcccggcagctttgagtgcgagtgcttttcccggctacgagagtggtctcatgctgat 2425
      |||
Sbjct: 250 cacgcccggcagctttgagtgcgagtgcttttcccggctacgagagtggtctcatgctgat 309

Query: 2426 gaagaactgcatgg 2439
      |||
Sbjct: 310 gaagaactgcatgg 323

```

さらに、AMF3核酸配列は、表3DのBLASTNアライメントデータに示

されように、他の核酸配列に対して高い相同性を有する。

【0066】

表3D. AMF3のBLASTNアライメント結果

【0067】

【表3D】

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
AK000436	AK000036 Homo sapiens cDNA FLJ20029 fis, clone ADSE...	166	7e-68
AF135060	AF135060 Rattus norvegicus fibrillin-2 mRNA, comple...	125	2e-25
MUSEFN2	L39790 Mus musculus fibrillin 2 (fbn2) gene, complet...	109	1e-20
HSU03272	U03272 Human fibrillin-2 mRNA, complete cds. 5/1994	98	4e-17
HSFIB5	X62009 Homo sapiens partial mRNA for fibrillin 5. 9/1999	98	4e-17
AC025169	AC025169 Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-352M6,...	90	9e-15
AC010461	AC010461 Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2275A5...	90	9e-15

BLASTP検索を、公的なタンパク質データベースに対して行った。表3Eに示されるように、AMF3タンパク質は、2911アミノ酸残基長のHomo sapiens (ヒト)フィブリリン2前駆体(登録番号P35556)(配列番号68)に対する、1178アミノ酸残基中766アミノ酸残基(65%)の同一性を有し、そして1178アミノ酸残基中913アミノ酸残基(77%)の陽性を有する。

【0068】

表3E. FBN2(配列番号68)に対するAMF3のBLASTP

【0069】

【表3E】

```

>F3N2_HUMAN F35556 homo sapiens (human). fibrillin 2 precursor. 11/1997
Length = 2911
Score = 1804 bits (4622), Expect = 0.0
Identities = 766/1178 (65%), Positives = 913/1178 (77%), Gaps = 62/1178 (5%)

Query: 1  CGGSCVNMVGSFHCRCFVGHRLSBSAACE----- 30
      |||+||| ||| ||| ||| |||+|++ ||
Sbjct: 287  CCGVCIWVGSFHCRCFAGHKQSTTTQKCEDIDECSTIPGICETGRCANTVGSYFVCVDR 346
Query: 31  -----DVRAGACFSULFGRCAGLQHYTRGCCDGRCCNNAAGVPELCFP 78
      ||| ||| ||| ||| ||| +| ||| +| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 347  GYVTSIDGSRCIDQRTGMCFSGLVNGRCAGELPGRMTKMQCCCEPGRCCNGICTIPERCPV 406
Query: 79  RGSNEFQQLCAQRLPL--LPCHPLGFLPGLLPQSGKMGFPPLGPARLNPHGSDAGIP--- 133
      ||| |||+||| ||| +|| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| +| |||
Sbjct: 407  RGSERYRLCNDGLFVGGITPSSAGSRPG--GTGGNGFAPSNGNGYOPGGTGFPIFGGN 464
Query: 134  --SLGQENIOT-----ATLNGTIDICRHYTNLCLNGRCLPTFSSYRCCNMGY 181
      ||| ||| +| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 465  GFSYGVGSGVAGGCGPILITGLTILNQYDIDCKEHALCLNGRCIPTVSSYRCCNMGY 524
Query: 182  TDVVRGECIDVDECTSSPCHRGDCUNIPGTHCRCPQGFQATPTROACVVDVDCIVSGL 241
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 525  XQDANGDCIDVDECTSNFCTMGDCVNTFSSYRCCNAGFQRTPTRQACIDIDECINQVL 584
Query: 242  CHLRGCVNMGSTQCVCAGYELSDGHECVDRHECATSTRCVNGVCLNEDGSPFLCKCP 301
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 585  CHNGRCVNSDGSFQCLCAGAPLATTGHECVDRHECATSTRCVNGVCLNEDGSPFLCKCP 644
Query: 302  GFLAPGSHYCHDIDKCGTFCICVNGHCWTEGSEFCQCLGLAVGTDRVCVDIIVRST 361
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 645  GFVLAHNGYCTDVRCTPFCICVNGHCWTEGSEFCQCLGLAVGTDRVCVDIIVRST 704
Query: 362  CYGALTEGSCARFPDGTFTKROCCAMFDHFGEPQQLCAKHSRFPQALCSGGLQITTD 421
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 705  CYGGLEGGVCPVFPDGTFTKROCCAMFDHFGEPQQLCAKHSRFPQALCSGGLQITTD 764
Query: 422  GRDIDECALDFEVCAMGVCEKLSYRVCNLTYSASAGEDCTDVECALNSILLKNGN 481
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 765  GRDIDECALDFEVCAMGVCEKLSYRVCNLTYSASAGEDCTDVECALNSILLKNGN 824
Query: 482  CQNEPQSTSCSPPEHFWQDTEICHDVDECLSSPCVSGVCLAGSYTCRCPGRLDP 541
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 825  CQNEPQSTSCSPPEHFWQDTEICHDVDECLSSPCVSGVCLAGSYTCRCPGRLDP 604
Query: 542  SGTFLDSTGTCWLEKIQSRCEVNLQGANLSECCATLGAANGSPCECELDPAARFY 601
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 885  TGLYCLDSTGTCWLEKIQSRCEVNLQGANLSECCATLGAANGSPCECELDPAARFY 664
Query: 602  ANMGTVCDDVNECESFPQVCMGRCVWLAGSFCRCPGGLMLDASQRLCVDVRLFCFL 661
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 945  ARLEGTVCDDVNECESFPQVCMGRCVWLAGSFCRCPGGLMLDASQRLCVDVRLFCFL 1004
Query: 662  YRDEKCVLPLPKKINDVCCSGLAVNGVECEACDPFESLEPASTCEPGLGYSR-DIT 720
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1005  YRDEKCVLPLPKKINDVCCSGLAVNGVECEACDPFESLEPASTCEPGLGYSR-DIT 784
Query: 721  SGRPFYDVEKCVFFGLCTHETCENTVGSFHCRCAGSFAIDAQERKCTDIDECRISFDL 780
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1065  SGRPFYDVEKCVFFGLCTHETCENTVGSFHCRCAGSFAIDAQERKCTDIDECRISFDL 1124
Query: 781  CQGGICVNTFGSFCRCFPGYSGFNLKSCMDVDECARDPLCQGGICVNTDGSYKQC 840
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1125  CQGGICVNTFGSFCRCFPGYSGFNLKSCMDVDECARDPLCQGGICVNTDGSYKQC 904
Query: 841  FPGHRLTAKGTALCEIDECSTLSDGLCWHGQCVNIGAFQCSCEAGWQSTPDRQCVDEK 900
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1185  FPGHRLTAKGTALCEIDECSTLSDGLCWHGQCVNIGAFQCSCEAGWQSTPDRQCVDEK 964
Query: 901  CVVNGGCDVRRINFCSTYCSGQGYSLWDFGRACADVDEKRENVCDQGHCTWPGG 960
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1245  CVVNGGCDVRRINFCSTYCSGQGYSLWDFGRACADVDEKRENVCDQGHCTWPGG 1024
Query: 961  ERCLCYDGFHATFDHRCVVDVDCDNLNPHYCLGSDCENTGSLFVCHCQLGYVMKATGC 1020
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1305  ERCLCYDGFHATFDHRCVVDVDCDNLNPHYCLGSDCENTGSLFVCHCQLGYVMKATGC 1084
Query: 1021  SDVDECEVGGHNCDSHASCLNIPGSFSCRCLPQWVGDGFCEHLDZCVSQEHRCSFRDC 1080
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1365  SDVDECEVGGHNCDSHASCLNIPGSFSCRCLPQWVGDGFCEHLDZCVSQEHRCSFRDC 1144
Query: 1081  INVPSYACTCRQGFAGDGFCEDRDECAENVLCDKQ 1118
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1425  INVPSYACTCRQGFAGDGFCEDRDECAENVLCDKQ 1182

```

AMF 3はまた、表3 FのBLASTPアライメントデータに示されるように、他のアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。

【0070】

表3 F . AMF 3のBLASTPアライメント結果

【0071】

【表3F】

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
FN2_HUMAN	F35556 homo sapiens (human). fibrillin 2 precurs...	1804	0.0
FN2_MOUSE	Q61555 mus musculus (mouse). fibrillin 2 precurs...	1802	0.0
Q88840	Q88840 mus musculus (mouse). mutant fibrillin-1. 5/1999	1596	0.0
FN1_BOVIN	P98133 bos taurus (bovine). fibrillin 1 precursor...	1594	0.0
FN1_HUMAN	F35555 homo sapiens (human). fibrillin 1 precurs...	1591	0.0
FN1_MOUSE	Q61554 mus musculus (mouse). fibrillin 1 precurs...	1590	0.0
Q60784	Q60784 mus musculus (mouse). fibrillin-1 (fragment)....	1108	0.0
P87363	P87363 gallus gallus (chicken). fibrillin-1 (fragment)...	713	0.0
Q60789	Q60789 mus musculus (mouse). fibrillin-2 (fragment)....	534	e-150

AMF 3、ならびに他の全てのAMF Xタンパク質における識別可能なドメインの存在は、ソフトウェアアルゴリズム（例えば、PROSITE、DOMAIN、Blocks、Pfam、ProDomainおよびPrints）を使用する検索、次いでInterproウェブサイト（<http://www.ebi.ac.uk/interpro>）を使用してドメイン適合（または数）をクロスする（crossing）ことによるInterpro数の決定によって、決定され得る。次いで、DOMAINの結果を、Reverse Position Specific BLAST分析を用いてConserved Domain Database (CDD) から収集し得る。このBLAST分析ソフトウェアは、SmartおよびPfamコレクションに見出されるドメインをサンプルする。

【0072】

AMF X RNAの発現情報は、実施例に記載されるように、組織供給源（専有のデータベース供給源、公的なEST供給源、文献供給源、および/またはRACE供給源を含むが、これらに限定されない）を使用して導き出され得た。AMF 3は、少なくとも以下の組織において発現される：結腸癌および胃癌。最も高い発現は、肺癌細胞株であり、そしてこれは、胎児肺における発現と関連し、腫瘍胎児性表現型を示す。

【0073】

AMF 3の核酸およびタンパク質は、種々のAMF関連病態および/または障害に関連する可能な治療適用において有用である。例えば、フィブリリン様タン

パク質をコードするcDNAは、遺伝子治療に有用であり得、そしてフィブリリン様タンパク質は、それを必要とする被験体に投与された場合に有用であり得る。AMF3タンパク質またはそのフラグメントをコードする新規な核酸は、診断適用においてさらに有用であり得、ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される。これらの材料は、治療方法または診断方法における使用のための、本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0074】

AMF3核酸およびタンパク質は、以下に記載の種々の疾患および障害ならびに/または他の病態に関連する可能な診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、マルファン症候群、先天性拘縮クモ指症、マルファン様体型、家族性腺腫様ポリポーシス、ならびに他の疾患、障害および状態などに罹患している患者の処置に対する効力を有する。非限定的な例として、本発明の組成物は、マルファン症候群、先天性拘縮クモ指症、マルファン様体型、家族性腺腫様ポリポーシスに罹患している患者の処置に対する効力を有する。さらなるAMF3関連疾患および障害は、本明細書中を通して記載される。

【0075】

さらに、AMF3についてのタンパク質類似性の情報、発現パターンおよびマップ位置は、AMF3が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的および/または生理学的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、可能な診断適用および治療適用において、ならびに研究ツールとして有用である。これらには、特異的または選択的な核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとしての作用(ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される)、ならびに以下のような可能な治療適用が挙げられる:(i)タンパク質治療剤、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞傷害性抗体)、(iv)遺伝子治療(遺伝子送達/遺伝子除去)において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボで組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的防御武器(biological defense weapon)。

【0076】

これらの材料は、治療方法または診断方法における使用のための新規AMF3物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらの抗体は、以下の「抗AMFX抗体」の節に記載されるような、疎水性チャートからの予測を使用して、当該分野で公知の方法に従って生成され得る。種々の実施形態において、考えられるAMF3エピトープは、疎水性プロットまたは親水性プロットを生成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによって予測されるような、AMF3ポリペプチドの親水性領域である。

【0077】

(AMF-4(登録番号27486474とも言及される))

新規なAMF4は、プラスミノゲン様タンパク質である。AMF4クローンは、本明細書中において代替的に、登録番号27486474とも言及される。439ヌクレオチドのAMF4核酸を、表4Aに示す。AMF4のオープンリーディングフレーム(「ORF」)は、2~5位で開始する。AMF4 ORFは、ヌクレオチド93~95位のTAAコドンで終結する。表4Aに示されるように、停止コドンに対して3'側の推定非翻訳領域に下線を付し、そして停止コドンを太字とする。AMF4は、ATG開始部位では開始しない。従って、AMF4は、C末端コードフラグメントである可能性が最も高い。AMF4 ORFは、その核酸の5'方向(配列番号7)およびそのポリペプチドのN末端方向(配列番号8)に伸長することが意図される。

【0078】

【表4A】

表 4A.AMF4 核酸 (SEQ ID NO:7)

T CAC GGG AAT AAG CCT GGG CCC GTC CCT TTG ATT TCC AAC AAG ATC
 TGC AAC CAC AGG GAC GTG TAC GGT GGC ATC ATC TCC CCC TCC ATG
 CTC TGC GCG GGC TAC CTG ACG GGT GGC GTG GAC AGC TGC CAG GGG
 GAC AGC GGG GGG CCC CTG GTG TGT CAA GAG AGG AGG CTG TGG AAG
 TTA GTG GGA GCG ACC AGC TTT GGC ATC GGC TGC GCA GAG GTG AAC
 AAG CCT GGG GTG TAC ACC GTG TCA CCT CCT TCC TGG ACT GGA TCC
 ACG AGC AGA TGG AGA GAG ACC TAA AAA CCT GAA GAG GAA GGG GAT
AAG TAG CCA CCT GAG TTC CTG AGG TGA TGA AGA CAG CCC GAT CCT
CCC CTG GAC TCC CGT GTA GGA ACC TGC ACA CGA GCA GAC ACC CTT
GGA GCT CTG AGT TCC GGC ACC AGT AGC AGG CCC

コードされるAMF4ポリペプチド(配列番号8)を、表4Bにおいて、一字アミノ酸コードを用いて示す。

【0079】

【表4B】

表 4A.AMF4 ポリペプチド (SEQ ID NO:8)

HGKPKGFVPLISNKICNHRDVYGGIISPSMLCAGVLTGGVDSQCQDSCGGPLVQCERRLWKLV
 GATSPGIGCAEVNPKPGVYTVSEPPSWTIGSTSRWRET

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF4核酸配列は、表4Cに示されるようにセリンプロテアーゼ(GenBank登録番号AB038159)(配列番号69)に対して、420個中418個(99%)の同一な塩基を有することが見出された。本明細書中のすべてのBLASTアラインメントにおいて、「E値(E-value)」または「期待(Expect)」値は、検索されたデータベース内において、整列された配列が、偶然によってのみBLAST照会配列に対してその類似性を達成し得た確率の数値表示である。例えば、表4Cに示されるように、AMF4BLAST分析から検索された対象(「Subject」)(この場合、セリンプロテアーゼ遺伝子/タンパク質)が、純粋に偶然によって照会(Query)AMF4配列に一致した確率は0(E値

0.0)である。

【0080】

【表4C】

表 4C. AB038159に対するAMF4のBLASTN (SEQ ID NO:69)

>AB038159 H. sapiens TMPRSS3c mRNA for serine protease, complete cds. 1/2001
 Length = 2135 Strand = Plus / Plus
 Score = 809 bits (408), Expect = 0.0
 Identities = 418/420 (99%), Gaps = 1/420 (0%)

```

Query: 21  ccgtccctttgatttccaacaagatctgcaaccacagggacgtgtacggtggcatcatct 80
Sbjct: 950  ccgtccctttgatttccaacaagatctgcaaccacagggacgtgtacggtggcatcatct 1009

Query: 81  cccctccatgctctcgcggggctaactgacgggtggcgtggacagctgccagggggaca 140
Sbjct: 1010 cccctccatgctctcgcggggctaactgacgggtggcgtggacagctgccagggggaca 1059

Query: 141  gggggggccctggtgtgtcaagagaggaggctgtggaagttagtgggagcgaccagct 200
Sbjct: 1070 gggggggccctggtgtgtcaagagaggaggctgtggaagttagtgggagcgaccagct 1129

Query: 201  ttggcatcggctgcgcagaggtgaacaagcctggggtgtaca-ccgtgtcacctccttcc 259
Sbjct: 1130 ttggcatcggctgcgcagaggtgaacaagcctggggtgtacacccgtgtcacctccttcc 1189

Query: 260  tggactggatccacgagcagatggagagagacctaaaaacctgaagaggaaggggataag 319
Sbjct: 1190 tggactggatccacgagcagatggagagagacctaaaaacctgaagaggaaggggataag 1249

Query: 320  tagccacctgagttcctgaggtgatgaagacagcccgatcctccctggactcccgtgta 379
Sbjct: 1250 tagccacctgagttcctgaggtgatgaagacagcccgatcctccctggactcccgtgta 1309

Query: 380  ggaacctgcacacgagcagacacccctggagctctgagttccggcaccagtagcaggccc 439
Sbjct: 1310 ggaacctgcacacgagcagacacccctggagctctgagttccggcaccagtagcaggccc 1369

```

関連する核酸配列についてのさらなるBLASTN情報を、表4Dに示す。

【0081】

【表4D】

表 4D AMF4についてのBLASTN分析結果

Sequences producing significant alignments:				Score	E
				(bits)	Value
AB038159	AB038159	Homo sapiens	TMPRSS3c mRNA for serine prot...	809	0.0
AB038158	AB038158	Homo sapiens	TMPRSS3b mRNA for serine prot...	809	0.0
AB038157	AB038157	Homo sapiens	TMPRSS3a mRNA for serine prot...	809	0.0
AF201380	AF201380	Homo sapiens	serine protease TADG12 mRNA, ...	753	0.0
AP001746	AP001746	Homo sapiens	genomic DNA, chromosome 21q, ...	301	2e-79
AP001623	AP001623	Homo sapiens	genomic DNA, chromosome 21, c...	301	2e-79
AC015555	AC015555	Homo sapiens	chromosome 21 clona RP11-113F...	301	2e-79

BLASTP検索を、公的なタンパク質データベースに対して実施した。この比較からの結果を、表4Eに示す。

【表4G】

表 4G. P06868に対するAMF4のBLASTP (SEQ ID NO:71)

```

PFAM_BOVIN P06868 bos taurus plasminogen precursor (ac 3.4.21.7) 11/1997 Length =
812
Score = 101 bits (248), Expect = 2e-21
Identities = 47/82 (57%); Positives = 58/82 (70%), Gaps = 1/82 (1%)

Query: 4  KPGPVPLISNKICNHRDVYGGIISPSMLCAGYLRGGVDSCQGDSCGGPLVQCQERRLWKLVG 63
          |  +|+| ||+||  +  |  +|+| ||||+| || ||||| ||||| |||  |+  +  ||
Sbjct: 719  KEAHLVVIENKVCNRNEYLDGRVKPTLCAHGLIGGTDSCQGDSCGGPLVCFBKDKYILQG 778

Query: 64  ARSFGIGCAEVNKPQVY-RVSP 84
          |  +|+|||  |||||  ||||
Sbjct: 779  VTSWGLGCARPKNKPGVYVRVSP 800

```

AMF4および他のすべてのAMF×タンパク質における同一性証明可能な (identifiable) ドメインの存在は、PROSITE、DOMAIN、Blocks、Pfam、ProDomain、およびPrintsのようなソフトウェアアルゴリズムを使用して検索し、次いで、Interproウェブサイト (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) を使用して、ドメインマッチ (すなわち、数) を掛け合わせる (cross) ことによってInterpro数を決定することによって決定され得る。次いで、DOMAINの結果を、Reverse Position Specific BLAST分析を使用して、Conserved Domain Database (CDD) から収集し得る。このBLAST分析ソフトウェアサンプルドメインが、SmartおよびPfamコレクションにおいて見出された。このDOMAIN配列アラインメントについて、完全に保存された単一残基を、黒色の陰影を付けることによって示し、そして「強く」半保存された残基を、灰色によって示す。「強い」保存されたアミノ酸残基の群は、以下のアミノ酸群のいずれか1つであり得る：STA、NEQK、NHQK、NDEQ、QHRK、MILV、MILF、HY、FYW。AMF4は、トリプシン様セリンプロテアーゼドメイン (Smart | Tryp__SPc, E = 2e - 21) およびトリプシンドメイン (Pfam00089, E = 2e - 14) のコンセンサス配列と、良好な相同性を示す。トリプシン様セリンプロテアーゼドメイン (配列番号72) (「コンセンサス (「Consensus」)」と表示) とのアラインメントを、表4Hに示

。ウロキナーゼ (Online Mendelian Inheritance in Man (「OMIM」) 登録番号191840) による、活性形態 (プラスミン) への活性化は、残基560と561との間のArg - Val結合での切断を包含し、これは、2つのジスルフィド結合によって共に保持された2本鎖プラスミン分子の形成を生じる。より重い方の鎖は、約411残基を含み、そしてより軽い方の鎖は、約233残基を含む。プラスミンの主な機能は、血餅中のフィブリンの消化である。プラスミンは、トリプシンに類似した特異性を有するタンパク質分解性酵素である。トリプシンと同様に、プラスミンは、セリンプロテアーゼのファミリーに属し、ここで、活性部位の触媒の三つ組み (active site catalytic triad) であるHis - 57, Asp - 102, およびSer - 195 (キモトリプシンでの番号付け) は、軽鎖に存在する。

【0088】

プラスミノゲン活性化系は、一貫して癌に関連付けられている一経路である。癌に対するその関連性は、腫瘍の進行を規定する分子機構の全てではなくとも、多くに対して根本的となる、癌患者において生じる出血症状発現の多くを担うことから示される。固形悪性腫瘍の管外遊出および管内遊出は、局所的なタンパク質分解および腫瘍細胞の移動による、基底膜および細胞外マトリクスの成分への腫瘍細胞の付着によって制御される。腫瘍関連セリンプロテアーゼプラスミン、その活性化因子uPA (ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子)、レセプターuPA - R (CD87)、ならびにインヒビターPAI - 1およびPAI - 2が、癌の浸潤および転移に関連するという、強力な臨床的証拠および実験的証拠が蓄積された。癌において、uPA、uPA - Rおよび/またはPAI - 1が増加することは、腫瘍の進行、ならびに悪性固形腫瘍に罹患した患者における無疾患状態 (disease - free) および/または全体的生存の短縮と関連付けられる。uPAおよび/またはそのインヒビターであるPAI - 1は、これまでに記載された中で最強の予後判定マーカーの1つであるように思われる。疾患再発および全体的生存を予測するための強力な予後判定価値は、乳癌、卵巣癌、

子宮頸癌、子宮内膜癌、胃癌、結腸癌、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、脳の癌、および軟組織の癌を有する患者について証明された。原発性癌組織におけるuPAおよび/またはPAI-1値の上昇と、癌細胞の腫瘍浸潤/転移能力との間の強い相関に起因して、タンパク質分解性因子を治療のための標的として選択した。

【0089】

ルイス肺癌からの転移の抑制を媒介した新規な新脈管形成インヒビターが単離され、そしてインヒビターアンギオスタチン(angiostatin)と命名された。例えば、O'Reillyら, 1994 Cell 79:315-328を参照のこと。アンギオスタチンは、プラスミノゲンの38kDの内部フラグメントであり、これは、プラスミノゲンの少なくとも3個のクリングルを含む。アンギオスタチンの組換えフラグメントは、インビトロにおいて阻害活性を示す。例えば、Caoら, 1996 J Clin Invest. 101:1055-1063を参照のこと。アンギオスタチンは、いくつかのヒト前立腺癌細胞株によって産生されるセリンプロテアーゼによる、プラスミノゲンのタンパク質分解性切断によって産生される。例えば、Gatelyら, 1996 Cancer Res. 56:4887-4890を参照のこと。マウスアンギオスタチンをコードするcDNAをマウスT241線維肉腫細胞中に遺伝子移入することによる、腫瘍新脈管形成の平衡のシフトは、インビボにおいて、原発性腫瘍増殖および転移性腫瘍増殖を抑制する。例えば、Caoら, 1998 J Clin Invest. 101:1055-1063を参照のこと。C57B16/Jマウスにおいてマウスアンギオスタチンを発現する安定なクローンの完成は、原発性腫瘍増殖を平均して77%阻害した。原発性腫瘍を取り除いた後、約70%のマウスにおいて肺の微小転移巣は、2~5ヶ月間にわたり顕微鏡的に休眠かつ無血管の状態のままであった。休眠状態の微小転移巣における腫瘍細胞は、高い増殖率によって平衡を保たれた高い割合のアポトーシスを示した。これらの研究によって、原発性腫瘍除去後の肺転移増殖の減少が示された。このことは、転移が、新脈管形成を停止することによって自己阻害性であることを示唆する。このデータはまた、特定のnew脈管形成インヒビターを用いる抗new脈管形成遺伝子療法による、癌治療についての新規なアプローチを提供し得る。アンギオスタチ

ンにより誘導される肺転移の長期休眠状態は、ヒトでの14～15年間に相当する(マウスの1日間が、ヒトでの約35日間に相当する場合)。

【0090】

uPA(ウロキナーゼ)のようなプラスミノゲン活性化因子に呼応したAMF4の過剰発現は、潜在的に、腫瘍細胞の浸潤および移動を刺激し得る。あるいは、AMF4は、プラスミノゲンをアンギオスタチンへと切断するプロテアーゼに類似する未同定のセリンプロテアーゼの基質として作用し得る。この様式において、腫瘍細胞は、この重要な抗新脈管形成因子の産生を制限し得る。

【0091】

AMF4の治療的標的化は、腫瘍細胞の浸潤/運動性および転移の程度を制限またはブロックすると予測される。潜在的に、AMF4の治療的標的化は、アンギオスタチンまたは抗新脈管形成活性を有する類似の分子の産生に有利なように平衡をシフトし得る。

【0092】

AMFX RNAについての発現情報は、実施例に記載のように、専有のデータベース供給源、公的なEST供給源、文献の供給源および/またはRACE供給源が挙げられるが、これらに限定されない組織供給源を使用して導き出された。

【0093】

AMF4の核酸およびタンパク質は、種々のAMFに関連した病理および/または障害に関連付けられる潜在的な治療的適用において有用である。例えば、トリプシン様セリンプロテアーゼタンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得、そしてトリプシン様セリンプロテアーゼタンパク質は、トリプシン様セリンプロテアーゼタンパク質を必要とする被験体に投与される場合に有用であり得る。AMF4タンパク質をコードする新規な核酸またはそのフラグメントはさらに、診断的適用において有用であり得る。この診断的適用では、この核酸またはこのタンパク質の存在または量を評価する。これらの物質はさらに、治療方法または診断方法において使用するための、本発明の新規な物質に対して免疫特異的に結合する抗体の産生において有用である。

【0094】

AMFXの核酸およびタンパク質は、以下に記載される種々の疾患および障害および/または他の病理に関連付けられる潜在的な診断的適用および治療的適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、癌、血液凝固障害ならびに他の疾患、障害および状態などに罹患している患者の処置に対する効力を有する。制限することのない例として、本発明の組成物は、癌、血液凝固障害に罹患している患者の処置に対する効力を有する。AMFに関連したさらなる疾患および障害は、本明細書全体を通して言及される。

【0095】

さらに、AMF4についてのタンパク質類似性情報、発現パターン、およびマップ位置は、AMF4が、トリプシン様セリンプロテアーゼファミリーに特徴的な重要な構造的および/または生理的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、潜在的な診断的適用および治療的適用において有用であり、ならびに研究用ツールとして有用である。これらは、特異的または選択的な核酸またはタンパク質の診断用マーカーおよび/または予後判定マーカーとして供されることを包含し、ここでは、この核酸またはこのタンパク質の存在または量を評価する。ならびにこれらは、以下のような潜在的な治療的適用を包含する：(i)タンパク質治療、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞傷害性抗体)、(iv)遺伝子治療に有用な核酸(遺伝子送達/遺伝子消失(ablation))、ならびに(v)インビトロおよびインビボでの組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的防御兵器。

【0096】

これらの物質はさらに、治療方法または診断方法において使用するための、新規なAMF4物質に対して免疫特異的に結合する抗体の産生において有用である。これらの抗体は、以下の「抗AMFX抗体」の節に記載のように、疎水性チャートからの予測を使用して、当該分野において公知の方法に従って産生され得る。種々の実施形態において、意図されるAMF4エピトープは、疎水性プロットまたは親水性プロットを作成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによ

って予測されるような、AMF 4 ポリペプチドの親水性領域である。

【0097】

(AMF 5 (登録番号29691387とも言及される))

新規なAMF 5は、有機アニオン輸送ペプチド様タンパク質(「OTAP」)タンパク質である。AMF 5クローンは、本明細書中において代替的に、登録番号29691387とも言及される。2646ヌクレオチドのAMF 5核酸を、表5Aに示す。AMF 5のオープンリーディングフレーム(「ORF」)は3~5位で開始する。AMF 5は、内部フラグメントであるようである。従って、このORFは、表5Aおよび5Bに示されるN末端およびC末端を超えて伸長し得ることが意図される。表5Aに示されるように、最初のコードトリプレットは、太字である。

【0098】

【表5A】

表 5A. AMF5 ヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:9).

```

TGTCATGTCCCTTTACCTATTATATTTTCATACTCTGTGAAAACAAATCAGTTGCCGGACTAACCATGACCTA
TGATGGAAATAATCCAGTGACATCTCATAGAGATGTGCCACTTTCTTATTGCAACTCAGACTGCAATTGTGATGAA
AGTCAGTGGGAACCCAGTCTGTGGGAACAATGGAAATAACTTACCTGTACCTTGTCTAGCAGGATGCAAATCCTCAA
GTGGTATTAATAAAGCATACAGTGTATTAATACTGTAGTTGTGTGGAAAGTAACTGGTCTCCAGAACAGAAATCTC
AGCGCACTTGGGTGAATGCCCAAGAGATAATACTTGTACAAGGAAATTTTTCATCTATGTTGCAATTCAAGTCATA
AACTCTTGTCTCTGCAACAGGAGSTACC

```

コードされるAMF 5タンパク質(配列番号10)は、表5Bに示される136アミノ酸のタンパク質である。

【0099】

【表5B】

表 5B. AMF5 アミノ酸配列 (SEQ ID NO:10)

```

SLSFYLLYFFILCSNKSVAGLIMTYDGNNEPVTSHRDVPLSYCNDCNCDESQWEPVCGNNGITYLSPCLAGCKSSS
GIKKHTVFNCSCEVETGLQNRNYS AHLGECPRDNTCTRKFFIYVAIQVINSLFSATGCT

```

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF 5核酸配列は、表5Cに示されるように有機アニオン輸送体8(SLC21A8遺伝子)につい

てのHomo sapiens mRNA (GenBank登録番号AJ251506) (配列番号73) に対して、374個中363個(97%) 同一な塩基を有することが見出された。

【0100】

【表5C】

表 5C DAT-8 mRNA に対する AMF5 の BLASTN (SEQ ID NO:73)

>HSA251506 AJ251506 Homo sapiens mRNA for organic anion transporter 8 (SLC21A8 gene). 7/2000 Length = 2646; Strand = Plus / Plus
Score = 654 bits (330), Expect = 0.0
Identities = 363/374 (97%)

Query: 37 tctgtgaaaaaacaatcagttgccggactaacatgacctatgatggaaataatccagtga 96
Sbjct: 1330 tctgtgaaagcaaatcagttgccggcctaaccttgacctatgatggaaataatccagtgg 1389
Query: 97 catctcatagagatgtgccactttcttattgcaactcagactgcaattgtgatgaaagtc 156
Sbjct: 1390 catctcatgtagatgtaccactttcttattgcaactcagagtgcaattgtgatgaaagtc 1449
Query: 157 agtgggaaccagtcctgtgggaacaatggaataaactacotgtcaccttgtctagcaggat 216
Sbjct: 1450 agtgggaaccagtcctgtgggaacaatggaataaactacotgtcaccttgtctagcaggat 1509
Query: 217 gcaaatcctcaagtggattaaaaagcatacagtgttttataactgtagttgtgtggaag 276
Sbjct: 1510 gcaaatcctcaagtggattaaaaagcatacagtgttttataactgtagttgtgtggaag 1569
Query: 277 taactgggtctccagaacagaaattactcagcgcaacttgggtgaatgcccaagagataata 336
Sbjct: 1570 taactgggtctccagaacagaaattactcagcgcaacttgggtgaatgcccaagagataata 1629
Query: 337 cttgtacaaggaatttttctctatgttgcaattcaagtcataaactctttgttctctg 396
Sbjct: 1630 cttgtacaaggaatttttctctatgttgcaattcaagtcataaactctttgttctctg 1689
Query: 397 caacaggaggtacc 410
Sbjct: 1690 caacaggaggtacc 1703

さらに、AMF5 核酸配列は、他の核酸配列に対して高い相同性を有する。このBLASTNアラインメントデータを、表5Dに示す。

【0101】

【表5D】

表 5D. AMF5 についての BLASTN アライメント結果

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
HSA251506 AJ251506 Homo sapiens mRNA for organic anion trans...	654	0.0
AF187815 AF187815 Homo sapiens liver-specific organic anion ...	654	0.0
AF205071 AF205071 Homo sapiens organic anion transport polyp...	557	e-156
AF060500 AF060500 Homo sapiens liver specific transporter mR...	557	e-156
AB026257 AB026257 Homo sapiens mRNA for organic anion transp...	557	e-156
HSA132573 AJ132573 Homo sapiens mRNA for organic anion trans...	549	e-154

BLASTP 検索を、公的なタンパク質データベースに対して実施した。表 5 E に示されるように、AMF5 タンパク質は、691 アミノ酸残基長の Homo sapiens (ヒト) 肝臓特異的有機アニオン輸送体 (有機アニオン輸送体ポリペプチド2) (oatp2) (登録番号) (配列番号74) に対して136 個中119 個 (87%) の同一なアミノ酸残基を有し、そして136 個中125 個 (91%) の陽性残基を有する。

【0102】

【表5E】

表 5E. OATP1 に対する AMF5 の BLASTP (SEQ ID NO:74)

```

>OATP1_HUMAN Q9y616 homo sapiens (human). liver-specific organic anion transporter
(organic anion transport polypeptide 2) (oatp 2). 10/2000 Length = 691
Score = 265 bits (670), Expect = 9e-71
Identities = 119/136 (87%), Positives = 125/136 (91%)

Query: 1  SLSFYLLYFFILCENKSVAGLEMRVYDGNPNVTSHERDVPLEVCNSDCNCDESQWEPVCGNN 60
          |||
Sbjct: 418 SLSFYLLYFFILCENKSVAGLEMTYDGNPNVTSHERDVPVLSYCNDCNCDESQWEPVCGNN 477

Query: 61  GITYLSPLCLAGCKSSSGIKKHTVFNCSCEVEVTGLQNRNYS AHLGECPRDNTCTRKFPIY 120
          |||+|||
Sbjct: 478 GITYLSPLCLAGCKSSSGKPKIVFNCSCELEVTGLQNRNYS AHLGECPRDDACTRKFPIY 537

Query: 121 VAIQVINSLFSATGGT 136
          |||||+| ||| |||
Sbjct: 538 VAIQVLNLFPSALGGT 553

```

AMF5 のアミノ酸配列はまた、表 5 F における BLASTP アライメントデータに示されるようなアミノ酸配列に対して高い相同性を有する。

【0103】

【表5F】

表 5F. AMF5 についての BLASTP アライメント結果

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
OAT6_HUMAN Q9y616 homo sapiens (human). liver-specific organ...	265	9e-71
OAT3_RAT O88397 rattus norvegicus (rat). sodium-independent ...	108	2e-23
O88397 O88397 rattus norvegicus (rat). organic anion transpo...	108	2e-23
OATP_HUMAN P46721 homo sapiens (human). sodium-independent o...	106	9e-23
OAT2_RAT O35913 rattus norvegicus (rat). sodium-independent ...	102	1e-21
OATP_RAT P46710 rattus norvegicus (rat). sodium-independent ...	99	8e-21
OATK_RAT P70502 rattus norvegicus (rat). sodium-independent ...	98	2e-20
P70502 P70502 rattus norvegicus (rat). oat-k1. 1/1999	98	2e-20

AMF5 および他のすべての AMF X タンパク質における同一性証明可能な (identifiable) ドメインの存在は、PROSITE、DOMAIN、Blocks、Pfam、ProDomain、および Prints のようなソフトウェアアルゴリズムを使用して検索し、次いで、Interpro ウェブサイト (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) を使用して、ドメインマッチ (すなわち、数) を掛け合わせる (cross) ことによって Interpro 数を決定することによって決定され得る。DOMAIN の結果を、次いで、Reverse Position Specific BLAST 分析を使用して、Conserved Domain Database (CDD) から収集し得る。この BLAST 分析ソフトウェアサンプルドメインが、Smart および Pfam コレクションにおいて見出された。

【0104】

AMF X RNA についての発現情報は、実施例に記載のように、専有のデータベース供給源、公的な EST 供給源、文献の供給源および / または RACE 供給源が挙げられるが、これらに限定されない組織供給源を使用して導き出された。AMF5 は、少なくとも以下の組織において発現される：肝臓、脳、肺、腎臓、および精巣。さらなる転写物もまた観察された。OATP の肝臓外発現は、経上皮有機アニオン輸送における OATP の一般的役割を示唆すると本発明者らは明言する。

【0105】

AMF5 の核酸およびタンパク質は、種々の AMF に関連した病理および / または障害に関連付けられる潜在的な治療的適用において有用である。例えば、有機アニオン輸送ペプチド様タンパク質をコードする cDNA は、遺伝子治療にお

いて有用であり得、そして有機アニオン輸送ペプチド様タンパク質は、有機アニオン輸送ペプチド様タンパク質を必要とする被験体に投与される場合に有用であり得る。AMF5タンパク質をコードする新規な核酸またはそのフラグメントはさらに、診断的適用において有用であり得る。この診断的適用では、この核酸またはこのタンパク質の存在または量を評価する。これらの物質はさらに、治療方法または診断方法において使用するための、本発明の新規な物質に対して免疫特異的に結合する抗体の産生において有用である。

【0106】

AMFX核酸およびAMFXタンパク質は、下記の種々の疾患および障害、ならびに/または他の病状に関与する、可能性のある診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、以下：結腸腺癌、小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌および神経膠腫、ならびに他の疾患、障害および状態など、を罹患する患者の処置のための有効性を有する。非限定的な例として、本発明の組成物は、結腸腺癌、小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌および神経膠腫に罹患する患者の処置のための有効性を有する。さらなるAMF関連疾患および障害が本明細書を通じて言及される。

【0107】

さらに、AMF5についてのタンパク質の類似性情報、発現パターン、およびマッピング配置は、AMF5が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的および/または生理学的な機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、可能性のある診断および治療の適用において、そして検索ツールとして有用である。これらは、特異的、または選択的な核酸またはタンパク質の診断および/または予測マーカーとしての働き（ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が、評価されるべきである）、ならびに以下：(i)タンパク質治療剤、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的（治療抗体、診断抗体、薬物標的化抗体/細胞毒性抗体）、(iv)遺伝子治療（遺伝子送達/遺伝子アブレーション）において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボにおいて組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的防御武器、のような可能性のある治療適用を含む。

【0108】

これらの物質はさらに、治療方法または診断方法における使用のための、新規なAMF5物質に免疫特異的に結合する抗体の生成において有用である。これらの抗体は、下記の「抗-AMF X抗体」の節に記載のような、疎水性チャートからの予測を用いて、当該分野で公知の方法に従って生成され得る。種々の実施形態において、考慮されるAMF5エピトープは、疎水性または親水性プロットを作成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによって予想されるように、AMF5ポリペプチドの親水性領域である。

【0109】

(AMF-6 (Acc. 番号38905521とも呼ばれる))

新規なAMF6は、MEGF関連タンパク質である。AMF6クローンは、本明細書において、あるいはAcc. 番号38905521と呼ばれる。332ヌクレオチドのAMF6核酸(配列番号11)を表6Aに示す。AMF6のオープンリーディングフレーム(「ORF」)は、ヌクレオチド3~5で開始する。AMF6 ORFは、ヌクレオチド318~320で終わる。AMF5は、内部フラグメントであるらしく、そのためORFはN末端およびC末端を越えて伸びることが考えられる。表6Aに示すように、5'から開始コドンへ、および3'から終止コドンへの、推定の非翻訳領域には下線を付しており、そして開始コドンおよび終止コドンは太字にしている。

【0110】

表6A. AMF6ヌクレオチド配列(配列番号11)

【0111】

【表6A】

```

TGGCAGCCCTGGAGGACCCGATGGTGGACCTGGACGGCGAGCTGCCTTTCGTGCGGCCCTGCCCCACATTGCCGT
GCTCCAGGACGAGCTGCCGCAACTCTCCAGGATGACGACGCTCGGGCCGATGAGGAAGAGGCAGAGTTCGGGGC
GAACACACGCTCACAGAGAAGTTTGTCTGCTGGATGACTCCTTTGGCCATGACTGCAGCTTGACCTGTGATGACT
GCAGGAACGGAGGGACTGCCTCCCTGGGCCTGGATGGCTGTGATTGCCCCGAGGGGTGGACTGGGGTTATTTGCAA
TGAGATTTGCTCCCGGA

```

コードされたAMF6タンパク質(配列番号12)は、表6Bに示される、106アミノ酸のタンパク質である。

【0112】

表6B . AMF6 アミノ酸配列 (配列番号12)

【0113】

【表6B】

```
AALESFMDLGDGELPFVVRPIPHIAVLQDELPLQLFQDDDDVGADEEEAEELRGEHTLTEKFCVCLDDSFQHDGCSLTCDDC
RNGGTCLLGLDGCDCPEGWTGVICNEICPF
```

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF6 核酸配列が、表6Cに示される、MEGF6、完全c ds (GenBank Acc. 番号AB011532) (配列番号75および76) について、Rattus norvegicus mRNA に対して、179塩基のうち154塩基(86%) 同一である1つのフラグメント、および91塩基のうち79塩基(86%) 同一である第二のフラグメントを有することが、見出された。

【0114】

表6C . MEGF6 mRNA (配列番号75および76) に対するAMF6
のBLASTN

【0115】

【表6C】

```

>AB011532 AB011532 Rattus norvegicus mRNA for MEGF6, complete cds. 8/1998
      Length = 5523
      Score = 157 bits (79), Expect = 4e-35
      Identities = 154/179 (86%)
      Sbjct: residues 1738 to 1916 (SEQ ID NO:75); Strand = Plus / Plus

Query: 141 gagttgccccggggaacacacgctcacagagaagtttgtctgcctggatgactcctttggc 200
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1738 gagttgctgggagaacacacgctcactgagaagtttgtctgcttggatcactccttggg 1797

Query: 201 catgactgcagcttgacctgtgatgactgcaggaacggaggacctgctcctctgggctg 260
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1798 catgactgcagcctaacctgcgatgactgcaggaatgggggacttgcttccccgggcag 1857

Query: 261 gatggctgtgattgccccaggggtggactggggttatttgcattgagatttgcctcc 319
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1858 gacgctgtgactgcccaggggtggactgggaatcatttgcattgagacttgcctcc 1916

      Score = 85.7 bits (43), Expect = 1e-14
      Identities = 79/91 (86%)
      Sbjct: residues 1616 to 1706 (SEQ ID NO:76); Strand = Plus / Plus

Query: 22  tggtagacctggagcggagctgcctttcgtgcccctgccccacattgacctgctcc 81
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1616 tggtagacctggatggcgggtgcctttcgtgcccctgccccacattgacctgctga 1675

Query: 82  aggacgagctgcccgaactcttccaggatga 112
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1676 gggatgagctgcccgaactcttccaggatga 1706

```

BLASTP検索を公的なタンパク質データベースに対して実施した。表6Dに示すように、AMF6タンパク質は、1574アミノ酸残基長の*Rattus norvegicus* (ラット).megf6 (Acc.No.O88281) (配列番号77)に対して、107アミノ酸残基のうち89塩基(83%)同一性を有し、そして107残基のうち95塩基(88%)陽性である。

【0116】

表6D.MEGF6(配列番号77)に対するAMF6aのBLASTP

【0117】

【表6D】

```

Query: 2  ALEPMVDLDGELPFVRLPHI AVLQDELPLQFQDDVGADEEEA--ELRGEHTLTKFV 59
      +||| +||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 456 SLEESVVDLDGRLPFVRLPHI AVLRLDELPLRLQDD-YGAESEAAAELRGEHTLTKFV 514

Query: 60  CLDHSFGHDCSLTCDDCRNGGTCLLGLDGCDCPEGWIGVICNETCPP 106
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 515 CLDHSFGHDCSLTCDDCRNGGTCFPGQDGCDCPEGWIGVICNETCPP 561

```

AMF6における同定可能なドメイン、および他の全てのAMF Xタンパク質の存在は、PROSITE、DOMAIN、Blocks、Pfam、ProDomain、およびPrintsのようなソフトウェアアルゴリズムを用いる検索によって、次いでInterpro website (<http://www>

.ebi.ac.uk/interpro)を用いてドメインメッチ(または数)を掛け合わせるによりInterpro数を決定することによって決定され得る。次いで、DOMAINの結果を、Reverse Position Specific BLAST分析を用いた保存ドメインデータベース(Conserved Domain Database)(CDD)から収集し得る。このBLAST分析ソフトウェアサンプルドメインは、SmartおよびPfam収集において見出される。

【0118】

AMFX RNAについての発現情報は、実施例に記載のような、以下：独自データベースソース、公的ESTソース、文献ソース、および/またはRACEソースを含むがこれに限定されない組織供給源を用いて得られた。AMF6は、ラット脳のいくつかの領域で発現される。

【0119】

AMF6の核酸およびタンパク質は、種々のAMF関連病理および/または障害に関与する、可能性のある治療適用において有用である。例えば、MEGF様タンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得、そしてMEGF様タンパク質は、その治療の必要な被験体に投与された場合に有用であり得る。この新規な、AMF6タンパク質をコードする核酸、またはそのフラグメントは、診断適用においてさらに有用であり得る。ここでこの核酸またはタンパク質の存在または量が評価されるべきである。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0120】

AMFX核酸およびタンパク質は、下記の種々の疾患および障害、ならびに/または他の病状に関連する、可能性のある診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、以下：胃癌および腎細胞癌、乳癌および卵巣癌、ならびに類似の他の疾患、障害および状態などに罹患する患者の処置に有効性を有する。非限定的な例として、本発明の組成物は、胃癌および腎細胞癌、乳癌および卵巣癌に罹患する患者の処置に有効性を有する。さらなるAMF-関

連疾患および障害が本明細書を通じて言及されている。

【0121】

さらに、AMF6についてのタンパク質類似性情報、発現パターン、およびマッピング位置は、AMF6が、AMFファミリーの特徴的な重要な構造的および/または生理学的な機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、可能性のある診断および治療の適用において、そして検索ツールとして有用である。これらは、特異的、または選択的な核酸またはタンパク質の診断および/または予測マーカーとしての働き（ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が、評価されるべきである）、ならびに以下：(i)タンパク質治療剤、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的（治療抗体、診断抗体、薬物標的化抗体/細胞毒性抗体）、(iv)遺伝子治療（遺伝子送達/遺伝子アブレーション）において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボにおいて組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的防御武器、のような可能性のある治療適用を含む。

【0122】

これらの物質はさらに、治療方法または診断方法における使用のための、新規なAMF6物質に免疫特異的に結合する抗体の生成において有用である。これらの抗体は、下記の「抗-AMFX抗体」の節に記載のような、疎水性チャートからの予測を用いて、当該分野で公知の方法に従って生成され得る。種々の実施形態において、考慮されるAMF6エピトープは、疎水性または親水性プロットを作成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによって予想されるように、AMF6ポリペプチドの親水性領域である。

【0123】

(AMF-7 (Acc. 番号4194093とも呼ばれる))

新規なAMF7は、インターロイキン-11様（「IL-11」）タンパク質である。AMF7クローンは、本明細書において、あるいはAcc. 番号4194093と呼ばれる。1332ヌクレオチドのAMF7核酸（配列番号13）を表7Aに示す。AMF7のオープンリーディングフレーム（「ORF」）は、ヌクレオチド2~4で開始する。AMF7のORFは、ヌクレオチド1307~

1309のTGAコドンで終わる。AMF7は、C末端フラグメントであるらしく、そのためORFはN末端を越えて伸びることが考えられる。表7Aに示すように、5'から開始コドンへ、および3'から終止コドンへの、推定の非翻訳領域には下線を付しており、そして最初のコードトリプレットおよび終止コドンは太字にしている。

【0124】

表7A. AMF7ヌクレオチド配列(配列番号13)

【0125】

【表7A】

CGCCCTTCATGCTGCCGGCGGCTGCTCGCGCCGGCTGGTGGCCBAGCTGCAGGGCCGCTGGACGCCCTGGCCACAG
CGACAATTGCARTTGGAGCAGAGCCTGCGCGTTTGGCCGTCCGGCTGCTGCATGCCCTGGGAACCAACTGGGACCCGGG
CTTTGAAAGCCACCTCCAGGGCCAGAACTAATGGAGAGGACCCCTTCCAGCATGCACACCCAGTCCACAAAGACCT
CAAAGAGTTGGAGTTTCTGACCCAGGCCTGGGAGAAGGCTGTACGAGTTCGAAGAGGCATCACTAAGGCCGAAAGAG
AGAGACAAGGCCCCAGCCTGAAATCTAGGTCCATTGTCACTCTTCTTGGCACGACAGCCTCCGCCCCACCCGCATT
CCCCAGGCCAAGCTGGTGGCCATGCTTCAGACAAGAGACCCACCAAGGGCTCCGCCAGACCAAGGTGCCCTGGCCAA
GGCCACCCCTGAGCGCCGGCTGCTGTCACTGGGGGATGGGACCCCTGTTGGGATGGGAGCCCGAAACCCAGGCCT
GGGGCGGCCCTCAGGGACAGCAATGGGCCCATCCGCTGCTCCTCAGGCCCGAAGCCTTCACACTCAAGGAGA
AGGGCACCTGCTGCGGCTGCCCTGCGGCATTCAGGAAAGCAGCTTCCAGAACTCGAGCCTGTGGGCCAGCTCAG
TTCCACACAGACAGTGTATTCACCGGATGCCCGCTGCCCCAAACCCAGTTCTCCAGAACATGCAGACAGCTTCA
GGCGGGCCCCAGCCAGGCTCAGTGTCTGTGGAGGTGGAGGGCGGGCGCCCTGCGGAAGGCCTGTGCTCGCTGC
TGAGACTGCCCATGAGGAGGAGCTCTCAGCAGCCCCATGGACTGGATGCAGGAGTACCGCTGCCCTGCCTCAGCCT
GGAGGGCTGCAGGCCATGGTGGGCCAGTGTCTGCACAGGCTGCAGGAGCTGCCGTGCAAGCGGTGGCGGAACAGCCA
CCAAGACCTGCTCTGTGGGAGGCCCCCGGAGCCTCGCCGCTCTGTGGGGGTAGAGCGGAGCCTGCATGAGAGCC
CCAGCTGCTGTCTACTCCAGCACCCAGGAGCTGCAGACCTGGCGGCCCTCAAGCTGCGAGTGGCTGTGCTGGA
CCAGCAGATCCACTTGAAAGGTCCTGATGGCTGAACTCCTCCCTGCTGTAAGCGCTGCACAGCCCGCAGGGGGCCG
CCCTGGCTGGCCCTGTGCCCBBGCTGTGCACAGCCTGCTCTGCGAGGGAGGAGCACGTGCTTACCATCCTGCGGG
ATGAACCTGCAGTCTGAGCCCTTCCCATGCTGCCCTCGGC

コードされたAMF7タンパク質(配列番号14)は、表7Bに示される、435アミノ酸のタンパク質である。

【0126】

表7B. AMF7アミノ酸配列(配列番号14)

【0127】

【表7B】

AFNLPAGCSRRLVAVLQALDACAQRQLQLEQSLRVCRRLLHAWPTGTRALKPPPPEPETNGEDPLPACTPSPQDL
 KELEFLTQALEKAVRVRGGITKAEERDKAFSLKRSIVTSSGTTASAPPHSEGGAGGHASDTRPTKGLRQTTPAK
 GHPERRLLSVGGTRVGMGARTPRPGAGLRDQMAPSAAPQAPAEFTLKEKGHLLRLPAAFRKAASQNSLWQLS
 STQTSDDTAAAKTQFLQNMQTASGGPQPRLSAVEVEAEAGRLRKACSLRLRMREELSAPMDWMOEYRCLLTL
 EGLQAMVGGCLHRLQELRAVAEQFPRPCPVGRPPGASPSGGRAPAWSQQLLVYSSTQELQTLAALKLRVAULD
 QQIHLKLVMAELLEPLVSAAPQPPWLALCRAVHSLLEGGARVLTILRDEPAV

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF7核酸配列のフ

ラゲメントが、表7Cに示される、Homo sapiens cDNA FLJ13909 fis、クローンY79AA1000065 (GenBank Acc. 番号AK023971) (配列番号78) に対して、1300塩基のうち1299塩基(99%) 同一であることが、見出された。

【0128】

表7C . cDNA FLJ13909 (配列番号78) に対するAMF7のBLASTN

【0129】

【表7C】

```

>AK023971 AK023971 Homo sapiens cDNA FLJ13909 fis, clone Y79AA1000065.
9/2000 Length = 1708 Strand = Plus / Plus
Score = 2569 bits (1296), Expect = 0.0
Identities = 1299/1300 (99%)

Query: 33  ggctggtggccgagctgcaaggccctggagcctgagcaagcaaatgcaattgg 92
Sbjct: 138  ggctggtggccgagctgcaaggccctggagcctgagcaagcaaatgcaattgg 197

Query: 93  agcagagcctgcygctttgctgtggctgctgcaatgctgggaaccaactgggaccggg 152
Sbjct: 198  agcagagcctgcygctttgctgtggctgctgcaatgctgggaaccaactgggaccggg 257

Query: 153  ctttgaagccacctccagggccagaaactaaaggagagacccttccagcatgcaac 212
Sbjct: 250  ctttgaagccacctccagggccagaaactaaaggagagacccttccagcatgcaac 317

Query: 213  ccagtcacaagacctcaagagttggagttctgaccaggccctggagagctgtac 272
Sbjct: 318  ccagtcacaagacctcaagagttggagttctgaccaggccctggagagctgtac 377

Query: 273  gagttcgaagaggcatcaactaaggccgaagagagagcaaggcccccagctgaaatca 332
Sbjct: 378  gagttcgaagaggcatcaactaaggccgaagagagagcaaggcccccagctgaaatca 437

Query: 333  ggtccatbgtcaacctatctgagcagcagcctccgcccacggcatccccagggcaag 392
Sbjct: 436  ggtccatbgtcaacctatctgagcagcagcctccgcccacggcatccccagggcaag 497

Query: 393  ctggtggcctatgcttaagacagagaccaccaaggccctccagcagaccaggtgctg 452
Sbjct: 498  ctggtggcctatgcttaagacagagaccaccaaggccctccagcagaccaggtgctg 557

Query: 453  ccaagggccaccctgagcggcggctgctgtcagtgccggtatgggaccgctgtgggatgg 512
Sbjct: 558  ccaagggccaccctgagcggcggctgctgtcagtgccggtatgggaccgctgtgggatgg 617

Query: 513  gagcccgaaacccagggcctggggcggccctcagggcagcaaatggcccaatccgctg 572
Sbjct: 618  gagcccgaaacccagggcctggggcggccctcagggcagcaaatggcccaatccgctg 677

Query: 573  ctctcagggccccaagaccttcaaatcaagagagagggcaccctgctgctgctgctg 632
Sbjct: 678  ctctcagggccccaagaccttcaaatcaagagagagggcaccctgctgctgctgctg 737

Query: 633  cggcatccaggaagcagcttccagaactcagacctgtgggcccagctcagttccacc 692
Sbjct: 738  cggcatccaggaagcagcttccagaactcagacctgtgggcccagctcagttccacc 797

Query: 693  agaccagtgattccagggatgctgctgctgcccacccagttcctccagaatgcaaga 752
Sbjct: 798  agaccagtgattccagggatgctgctgctgcccacccagttcctccagaatgcaaga 857

Query: 753  cagcttcaggcgggcccagcccaggctcagtgctgtgaggtggaggtggagcggggc 812
Sbjct: 858  cagcttcaggcgggcccagcccaggctcagtgctgtgaggtggaggtggagcggggc 917

Query: 813  gctcggaaaggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg 872
Sbjct: 918  gctcggaaaggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg 977

Query: 873  ccatggactggatgcaaggatcaccctgctgctcaccctggagggctgcaaggccatgg 932
Sbjct: 978  ccatggactggatgcaaggatcaccctgctgctcaccctggagggctgcaaggccatgg 1037

Query: 933  tggccagtgctgcaaggctgcaaggctgcaaggctgcaaggctgcaaggctgcaagg 992
Sbjct: 1038  tggccagtgctgcaaggctgcaaggctgcaaggctgcaaggctgcaaggctgcaagg 1097

Query: 993  gacatgtctgtgagggagcccccaggcctcgcctctgtggggtagagcggagc 1052
Sbjct: 1098  gacatgtctgtgagggagcccccaggcctcgcctctgtggggtagagcggagc 1157

Query: 1053  ctgcatggagcccagctgctgctgctcaccagcaccaggagctgcaagaccctggcgg 1112
Sbjct: 1158  ctgcatggagcccagctgctgctgctcaccagcaccaggagctgcaagaccctggcgg 1217

Query: 1113  cctcagctgcaaggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg 1172
Sbjct: 1218  cctcagctgcaaggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg 1277

Query: 1173  ctgaactcctccctggttagcgtgcaacagcaggggctgcccctggctgctgctgct 1232
Sbjct: 1278  ctgaactcctccctggttagcgtgcaacagcaggggctgcccctggctgctgctgct 1337

Query: 1233  gccgggctgtgcaagcctgctctgcaaggagggagcagctgctcctaccatcctgggg 1292
Sbjct: 1338  gccgggctgtgcaagcctgctctgcaaggagggagcagctgctcctaccatcctgggg 1397

Query: 1293  atgaacctgcaagtgtgagccttccatgctgctcctggc 1332
Sbjct: 1398  atgaacctgcaagtgtgagccttccatgctgctcctggc 1437

```

BLASTP検索を公的なタンパク質データベースに対して実施した。表7Dに示すように、AMF7タンパク質は、1151アミノ酸残基長のGallus gallus (ニワトリ) 高分子量核抗原 (フラグメント) (Acc.No. 057580) (配列番号79) に対して、332アミノ酸残基のうち78 (2

3%) 同一であり、そして332残基のうち113塩基(34%)陽性である。

【0130】

表7D. ニワトリHMMNA(配列番号79)に対するAMF7のBLAST
P

【0131】

【表7D】

```

057580 gallus gallus (chicken). high molecular mass nuclear antigen (fragment).
11/1998 Length = 1151
      Score = 43.8,          bits (101.0), Expect = 0.002
      Identities = 78/332 (23%), Positives = 113/332, (34%)

Query: 44      WEPTGTRALKEPPGPE-TNGEDPLPACTPSPQDLKELEFLTQALEKAVRVRRGITKAEER 102
              ||| | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 52      WVPIG--GAPFPFGTEPTPPSKPTDGADAAPKASAEILTSEPPASPSPPDGEKAPSDAGEA 109

Query: 103     DKAPSLKRSIVTSSGTTASAPHSFGQAGGSVGDGTRVGMGART---PRPGAGLRDQQM 159
              + | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 110     EAGTFPPSQG-----PAGTFPPSQGAAGAPKGDGTAQFSGTKSGADGKPARQDVPKAT 162

Query: 160     AHASDTRPTKGLRQTTVRAKGHPERRLPSAAPQAFPAFLLKEKGLLRLPAPFRKAASQ 219
              | ++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 163     TAATEARPASA-ASPTVP-KATAEATAVTAASQSAPKAT-----DAAAVTAASQ 210

Query: 220     NS-SLWAQLSSTQTSDDSTDAAAAKTQFLQNMQTASGGPQPRLS----- 261
              ++ ++ + + + | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 211     SAPKATVEVKEAAAVAKEAKAVTAAARAPKATBAKAPVTSPTIPCSAEAKPLTAAS 270

Query: 262     --AVEVEAENGRLRKCSSLRLRMRRELSAAPMDWNQEVRCLLTLEGLQAMVGGCLHRLQ 319
              | + | | | + | | + + | | | | + + + + + + | + + +
Sbjct: 271     PTASHKATAEAKFVPATASLMATKVTAEAKPAPSPSVP--KATTDTKAVTATAPKAGPDVE 328

Query: 320     ELRAAVAEQPPRCPVGRPPGASPSGCGRAEP 351
              | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 329     PAVAVCAEAKPAPP---PPQQLPKAAAAAAP 357

```

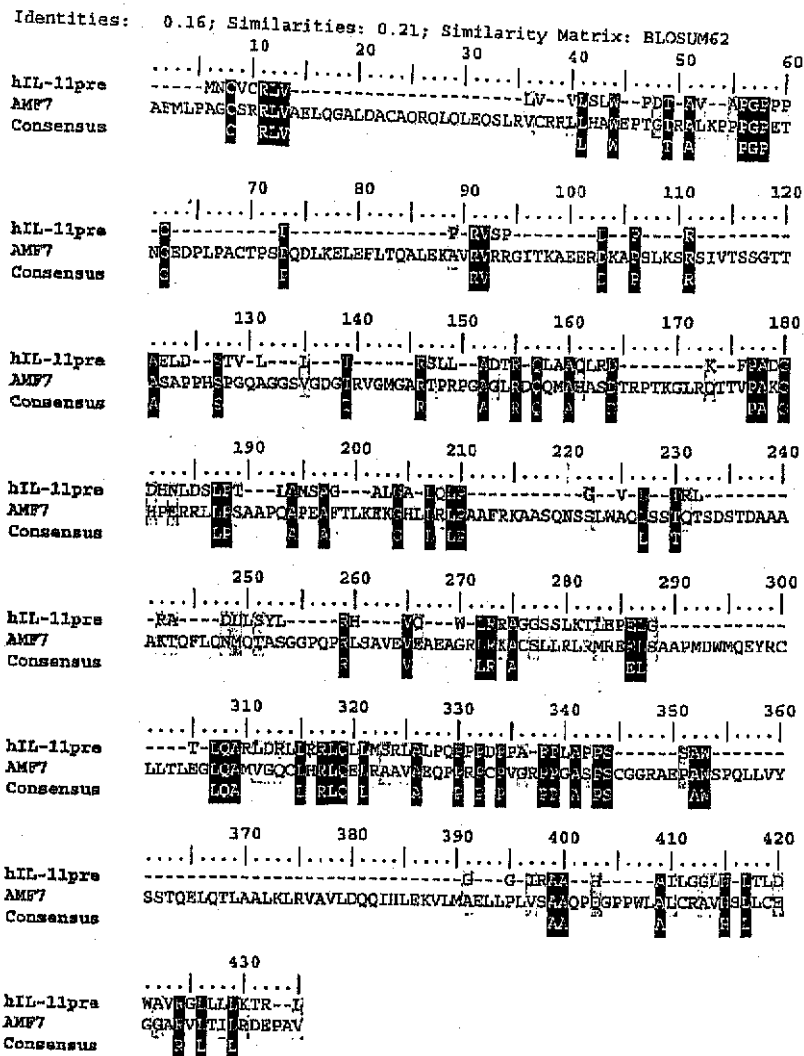
AMF7はまた、表7Eに示される、インターロイキン-11前駆体(IL-11)(Adipogenesis Inhibitor Y Factor)(AGIF)(GenBank Acc.No.P20809)(配列番号80)と16%同一であり、21%陽性である。

【0132】

(表7E. IL-11前駆体(配列番号80)に対するAMF7のBLAST
P)

【0133】

【表7E】



AMF7における同定可能なドメイン、および他の全てのAMF Xタンパク質の存在は、PROSITE、DOMAIN、BLOCKS、Pfam、ProDomain、およびPrintsのようなソフトウェアアルゴリズムを用いる検索によって、次いでInterpro website (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>)を用いてドメインマッチ(または数)を掛け合わせるによりInterpro数を決定することによって決定される。次いで、DOMAINの結果を、Reverse Position Specific BLAST分析を用いた保存ドメインデータベース(Conserved Domain Database)(CDD)から収集し得る。このBLAST分析ソフトウェアサンプルドメインは、SmartおよびPfa

m収集において見出される。

【0134】

AMFX RNAについての発現情報は、実施例に記載のような、以下：独自データベースソース、公的ESTソース、文献ソース、および/またはRACEソースを含むがこれに限定されない組織供給源を用いて得られた。AMF7は、少なくとも以下の組織：結腸、卵巣、肺、腎および脳の癌において発現される。肺および腎の癌細胞株における発現は、癌胎児性表現型を示す、胎児組織における発現と関連する。

【0135】

AMF7の核酸およびタンパク質は、種々のAMF関連病理および/または障害に關与する、可能性のある治療適用において有用である。例えば、IL-11様タンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得、そしてIL-11様タンパク質は、その治療に必要な被験体に投与された場合に有用であり得る。この新規な、AMF7タンパク質をコードする核酸、またはそのフラグメントは、診断適用においてさらに有用であり得る。ここでこの核酸またはタンパク質の存在または量が評価されるべきである。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0136】

AMFX核酸およびタンパク質は、下記の種々の疾患および障害、ならびに/または他の病状に關連する、可能性のある診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、以下：造血前駆細胞の増殖および血小板成熟に關する疾患、肺癌および腎癌、ならびに類似の他の疾患、障害および状態などに罹患する患者の処置に有効性を有する。非限定的な例として、本発明の組成物は、造血前駆細胞の増殖および血小板成熟に關する疾患、肺癌および腎癌に罹患する患者の処置に有効性を有する。さらなるAMF-関連疾患および障害が本明細書を通じて言及されている。

【0137】

さらに、AMF7についてのタンパク質類似性情報、発現パターン、およびマ

ッピング位置は、AMF 7が、AMFファミリーの特徴的な重要な構造的および/または生理学的な機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、可能性のある診断および治療の適用において、そして検索ツールとして有用である。これらは、特異的、または選択的な核酸またはタンパク質の診断および/または予測マーカーとしての働き（ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が、評価されるべきである）、ならびに以下：(i) タンパク質治療剤、(ii) 低分子薬物標的、(iii) 抗体標的（治療抗体、診断抗体、薬物標的化抗体/細胞毒性抗体）、(iv) 遺伝子治療（遺伝子送達/遺伝子アブレーション）において有用な核酸、ならびに(v) インビトロおよびインビボにおいて組織再生を促進する組成物、(vi) 生物学的防御武器、のような可能性のある治療適用を含む。

【0138】

これらの物質はさらに、治療方法または診断方法における使用のための、新規なAMF 7物質に免疫特異的に結合する抗体の生成において有用である。これらの抗体は、下記の「抗-AMF X抗体」の節に記載のような、疎水性チャートからの予測を用いて、当該分野で公知の方法に従って生成され得る。種々の実施形態において、考慮されるAMF 7エピトープは、疎水性または親水性プロットを作成する当該分野で周知のソフトウェアプログラムによって予想されるように、AMF 7ポリペプチドの親水性領域である。

【0139】

(AMF - 8 (Acc. 番号AC01136__Aとも呼ばれる))

AMF 1は、新規なプレイトロフィン様ポリペプチド(pleitrophin-like polypeptide)である。AMF 1クローンは、本明細書において、あるいはAcc. 番号AC01136__Aと呼ばれる。510ヌクレオチドのAMF 1核酸(配列番号15)を表8Aに示す。AMF 1のオープンリーディングフレーム(「ORF」)(配列番号16)は、ヌクレオチド1で開始する。AMF 1のORFは、ヌクレオチド510~513のTAAコドンで終わる。AMF 1タンパク質は、分泌タンパク質であると予想された。

【0140】

表8A . AMF - 8 DNA (配列番号15) およびポリペプチド (配列番号16)

【0141】

【表8A】

```

Translated Protein - Frame: 1 -Nucleotide 1 to 510
ATGCRGGCTCAACAGTACCAGCAGCAGCGTCGAAAATTGCGAGCTGCCCTTCTTGGCATTCAITTTTCATACITGGCAGCTGT 80
M Q A Q Q Y Q Q Q R R K F A A A F L A F I F I L A R V
GGATACTGCTGAAGCCGGGAAGAAAGAGAACCAGAAAARAAAGTGAGAAGTCTGACTGTGGAGAATGGCAGTGGAGTG 160
D T A E A G K K E K P E K K V K K S D C G E W Q W S V
TGTGTGTGCCACCACTGGADACTGTGGCTGGGACACGGGAGGGCACCTGGACTGGAGCTGAGTGCAAGCAAAACCATG 240
C V P T S G D C G L G T R B G T R T G A E C K Q T M
AAGACCCAGAGATGAAGATCCCTGCAACTGGAAGAAGCAATTTGGCGGAGTSCAAATCCAGTTCAGGCCCTGGGG 320
K T Q R C K I P C N W K K Q P G A E C K Y Q F Q A W G
AGAATGTGACCTGAACACAGCCCTGAAGACCAGAACTGGAGTCTGAAGCCGAGCCCTGCACRATGCCGAAATGCCGGAAGA 400
E C D L N T A L K T R T G S L K R A L H N A E C Q K T
CTGTCCACCATCTCCAGCCCTGTGGCAAACTGACCAAGCCCAACCTCAAGGTACCCCTAGAAGTAAAGTAAAAA 480
V T I S K P C G K L T K P K P Q G T L E L K V K K K
AAAAAATAAATAATCTGAGGAGACCTTTAG 513
K K K K N S E E T F

```

AMF - 8 関連核酸配列についてのBLASTN情報を表8Bに示す。

【0142】

表8B . AMF 8 についてのBLASTN分析結果

【0143】

【表8B】

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
HUMHNF1 M57399 Human nerve growth factor (HBNF-1) mRNA, com...	894	0.0
KSHBGF8 X52945 Human pleiotrophin (PTN) mRNA. 9/1993	894	0.0
AB004306 AB004306 Homo sapiens mRNA for osteoblast stimulat...	894	0.0
D89546 D89546 Porcine mRNA for pleiotrophic factor beta, com...	618	e-175
BTHBGF8 X52945 Bovine pleiotrophin (PTN) mRNA. 9/1993	609	e-172
RA7HBGAM M55601 R.norvegicus heparin-binding growth associat...	531	e-148
MUSOSF1 D90225 Mouse mRNA for OSF-1. 6/1999	502	e-139

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF 1 核酸配列が、表8Cに示される、ヒト神経成長因子 (GenBank Acc. 番号M57399) (配列番号81) に対して、541塩基のうち541塩基 (100%) 同一であることが、見出された。本明細書における全てのBLAST整列において、「E - 値」すなわち「期待値」は、確率の数値であり、この整列した配列は、検索されたデータベース内で、単に偶然によってBLAST問い合わせ配列に対してその類似性を達成した。例えば、表8Bに示されるように、AMF 1 BLAST分析から取り出された対象 (「Subject」) が、(この場合、ヒト

神経成長因子遺伝子)、純粹に偶然に問い合わせAMF 1配列に適合した確率は、0.0の期待値で示されるように、ゼロである。

【0144】

(表8C. ヒトNGF (配列番号81) に対するAMF 1のBLASTN)

【0145】

【表8C】

```
>H0MBNF1 M57399 Human nerve growth factor (HBNF-1) mRNA, complete cds. 4/1993
Length = 1029; Strand = Plus / Plus
Score = 894 bits (451), Expect = 0.0
Identities = 451/451 (100%)

Query: 1  atgcaggctcaacagtaccagcagcagcgtcgaaaatttgcagctgccttcttggcattc 60
          |||
Sbjct: 396 atgcaggctcaacagtaactagcagcagcgtcgaaaatttgcagctgccttcttggcattc 455

Query: 61  attttcatactggcagctgtggatactgctgaagcagggagaagagaaccagaaaa 120
          |||
Sbjct: 456 attttcatactggcagctgtggatactgctgaagcagggagaagagaaccagaaaa 515

Query: 121 aaagtgaagaagtctgactgtggagaatggcagtgagtggtgtgtgcccaccagtgga 180
          |||
Sbjct: 516 aaagtgaagaagtctgactgtggagaatggcagtgagtggtgtgtgcccaccagtgga 575

Query: 181 gactgtgggctgggcacacgggagggcactcggactggagctgagtgcaagcaaacctg 240
          |||
Sbjct: 576 gactgtgggctgggcacacgggagggcactcggactggagctgagtgcaagcaaacctg 635

Query: 241 aagadccagagatgtaagatccctgcaactggaagaagcaatttggcggagtgcaaa 300
          |||
Sbjct: 636 aagadccagagatgtaagatccctgcaactggaagaagcaatttggcggagtgcaaa 695

Query: 301 taccagttccaggcctggggagaatgtgacctgaaacacagcctgaagaccagaactgga 360
          |||
Sbjct: 696 taccagttccaggcctggggagaatgtgacctgaaacacagcctgaagaccagaactgga 755

Query: 361 agtctgaagcgagcctgcacaatgccgaatgocagaagactgtcaccatctccaagccc 420
          |||
Sbjct: 756 agtctgaagcgagcctgcacaatgccgaatgocagaagactgtcaccatctccaagccc 815

Query: 421 tgtggcaactgaccaagcccacactcaag 451
          |||
Sbjct: 816 tgtggcaactgaccaagcccacactcaag 846
```

BLASTP検索を、公的なタンパク質データベースについて実施した。この比較からの結果を表8Dに示す。

【0146】

(表8D. AMF 8についてのBLASTP分析の結果)

【0147】

【表8D】

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
FGFJ_HUMAN O95750 homo sapiens (human). fibroblast growth fa...	92	2e-18
O95750 O95750 homo sapiens (human). fgf-19. 5/1999	92	2e-18
FGFF_MOUSE O35622 mus musculus (mouse). fibroblast growth fa...	79	1e-14
FGF3_MOUSE P05524 mus musculus (mouse). int-2 proto-oncogene...	71	5e-12
FGF3_HUMAN P11487 homo sapiens (human). int-2 proto-oncogene...	70	8e-12

例えば、表 8 E に示されるように、AMF 8 タンパク質は、216 アミノ酸残基長のヒト線維芽細胞増殖因子 (Acc. No. 095750) (配列番号 82) に対して、143 アミノ酸残基のうち 57 個 (39%) が同一であり、143 残基のうちの 79 個 (54%) がポジティブである。

【0148】

(表 8 E . ヒト FGF (配列番号 82) に対する AMF 1 の BLASTP)

【0149】

【表 8 E】

```

>FGFJ_HUMAN O95750 homo sapiens (human). fibroblast growth factor-19 precursor(fgf-19). 10/2000 Length = 216
Score = 92.1 bits (225), Expect = 2e-18
Identities = 57/143 (39%), Positives = 79/143 (54%), Gaps = 5/143 (4%)

Query: 15  VSVLAGLLLGACQAHPIP--DSSPLLQFG--GQVRQRYLYTDDAQQ-TEAHLREIDGTV 69
          | +| | | | | | | | + | + | + + | + | +| | | | | |
Sbjct: 10  VWILAGLWL-AVAGRPLAFSDAGPHVHYGWGQPIRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVV 68

Query: 70  GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE 129
          | | | | | +| + | + | | + | + | | + | | + | + | + |
Sbjct: 69  DCARGQSAHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGGMQGLLQYSEEDCAFEERIRP 128

Query: 130 DGYNVYQSEARGLPLHLPLQLRR 152
          ||| | | +| | | + | ++|
Sbjct: 129 DGYNVYRSEKRLPVLSSAKQR 151

```

AMF X RNA についての発現情報を、実施例に記載されるように、以下を含むがこれらに限定されない組織供給源を使用して誘導した：独自のデータベース供給源、公的 EST 供給源、文献供給源および/または RACE 供給源。AMF 1 は、少なくとも以下の組織、いくつかの脳腫瘍細胞株および胎児由来組織において発現される。AMF 1 の核酸およびタンパク質は、種々の AMF に関連する病状および/または障害に関連する潜在的な治療適用において有用である。例えば、プレイオトロピン様タンパク質をコードする cDNA は、遺伝子治療において有用であり得、そしてこのプレイオトロピン様タンパク質は、その必要のある被検体に投与される場合に、有用であり得る。AMF 1 タンパク質をコードす

る新規な核酸、またはそのフラグメントは、診断適用において、さらに有用であり得、ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が、評価される。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0150】

AMFX核酸およびタンパク質は、以下に記載される種々の疾患および障害、ならびに/または他の病状に関係した潜在的な診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、癌および他の細胞増殖疾患を罹患する患者の処置のための効力を有する。非限定的な例によって、本発明の組成物は、癌および他の細胞増殖疾患を罹患する患者の処置のための効力を有する。さらなるAMF関連疾患および障害が、本明細書を通して言及される。

【0151】

さらに、タンパク質類似性情報、発現パターンおよびAMF1に対するマップ位置は、AMF1が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的機能および/または生理学的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、潜在的な診断適用および治療適用において有用であり、そして研究ツールとして有用である。これらは、特定のまたは選択的核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとして機能し、ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が評価され、そして以下のような潜在的な治療適用が、評価される：(i)タンパク質治療剤、(ii)小分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞障害性抗体)、(iv)遺伝子治療(遺伝子送達/遺伝子切断)において有用な核酸、および(v)インビトロおよびインビボで組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的な防御武器。

【0152】

これらの物質は、治療方法または診断方法において使用するための新規なAMF1物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらの抗体は、当該分野で公知の方法に従って、以下の「抗AMFX抗体」の節に記載されるように、疎水性チャートからの予測を使用して、生成され得る。種々の実施形態において、意図されたAMF1エピトープは、疎水性プロットまたは親

水性プロットを生成する、当該分野で周知のソフトウェアによって予測されるようなAMF 1ポリペプチドの親水性領域である。

【0153】

(AMF - 9 (これはまた、Acc. No. AL307658と称される))
AMF 9は、新規なGPCR様ポリペプチドである。このAMF 9クローンは、あるいは、本明細書中でAcc. No. AL307658と称される。このAMF 9核酸(配列番号17)は、図9Aに示される。AMF 9のオープンリーディングフレーム(「ORF」)(配列番号18)は、94アミノ酸タンパク質をコードする。このAMF 9ポリペプチドは、ネガティブなリーディングフレームにコードされる。以下に示されるこの配列は、予測されるNからCへの方向へのタンパク質のリーディングを可能にするように、逆方向で相補的であり、そして再番号付けされた。

【0154】

(表9A: AMF - 9 DNA (配列番号17) およびポリペプチド (配列番号18))

【0155】

【表9A】

Translated Protein - Frame: -1 - Nucleotide 16 to 297

```
CGAAGGGCTTTACAAATGCTAGGTGTGGTCTGGCTGGTGGCAGTCATCGTAGGATCACCCATGTGGCACGTGCACAACT 80
      M L G V V N L V A V I V G S P M W H V Q Q L
TGAGATCAAATATGACTTCCTATATGAAAAGGAACACATCTGCTGCTTAGAAGAGTGGACCCAGCCCTGTGCACCAGAAGA 160
      E I K Y D F L Y E K E H I C C L E E W T S P V H Q K I
TCTACACCACCTTCATCCTTGTCTCCTCTCCTCCTGCTCTTATGSAAGAAGAAAGGCTGTCATTATGATGGTGAC 240
      Y T T F I L V I L F L L P L M E E E T S C H Y D G D
AGTGGTGGCTCTCTTGTGCTGTGCTGGGCACCATTCATGTTGTCCTATGATGATTGAATACAGTAATTTTGAAGG 320
      S G G S L C C V L G T I P C C P Y D D
AATATGATGATGTCACAATCAAGATGATTTTGGCTATCGTGCAATTATTGGATTTTCCAACTCCATCTGTAATCCCAT 400
      GTCTATGCATTTATGAATGAAAACCTTCAAAA 432
```

B L A S T N分析は、以下の表9に示されるように、有意な相同性を生じなかった。本明細書中の全てのB L A S T配列において、「E値」または「期待値」は、この整列された配列が、検索されたデータベース内で、偶然によって、B L A S T問い合わせ配列に対するそれらの類似性を達成し得る確率の数字的指標で

ある。

【0156】

(表9B: AMF9についてのBLASTN整列の結果)

【0157】

【表9B】

クローニング ライブラリー (GenBank Main)	始り - 終り	説明	スコア	E 値
gb:AL079305 CNS00M8M	[255- 276]	Human chromosome 14 DNA sequence *** IN PROGRESS *** BAC R-306B9 of library RPC1-11 from chromosome 14 of Homo sapiens (Human), complete sequence.	44.1	0.059
gb:AP001729 AP001729	[219- 240]	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q, section 73/105.	44.1	0.059
gb:AP001436 AP001436	[219- 240]	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, clone:T556, LB7T-ERG region, complete sequence.	44.1	0.059
gb:AP000156 AP000156	[219- 240]	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.2, DSCR region, clone D47-S479, segment 8/16, complete sequence.	44.1	0.059
gb:AP000014 AP000014	[219- 240]	Homo sapiens genomic DNA of 21q22.2 Down Syndrome region, segment 7/13.	44.1	0.059
gb:L21977 PETACO2A	[276- 297]	Petunia hybrida potential 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO2) pseudogene sequence.	44.1	0.059

BLASTP検索を、公的タンパク質データベースについて実施した、この比較からの結果を、表9Cに示す。表9Bおよび表9Cの両方において、全ての得られたE値が0.001よりも大きいという事実によって示されるように、AMF9に対する高度に有意な相同性を有するデータベースエントリーは、同定されず、すなわち、偶然によってAMF9問い合わせ配列に対する相同性を有する検索された公的なデータベース内の少なくとも1つの対象配列は、1000に1つよりも頻繁である。

【0158】

(表9C: AMF9についてのBLASTP整列の結果)

【0159】

【表9C】

SwissProt + SpTrEMBL (=番号)	始り -終り	説明	スコア	E 値
spt:Q62805 GALR RAT	[2-64]	GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).	40.2	0.003
spt:P56479 GALR MOUSE	[2-64]	GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).	40.2	0.003
spt:P50391 NY4R HUMAN	[4-63]	NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 4 (NPY4-R) (PANCREATIC POLYPEPTIDERECPTOR 1) (PP1).	39.1	0.008
spt:Q9Z2D4 Q9Z2D4	[4-63]	PANCREATIC POLYPEPTIDE RECEPTOR Y4.	39.1	0.008
spt:Q61041 NY4R_MOUSE	[4-63]	NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 4 (NPY4-R) (PANCREATIC POLYPEPTIDERECPTOR 1) (PP1) (NPYR-D).	37.9	0.017
spt:O73734 O73734	[2-64]	NEUROPEPTIDE Y/PEPTIDE YY RECEPTOR YC.	37.5	0.023
spt:O97505 O97505	[4-63]	NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 4.	37.5	0.023
spt:Q22995 Q22995	[3-62]	SIMILAR TO FAMILY 1 OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS.	37.5	0.023

例えば、表9Dに示されるように、AMF9タンパク質は、346アミノ酸残基長のラットガラニンレセプターI型(配列番号83)に対して、63アミノ酸残基のうちの18(29%)が同一であり、63残基のうちの33(52%)がポジティブである。

【0160】

(表9D. ラットガラニンRセプター1型(配列番号83)に対するAMF9のBLASTP)

【0161】

【表9D】

```
GALR_RAT rattus norvegicus (rat). galanin receptor type 1 (gal1-r) (galr1). 7/1998
Length = 346, Score = 40.2, bits (92.0), Expect = 0.003
Identities = 18/63 (29%), Positives = 33/63, (52%)
```

```
Query: 2      LGVVVLLVAVIVGSPMWRVQQLKTRVDFLYEKEHICCLEENTSPVHQKTYTTFILVILFLL 61
             || | | |++ + ||+ + |+| | + | | | | + + |+| | | +||
Sbjct: 155    VGFVIALSLIAMSPPVAVYVQRL-----FHRDSNQTFCWEHWPNQLKPKAYVVCVFVFCYLL 209

Query: 62      PLM 64
             ||+
Sbjct: 210    PLL 212
```

AMF9の核酸およびタンパク質は、種々のAMFに関連する病状および/または障害に関連する潜在的な治療適用において有用である。例えば、GPCR様タンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得、そしてこのGPCR様タンパク質は、その必要のある被検体に投与される場合に、有用

であり得る。AMF9タンパク質をコードする新規な核酸、またはそのフラグメントは、診断適用において、さらに有用であり得、ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が、評価される。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0162】

AMFX核酸およびタンパク質は、以下に記載される種々の疾患および障害、ならびに/または他の病状に関係した潜在的な診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、癌および他の細胞増殖疾患を罹患する患者の処置のための効力を有する。非限定的な例によって、本発明の組成物は、癌および他の細胞増殖疾患を罹患する患者の処置のための効力を有する。さらなるAMF関連疾患および障害が、本明細書を通して言及される。

【0163】

さらに、AMF9に対するタンパク質類似性情報、発現パターンおよびマップ位置は、AMF9が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的機能および/または生理学的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、潜在的な診断適用および治療適用において有用であり、そして研究ツールとして有用である。これらは、特定のまたは選択的核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとして機能し、ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が評価され、そして以下のような潜在的な治療適用が、評価される：(i)タンパク質治療剤、(ii)小分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞障害性抗体)、(iv)遺伝子治療(遺伝子送達/遺伝子切断)において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボで組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的な防御武器。

【0164】

これらの物質は、治療方法または診断方法において使用するための新規なAMF9物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらの抗体は、当該分野で公知の方法に従って、以下の「抗AMFX抗体」の節に記載されるように、疎水性チャートからの予測を使用して、生成され得る。種々の

実施形態において、意図されたAMF 9エピトープは、疎水性プロットまたは親水性プロットを生成する、当該分野で周知のソフトウェアによって予測されるようなAMF 9ポリペプチドの親水性領域である。

【0165】

(AMF - 10 (これはまた、Acc . No . G55707__Aと称される)
)

AMF 10は、新規な増殖/分化因子 - 6様ポリペプチドである。このAMF 10クローンは、あるいは、本明細書中でAcc . No . G55707__Aと称される。1425ヌクレオチドのAMF 10核酸(配列番号19)は、図9Aに示される。AMF 10のオープンリーディングフレーム(「ORF」)(配列番号20)は、ヌクレオチド31で開始する。このAMF 10のORFは、ヌクレオチド1396~1398のTAGコドンで終結する。AMF 10タンパク質は、分泌タンパク質であることが予測される。このプログラムSignalPは、アミノ酸22と23との間の最も可能性のある切断部位を有するシグナルペプチドを予測する。AMF 10ポリペプチドの推定分子量は、50677Daである。

【0166】

(表10A: AMF - 10 DNA (配列番号19)およびポリペプチド(配列番号20))

【0167】

【表10A】

CTC CTG GGG AGA CGC AGC CAC TTG CCC GCC ATG GAT ACT CCC AGG	45
Met Asp Thr Pro Arg	
GTC CTG CTC TCG GCC GTC TTC CTC ATC AGT TTT CTG TGG GAT TTG	90
Val Leu Leu Ser Ala Val Phe Leu Ile Ser Phe Leu Trp Asp Leu	
CCC GGT TTC CAG CAG GCT TCC ATC TCA TCC TCC TGT TCG TCC GCC	135
Pro Gly Phe Gln Gln Ala Ser Ile Ser Ser Ser Cys Ser Ser Ala	
GAG CTG GGT TCC ACC AAG GGC ATG CGA AGC CGC AAG GAA GGC AAG	180
Glu Leu Gly Ser Thr Lys Gly Met Arg Ser Arg Lys Glu Gly Lys	
ATG CAG CGG GCG CCG CGC GAC AGT GAC GCG GGC CGG GAG GGC CAG	225
Met Gln Arg Ala Pro Arg Asp Ser Asp Ala Gly Arg Glu Gly Gln	
GAA CCA CAG CCG CGG CCT CAG GAC GAA CCC CGG GCT CAG CAG CCC	270
Glu Pro Gln Pro Arg Pro Gln Asp Glu Pro Arg Ala Gln Gln Pro	
CGG GCG CAG GAG CCG CCA GGC AGG GGT CCG CGC GTG GTG CCC CAC	315
Arg Ala Gln Glu Pro Pro Gly Arg Gly Pro Arg Val Val Pro His	
GAG TAC ATG CTG TCA ATC TAC AGG ACT TAC TCC ATC GCT GAG AAG	360
Glu Tyr Met Leu Ser Ile Tyr Arg Thr Tyr Ser Ile Ala Glu Lys	
CTG GGC ATC AAT GCC AGC TTT TTC CAG TCT TCC AAG TCG GCT AAT	405
Leu Gly Ile Asn Ala Ser Phe Phe Gln Ser Ser Lys Ser Ala Asn	
ACG ATC ACC AGC TTT GTA GAC AGG GGA CTA GAC GAT CTC TCG CAC	450
Thr Ile Thr Ser Phe Val Asp Arg Gly Leu Asp Asp Leu Ser His	
ACT CCT CTC CCG AGA CAG AAG TAT TTG TTT GAT GTG TCC ATG CTC	495
Thr Pro Leu Arg Arg Gln Lys Tyr Leu Phe Asp Val Ser Met Leu	
TCA GAC AAA GAA GAG CTG GTG GGC GCG GAG CTG CGG CTC TTT CGC	540
Ser Asp Lys Glu Glu Leu Val Gly Ala Glu Leu Arg Leu Phe Arg	
CAG GCG CCC TCA GCG CCC TGG GGG CCA CCA GCC GGG CCG CTC CAC	585
Gln Ala Pro Ser Ala Pro Trp Gly Pro Pro Ala Gly Pro Leu His	
GTG CAG CTC TTC CCT TGC CTT TCG CCC CTA CTG CTG GAC GCG CGG	630
Val Gln Leu Phe Pro Cys Leu Ser Pro Leu Leu Leu Asp Ala Arg	
ACC CTG GAC CCG CAG GGG GCG CCG CCG GCC GGC TGG GAA GTC TTC	675
Thr Leu Asp Pro Gln Gly Ala Pro Pro Ala Gly Trp Glu Val Phe	
GAC GTG TGG CAG GGC CTG CGC CAC CAG CCC TGG AAG CAG CTG TGC	720
Asp Val Trp Gln Gly Leu Arg His Gln Pro Trp Lys Gln Leu Cys	
TTG GAG CTG CGG GCC GCA TGG GGC GAG CTG GAC GCC GGG GAG GCC	765
Leu Glu Leu Arg Ala Ala Trp Gly Glu Leu Asp Ala Gly Glu Ala	

【表10A】の続き

GAG GCG CGC GCG CGG GGA CCC CAG CAA CCG CCG CCC CCG GAC CTG	810
Glu Ala Arg Ala Arg Gly Pro Gln Gln Pro Pro Pro Pro Asp Leu	
CGG AGT CTG GGC TTC GGC CGG AGG GTG CGG CCT CCC CAG GAG CGG	855
Arg Ser Leu Gly Phe Gly Arg Arg Val Arg Pro Pro Gln Glu Arg	
GCC CTG CTG GTG GTA TTC ACC AGA TCC CAG CGC AAG AAC CTG TTC	900
Ala Leu Leu Val Val Phe Thr Arg Ser Gln Arg Lys Asn Leu Phe	
GCA GAG ATG CGC GAG CAG CTG GGC TCG GCC GAG GCT GCG GGC CCG	945
Ala Glu Met Arg Glu Gln Leu Gly Ser Ala Glu Ala Ala Gly Pro	
GGC GCG GGC GCC GAG GGG TCG TGG CCG CCG CCG TCG GGC GCC CCG	990
Gly Ala Gly Ala Glu Gly Ser Trp Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro	
GAT GCC AGG CCT TGG CTG CCC TCG CCC GGC CGC CCG CCG CCG CGC	1035
Asp Ala Arg Pro Trp Leu Pro Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg	
ACG GCC TTC GCC AGT CGC CAT GGC AAG CCG CAC GGC AAG AAG TCC	1080
Thr Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser	
AGG CTA CGC TGC AGC AAG AAG CCC CTG CAC GTG AAC TTC AAG GAG	1125
Arg Leu Arg Cys Ser Lys Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu	
CTG GGC TGG GAC GAC TGG ATT ATC GCG CCC CTG GAG TAC GAG GCC	1170
Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala	
TAT CAC TGC GAG GGT GTA TGC GAC TTC CCG CTG CGC TCG CAC CTG	1215
Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu	
GAG CCC ACC AAC CAC GCC ATC ATC CAG ACG CTG ATG AAC TCC ATG	1260
Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met	
GAC CCC GGC TCC ACC CCG CCC AGC TGC TGC GTG CCC ACC AAA TTG	1305
Asp Pro Gly Ser Thr Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu	
ACT CCC ATC AGC ATT CTA TAC ATC GAC GCG GGC AAT AAT GTG GTC	1350
Thr Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn Val Val	
TAC AAG CAG TAC GAG GAC ATG GTG GTG GAG TCG TGC GGC TGC AGG	1395
Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg	
TAG CCG TGC CTT TCC CGC CGC CTT GGC CCG	1425

公的な核酸配列データベースの分析において、例えば、AMF10核酸配列は、表10Bに示される雄ウシ軟骨由来形態形成タンパク質2 (GenBank Acc.No. BTU13661) (配列番号84) に対して95/98塩基(96%)の同一性を有する。本明細書中の全てのBLAST配列において、「E値」または「期待値」は、この整列された配列が、検索されたデータベース内で、偶然によって、BLAST問い合わせ配列へのそれらの類似性を達成し得る確率の数字的指標である。

(表10B: CDMP2 (配列番号84) に対するAMF10のBLASTN)

【0169】

【表10B】

```
>BTUL3661 U13661 Bos taurus cartilage-derived morphogenetic protein 2 (CDMP-2) mRNA,
complete cds. 1/1995, Length = 1308; Strand = Plus / Plus
Score = 170 bits (86), Expect = 8e-41
Identities = 95/98 (96%)
```

```
Query: 3 gacttactccatcgctgagaagctgggcatcaatgccagctttttccagtcttccaagtc 62
      |||
Sbjct: 234 gacttactccatcgctgagaagctgggcatcaatgctagctttttccagtcttccaagtc 293

Query: 63 ggctaatacagatcaccagctttgtagacaggggactag 100
      |||
Sbjct: 294 ggctaatacagatcactagctttgtagacaggggactag 331
```

関連する核酸配列についてのさらなるBLASTN情報を、表10Cに示す。

【0170】

【表10C】

表 10C

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
BTUL3661 U13661 Bos taurus cartilage-derived morphogenetic...	170	8e-41
AC058786 AC058786 Mus musculus clone RF23-11707, complete ...	151	7e-35
AF155125 AF155125 Xenopus laevis growth and differentiatio...	56	3e-06

BLASTP検索を、公的タンパク質データベースについて実施した。この比較からの結果を表10Dに示す。表10Dに示されるように、このAMF10タンパク質は、436アミノ酸残基長の雄ウシ増殖および分化因子6前駆体(Acc.No.P55106)(配列番号85)に対して、435アミノ酸残基のうち354個(81%)と同一であり、435残基のうち372個(85%)ポジティブである。

【0171】

(表10D: GDF6前駆体(配列番号85)に対するAMF10のBLASTP)

【0172】

【表10D】

【0173】

AMF X核酸およびタンパク質は、以下に記載される種々の疾患および障害、ならびに/または他の病状に関係した潜在的な診断適用および治療適用において有用である。例えば、本発明の組成物は、癌および他の細胞増殖疾患を罹患する患者の処置のための効力を有する。非限定的な例によって、本発明の組成物は、癌および他の細胞増殖疾患を罹患する患者の処置のための効力を有する。さらなるAMF関連疾患および障害が、本明細書を通して言及される。

【0174】

さらに、タンパク質類似性情報、発現パターンおよびAMF 10に対するマップ位置は、AMF 10が、AMFファミリーに特徴的な重要な構造的機能および/または生理学的機能を有し得ることを示唆する。従って、本発明の核酸およびタンパク質は、潜在的な診断適用および治療適用において有用であり、そして研究ツールとして有用である。これらは、特定のまたは選択的核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとして機能し、ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が評価され、そして以下のような潜在的な治療適用が、評価される：(i)タンパク質治療剤、(ii)小分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療的、診断的、薬物標的化/細胞障害性抗体)、(iv)遺伝子治療(遺伝子送達/遺伝子切断)において有用な核酸、ならびに(v)インビトロおよびインビボで組織再生を促進する組成物、(vi)生物学的な防御武器。

【0175】

これらの物質は、治療方法または診断方法において使用するための新規なAMF 10物質に免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。これらの抗体は、当該分野で公知の方法に従って、以下の「抗AMF X抗体」の節に記載されるように、疎水性チャートからの予測を使用して、生成され得る。種々の実施形態において、意図されたAMF 10エピトープは、疎水性プロットまたは親水性プロットを生成する、当該分野で周知のソフトウェアによって予測されるようなAMF 10ポリペプチドの親水性領域である。

【0176】

(AMF X核酸およびポリペプチド)

本発明において開示される新規なAMFX核酸およびポリペプチド配列は、表11に要約されるものを含む。

【0177】

(表11. AMFX配列および対応する配列番号)

【0178】

【表11】

AMFX 番号	内部同定	配列番号 (本発明)	配列番号 (データベース)	相同性
1	14209510	1	2	フィブリノゲン前駆体
2	20421338	3	4	ネリン
3	27251385	5	6	フィブリノゲン前駆体
4	27486474	7	8	アラスミン
5	29691387	9	10	有機アノキスホーター
6	12996895_1	11	12	MEGF6
7	38905521	13	14	IL-11
8	AC11036_A	15	16	アレイトロン
9	AL307658	17	18	GPCR13
10	GM55707_EXT.0.1_dal	19	20	GDF6

本発明の1つの局面は、AMFXポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、本発明には、AMFX核酸分子の増幅および/または変異のためのPCRプライマーとして使用するためのAMFXコード核酸(例えば、AMFX mRNA)およびフラグメントを同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用のために十分な核酸分子が含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチドアナログを使用して生成されたDNAまたはRNAのアナログ、ならびにこれらの誘導體、フラグメント、およびホモログを含むことが意図される。この核酸分子は、単鎖または二重鎖であり得るが、好ましくは二重鎖DNAを含む。

【0179】

AMFX核酸は、成熟AMFXポリペプチドをコードし得る。本明細書中で使用される場合、本発明に開示されるポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形

態は、天然に存在するポリペプチドあるいは前駆体形態またはプロタンパク質の産物である。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、非制限例として、対応する遺伝子によってコードされる完全長遺伝子産物が挙げられる。あるいは、本明細書中で記載されるORFによってコードされる、ポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として規定され得る。産物「成熟」形態は、さらに非制限例として、遺伝子産物が産生される細胞、または宿主細胞中で発生し得る、1以上の天然に存在するプロセッシング工程の結果として発生する。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態に導くこのようなプロセッシング工程の例としては、ORFの開始コドンによってコードされる、N-末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドもしくはリーダー配列のタンパク分解性切断が挙げられる。従って、残基1~N(ここで、残基1は、N-末端メチオニンである)を有する、前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、N-末端メチオニンの除去後に残った残基2~N末端を有する。あるいは、残基1~Nを有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態(ここで、残基1~残基M由来のN末端シグナル配列が切断される)は、残った残基M+1~残基Nの残基を有する。本明細書中でさらに使用されるように、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断事象以外の、翻訳後改変事象の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非制限例として、グリコシル化、ミリストイル化、またはリン酸化が挙げられる。一般に、成熟ポリペプチドまたは成熟タンパク質は、これらのプロセスの1つのみの作用、またはそれらの任意の組み合わせから生じ得る。

【0180】

本明細書中で用いられる用語「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、特異的な使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド(nt)、100nt、または例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長さの長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてまたPCR、膜ベースのハイ

ブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計され得る。

【0181】

本明細書中で用いられる用語「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されている核酸である。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれる組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持される組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸分子に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたAMFX核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でこの核酸に天然で隣接する、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

【0182】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこの上述のヌクレオチド配列の任意の相補体は、標準的な分子生物学的技術および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19の核酸配列の全部または一部を使用して、AMFX核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術（例えば、Sambrookら（編）、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989；およびAusubelら、（編）、CURRENT PROTOCOLS IN MO

LECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993に記載される)を用いて単離され得る。

【0183】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技術に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、AMFXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

【0184】

本明細書中で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられる十分多数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ntの長さ、好ましくは約15nt~30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態において、100nt未満の長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてまたプローブとして用いられ得る。

【0185】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。さらに別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部の相補体である核酸分子を含む。任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、

15、17および19に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、任意の配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示される核酸配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

【0186】

本明細書中で用いる用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物またはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を規定する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的であるかまたは間接的であり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の効果を紹介するか、または起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物の効果を紹介して、または起因して生じないが、かわりにその他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

【0187】

本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の(連続する)核酸配列または少なくとも4個の(連続する)アミノ酸配列(それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ)として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくらかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する(しかし、同一ではない)が、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。

【0188】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、誘導体またはアナログが、修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長、または全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一のサイズの核酸配列またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列に比較した場合（この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される）、少なくとも約70%、80%、もしくは95%もの同一性（好ましい同一性は、80~95%）で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。

【0189】

本明細書中で用いる「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、AMFXポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの代替的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のAMFXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に存在する対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトAMFXタンパク質をコードするヌク

レオチド配列を含まない。相同核酸配列は、任意の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびAMFX活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。AMFXタンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。

【0190】

AMFXポリペプチドは、AMFX核酸のオープンリーディングフレーム（「ORF」）によってコードされる。ORFは、潜在的にポリペプチドに翻訳され得る核酸配列に対応する。ORFを含む核酸のストレッチは、終止コドンにより中断されない。完全タンパク質のコード配列を示すORFは、ATG「開始」コドンで始まり、そして3つの停止コドン、すなわち、TAA、TAG、またはTGAの1つで停止する。本発明の目的には、ORFは、開始コドン、ストップコドン、またはその両方をともなうか、またはそれらのないコード配列の任意の部分であり得る。真実の細胞タンパク質をコードするための良好な候補として考慮されるべきORFには、最小サイズの要求（例えば、50アミノ酸またはそれ以上のタンパク質をコードするDNAのストレッチ）がしばしば設定される。

【0191】

ヒトAMFX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるAMFXホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のAMFXホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の天然に存在する変異体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0192】

ヒトAMFXヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、AMFXタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のAMFXをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、AMFX mRNAレベルを検出すること、またはゲノムAMFX遺伝子の変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

【0193】

「AMFXポリペプチドの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「AMFXの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、AMFXの生物学的活性（AMFXタンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の一部を単離し、AMFXタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてAMFXのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。

【0194】

（AMFX核酸およびポリペプチド改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。それにより、これらの核酸は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じAMFXタンパク質をコードする。別の実施形態

において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0195】

配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヒトAMFXヌクレオチド配列に加えて、AMFXのアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが、当業者によって理解される。AMFX遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、AMFXタンパク質、好ましくは哺乳動物のAMFXタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、AMFX遺伝子のヌクレオチド配列において1～5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてAMFXの機能的活性を変化させない、AMFX内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

【0196】

さらに、他の種由来のAMFXタンパク質をコードし、従って、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のAMFXのcDNAの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒトAMFX核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒトcDNAまたはその一部を用いて単離され得る。

【0197】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7

、9、11、13、15、17もしくは19のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500、750、1000、1500、または2000以上のヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

【0198】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のAMFXタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralogs））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【0199】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点（ T_m ）より約5 低いように選択される。この T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下）温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 T_m では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン（またはその他の塩）、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、10nt~50nt）について少なく

とも約30、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【0200】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてAusubelら(編)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションに、0.2×SSC、0.01% BSA中での50での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する(例えば、天然のタンパク質をコードする)ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

【0201】

第2の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55での6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中での37での1回以上の

洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

【0202】

第3の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (重量/容量) デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中での50 での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびにKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

【0203】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、AMFX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加え

て、当業者は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、AMFXタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるAMFXタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を有意に変更することなく、AMFXの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のAMFXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。保存的置換が行われ得るためのアミノ酸は、当該分野で公知である。

【0204】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、AMFXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなAMFXタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18および20とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、それぞれ、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のアミノ酸配列に少なくとも約45%の相同性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約60%相同性であり、より好ましくは配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約80%相同性であり、さらにより好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約90%相同性であり、そして最も好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約95%相同性である。

【0205】

配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のタン

タンパク質に相同なAMFXタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

【0206】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）によって配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、AMFX中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、AMFXコード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、AMFXの生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

【0207】

アミノ酸ファミリーの関連性はまた、側鎖相互作用に基づいて決定され得る。置換アミノ酸は、十分に保存された「強い」残基または十分に保存された「弱い」残基であり得る。保存アミノ酸残基の「強い」基は、以下の基のいずれかであり得る：STA、NEQK、NHQK、NDEQ、QHRK、MILV、MILF、HY、FYW（ここで、一文字のアミノ酸コードは、互いに置換され得るアミノ酸によってグループ分けされる）。同様に、保存残基の「弱い」基は、以下のうちのいずれか1つであり得る：CSA、ATV、SAG、STNK、STPA、SGND、SNDEQK、NDEQHK、NDEQHK、NEQHRK、VLLIM、HFY（ここで、各グループ内の文字は、一文字のアミノ酸コードを表す）。

【0208】

1つの実施形態では、変異AMFXタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：(i)他のAMFXタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、(ii)変異AMFXタンパク質と、AMFXリガンドとの間の複合体形成；または(iii)変異AMFXタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；（例えば、アビジンタンパク質）。

【0209】

さらに別の実施形態において、成熟AMFXタンパク質は、特定の生物学的機能を調節する能力（例えば、インスリン放出の調節）についてアッセイされ得る。

【0210】

（アンチセンス核酸）

本発明の別の局面は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に

相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である)ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のAMFXコード鎖、またはそれらの一部のみに相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のAMFXタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のAMFXの核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0211】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、AMFXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、AMFXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、5'配列および3'配列をいう(すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる)。

【0212】

本明細書中に開示されるAMFXをコードするコード鎖配列を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、AMFX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、AMFX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、AMFX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸(例えば、ア

ンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る)。

【0213】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以下が挙げられる: 5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、*-D* - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、*-D* - マンノシルクエオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

【0214】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、AMFXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグループ(major groove)における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なpol IIプロモーターまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

【0215】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 β -アノマー核酸分子である。 β -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここで、通常の β -ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する(Gaultierら(1987)Nucleic Acids Res 15:6625~6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoueら、(1987)Nucleic Acids Res 15:6131~6148)またはキメラRNA-DNAアナログ(Inoueら(1987)FEBS Lett 215:327~

330) を含み得る。

【0216】

(リボザイムおよびPNA部分)

核酸改変は、非制限的な例として、改変された塩基、および糖リン酸骨格が改変または誘導体化されている核酸を含む。これらの改変は、少なくとも一部分、改変された核酸の化学的安定性を、それらが、例えば、被験体における治療的適用にアンチセンス結合性核酸として用いられ得るように増大するために実施される。

【0217】

1つの実施形態では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらに対してリボザイムが相補的領域を有する一本鎖核酸、例えばmRNAを切断し得るリボヌクレアーゼ活性をもつ触媒的RNA分子である。従って、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(HaselhofおよびGerlach(1988)Nature 334:585-591に記載されている))は、AMFX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってAMFX mRNAの翻訳を阻害するために用いられ得る。AMFXをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示のAMFX cDNAのヌクレオチド配列(すなわち、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、または19)に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が、AMFXをコードするmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に相補的であるように構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号;およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、AMFX mRNAは、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNAを選択するために用いられ得る。例えば、Bartelら(1993)Science 261:1411-1418を参照のこと。

【0218】

あるいは、AMFX遺伝子発現は、AMFXの調節領域(例えば、AMFXプロモーターおよび/またはエンハンサー)に相補的であるヌクレオチド配列を標

的化し、標的細胞中のAMFX遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般に、Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Heleneら (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; および Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15を参照のこと。

【0219】

種々の実施形態では、AMFXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変してペプチド核酸を生成し得る (Hyrupら (1996) *Bioorg Med Chem* 4:5-23を参照のこと)。本明細書で用いられる場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド (pseudopeptide) 骨格で置換され、かつ4つの天然のヌクレオ塩基のみが保持されている、核酸模倣物、例えば、DNA模倣物をいう。PNAの中性の骨格は、低イオン強度条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrupら (1996) 上述; Perry-O'Keefeら (1996) *PNAS* 93:14670-675に記載のような、標準的な固相ペプチド合成プロトコールを用いて実施され得る。

【0220】

AMFXのPNAは、治療適用および診断適用で用いられ得る。例えば、PNAは、例えば、転写または翻訳抑止 (arrest) を誘導すること、または複製を阻害することにより、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス剤またはアンチ遺伝子剤として用いられ得る。AMFXのPNAはまた、例えば、PNA指向PCRクランピングによる、例えば、遺伝子中の1塩基対変異の分析に; 他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼと組み合わせて用いる場合、人工の制限酵素として (Hyrup B. (1966) 上述); またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプローブまたはプライマーとして (Hyrupら (1966) 上述; Perry-O'Keefe (1996) 上述) 用いられ得る。

【0221】

別の実施形態では、AMFXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性の取り込みを増大するために、PNAに親油性基またはその他の補助基を結合することによるか、PNA-DNAキメラの形成によるか、またはリポソームの使用もしくは当該分野で公知の薬物送達のその他の技法によって改変され得る。例えば、PNAとDNAの有利な性質を組み合わせ得る、AMFXのPNA-DNAキメラが生成され得る。このようなキメラは、PNA部分の高い結合親和性および特異性を提供しながら、DNA部分と相互作用するために、DNA認識酵素、例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基間の結合の数、および配向の点から選択された適切な長さのリンカーを用いて連結され得る(Hyrup(1996) 上述)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup(1966) 上述およびFinnら(1996) *Nucl Acids Res* 24:3357-63に記載のように実施され得る。例えば、DNA鎖を、標準的なホルホルアミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成し得、そして改変ヌクレオシドアナログ、例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホルアミダイトを、PNAとDNAの5'末端との間に用い得る(Magら(1989) *Nucl Acid Res* 17:5973-88)。次いで、PNAモノマーを段階的様式でカップリングし、5' PNAセグメントと3' DNAセグメントをもつキメラ分子を生成する(Finnら(1996) 上述)。あるいは、キメラ分子は、5' DNAセグメントと3' PNAセグメントを有して合成され得る。Petersenら(1975) *Bioorg Med Chem Lett* 5:1119-11124を参照のこと。

【0222】

他の実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、ペプチド(例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的にするため)、または細胞膜を横切る輸送を容易にする薬剤(例えば、Letsingerら、1989、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556; Lemaitreら、1987、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648-652;

PCT公開公報番号WO88/09810を参照のこと)もしくは血液脳関門を横切る輸送を容易にする薬剤(例えば、PCT公開公報番号WO89/10134を参照のこと)のような他の付属基を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーショントリガー切断剤(例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6:958-976を参照のこと)またはインターカーレーティング剤(例えば、Zon、1988、Pharm. Res. 5:539-549を参照のこと)を用いて改変され得る。この目的のために、このオリゴヌクレオチドは、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーショントリガー架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーショントリガー切断剤などの他の分子に連結され得る。

【0223】

(AMFXポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、その配列が配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20によって提供されるAMFXポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。本発明はまた、なおそのAMFX活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードしながら、その任意の残基が配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に示される対応する残基から変化し得る、変異体または改変体タンパク質を含む。この変異体または改変体タンパク質において、20%までまたはそれ以上の残基がそのように変化し得る。

【0224】

一般に、AMFX様機能を保持するAMFX改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基(単数または複数)を挿入する可能性、および親配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む任意の改変体を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失は、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定されるような保存的置換である。

【0225】

本発明の1つの局面は、単離されたAMFXタンパク質、およびその生物学的

に活性な部分、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗AMFX抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態では、ネイティブAMFXタンパク質が、標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、AMFXタンパク質は、組換えDNA技法により生産される。組換え発現の代替として、AMFXタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。

【0226】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質または生物学的に活性なその部分は、AMFXタンパク質が由来する細胞供給源または組織供給源からの細胞性物質またはその他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、AMFXタンパク質が、単離されるかまたは組換えにより産生された細胞の細胞成分から分離されているこのタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態では、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非AMFXタンパク質（本明細書ではまた「汚染タンパク質」と呼ばれる）が約30%（乾燥重量による）より少ない、より好ましくは約20%より少ない非AMFXタンパク質、なおより好ましくは約10%より少ない非AMFXタンパク質、そして最も好ましくは約5%より少ない非AMFXタンパク質を有する、AMFXタンパク質の調製物を含む。このAMFXタンパク質または生物学的に活性なその部分が組換えにより産生される場合、培養培地を実質的に含まないこともまた好ましい。すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約20%より少ないか、より好ましくは約10%より少ないか、そして最も好ましくは約5%より少ない。

【0227】

用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質の合成に関与する化学的前駆体またはその他の化学物質からこのタンパク質が分離されているAMFXタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態では、用

語「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない」は、化学的前駆体または非AMFX化学物質を約30%（乾燥重量による）より少く、より好ましくは化学的前駆体または非AMFX化学物質を約20%より少なく、なおより好ましくは化学的前駆体または非AMFX化学物質を約10%より少なく、そして最も好ましくは化学的前駆体または非AMFX化学物質を約5%より少なく有するAMFXタンパク質の調製物を含む。

【0228】

AMFXタンパク質の生物学的に活性な部分は、完全長のAMFXタンパク質より少ないアミノ酸配列を含み、そしてAMFXタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、AMFXタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に示されるアミノ酸配列）に十分に相同であるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、AMFXタンパク質の少なくとも1つの活性をとまなうドメインまたはモチーフを含む。AMFXタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸の長さのポリペプチドであり得る。

【0229】

さらに、このタンパク質のその他の領域が欠失したその他の生物学的に活性な部分が、組換え技法により調製され、ネイティブなAMFXタンパク質の1つ以上の機能的活性について評価され得る。

【0230】

ある実施形態では、このAMFXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態では、このAMFXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に実質的に相同であり、そして以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子変動または変異誘発に起因してアミノ酸配列がなお異なるが、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態では、このAMFXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、1

6、18、または20のアミノ酸配列に少なくとも約45%相同であるアミノ酸配列を含み、そして配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のAMFXタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【0231】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列の相同性または2つの核酸の相同性のパーセントを決定するために、これらの配列を、最適な比較の目的にアラインする(例えば、第2のアミノ酸配列または核酸配列との最適アラインメントのために第1のアミノ酸配列または核酸配列の配列中にギャップを導入し得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、この分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書で用いられる場合、アミノ酸「相同性」または核酸「相同性」は、アミノ酸「相同性」または核酸「同一性」と等価である)。

【0232】

核酸配列相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。この相同性は、GCGプログラムパッケージで提供されるGAPソフトウェアのような当該分野で公知のコンピュータープログラムを用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443-453を参照のこと。GCG GAPソフトウェアを使用して核酸配列比較のために以下の設定を用い: 5.0のGAP作成ペナルティーおよび0.3のGAP伸長ペナルティー、上記で言及した類似の核酸配列のコード領域は、好ましくは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、または19に示されたDNA配列のCDS(すなわちコードする)部分と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性の程度を示す。

【0233】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、比較の特定の領域にわたって残基対残基の基本に基づいて同一である程度を

いう。用語「配列同一性のパーセント」は、その比較の領域にわたり最適にアラインされた配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合、A、T、C、G、U、またはI）が生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を生成すること、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）によって一致した位置の数を除すること、およびこの結果に100を乗じ配列同一性のパーセントを得ることにより算出される。本明細書で用いられる場合、用語「実質的に同一」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここで、このポリヌクレオチドは、比較領域にわたって参照配列と比較した場合、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性そしてしばしば90～95%の配列同一性、より通常は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0234】

（キメラおよび融合タンパク質）

本発明はまた、AMFXキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書で使用される場合、AMFX「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非AMFXポリペプチドと作動可能に連結されたAMFXポリペプチドを含む。「AMFXポリペプチド」は、AMFXに相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、一方、「非AMFXポリペプチド」は、このAMFXタンパク質に実質的に相同ではないタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう（例えば、AMFXタンパク質とは異なり、しかも同一かまたは異なる生物に由来するタンパク質）。AMFX融合タンパク質の中で、AMFXポリペプチドは、AMFXタンパク質のすべてか、またはその一部分に対応する。1つの実施形態では、AMFX融合タンパク質は、AMFXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態では、AMFX融合タンパク質は、AMFXタンパク質の少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結される」は、AMFXポリペプチドおよび非AMFXポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことを意図する。非AMFXポリペプチドは、AMFXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0235】

1つの実施形態では、この融合タンパク質は、GST-AMFX融合タンパク質であり、ここでAMFX配列が、GST（すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えAMFXの精製を容易にし得る。

【0236】

別の実施形態では、この融合タンパク質は、そのN末端に異質シグナル配列を含むAMFXタンパク質である。例えば、ネイティブなPTMA-7シグナル配列（すなわち、配列番号14のほぼアミノ酸1～40）を除去し得、そして別のタンパク質からのシグナル配列で置き換え得る。特定の宿主細胞では（例えば、哺乳動物宿主細胞）、AMFXの発現および/または分泌は、異質シグナル配列の使用を通じて増大され得る。

【0237】

なお別の実施形態では、この融合タンパク質は、AMFX-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでAMFX配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのAMFX-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に組み込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でAMFXリガントとAMFXタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのAMFX媒介信号伝達を抑制し得る。このAMFX-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、AMFX同族リガンドの生体利用性に影響を与え得る。AMFXリガント/AMFX相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、ならびに細胞生存の調節（例えば、促進または阻害）に、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのAMFX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗AMFX抗体を産生するための免疫原として用いられ得、AMFXリガントを精製し、そしてAMFXリガントとのAMFXの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

【0238】

本発明のAMFXキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法

により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着(cohesive)末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームと一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバハングを生じるアンカープライマーを用いて、キメラ遺伝子配列を生成するために実施し得る(例えば、Ausbelら(編)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと)。さらに、融合部分(例えば、GSTポリペプチド)をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。AMFXをコードする核酸は、この融合部分がAMFXタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

【0239】

(AMFXアゴニストおよびアンタゴニスト)

本発明はまた、AMFXアゴニスト(模倣物)またはAMFXアンタゴニストのいずれかとして機能するAMFXタンパク質の改変体に関する。AMFXタンパク質の改変体、例えば、AMFXタンパク質の離散した点変異または短縮型が、変異誘発により生成され得る。AMFXタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のAMFXタンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。AMFXタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のAMFXタンパク質の1つ以上の活性を、例えば、AMFXタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流メンバーまたは上流メンバーに競合的に結合することにより阻害され得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。1つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、AMFXタンパク質の天然に存在する形態を用い

た処置に関する被験体におけるより少ない副作用を有する。

【0240】

AMFXアゴニスト(模倣物)またはAMFXアンタゴニストのいずれかとして機能するAMFXタンパク質の改変体は、AMFXタンパク質アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性についてのAMFXタンパク質の変異体、例えば短縮型変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、AMFX改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。AMFX改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なAMFX配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にAMFX配列のセットを含む(例えば、ファージディスプレイのための)より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列中に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なAMFX改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なAMFX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給量を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である(例えば、Narang(1983)Tetrahedron 39:3;Itakuraら(1984)Annu Rev Biochem 53:323;Itakuraら(1984)Science 198:1056;Ikeら(1983)Nucl Acid Res 11:477を参照のこと)。

【0241】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、AMFXタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、AMFXタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのAMFXフラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、AMFXコード配列の二本鎖PCRフラグ

メントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下において、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、AMFXタンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

【0242】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法を、AMFXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でこのコンビナトリアル遺伝子を発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、AMFX改変体を同定し得る(ArkinおよびYourvan(1992)PNAS 89:7811-7815; Delgraveら(1993)Protein Engineering 6:327-331)。

【0243】

(抗AMFX抗体)

本発明は、本発明の任意のAMFXポリペプチドに免疫特異的に結合する、Fabまたは(Fab)₂のような抗体または抗体フラグメントを包含する。

【0244】

単離されたAMFXタンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を用いて、AMFXポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原として用いられ得る。完全長のAMFXタンパク質が用いられ得るが、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のためのAMFXタンパク質の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。AMFXの抗原性ペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20で示されるアミノ酸配列の少なくとも4アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体がAMFXと特異的な免疫複合体を形成するように、AMFXのエピトープを含む。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも6、8、10、15、20、または30個のアミノ酸残基を含む。より長い抗原性ペプチドが、用途に依存して、そして当業者に周知の方法に従い、より短い抗原性ペプチドよりもしばしば好適である。

【0245】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドに含まれる少なくとも1つのエピトープは、タンパク質の表面上に位置するAMFXの領域、例えば、親水性領域である。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換を伴うかまたは伴わない、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、例えば、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157:105-142を参照のこと。この各々が、それらの全体において、本明細書中で参考として援用される。

【0246】

本明細書で開示されるように、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20のAMFXタンパク質配列、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログを、これらのタンパク質成分に免疫特異的に

結合する抗体の産生における免疫原として利用し得る。本明細書で用いる用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、AMFXのような抗原に特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含む分子をいう。このような抗体は、制限されずに、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、FabおよびF_{(ab')₂}フラグメント、およびFab発現ライブラリーを含む。特定の実施形態では、ヒトAMFXタンパク質に対する抗体が開示される。当該分野で公知の種々の手順が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20のAMFXタンパク質配列、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生のために用いられ得る。これらのタンパク質のいくつかを以下で論議する。

【0247】

AMFXタンパク質に対する抗体、またはAMFXタンパク質のフラグメントもまた、本発明に含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン(Ig)分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原に特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子）をいう。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F_{ab}フラグメント、F_{ab'}フラグメントおよびF_{(ab')₂}フラグメント、ならびにF_{ab}発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの任意のクラスに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によってお互いに異なる。特定のクラスは同様にサブクラス（例えば、IgG₁、IgG₂など）を有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖は鎖または鎖であり得る。本明細書中で抗体に対する参照は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する参照を含む。

【0248】

本発明の単離されたAMFX関連タンパク質は、抗原、またはその一部もしくはフラグメントとして役立つことが意図され得、そしてさらに、免疫原として使用され、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な

技術を用いて、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを含み、その結果このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質またはこのエピトープを含む任意のフラグメントと特定の免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、または少なくとも15アミノ酸残基、または少なくとも20アミノ酸残基、または少なくとも30アミノ酸残基を含む。この抗原性ペプチドにより含まれる好ましいエピトープは、そのペプチド表面上に位置するタンパク質の領域であり；通常、これらは親水性領域である。

【0249】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープは、AMFXタンパク質の表面上に位置するAMFX関連タンパク質の領域、例えば、親水性領域である。ヒトAMFX関連タンパク質配列の疎水性分析は、AMFX関連タンパク質のどの領域が特に親水性であるか、そしてそれ故、抗体産生を標的にするために有用な表面残基をコードするようであることを示す。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換とともにまたはなしの、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828；KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157:105-142を参照のこと。抗原性タンパク質またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログ内の1つ以上のドメインに対して特異的な抗体はまた、本明細書中で提供される。

【0250】

本発明のタンパク質、またはその誘導體、フラグメント、アナログ、ホモログ

もしくはオルソログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の産生における免疫原として利用され得る。

【0251】

当該分野において公知の種々の手順が、本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対して指向されるポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体の産生のために使用され得る（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, および Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のうちのいくつかは、以下で考察される。

【0252】

（ポリクロナール抗体）

ポリクロナール抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）は、ネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導体を用いる1以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免役されている哺乳動物において免疫原性であることが知られている第2のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され、このようなアジュバントとしては、Freund's（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて使用可能なアジュバント（例えば、Bacille Calmette - GuerinおよびC

orynebacterium parvum) または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート)が挙げられる。

【0253】

免疫原性タンパク質に対して指向されるポリクロナール抗体分子は、哺乳動物から(例えば、血液から)単離され得、そして周知の技術(例えば、プロテインAまたはプロテインGを用いるアフィニティクロマトグラフィー(これは、主に免疫血清のIgG画分を提供する))によってさらに精製され得る。続いて、または代替的に、求められている免疫グロブリンの標的である特定の抗原またはその抗原のエピトープがカラムに固定され、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist (The Scientist, Inc., Philadelphia PAより発行)、第14巻、第8号(2000年4月17日)、25~28頁)によって考察される。

【0254】

(モノクローナル抗体)

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」(MAb)または「モノクローナル抗体組成物」は、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる唯一の分子種の抗体分子を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、すべての分子の集団に同一である。従って、MAbは、抗原への独特の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

【0255】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法(例えば、KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495(1975)に記載されるような方法)を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主細胞は、免疫因子で代表的に免疫され、免疫因子に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。

あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0256】

免疫因子としては、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般的には、以下のいずれかである：ヒト起源の細胞が望まれる場合は、末梢血リンパ球が使用され、または非ヒト哺乳動物供給源が望まれる場合は、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次いで、適切な融合因子（例えば、ポリエチレングリコール）を使用して、リンパ球を不死化細胞株に融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986) 第59-103頁）。不死化細胞株は、哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞に通常形質転換される。通常ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株が使用されるハイブリドーマ細胞は、1以上の物質（融合されていない不死化細胞の増殖も生存も阻害する）を適切に含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親の細胞が酵素、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR TまたはHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマからの培養培地は、代表的にヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（「HAT培地」）、それらの物質はHGPR T欠失細胞の増殖を阻害する。

【0257】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは選択された抗体産生細胞の安定な高レベルの抗体の発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に敏感である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髓腫細胞株であり、それらを、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから得ることが可能である。ヒト骨髓腫およびマウス-ヒト骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される（Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Produc

tion Techniques and Application, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第51-63頁)。

【0258】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって決定されるか、またはインビトロ結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA))によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって決定され得る。好ましくは、標的抗原に対する高い程度の特異性および高結合親和性を有する抗体が、単離される。

【0259】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈手順を限定することによって、クローンをサブクローニングし得、そして標準方法によって増殖し得る。例えば、この目的のために適切な培養培地としては、Dulbecco's Modified Eagle's MediumおよびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖され得る。

【0260】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー)によって、培養培地または腹水から、単離または精製され得る。

【0261】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法)によって作製され得る。本発明のモノクローナ

ル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され得、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いでそれらは、宿主細胞（例えば、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞）にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインをコードする配列の置換（米国特許第4,816,567号；Morrisson, Nature 368, 812-13 (1994)）によってか、または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列のすべてまたは一部の配列をコードする免疫グロブリンへの共有結合的な連結によって改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域に置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域に置換され得、キメラ二価の抗体を作製する。

【0262】

（ヒト化抗体）

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトの免疫応答を引き起こさないヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または他の抗体の抗原結合配列）であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換によって、Winterおよび共同研究者の方法（Jonesら、Nature, 31:522-525 (1986)；Riechmannら、Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536 (1988)）

の後に達成され得る。(米国特許第5,225,539号もまた参照のこと。)
いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFv骨格(framework)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、患者の抗体においても、移入されたCDRまたは骨格配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、すべての少なくとも1つ、および代表的には2つの可変領域を実質的に含む。これらの領域内で、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべての骨格領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を必要に応じて含む(Jonesら、1986; Riechmannら、1988; およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992))。

【0263】

(ヒト抗体)

CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全体配列がヒト遺伝子から本質的に生じる抗体分子に、ヒト抗体は十分に関連する。このような抗体を、「ヒト抗体」、または「十分なヒト抗体」と本明細書中で呼ぶ。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ(trioma)技術によって調製され得る; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983 Immunol Today 4:72を参照のこと)およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁)。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実行において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用によってか(Coteら、1983. Proc Natl Acad USA 80:2026-2030を参照のこと)、またはインビトロでのEpstein Barr Virusを用いたヒトB細胞による形質転換によって(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁を参照のこと)産生され得る。

【0264】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術（ファージディスプレイライブラリー（HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marksら、J. Mol. Biol., 222:581(1991)）を含む）を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン位置をトランスジェニック動物（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス）に導入することによって、ヒト抗体は作製され得る。チャレンジの際にヒト抗体産生が観察され、このことはすべての点（遺伝子再配列、アセンブリー、および抗体レパートリーを含む）でヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載される：米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,611,016号、およびMarksら（Bio/Technology 10、779-783(1992)）；Lonbergら（Nature 368 856-859(1994)）；Morrison（Nature 368、812-13(1994)）；Fishwildら（Nature Biotechnology 14、845-51(1996)）；Neuberger（Nature Biotechnology 14、826(1996)）；ならびにLonbergおよびHuszar（Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995)）。

【0265】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに应答して動物の内因性抗体よりもヒト抗体を十分に産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る。（PCT刊行物WO94/02602を参照のこと。）非ヒト宿主における重免疫グロブリン鎖および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子は、耐えられなくなっており、そしてヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な位置は、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して、ヒト遺伝子は組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、完全な改変の相補体より

もより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を雑種することによって子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT刊行物WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにXenomous™と呼ばれる。この動物は、ヒト免疫グロブリンを十分に分泌するB細胞を産生する。目的の免疫原を有する免疫後の動物から（例えば、ポリクローナル抗体の調製）、あるいは動物由来の不死化されたB細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、1本鎖Fv分子）を得るために、さらに改変され得る。

【0266】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主（マウスとして例証される）を作製するための方法の例は、米国特許第5,939,598号に記載される。それを、以下の工程を包含する方法によって得ることが可能である：位置の再配列を防ぎ、そして再配列された免疫グロブリン重鎖位置の転写物の形成、および選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的ベクターによって影響される欠失を防ぐために、胚幹細胞における少なくとも1つの内因性重鎖位置由来のJセグメント遺伝子を欠失する工程；およびトランスジェニックマウス（その体細胞および生殖細胞は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む）を、胚幹細胞から作製する工程。

【0267】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を産生する方法は、米国特許第5,916,771号に開示される。それは以下の工程を包含する：重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、およびハイブリッド細胞を形成するために2つの細胞融合する工程。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

【0268】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを

同定する方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択する相関する方法は、PCT刊行物WO99/53049に開示される。

【0269】

(F_{ab}フラグメントおよび1本鎖抗体)

本発明に従って、技術は、本発明の抗原性タンパク質に特異的な1本鎖抗体の産生に適用され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、F_{ab}発現ライブラリーの構築に適用され得(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと)、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログについての所望の特異性を有するモノクローナルF_{ab}フラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にする。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメント((i)抗体分子のペプシン消化によって産生されるF_(ab')₂フラグメント;(ii)F_(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって産生されたF_{ab}フラグメント(iii)ペプシンおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生されたF_{ab}フラグメント、および(iv)F_vフラグメントを含むが、これらに限定ない)は、当該分野で公知の技術によって産生され得る。

【0270】

(二重特異的抗体)

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体(好ましくはヒトモノクローナル抗体またはヒト化されたモノクローナル抗体)であって、これは少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する。この場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質に対してである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には細胞表面タンパク質あるいはレセプターまたはレセプターサブユニットである。

【0271】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖の対の同時発現に

基づき、ここでこの2つの重鎖は異なる特異性を有する (MilsteinおよびCuello、Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を作製し、このうち1つのみが正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順は、1993年5月13日開示のWO93/08829、およびTrauneckerら、1991 EMBO J., 10:3655-3659において開示される。

【0272】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常領域配列に融合され得る。この融合は、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有し、ヒンジ、CH₂、およびCH₃領域の少なくとも部分を含む。この融合物中の少なくとも1つに存在する軽鎖結合のために必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH₁)を有することが好ましい。この免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合、この免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物体に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の作製のさらなる詳細は、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照のこと。

【0273】

WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常領域のCH₃領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きな側鎖についての同一または同様のサイズの代償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に生成さ

れる。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物よりも、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

【0274】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、 $F(ab')$ ₂二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を作製するための技術は、文献において記載される。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら、Science 229:81(1985)は、インタクトな抗体がタンパク分解的に切断されて $F(ab')$ ₂フラグメントを作製する手順を記載する。これらのフラグメントは、ビスナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤ナトリウム亜ヒ酸塩の存在下で還元される。次いで、この作製された $F(ab')$ フラグメントは、チオニトロベンゾエート(TBN)誘導体に変換される。次いで、 $F(ab')$ -TBN誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によって $F(ab')$ -チオールに再変換され、そしてこれは等モル量の他の $F(ab')$ -TBN誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

【0275】

さらに、 $F(ab')$ フラグメントは、E. coliから直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。Shalabyら、J. Exp. Med. 175:217-225(1992)は、完全にヒト化された二重特異的抗体 $F(ab')$ ₂分子の生成を記載する。各 $F(ab')$ フラグメントは、E. coliから別々に分泌され、そしてインビトロの化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。従って、形成されたこの二重特異的抗体は、ErbB2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解性活性を誘因し得る。

【0276】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製し、そして単離するための種々の技術が記載されてきた。例えば、二重特異的抗体は、ロイシン

ジッパーを使用して産生される。Kostelnyら、J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に結合される。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた、抗体ホモダイマーの産生のために使用され得る。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)に記載されるこの「ディアボディー(diabody)」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間を対にできないリンカーによって軽鎖可変領域(V_L)に接続された重鎖可変領域(V_H)を含む。従って、1つのフラグメントのV_HおよびV_Lドメインは、別のフラグメントの相補的なV_LおよびV_Hドメインと対になるように強制され、これによって2つの抗原結合部位が形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されてきた。Gruberら、J. Immunol. 152:5368(1994)を参照のこと。

【0277】

2つ以上の結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。Tuttら、J. Immunol. 147:60(1991)。

【0278】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、T細胞レセプター分子のような白血球(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)、あるいはIgGに対するFcレセプター(FcR)(例えば、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16))上の標的化分子に結合するアームに、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に焦点を合わせるように結合され得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞傷害

性因子に指向するために使用され得る。これらの抗体は抗原結合アーム、および細胞傷害性因子または放射性核種キレーター（例えば、EOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETA）に結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原に結合し、そしてさらに組織因子（TF）に結合する。

【0279】

（ヘテロ接合体抗体）

ヘテロ接合体抗体はまた、本発明の範囲内である。ヘテロ接合体抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不必要な細胞に標的化するために（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置のために（WO91/00360；WO92/200373；EP03089）提案されてきた。この抗体（架橋剤を含む抗体を含む）は、インビトロで、合成タンパク質化学において公知の方法を使用して調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応の使用またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号において開示される試薬が挙げられる。

【0280】

（エフェクター機能操作）

本発明の抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましい。例えば、システイン残基は、Fc領域に導入され得、これによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。従って、作製されるこのホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの可能性および/または増加した補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有し得る。Caronら、J. Exp. Med.、176：1191-1195（1992）およびShopes、J. Immunol. 148：2918-2922（1992）を参照のこと。増大した抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolffら、Cancer Research、53：2560-2656（1993）に記載されるヘテ

口二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、これは二重のFc領域を有し、そしてこれによって増大した補体溶解およびADCCの可能性を有し得る。Stevensonら、*Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989)を参照のこと。

【0281】

(免疫接合体)

本発明はまた、細胞傷害性の薬剤(例えば、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素、あるいはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性接合体))に結合した抗体を含む免疫接合体に関する。

【0282】

このような免疫接合体の作製において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(*Pseudomonas aeruginosa*由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、 α -サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質(PAPI、PAPII、およびPASP-S)、*momordica charantia*インヒビター、クルシン(curcumin)、クロチン(crotin)、*sepaonaria officinalis*インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、およびトリコテセン(tricothecene)が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の作製のために利用可能である。その例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reが挙げられる。

【0283】

抗体および細胞傷害性因子の接合体は、種々の二官能性タンパク質結合因子(例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナー

ト (SPDP)、イミノチオラン (iminothiolane) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデート HCL)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド (glutaredialdehyde))、ビスアジド化合物 (例えば、ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス- (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス-活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)) を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science, 238:1098 (1987) に記載されるように調製され得る。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。

【0284】

別の実施形態において、腫瘍の前標的化における利用のために、この抗体は、「レセプター」 (例えば、ストレプトアビジン) に結合され得、ここで抗体-レセプター接合体は患者に投与され、続いて除去剤を使用して結合していない接合体が循環から除去され、次いで細胞傷害性因子に次々に結合する「リガンド」 (例えば、アビジン) が投与される。

【0285】

(AMFX組換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明の別の局面は、AMFXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、これが接続された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが連結し得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型はウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはこのウイルス性ゲノムに連結され得る。特定のベクターは宿主細胞中で自発的に複製し得、この中に導入される (例えば、細菌の

複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてこれによって宿主のゲノムと同調して複製される。さらに、特定のベクターは、これが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、このプラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルス性ベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図し、これは等価な機能を果たす。

【0286】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含み、これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の調節配列を含むこと意味し、これは発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする(例えば、このベクターが宿主細胞に導入される場合、インビトロ転写/翻訳系または宿主細胞において)ような様式で調節配列に連結されることを意味することを意図する。

【0287】

用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif.(1990)に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列(例えば、組織特異的調節配列)を含む。発現ベクター

の設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、AMF Xタンパク質、AMF Xタンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

【0288】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、AMF Xタンパク質の発現のために設計され得る。例えば、AMF Xタンパク質は、細菌細胞（例えば、*Escherichia coli*）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif.（1990）においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0289】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有する*Escherichia coli*において実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ：（i）組換えタンパク質の発現を増加させること；（ii）組換えタンパク質の溶解度を増加させること；および（iii）親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そして融合タンパク質の精製の後に、組換えタンパク質が組換えタンパク質の融合部分から

分離されることを可能にする。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson(1988)Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられる。

【0290】

適切な誘導性非融合E.coli発現ベクターの例としては、pTrc(Amranら(1988)Gene 69:301-315)およびpET11d(Studierら、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)60-89)が挙げられる。

【0291】

E.coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)119-128を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、E.coliにおいて優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、Wadaら(1992)Nucl. Acids Res. 20:2111-2118を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0292】

別の実施形態において、AMFX発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における発現のためのベクターの例には、pYepSec1 (Baldaire, (1987) EMBO J 6:229-234)、pMFA (KurjanおよびHerskowitz, (1982) Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultzら, (1987) Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ (Invitrogen Corp., San Diego, Calif.) が挙げられる。

【0293】

あるいは、AMFXは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ (Smithら (1983) Mol Cell Biol 3:2156-2165) およびpVLシリーズ (LucklowおよびSummers (1989) Virology 170:31-39) が挙げられる。

【0294】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed (1987) Nature 329:840) およびpMT2PC (Kaufmanら (1987) EMBO J 6:187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Sp

ring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0295】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）中で優先的に核酸の発現を指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertrら（1987）Genes Dev 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv Immunol 43:235-275）、特に、T細胞レセプタープロモーター（WinotoおよびBaltimore（1989）EMBO J 8:729-733）および免疫グロブリン（Banerjiら（1983）Cell 33:729-740；QueenおよびBaltimore（1983）Cell 33:741-748）のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）Science 230:912-916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス（murine hox）プロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249:374-379）および - フェトプロテインプロモーター（CampesおよびTilghman（1989）Genes Dev 3:537-546）。

【0296】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのDNA分子は、AMFX mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現（DN

A分子の転写によって)を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得る。例えば、アンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、例えば、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - Trends in Genetics、第1巻(1)1986を参照のこと。

【0297】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0298】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、AMFXタンパク質は、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(例えば、ヒトチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0299】

ベクターDNAは、従来的な形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場

合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0300】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについては、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノム中に組み込み得ることが知られている。これらの要素を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物に対する耐性を付与するマーカー（例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート）が含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、AMFXをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸とともに安定にトランスフェクトされる細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【0301】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞）は、AMFXタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、AMFXタンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、AM

F Xタンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（ここに、AMF Xタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞からAMF Xを単離する工程を包含する。

【0302】

（トランスジェニックAMF X動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、AMF Xタンパク質コード配列が導入される、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得、ここで外因性のAMF X配列は、それらのゲノムまたは相同組換え動物（ここで内因性のAMF X配列が変更されている）に導入される。このような動物は、AMF Xタンパク質の機能および/または活性を研究するため、およびAMF Xタンパク質の活性のモジュレーターを同定および/または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯動物であり、ここでこれらの動物の1つ以上の細胞は、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などを含む。導入遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれ（この細胞からトランスジェニック動物が発生する）、そして成熟動物のゲノムに残存する外因性のDNAであり、それによって、このトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコード遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性AMF X遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

【0303】

本発明のトランスジェニック動物は、AMF Xをコードする核酸を、（受精し

た卵母細胞の雄性前核に導入することによって例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって)、およびこの卵母細胞が偽妊娠雌性フォスター動物 (foster animal) 中で発生することを可能にすることによって作製され得る。配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19を含む配列は、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトAMFX遺伝子の非ヒトホモログ(例えば、マウスAMFX遺伝子)は、ヒトAMFX cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得(上述にさらに記載される)、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列(単数または複数)は、特定の細胞に対して、AMFXタンパク質の発現を指向するために、AMFX導入遺伝子に作動可能に連結される。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物(特に、マウスのような動物)を生成するための方法は、当該分野で従来的になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号;同第4,870,009号;および同第4,873,191号;ならびにHogan 1986、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック初代動物は、そのゲノムにおけるAMFX導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織または細胞中のAMFX mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、AMFXタンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物へと繁殖させ得る。

【0304】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってAMFX遺伝子が変化(例えば、機能的に破壊)されている、少なくとも、AMFX遺伝子の一部を含むベクターを調製する。AMFX遺伝子は、ヒ

ト遺伝子（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19のDNA）であり得るが、より好ましくは、ヒトAMFX遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19のヒトAMFX遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性AMFX遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、内因性AMFX遺伝子が、機能的に破壊される（すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない；「ロックアウト」ベクターともいわれる）ように設計される。

【0305】

あるいは、このベクターは、相同組換えの際に、内因性AMFX遺伝子が発現されるか、あるいはさもなければ、変更されるが、なお機能性タンパク質をコードするように設計される（例えば、上流の調節領域を変更して、それによって内因性AMFXタンパク質の発現を変更し得る）。相同組換えベクターにおいて、AMFX遺伝子の変更された部分は、AMFX遺伝子のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、ベクターによって運ばれる外因性AMFX遺伝子と胚幹細胞中の内因性AMFX遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するAMFX核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さである。代表的に、数キロベースの隣接するDNA（5'末端および3'末端の両方）が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載について、Thomasら（1987）Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、胚幹細胞株に導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、この導入されたAMFX遺伝子が、内因性AMFX遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される（例えば、Liら（1992）Cell 69:915を参照のこと）。

【0306】

次いで、この選択された細胞を、動物（例えば、マウス）の胚盤胞へ注入して、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley（1987）のTERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS:

A PRACTICAL APPROACH、Robertson編、IRL、Oxford 113頁～152頁を参照のこと。次いで、キメラ胚を、適切な偽妊娠雌性フォスター動物に移植し得、そしてこの胚を、一定期間置く。それらの胚芽細胞中に相同組換えDNAを保有する子孫を使用して、動物を繁殖し得、ここで、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって、この相同組換えDNAを含む。相同的組換えベクターおよび相同的組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される；Bradley(1991)Curr. Opin. Biotechnol. 2:823-829；PCT国際公開番号：WO90/11354；WO91/01140；WO92/0968；およびWO93/04169。

【0307】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含む、非ヒトトランスジェニック動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksor、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら、1991、Science 251:1351-1355を参照のこと)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は選択されたタンパク質をコードした導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードした導入遺伝子を含む)を交配することによる、「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

【0308】

本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト動物のクローンがまた、Wilmutら、1997、Nature 385:810-813に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞(

例えば、体細胞)を、単離および誘導し、増殖サイクルから出し、そしてG₀期に入らせ得る。次いで、この静止細胞を、例えば、電気パルスの使用により、静止細胞が単離される同種動物由来の、摘出された卵母細胞へ融合し得る。次いで、この再構築された卵母細胞を培養し、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性フォスター動物に移される。この雌性フォスター動物の産生子孫は、この細胞(例えば、体細胞)が単離される動物のクローンである。

【0309】

(薬学的組成物)

本発明のAMFX核酸分子、AMFXタンパク質、および抗AMFX抗体(これはまた、本明細書中で「活性化合物」といわれる)、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、代表的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散液、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤(delaying agent)などを含むことが意図される。適切なキャリアは、当該分野における標準的な参考書である、Remington's Pharmaceutical Sciencesの最新版(本明細書中で参考として援用される)に記載される。このようなキャリアまたは賦形薬の好ましい例としては、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル(例えば、不揮発性油)はまた、使用され得る。薬学的に活性物質である、このような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。この活性化合物と不適合性である任意の従来媒体または薬剤の範囲を除いて、組成物におけるその使用は、意図される。補足的な活性化合物はまた、この組成物に組み込まれ得る。

【0310】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合可能に処方される

。投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下）、経口（例えば、吸入）、経皮的（すなわち、局所的）、粘膜を越えて、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液としては、以下の成分が挙げられ得る：滅菌賦形薬（注射のための水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌性剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））；緩衝液（例えば、アセテート、シトレートまたはホスフェート）；および張度の調整のための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）を用いて調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに封入され得る。

【0311】

注入用途に適した薬学的組成物は、滅菌水溶液（ここでは、水溶解性）または分散媒（dispersion）、および滅菌注入可能溶液または分散媒の即座の調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与において、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL™（BASF、Parsippany、N.J.）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全の場合において、組成物は、無菌でなければならず、そして容易な注入性（syringeability）が存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌のような微生物の汚染行為に対して保護されなければならない。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散媒であり得る：水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散媒の場合には、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラ

ベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど)によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤(例えば、砂糖、ポリアルコール(例えば、マンニトール(mannitol)、ソルビトール)、塩化ナトリウム)を含むことが好ましい。注入可能組成物の吸収期間の延長は、組成物に吸収を遅延させる薬剤(例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン)を含ませることによってもたらされ得る。

【0312】

滅菌注射可能溶液は、必要量のこの活性化化合物(例えば、AMFXタンパク質または抗AMFX抗体)を、適切な溶媒中で、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散媒は、活性化化合物を、基本(basic)の分散媒と上記で列挙される成分から必要とされる他の成分とを含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能液剤の調製のための滅菌粉末の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、予め滅菌濾過されたその溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

【0313】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へと圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして音を立てられ(swish)、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント物質が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤(例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン)；賦形剤(例えば、デンプンまたはラクトース)、崩壊剤(例えば、アルギン酸、プリモゲル(Primogel)、またはコーンス

ターチ) ; 滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはステロテス (S t e r o t e s)) ; 潤滑剤 (g l i d a n t) (例えば、コロイド状二酸化ケイ素) ; 甘味剤 (例えば、スクロースまたはサッカリン) ; あるいは香味剤 (例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー)。

【0314】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤 (例えば、二酸化炭素のような気体) を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾル噴霧の形態で送達される。

【0315】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透される障壁に適切な浸透剤が、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐剤の使用によって達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤 (o i n t m e n t)、軟膏 (s a l v e)、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

【0316】

この化合物はまた、直腸送達のための坐剤 (例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤と共に) または貯留 (r e n t e n t i o n) 浣腸の形態で調製され得る。

【0317】

1つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され (例えば、制御放出処方物)、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者には明らかである。これらの物質はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁剤

(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む)がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【0318】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体に対する単位投薬量として適切な物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと関連して所望の治療的効果を生じるように計算された、所定量の活性化化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化化合物の固有の特徴、および達成される特定の治療効果、ならびに個体の処置のためのこのような活性化化合物を調合する分野に固有の制限によって決定されるか、あるいはこれらに直接依存する。

【0319】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば静脈内注射、局所投与(例えば、米国特許第5,328,470号を参照のこと)によって、または定位注射(例えば、Chenら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:3054-3057を参照のこと)によって送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得るか、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる除放射性マトリックスが挙げられ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得る場合(例えば、レトロウイルスベクター)、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

【0320】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書と共に、容器、包装、またはディスペンサーに含まれ得る。

【0321】

(スクリーニングおよび検出の方法)

本発明の単離された核酸分子は、以下にさらに説明されるように、AMFXタンパク質（例えば、遺伝子治療適用における宿主細胞中の組換え発現ベクターを介する）を発現するため、AMFX mRNA（例えば、生物学的サンプルにおいて）またはAMFX遺伝子における遺伝子損傷を検出するため、ならびにAMFX活性を調節するために使用され得る。さらに、AMFXタンパク質は、AMFXタンパク質の活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびにAMFXタンパク質の不十分もしくは過剰な産生によって、あるいはAMFX野生型タンパク質と比較して減少した活性もしくは異常な活性を有するAMFXタンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害（例えば；糖尿病（インシュリン放出を制御する）；肥満（脂質を結合し、輸送する）；肥満に関連する代謝障害、代謝症候群X、ならびに慢性疾患および種々の癌に関連する食欲不振および消耗障害、および感染性疾患（抗細菌活性を有する）および種々の脂血症（*dyslipidemia*））を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗AMFX抗体が、AMFXタンパク質を検出および単離するため、ならびにAMFX活性を調節するために使用され得る。なおさらなる局面において、本発明は、陽性様式と陰性様式との両方で、食欲、栄養の吸収、および代謝基質の処置に影響する方法において使用され得る。

【0322】

本発明は、さらに、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤、および上記で本明細書中で記載されるような処置のためのそれらの使用に関する。

【0323】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、調節因子、すなわち、AMFXタンパク質に結合するか、あるいは例えば、AMFXタンパク質の発現またはAMFXタンパク質の活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補または試験化合物または薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。本発明はまた、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイにおいて同定された化合物

を含む。

【0324】

1実施形態において、本発明は、AMF Xタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分の膜結合形態に結合するか、またはその膜結合形態の活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのいずれかを使用して得られ得、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的に位置付け可能な並行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（例えば、Lam(1997) Anticancer Drug Design 12:145を参照のこと）。

【0325】

本明細書中で使用される場合、「低分子」とは、約5kD未満の分子量、最も好ましくは約4kD未満の分子量を有する組成物をいうように意味される。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、炭水化物、脂質または他の有機分子もしくは無機分子であり得る。化学的および/または生物学的混合物（例えば、真菌、細菌または藻類抽出物）のライブラリーは、当該分野で公知であり、そして本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

【0326】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909；Erbら(1994) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:11422；Zuckermannら(1994) J. Med. Chem. 37:2678；Choら(1993) Sc

ience 261:1303; Carrellら(1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carellら(1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; および Gallopら(1994) J. Med. Chem. 37:1233。

【0327】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992) Biotechniques 13:412~421)、あるいはビーズ上(Lam(1991) Nature 354:82~84)、チップ上(Fodor(1993) Nature 364:555~556)、細菌(Ladner 米国特許第5,223,409号)、孢子(Ladner 米国特許第5,233,409号)、プラスミド(Cullら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865~1869)またはファージ上(ScottおよびSmith(1990) Science 249:386~390; Devlin(1990) Science 249:404~406; Cwirllaら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378~6382; Felici(1991) J. Mol. Biol. 222:301~310; Ladner、米国特許第5,233,409号)において提示され得る。

【0328】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のAMFXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、AMFXタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がAMFXタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のAMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで直接的または間接的のいずれかで標識され得

、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のAMFXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分とその細胞表面上に発現する細胞を、AMFXと結合する既知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がAMFXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がAMFXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程によって、この試験化合物が、既知の化合物と比較して、AMFXまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【0329】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のAMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、AMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、AMFXまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、AMFXタンパク質が、AMFX標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、AMFXタンパク質が天然に結合または相互作用する分子であり、例えば、AMFX相互作用タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内面と会合する分子、または細胞質分子である。AMFX標的分子は、非AMFX分子あるいは本発明のAMFXタンパク質またはポリペプチドであり得る。1つの実施形態において、AMFX標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通過して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合AMFX分子

に結合することにより発生するシグナル)の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル伝達分子のAMFXとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

【0330】

AMFXタンパク質がAMFX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、AMFXタンパク質がAMFX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞性セカンドメッセンジャー(すなわち、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、 IP_3 など)の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性/酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子(検出可能なマーカー(例えば、ルシフェラーゼ)をコードする核酸に作動可能に連結されたAMFX応答性調節エレメントを含む)の誘導を検出すること、または細胞応答(例えば、細胞生存度、細胞分化、または細胞増殖)を検出することにより、決定され得る。

【0331】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞(cell-free)アッセイであり、AMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がAMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物の、AMFXタンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にのいずれかで決定され得る。1つのこのような実施形態において、このアッセイは、AMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、AMFXを結合する既知の化合物に接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がAMFXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がAMFXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、既知の化合物と比較して、AMFX、またはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【0332】

なお別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、AMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、ならびにその試験化合物がAMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がAMFXの活性を調節する能力の決定は、例えば、AMFXタンパク質が、AMFX標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の1つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がAMFXタンパク質の活性を調節する能力の決定は、AMFXタンパク質が、AMFX標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性/酵素活性は、上記のように決定され得る。

【0333】

さらに別の実施形態において、無細胞アッセイは、AMFXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、AMFXタンパク質を結合する既知の化合物に接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物がAMFXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がAMFXタンパク質と相互作用する能力の決定は、AMFXタンパク質が、AMFX標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

【0334】

本発明の無細胞アッセイは、AMFXタンパク質の、可溶性の形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のAMFXタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、AMFXタンパク質の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton（登録商標）X-

100、Triton (登録商標) X-114、Thesit (登録商標)、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)_n (Isotridecyl poly(ethylene glycol ether)_n、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンミニオール-1-プロパンスルホネート(3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-1-propane sulfonate) (CHAPS)、または3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンミニオール-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate) (CHAPSO)である。

【0335】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多い実施形態において、AMFXタンパク質またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適合させることが、所望され得る。試験化合物の、AMFXタンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、AMFXタンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST-AMFX融合タンパク質またはGST標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および未吸着標的タンパク質またはAMFXタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成を誘導する条件下(例えば、塩およびpHに関して生理学的条件)でインキュベートされる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結

合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてAMFXタンパク質の結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

【0336】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、AMFXタンパク質、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を利用して、固定され得る。ビオチン化AMFXタンパク質、または標的分子は、当該分野において周知の技術を使用して、ビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製され得 (例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.)、そしてストレプトアビジンでコーティングした96ウェルのプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定され得る。あるいは、AMFXタンパク質、または標的分子と反応性であるがAMFXタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはAMFXタンパク質が、抗体の結合によってウェル内に捕捉され得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定複合体に関しての上記で述べた方法に加えて、AMFXタンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびにAMFXタンパク質、または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【0337】

別の実施形態において、AMFXタンパク質発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のAMFX mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのAMFX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのAMFX mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、AMFX mRNAまたはタンパク質発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、AMFX mRNAまたはタンパク質の発現が

候補化合物の非存在下より、その存在下における方が大きい(すなわち、統計的に有意に大きい)場合、この候補化合物は、AMFX mRNAまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、AMFX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりその存在下の方が少ない(統計的に有意に少ない)場合、この候補化合物は、AMFX mRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のAMFX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、AMFX mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。

【0338】

本発明のなお別の局面において、AMFXタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「餌(bait)タンパク質」として使用されて(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら(1993) Cell 72:223-232; Maduraら、1993 J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartelら、1993 Biotechniques 14:920-924; Iwabuchiら、1993 Oncogene 8:1693-1696; および Brent WO94/10300を参照のこと)、AMFX(「AMFX結合タンパク質」または「AMFX-bp」)に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてAMFX活性を調節する他のタンパク質を同定し得る。このようなAMFX結合タンパク質はまた、例えば、AMFX経路の上流または下流エレメントとしてAMFXタンパク質によるシグナル伝達に關与する可能性がある。

【0339】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュール的性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。一方の構築物においては、AMFXをコードする遺伝子が既知の転写因子(例えば、GAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質(「餌食(pre y)」または「サンプル」)をコードするDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメイン

をコードする遺伝子に融合される。「餌」および「餌食」タンパク質がインビボで相互作用して、AMFX依存性複合体を形成し得る場合、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写が可能となる。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そしてAMFXと相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

【0340】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのこの薬剤の使用に関する。

【0341】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるcDNA配列の一部またはフラグメント（および対応する完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば、これらの配列を使用して、（i）染色体上にそれぞれの遺伝子をマッピングし得；従って遺伝病と関連する遺伝子領域を位置決定し得る；（ii）微量の生物学的サンプルから個体を同定し得る（組織型決定）；および（iii）生物学的サンプルの法医学的識別を助け得るが、これに限定されない。これらの適用のいくつかは、以下の節において記載される。

【0342】

（染色体マッピング）

一旦遺伝子の配列（または配列の一部）が単離されると、この配列を用いて染色体上に遺伝子の位置をマッピングし得る。このプロセスは、染色体マッピングとよばれる。従って、AMFX配列の一部またはフラグメント、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19、またはそのフラグメントもしくは誘導体を用いて、それぞれ、AMFX遺伝子の位置を染色体上にマッピングし得る。AMFX配列を染色体にマッピングすることは、これらの配列と、疾患と関連する遺伝子とを相関付ける際の重要な第一歩である。

【0343】

簡潔には、AMFX遺伝子は、AMFX配列からPCRプライマー（好ましくは、15～25bpの長さ）を調製することにより染色体にマッピングし得る。AMFX配列のコンピューター分析を用いて、ゲノムDNAにおける1つを超えるエクソンにまたがらないプライマーを迅速に選択し得、従って、増幅プロセスを複雑にし得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用され得る。AMFX配列に対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅されたフラグメントを生じる。

【0344】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物由来の体細胞（例えば、ヒトおよびマウス細胞）を融合することにより調製される。ヒトおよびマウスの細胞のハイブリッドが増殖および分裂するにつれ、それらは、無作為な順序で徐々にヒト染色体を欠くが、マウス染色体を維持する。特定の酵素を失うので、マウス細胞は増殖できないが、ヒト細胞は増殖できる培地を使用することにより、必要な酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が維持される。種々の培地を使用することによって、ハイブリッド細胞株のパネルが確立され得る。パネルにおける各細胞株は、単一のヒト染色体または少数のヒト染色体いずれかおよびマウス染色体の完全なセットを含み、これにより、個々の遺伝子を特定のヒト染色体にマッピングすることが容易に可能になる（例えば、D'Eustachioら（1983）*Science* 220:919-924を参照のこと）。ヒト染色体のフラグメントのみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座および欠失を伴うヒト染色体を使用することにより生成され得る。

【0345】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定の配列を割り当てるためには迅速な手順である。1つのサーマルサイクラーを用いて一日に3つ以上の配列が割り当てられ得る。AMFX配列を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを設計すると、下位位置決定（sublocalization）は、特定の染色体由来のフラグメントのパネルを用いて達成され得る。

【0346】

中期染色体スプレッドに対するDNA配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)をさらに使用して、一工程で正確な染色体位置を提供し得る。染色体スプレッドは、コルセミド(染色体紡錘体を破壊する)のような化学物質により分裂が中期においてブロックされた細胞を使用して行われ得る。この染色体は、トリプシンで短時間処理され得、次いで、ギムザ染色され得る。薄いバンドおよび濃いバンドのパターンが各染色体で発生し、その結果、この染色体は、個々に同定され得る。FISH技術は、500または600塩基ほどの長さのDNA配列と共に使用され得る。しかし、1,000塩基より大きなクローンは、簡単な検出に十分なシグナル強度で、独特の染色体位置に結合する可能性がより高い。好ましくは、1,000塩基、そしてより好ましくは、2,000塩基が妥当な時間量で良好な結果を得るために十分である。この技術の総説については、Vermaら、HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (Pergamon Press, New York 1988)を参照のこと。

【0347】

染色体マッピングの試薬は、単一の染色体またはその染色体上の単一部位を印付けするために個々に使用され得るか、あるいは試薬のパネルは複数部位および/または複数染色体を印付けするために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際に、マッピング目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内に保存されており、従って、染色体マッピングの間に交叉ハイブリダイゼーションの機会が増大する可能性が高い。

【0348】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、その配列の染色体上の物理的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る。このようなデータは、例えば、McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで入手可能)において見いだされる。次いで、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と疾患との間の関係は、

例えば、Egelandら(1987)Nature, 325:783-787に記載される連鎖分析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)によって同定され得る。

【0349】

さらに、AMFX遺伝子と関連する疾患に罹患した個体と、この疾患に罹患していない個体との間のDNA配列における差異が決定され得る。罹患した個体のいくらかまたは全てにおいて変異が認められるが、非罹患個体のいずれにおいても認められない場合、この変異は特定の疾患の候補因子である可能性が高い。罹患個体と非罹患個体の比較は、一般に、染色体における構造的変化(例えば、染色体スプレッドから可視であるか、またはそのDNA配列に基づいたPCRを用いて検出可能な欠失または転座)を最初に探すことを包含する。最終的に、いくらかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定を行って、変異の存在を確認し得、かつ多型に由来する変異を区別し得る。

【0350】

(組織型決定(tissue typing))

本発明のAMFX配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のために独特のバンドを生成するためにサザンブロット上でプローブされる。本発明の配列は、RFLP(米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多型」)のためのさらなるDNAマーカーとして有用である。

【0351】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとにDNA配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のAMFX配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体のDNAを増幅し得、引き続いて、配列決定し得る。

【0352】

このように調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、各個体が、

対立遺伝子差異に起因するこのようなDNA配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のAMFX配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子変異は、これらの配列のコード領域においてある程度生じ、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子変異は、各500塩基につき約1回の頻度で生じると見積もられる。対立遺伝子変異の多さは、制限フラグメント長多型(RFLP)を含む単一ヌクレオチド多型(SNP)に起因する。

【0353】

本明細書中で記載の配列の各々は、ある程度、標準物質（これに対して個体からのDNAが識別の目的で比較され得る）として使用され得る。より多くの多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。非コード配列は、おそらく10~1,000プライマーのパネルを用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマーは、各々が100塩基の増幅された非コード配列を生じる。推定コード配列（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19における配列）が使用される場合、ポジティブな個体識別に関するプライマーのより適切な数は、500~2,000である。

【0354】

（予測医療）

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノム(pharmacogenomics)およびモニタリング臨床試験が、予後(予測)の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、AMFXタンパク質および/または核酸の発現、ならびにAMFXの活性を、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の関連で決定するための診断アッセイに関し、これによって、異常なAMFXの発現または活性に関連して、個体が疾患または障害に罹患するかどうか、あるいは障害を発症するリスクがあるかどうかを決定する。この障害には、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞の接着または移動の経路の調節に関連する障害、

例えば、化学療法抵抗性、放射線治療抵抗性、栄養因子が制限された二次組織部位のミクロ環境での生存、結合組織障害、組織再造形、腫瘍形成、胸部の癌、卵巣の癌、頸部の癌、前立腺の癌、子宮内膜の癌、胃の癌、結腸の癌、肺の癌、膀胱の癌、腎臓の癌、脳ของ癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再造形、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン移送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖のオートクラインおよびパラクリンによる調節、外部刺激に対する細胞応答、慢性疾患および種々の癌に関連する消耗障害が挙げられるが、これらに限定されない。本発明はまた、個体が、AMFXのタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための予後的（または予測的）アッセイを提供する。例えば、AMFXの遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによってAMFXのタンパク質、核酸の発現または生物学的活性によって特徴付けられるかまたは関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置する。

【0355】

本発明の別の局面は、個体におけるAMFXのタンパク質、核酸の発現あるいは活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的試薬（本明細書において「薬物ゲノム」とよばれる）を選択する。薬物ゲノムは、個体の遺伝型（例えば、特定の試薬に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型）に基づいて個体の治療的または予防的処置のための試薬（例えば、薬物）の選択を可能にする。

【0356】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるAMFXの発現または活性に対する試薬（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。

【0357】

これらおよび他の試薬は、以下の節でさらに詳細に記載される。

【0358】

（診断アッセイ）

生物学的サンプルにおけるAMFXの存在または非存在を検出するための例示

的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをAMFXのタンパク質またはAMFXタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、AMFXの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。AMFXのmRNAもしくはゲノムDNAを検出するための薬剤は、AMFX mRNAもしくはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のAMFXの核酸（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19の核酸またはそれらの一部）（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、ストリンジントな条件下でAMFXのmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするに十分である核酸）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

【0359】

AMFXのタンパク質を検出するための薬剤は、AMFXのタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')₂）が使用され得る。用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結する）ことによってそのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識された別の試薬との反応性によってそのプローブもしくは抗体の間接的な標識をすることを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにDNAプローブのビオチンを用いた末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、AMFXのmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、生物学的サン

ル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、AMFXのmRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。AMFXのタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。AMFXのゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、AMFXのタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗AMFX抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカールを用いて標識され得る。被験体における放射性マーカールの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

【0360】

1つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、その生物学的サンプルは、その試験被験体からのmRNA分子またはその試験被験体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【0361】

別の実施形態において、これらの方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、AMFXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAを検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、AMFXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるAMFXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるAMFXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

【0362】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるAMFXの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてAMFXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物も

しくは薬剤；そのサンプルにおけるAMFXの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおけるAMFXの量と、標準とを比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、AMFXのタンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための指示書を備え得る。

【0363】

(予後アッセイ)

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、AMFXの異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するか、またはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ）を利用して、AMFXのタンパク質、核酸の発現または活性に関連する障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。従って、本発明は、AMFXの異常発現または異常活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてAMFXのタンパク質または核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、ここで、AMFXのタンパク質または核酸の存在は、AMFXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体についての診断指標である。本明細書において使用される場合「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

【0364】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体に薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与してAMFXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置し得るか否かを、決定し得る。例えば、このような方法を使用して、被験体が障害のための薬剤で有効に処置され得るか否か

を決定し得る。従って、本発明は、AMFXの異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて、被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてAMFXのタンパク質または核酸が検出される（例えば、ここで、AMFXのタンパク質または核酸の存在は、この薬剤が投与されてAMFXの異常発現または異常活性に関連する障害が処置され得る被験体についての、診断指標である）。

【0365】

本発明の方法はまた、AMFX遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる障害についての危険性を有するか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、この方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、AMFXタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える少なくとも1つの変更によって特徴付けられる遺伝的損傷の存在または非存在、あるいはAMFX遺伝子の誤発現を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(i) AMFX遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(ii) AMFX遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(iii) AMFX遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(iv) AMFX遺伝子の染色体再配置；(v) AMFX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更、(vi) AMFX遺伝子の異常改変（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常改変）、(vii) AMFX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii) AMFXタンパク質の非野生型レベル、(ix) AMFX遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(x) AMFXタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、AMFX遺伝子における損傷を検出するために使用され得る、多数の公知のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

【0366】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと）（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、あるいは、連結連鎖反応（LCR）（例えば、Landegranら（1988）Science 241:1077-1080；およびNakazawaら（1994）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:360-364を参照のこと）におけるプローブ/プライマーの使用を包含する。後者は、AMFX遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る（Abravayaら、1995 Nucl Acids Res 23:675-682を参照のこと）。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸（例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方）をそのサンプルの細胞から単離する工程、AMFXの遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーとその核酸サンプルとを、AMFX遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物のサイズを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されることが望ましくあり得ることが予想される。

【0367】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：当業者に周知な技術を用いた、その増幅された分子の検出の前の、自己維持配列複製（Guatelliら、1990、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878を参照のこと）、転写増幅系（Kwohら、1989、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177を参照のこと）、Qレプリカーゼ（Lizardiら、1988、BioTechnology 6:1197を参照のこと）、または他の任意の核酸増幅方法。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に極少数で存在する場合に、そのような核酸分子の

検出のために特に有用である。

【0368】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのAMFX遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅され(必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差異は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用(例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

【0369】

他の実施形態において、AMFXにおける遺伝子変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る(Croninら(1996)Human Mutation 7:244-255; Kozalら(1996)Nat. Med. 2:753-759を参照のこと)。例えば、AMFXにおける遺伝子変異は、Croninら(前出)に記載されるように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、プローブの第一ハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAにわたって走査し、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによって、その配列間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に第二のハイブリダイゼーションアレイが続き、これは、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いることによる特定の変異の特徴付けを可能にする。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

【0370】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、AMFX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルAMFX配列と対応する野生型(コントロール)配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaximおよびGilbert(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:560またはSanger(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される(例えば、Naevら(1995)Biotechniques 19:448を参照のこと)。これらには、質量分析法による配列決定法(例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101;Cohenら(1996)Adv Chromatography 36:127-162;およびGriffinら(1993)Appl Biochem Biotechnol 38.:147-159を参照のこと)が含まれる。

【0371】

AMFX遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖に基づくミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる(例えば、Myersら(1985)Science 230:1242を参照のこと)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のAMFX配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供する工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域(例えば、そのコントロールとサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの)を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA/DNAハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することに対して、S₁ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミ

ウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。そのミスマッチ領域の消化後、次いで、得られた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさにより分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら(1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleebaら(1992) Methods Enzymol 217:286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

【0372】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を、細胞のサンプルから得られたAMFX cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(例えば、Hsuら(1994) Carcinogenesis 15:1657~1662を参照)。例示的な実施形態に従って、AMFX配列(例えば、野生型AMFX配列)に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物(もしあれば)は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

【0373】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、AMFX遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖コンホメーション多型(SSCP)は、変異体と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る(例えば、Oritaら(1989) Proc Natl Acad Sci USA:86:2766、Cotton(1993) Mutat Res 285:125~144; Hayashi(1992) Genet Anal Tech Appl 9:73~79を参照のこと)。サンプルおよびコントロールAMFX核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性

され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、1つの塩基変化の検出さえも可能にする。DNAフラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感度は、DNAよりもむしろ、二次構造が配列中の変化に対してより感受的であるRNAを使用することによって増強され得る。1つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する。例えば、Keenら(1991) Trends Genet 7:5を参照のこと。

【0374】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイされる。例えば、Myersら(1985) Nature 313:495を参照のこと。DGGEが分析の方法として使用される場合、DNAは、例えば、PCRにより約40bpの高融点GCリッチDNAのGCクランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実にするように改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプルDNAの移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される。例えば、RosenbaumおよびReissner(1987) Biophys Chem 265:12753を参照のこと。

【0375】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズされる。例えば、Saikiら(1986) Nature 324:163) ; Saikiら(1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:6230を参照のこと。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして

標識された標的DNAとハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

【0376】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する)(例えば、Gibbsら(1989)Nucl. Acids Res 17:2437~2448を参照)か、あるいは適切な条件下でミスマッチがポリメラーゼ伸長を妨害または減少し得る、1つのプライマーの3'の最末端で、目的の変異を保有し得る(例えば、Prossner(1993)Tibtech 11:238参照)。さらに、変異領域に新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る。例えば、Gaspariniら(1992)Mol Cell Probes 6:1を参照のこと。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用Taqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される。例えば、Barany(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:189を参照のこと。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位における既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【0377】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、AMFX遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

【0378】

さらに、AMFXが発現される任意の細胞型または組織(好ましくは、末梢白血球)は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル(例えば、頬粘膜細胞を含む)が、

使用され得る。

【0379】

(薬理ゲノム学 (Pharmacogenomics))

AMFX活性(例えば、AMFX遺伝子発現)に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、障害(この障害には、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞の接着または移動の経路の調節に関連する障害、例えば、化学療法抵抗性、放射線治療抵抗性、栄養因子が制限された二次組織部位のミクロ環境での生存、結合組織障害、組織再造形、腫瘍形成、胸部の癌、卵巣の癌、頸部の癌、前立腺の癌、子宮内膜の癌、胃の癌、結腸の癌、肺の癌、膀胱の癌、腎臓の癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再造形、炎症、血餅の形成および吸収、造血、新脈管形成、有機アニオン移送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖のオートクラインおよびパラクリンによる調節、外部刺激に対する細胞応答、ならびに慢性疾患および種々の癌と関連する消耗障害が挙げられるが、これらに限定されない)を(予防的または治療的に)処置するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学(すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究)が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤(例えば、薬物)の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、AMFXタンパク質の活性、AMFX核酸の発現、あるいは個体におけるAMFX遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

【0380】

薬理ゲノム学は、罹患した人における変更された薬物の性質および異常な作用に起因して、薬物に应答する臨床的に有意な遺伝性変更を扱う。例えば、Eich

elbaum、1996、Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, 23:983~985およびLinder、1997、Clin. Chem, 43:254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。薬物が身体に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物作用)、または身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物代謝)。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物(抗マリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの摂食後の溶血である。

【0381】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)ならびにシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型(高い代謝能を持つ人(extensive metabolizer)(EM)および低い代謝能を持つ人(poor metabolizer)(PM))で表現される。PMの有病率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受けの場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準とな

る分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

【0382】

従って、AMFXのタンパク質の活性、AMFXの核酸の発現、あるいは個体におけるAMFXの遺伝子の変異内容を決定して、それによって、その個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型を適用し得る。この知見は、用量または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をAMFXの調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）を用いて処置する場合に治療的または予防的効率を増強し得る。

【0383】

（臨床試験中の効果のモニタリング）

AMFXの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングおよび臨床試験に適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される、AMFXの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはAMFX活性をアップレギュレートする薬剤の効力は、減少したAMFXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたAMFXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される、AMFXの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはAMFXの活性をダウンレギュレートする薬剤の効力は、増加したAMFXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたAMFXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、AMFXの発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞増殖または免疫障害に關与するような他の遺伝子が、「リードアウト（読み出し）（read out）」、すなわち、特定の細胞の免疫応答性のマーカーとして使用され得る。

【0384】

例えば、限定されないが、AMFXを含む遺伝子（これは、AMFX活性（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物または低分子）を用いる処置によって、細胞内で調節される）が、同定され得る。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、そしてAMFXおよびこの障害に關与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるように、ノーザンプロット分析もしくはRT-PCRによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定することによるか、本明細書中に記載されるような方法の1つによるか、あるいはAMFXまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この様式で、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前、および処置の間の種々の時点で、決定され得る。

【0385】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物）を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：(i) 薬剤の投与前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii) この投与前サンプルにおいて、AMFXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii) この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv) この投与後サンプルにおいて、AMFXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v) この投与前サンプルにおけるAMFXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるAMFXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルと比較する工程；ならびに(vi) 従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出され

るよりも高いレベルにAMFXの発現または活性を増加すること（すなわち、この薬剤の効力を増加すること）が望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにAMFXの発現または活性を減少するため（すなわち、この薬剤の効力を減少するため）に望ましくあり得る。

【0386】

（処置方法）

本発明は、異常なAMFXの発現または活性に関連する障害の危険性のある（またはこの障害に感受性の）被験体、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。この障害には、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞の接着または移動の経路の調節に関連する障害、例えば、化学療法抵抗性、放射線治療抵抗性、栄養因子が制限された二次組織部位のミクロ環境での生存、結合組織障害、組織再造形、腫瘍形成、胸部の癌、卵巣の癌、頸部の癌、前立腺の癌、子宮内膜の癌、胃の癌、結腸の癌、肺の癌、膀胱の癌、腎臓の癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再造形、炎症、血餅の形成および吸収、造血、親脈管形成、有機アニオン移送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖のオートクラインおよびパラクリンによる調節、外部刺激に対する細胞応答、ならびに他の疾患、障害および状態などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0387】

これらの処置方法は、以下により詳細に記載される。

【0388】

（疾患および障害）

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を拮抗する（すなわち、低減または阻害する）治療剤を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（i）上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；（ii）上記ペプチドに対する抗体；（iii）上記ペプチドをコードする核酸；（iv）相同組

換えによって上記ペプチドの内因性機能を「ロックアウトする」ために利用される、アンチセンス核酸および「機能不全性」である（すなわち、上記ペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する）核酸の投与、（例えば、Capecci、1989、Science 244:1288~1292を参照のこと）；または（v）上記ペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子（すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む））。

【0389】

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる（すなわち、活性に対するアゴニストである）治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティーを増加させるアゴニスト。

【0390】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド（または上記ペプチドのmRNA）のRNAレベルまたはペプチドレベル、構造および/または活性についてインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

【0391】

(予防的方法)

1つの局面において、本発明は、被験体において異常なAMFXの発現または活性と関連する疾患または状態を、AMFXの発現または少なくとも1つのAMFX活性を調節する薬剤をこの被験体に投与することによって予防するための方法を提供する。異常なAMFXの発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このAMFX異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このAMFX異常の型に依存して、例えば、AMFXアゴニスト薬剤またはAMFXアンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。本発明の予防方法は、以下の小区分において、さらに議論される。

【 0 3 9 2 】

(治療方法)

本発明の別の局面は、治療目的のためにAMFXの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するAMFXタンパク質活性の活性のうちの1つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。AMFXタンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、AMFXタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、AMFXペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、AMFXタンパク質活性のうちの1つ以上を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なAMFXタンパク質、およびその細胞に導入されたAMFXをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、AMFXタンパク質活性のうちの1つ以上を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスAMFX核酸分子、および抗AMFX抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで(例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって)、あるいはインビボで(例

例えば、被験体にその薬剤を投与することによって)実施され得る。このように、本発明は、AMFXのタンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、AMFXの発現または活性を調節する(例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする)薬剤(例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤)あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、AMFXのタンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常な、AMFXの発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

【0393】

AMFX活性の刺激は、AMFXが異常にダウンレギュレートされている状況、および/またはAMFX活性の増加が有益な効果を有するようである状況において、望ましい。このような状況の1つの例は、被験体が、異常な細胞増殖および/または細胞分化によって特徴付けられる障害(例えば、癌または免疫関連障害)を有する場合である。このような状況の別の例は、被験体が妊娠疾患(例えば、子癩前症(*precipia*))を有する場合である。

【0394】

(治療剤の生物学的効果の決定)

本発明の種々の実施形態では、適切なインビトロまたはインビボアッセイを行い、特定の治療剤の効果を決定し、かつその投与が発症した組織の処置について適応されるか否かを決定する。

【0395】

種々の特異的な実施形態では、インビトロアッセイは、所定の治療剤が、細胞型に所望の効果を発揮するかどうかを決定するために、患者の疾患に關与する代表的な細胞型で行なわれ得る。治療において使用される化合物は、ヒト患者で試験する前に、適切な動物モデル系で試験され得、それらの適切な動物モデル系としては、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどが挙げられるがそれに限定されない。同様に、インビボ試験のために、当該分野で公知の任意の動

物モデル系が、ヒト患者に投与する前に、使用され得る。

【0396】

(本発明の組成物の予防的使用および治療的使用)

本発明のAMFX核酸およびタンパク質は、種々の障害に関する潜在的な予防的適用および治療的適用において有用である。これらの障害としては、例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞の接着または移動の経路の調節に関連する障害が挙げられ、例えば、限定はしないが、化学療法抵抗性、放射線治療抵抗性、栄養因子が制限された二次組織部位のミクロ環境での生存、結合組織障害、組織再形成、腫瘍形成、胸部の癌、卵巣の癌、頸部の癌、前立腺の癌、子宮内膜の癌、胃の癌、結腸の癌、肺の癌、膀胱の癌、腎臓の癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再形成、炎症、血餅の形成および吸収、造血、親脈管形成、有機アニオン移送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖のオートクラインおよびパラクリンによる調節、外部刺激に対する細胞応答、慢性疾患および種々の癌に関連する障害が挙げられる。

【0397】

一例として、本発明のAMFXタンパク質をコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得、そしてそのタンパク質は、それが必要な被験体に投与される場合に、有用であり得る。非限定的な例として、本発明の組成物は、以下に罹患する患者の処置に対して効力を有する：例えば、細胞シグナルプロセッシング、細胞の接着または移動の経路の調節に関連する障害、例えば、限定はしないが、化学療法抵抗性、放射線治療抵抗性、栄養因子が制限された二次組織部位のミクロ環境での生存、結合組織障害、組織再形成、腫瘍形成、胸部の癌、卵巣の癌、頸部の癌、前立腺の癌、子宮内膜の癌、胃の癌、結腸の癌、肺の癌、膀胱の癌、腎臓の癌、脳の癌、および軟部組織の癌、細胞形質転換、発生組織再形成、炎症、血餅の形成および吸収、造血、親脈管形成、有機アニオン移送体に関連する多剤耐性、悪性疾患の進行、細胞増殖のオートクラインおよびパラクリンによる調節、外部刺激に対する細胞応答。

【0398】

AMFXタンパク質をコードする新規の核酸、および本発明のAMFXタンバ

ク質の両方、またはそれらのフラグメントはまた、診断上の適用に有用であり得、ここで核酸またはタンパク質の存在または量が、評価される。さらなる使用は、抗菌分子としての使用であり得る（すなわち、いくつかのペプチドは、抗菌特性を有することが見出された）。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための、本発明の新規の物質に免疫特異的に結合する抗体の産生において、さらに有用である。

【0399】

（実施例）

以下の実施例は、非限定的な例によって、本発明の種々の局面を説明する。

【0400】

（実施例1．種々の細胞および組織におけるAMF1～AMF10の定量的発現分析）

クローンAMF1～AMF10の定量的な発現パターンを、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM（登録商標）7700 Sequence Detection Systemで行ったリアルタイム定量PCR（TaqMan（登録商標））によって、多数の正常および腫瘍のサンプル細胞および細胞株において評価した。

【0401】

第1に、96のRNAサンプルを - アクチンおよびGAPDHに対して正規化した。RNA（合計約50ngまたは約1ngポリA+）を、製造者のプロトコールに従って、TaqMan（登録商標）Reverse Transcription Reagents Kit（PE Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号N808-0234）およびランダムヘキサマーを使用してcDNAに変換した。反応を、20 μ lで実施し、そして30分間48 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次いで、cDNA（5 μ l）を、製造業者のプロトコールに従って、 - アクチンおよびGAPDH TaqMan（登録商標）Assay Reagents（PE Biosystems; カタログ番号4310881Eおよび4310884Eの各々）およびTaqMan（登録商標）universal PCR Master Mix（PE Bio

s y s t e m s ; カタログ番号4304447) を使用するTaqMan (登録商標) 反応のために、別個のプレートに移した。反応を、以下のパラメータを使用して25 μ l で実施した: 50 で2分; 95 で10分; 95 で15秒/60 で1分(40サイクル)。結果を、対数スケールを使用するCT値(所与のサンプルが、蛍光の閾値レベルを超えるサイクル)として記録し、所与のサンプルと最も低いCT値を有するサンプルとの間のRNA濃度の差は、2のCT乗として示した。次いで、相対発現パーセントを、このRNAの差の逆数をとって100を掛けることにより得る。 - アクチンおよびGAPDHについて得られたCTの平均値は、RNAサンプルを正規化するために使用した。最も高いCT値を生じるRNAサンプルは、さらなる希釈を必要としないが、他の全てのサンプルは、 - アクチン/GAPDHの平均CT値に従ってこのサンプルと比較して希釈した。

【0402】

正規化RNA(5 μ l)を、cDNAに転換し、製造者の指示に従って、One Step RT-PCR Master Mix Reagents(PE Biosystems; カタログ番号4309169)および遺伝子特異的プライマーを使用するTaqMan(登録商標)によって分析した。プローブおよびプライマーを、入力として標的配列を使用する、Perkin Elmer BiosystemのPrimer Express Softwareパッケージ(Apple ComputerのMacintosh Power PC用のバージョンI)または類似のアルゴリズムに従って、各アッセイに対して設計した。デフォルトの設定を、反応条件に対して使用し、そして以下のパラメータを、プライマーを選択する前に設定した: プライマーの濃度=250 nM、プライマーの融点(T_m)範囲=58 ~ 60、プライマーの最適 T_m =59、プライマーの最大差=2、プローブは、5' Gを有さず、プローブ T_m は、プライマー T_m よりも10 高くなければならず、アンプリコンサイズ75 bp ~ 100 bp。選択されるプローブおよびプライマー(以下を参照のこと)は、Synthegen(Houston, TX, USA)によって合成された。プローブを、未反応の色素を除去するために2回HPLC精製し、プローブのそ

れぞれ5'末端および3'末端へのレポーター色素およびクエンチャー色素のカップリングを確認するために、マススペクトルによって評価した。正方向プライマーおよび逆方向プライマーの最終濃度は、各々900 nMであり、そしてプローブの最終濃度は、200 nMであった。

【0403】

PCR条件：各組織および各細胞株由来の正規化RNAを、96ウェルPCRプレート(Perkin Elmer Biosystems)の各ウェルにスポットした。2つのプローブ(標的クローンに特異的なプローブおよび標的プローブで多重化された別の遺伝子特異的プローブ)を含むPCRカクテルを、PE Biosystems 7700の1xTaqMan™PCR Master Mix(5mMのMgCl₂、dNTP(dA、G、C、U(1:1:1:2の比))、0.25U/ml AmpliTaq Gold™(PE Biosystems)、および0.4U/μlのRNaseインヒビター、および0.25U/μlの逆転写酵素を含む)を用いて設定した。逆転写を、48℃で30分間実施し、次いで以下の増幅/PCRサイクルを実施した：95℃で10分、次いで90℃で15秒間、60℃で1分間を40サイクル。

【0404】

(AMF-1)

AMF-1に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表12に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0405】

【表12】

表12. TaqMan分析のために入力したAMF-1(1429510)配列

(通記列番号1の逆方向鎖):
 CCGATGACTCCCGAGAAGGTGAGCCCCCTCACCCACATGCTAAGAGCCCTTCTGGGCCACCCAGATCCATCTCCGC
 ACTGCCTGGGTCTCTGAGTTTCAGGCTCCCCCTGAGAGCCTGGGTGGCCCTGGACCCCTGCCAGCCTGGGGCTTGGG
 CTTTTGTCCCCTTGGGGCCTTGAGTGTGGCCAGGGCTCTGGCGATTGTGTGGTGAACGAAGCCATGTCTGCAACGC
 CTGCCATCCGACAGCGTGAATGAGTGTGCAGAGAACCCTGGCGTCTGCACTAACGGCGTCTGTGTCAACACCGATG
 GATCCTTCCGCTGTGAGTGTCCCTTTGGCTACAGCCTGGACTTCACTGGCATCAACTGTGTGGACACAGACGAGTG
 CTCTGTGGGCCACCCCTGTGGGCAAGGGACATGCACCAATGTTCATCGGAGGCTTTCGAATGTGCTGTGTGAGCGG
 TTGAGCCTGGCCTCATGATGACCTGGGAGGACATGACGAATGCTCCCTGACCCCGCTGCTCTGTGCCCTCCGCT
 GCCAATACCGAGGGCTCCTACCTGTGCACCTGTCCAGCCGGCTACACCCTGGGGAGGACGGGGCCATGTGTGCG
 AGATGTGGAGAGTGTGCAGATGTCAGCAGGACTGCCACGCCCGGGCATGGAGTGCAAGAACCTCATCGGTACC
 TTGCGGTGGGTCTGTCCCCAGGCATGCGGCCCTGCTGGCTCTGGGGAGGGCTGCACAGATGACAAATGAATGCC
 ACGCTCAGCCTGACCTCTGTGTCAACGGCCGCTGTGTCAACCCGGGGCAGCTTCCGGTGGGACTGTGATGAGGG
 ATTCCAGCCAGCCACCCCTTACCGAGTGCACGACATCCGGCAGGGGCCCTGCTTTGOCGAGTGTGTGCAGACC
 ATGTGCCGGTCTCTGTCCAGCAGCAGTGAGGCTGTCAACAGGGCCGAGTGTCTGTGGGGTGGCCGGGCTGGG
 GGCCCGCTGGGAGCTCTGTCCCTGCCCGCACCTTGTGCTACAGGAAGCTGTGCCCCATGGCTCAGGCTACAC
 TGCTGAGGGCCGAGATGTAGATGAATGCCGTATGCTTGTCTCACCTGTGTGCTCATGGGGAGTGCATCAACAGCCTT
 GGCTCCTTCCGCTGCCACTGTGAGCCGGGTACACACCGGATGCTACTGCTACTACTCCCTGGATATGGATGAGT
 GCAGCCAGGTCCCAGCCATGTACCTTCCCTGTGCAAAAACACGAAAGGGCAGTTTCCCTGTGCAGCTGTCCCGAGG
 CTACCTGCTGGAGGAGGATGGCAGGACCTGCARAGACTGGACGAATGCACCTCCCGGCAGCACAACTGTCAATTC
 CTCTGTGTCACACTGTGGGGCCCTTCACTTCCCGCTGTCCACCCGGCTTCAACCCAGCACCAACAGGCTGCTTCC
 ACAATGATGAGTGTCTGAGCCACCTGGCCCATGTGGTGGCCACGGGCACTGCCACAACCCCGGGCAGCTTCCG
 CTGTGAATGCCACCAAGGCTTCACTTGGTGTGAGCTCAGGCATGGCTGTGAAGATGTGAATGAATGTGATGGGGCC
 CACCGCTGCCAGCATGGCTGTGAGAACCAGCTAGGGGGCTACCGCTGCAGCTGCCCCAGGGTTTCAACCCAGCACT
 CCGAGTGGGCCAGTGTGTGGGTGAGTGAAGAAGGCTGGGAAGAAGCTGGGCCCTCCACCAGAACTGCTCAGAGC
 AGGGCATAACAGACGCCACCCCTCAAGATGATGTGACAAAGCACAATTAATCAAGAGATTGAACAGGCCAGCCAGA
 AGATGAGAAATGAGTGTGCCCTGTGGCCC (通記列番号 21)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-1のTaqMan分析のために使用した。

- Ag 390 (F): 5'-ACCAATGTTCATCGGAGGCTT-3' (通記列番号 22)
- Ag 390 (R): 5'-GATGTCCCTCCAGGTTCATCAT-3' (通記列番号 23)
- Ag 390 (P): FAM-5'-TCAAAGCCGTGACACAGGCCA-3'-TAMRA (通記列番号 24)

(AMF - 2)

AMF - 2に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表13に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0406】

【表13】

表13. TaqMan分析のために入力したAMF-2(20421338)配列

(通記列番号3の逆方向鎖):
 GGAGGGCCCTGTGATTCCTACTGCAGGCAGGCACCCCCACAACCTCACATGCCGGGCCCTTCAATG
 CGAAGCCCTGCTGCCACCATCATCTGGTTCCGGGACGGGACCGCAGCAGGAGGGCGCTGTGGCCAG
 CACGGAATGCTGAAGGATGGGAAGAGGGAGACACCGTGAGCCAACTGCTTATTAACCCACG
 GACCTGGACATGGGGCTGTCTTCACTTGCAGGATGAACGAAGCCA TCCC TAGTGGCAAGG
AGACTTCCATCGAGCTGGATGTGCACCACTCTCTACAGTACCCCTGTCCATTGAGCCACAGAC
GGGCAGGAGGCTGAGCGTGTGTCTTTACCTGCCAGGCCACAGCCAACCCCGAGATCT
 (通記列番号25)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-2のTaqMan分析のために使用した

- Ag 271 (F): 5'-ACCTGACATAGGGCGTGTCT-3' (通記列番号 26)
- Ag 271 (R): 5'-TCGATGGAAGTCTCCTTCCC-3' (通記列番号 27)
- Ag 271 (P): FAM-5'-CGAAGCATGAACGAAGCCATCCCTAG-3'-TAMRA (通記列番号 28)

(AMF - 3)

AMF - 3に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表14に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0407】

【表14】

表14. TaqMan分析のために入力したAMF-3(27251385)配列

(配列番号5の逆方向全長):

TCCAATCTCACATGCACGCACAGCCCGCCTGAGGCGTCCAGCATCAGGCCCTCTGGACACTCACAGCCCAAGACCC
CAGCAGTGTGACGCAACGCCCGTTGGGACAGACTCCCGGGAGGACTCACACTCGTTCACATCATCGCAGGTGAC
 ACCCGTCTCCGGGCAAAGCCCGGGCACAGGCAGGGTCCGATCTCGCAGCGTTCGCAGGGCCTCCCCAGGCTGCC
 CCGAGG (配列番号 29)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-3のTaqMan分析のために使用した。

Ag 72

F CGGAAAGACCCAGCAGTGT (配列番号 30)

R ATGATGTGAACGAGTGTGAGTCCT (配列番号 31)

P Fam-CGCCCGTGGGACAGACTCCC-Tamra (配列番号 32)

(AMF - 4)

AMF - 4に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表15に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0408】

【表15】

表15. TaqMan分析のために入力したAMF-4(27486474)配列

TCACGGGAATAAGCCTGGGCCCGTCCCTTTGATTTCCACACAGATCTGCATACACAGGGA
CGTGACGGTGGCATCATCTCCCCCTCCATGCTCTGCGCGGGCTACCTGACGGGTGGCGT
 GGACAGCTGCCAGGGGGACAGCGGGGGGCCCTGGTGTGTCAAGAGAGGAGGCTGTGGHA
 GTTAGTGGGAGCGACCACTTTGGCATCGGCTGCGCAGAGGTGAACAAGCCTGGGGTETA
 CACCCTGTCACTCCTTCCTGGACTGGATCCACGAGCAGATGGAGAGAGACCTAAAACC
 TGAAGAGGAAGGGGATAAGTAGCCACCTGAGTTCCTGAGGTGATGAAGACAGCCCGATCC
 TCCCCTGGACTCCCGTGTAGGAACCTGCACACGAGCAGACACCCCTTGGAGCTCTGAGTTC
 CGGCACCACTAGCAGGCC (配列番号 33)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-4のTaqMan分析のために使用した。

Ag 248 (F): 5'-TTTCCACACAGATCTGCACCA-3' (配列番号 34)

Ag 248 (R): 5'-AGGTAGCCCGCCAGAG-3' (配列番号 35)

Ag 248 (P): FAM-5'-CGTGTACGGTGGCATCATCTCCCC-3'-TAMRA (配列番号 36)

(AMF - 5)

AMF - 5に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、

表16に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0409】

【表16】

—表16. TaqMan分析のために入力したAMF-5(29691387)配列

TGTCATTGTCCTTTACCTATTATATTTTTTCATACCTCTGTGAAAACAATCAGTTGCCGGACTAACCATGACCTATGATGGAA
ATAATCCAGTGCATCTCATAGAGATGTGCCACTTCTTATTGCAATCAGACTGCAATTGTGATGAATGTCAGTGGGAACCAG
TCGTGGGAACAATGCATAACTTACCTGTCACTTGTCTAGCAGGATGCAATCCTCAAGTGGTATTAAAAAGCATAACAGTGT
TTTATAACTGTAGTTGTGTGAAGTAACTGGTCTCCAGAACAGAAATTACTCAGCCCACTTGGGTGAATGCCCAAGAGATAATA
CTGTACCAAGGAATTTTTCATCTAGTTGCATTCAGTCAATAAATCTTTGTCTCTGCAACAGGAGGTACC (配列番
号 37)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-5のTaqMan分析のために使用した。

Ag 287 (F): 5'-AACTCAGACTGCAATTGTEATGAAA-3' (配列番号 38)
Ag 287 (R): 5'-CTAGACAAGGTGACAGGTAAGTTATTCC-3' (配列番号 39)
Ag 287 (P): TET-5'-TTGTTCCACAGACTGGTTCCTCCACTGT-3'-TAMRA (配列番号 40)

(AMF-6)

AMF-6に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表17に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0410】

【表17】

—表17. TaqMan分析のために入力したAMF-6(38905521)配列

TGGCAGCCCTGGAGGAGCCGATGGTGGACCTGGACGGGAGCTGCCCTTTCGTGCGGCCCTGCCCCACATTGCCGT
GCCTCCAGGACGAGCTGCTCCGCAACTCTTCCAGGATGACGACCTCGGGGCCGATGAGGAAGAGGCGAGATTGCCGGGC
GAACACACGCTCACAGAGAAGTTGTCTGCCTGGATGACTCCTTTGCCCCATGACTGCAGCTTGACCTGTGATGACT
GCAGGAACGGAGGGACCTGCCTCCTGGGCCCTGGATGGCTGTGATTCGCCCGAGGGGTGACTGSSGTTATTGCAA
TGAGATTTGCTCCTCCGGA (配列番号 41)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-6のTaqMan分析のために使用した。

Ag 252 (F): 5'-GAGCTGCCGCAACTCTTCC-3' (配列番号 42)
Ag 252 (R): 5'-GACAACTTCTCTGTGAGCGTGTG-3' (配列番号 43)
Ag 252 (P): TET-5'-CGCAACTCTGCCCTCTCCTCATCGG-3'-TAMRA (配列番号 44)

(AMF-7)

AMF-7に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表18に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、

そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0411】

【表18】

表18. TaqMan分析のために入力したAMF-7(4194093)配列

(配列番号13の逆方向鎖):

```

cgccctcatgctgcccggcgggtgctcggccggctggtggccgagctgcagggccgccc
ggacgcctgcccacagcgcacaattgcaatbaggagcagagcctgcgcgcttgcgcctggct
gctgcatgcccgggaaccactgggaccgggcttgaagccacctccagggccagaac
taatggagaggaccgccctccagcatgcacaccagtcacacaagacctcaaagagtggga
gttctgaccagcactgggagaaggctgtacgagttcgaagaggcatcactaaggccga
agagagagacaaggccccccagcctgaaatctaggctccatbgtcacctctctggcaccgac
agcctccgccccaccgcatccccaggccaagctgggtggccatgcttcagacacgagacc
caocaaggggcctccgccaagaccggctgctgccaaggggccacctgagcggcggctgct
gtcagtggggggatgggaaccctgttgggatgggagcccgaaaccgccagcctggggcggg
cctcaggaccagcaaatggcccctaccgctgctcctcaggccccagaagccttcacact
caaggagaaggggcaacctgctgaggctgctgctggcattccaggaaagcagccttcccagaa
ctcgagcctgtgggcccagctcacttccacaagaccagctgattccacgggatggcggcgc
tgccaaaaccagcttctccagaacatgcagacagcttccaggcggggcccccagccaggct
cagtgctgtggagggtggaggcggaggcggggcgcttgcggaaggcctgctogctgctgag
actgcccattgaggaggagctctcagcagcctccatggactggatgcaggagtaaccgctg
cctgctcacgctggaggggctgcaggccatgggtgggcccagtgcttgccagggctgcaggga
gctgctgtagcgggtggcggaaacagccaccaagaccatgtcctgtggggaggcccccg
agcctcggcctcctgtgggggtagagcgggagcctgcatggagccccagcctgcttctta
ctccagcaccagagctgcagaccctggcggccctcaagctgcgagtggtgctgctgga
ccagcagatccactggaaaggctcctgctggctgaaactcctccctggtaagcgtgca
acagccgagggggcgccttggctggcctgtgcccgggctgtgcaagcctgcttgcga
gggaggagcagctgcttaccatcctgcccggatgaacctgcagctctgagccttcccat
gtgcccctggc (配列番号 45)

```

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-7のTaqMan分析のために使用した

- Ab16 (F): 5'-GGCATTCCAGGAAAGCAGCTT-3' (配列番号 45)
- Ab16 (R): 5'-GCATCCGTGGAAATCACTGGT-3' (配列番号 47)
- Ab16 (P): FAM-5'-TGGGCCCAGCTCAGTTCACACA-TAMRA (配列番号 48)

(AMF-8)

AMF-8に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表19に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0412】

【表19】

表19. TaqMan分析のために入力したAMF-8 (AC011036_A) 配列

(配列番号15の逆方向鎖):
 ATGCAGGCTCAACAGTACCAGCAGCAGCGTCGAAAATTTCAGCTGCCCTTCTGGCATTCAATTTTCATACITGGCAG
 CTGTGGATACTGCTGAAGCAGGGGAAGAAGAGAAACCAGAAAAAAGTGAAGAAGTCTGACTGTGGAGAATGGCA
 GTGGAGTGTGTGTGCCCCACAGTGGAGACTGTGGGCTGGCCACACCGGAGGGCACTCGGACTGGAGCTGAGTGC
 AAGCAAACCATGAAGACCCAGAGATGTAAAGATCCCCTGCAACTGGAAGAGCAATTTGGCCGGAGTGCAAATACC
 AGTTCAGGGCCTGGGGAGAATGTGACCTGAACACAGCCCTGAAGACCCAGAACTGGAAGTCTGAAGCGAGCCCTGCA
CAATGCCGATGTCCAGAGACTGTACCCATCTCCAGCCCTGTGGCAACTGACCAAGCCCAACCTCAAGGTACC
 CTAGAACTTAAAGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCTGAGGAGACCTTTTAG (配列番号 49)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-8のTaqMan分析のために使用した

- Ag 177 (F): 5'-CCCTGCACAATGCCGAAT-3' (配列番号 50)
- Ag 177 (R): 5'-TGAGGTTTGGGCTTGGTGAG-3' (配列番号 52)
- Ag 177 (P): TET-5'-CACCATCTCCAGCCCTGTGGCAA-3'-TAMRA (配列番号 52)

(AMF-9)

AMF-9に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表20に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0413】

【表20】

表20. TaqMan分析のために入力したAMF-9 (AL307658) 配列

TTTTGAAGTTTTCATTCTATAATGCATAGACAATGGGATTACAGATGGAGTTGGAAAATCCAAATAATTTGCACGA
 TAGCAAAAATCATCTTGATGTGACATCATCATATTCCTTTTCAAAATTAAGTATTCAATCATCATATGGACAAC
ATGGATTTGGTCCCXGCAACAGCAAGAGAGCCACCACTGTACCATATAATGACAGCTCGTTCTTCTCCAT
 AAGAGGCAGGAGGAGAGATGACAAGGATGAAGGTGGTGTAGATCTTCTGTTGCACAGGGCTGGTCCACTCTTCT
 AAGCAGCAGATGTGTTCTTTTCAATAGGAAGTCATAATTTGATCTCAAGTGTGTGCACGTGCCACATGGGTGATC
 CTACGATGACTGCCACCAGCCAGACCACACCTAGCATTTGTGAAGCCCTTCG (配列番号 53)

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-9のTaqMan分析のために使用した

- GPCR 13 (F): 5'-ATGGAATGGTCCCAGCA-3' (配列番号 54)
- GPCR 13 (R): 5'-TGGAAGAGAAACGAGCTGTCA-3' (配列番号 55)
- GPCR 13 (P): 5'-CAGCAAAGAGAGCCACCCTGTCA-3' (配列番号 56)

(AMF-10)

AMF-10に対するTaqMan分析のために使用したヌクレオチド配列を、表21に示す。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチド配列を枠で囲み、そしてプローブとして使用したオリゴヌクレオチド配列に下線を引く。

【0414】

【表21A】

表21. TaqMan分析のために入力したAMF-10(G55707_A)配列

~~NAGACTTACTCCATCGCTGAGAGGCAGGGCATCAATGCCAGCTTTTTCAGTCTTCCAGTCTGGCTAATTCGATCACCTAG~~
 T Y S I A E K L G I N A S F F Q S S K S A N T I T S 80
 TTTGTAGACAGGGGACTAGNN (配列番号 57)
 F V D R G L (配列番号 20) 102

以下のプライマー配列およびプローブ配列を、AMF-10のTaqMan分析のために使用した。

Ag 191 (F): 5'-GACTTACTCCATCGCTGAGAGCT-3' (配列番号 58)
 Ag 191 (R): 5'-GCTGGTGATCGTATTAGCCGA-3' (配列番号 59)
 Ag 191 (P): FAM-5'-CATCAATGCCAGCTTTTTCAGTCTTCC-3'-TAMRA (配列番号 60)

(実施例2. TaqMan分析を使用するAMF X遺伝子発現の定量)

クローンAMF-1~AMF-10の定量的発現パターンを、多数の正常および腫瘍のサンプル細胞および細胞株において、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM(登録商標)7700配列検出システムにおいて実施される、リアルタイムの定量PCR(TaqMan(登録商標))によって評価した。表21は、AMF-1、AMF-2、AMF-4、およびAMF-6の発現パターンを示す。

【0415】

【表21B】

表 21. 細胞および組織における AMF-X の発現

正常組織および腫瘍組織	AMF-1	AMF-2	AMF-6	AMF-4
	相対的発現 (%)			
内皮細胞	0.00	4.97	17.31	0.00
内皮細胞 (処置された)	0.00	4.30	5.15	0.00
脾臓	0.00	3.06	13.03	14.66
脾臓癌腫 CAPAN 2	0.00	23.98	10.73	0.00
脂肪	2.66	39.78	62.85	0.00
副腎	0.00	8.19	4.30	0.00
甲状腺	7.38	6.08	6.56	11.27
唾液腺	5.87	4.09	15.60	13.58
下垂体	0.00	10.22	2.29	0.00
脳 (胎児)	100.00	8.96	1.08	0.00
脳 (全体)	3.00	3.74	0.12	0.00
脳 (扁桃)	0.80	1.66	0.19	0.00
脳 (小脳)	1.44	10.51	6.75	0.00
脳 (海馬)	2.80	1.18	0.00	0.00
脳 (視床下部)	5.63	3.42	1.07	6.79
脳 (黒質)	7.33	3.52	0.26	0.01
脳 (視床)	2.01	2.70	0.46	0.00
脊髄	1.18	3.96	1.69	0.00
CNS 癌腫 (膠/星状) U87-MG	0.00	23.98	0.00	0.00
CNS 癌腫 (膠/星状) U-118-MG	0.00	24.83	33.22	0.00
CNS 癌腫 (星状) SW1783	0.00	17.08	37.37	0.00
CNS 癌腫* (神経; 転移) SK-N-AS	0.00	17.56	0.00	0.00
CNS 癌腫 (星状) SF-539	0.00	27.36	3.54	0.00
CNS 癌腫 (星状) SNB-75	0.00	65.07	4.07	0.00
CNS 癌腫 (膠) SNB-19	2.68	53.59	0.00	0.00
CNS 癌腫 (膠) U251	0.00	26.79	0.23	0.00

(表2)の続き)

CNS腫瘍(膠) SF-295	0.00	33.45	15.71	3.33
心臓	0.00	4.54	15.18	0.00
骨格筋	0.00	1.91	0.32	0.00
骨髓	0.00	1.73	6.34	0.00
胸腺	1.86	18.95	56.64	0.00
脾臓	0.00	5.08	9.09	0.29
リンパ節	0.00	6.04	32.09	2.19
結腸(上行)	0.81	3.24	0.21	0.01
胃	0.00	11.99	18.82	26.24
小腸	0.00	8.66	9.02	2.84
結腸癌腫 SW480	0.00	1.85	0.00	0.00
結腸癌腫*(SW480転移)SW620	0.18	2.42	0.00	10.88
結腸癌腫 HT29	0.00	1.75	0.87	0.00
結腸癌腫 HCT-116	2.72	10.37	2.47	0.00
結腸癌腫 CaCo-2	21.92	21.76	3.93	0.00
結腸癌腫 HCT-15	1.99	4.97	4.61	9.67
結腸癌腫 HCC-2998	0.00	1.15	11.58	0.00
胃癌腫*(肝臓転移)NCL-N87	91.38	3.06	85.86	100.00
膀胱	0.00	15.93	29.32	0.00
尿管	0.00	7.03	32.09	40.61
腎臓	7.59	8.90	8.66	0.02
腎臓(胎児)	46.65	55.86	32.09	2.19
腎臓癌腫 786-0	0.00	96.59	28.13	0.00
腎臓癌腫 A498	0.00	65.52	40.90	0.00
腎臓癌腫 RXF 393	0.00	27.74	18.82	0.00
腎臓癌腫 ACHN	0.00	65.07	5.79	0.00
腎臓癌腫 UO-31	0.00	41.75	17.31	0.00
腎臓癌腫 TK-10	0.00	56.64	8.84	0.00
肝臓	0.13	3.30	11.99	2.76
肝臓(胎児)	0.05	2.35	2.32	0.00
肝臓癌腫(胚芽細胞腫) HepG2	14.66	0.02	0.00	0.27
肺	7.75	8.02	42.93	0.04
肺(胎児)	81.79	11.91	100.00	0.01
肺癌腫(小細胞) LX-1	1.61	1.35	11.34	48.97
肺癌腫(小細胞) NCI-H69	0.04	4.15	0.00	0.00
肺癌腫(小細胞変異体) SEP-77	0.32	0.36	0.00	0.00
肺癌腫(大細胞) NCI-H460	0.00	26.98	0.41	0.00
肺癌腫(非小細胞) A549	0.13	7.13	0.78	0.00
肺癌腫(非小細胞) NCI-H23	0.00	7.08	2.38	0.00
肺癌腫(非小細胞) HOP-62	0.00	15.82	1.30	0.00
肺癌腫(非小細胞) NCI-H522	1.31	5.37	15.28	0.00
肺癌腫(鱗状) SW 900	0.00	17.08	17.08	0.00
肺癌腫(鱗状) NCI-H596	0.02	8.66	0.00	0.00
乳腺	0.23	45.06	55.10	31.86
乳房癌腫*(胸水) MCF-7	0.00	0.00	4.15	8.30
乳房癌腫*(胸水)MDA-MB-231	0.00	15.07	0.83	0.00
乳房癌腫*(胸水) T47D	3.61	5.33	8.72	57.83
乳房癌腫 BT-549	0.00	65.07	97.94	0.00
乳房癌腫 MDA-N	0.00	25.70	0.00	0.00
卵巣	0.28	39.50	14.97	3.52
卵巣癌腫 OVCAR-3	7.48	32.31	1.24	0.21
卵巣癌腫 OVCAR-4	8.78	32.99	1.03	6.93
卵巣癌腫 OVCAR-5	0.00	35.60	36.10	0.73
卵巣癌腫 OVCAR-8	0.00	20.03	13.58	1.04

(表21の続き)

卵巢癌腫	IGROV-1	0.04	47.96	13.68	0.00
卵巢癌腫	*(腹水) SK-OV-3	0.00	47.63	3.87	0.00
子宮筋層		1.03	23.49	19.08	0.16
子宮		8.48	9.94	19.08	0.29
胎盤		0.00	23.82	4.97	0.05
前立腺		0.29	6.75	46.98	0.65
前立腺癌腫	*(骨転移) PC-3	0.00	37.63	7.86	0.00
精巣		6.25	23.82	17.19	0.00
黒色腫	Hs688(A).T	0.00	23.00	44.44	0.00
黒色腫	*(転移) Hs688(B).T	0.00	25.35	38.69	0.00
黒色腫	UACC-62	0.00	23.00	0.02	0.00
黒色腫	M14	0.00	36.10	1.13	0.00
黒色腫	LOX IMVI	0.00	100.00	0.01	0.00
黒色腫	*(転移) SK-MEL-5	0.00	10.88	0.10	0.00
黒色腫	SK-MEL-28	0.00	79.00	11.91	0.00
黒色腫	UACC-257	0.00	0.00	0.00	0.00
		TM 407F	TM 418 F	TM 371	TM 416 F

クローンAMF - 1 ~ AMF - 10の定量的発現パターンを、多数の正常および腫瘍のサンプル細胞および細胞株において、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM (登録商標) 7700配列検出システムにおいて実施される、リアルタイムの定量PCR (TaqMan (登録商標)) によって評価した。表22は、AMF - 3、AMF - 7、AMF - 8、およびAMF - 10の発現パターンを示す。

【0416】

【表22】

表22. 細胞および組織におけるAMF-Xの発現

正常組織および腫瘍組織	AMF-10	AMF-8	AMF-3	AMF-7
相対的発現 (%)				
内皮細胞	0.00	0.58	0.02	0.39
内皮細胞 (処置された)	0.00	0.23	0.09	0.57
脾臓	0.08	3.15	0.17	0.21
脾臓癌腫 CAPAN 2	0.00	0.62	0.10	1.64
脂肪	0.47	8.13	2.47	0.00
副腎	0.00	2.47	0.64	0.51
甲状腺	0.00	7.54	1.31	0.53
唾液腺	0.00	4.54	1.69	0.45
下垂体	0.01	19.75	0.04	0.08
脳 (胎児)	0.00	20.03	41.18	3.35
脳 (全体)	0.00	37.89	0.01	3.52
脳 (扁桃)	0.00	20.45	15.28	0.96
脳 (小脳)	0.00	100.00	100.00	1.92
脳 (海馬)	0.00	22.53	28.52	6.61
脳 (視床下部)	0.00	76.31	4.24	1.28
脳 (黒質)	0.00	30.57	22.69	1.67
脳 (視床)	0.00	29.32	9.21	2.43
脊髄	0.00	35.11	1.76	0.59
CNS癌腫(膠/星状) U87-MG	0.00	8.66	0.01	1.49
CNS癌腫(膠/星状) U-118-MG	100.00	2.18	0.01	3.52
CNS癌腫(星状) SW1783	4.15	1.61	0.00	1.16
CNS癌腫* (神経; 転移) SK-N-AS	0.00	38.42	0.95	9.41
CNS癌腫(星状) SF-539	0.00	3.61	0.00	1.12
CNS癌腫(星状) SNB-75	0.00	23.98	0.00	1.45

(表22の続き)

CNS癌腫(膠) SNB-19	0.00	33.68	0.48	1.03
CNS癌腫(膠) U251	0.18	9.41	0.12	0.88
CNS癌腫(膠) SF-295	0.00	11.83	0.00	0.41
心臓	0.00	11.27	0.36	0.25
骨格筋	0.00	0.54	0.48	0.11
骨髄	0.00	1.88	0.06	1.35
胸腺	0.00	6.84	0.66	3.77
脾臓	0.00	8.25	0.12	0.42
リンパ節	0.00	2.78	0.11	0.50
結腸(上行)	0.00	2.90	2.12	0.23
胃	0.00	9.02	1.23	0.39
小腸	0.00	8.30	0.42	1.73
結腸癌腫 SW480	0.00	0.32	0.02	1.60
結腸癌腫*(SW480転移)SW620	0.00	0.52	0.18	3.59
結腸癌腫 HT29	0.00	0.49	0.05	2.98
結腸癌腫 HCT-116	0.00	1.15	3.26	58.64
結腸癌腫 CaCo-2	0.00	5.40	2.21	4.77
結腸癌腫 HCT-15	0.00	1.39	0.32	2.74
結腸癌腫 HCC-2998	0.00	0.93	0.15	3.96
胃癌腫*(肝臓転移)NCL-N87	0.00	1.27	9.61	2.94
膀胱	0.13	5.79	1.50	0.00
気管	0.00	8.54	0.77	1.91
腎臓	0.00	5.11	1.10	0.20
腎臓(胎児)	0.00	22.69	5.11	3.13
腎臓癌腫 786-0	0.00	1.10	0.01	2.54
腎臓癌腫 A498	0.00	1.30	0.00	2.19
腎臓癌腫 RXF 393	0.00	1.04	0.00	0.60
腎臓癌腫 ACHN	0.00	0.44	0.00	1.33
腎臓癌腫 UO-31	0.00	0.85	0.04	0.56
腎臓癌腫 TK-10	0.00	1.17	0.12	2.94
肝臓	0.00	2.76	0.14	2.78
肝臓(胎児)	0.00	2.24	0.22	3.52
肝臓癌腫(胚芽細胞腫) HepG2	0.00	1.29	0.71	1.70
肺	0.00	1.41	0.56	0.01
肺(胎児)	0.00	11.27	16.27	1.92
肺癌腫(小細胞) LX-1	0.00	0.83	0.32	3.24
肺癌腫(小細胞) NCI-H69	0.00	8.84	1.51	5.48
肺癌腫(小細胞変異体) SHP-77	0.00	1.88	6.98	100.00
肺癌腫(大細胞) NCI-H460	0.00	1.39	43.53	6.93
肺癌腫(非小細胞) A549	0.00	1.41	0.05	0.84
肺癌腫(非小細胞) NCI-H23	0.00	1.10	0.84	2.21
肺癌腫(非小細胞) HOP-62	0.00	1.24	0.09	0.23
肺癌腫(非小細胞) NCI-H522	0.00	2.35	0.40	15.39
肺癌腫(鱗状) SW 900	0.00	1.51	0.78	3.37
肺癌腫(鱗状) NCI-H596	0.00	4.09	1.21	7.80
乳腺	0.00	17.31	1.18	0.43
乳房癌腫*(胸水) MCF-7	0.00	1.87	0.08	6.75
乳房癌腫*(胸水)MDA-MB-231	0.00	0.76	0.00	1.71
乳房癌腫*(胸水) T47D	0.00	0.98	0.94	1.47
乳房癌腫 BT-549	0.00	2.74	0.19	18.30
乳房癌腫 MDA-N	0.00	4.61	0.17	13.68
卵巣	0.00	3.08	0.63	0.68
卵巣癌腫 OVCAR-3	0.00	0.61	1.57	1.63
卵巣癌腫 OVCAR-4	0.00	1.00	0.80	1.17

(表22の続き)					
卵巣癌腫	OVCA-5	0.00	0.75	0.45	4.97
卵巣癌腫	OVCA-8	0.00	0.80	0.14	2.19
卵巣癌腫	IGROV-1	0.00	0.50	0.09	1.10
卵巣癌腫	*(腹水) SK-OV-3	0.03	0.63	0.10	3.67
子宮筋腫		0.00	13.40	1.34	0.07
子宮		0.00	6.52	1.36	0.44
胎盤		3.59	21.02	0.37	2.19
前立腺		0.00	27.36	1.16	0.40
前立腺癌腫	*(骨転移) PC-3	0.00	1.81	7.48	18.05
精巣		0.36	56.64	1.82	21.76
黒色腫	Hs688(A).T	0.00	1.62	0.00	0.33
黒色腫	*(転移) Hs688(B).T	0.20	0.94	0.08	0.04
黒色腫	UACC-62	0.00	0.54	0.00	0.12
黒色腫	M14	0.00	1.94	0.56	1.25
黒色腫	LOX IMVI	0.00	2.12	0.10	33.68
黒色腫	*(転移) SK-MEL-5	0.00	0.96	0.16	2.21
黒色腫	SK-MEL-28	0.00	1.81	0.01	4.04
黒色腫	UACC-257		0.00	0.00	9.02
		TM 361 F	TM 415 T	TM 208 F	TM 221 F

TaqMan分析を、AMF - 5およびAMF - 9に対してもまた行った。

【0417】

(等価物)

特定の実施形態を本明細書中に詳細に開示したが、これは、説明のみの目的で、例としてなされたものであり、そして添付の特許請求の範囲の範囲に対して限定することは意図されない。特に、本発明者らによって、種々の状況、変更および改変が、特許請求の範囲によって規定される本発明の意図および範囲から逸脱することなくなされ得ることが、意図される。核酸の出発物質、目的のクローン、またはライブラリーの型の選択は、本明細書中に開示された実施形態の知識を有する当業者に対して、慣習的事項であると考えられる。他の局面、利点、および改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内であると考えられる。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCI/US 01/10892
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K14/47	C07K14/705 C07K14/745 C07K14/485 C07K14/54
	C07K14/475	C07K14/51 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/18
	G01N33/68	C12Q1/68 G01N33/50 A61K38/16
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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) SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE SWISS-PROT [Online] Swiss institute of Bioinformatics; 1 June 1994 (1994-06-01) ZHANG, H. ET AL.: retrieved from EBI, accession no. P35556 Database accession no. P35556 XP002186021 abstract	1-13
A	--- DATABASE EM EST [Online] EMBL; 31 December 1998 (1998-12-31) STRAUSBERG, R. ET AL.: "Human cDNA clone IMAGE:2009218 3", similar to fibrillin 1 precursor" retrieved from EBI, accession no. AI341180 Database accession no. AI341180 XP002186022 abstract	1-13
	---	---
	-/--	
<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		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 18 December 2001		Date of mailing of the international search report 03 4 02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-8040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer De Kok, A

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/US 01/10892

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EM EST [Online] EMBL; 5 May 1999 (1999-05-05) STRAUSBERG, R. ET AL.: "Human cDNA clone IMAGE:2310224 3', similar to fibrilin 1 precursor" retrieved from EBI, accession no. AI652723 Database accession no. AI652723 XP002186023 abstract ---	1-13
A	--- WD 88 09797 A (US COMMERCE) 15 December 1988 (1988-12-15) the whole document ---	1-24, 26-49
A	--- US 5 449 753 A (KRUTZSCH HENRY ET AL) 12 September 1995 (1995-09-12) the whole document ---	1
A	--- WD 99 61060 A (UNIV MONTREAL (CA)) 2 December 1999 (1999-12-02) abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/10892**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 26-37 and 48, 49 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 25 completely and 1-24 and 26-49 partially
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 8.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-49 partially

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: Invention 1: claims 1-49 partially

An isolated polypeptide having the aminoacid sequence of SEQ.ID.No.2; an isolated nucleic acid encoding said polypeptide having the sequence of SEQ.ID.No.1; a vector comprising said nucleic acid; a cell comprising said vector; an antibody against said polypeptide and the use of said polypeptide, nucleic acid and antibody in the therapy and diagnosis of diseases

2. Claims: Inventions 2-10: claims 1-49 partially

As invention 1, but for SEQ.ID.No. 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 (and corresponding polynucleotide sequences) respectively.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 25 completely and 1-24 and 26-49 partially

Present claims 1-24 and 26-49 relate to an extremely large number of possible polypeptides and polynucleotides encoding said polypeptides as well as their use. In fact, the claims contain so many variants and possible permutations of those polypeptides resp. polynucleotides that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely to a polypeptide having an amino acid sequence identified by SEQ.ID.No. 2 and to a polynucleotide having a nucleotidesequence identified by SEQ.ID.No. 1 and their use.

Present claim 25 relates to the use of a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely by its ability to modulate the activity of the polypeptide of claim 1. The claim covers all compounds 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 NONE of such compounds. 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 compound 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, NO search has been carried out for this claim.

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 01/10892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8809797	A	15-12-1988	AU 614755 B2 12-09-1991
			AU 1803488 A 04-01-1989
			CA 1310902 A1 01-12-1992
			EP 0362278 A1 11-04-1990
			IL 86577 A 10-06-1993
			JP 2851288 B2 27-01-1999
			JP 4502143 T 16-04-1992
			US 5604106 A 18-02-1997
			WO 8809797 A1 15-12-1988
			US 5449753
AU 675927 B2 27-02-1997			
AU 3439893 A 03-08-1993			
CA 2128215 A1 22-07-1993			
DE 69329190 D1 14-09-2000			
DE 69329190 T2 23-05-2001			
DK 629238 T3 18-12-2000			
EP 0629238 A1 21-12-1994			
ES 2150937 T3 16-12-2000			
GR 3034725 T3 31-01-2001			
JP 7505050 T 08-06-1995			
PT 629238 T 31-01-2001			
WO 9314202 A1 22-07-1993			
US 5731167 A 24-03-1998			
US 6084069 A 04-07-2000			
WO 9961060	A	02-12-1999	AU 3806699 A 13-12-1999
			WO 9961060 A1 02-12-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P	7/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P	3/00		29/00	4 C 0 8 5
	7/00		35/00	4 C 0 8 6
	29/00		43/00	1 0 5
	35/00			1 1 1
	43/00	1 0 5		
		1 1 1		
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K	14/47	
	16/18		16/18	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/15	
	1/19		1/19	
	1/21		1/21	
	5/10	C 1 2 Q	1/02	A
C 1 2 Q	1/02		1/68	Z
	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	D
	33/50		33/53	M
	33/53		33/566	
	33/566	C 1 2 P	21/08	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
		A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 フェルナンデス, エルマ
 アメリカ合衆国 コネチカット 06405,
 ブランフォード, フローレンス ロード
 77, ナンバー2

- (72)発明者 タウピアー , レイモンド ジェイ . ジュニア
 アメリカ合衆国 コネチカット 06512 ,
 イースト ハイブン , ホルムズ スト
 リート 47
- (72)発明者 クイン , ケリー イー .
 アメリカ合衆国 コネチカット 06790 ,
 トリントン , グリーンフィールド ド
 ライブ 51
- (72)発明者 スパイテク , キンバリー アン
 アメリカ合衆国 コネチカット 06511 ,
 ニュー ハイブン , コート ストリー
 ト 28 , ナンバー 1
- (72)発明者 ラステリ , ルカ
 アメリカ合衆国 コネチカット 06437 ,
 ギルフォード , ペPPERブッシュ レ
 ーン 52
- (72)発明者 ハーマン , ジョン エル .
 アメリカ合衆国 コネチカット 06437 ,
 ギルフォード , バーンシェド レーン
 78

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA01
 CA04 CA11 DA02 DA05 DA11
 EA02 EA03 EA04 FA02 GA01
 GA11 HA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ01 QQ42
 QQ52 QR08 QR33 QR42 QR55
 QR59 QR62 QR74 QR80 QR82
 QS05 QS25 QS34 QS36 QX02
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y
 AB01 AB02 BA01 BA08 CA24
 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01
 BA20 BA21 BA22 BA23 CA53
 DC50 NA14 ZA512 ZB112
 ZB212 ZB262 ZC022 ZC212
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC04
 CC05 DD22 DD23 DD33 DD36
 DD41 DD43 DD61 EE01
 4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04
 NA14 ZA51 ZB11 ZB21 ZB26
 ZC02 ZC21
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 BA41 CA40 DA00 DA76 EA20
 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	AMF-1至AMF-10蛋白质和编码该蛋白质的核酸		
公开(公告)号	JP2003529358A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2001572586	申请日	2001-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	ヴェルネコリーヌアーエム バージェスキャサリンイー フェルナンデスエルマ タウピアレーモンドジェイジュニア クインケリーイー スパイテクキンバリーアン ラステリルカ ハーマンジョンエル		
发明人	ヴェルネ, コリーヌ アー. エム. バージェス, キャサリン イー. フェルナンデス, エルマ タウピア, レイモンド ジェイ. ジュニア クイン, ケリー イー. スパイテク, キンバリー アン ラステリ, ルカ ハーマン, ジョン エル.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7052 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/00 A61P7/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/485 C07K14/51 C07K14/54 C07K14/705 C07K14/745 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
FI分类号	A61K31/7052 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P3/00 A61P7/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD33 4C085/DD36 4C085/DD41 4C085/DD43 4C085/DD61 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC02 4C086/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/194314 2000-04-03 US		

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本文公开了编码多肽的新型人核酸序列。还公开了由这些核酸序列编码的多肽，与该多肽免疫特异性结合的抗体，以及上述多肽，多核苷酸或抗体的衍生物，变体，变体或片段。有待完成。本发明进一步公开了用于诊断，治疗和预防涉及这些新型人核酸和蛋白质中的任何一种的疾病的治疗，诊断和研究方法。